Л.Страйер

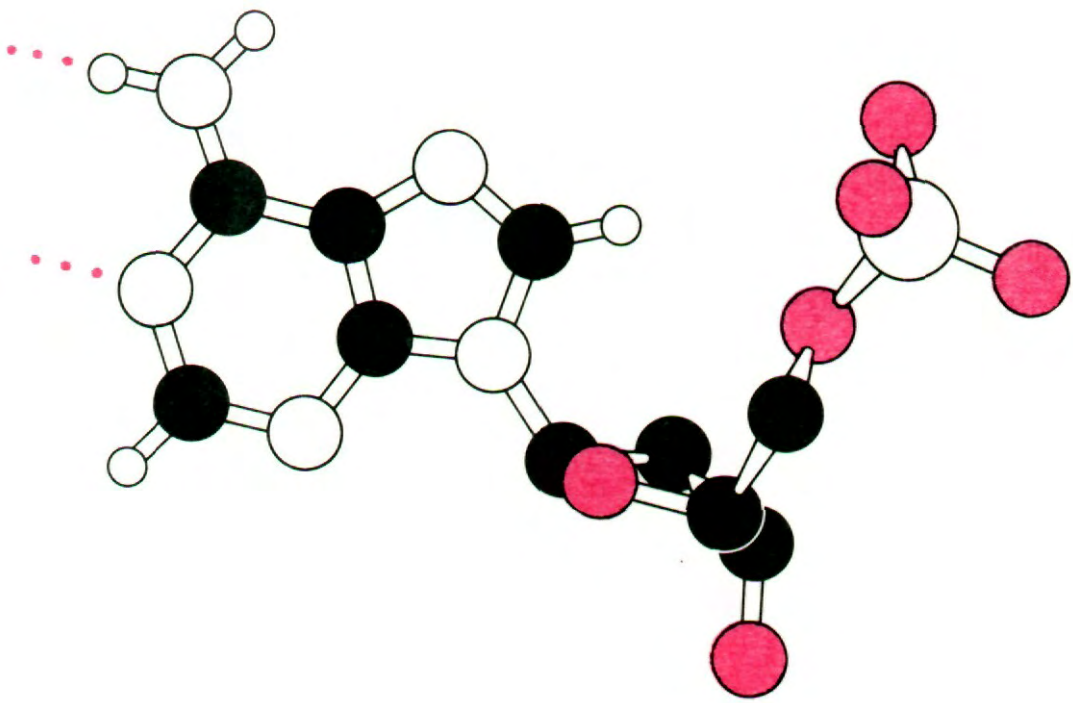
БИОХИМИЯ

Second Edition

BIOCHEMISTRY

Lubert Stryer
Stanford University

W.H.Freeman and Company
San Francisco



Л.Страйер

В 3-х томах

БИОХИМИЯ

Перевод с английского канд. биол. наук М.Д.Гроздовой
и канд. биол. наук А.М.Колчинского

Под редакцией академика С.Е.Северина

том 3

Москва «Мир»
1985

ББК 28.072
С 83
УДК 577.1

Страйер Л.

С 83 Биохимия: В 3-х т. Т.3 Пер. с англ.- М.: Мир, 1985,- 400 с., ил.

В книге ученого из США на самом современном научном уровне рассмотрены основные проблемы биохимии и молекулярной биологии.

Третий том посвящен хранению, передаче и реализации генетической информации, а также молекулярным основам ряда физиологических процессов (иммунной защите, действию гормонов, транспорту веществ в клетке, работе биологических мембран).

Предназначена для биохимиков, молекулярных биологов, физиологов, химиков, медиков, для студентов, аспирантов и преподавателей биологических, химических и медицинских специальностей.

С $\frac{2001040000\text{-}372}{041(01)\text{-}85}$ **св. пл. подп. изд., 1985**

ББК 28.072
57.04

Редакция литературы по биологии

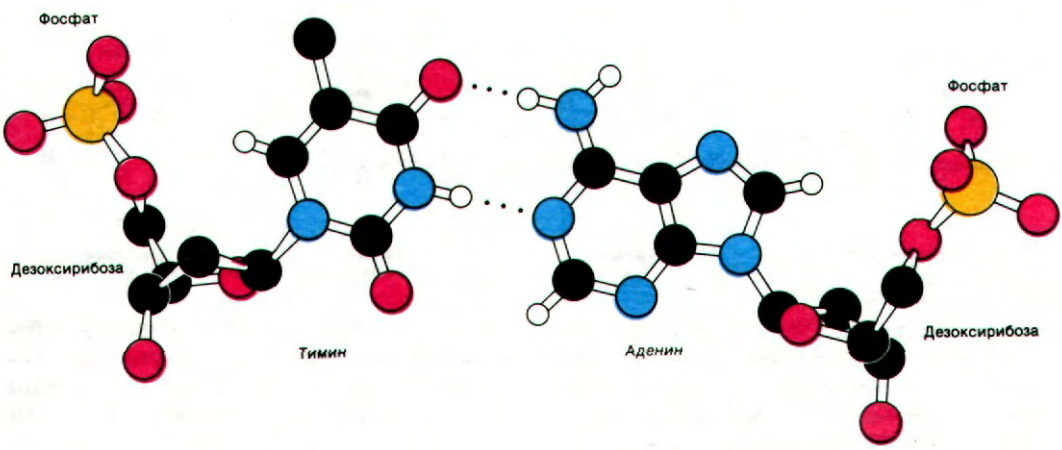
© 1975, 1981 by Lubert Stryer

© перевод на русский язык, «Мир», 1985

Часть IV

Информация

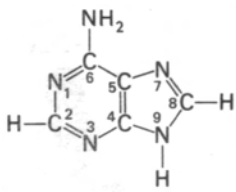
Хранение, передача и экспрессия генетической информации



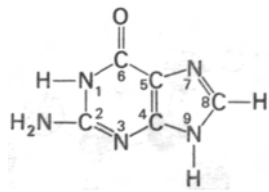
Модель пары дезоксирибонуклеотидных мономеров двойной спирали ДНК. В этой паре аденин связан водородной связью с тимином.

ГЛАВА 24
ДНК: генетическая роль, структура и репликация

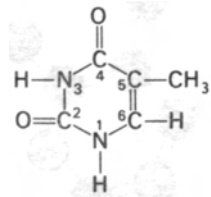
Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) - молекула наследственности. ДНК - очень длинная нитевидная молекула, состоящая из большого числа рибонуклеотидов. *Пуриновые и пиримидиновые основания ДНК несут генетическую информацию, тогда как сахарные и фосфатные группы выполняют структурную роль.* В настоящей главе обсуждаются структура, генетическая роль и репликация ДНК, причем основное внимание уделяется ДНК прокариот, так как эти организмы устроены проще и подчиняются общим для всех организмов законам. Хромосомы эукариотических клеток рассматриваются в гл. 29.



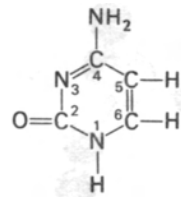
Аденин (A)



Гуанин (G)



Тимин (T)



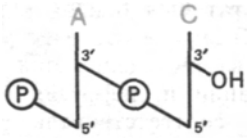
Цитозин (C)

24.1. Ковалентная структура и номенклатура ДНК

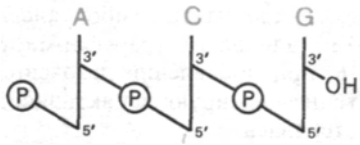
Остов ДНК имеет одинаковое строение на всем протяжении молекулы. Он состоит из остатков дезоксирибозы, связанных фосфодиэфирными мостиками. 3'-гидроксильная группа остатка сахара одного дезоксирибонуклеотида соединена с 5'-гидроксильной группой соседнего сахара фосфодиэфирной связью. *Вариабельной* в ДНК является последовательность оснований. ДНК содержит четыре типа оснований: два пуриновых основания - *аденин* (A) и *гуанин* (G); два пиримидиновых основания - *тимин* (T) и *цитозин* (C). Строение цепи ДНК показано на рис. 24.2.

Строение ДНК можно изобразить и более кратким путем. В этом случае для обозначения четырех основных нуклеотидов используются следующие символы:

Вертикальные линии в приведенных символах соответствуют остаткам сахара, буквы A, G, C и T - основаниям. Диагональная линия с символом Ⓟ (на схеме, приведенной ниже), обозначает фосфодиэфирную связь. Эта диагональная линия соединяет конец одной вертикальной линии с серединой другой. Точки соединения соответственно означают 5'-OH- и 3'-OH-группы. В приведенном ниже примере символ Ⓟ указывает, что дезоксиаденилат связан с дезоксицитидином фосфодиэфирным мостиком. 3'-OH-группа дезоксиаденилата присоединена к 5'-OH-группе дезоксицитидина через фосфорильную группу:

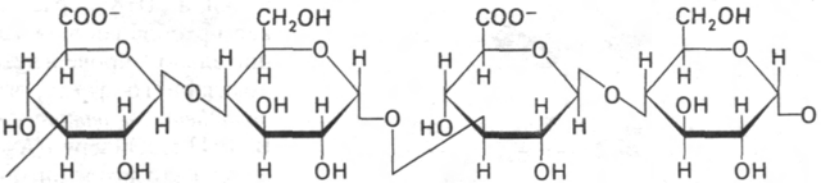


Предположим теперь, что с дезоксицитидином этого динуклеотида связан дезоксигуанилат. Соответствующий тринуклеотид можно представить следующим образом:



Сокращенное обозначение этого тринуклеотида - pApCpG или ACG.

бактерий. Они вызывают пневмонию у человека и других чувствительных млекопитающих. Мутанты, лишенные полисахаридной оболочки, не патогенны. Бактерии дикого типа обозначают буквой S (от англ. smooth - гладкий), так как они образуют гладкие колонии, а мутантные бактерии, не имеющие капсулы,- буквой R (от англ. rough - шероховатый), так как они образуют шероховатые колонии. У одной группы R-мутантов отсутствует фермент дегидрогеназа, превращающий UDP-глюкозу в UDP-глюкуронат. Фермент необходим для синтеза капсульного полисахарида, который у этих пневмококков состоит из чередующейся последовательности остатков глюкозы и глюкуроната:



Цепь ДНК характеризуется полярностью. Один конец цепи несет 5'-OH-группу, а другой - 3'-OH-группу, которая не связана с другим нуклеотидом. Согласно принятым сокращениям, символ ACG означает, что свободная 5'-OH-группа принадлежит дезоксиаденозину, а свободная 3'-OH-группа - дезоксигуанозину. Итак, *последовательность оснований пишется в направлении 5'—>3'.* Напомним, что аминокислотная последовательность белка пишется в направлении от N-концевой аминокислоты к C-концевой аминокислоте. Следует отметить, что ACG и GCA - разные соединения, точно так же, как Glu-Phe-Ala отличается от Ala-Phe-Glu.

24.2. Трансформация пневмококков с помощью ДНК показала, что гены состоят из ДНК

Бактерии пневмококки сыграли важную роль в открытии генетической функции ДНК.

Пневмококки обычно окружены слизистой блестящей полисахаридной капсулой. Этот наружный слой имеет существенное значение для проявления патогенности

В 1928 г. Фред Гриффит (Fred Griffith) обнаружил, что непатогенный R-мутант можно *трансформировать* в патогенную S-форму следующим путем. Он инъецировал мышам смесь живых бактерий R-формы и убитых нагреванием пневмококков S. Поразительное открытие Гриффита состояло в том, что эта смесь вызывала гибель мышей, хотя ни живые R-пневмококки, ни убитые нагреванием S-пневмококки мышей не убивали. Кровь погибших мышей содержала живые S-пневмококки. Следовательно, убитые нагреванием S-пневмококки каким-то образом трансформировали живые R-пневмококки в живые S-пневмококки. Это изменение было стабильным: трансформированные пневмококки давали патогенное потомство S-формы. Затем было установлено, что такая трансформация R—>S может происходить *in vitro.* Некоторые клетки в растущей культуре R-формы трансформировались в S-форму при добавлении *бесклеточного экстракта* убитых нагреванием пневмококков S. Это открытие заложило основу для

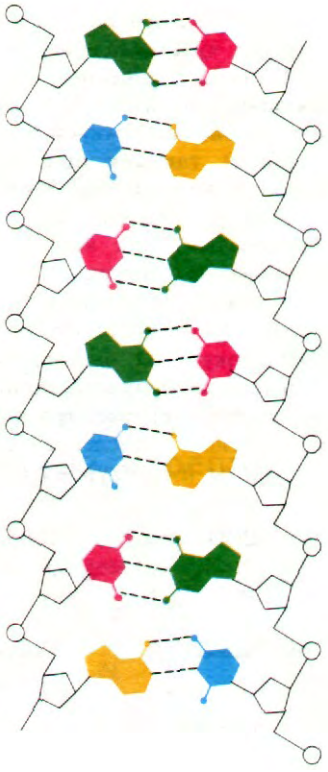


Рис. 24.1. Схема структуры ДНК. Сахарофосфатный остов показан черным цветом, а пуриновые и пиримидиновые основания разноцветные. (Kornberg A., The synthesis of DNA; Scientific American, Inc., 1968.)

изучения химической природы трансформирующего начала.

Исследователи стали фракционировать бесклеточный экстракт убитых нагреванием пневмококков S и определять трансформирующую активность его компонентов (рис. 24.3). В 1944 г. Освальд Эйвери, Колин Мак-Леод и Маклин Мак-Карти (Oswald Avery, Colin MacLeod, Maclyn McCarty) опубликовали результаты своей работы. Оказалось, что «нуклеиновая кислота *дезоксирибозного типа - основное действующее начало трансформирующего экстракта пневмококка типа III*.» Экспериментальные доказательства этого заключения состояли в следующем: 1) при элементном химическом анализе очищенного, высокоактивного трансформирующего начала результат был близок к расчетному для ДНК; 2) оптические, электрофоретические свойства, поведение при ультрацентрифугировании и диффузия очищенного материала соответствовали свойствам ДНК; 3) при экстрагировании белков или липидов не происходило потери трансформирующей активности; 4) трипсин и химотрипсин не влияли на трансформирующую активность; 5) рибонуклеаза (которая, как известно, гидролизует рибонуклеиновую кислоту) не влияла на трансформирующее начало; 6) при добавлении дезоксирибонуклеазы трансформирующая активность, наоборот, терялась.

Эта работа - памятная веха в истории биохимии. До 1944 г. считалось, что генетическую информацию несут хромосомные белки, а ДНК играет вторичную роль. Такая преобладающая точка зрения была решительно опровергнута открытием строго доказанного факта, что *очищенная ДНК обладает генетической специфичностью.* В 1943 г. Эйвери (Avery) живым языком описал это исследование и его последствия

Рис. 24.2. Строение одной цепи ДНК. Показана часть цепи.

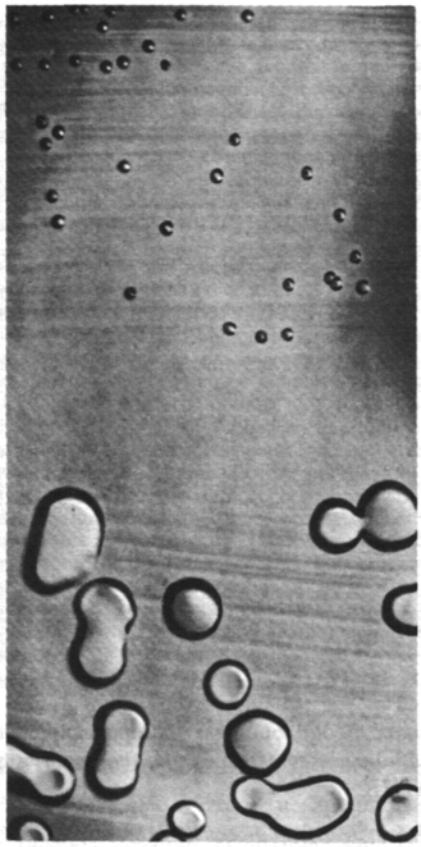


Рис. 24.3. Трансформация непатогенного пневмококка R (мелкие колонии) и возникновение патогенного пневмококка S (крупные блестящие колонии) под действием ДНК из убитых нагреванием пневмококков S. [Avery O. T., MacLeod C. M., McCarty M., J. Exp. Med., 79, 158 (1944).]

в письме, направленном брату в другой университет (рис. 24.4).

Новое подтверждение генетической роли ДНК было получено при изучении одного вируса (бактериофага), заражающего *E. coli*. Бактериофаг Т2 состоит из сердцевины (ДНК), заключенной в белковую оболочку. В 1951 г. Роджер Херриот (Roger Herriott) предположил, что «вирус, очевидно, действует, как крошечный шприц для подкожных инъекций, наполненный трансформирующим началом; вирус как таковой никогда не проникает в клетку; только отросток вступает в контакт с клеткой-хозяином и, возможно, ферментативно проделывает небольшое отверстие в наружной мембране (рис. 24.5). Затем нуклеиновая кислота из головки вируса перетекает внутрь клетки». Чтобы проверить это предположение Альфред Херши и Марта Чейз (Alfred Hershey, Martha Chase) поставили следующий опыт. Фаговую ДНК пометили радиоактивным изотопом ^{32}P, а белковую оболочку - изотопом ^{35}S. Эти метки весьма специфичны, так как ДНК не содержит серы, а в белковой оболочке нет фосфора. Культуру *E. coli* заразили меченным фагом, который за непродолжительное время инкубации прикреплялся к бактерии. Суспензию обрабатывали в течение нескольких минут в гомогенизаторе Уоринга при 10000 об/мин. В этих условиях зараженные фагом клетки подвергались воздействию значительных сил сдвига, которые разрушали связи между вирусами и бактериями. Затем суспензию центрифугировали, чтобы осадить бактерии на дно пробирки. Полученный осадок содержал зараженные бактерии, а надосадочная фракция - более мелкие частицы. Исследуя содержание ^{32}P и ^{35}S в осадке и надосадочной фракции, определяли локализацию фаговой ДНК и белка оболочки. В результате были получены следующие данные.

1. Большая часть фаговой ДНК обнаруживалась в бактериях.

2. Большая часть фагового белка обнаруживалась в надосадочной фракции.

3. Обработка в гомогенизаторе почти не влияет на способность зараженных бактерий продуцировать вирусное потомство.

Дополнительные эксперименты показали, что менее 1% ^{35}S было перенесено из родительских фаговых частиц фаговому потомству; 30% родительской ^{32}P-метки, наоборот, обнаруживалось в потомстве. Эти простые, убедительные эксперименты показали, что *фаг Т2 можно физически разделить на генетическую и негенетическую части...* Серусодержащий белок покоящихся фаговых частиц содержится только в защитной оболочке, которая обеспечивает прикрепление фаговой частицы к бактериальной клетке и функционирует в качестве приспособления для введения фаговой ДНК в клетку. Этот белок, возможно, не несет никакой функции, необ-

В течение последних двух лет, вначале с Мак-Леодом, а в настоящее время с д-ром Мак-Карти, я пытаюсь выяснить, какова химическая природа того вещества в бактериальных экстрактах, которое вызывает это специфическое изменение. В неочищенном экстракте бактерий типа III полно капсульных полисахаридов, углевода С (соматического), нуклеопротеинов, свободных нуклеиновых кислот дрожжевого и тимусного типа, липидов и других клеточных компонентов. Попробуй найти в таких сложных смесях активное начало! Попробуй выделить и химически идентифицировать именно то вещество, которое само, придя в соприкосновение с R-клетками типа II, заставляет их вырабатывать капсульный полисахарид типа III и приобрести все аристократические особенности того самого типа клеток, из которых был приготовлен экстракт! Вот это работа, полная проблем и неожиданных затруднений. Но, ВОЗМОЖНО, мы наконец достигли своего.

...Если окажется, что мы правы - а это, разумеется, очень весомое «если»,- тогда можно считать, что нам известна и химическая природа индуцирующего начала, и химическая структура вещества, которое в результате образуется. Первое - это тимусная нуклеиновая кислота, второе - полисахарид типа III. Оба они впоследствии воспроизводятся в дочерних клетках, и через бесчисленное множество переносов без повторного добавления индуцирующего агента можно выделить то же самое активное и специфичное трансформирующее начало в количестве, значительно превышающем то, которое было использовано в самом начале для индуцирования реакции. Это напоминает вирус. Возможно, это - ген. Но механизм явления меня сейчас не интересует. Всему свое время, и первым шагом должно быть выяснение химической природы трансформирующего начала. Остальные вопросы пусть решает кто-нибудь еще. Конечно, с каждым шагом работа обрастает трудностями. Она затрагивает биохимию нуклеиновых кислот тимусного типа, которые, как известно, составляют основную часть хромосом, но которые до сих пор считали сходными независимо от их происхождения. Она затрагивает генетику, энзимологию, клеточный метаболизм и синтез углеводов. Но сегодня, только располагая множеством надежно обоснованных данных, можно убедить кого бы то ни было в том, что натриевая соль дезоксирибозной нуклеиновой кислоты, свободная от белка, могла бы обладать специфической биологической активностью. Именно такие данные мы и пытаемся теперь получить. Тут хватает всяких веселеньких неожиданностей, чтобы пойти на дно, но разумнее справиться с ними самому, прежде чем кто-нибудь другой попытается это сделать.

Рис. 24.4. Из письма Освальда Эйвери брату Рою, написанного в мае 1943 г. (Из статьи Hotchkiss R. D. In: Phage and the Origin of Molecular Biology, J. Cairns, S. Stent, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1966, pp. 185-186.)

ходимой для роста фаговых частиц внутри клетки. ДНК же выполняет какую-то функцию в размножении фага. Представленные эксперименты не позволяют сделать более далеко идущие выводы относительно химической природы наблюдаемых явлений».

Осторожный тон этого вывода не должен умалять его значения. Вскоре генетическая роль ДНК стала общепризнанной. Эксперименты Херши и Чейз убедительно подтвердили факты, открытые восемью годами раньше Эйвери, Мак-Леодом и Мак-Карти на другой системе. Дополнительные доказательства были получены при исследовании содержания ДНК в отдельных клетках. Они показали, что для данного вида *содержание ДНК одинаково во всех клетках с диплоидным набором хромосом. Гаплоидные клетки имеют вполовину меньше ДНК.*

24.3. Гены некоторых вирусов состоят из РНК

Гены всех прокариотических и эукариотических организмов построены из ДНК, гены вирусов - из ДНК или из РНК. Вирус табачной мозаики, заражающий листья

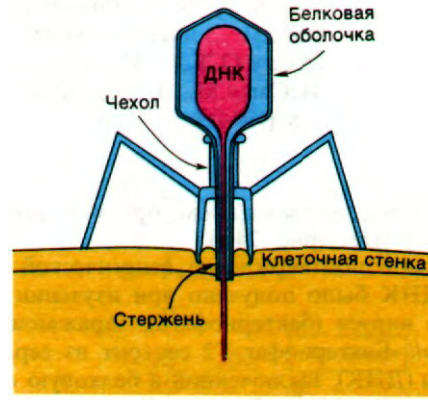


Рис. 24.5. Схема бактериофага Т2, вводящего свою ДНК в бактериальную клетку. (Wood W.B., Edgar R.S., Building a Bacterial Virus, Scientific American. Inc., 1967.)

растений табака,- один из наиболее изученных РНК-содержащих вирусов. Он образован одной молекулой РНК, окруженной белковой оболочкой из 2130 одинаковых субъединиц (обсуждение структуры и сборки вирусов см. в гл. 30). Обработав вирус фенолом, можно отделить белок от РНК. *Изолированная вирусная РНК инфекционна, тогда как изолированный белок лишен инфекционности.* Использование синтетических гибридных вирусных частиц еще раз показало, что генетическая специфичность вируса заключается только в его РНК. Существует множество штаммов вируса табачной мозаики. Был получен синтетический гибридный вирус из РНК штамма 1 и белка штамма 2. Другой такой вирус был приготовлен из РНК штамма 2 и белка штамма 1. После заражения клетки гибридным вирусом *вирусное потомство всегда состояло из РНК и белка, соответствующих специфичности РНК гибридного вируса, использованного для заражения.*

24.4. Двойная спираль ДНК Уотсона-Крика

В 1953 г. Джеймс Уотсон и Френсис Крик (James Watson, Francis Crick) установили трехмерную структуру ДНК и сразу же предложили возможный механизм ее репликации. Это блестящее достижение стоит в ряду важнейших событий в истории биологии, так как оно открыло путь к пониманию функции гена на молекулярном уровне. Уотсон и Крик проанализировали картины дифракции рентгеновских лучей на нити ДНК (рис. 24.6), полученные Розалиндой Франклин и Морисом Уилкинсом (Rosalind Franklin, Maurice Wilkins), и предложили структурную модель, которая в основных своих чертах оказалась верной. Характерные особенности этой модели сводятся к следующему.

1. Две спиральные полинуклеотидные цепи закручены вокруг общей оси. Цепи направлены в противоположные стороны (рис. 24.7).

2. Пуриновые и пиримидиновые основания расположены внутри спирали, а остатки фосфата и дезоксирибозы - снаружи (рис. 24.8). Плоскости оснований перпендикулярны оси спирали. Плоскости остатков сахара расположены почти под прямым углом к основаниям.

3. Диаметр спирали 20 А. Расстояние между соседними основаниями вдоль оси спирали 3,4 А, они повернуты относительно друг друга на 36°. Таким образом, на один виток спирали каждой из цепей приходится 10 нуклеотидов, что соответствует 34 А.

4. Две цепи удерживаются вместе водородными связями между парами оснований. Аденин всегда спаривается с тимином, гуанин - с цитозином (рис. 24.9 и 24.10).

5. На последовательность оснований в полинуклеотидной цепи не накладывается никаких ограничений. *Определенная последовательность оснований несет конкретную генетическую информацию.*

Важнейшее свойство двойной спирали - специфичность спаривания оснований. Исходя из стерических ограничений и способности к образованию водородных связей, Уотсон и Крик постулировали, что аденин

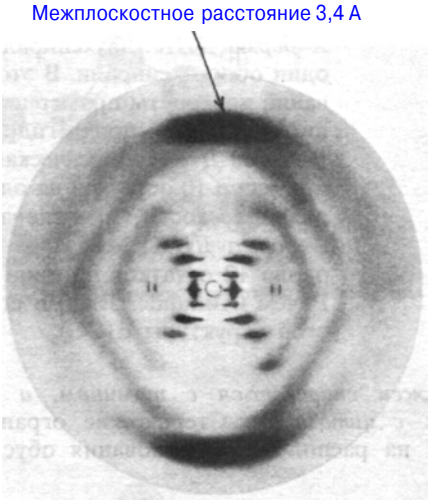


Рис. 24.6. Фотография дифракции рентгеновских лучей на влажной нити ДНК (В-форма). Крест в середине картины характерен для спиральной структуры. Интенсивные меридианальные рефлексы возникают в результате дифракции на стопке пар оснований, расположенных на расстоянии 3,4 А друг от друга. (Печатается с любезного разрешения д-ра Maurice Wilkins.)

Формы ДНК -

A-форма ДНК: двухспиральная ДНК, содержащая примерно 11 остатков на один оборот спирали. В этой правозакрученной спирали плоскости пар оснований повернуты примерно на 20° относительно перпендикуляра к оси спирали. Образуется при дегидратации B-формы ДНК.

B-форма ДНК: классическая уотсон-криковская двойная спираль, содержащая примерно 10 остатков на один оборот спирали. В этой правозакрученной спирали плоскости пар оснований перпендикулярны оси спирали.

Z-форма ДНК: левозакрученная двухспиральная форма ДНК, содержащая около 12 остатков на один оборот. Эта структура предложена Александром Ричем (Alexander Rich) и его сотрудниками на основе изучения кристаллической структуры $d(CG)_3$.

должен спариваться с тимином, а гуанин - с цитозином. Стерические ограничения на расположение основания обусловлены периодическим строением спиральной структуры сахарофосфатного остова обеих полинуклеотидных цепей. Гликозидные связи, которыми присоединяется к остову пара оснований, отстоят друг от друга на расстояние 10,85 А (рис. 24.11). Пара пиримидин—пурин прекрасно укладывается в это пространство. В то же время для двух пуринов этого расстояния недостаточно. Для двух пиримидинов места более чем достаточно, но они оказались бы слишком далеко друг от друга, чтобы образовать водородные связи. Следова-

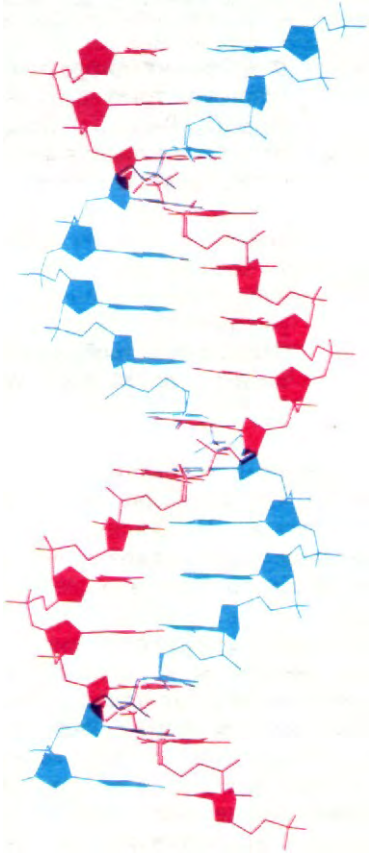


Рис. 24.7. Схема модели двухспиральной ДНК. Вся структура повторяется через 34 А, что соответствует 10 остаткам в каждой цепи.

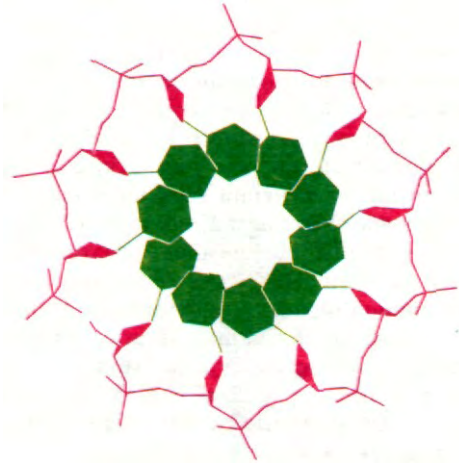


Рис. 24.8. Схема одной из цепей двойной спирали ДНК (вид по оси спирали). Основания - в данном случае только пиримидины - расположены внутри, а сахарофосфатный остов - снаружи. Отчетливо видно, что структура имеет ось симметрии десятого порядка. Основания обозначены зеленым цветом, сахара - красным.

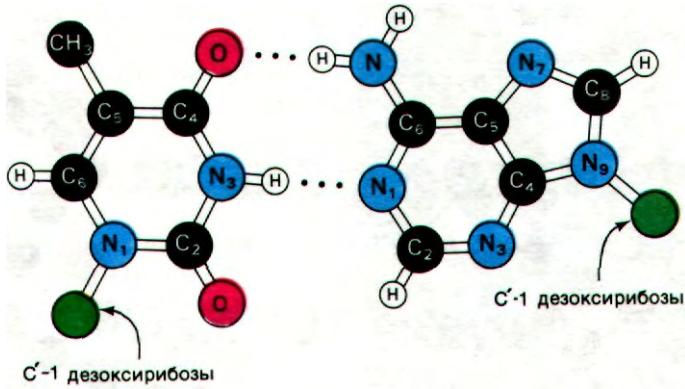


Рис. 24.9. Модель пары оснований аденин—тимин.

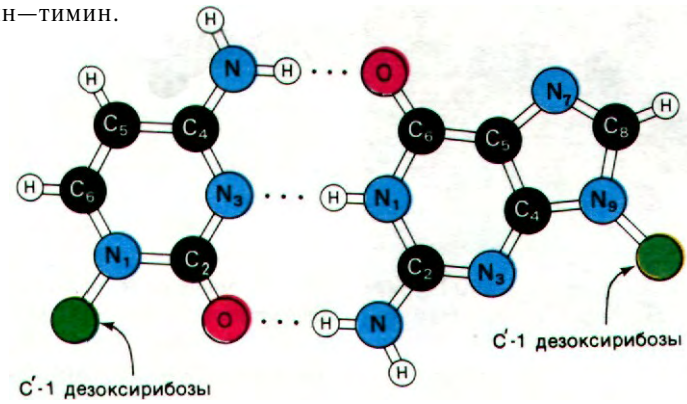


Рис. 24.10. Модель пары основании гуанин—цитозин.

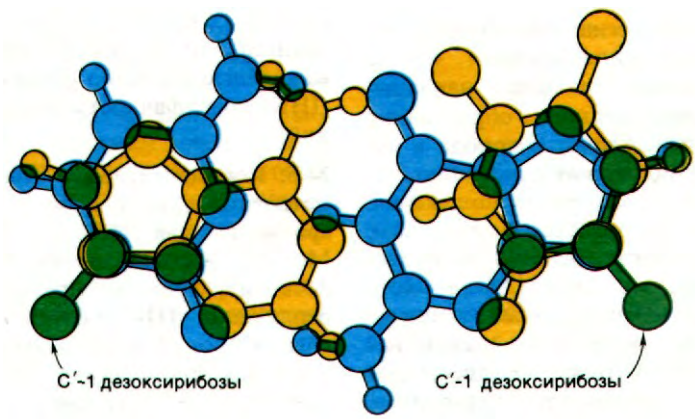


Рис. 24.11. Наложение AT-пары оснований (обозначена желтым цветом) на GC-пару (обозначена синим цветом). Обратите внимание, что положения гликозидных связей и C'-1 атома дезоксирибозы (обозначен зеленым) в двух типах пар оснований почти одинаковы.

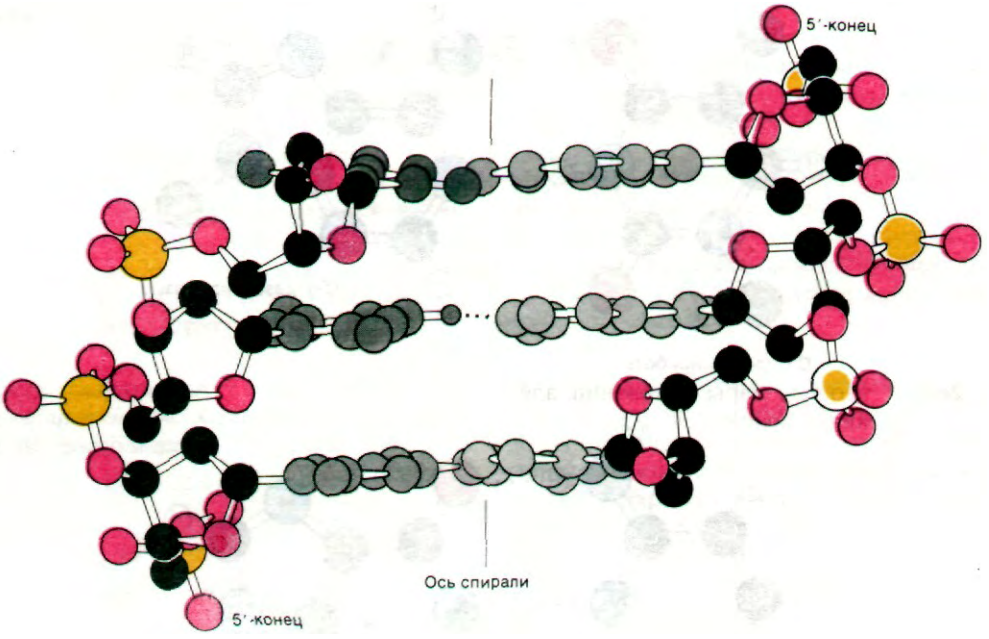


Рис. 24.12. Модель двухспиральной молекулы ДНК. Показаны три пары оснований. Обратите внимание, что две цепи ориентированы в противоположном направлении.

тельно, одно из оснований в паре в двойной спирали ДНК всегда должно быть пурином, а другое - пиримидином. Кроме того, на спаривание оснований накладывают ограничения правила образования водородных связей. Атомы водорода в пуриновых и пиримидиновых основаниях занимают вполне определенные положения. Аденин не может спариваться с цитозином, так как тогда на месте одной связи оказалось бы два атома водорода, а на месте другой - ни одного. Точно так же гуанин не может связываться с тимином. Аденин, наоборот, образует с тимином две водородные связи, а гуанин - три водородные связи с цитозином (рис. 24.9 и 24.10). Ориентация этих водородных связей и расстояние между ними оптимальны для сильного взаимодействия между основаниями.

Эта схема спаривания оснований получила убедительное подтверждение в результате проведенных ранее исследований нуклеотидного состава ДНК разных видов. В 1950 гг. Эрвин Чаргафф (Erwin Chargaff) обнаружил, что *соотношение аденина с тимином и гуанина с цитозином у всех исследованных видов было близко к 1.* Значение этого факта оставалось неясным, пока не была предложена модель Уотсона-Крика (рис. 24.12 и 24.13). Только тогда стало понятным, что эта закономерность отражает важнейшее свойство структуры и функции ДНК - специфичность спаривания оснований.

24.5. Комплементарные цепи служат матрицами друг для друга при репликации ДНК

Модель двухспиральной молекулы ДНК позволила сразу же предложить механизм репликации ДНК. Уотсон и Крик опубликовали свою гипотезу через месяц после того, как представили модель структуры ДНК в виде прекрасной статьи, отличавшейся простотой и ясностью.

«Если задан определенный порядок оснований в одной из цепей, можно написать точную последовательность оснований в другой цепи, поскольку спаривание специфично. Таким образом, каждая из цепей комплементарна другой цепи, и именно это свойство подсказывает, каким образом может удваиваться молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты.

Прежние дискуссии о самоудвоении всегда опирались на представление о некой матрице или каком-то шаблоне. Предполагалось, что матрица копирует непосредственно самое себя, или должна образовывать «негатив», который в свою очередь действует в качестве матрицы и образует исходный «позитив». Ни в одном случае не было предложено детального объяснения, как это могло бы происходить на уровне атомов и молекул.

В нашей модели дезоксирибонуклеиновой кислоты имеется, по существу, *пара* матриц, причем каждая из них комплементарна другой. Мы полагаем, что перед удвоением водородные связи разрываются и две цепи раскручиваются и расходятся. Затем каждая цепь используется в качестве матрицы для образования на ней новой комплементарной цепи, так что в конце концов у нас будет *две* пары цепей, тогда как раньше была только одна. Более того, при таком способе репликация последовательность пар оснований будет в точности удвоена».

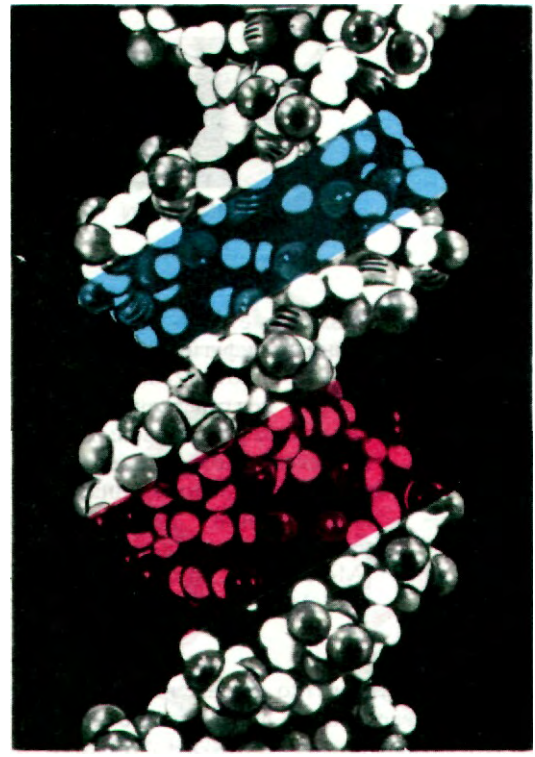


Рис. 24.13. Пространственная модель двойной спирали ДНК. Отчетливо видны большая бороздка (показана красным цветом) и малая бороздка (показана синим цветом). Обратите внимание, что часть каждого основания доступна для взаимодействия с другими молекулами. (Печатается с любезного разрешения д-ра Sung-Hou Kim.)

24.6. Репликация ДНК полуконсервативна Уотсон и Крик предположили, что одна из цепей каждой дочерней молекулы ДНК синтезируется заново, а другая происходит от родительской молекулы ДНК. Такое распределение атомов родительской молекулы называют *полуконсервативным*. Метью Меселсон и Франклин Сталь (Matthew Meselson, Franklin Stahl) поставили принципиально важный эксперимент для проверки этой гипотезы. Родительскую ДНК пометили тяжелым изотопом азота ^{15}N, чтобы сделать ее более тяжелой, чем обычная ДНК. Для этого выращивали *E. coli* в течение многих поколений в среде, содержавшей в качестве единственного источника азота $^{15}NH_4Cl$. Затем бактерии быстро переносили в среду, содержавшую ^{14}N-стабильный изотоп азота. Этот эксперимент должен был показать, как распределяются изотопы ^{14}N и ^{15}N в молекулах ДНК в ходе последующих циклов репликации.

Распределение ^{14}N и ^{15}N в потомстве изучали с помощью только что разработанного метода *равновесной седиментации в градиенте плотности*. Небольшое количество ДНК растворяют в концентрированном растворе хлористого цезия с плотностью, близкой к плотности ДНК ($\sim 1,7$ г/см^3). Этот раствор центрифугируют почти до равновесного состояния. Под действием противодействующих процессов седиментации и диффузии в центрифужной ячейке возникает градиент концентрации хлористого цезия. В результате создается устойчивый градиент плотности от 1,66 до 1,76 г/см^3. Под действием центробежной силы молекулы ДНК переходят в ту область градиента, в которой плотность раствора равна их собственной плавучей плотности. Высокомолекулярная

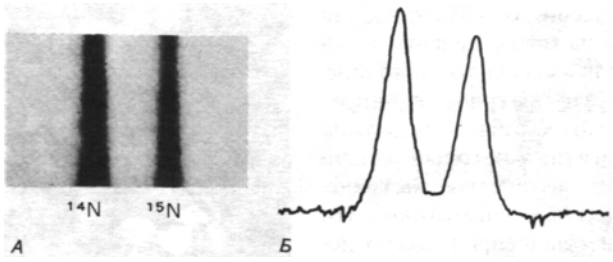


Рис. 24.14. Разделение ^{14}N- и ^{15}N-ДНК при центрифугировании в градиенте плотности. *А* - фотография центрифужной ячейки в ультрафиолетовом свете; *Б* - денситометрическая кривая поглощения, полученная при сканировании фотографии, приведенной на рис. *А*. [Meselson M., Stahl F. W., Proc. Nat. Acad. Sci., 44, 671 (1958).]

ДНК образует четко выраженную полосу, обнаруживаемую по поглощению ультрафиолетового света. Молекулы ^{14}N-ДНК и ^{15}N-ДНК хорошо разделяются в таком градиенте, поскольку их плотность различается примерно на 1% (рис. 24.14).

ДНК выделяли из бактерий через различные промежутки времени после переноса со среды, содержащей ^{15}N, на ^{14}N. Анализ этих образцов центрифугированием в градиенте плотности показал, что после одного цикла репликации ДНК дает одну полосу (рис. 24.15). Плотность этой полосы была равна в точности среднеарифметическому значению между плотностью ^{14}N- и ^{15}N-ДНК. *Отсутствие* ^{15}N-ДНК *свидетельствовало о том, что целостность родительской ДНК в ходе репликации нарушается.* Отсутствие ^{14}N-ДНК показывало, что часть атомов всех дочерних молекул ДНК происходила от родительской ДНК. Соотношение ^{14}N и ^{15}N в дочерних молекулах должно составлять 1:1, так как плотность гибридных молекул ДНК была средней между ^{14}N- и ^{15}N-ДНК.

После двух циклов репликации ДНК распределялась поровну в двух полосах. Одна из них - гибридная ДНК, другая - ^{14}N-ДНК. Меселсон и Сталь сделали из этих убедительных экспериментов вывод, «*что азот молекул ДНК распределяется поровну между двумя физически раздельными структурами, что после удвоения каждая дочерняя молекула получает одну из этих структур и что эти структуры сохраняются интактными в течение многих удвоений*». Полученные результаты прекрасно согласовывались с моделью репликации ДНК Уотсона—Крика (рис. 24.16).

24.7. Некоторые вирусы содержат на определенных стадиях жизненного цикла одноцепочечную ДНК

ДНК не всегда двухцепочечная молекула. Роберт Синсхеймер (Robert Sinsheimer) обнаружил, что ДНК *фага φX174, небольшого вируса, заражающего E. coli, - одноцепочечная молекула.* Несколько экспериментальных фактов привели его к этому неожиданному выводу. Во-первых, соотношение оснований в ДНК фага φX174 не удовлетворяет правилу [A] = [T] и [G] = = [C]. Во-вторых, вязкость раствора ДНК фага φX174 значительно меньше вязкости раствора ДНК *E. coli* той же концентрации. Гидродинамические свойства ДНК фага φX174 соответствуют полимеру в конформации случайного клубка. В отличие от этого ДНК в форме двойной спирали ведет себя гидродинамически как очень жесткая палочка. В-третьих, аминогруппы оснований ДНК фага φX174 легко реагируют с формальдегидом, тогда как основания в двойной спирали ДНК почти недоступны для этого реактива.

Обнаружение этой одноцепочечной ДНК породило сомнения в универсальности схемы полуконсервативной репликации, предложенной Уотсоном и Криком. Однако вскоре было показано, что ДНК фага φX174 находится в одноцепочечном состоянии только на протяжении части жизненного цикла вируса. Синсхеймер обнаружил, что зараженные клетки *E. coli* содержат *двухцепочечную форму ДНК фага*

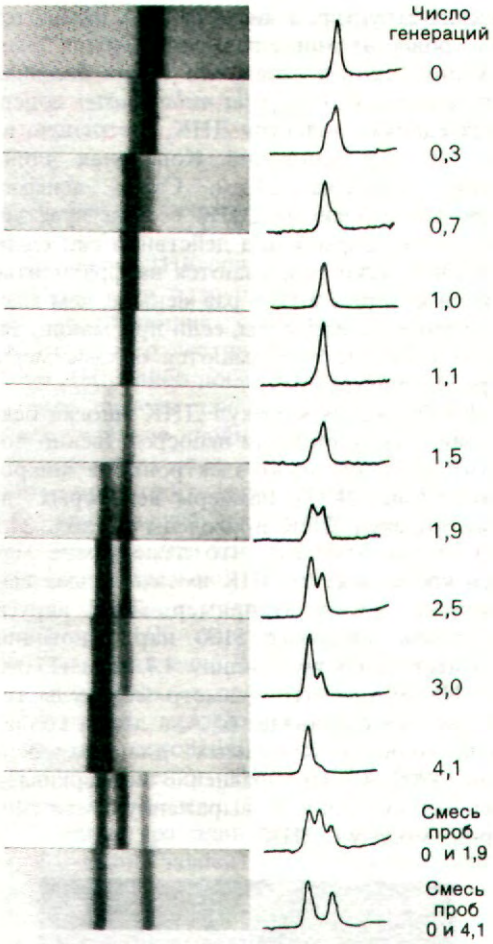


Рис. 24.15. Доказательство полуконсервативной репликации в клетках *E. coli* с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Положение полосы ДНК зависит от содержания ^{14}N и ^{15}N. После 1,0 генерации все молекулы ДНК представляют собой гибриды, содержащие равное количество ^{14}N и ^{15}N. Родительская ДНК (^{15}N) после 1,0 генерации не обнаруживается. [Meselson M., Stahl F.W., Proc. Nat. Acad. Sci., 44, 671 (1958).]

Рис. 24.16. Схема полуконсервативной репликации. Родительская ДНК изображена зеленым, а новосинтезированная - красным. [Meselson M., Stahl F.W., Proc. Nat. Acad. Sci, 44, 671 (1958).]

φX174. Эта двухцепочечная ДНК называется *репликативной формой,* так как она служит матрицей для синтеза ДНК вирусного потомства. Вирусы, содержащие одноцепочечную РНК, также реплици-

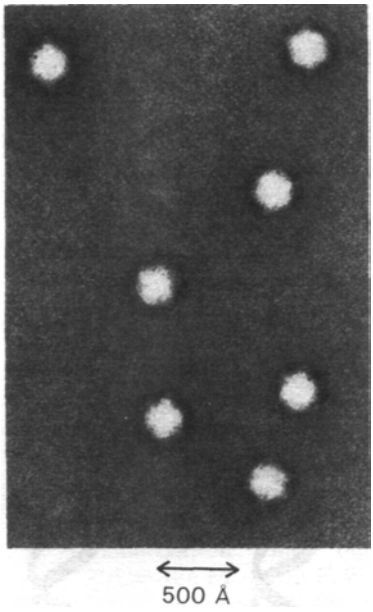


Рис. 24.17. Электронная микрофотография частиц вируса φX174. (Печатается с любезного разрешения д-ра Robley Williams.)

руются через промежуточную двухцепочечную репликативную форму. Механизмы этих процессов подробнее рассматриваются в гл. 30. Здесь же важно лишь подчеркнуть, что эти исследования подтвердили всеобщность схемы репликации Уотсона—Крика. *Двухцепочечная ДНК (или РНК) - репликативная форма всех известных генов.*

24.8. Молекулы ДНК очень длинные

Прежде чем перейти к механизму репликации ДНК, представляющему собой сложный ферментативный процесс, рассмотрим некоторые свойства ДНК. Поразительная особенность молекул ДНК, встречающихся в природе,- их необычайная длина. *Хромосома E. coli представляет собой единую молекулу двухспиральной ДНК, содержащей 4 млн. пар оснований.* Масса этой молекулы ДНК $2{,}6 \cdot 10^6$ кДа. Она имеет *крайне асимметричную форму*: ее контурная длина $14 \cdot 10^6$ А, а диаметр 20 А. Контурная длина (1,4 мм) этой молекулы ДНК соответствует размерам макроскопических структур, а диаметр 20 А находится на уровне атомных размеров. Бруно Зимм (Bruno Zimm) показал, что самая большая хромосома у *Drosophila melanogaster* содержит единую молекулу ДНК, состоящую из $6{,}2 \cdot 10^7$ пар оснований. Контурная длина этой молекулы 2,1 см. Столь асимметричные молекулы ДНК весьма чувствительны к разрыву под действием сил сдвига. Они легко разрываются на фрагменты, масса которых в 1000 раз меньше, чем масса исходной молекулы, если при манипуляциях с ней не принимаются особые меры предосторожности.

Изображения молекул ДНК многих бактерий и вирусов были непосредственно получены с помощью электронного микроскопа (рис. 24.18). Размеры некоторых таких молекул ДНК приведены в табл. 24.1

Следует отметить, что даже самые маленькие молекулы ДНК имеют весьма вытянутую форму. Например, ДНК вируса полиомы содержит 5100 пар оснований и имеет контурную длину 1,7 мкм (17000 А). Напомним, что диаметр молекулы гемоглобина составляет 65 А, а длина коллагена, одного из самых длинных белков,- 3000 А. Это сравнение подчеркивает огромную длину и выраженную асимметрию молекул ДНК.

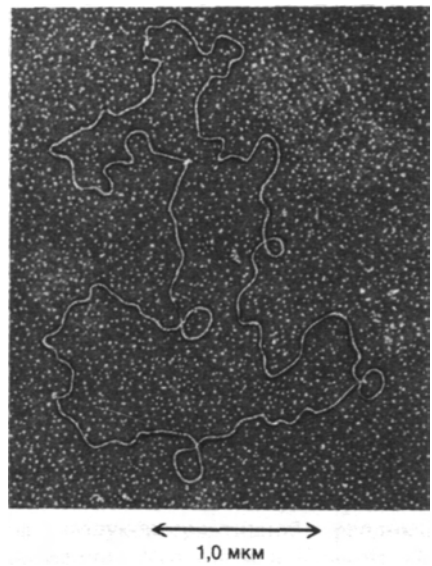


Рис. 24.18. Электронная микрофотография молекулы ДНК бактериофага λ (форма RFII). (Печатается с любезного разрешения д-ра Thomas Broker.)

Для измерения длин молекул нуклеиновых кислот применяется единица длины, равная 1000 пар нуклеотидов в случае двухцепочечных молекул нуклеиновых кислот (т.п.н., или kb - от англ. kilobase) или 1000 нуклеотидов в случае одноцепочечных молекул (т.н., или kb). 1 kb двухцепочечной ДНК имеет контурную длину 0,34 мкм и массу примерно 660 кДа.

24.9. Двойная спираль может быть обратимо расплавлена

Две цепи ДНК-спирали могут легко разойтись, если разрушить водородные связи, соединяющие спаренные основания. Этого можно достичь, либо нагревая раствор ДНК, либо добавляя в раствор кислоту или щелочь для ионизации оснований. Раскручивание двойной спирали называется *плавлением,* так как происходит мгновенно при строго определенной температуре. *Температура плавления* ($T_{пл}$) - это та температура, при которой разрушается половина спиральной структуры. Резкость этого перехода показывает, что двойная спираль ДНК - структура *высококооперативная*. Плавление ДНК легко регистрировать, измеряя ее поглощение при 260 нм. Нарушение межплоскостных взаимодействий пар оснований приводит к увеличению поглощения - эффект, называемый *гиперхромизмом* (рис. 24.19).

Температура плавления молекулы ДНК существенно зависит от ее нуклеотидного состава. Молекулы ДНК, богатые GC-парами оснований, имеют более высокие значения $T_{пл}$, чем молекулы, богатые AT-парами оснований (рис. 24.20). В общем $T_{пл}$

Таблица 24.1. **Размеры некоторых молекул ДНК** (Kornberg A., DNA replication, W. H. Freeman and Co., **1980**, p. **20**)

Организм	Число пар оснований, kb	Контурная длина, мкм
Вирусы		
Полиома или SV-40	5,1	1,7
Фаг λ	48,6	17
Фаг T2	166	56
Вирус коровьей оспы	190	65
Бактерии		
Микоплазма	760	260
E.coli	4000	1 360
Эукариоты		
Дрожжи	13500	4600
Дрозофила	165000	56000
Человек	2900000	990000

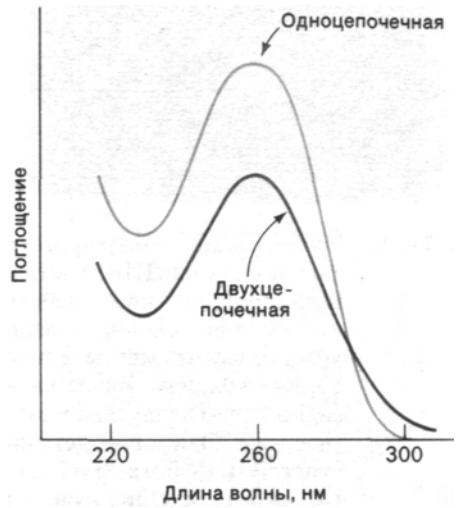


Рис. 24.19. При плавлении двойной спирали, когда она переходит в одноцепочечную форму, поглощение раствора ДНК при 260 нм возрастает.

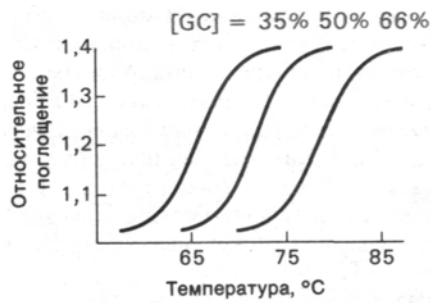


Рис. 24.20. Кривые плавления различных ДНК. На графике отложено относительное поглощение при 260 нм в зависимости от температуры (поглощение при 25°C принято за 1). $T_{пл}$ равна 69°C для ДНК *E. coli* (50% GC-пар) и 76°C для ДНК. *P. aeruginosa* (68% GC-пар).

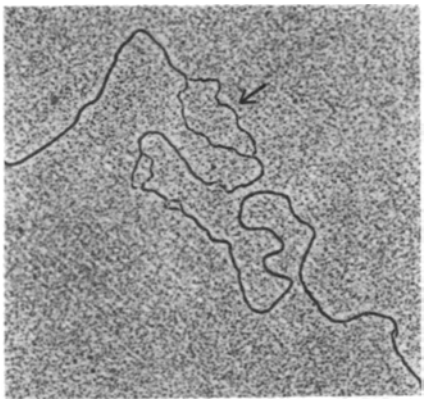


Рис. 24.21. Электронная микрофотография молекулы ДНК, частично расплетенной под действием щелочи. Одноцепочечные участки имеют вид петель, которые окрашены менее интенсивно, чем двухцепочечные участки. Эти расплетенные участки ДНК богаты АТ-парами оснований. Один из них помечен стрелкой. [Inman R. B., Schnos M., J. Mol. Biol., **49**, 93 (1970).]

ДНК многих видов повышается линейно от 77 до 100°С с увеличением содержания GC-пар от 20 до 78%. GC-пары стабильнее АТ-пар, так как в них основания удерживаются вместе тремя водородными связями, а не двумя. *Следовательно, АТ-богатые области ДНК должны плавиться первыми* (рис. 24.21). Как мы увидим ниже, in vivo двойная спираль расплетается под действием специальных белков. Некоторые из них вызывают раскручивание ДНК, гидролизуя АТР (разд. 24.21).

Разделенные комплементарные цепи ДНК спонтанно реассоциируют с образованием двойной спирали, если температура становится ниже $T_{пл}$. Этот процесс ренатурации иногда называют *отжигом*. Скорость реассоциации зависит от концентрации комплементарных последовательностей (разд. 29.10). Легкость, с которой плавятся и реассоциируют двойные спирали, имеет критическое значение для выполнения ДНК ее биологических функций.

24.10. Некоторые молекулы ДНК имеют кольцевую форму

Методом электронной микроскопии было показано, что интактные молекулы ДНК из многих источников замкнуты в кольцо (рис. 24.18). Открытие того факта, что *E. coli* имеет кольцевую хромосому, не было неожиданностью. Оно было предсказано на основе генетических исследований, показавших, что *карта генетического сцепления этой бактерии является кольцевой.* Термин «кольцевая» означает лишь, что цепь ДНК непрерывна, и отнюдь не относится к ее геометрической форме. *In vivo* молекулы ДНК всегда имеют весьма компактную форму. В связи с этим следует отметить, что хромосома *E. coli* примерно в 1000 раз длиннее, чем клетка бактерии.

Не все молекулы ДНК имеют кольцевую форму. Например, ДНК бактериофага Т7 является *линейной.* Молекулы ДНК некоторых вирусов, таких, как бактериофаг λ, *претерпевают взаимопревращения линейной и кольцевой форм.* В вирусной частице присутствует линейная форма, а в клетке-хозяине - кольцевая (разд. 30.16).

24.11. Кольцевые двухспиральные молекулы ДНК могут находиться в суперспирализованном состоянии

При превращении линейной двухцепочечной ДНК в замкнутую кольцевую молекулу она приобретает новое свойство. Джером Виноград (Jerome Vinograd) установил, что ось двойной спирали ДНК может сама быть закручена в *суперспираль.* Эта суперспираль может быть закручена в правую или в левую сторону (рис. 24.22). Термины «суперспирализованная», «сверхскручен-

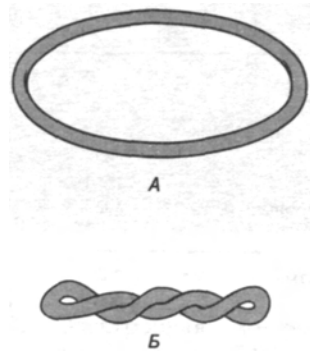


Рис. 24.22. Схематическое изображение релаксированной (*А*) и суперспирализованной (*Б*) ДНК.

ная», «суперспиральная», «суперскрученная» и «сверхспиральная» - синонимы. Кольцевую ДНК, совершенно лишенную суперспиральных витков, называют *релаксированной*. Для того чтобы превратить релаксированную ДНК в суперспирализованную, необходимо затратить определенную энергию. Например, энергия, затрачиваемая на образование 15 суперспиральных витков в одной молекуле ДНК вируса SV-40 (ее контурная длина 1,7 мкм), составляет около 100 ккал/моль. Энергия напряжения суперспирализованной ДНК (энергия суперспирализации) примерно пропорциональна квадрату числа суперспиральных витков.

Суперспирализация, по-видимому, выполняет две биологические функции. Во-первых, *суперспирализованная ДНК имеет более компактную форму, чем релаксированная ДНК такой же длины* (рис. 24.23). Суперспирализация может играть определенную роль в упаковке ДНК. Во-вторых, Суперспирализация может влиять на степень расплетания двойной спирали и, следовательно, на ее взаимодействия с другими молекулами. Точнее, *отрицательная суперспирализация может приводить к раскручиванию двойной спирали*. Интересно отметить, что почти все кольцевые молекулы ДНК, встречающиеся в природе, отрицательно суперспирализованы.

Важная характеристика замкнутой кольцевой ДНК - ее порядок зацепления L (от англ. linking). Число L указывает, сколько раз одна цепь пересекает другую цепь, если их спроецировать на плоскость. Число L должно быть целым. Кручение T (от англ. twisting) и величина суперспирализации W (от англ. writhe) связаны между собой уравнением

$$L = W + T,$$

т.е. находятся в обратной зависимости.

Порядок зацепления - топологическая характеристика; она может изменяться, лишь когда в одну или в обе цепи кольцевой ДНК вносятся разрывы. Действительно, были выделены ферменты, которые каталитически изменяют величину L. Каталитическую активность таких *топоизомераз* легко выявить с помощью гель-электрофореза, так как суперспирализованная ДНК более компактна и поэтому имеет большую подвижность, чем релаксированная ДНК (рис. 24.24).

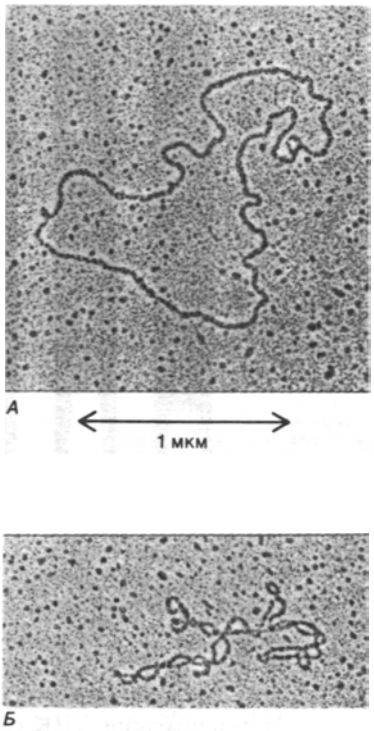


Рис. 24.23. Электронные микрофотографии митохондриальной ДНК: *А* - релаксированная кольцевая форма; *Б* - суперспирализованная кольцевая форма. (Печатается с любезного разрешения д-ра David Clayton.)

24.12. Открытие ДНК-полимеразы

Перейдем теперь к молекулярному механизму репликации ДНК. Артур Корнберг (Arthur Kornberg) и его коллеги в 1955 г. начали поиск фермента, синтезирующего ДНК. Вскоре этот поиск увенчался успехом, главным образом потому, что при планировании экспериментов были приняты три правильных решения, т.е. был сделан правильный выбор между несколькими возможностями.

1. Что представляют собой *активированные предшественники* ДНК? Корнберг и его коллеги сделали правильное предположение, что активированные промежуточные продукты синтеза *ДНК - дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты*. В основе это-

Рис. 24.24. Фотографии гелей, на которых видна релаксация суперспирализованной ДНК вируса SV-40. Дорожка *А* - суперспирализованная ДНК с большим числом отрицательных витков. При инкубации ДНК с топоизомеразой в течение 5 мин (*Б*) и 30 мин (*В*) образуется ряд полос с более низкой степенью суперспирализации. [Keller W., Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 2553 (1975).]

го предположения лежали два соображения. Во-первых, пути биосинтеза пуринов и пиримидинов приводят к образованию нуклеозид-5'-фосфатов (а не нуклеозид-3'-фосфатов). Во-вторых, активированным промежуточным продуктом синтеза пирофосфатной связи в таких коферментах, как NAD^+, FAD и CoA, является ATP.

2. Что может служить критерием *синтеза ДНК*? Предполагалось, что абсолютное количество ДНК, синтезированной в первоначальных экспериментах, должно быть весьма невелико, главным образом из-за обилия нуклеаз. Поэтому нужен был какой-то чувствительный тест. Был разработан такой тест с использованием *радиоактивных нуклеотидов-предшественников*. Включение этих предшественников в ДНК обнаруживали путем измерения радиоактивности *в осадке, полученном после обработки инкубационной смеси кислотой*. В основе этого метода лежит тот факт, что ДНК осаждается кислотами, например трихлоруксусной кислотой, а нуклеотиды-предшественники остаются в растворе.

3. *Какие клетки* следует выбрать для исследования? После того как первоначальные эксперименты с экстрактами животных клеток дали отрицательные результаты, выбор пал на бактерии *E. coli,* поскольку деление этих клеток происходит всего лишь за 20 мин (время генерации), и, следовательно, их можно выращивать в больших количествах. Как и предполагалось, эта бактерия исключительно богата ферментами, участвующими в синтезе ДНК.

Экстракт *E. coli* инкубировали с радиоактивным дезокситимидин-5'-трифосфатом. Радиоактивность этого ^{14}C-меченного предшественника составляла $1 \cdot 10^6$ имп./мин. Радиоактивность осадка, полученного добавлением к инкубационной смеси кислоты, составляла всего 50 имп./мин. Было синтезировано лишь несколько пикомолей ДНК, но этим было положено начало. Корнберг писал: «Хотя количество нуклеотида, включившегося в состав нуклеиновой кислоты, было ничтожным, оно было существенно выше уровня фона. Мы попробовали забить клин в эту узенькую щелку.

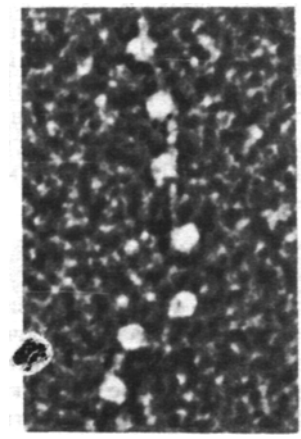


Рис. 24.25. Электронная микрофотография молекул ДНК-полимеразы (сферические структуры), связанных с молекулой ДНК (тонкая нить). (Печатается с любезного разрешения д-ра Jack Griffith.)

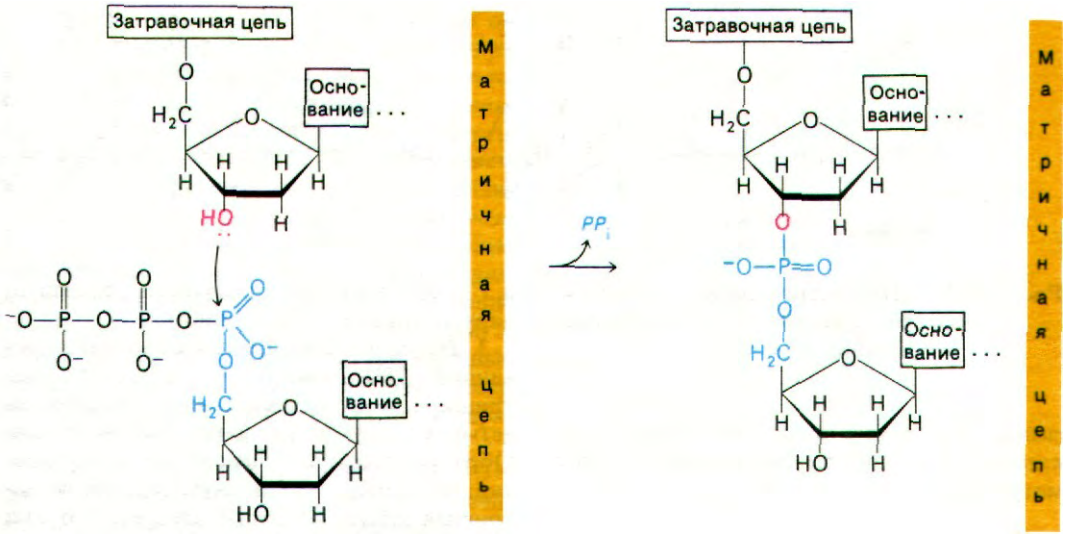


Рис. 24.26. Реакция элонгации цепи, катализируемая ДНК-полимеразой.

Молотком нам служила очистка фермента - метод, отработанный при изучении спиртового брожения».

Этот новый фермент был назван ДНК-полимеразой (рис. 24.25). Теперь его называют *ДНК-полимеразой I,* так как с тех пор были выделены другие ДНК-полимеразы. После десяти лет напряженной работы в лаборатории Корнберга ДНК-полимераза I была очищена до гомогенного состояния и детально охарактеризована. Насколько велики были масштабы проделанной работы, говорит тот факт, что для получения 500 мг чистого фермента необходимо было взять 100 кг клеток *E.coli.*

ДНК-полимераза I - это единая полипептидная цепь с массой 109 кДа. Она катализирует *последовательное присоединение дезоксирибонуклеиновых звеньев к цепи ДНК:*

$$(\text{ДНК})_{n\ \text{остатков}} + \text{dNTP} \rightleftarrows (\text{ДНК})_{n+1} + PP_i$$

Для синтеза цепи ДНК ДНК-полимеразе I необходимы следующие компоненты:

1. В среде должны присутствовать все четыре дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфата: dATP, dGTP, dTTP и dCTP. В дальнейшем мы будем обозначать эти дезоксирибонуклеозидтрифосфаты общим символом dNTP. Кроме того, необходимы *ионы* Mg^{2+}.

2. ДНК-полимераза I присоединяет дезоксирибонуклеотиды к 3'-гидроксильному концу предсуществующей цепи ДНК (или РНК). Другими словами, необходима затравочная цепь, или *затравка,* со свободной 3'-гидроксильной группой.

3. Необходима *матричная* ДНК. Матрицей может служить как одно- так и двухцепочечная ДНК. Двухцепочечная ДНК служит эффективной матрицей лишь в том случае, если ее сахарофосфатный остов разорван в одном или нескольких местах.

Реакция элонгации (удлинения) цепи, катализируемая ДНК-полимеразой, происходит путем *нуклеофильной атаки 3'-ОН-концом матрицы ближайшего к рибозе атома фосфора очередного дезоксирибонуклеозидтрифосфата.* В результате образуется фосфодиэфирный мостик и одновременно высвобождается пирофосфат (рис. 24.26). Последующий гидролиз пирофосфата обеспечивает дальнейшую полимеризацию. Такое смещение общего состояния равновесия было бы невозможно, если бы активированными промежуточными продуктами служили нуклеозиддифосфаты. Именно в этом мы усматриваем убедительную причину преобладания нуклеозидтрифосфатов по сравнению с дифосфатами в качестве активированных предшественников в биосинтетических реакциях. *Элонгация цепи ДНК происходит в направлении 5'—> —>3'* (рис. 24.27). За секунду одна молекула ДНК-полимеразы I присоединяет примерно 10 нуклеотидов. Полимеризация *процес-*

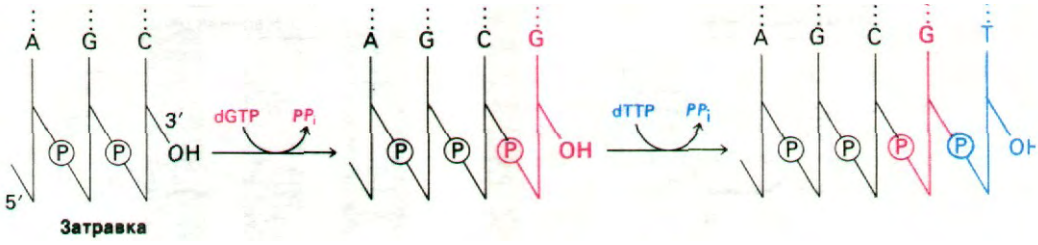


Рис. 24.27. ДНК-полимеразы катализируют рост цепей ДНК в направлении 5'—>3'.

сивна, т. е. фермент присоединяет много нуклеотидов, оставаясь связанным с одной матрицей.

24.13. ДНК-полимераза получает инструкции от матрицы

ДНК-лолимераза катализирует образование фосфодиэфирной связи только в том случае, если основание очередного нуклеотида комплементарно соответствующему основанию матричной цепи. Если же основание очередного нуклеотида не образует уотсон-криковской пары с соответствующим основанием матричной цепи, вероятность образования ковалентной связи очень низка. Следовательно, ДНК-полимераза - *фермент, направляемый матрицей.* Она была открыта первой из ферментов такого типа.

Ряд экспериментов доказывает, что ДНК-полимераза получает инструкции от матрицы.

1. Первым доводом в пользу этого утверждения послужил тот факт, что *значительный синтез ДНК идет только в присутствии всех четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и матричной ДНК,*

2. ДНК-полимераза может включать в ДНК некоторые аналоги оснований. Например, урацил или 5-бромурацил может замещать тимин. Гипоксантин может замещать гуанин. Способность аналогов замещать основания высоко специфична. *Согласно правилу замещения, тот или иной аналог может включаться лишь при условии, что он способен образовать уотсон-криковскую пару с основанием, комплементарным замещаемому основанию.* Так, гипоксантин может замещать G (но не A, T и C), поскольку он образует подходящую пару оснований с цитозином.

3. *Нуклеотидный состав* новосинтезированной ДНК зависит от характера матрицы, а не от относительного количества четырех нуклеотидов-предшественников. Образующаяся ДНК имеет тот же нуклеотидный состав, что и двухспиральная матричная ДНК. Из этого следует, что под действием ДНК-полимеразы реплицируются обе цепи матричной ДНК.

4. Наиболее убедительным доводом служат данные о том, что ДНК фага φX174, реплицированная *in vitro* ДНК-полимеразой I, полностью инфекционна. Следовательно, частота, с которой этот фермент делает ошибки, очень низка.

24.14. ДНК-полимераза I исправляет ошибки в ДНК

ДНК-полимераза обладает еще одним видом ферментативной активности: в определенных условиях она способна расщеплять цепи ДНК. ДНК-полимераза постепенно гидролизует цепь ДНК с 3'-гидроксильного конца. При этом отщепляются мононуклеотиды. Таким образом, *ДНК-полимераза I является также 3'—>5'-экзонуклеазой* (рис. 24.28). Удаляемый нуклеотид должен иметь свободный 3'-ОН-конец и не должен находиться в составе двойной спирали. Является ли такая экзонуклеазная активность фермента нежелательным побочным эффектом, или она каким-то образом участвует в биологическом действии ДНК-полимеразы? Эксперименты с использованием химически синтезированных полинуклеотидов с некомплементарным остатком на конце затравки показали, что *3'—> —>5'-экзонуклеазная активность выполняет в процессе полимеризации функцию редактирования.* Рассмотрим полимер, показанный на рис. 24.28, в котором последовательность остатков dT образует двойную спираль с более длинным полимером dA. На 3'-конце этой poly(dT)-последовательности имеется один остаток dC, который

не образует водородных связей, так как он не комплементарен dA. При добавлении ДНК-полимеразы и dTTP этот некомплементарный остаток dC отщепляется раньше, чем начинается присоединение остатков dT. Эксперименты с использованием множества различных синтетических полимеров показали, что *ДНК-полимераза I всегда удаляет некомплементарные остатки на конце затравки, прежде чем продолжать полимеризацию.* Если на конце находится комплементарное основание и в среде присутствуют активированные предшественники, гидролиза практически не происходит. Полимеризация предотвращает гидролиз с 3'-конца.

По всей вероятности, репликация ДНК идет с высокой точностью, так как *спаривание оснований проверяется дважды.* В тех случаях, когда пара оснований не вмещается в двойной спирали, полимеризация обычно не идет. Однако, если на этом этапе все-таки произойдет ошибка, она может быть исправлена раньше, чем будет присоединен следующий нуклеотид. Таким образом, ДНК-полимераза I проверяет результат каждого проведенного акта полимеризации, прежде чем перейти к следующему.

Кроме того, ДНК-полимераза I может гидролизовать ДНК, начиная с 5'-конца цепи. Эта *5'—>3'-нуклеазная* активность (рис. 24.29) существенно отличается от обсуждавшейся выше 3'—>5'-экзонуклеазной активности. Во-первых, расщепляемая связь должна находиться в двухспиральном участке. Во-вторых, может происходить расщепление как концевой фосфодиэфирной связи, так и связи, расположенной на расстоянии нескольких нуклеотидов от 5'-конца (который может иметь свободную или фосфорилированную гидроксильную группу). В-третьих, 5'—>3'-нуклеазная активность увеличивается, если одновременно идет синтез ДНК. В-четвертых, активный участок 5'—>3'-нуклеазной активности четко отделен от активных участков полимеризации и 3'—>5'-гидролиза. ДНК-полимеразу I можно расщепить протеолитическими ферментами на фрагмент с массой 36 кДа, содержащий всю 5'—> —>3'-нуклеазную активность, и фрагмент с массой 75 кДа, содержащий всю полимеразную и всю 3'—>5'-экзонуклеазную активности. Таким образом, *ДНК-полимераза I содержит по меньшей мере два различных фермента в одной полипептидной цепи. 5'—>3'*-нуклеаза дополняет 3'—> —>5'-экзонуклеазную активность, исправляя ошибки другого рода. Например, 5'—> —>3'-нуклеаза участвует в вырезании пири-

Рис. 24.28. 3'—>5'-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы I.

Рис. 24.29. 5'—>3'-нуклеазная активность ДНК-полимеразы I.

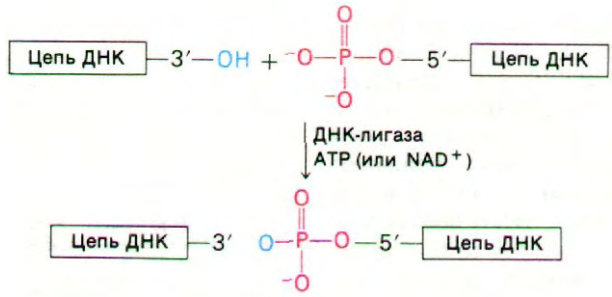


Рис. 24.30. ДНК-лигаза катализирует соединение двух цепей ДНК, входящих в состав одной двухспиральной молекулы.

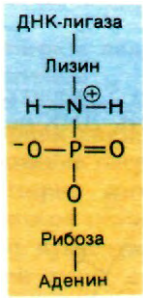


Рис. 24.31. Ковалентный промежуточный комплекс фермент—AMP.

мидиновых димеров, образующихся при облучении ДНК ультрафиолетом (разд. 24.24). Более того, 5'—>3'-нуклеазная активность играет ключевую роль в самой репликации ДНК (разд. 24.19).

24.15. ДНК-лигаза соединяет фрагменты ДНК

ДНК-полимераза I может присоединять дезоксирибонуклеотиды к затравочной цепи, но она не способна катализировать соединение двух цепей ДНК или замыкание одной цепи ДНК. Обнаружение кольцевой ДНК указывало, что такой фермент должен существовать. В 1967 г. в нескольких лабораториях одновременно была открыта *ДНК-лигаза* - фермент, катализирующий образование фосфодиэфирной связи между двумя цепями ДНК (рис. 24.30). Фермент этот активен при наличии *свободной OH-группы на 3'-конце* одной цепи ДНК и фосфатной группы на 5'-конце другой. Образование фосфодиэфирной связи между этими группами - эндергоническая реакция. Следовательно, *для реакции соединения цепей требуется источник энергии.* У *E. coli* и других бактерий *эту роль выполняет* NAD^+, тогда как в клетках животных и зараженных бактериофагом клетках данная реакция осуществляется *за счет энергии ATP.*

Заслуживает внимания и еще один аспект работы ДНК-лигазы: ДНК-лигаза не может соединить две молекулы одноцепочечной ДНК. *Цепи ДНК, соединяемые ДНК-лигазой, должны быть частью двухцепочечной молекулы ДНК.* Исследования модельных систем дают основание думать, что ДНК-лигаза образует фосфодиэфирную связь только в том случае, если вблизи от места разрыва имеется хотя бы несколько пар оснований. В действительности ДНК-лигаза заделывает одноцепочечные разрывы в остове двухспиральной ДНК. Этот процесс необходим для *нормального синтеза ДНК, для репарации поврежденной ДНК и для сращивания (сплайсинга) цепей ДНК при генетической рекомбинации.*

Рассмотрим механизм этой реакции, установленный Робертом Леманом (Robert Lehman). ATP или NAD^+ вступают в реакцию с ДНК-лигазой и образуют *ковалентный комплекс фермент-AMP,* в котором AMP связан с ε-аминогруппой лизинового остатка фермента фосфоамидной связью (рис. 24.31). Остаток *AMP* активирует фосфатную группу на 5'-конце ДНК. Последняя стадия - *нуклеофильная атака активированного атома фосфора 3'-OH-группой.* В результате образуется фосфодиэфирная связь и освобождается AMP. Движущая сила этой последовательности реакций - гидролиз пирофосфата, отщепляющегося при образовании комплекса фермент—аденилат. Таким образом, *на образование фосфодиэфирной связи в остове ДНК расходуют-*

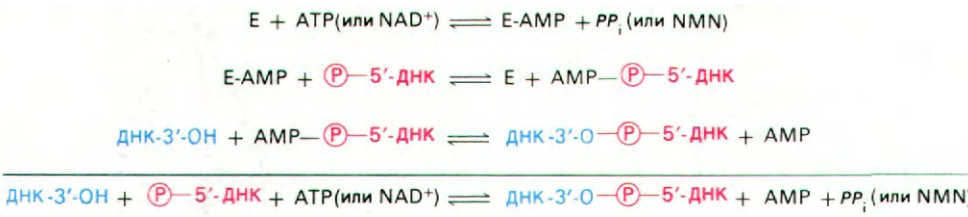


Рис. 24.32. Механизм реакции, катализируемой ДНК-лигазой.

ся две богатые энергией фосфатные связи. если источником энергии служит ATP.

24.16. Открытие ДНК-полимераз II и III

Мы видели, что ДНК-полимераза I может синтезировать и репарировать ДНК *in vitro*. Выполняет ли она эти функции *in vivo*? Вопрос вполне правомерный, так как фермент не всегда способен осуществлять *in vivo* ту реакцию, которую он катализирует *in vitro*. Условия, существующие в клетке, могут отличаться от условий, используемых при постановке опытов *in vitro*, и, кроме того, в клетке могут присутствовать другие ферменты. Действительно, в клетке *E.coli* имеются по меньшей мере две другие ДНК-полимеразы, названные полимеразами II и III, которые были обнаружены примерно через 15 лет после открытия ДНК-полимеразы I. Чем же объясняется такое запаздывание? Дело в том, что активность ДНК-полимераз II и III маскировалась высокой активностью полимеразы I.

Ситуация изменилась в 1969 г., когда Паула Де Лусия и Джон Кэрнс (Paula DeLucia, John Cairns) выделили мутантную форму *E.coli,* в экстракте которого обнаруживалось от 0,5 до 1% нормальной полимеразной активности ДНК-полимеразы I по сравнению с обычными клетками. Этот мутант (обозначенный polA 1) размножался с такой же скоростью, как и родительский штамм. Кроме того, многие фаги размножались в клетках polA 1 так же хорошо, как и в родительских клетках. Однако этот мутант гораздо быстрее погибал под действием ультрафиолетового облучения. К тому же мутант polA 1 был более чувствителен к летальному действию химического мутагена метилметансульфоната. Де Лусия и Кэрнс сделали вывод, что репликация ДНК в клетках полученного ими мутанта polA 1 идет нормально, но репарация ДНК существенно нарушена. Они предположили, что для синтеза ДНК нужна какая-то другая полимераза, отличная от ДНК-полимеразы I.

Низкий фон активности полимеразы I у мутанта polA 1 облегчил поиск новых ДНК-полимераз. Вскоре в нескольких лабораториях были выделены и охарактеризованы два таких фермента. *ДНК-полимеразы II и III подобны полимеразе I в следующих отношениях:*

1. Они катализируют направляемый матрицей синтез ДНК из предшественников дезоксирибонуклеозидтрифосфатов.
2. Для проявления их активности необходима затравка со свободной 3'-OH-группой,
3. Синтез идет в направлении 5'—>3'.
4. Они обладают 3'—>5'-экзонуклеазной активностью. ДНК-полимераза III (но не II) является также 5'—>3'-нуклеазой.

Эти полимеразы различаются по характеру предпочитаемых ими матриц. Для полимераз II и III оптимальными матрицами служат двухцепочечные ДНК, имеющие короткие одноцепочечные пробелы. Полимераза I, наоборот, предпочитает протяженные одноцепочечные участки, соседствующие с двухспиральными участками. Максимальные скорости катализа in vitro для этих ферментов также различаются: полимераза I присоединяет 10 нуклеотидов в секунду, а полимераза II - 0,5 и полимераза III - 150 нуклеотидов в секунду. В физиологически активном состоянии ДНК-полимераза III ассоциирована с некоторыми другими белками. Этот мультисубъединичный комплекс называют *голоферментом ДНК-полимеразы III.*

Какова роль этих полимераз *in vivo*? Вскоре мы расскажем о том, что мультиферментный комплекс, содержащий ДНК-полимеразу III, синтезирует большую часть новообразующейся ДНК, а ДНК-полимераза I удаляет затравку и заполняет пробелы. Роль ДНК-полимеразы II пока не установлена. Проведенные в последнее время био-

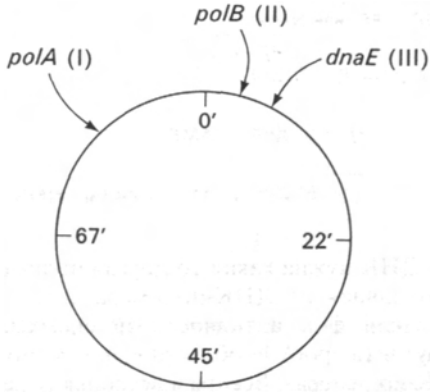


Рис. 24.33. Положение структурных генов трех ДНК-полимераз *E. coli.* Ген ДНК-полимеразы I расположен в локусе *polA,* ген ДНК-полимеразы II - в локусе *polB* и ген ДНК-полимеразы III - в локусе *dnaE.*

химические и генетические исследования показали, что, кроме ДНК-полимераз I и II и ДНК-лигазы, для репликации ДНК в клетке *E.coli* необходимо более 10 белков. Прежде чем рассмотреть взаимодействие этих белков с ДНК, познакомимся в общих чертах с репликацией на уровне целой хромосомы.

24.17. Расплетание родительской ДНК и синтез новой ДНК происходят в репликационной вилке

Изображения ДНК во время репликации были получены с помощью радиоавтографии и электронной микроскопии. При *радиоавтографии* изображение образуется в результате распада подходящего изотопа, например трития. Испускаемые электроны взаимодействуют с гранулами серебра фотографической эмульсии. После проявления пленки возникают черные точки. Метод радиоавтографии имеет довольно низкую разрешающую способность - порядка нескольких сотен ангстрем. Однако у этого метода есть определенное преимущество: он позволяет видеть лишь те молекулы, которые содержат метку. Для того чтобы сделать ДНК видимой при радиоавтографии, в нее включают тимин или тимидин, меченный тритием.

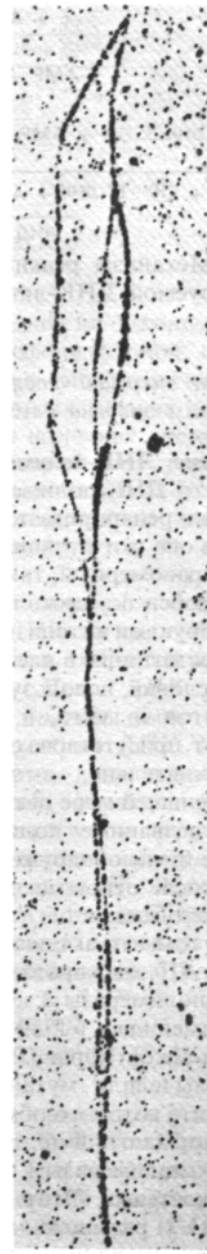


Рис. 24.34. Радиоавтограф реплицирующейся ДНК *E. coli.* (Печатается с любезного разрешения д-ра John Gairns.)

На радиоавтографах и электронных микрофотографиях видно, что реплицирующаяся ДНК *E.coli* имеет форму замкнутого кольца с внутренней петлей (рис. 24.34). Молекулы такой формы называют тета-структурами, так как они напоминают греческую

букву θ (рис. 24.35). Тета-структуры показывают, что *молекулы ДНК сохраняют во время репликации кольцевую форму.* Разрешение этого метода недостаточно велико, чтобы различить свободные концы. Однако очевидно, что длинных нитей одноцепочечной ДНК в молекуле нет. Таким образом, эти изображения позволяют отвергнуть механизм репликации, согласно которому цепи родительской ДНК сначала полностью раскручиваются, и только затем используются в качестве матриц при синтезе новой ДНК. Напротив, *синтез новой ДНК сопряжен с одновременным раскручиванием родительской ДНК.* Участок, где происходит одновременное расплетание и синтез, называется *репликационной вилкой.*

Рис. 24.35. Схематическое изображение кольцевой хромосомы *E. coli* во время репликации. Синими линиями в этой тета-структуре показана родительская ДНК, красными - новообразованная ДНК.

24.18. Репликация ДНК начинается в строго определенном месте и продолжается последовательно в обоих направлениях

Начинается ли репликация ДНК *E.coli* в произвольном месте хромосомы, или же в хромосоме имеется определенный участок инициации? Репликация ДНК - строго регулируемый процесс, поэтому *a priori* кажется гораздо более вероятным, что она начинается в определенном месте. Действительно, как показали работы по определению относительного числа различных генов в условиях быстрого синтеза ДНК, репликация в клетках *E.coli* начинается в одном определенном месте хромосомы. Рассмотрим два гена - *a* и *b.* Предположим, что ген *a* расположен вблизи от точки начала репликации, а ген *b* - вблизи от конца. Тогда ген *a* будет реплицироваться намного раньше, чем ген *b.* В быстро растущей культуре на один ген *b* будет приходиться примерно два гена *a.* Если же, наоборот, репликация ДНК начинается в случайной точке, количество генов *a* и *b* будет одинаковым. Относительное число генов было определено с помощью метода гибридизации, который рассматривается ниже (разд. 25.5). Результаты этих экспериментов ясно показали, что относительное число генов действительно зависит от их положения на карте (рис. 24.36). Эти данные позволили сделать следующие выводы.

1. *Репликация начинается в строго определенном уникальном участке* - вблизи гена *ilv,* локализованного на 74' на стандартной генетической карте *E.coli.*

2. Репликация идет одновременно в обоих направлениях с примерно одинаковой

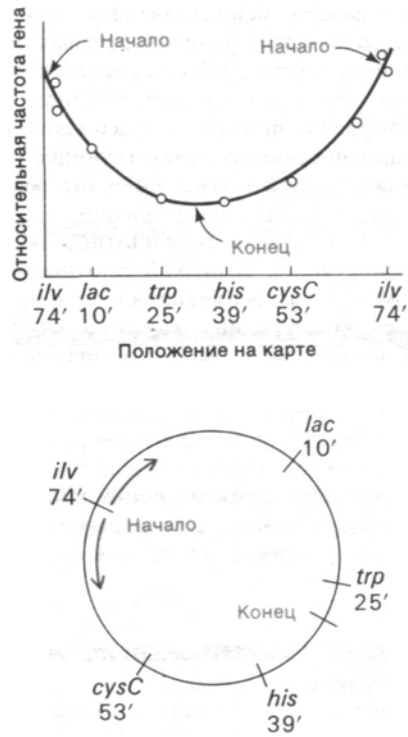


Рис. 24.36. Относительные количества различных генов в условиях быстрого синтеза ДНК у *E. coli* в зависимости от их положения на генетической карте.

скоростью. Другими словами, *существуют две репликационные вилки: одна движется по часовой стрелке, другая - против часовой стрелки.*

3. Две репликационные вилки встречаются вблизи маркера *trp* (25' на генетической карте) - в точке, почти диаметрально противоположной началу репликации.

Еще одно доказательство двунаправленности репликации ДНК у *E.coli* было получено методом радиоавтографии. Для этого вначале репликацию проводили в среде, содержавшей тимин, меченный тритием до *умеренной* удельной радиоактивности. Через несколько минут инкубации бактерии перенесли в среду, содержавшую *высокомеченный* тритием радиоактивный тимин. Пробы с двумя различными уровнями радиоактивности использовались для того, чтобы получить на радиоавтографах два типа цепочек зерен серебра: цепочки с низкой плотностью зерен, соответствующие ДНК, синтезированной вначале, и цепочки с высокой плотностью, соответствующие ДНК, синтезированной позже. Если бы репликация шла в одном направлении, были бы видны цепочки с высокой плотностью зерен на одном конце и низкой плотностью на другом. Если же репликация идет в двух направлениях, середина каждого отпечатка ДНК должна была бы иметь низкую плотность зерна, а концы - высокую (рис. 24.37). Радиоавтографы дали наглядный ответ (рис. 24.38). Цепочки зерен серебра (отпечатки ДНК) во всех случаях имели более высокую плотность зерен на обоих концах, чем посередине, указывая тем самым, что *репликация хромосомы E.coli идет в двух направлениях.*

24.19. Одна цепь ДНК синтезируется прерывисто

Вернемся к взаимодействию молекул при репликации. В области репликационной вилки обе цепи родительской ДНК служат матрицами для синтеза новой ДНК. Напомним, что цепи родительской ДНК антипараллельны. Следовательно, *общее* направление синтеза ДНК должно быть 5'—>3' для одной из дочерних цепей и 3'—>5' для другой (рис. 24.39). Однако все известные ДНК-полимеразы синтезируют ДНК в направлении 5'—>3', а не 3'—>5'. Как же тогда происходит

Рис. 24.37. Предполагаемые результаты радиоавтографии в случае одно- и двунаправленной репликации, если бактерий переносят со среды, содержащей тимин с умеренной радиоактивностью, на среду с высокорадиоактивным тимином.

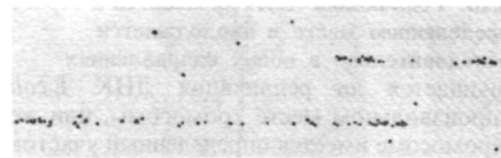


Рис. 24.38. Радиоавтограф ДНК *E. coli* во время репликации (условия опыта указаны в подписи к рис. 24.37). Наблюдаемое распределение зерен серебра показывает, что репликация идет в двух направлениях. [Prescott D. M., Kuempel P.L., Proc. Nat. Acad. Sci, 69, 2842 (1972).]

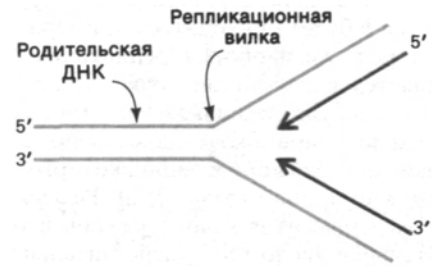


Рис. 24.39. При *низком разрешении кажущееся* направление репликации ДНК будет 5'—>3' для одной дочерней цепи и 3'—>5' для другой. На самом деле обе цепи синтезируются в направлении 5'—>3', как показано на рис. 24.40.

кажущийся (при низкой разрешающей способности метода) рост одной из дочерних цепей в направлении 3'—>5'?

Проблема была решена Рейдзи Оказаки (Reiji Okazaki), который обнаружил, что *значительная часть новосинтезированной ДНК существует в виде коротких фрагментов.* Такие фрагменты длиной около 1000 нуклеотидов (они называются фрагментами Оказаки) существуют в течение непродолжительного времени в непосредственной близости от репликационной вилки. По мере прохождения репликации эти фрагменты соединяются друг с другом ковалентно под действием ДНК-лигазы и образуют одну из дочерних цепей (рис. 24.40). Другая новая цепь синтезируется непрерывно или почти непрерывно. Та цепь, которая образуется из фрагментов Оказаки, называется *отстающей цепью,* а та, что синтезируется без разрывов или почти без разрывов,- *ведущей цепью.* И фрагменты Оказаки, и ведущая цепь синтезируются в направлении 5'—>3'. *Прерывистая сборка отстающей цепи позволяет путем полимеризации в направлении 5'—>3' на атомном уровне получать общий рост цепи в направлении* 3'—>5'.

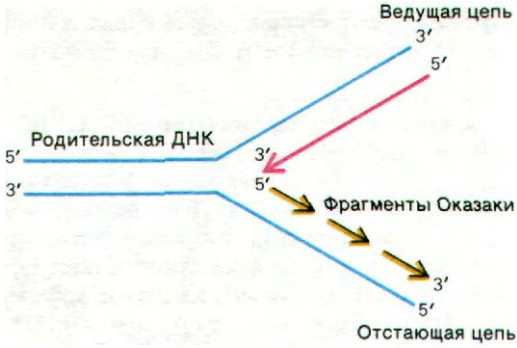


Рис. 24.40. Схематическое изображение репликационной вилки. Обе цепи ДНК синтезируются в направлении 5'—>3'. Ведущая цепь синтезируется непрерывно, а отстающая - в виде коротких фрагментов (фрагменты Оказаки).

24.20. Затравкой синтеза ДНК служит РНК

Как начинается синтез ДНК? Напомним, что всем ДНК-полимеразам для инициирования синтеза ДНК необходима затравка со свободной 3'-ОН-группой. Что служит затравкой при синтезе ведущей цепи и фрагментов Оказаки? Важным толчком к решению этого вопроса послужило наблюдение, что для инициации синтеза ДНК необходим синтез РНК. На основе этого открытия было высказано предположение, что РНК, очевидно, служит затравкой в синтезе ДНК, так как уже было известно, что РНК-полимеразы способны начинать синтез цепей *de novo.* Затем было показано, что *новообразующаяся ДНК ковалентно связана с коротким фрагментом РНК, который и служит затравкой. Итак, РНК-затравка в синтезе ДНК.*

По всей вероятности, репликация ДНК в клетке *E.coli* происходит, как показано на рис. 24.41.

1. Особая РНК-полимераза (ее называют *праймаза)* синтезирует короткую цепь РНК (примерно 10 нуклеотидов), комплементарную одной из цепей ДНК-матрицы. В отличие от ДНК-полимеразы праймаза не ну-

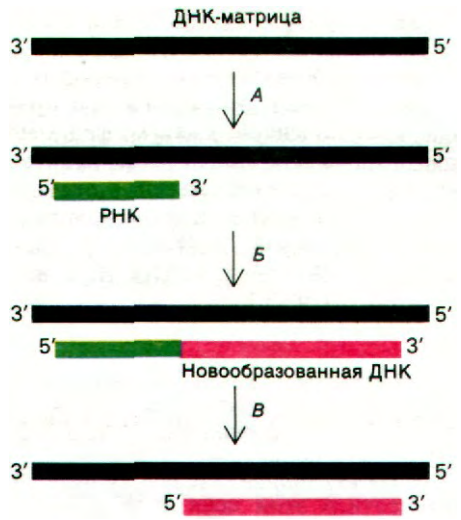


Рис. 24.41. Инициация синтеза ДНК. *А* - праймаза синтезирует короткую комплементарную цепь РНК; *Б* - эта РНК служит затравкой для синтеза новой ДНК; *В* - РНК, входящая в состав новообразованной цепи, гидролизуется, при этом образуется брешь, которая впоследствии заполняется.

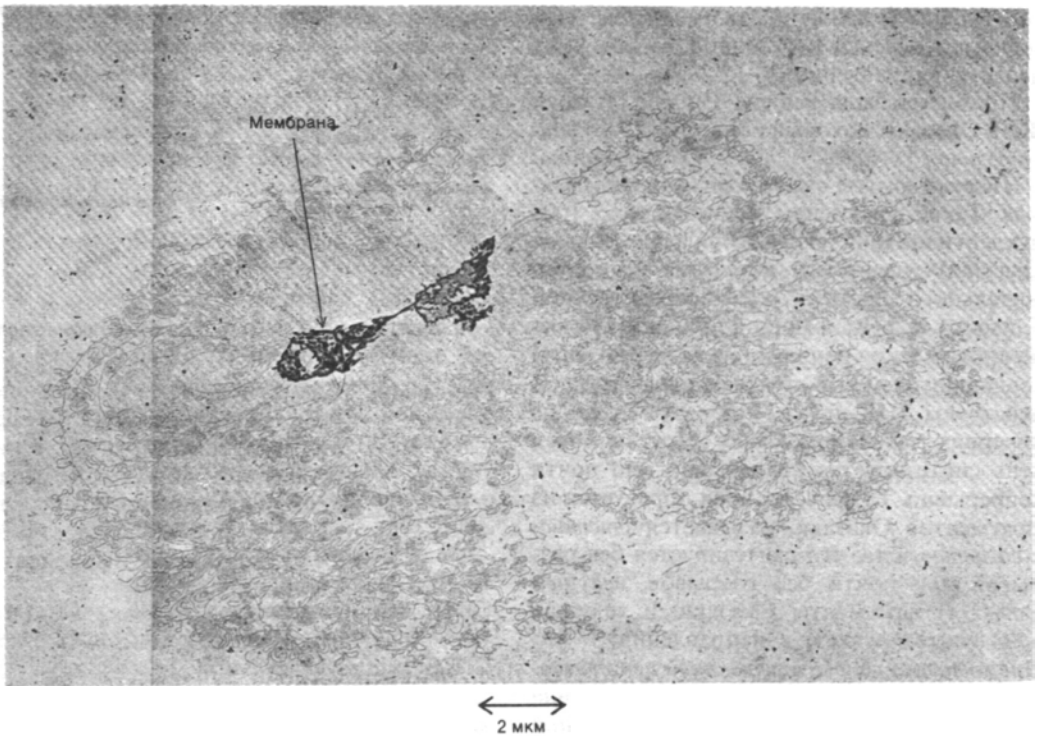


Рис. 24.42. Электронная микрофотография хромосомы *E. coli,* прикрепленной к двум фрагментам клеточной мембраны. На рисунке изображена одна интактная суперспирализованная молекула ДНК. [Delius H., Worcel A., J. Mol. Biol., 82, 108 (1974).]

ждается в затравке для синтеза полинуклеотида.

2. 3'-гидроксильная группа концевого рибонуклеотида этой цепи РНК служит затравкой для синтеза ДНК под действием голофермента ДНК-полимеразы III. Большая часть новообразованной ДНК синтезируется этим мультисубъединичным комплексом.

3. РНК-компонент этого РНК-ДНК-гибрида гидролизуется под действием ДНК-полимеразы I.

4. После удаления РНК из новообразованных цепей между фрагментами ДНК остаются довольно обширные бреши. ДНК-полимераза I, которая хорошо приспособлена для синтеза ДНК на одноцепочечной матрице, заполняет эти бреши.

Последние исследования показали, что действию праймазы предшествует образование *предзатравочного промежуточного комплекса,* состоящего как минимум из пяти белков. Один из них - белок dnaB - может передвигаться вдоль ДНК, используя энергию гидролиза АТР. Белок dnaB может служить сигналом для активации праймазы. Специфичность инициации очередного цикла репликации может обеспечиваться белками, доставляющими белок dnaB точно в область гена *ilv,* где находится точка начала репликации хромосомы *E.coli.* Время начала репликации ДНК имеет критическое значение, поскольку оно должно быть скоординировано с делением клетки. И действительно, бактериальная хромосома ассоциирована с впячиванием клеточной мембраны (рис. 24.42).

24.21. Энергия гидролиза АТР используется для расплетания родительской ДНК в области репликационной вилки под действием белка гер

В 1953 г. Уотсон и Крик отмечали, что «раскрутить спираль - задача труднопреодолимая». Исследования, проведенные в последнее время, показали, что в клетке *E.coli*

Рис. 24.43. Каталитические активности ДНК-гиразы.

в области репликационной вилки происходит активное расплетание родительской двойной спирали под действием фермента — белка rep. Поскольку энергия для расплетания родительской ДНК высвобождается при гидролизе ATP, белок rep называют *хеликазой*. На разделение каждой пары оснований затрачиваются примерно две молекулы ATP. Затем каждая из разделенных цепей родительской ДНК взаимодействует с несколькими молекулами *белка, связывающегося с одноцепочечной ДНК* (ОЦ-связывающий белок). Роль ОЦ-связывающего белка - стабилизировать одноцепочечные участки ДНК, образовавшиеся под действием хеликазы, чтобы расплетенная область могла функционировать в качестве матрицы. ОЦ-связывающие белки называют также белками, дестабилизирующими спираль (белки ДС), или плавящими белками.

24.22. ДНК-гираза вводит отрицательные супервитки в родительскую ДНК, чтобы облегчить ее расплетание

При расплетании ковалентно замкнутой кольцевой молекулы ДНК возникают топологические проблемы, так как расплетание двойной спирали вызывает образование положительных супервитков в замкнутой молекуле. В области репликационной вилки родительская ДНК вращается со скоростью 100 об/с - более чем в 100 раз быстрее, чем обычная долгоиграющая пластинка. Чтобы процесс расплетания продолжался, необходимо снять эти положительные супервитки, образовавшиеся в результате вращения. Другими словами, необходимо наличие какого-то *молекулярного шарнира*. Недавно Мартин Геллерт (Martin Gellert) установил, что эту функцию выполняет *ДНК-гираза. Эта топоизомераза удаляет положительные супервитки, внося одноцепочечные разрывы и затем заделывая фосфодиэфирные связи в остове ДНК.* ATP не требуется для такой термодинамически выгодной релаксации третичной структуры ДНК. Более того, *ДНК-гираза может активно вводить отрицательные супервитки в ковалентно* замкнутую *кольцевую ДНК за счет энергии гидролиза ATP* (рис. 24.43). Эти отрицательные супервитки способствуют расхождению цепей родительской ДНК в области репликационной вилки[1].

24.23. Сложность аппарата репликации, по-видимому, необходима для обеспечения очень высокой надежности

Существующие представления о молекулярном механизме репликации ДНК у *E.coli*

[1] В этой главе автор называет ДНК-гиразой два совершенно различных фермента. Один из них - ДНК-гираза, способная вводить в ДНК термодинамически невыгодные отрицательные супервитки за счет энергии гидролиза ATP; другой - независимая от ATP ДНК-топоизомераза, приводящая кольцевую молекулу ДНК в термодинамически равновесное (релаксированное) состояние. Это два совершенно различных белка: у них различные ингибиторы, потребности в ионных условиях среды, механизм действия. В репликации в качестве молекулярного шарнира участвует ДНК-гираза. - *Прим. перев.*

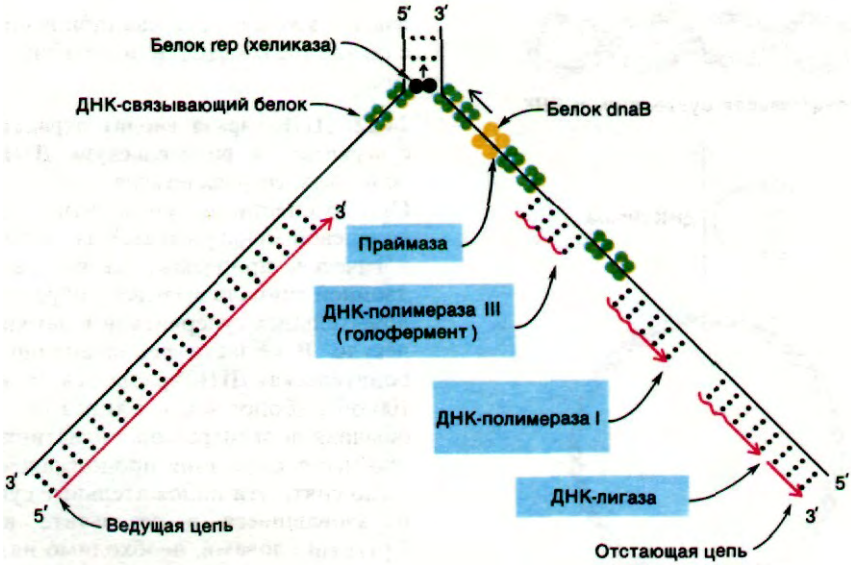


Рис. 24.44. Схематическое изображение ферментативных процессов в области репликационной вилки *E. coli*. Фрагменты, отмеченные синим цветом, катализируют инициацию, элонгацию и сшивание (с помощью ДНК-лигазы) цепей ДНК. (Kornberg A., DNA replication, W.H. Freeman and Co., 1980.)

представлены на рис. 24.44 и в табл. 24.2. Поражает сложность взаимодействий множества белков, участвующих в этом процессе. Генетический анализ показывает, что в репликации ДНК непосредственно участвует не менее 15 белков. Почему механизм репликации ДНК столь сложен? В частности, почему синтез ДНК начинается с РНК-затравки, которая затем удаляется? Если бы ДНК-полимеразы могли начинать синтез цепей de novo, в РНК-затравке не было бы надобности. Однако такая способность была бы несовместима с чрезвычайно высокой точностью ДНК-полимераз. Напомним, что ДНК-полимеразы, прежде чем образовать новую фосфодиэфирную связь, проверяют правильность предшествующей пары оснований. Эта функция редактирования существенно снижает частоту ошибок. РНК-полимеразы, напротив, могут начинать синтез цепей de novo, так как они не проверяют предыдущую пару оснований. Частота ошибок для них на несколько порядков величины выше, чем для ДНК-полимераз. Было найдено остроумное решение этой проблемы: *начинать синтез ДНК с полинуклеотида, синтезируемого с низкой надежностью, но отмечать его «временный» характер, включив в его состав рибонуклео-*

Таблица 24.2. **Белки репликации *E. coli***

Белок	Функция	Масса, кДа	Число молекул в клетке
dna B	Дает возможность праймазе инициировать синтез РНК	~250	20
Праймаза	Синтезирует РНК-затравки	60	100
rep	Расплетает двойную спираль	65	50
ДНК-связывающий	Стабилизирует одноцепочечные участки	74	300
ДНК-гираза	Вводит суперспиральные витки	400	
Голофермент ДНК-полимеразы III	Синтезирует ДНК	>300	20
ДНК-полимераза I	Удаляет затравку и заполняет бреши	109	300
ДНК-лигаза	Соединяет концы ДНК	74	300

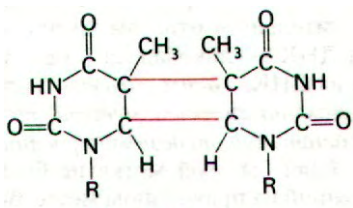
тиды. Затем ДНК-полимераза I вырезает эти короткие последовательности РНК-затравок и замещает их последовательностью ДНК, синтезированной с высокой надежностью. Создается впечатление, что многие детали, усложняющие механизм репликации ДНК, предназначены для обеспечения чрезвычайно высокой точности. Генетический анализ показывает, что частота ошибок составляет одну на 10^9-10^{10} считанных пар оснований.

24.24. Повреждения ДНК постоянно репарируются

Поскольку множество химических и физических агентов вызывает в ДНК повреждения, во всех клетках имеются специальные механизмы для исправления этих повреждений. Основания в ДНК могут изменяться и теряться, фосфодиэфирные связи остова могут разрываться, а две цепи могут поперечно сшиваться друг с другом. Эти повреждения образуются под действием ионизирующей радиации, ультрафиолетового облучения и различных химических веществ. Многие повреждения в ДНК поддаются исправлению, так как генетическая информация записана в обеих цепях двойной спирали. Благодаря этому информацию, утраченную одной из цепей, можно извлечь из другой цепи.

Один из наиболее хорошо изученных механизмов репарации - вырезание *пиримидинового димера* (рис. 24.45), *который образуется при действии на ДНК ультрафиолетового света.* Соседние пиримидиновые остатки в одной цепи ДНК могут в этих условиях образовать ковалентную сшивку. Такой пиримидиновый димер не укладывается в двойную спираль, так что репликация и экспрессия генов оказываются блокированными до тех пор, пока повреждение не будет удалено.

В осуществлении этого процесса важную роль играют четыре ферментативные активности (рис. 24.46). Первая из них - *УФ-специфичная эндонуклеаза* - находит место повреждения и вносит одноцепочечный разрыв вблизи от димера, обычно с 5'-стороны. Участок, содержащий димер, выпячивается из двойной спирали, что позволяет *ДНК-полимеразе I* (или другой подобной полимеразе) провести репарационный синтез в направлении 5'—>3'. Затравкой при этом служит 3'-конец разорванной цепи, а матрицей - интактная комплементарная цепь. Затем область, где расположен пиримидиновый димер, вырезается под действием 5'—>—>3'-*нуклеазной* активности ДНК-полимеразы. Наконец, новосинтезированная цепь и остаток той же цепи ДНК соединяются *ДНК-лигазой.* Другой путь репарации-фотохимическое расщепление пиримидинового димера. Почти все клетки содержат *фотореактивирующий фермент,* который узнает димер и расщепляет его на исходные основания, используя энергию поглощенного синего света.



Тиминовый димер

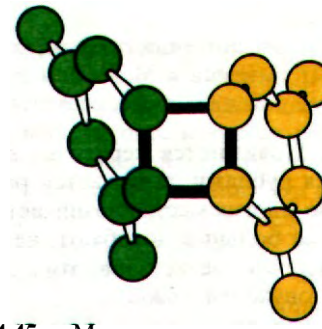


Рис. 24.45. Модель димера урацила, образованного под действием ультрафиолетового облучения. Тиминовый димер имеет примерно такую же структуру.

24.25. Рак кожи при золотистой ксеродерме обусловлен нарушением нормальной репарации ДНК

Золотистая ксеродерма (Xeroderma pigmentosum) - редкое заболевание кожи у людей. Оно наследуется как аутосомный рецессивный признак. У гомозиготных больных кожа крайне чувствительна к солнечному и ультрафиолетовому свету. Серьезные поражения кожи наблюдаются уже в детстве, а с возрастом они принимают все более тяжелый характер. Кожа становится сухой, и дерма в значительной степени атро-

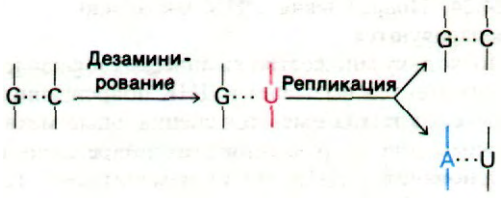
Ксеродерма - от греч. слов, означающих «сухая кожа». Этот термин был впервые использован F. Hebra и M. Kaposi в 1874 г. для описания «пергаментной кожи» и аномальной пигментации, наблюдавшихся у одного из больных.

фируется. Появляются кератозы, веки покрываются рубцами, поражается роговица. Обычно во многих местах возникает рак кожи. Многие больные погибают, не достигнув 30 лет, от метастазов этих злокачественных опухолей кожи.

В ДНК человека, как и у *E.coli,* под действием ультрафиолетового света образуются пиримидиновые димеры. Более того, механизмы репарации у человека и у *E.coli,* по-видимому, сходны. Изучение фибробластов кожи больных золотистой ксеродермой показало, что одна из форм этой болезни сопровождается биохимическим нарушением. В нормальных фибробластах половина пиримидиновых димеров, образовавшихся под действием ультрафиолетового облучения, вырезается менее чем за сутки. В фибробластах же, полученных от больных золотистой ксеродермой, за тот же промежуток времени вырезания димеров почти не наблюдается. Какой этап репарации нарушен? Ответ был получен путем определения молекулярной массы цепей ДНК из фибробластов, облученных ультрафиолетовым светом. В нормальных клетках в течение нескольких часов после облучения происходит заметное снижение молекулярной массы одноцепочечной ДНК. Это снижение молекулярной массы обусловлено первой реакцией процесса репарации, а именно расщеплением цепи ДНК рядом с пиримидиновым димером. После УФ-облучения клеток золотистой ксеродермы, наоборот, снижения молекулярной массы не происходит. Следовательно, *это кожное заболевание, возможно, вызвано инактивацией эндонуклеазы, которая гидролизует остов ДНК рядом с пиримидиновым димером. Тяжелые клинические последствия этого ферментативного нарушения свидетельствуют об исключительной важности процессов репарации ДНК.*

24.26. ДНК содержит тимин вместо урацила, что делает возможной репарацию дезаминированного цитозина

Цитозин в ДНК спонтанно дезаминируется с измеримой скоростью, образуя урацил. Дезаминирование цитозина является потенциально мутагенным, так как образующийся урацил спаривается с аденином, и, следовательно, одна из дочерних цепей будет содержать AU-пару оснований вместо исходной GC-пары:



Эта мутация исправляется под действием репарационной системы, узнающей чужеродный урацил в молекуле ДНК (рис. 24.47). Прежде всего *урацил-ДНК—гликозидаза* гидролизует гликозидную связь остатка урацила с дезоксирибозой. На этом этапе остов ДНК остается интактным, но одно основание отсутствует. Затем специфическая эндонуклеаза узнает этот дефект и расщепляет остов рядом с отсутствующим основанием. ДНК-полимераза I вырезает оставшийся дезоксирибозофосфат и вставляет цитозин, комплементарный гуанину в неповрежденной цепи. Наконец, репарированная цепь заделывается ДНК-лигазой.

В течение многих лет оставалось загадкой, почему в ДНК присутствует тимин, а не урацил, ведь оба основания спариваются с аденином. Единственное различие между ними - метильная группа тимина на месте атома водорода при С-5 в урациле. Почему это метилированное основание используется в ДНК, но не в РНК? Напомним, что на метилирование дезоксиуридилата с образованием дезокситимидилата расходуется много энергии (разд. 22.16). Открытие сравнительно недавно активной системы, репарирующей дезаминирование цитозина, служит убедительным ответом на эту загадку. Урацил-ДНК—гликозидаза не удаляет тимина из ДНК. *Таким образом, метильная группа тимина служит меткой, позволяющей отличать его от дезаминированного цитозина.* Если бы этой метки не было, урацил, стоящий на правильном месте, было бы невозможно отличить от урацила, образо-

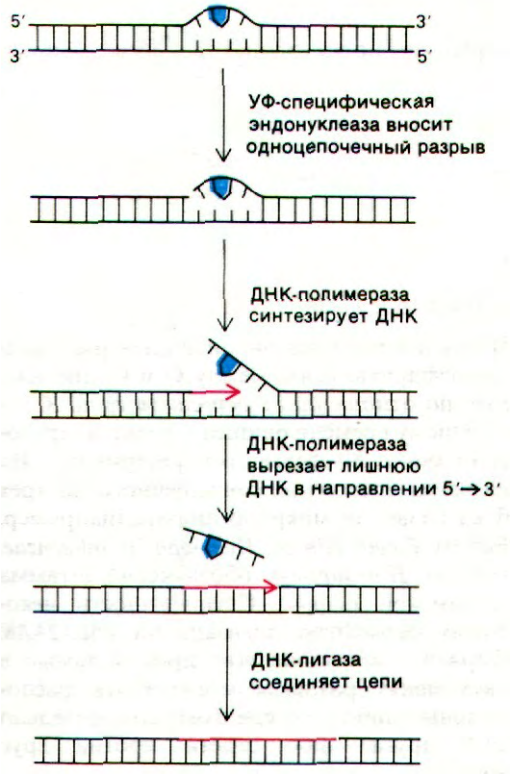


Рис. 24.46. Репарация участка ДНК, содержащего тиминовый димер, в результате последовательного действия специфической эндонуклеазы, ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы. Тиминовый димер показан синим цветом, а новосинтезированный участок ДНК - красным. [Hanawalt P.C, Endeavor, 31, 83 (1972).]

вавшегося в результате дезаминирования. Дефект остался бы незамеченным, и в одной из дочерних молекул ДНК неизбежно произошло бы мутационное замещение одной GC-пары на AU-пару. Система репарации, которая выискивает урацилы и оставляет тимины, подавляет такие мутации. По всей вероятности, *тимин используется в ДНК вместо урацила для увеличения* надежности *генетической информации.* В противоположность этому РНК не репарируется, и в ней используется урацил, так как он представляет собой менее дорогой строительный блок.

24.27. Рестриктирующие эндонуклеазы совершили переворот в анализе ДНК

Ферменты рестрикции - эндонуклеазы, способные узнавать определенные последовательности оснований в двухспиральной ДНК и расщеплять обе цепи. Эти исключительно тонкие скальпели - великолепный подарок природы биохимикам. Существование ферментов рестрикции позволило проводить эксперименты, о которых нельзя было даже и мечтать всего лишь несколько лет назад. Они представляют собой незаменимые инструменты для исследования

Рис. 24.47. Остатки уранила в ДНК вырезаются и замещаются цитозином - исходным основанием.

Палиндром (перевертыш) - слово, предложение или стих, которые читаются одинаково слева направо и справа налево.

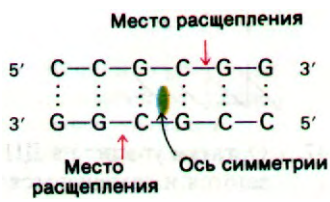
Примеры:
Радар
То не ясли ломал, а молился енот.
А роза упала на лапу Азора.
Нажал кабан на баклажан.
Roma tibi subito motibus ibit amor.

Происходит от греческого слова palindromos - бегу назад.

структуры хромосомы, определения последовательности нуклеотидов в очень длинных молекулах ДНК, выделения генов и получения новых молекул ДНК для клонирования. Разработку всех этих методов начали Вернер Арбер, Гамилтон Смит и Дэниел Натанс (Werner Arber, Hamilton Smith, Daniel Nathans).

Рестриктирующие эндонуклеазы обнаруживаются у самых различных прокариот. Биологическая роль этих ферментов состоит в том, чтобы расщеплять чужеродные молекулы ДНК. Собственная клеточная ДНК при этом не расщепляется, так как участки, узнаваемые своими ферментами рестрикции, у нее метилированы. Взаимосвязь между ресткрикцией и модификацией рассматривается в гл. 30 (разд. 30.9). Важное значение имеет тот факт, что многие ферменты рестрикции узнают специфические последовательности ДНК длиной от четырех до шести пар оснований и гидролизуют фосфодиэфирные связи в обеих цепях в этой области. Удивительная особенность таких участков расщепления - их симметрия относительно оси вращения второго порядка. Другими словами, узнаваемая последовательность пар оснований представляет собой палиндром.

Расщепляемые участки расположены симметрично относительно оси второго порядка. Например, фермент рестрикции из *Streptomyces achromogenes* узнает последовательность



В каждой цепи эта эндонуклеаза рвет фосфодиэфирную связь между G и C, дистальную по отношению к оси симметрии. К настоящему времени очищено и охарактеризовано более 80 ферментов рестрикции. Их названия состоят из сокращенного до трех букв названия микроорганизма (например, Eco от *E.coli,* Hin от *Haemophilus influenzae,* Hae от *H.aeguptins),* обозначения штамма и римской цифры. Специфичность некоторых ферментов показана на рис. 24.48. Обратите внимание, что производимые в двух цепях разрывы могут быть расположены либо со сдвигом относительно друг друга, либо строго против друг друга.

Ферменты рестрикции используются для расщепления молекул ДНК на определенные фрагменты, которые более удобны для анализа и манипулирования, чем исходная молекула. Например, EcoRI расщепляет кольцевую двухцепочечную ДНК вируса SV-40 длиной 5,1 kb только в одном месте, Hpa - в четырех местах и Hind - в 11 местах. Кусок ДНК, образованный одним ферментом рестрикции, можно специфически расщепить на более мелкие фрагменты с помощью другого фермента. *Используя несколько ферментов рестрикции, можно картировать хромосомы* (разд. 31.8). *Более того, набор фрагментов, полученных с помощью ферментов рестрикции, может служить своего рода «отпечатком пальца» для соответствующей молекулы ДНК.* Небольшие различия между сходными молекулами ДНК можно легко выявить с помощью электрофоретического разделения их рестрикционных фрагментов. Для каждого данного геля электрофоретическая подвижность фрагмента ДНК обратно пропорциональна логарифму числа пар оснований (до определенного предела длины фрагментов). Для разделения фрагментов ДНК длиной до 1000 пар оснований используют полиакриламидный гель, а для

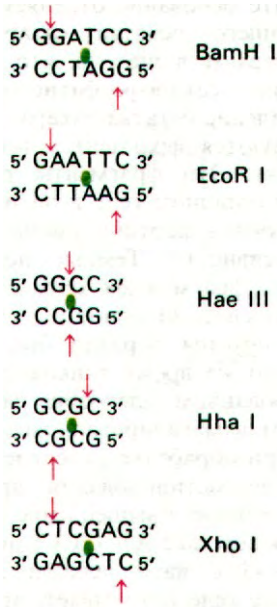


Рис. 24.48. Специфичность некоторых эндонуклеаз рестрикции. Последовательности пар оснований, узнаваемые этими ферментами, имеют ось симметрии второго порядка. Две цепи ДНК в этой области симметричны относительно оси, обозначенной зеленым овалом. (Одна цепь сдвинута относительно другой на 180°.) Места расщепления показаны красными стрелками. Сокращенные названия каждого фермента рестрикции приведены справа от последовательности, которую он узнает.

разделения более длинных молекул более пористый агарозный гель. Если ДНК содержит радиоактивную метку, полосы можно выявить методом радиоавтографии. В другом случае гель можно покрасить бромистым этидием, который при связывании с двухспиральной ДНК флуоресцирует ярким оранжевым светом. При использовании этого способа можно легко увидеть полосу, содержащую 50 нг ДНК (рис. 24.49). Помимо чувствительности, важное достоинство таких гелей - их высокая разрешающая способность.

24.28. Последовательность нуклеотидов в ДНК можно быстро определить с помощью специфического химического расщепления

Появление надежных методов определения последовательности нуклеотидов в молекулы ДНК облегчило также изучение структуры ДНК и ее связи с экспрессией гена. *Метод химического расщепления,* разработанный Алланом Максамом и Уолтером Гилбертом (Allan Maxam, Walter Gilbert), основан на использовании ДНК, меченной ^{32}P по одному из концов одной из цепей. Для введения ^{32}P в 5'-гидроксильный конец обычно используют полинуклеотидкиназу. Меченую ДНК расщепляют предпочтительно по одному из четырех нуклеотидов. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы на каждую цепь приходился в среднем один разрыв.

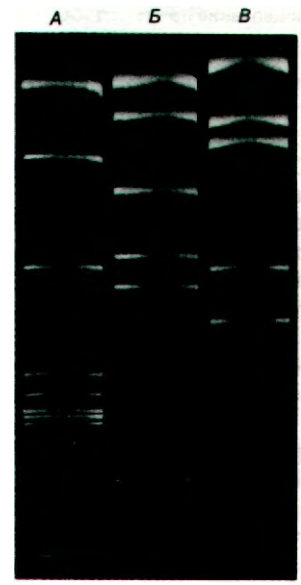


Рис. 24.49. Электрофоретическое разделение фрагментов, образующихся при расщеплении ДНК SV-40 тремя различными ферментами рестрикции. Эти фрагменты флуоресцируют благодаря тому, что гель окрашен бромистым этидием. (Печатается с любезного разрешения д-ра Jeffrey Sklar.)

Частичное расщепление по каждому основанию дает набор радиоактивных фрагментов, начинающихся ^{32}P-меткой и кончающихся одним из положений этого основания. Например, если исследуемая ДНК имеет последовательность

5'-^{32}P-GCTACGTA-3'

то в результате специфического расщепления с 5'-стороны каждого из четырех оснований получатся следующие радиоактивные фрагменты:

Расщепление по A: ^{32}P-GCT
^{32}P-GCTACGT
Расщепление по G: ^{32}P-GCTAC
Расщепление по C: ^{32}P-G
^{32}P-GCTA
Расщепление по T: ^{32}P-GC
^{32}P-GCTACG

Затем эти фрагменты разделяют методом электрофореза в полиакриламидном геле, который дает возможность разделять молекулы ДНК, различающиеся по длине всего лишь на один нуклеотид. Следующий этап - радиоавтография этого геля. Как показано на рис. 24.50, самая нижняя полоса расположена на дорожке, соответствующей расщеплению по C, следующая - на дорожке T, затем еще одна - на дорожке A. Следовательно, последовательность первых трех нуклеотидов имеет вид 5'-CTA-3'. Если прочитать все семь полос снизу вверх, получится последовательность 5'-CTACGTA-3'. *Итак, радиоавтограф геля, полученного после четырех различных реакций химического расщепления, дает набор полос, по которым можно непосредственно прочитать нужную последовательность.*

Как достигается специфическое расщепление ДНК? Для этого используют соединения, которые способны модифицировать основание и затем отщеплять его от остатка сахара (рис. 24.51). Пурины модифицируют диметилсульфатом, метилирующим гуанин по N-7 и аденин по N-3. Расщепление гликозидной связи метилированного пурина легко достигается нагреванием при нейтральном значении pH. В результате основание отделяется от соответствующего остатка сахара. Затем смесь нагревают в щелочи, что вызывает расщепление сахарофосфатного остова ДНК и удаление остатка сахара. В результате образуются фрагменты, несущие на конце метку. Эти фрагменты разделяют в полиакриламидном геле и на радиоавтографе получают картину полосы различной интенсивности. Темные полосы соответствуют фрагментам, образовавшимся при расщеплении по гуанину, так как гуанин метилируется гораздо быстрее, чем аденин. В то же время гликозидная связь в метилированном аденозине менее стабильна, чем в метилированном гуанозине. Поэтому при обработке разбавленной кислотой после метилирования происходит предпочтительное выщепление аденина (получается дорожка A + G). Сравнение дорожки A + G с параллельной дорожкой G на том же геле показывает, происходит ли расщепление по A или по G (рис. 24.52). Расщепление по цитозину и тимину проводят *гидразином*. Остов затем расщепляют

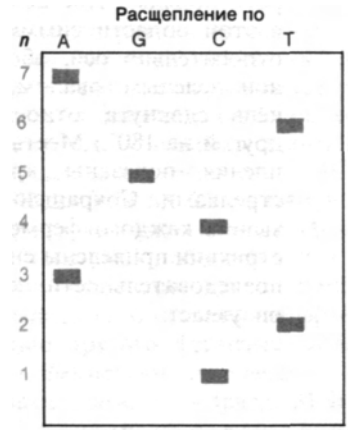


Рис. 24.50. Схематическое изображение геля, на котором показаны радиоактивные фрагменты, образовавшиеся при специфическом расщеплении последовательности 5'-^{32}P-GCTACGTA-3' по каждому из четырех оснований (дорожки A, G, C и T). Слева указано число нуклеотидов (n) в каждом фрагменте. Последовательность оснований читается непосредственно с геля снизу вверх.

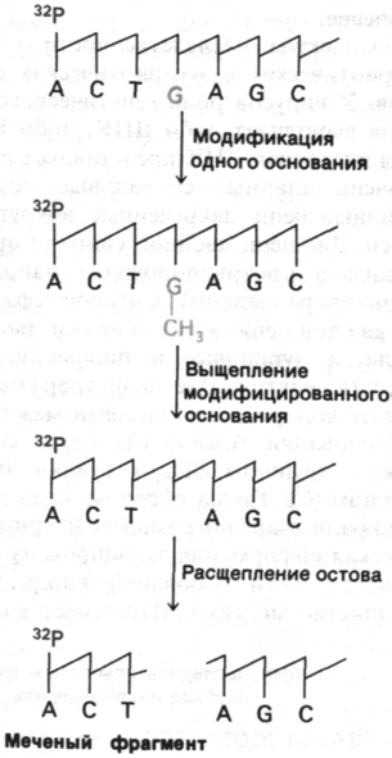


Рис. 24.51. Стратегия метода определения последовательности нуклеотидов в ДНК с помощью химического расщепления.

пиперидином, который вытесняет продукты реакции с гидразином и катализирует элиминацию фосфатов. В результате расщепления по цитозинам и тиминам получают серию полос примерно равной интенсивности (дорожка C + T). Эти пиримидины различают, проводя гидразинолиз в присутствии 2 M NaCl, подавляющим реакцию с тимином (дорожка C). Теперь последовательность ДНК можно прочитать по радиоавтографу геля, сопоставляя дорожки G, A + G, C + T и C (рис. 24.52). Самый короткий фрагмент имеет самую высокую электрофоретическую подвижность, так что 5'-концу соответствует низ геля. Если использовать несколько различных гелей для разделений всех меченых фрагментов, можно легко определить таким образом последовательности длиной более 150 пар оснований.

24.29. Полная последовательность оснований ДНК фага φX174 была определена с помощью метода ферментативной репликации

Другой метод определения последовательности оснований в ДНК основан на образовании меченых фрагментов с помощью *контролируемого прерывания ферментативной репликации in vitro*. Этот метод разработали Фред Сэнгер (Fred Sanger) и его сотрудники. Для считывания определенной последовательности с одноцепочечной ДНК используют ДНК-полимеразу

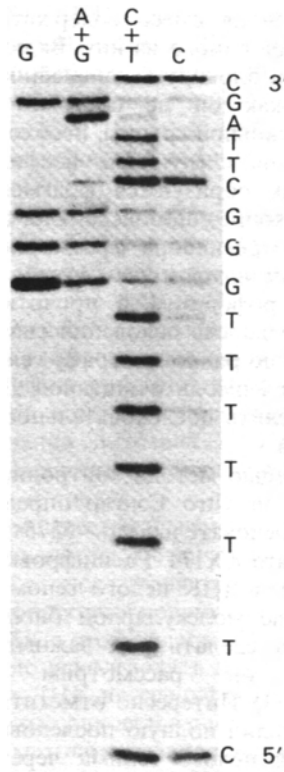


Рис. 24.52. На радиоавтографе геля видны меченые фрагменты, образовавшиеся при химическом расщеплении. 5'-конец этой ДНК был помечен ^{32}P. Самый короткий нуклеотид расположен у основания геля. С геля можно прочитать последовательность 5'-CTTTTTTGGGCTTAGC-3'.

I[1]. В качестве затравки для синтеза используется комплементарный фрагмент, который можно получить из набора продуктов рестрикции, соответствующей двухцепочечной ДНК. Кроме четырех радиоактивныхдезоксирибонуклеозидтрифосфатов, инкубационная смесь содержит *2′,3′-дидезоксианалог* одного из них. Включение этого аналога блокирует дальнейший рост цепи, так как он не содержит концевой 3′-гидроксильной группы, необходимой для образования следующей фосфодиэфирной связи. Так образуются фрагменты, несущие на 3′-конце дидезоксианалог (рис. 24.53). Затем четыре набора *фрагментов, образованных терминированием цепей,* разделяют гель-электрофорезом и прочитывают последовательность оснований синтезированной ДНК по радиоавтографу геля. Используя менее 1 пмоль очищенной ДНК, можно определить последовательности 200 нуклеотидов.

С помощью метода контролируемой репликации *in vitro* Сэнгер определил полную последовательность 5375 оснований в ДНК фага φX174. Расшифровка последовательности ДНК целого генома - крупное достижение молекулярной биологии. Она позволила сделать ряд важных выводов, которые мы рассмотрим в гл. 26 (разд. 26.11). Интересно отметить, что Сэнгер определил полную последовательность оснований целого генома через четверть века после того, как он расшифровал аминокислотную последовательность белка[2].

[1] Поэтому данный метод в отечественной литературе называют методом полимеразного копирования.- *Прим. перев.*

[2] Следует отметить, что в промежутке между этими открытиями Ф. Сэнгер разработал оригинальный метод определения последовательности оснований в РНК, который имел огромные преимущества перед другими известными в то время методами.- *Прим. перев.*

Заключение

ДНК - молекула наследственности у всех прокариотических и эукариотических организмов. У вирусов роль генетического материала выполняет либо ДНК, либо РНК. Любая клеточная ДНК представляет собой две очень длинные спиральные полинуклеотидные цепи, закрученные вокруг общей оси. Две цепи двойной спирали ориентированы в противоположном направлении (антипараллельны). Сахарофосфатный остов каждой цепи лежит снаружи двойной спирали, а пуриновые и пиримидиновые основания - внутри. Две цепи удерживаются вместе водородными связями между парами оснований. Аденин (A) всегда спаривается с тимином (T), а гуанин (G) - с цитозином (C). Таким образом, цепи двойной спирали взаимно комплементарны. Генетическая информация закодирована в последовательности оснований вдоль цепи. Большинство молекул ДНК имеет кольце-

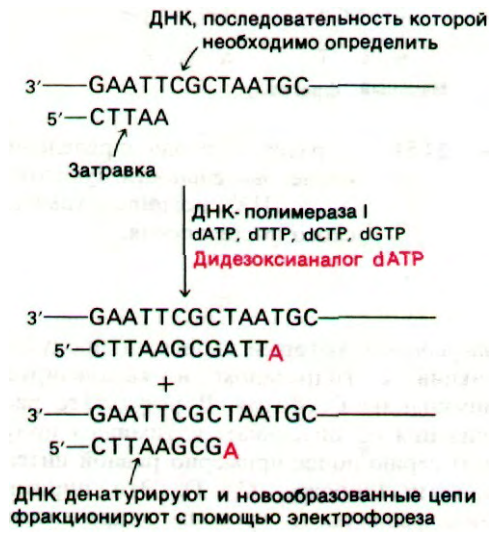


Рис. 24.53. Стратегия метода определения последовательности нуклеотидов в ДНК путем терминирования цепи. Фрагменты образуются в результате добавления 2′,3′-дидезоксианалога одного из dNTP в каждую из четырех пробирок, в которых происходит полимеризация. Например, при добавлении дидезоксианалога dATP образуются фрагменты, оканчивающиеся на A (показано красным цветом).

вую форму. Ось двойной спирали кольцевой ДНК может сама закручиваться и образовывать суперспираль. Суперспирализованная ДНК имеет более компактную форму, чем релаксированная ДНК.

При репликации ДНК две цепи двойной спирали расплетаются и расходятся по мере того, как синтезируются новые цепи. Каждая родительская цепь служит матрицей для образования новой комплементарной цепи. Таким образом, репликация ДНК полуконсервативна - каждая дочерняя молекула получает одну цепь родительской молекулы ДНК. Репликация ДНК - сложный процесс, в осуществлении которого участвует много белков, в том числе ДНК-полимеразы трех типов и ДНК-лигаза. Активированные предшественники синтеза ДНК - четыре дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты. Новая цепь синтезируется в направлении 5'—>3'. Этот синтез осуществляется путем нуклеофильной атаки внутреннего атома фосфора очередного дезоксинуклеозидтрифосфата 3'-гидроксильным концом цепи затравки. Самое важное состоит в том, что ДНК-полимераза катализирует образование фосфодиэфирной связи только в том случае, если основание очередного нуклеотида комплементарно основанию матричной цепи. Другими словами, ДНК-полимеразы — ферменты, направляемые матрицами. ДНК-полимеразы I, II и III обладают также 3'—>5'-экзонуклеазной активностью, которая увеличивает надежность репликации путем удаления некомплементарных остатков. ДНК-полимеразам I и III присуща, кроме того, 5'—>3'-нуклеазная активность, играющая важную роль в механизмах репликации и репарации ДНК.

Репликация ДНК в клетках *E.coli* начинается в строго определенном месте (в точке начала репликации) и идет в обоих направлениях. В области репликационной вилки (там, где из двух цепей ДНК получаются четыре) обе цепи родительской ДНК используются в качестве матриц для синтеза новой ДНК. Белок rep расплетает родительскую ДНК за счет энергии гидролиза ATP. Расплетанию способствует также ДНК-гираза, которая играет роль молекулярного шарнира и вводит отрицательные супервитки в родительскую ДНК. Одна цепь ДНК (ведущая) синтезируется непрерывно, тогда как другая (отстающая) синтезируется в виде фрагментов длиной 1 kb. Поскольку образование отстающей цепи происходит путем сборки из отдельных фрагментов, полимеризация в направлении 5'—>3' на атомном уровне приводит к общему росту этой цепи в направлении 3'—>5'. Синтезу новой ДНК предшествует синтез РНК, которая используется затем в качестве затравки. Впоследствии РНК, входящая в состав новообразованной РНК-ДНК-цепи, гидролизуется и замещается ДНК. Затем ДНК-лигаза соединяет новообразованные фрагменты ДНК, которые спарены с одной и той же матричной цепью. В этой реакции участвует в качестве источника энергии NAD^+.

Повреждения в ДНК, вызванные ионизирующей радиацией, ультрафиолетовым светом и различными химическими соединениями, постоянно репарируются. Например, пиримидиновые димеры, индуцированные ультрафиолетовым светом, вырезаются специфической эндонуклеазой. Урацил, который образуется при спонтанном дезаминировании цитозина в ДНК, удаляется гликозидазой, которая дифференцирует урацил и тимин.

Ферменты рестрикции узнают специфические последовательности, обладающие симметрией второго порядка, и гидролизуют одну фосфодиэфирную связь в каждой цепи ДНК в этой области. Эти эндонуклеазы можно использовать для расщепления молекул ДНК на специфические фрагменты, удобные для дальнейшего изучения. Разработка методов, позволяющих быстро определять последовательность нуклеотидов в ДНК на основе специфического расщепления и электрофоретического разделения продуктов, революционизировала изучение структуры ДНК.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Kornberg A., 1979. Aspects of DNA replication, Cold Spring Harbor Symp., Quant Biol., 43, 1-9.

Alberts B., Sternglanz R., 1977. Recent excitement in the DNA replication problem, Nature, 269, 655-661.

Fiddes J.G., 1977. The nucleotide sequence of a viral DNA, Sci. Amer., 237(6), 54-67.

Hamilton H.O., 1979. Nucleotide sequense specificity of restriction endonucleases, Science, 205, 455-622.

Nathans D., 1979. Restriction endonucleases, simian virus 40, and the new genetics, Science, 206, 903-909.

Bauer W.R., Crick F.H.C., White J.H., 1980. Supercoiled DNA, Sci. Amer., 243(1), 118-133. (Ясно и четко рассмотрена топология суперспиральных ДНК.)

Книги

Kornberg A., 1980. DNA Replication, Freeman. (Выдающаяся монография, читается с большим интересом.)

Cold Spring Harbor Laboratory, 1979. Replication and Recombination, Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology, vol. 43. (Наиболее информативный сборник статей по репликации, репарации и рекомбинации ДНК.)

Bloomfield V.A., Crothers D.M., Tinoco I., Jr., 1974. Physical Chemistry of Nucleic Acids, Harper and Row.

Davidson J.N., 1977. The Biochemistry of the Nucleic Acids, Academic Press.

Ts'o P.O.P., 1974. Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry, vol. 1 and 2, Academic Press.

Возникновение основополагающих концепций

Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M., 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus Type III, J. Exp. Med., 79, 137-158.

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

Watson J.D., Crick F.H.C., 1953. Molecular structure of nucleic acid. A structure for deoxyribose nucleic acid, Nature, 171, 737-738.

Watson J.D., Crick F.H.C., 1953. Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid, Nature, 171, 964-967.

Kornberg A., 1960. Biological synthesis of deoxyribonucleic acid, Science, 131, 1503-1508.

Meselson M., Stahl F.W., 1958. The replication of DNA in *Escherichia coli,* Proc. Nat. Acad. Sci., 44, 671-682.

Taylor J.H. (*ed.*), 1965. Selected Papers on Molecular Genetics, Academic Press. (В этой книге содержатся классические статьи, упоминавшиеся в данной главе.)

Определение последовательности оснований в ДНК

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 5463-5467.

Maxam A.M., Gilbert W., 1977. A new method for sequencing DNA, Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 560-564.

Белки, участвующие в репликации ДНК

Wickner S.H., 1978. DNA replication proteins of *Escherichia coli,* Ann. Rev. Biochem., 47, 1163-1191.

Lehman I.R., 1974. DNA ligase: structure, mechanism, and function, Science, 186, 790-797.

McHenry C., Kornberg A., 1977. DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli:* purification and resolution into subunits, J. Biol. Chem., 252, 6478-6484.

Rowen L., Kornberg A., 1978. Primase, the dna G protein *of Escherichia coli:* an enzyme which starts DNA chains, J. Biol. Chem., 253, 758-764.

Kornberg A., Scott J.F., Bertsch L.L., 1978. ATP utilization by *rep* protein in the catalytic separation of DNA strands at a replicating fork, J. Biol. Chem., 253, 3298-3304.

Cozzarelli N.R., 1977. The mechanism of action of inhibitors of DNA synthesis, Ann. Rev. Biochem., 46, 641-668.

Место начала репликации ДНК и направление репликации

Prescott D.M., Kuempel P. L., 1972. Bidirectional replication of the chromosome in *E. coli,* Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 2842-2845.

Bird R.E., Lourarn J., Martuscelli J., Caro L., 1972. Origin and sequence of chromosome replication in *E. coli,* J, Mol. Biol, 70, 549-566.

Ogawa T., Okazaki T., 1980. Discontinuous DNA replication, Ann. Rev. Biochem., 49, 421-458.

Структура ДНК

Cantor C.R., Schimmel P.R., 1980. Biophysical Chemistry, Freeman. [Имеется перевод: Кантор Ч., Шиммел Р. Биофизическая химия. В 3-х т. - М.: Мир, 1984.] (Гл. 3 и 6 в томе 1 и гл. 22-24 в томе 3 содержат превосходный обзор, посвященный конформации нуклеиновых кислот.)

Суперспиральная ДНК

Bauer W.R., 1978. Structure and reactions of closed duplex DNA, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 7, 287-313.

Crick F.H.C., 1976. Linking numbers and nucleosomes, Proc. Nat. Acad. Sci., 73, 2639-2643. (Доступное введение в проблему порядка зацепления, напряжения и угла закручивания суперспиральной ДНК.)

Mizuuchi K., O'Dea M.H., Gellert M., 1978. DNA gyrase: subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 5960-5963.

Cozzarelli N.R., 1980. DNA gyrase and the supercoiling of DNA, Science, 207, 953-960.

Репарация ДНК

*Hanawalt P.*C., *Cooper P.K., Ganesan A.K., Smith C.A.,* 1979. DNA repair in bacteria and mammalian cells, Ann. Rev. Biochem., 48, 783-836.

Lindahl T., Ljungquist S., Siegert W., Nyberg B., Sperens B., 1977. DNA N-glycosidases. Properties of uracil-DNA glycosidase from *Escherichia coli,* J. Biol. Chem., 252, 3286-3294.

Cleaver J.E., 1978. Xeroderma pigmentosum. In: Stanbury J.B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S. (eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease (4 th ed.), pp. 1072-1095, McGraw-Hill.

Воспоминания и исторические очерки

Cairns J., Stent G.S., Watson J. D. (*eds.*), 1966. Phage and the Origins of Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory. (Увлекательный сборник воспоминаний некоторых основоположников молекулярной биологии.)

Watson J.D., 1968. The Double Helix, Atheneum. (Живой рассказ об откры-

тии структуры ДНК и ее биологических функциях, в котором проступает яркая личность автора.) [Имеется перевод: Уотсон Д. Двойная спираль. - М.: Мир, 1969.]
Olby R., 1974. The Path to the Double Helix, University of Washington Press.
Portugal F.H., Cohen J.S., 1977. A Century of DNA: A History of the Discovery of the Structure and Function of the Genetic Substance, MIT Press.
Judson H., 1979. The Eighth Day of Creation, Simon and Schuster.

Вопросы и задачи

1. Напишите комплементарные последовательности (в стандартной записи в направлении 5'—>3') для следующих последовательностей:
а) GATCAA,
б) TCGAAC,
в) ACGCGT,
г) TACCAT.

2. Одна из цепей двухспиральной ДНК имеет следующий нуклеотидный состав (относительное молярное содержание): [A] = 0,30, [G] = 0,24.
а) Что можно сказать о содержании [T] и [C] в той же цепи?
б) Что можно сказать о содержании [A], [G], [T] и [C] в комплементарной цепи?

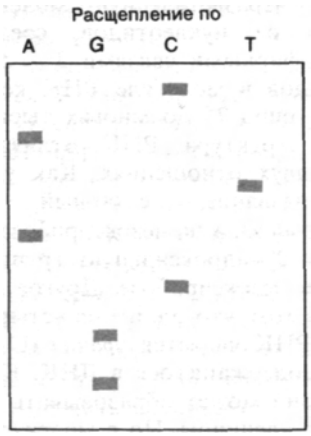


Рис. 24.54. Схематическое изображение радиоавтографа геля. Видны радиоактивные фрагменты, образующиеся при специфическом расщеплении олигонуклеотидов.

3. ДНК одного делеционного мутанта бактериофага λ имеет контурную длину 15 мкм вместо 17 мкм. Сколько пар оснований недостает у этого мутанта?

4. Какой результат получили бы Меселсон и Сталь, если бы репликация ДНК была консервативной? Укажите предполагаемое распределение молекул ДНК после 1-й и 2-й генераций в случае консервативной репликации (т.е. когда родительская двойная спираль не расходится).

5. Зависит ли от видовой принадлежности способность известных ДНК-лигаз использовать для соединения ДНК-цепей NAD^+ или ATP? Предположим, что обнаружена новая ДНК-лигаза, нуждающаяся в каком-то другом источнике энергии. Предположите приемлемую с энергетической точки зрения замену NAD^+ или ATP в этой реакции.

6. ДНК-лигаза из *E. coli* релаксирует суперспирализованную кольцевую ДНК в присутствии AMP. В отсутствие ATP эта активность не проявляется. Каков механизм этой реакции и почему он зависит от AMP?

7. На рис. 24.54 приведена схема радиоавтографа геля с четырьмя дорожками фрагментов ДНК, образовавшихся при химическом расщеплении. ДНК содержала ^{32}P-метку на 5'-конце. Какова последовательность этой ДНК?

Дополнительные вопросы см.: Wood W. B., Wilson J. H., Benbow R. M., Hood L. E. Biochemistry: A Problems Aproach, Benjamin, 1974, chs. 16, 17.

ГЛАВА 25
Информационная РНК и транскрипция

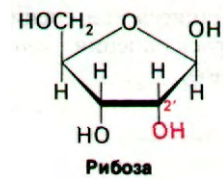
В этой главе мы рассмотрим выражение в фенотипе (экспрессию) генетической информации, содержащейся в ДНК. Функция генов - кодирование синтезируемых в клетке белков. Однако сама ДНК не используется в качестве непосредственной матрицы для синтеза белка. Роль таких матриц выполняют молекулы РНК (рибонуклеиновой кислоты). В норме поток генетической информации в клетке идет в следующем направлении:

В настоящей главе мы увидим, что *некоторые молекулы РНК играют роль промежуточных переносчиков информации в синтезе белка, тогда как другие молекулы РНК являются частью аппарата белкового синтеза.* Затем мы рассмотрим синтез РНК, протекающий в соответствии с последовательностью ДНК-матрицы. Это - процесс *транскрипции,* за которым следует трансляция. При *трансляции* РНК-матрицы направляют синтез белков. Более подробно этот вопрос рассматривается в гл. 27.

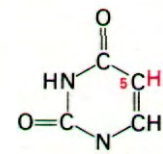
Участие РНК в синтезе белка казалось вероятным уже в 1940 г., за несколько лет до того, как было показано, что ДНК - материал наследственности. Торбьёрн Касперсон (Torbjorn Caspersson) изучал распределение РНК и ДНК в отдельных эукариотических клетках с помощью световой микроскопии. Он исходил из того факта, что и РНК, и ДНК сильно поглощают ультрафиолетовый свет с длиной волны 260 нм, но только ДНК интенсивно окрашивается реактивом Фёльгена. Касперсон обнаружил, что почти вся ДНК содержится в ядре, тогда как РНК находится большей частью в цитоплазме. К такому же выводу пришел Жан Браше (Jean Brachet), который разделял клетки на ядерную и цитоплазматическую фракции и определял в них содержание ДНК и РНК. Более того, он обнаружил, что РНК в цитоплазматической фракции находится в составе маленьких частиц и ассоциирована с белком. Было показано, что эти частицы, состоящие из РНК и белка, служат местом синтеза белка. Теперь их называют *рибосомы.*

25.1. Структура РНК

РНК, подобно ДНК, представляет собой длинную неразветвленную молекулу, состоящую из нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирными связями 3'—>5'. Число нуклеотидов в молекуле РНК колеблется от всего лишь 75 до многих тысяч. Ковалентная структура РНК отличается от ДНК в двух отношениях. Как указывает само название, сахарный остаток в *РНК - рибоза,* а не дезоксирибоза. Рибоза содержит 2'-гидроксильную группу, которой нет в дезоксирибозе. Другое различие состоит в том, что одним из четырех оснований в РНК является *урацил* (U) - вместо тимина, содержащегося в ДНК. Как и тимин, урацил может образовывать пару оснований с аденином. Но в молекуле урацила нет метильной группы, имеющейся в молекуле тимина.



Рибоза



Урацил

Таблица 25.1. **Молекулы РНК у** *E. coli*

Тип РНК	Относительное содержание, %	Коэффициент седиментации, S	Масса, кДа	Число нуклеотидов
Рибосомная (рРНК)	80	23	$1{,}2 \cdot 10^3$	3700
		16	$0{,}55 \cdot 10^3$	1700
		5	$3{,}6 \cdot 10^1$	120
Транспортная (тРНК)	15	4	$2{,}5 \cdot 10^1$	75
Информационная (мРНК)	5		Гетерогенна	

Молекулы РНК имеют одноцепочечное строение, за исключением РНК некоторых вирусов. Поэтому нуклеотидный состав РНК не подчиняется правилу комплементарности. Действительно, в большинстве молекул РНК содержание аденина отличается от содержания урацила, а содержание гуанина отличается от содержания цитозина. Но молекулы РНК все-таки содержат участки с двухцепочечной структурой, которые образуют петли в виде шпилек (рис. 25.2). В этих участках А спаривается с U, а G спаривается с С. Кроме того, G может образовывать пару оснований с U, но она менее прочна, чем GC-пара (разд. 27.6). Спаривание оснований в шпильках РНК часто несовершенно. Некоторые основания, расположенные в шпильке друг против друга, не комплементарны, и одно или несколько оснований в одной из цепей могут выпетливаться (выступать) из участка двойной спирали, чтобы облегчить спаривание других оснований. Доля двухспиральных участков в различных РНК варьирует в широких пределах - в наиболее типичном случае до 50%

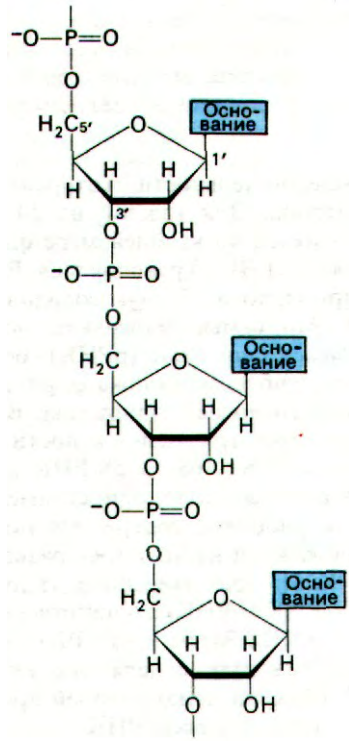


Рис. 25.1. Структура части цепи РНК.

25.2. Клетки содержат три типа РНК: рибосомную, транспортную и информационную

Клетки содержат три типа РНК (табл. 25.1). *Информационная РНК* (ее называют также матричная РНК, отсюда мРНК) служит матрицей для синтеза белка. Каждому работающему гену (или группе генов) соответствует своя молекула мРНК. Следовательно, мРНК - крайне гетерогенный класс молекул, у *E. coli* средняя длина молекулы мРНК составляет примерно 1,2 kb. *Транспортная РНК* (тРНК) переносит аминокислоты в активированной форме к рибосомам, где они соединяются пептидной связью в определен-

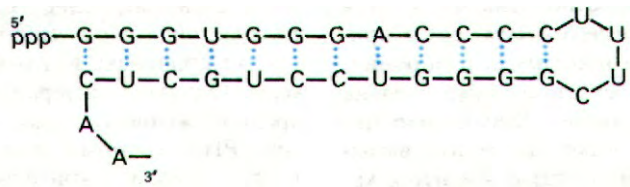


Рис. 25.2. РНК может складываться сама на себя и образовывать двухспиральные структуры.

Единица Сведберга (S) - коэффициенты седиментации биологических макромолекул выражаются в единицах Сведберга (сокращенно S); $1S = 10^{-13}$ с. (Сведберг - шведский ученый, изобретатель ультрацентрифуги.)

ной последовательности, которую задает РНК-матрица. Для каждой из 20 аминокислот имеется по крайней мере одна разновидность тРНК, Транспортная РНК состоит примерно из 75 нуклеотидов (масса 25 кДа). Это самые маленькие молекулы РНК. *Рибосомная РНК* (рРНК) - основной компонент рибосом, но пока ее роль в синтезе белка точно не установлена. В клетке *E. coli* имеется три разновидности рРНК, называемые 23S-, 16S- и 5S-РНК соответственно их поведению при седиментации. В каждой рибосоме содержится по одной молекуле каждой из этих трех разновидностей РНК. Из трех указанных типов РНК (мРНК, тРНК, рРНК) количественно преобладает рРНК. Затем идет тРНК, и меньше всего в клетке содержится информационной РНК, на долю которой приходится всего лишь 5% всей РНК.

25.3. Формулирование концепции информационной РНК

Концепция мРНК была сформулирована Франсуа Жакобом и Жаком Моно (Francois Jacob, Jacues Monod) в классической статье, опубликованной в 1961 г. Поскольку в эукариотических клетках белки синтезируются в цитоплазме, а не в ядре, было очевидно, что должен существовать какой-то химический посредник, кодируемый генами. Жакоб и Моно назвали его структурным посредником. Какова природа этого промежуточного продукта? Важную роль в решении этого вопроса сыграло проведенное ими исследование регуляции синтеза белка у *E. coli* (гл. 28). Некоторые ферменты *E. coli,* например ферменты, участвующие в поглощении и использовании лактозы, индуцибельны. Это означает, что количество этих ферментов увеличивается более чем в 1000 раз в присутствии индуктора (например, изопропилтиогалактозида). Особенно показательна была кинетика индукции. Добавление индуктора уже через несколько минут вызывало максимальный синтез ферментов, катализирующих обмен лактозы. При удалении индуктора синтез данных ферментов прекращался также быстро. Эти экспериментальные данные были несовместимы с существованием стабильных матриц для синтеза указанных ферментов. Отсюда Жакоб и Моно сделали вывод, что *время жизни посредника должно быть очень коротким.* Затем они предположили, что он должен обладать следующими свойствами.

1. Посредник должен быть полинуклеотидом.
2. Нуклеотидный состав предшественника должен соответствовать нуклеотидному составу ДНК, которая его кодирует.
3. Посредник должен быть весьма гетерогенным по размеру, так как гены (или группы генов) различаются по длине. Жакоб и Моно высказали правильное предположение, что три нуклеотида кодируют одну аминокислоту, и вычислили, что масса посредника должна быть не менее 500 кДа.
4. Посредник должен быть временно ассоциирован с рибосомами - местом синтеза белка.
5. Посредник должен синтезироваться и распадаться очень быстро. Отсюда следует, что аналоги оснований, например 5-фторурацил, должны включаться в посредник в течение нескольких минут.

Для Жакоба и Моно было очевидно, что известные в то время фракции РНК не удовлетворяют этим критериям. Рибосомная РНК, которую принято было считать матрицей для синтеза белков, была слишком гомогенна по размеру. Кроме того, ее нуклеотидный состав был сходен у видов, сильно различавшихся по нуклеотидному составу ДНК. Более того, эта РНК была стабильной, и 5-фторурацил включался в нее очень медленно. Транспортная РНК тоже не подходила на роль посредника по тем же причинам. К тому же она слишком мала. Однако в литературе высказывалось предположение о существовании третьего типа РНК, который, по-видимому, удовлетворял всем критериям посредника. В клетках *E. coli,* зараженных бактериофагом Т2 (рис. 25.3), была обнаружена ранее неизвестная фракция РНК подходящего размера с очень коротким временем жиз-

ни. Самое интересное, что нуклеотидный состав этой фракции РНК был близок к составу вирусной ДНК, а не ДНК *E. coli.*

25.4. Экспериментальные данные о существовании информационной РНК-посредника в синтезе белка

Правомочность гипотезы о короткоживущей РНК-посреднике, играющей роль переносчика информации при синтезе белка, была проверена вскоре после того, как гипотеза была сформулирована. Сидней Бреннер, Франсуа Жакоб и Мэтью Меселсон (Sydney Brenner, Francois Jacob, Matthew Meselson) провели эксперименты на *E. coli,* зараженной бактериофагом Т2. Почти все белки, синтезирующиеся после заражения, детерминируются генами фага. Синтез этих белков не сопровождается увеличением общего количества РНК. Однако вскоре после заражения появляется минорная фракция РНК с коротким временем жизни. Как уже говорилось выше, нуклеотидный состав минорной фракции РНК сходен с составом фаговой ДНК. Эта система представлялась оптимальной для проверки гипотезы посредника, поскольку в ней происходило быстрое переключение природы синтезируемого белка. Еще одно преимущество состояло в том, что в зараженных клетках не происходило синтеза рРНК и тРНК.

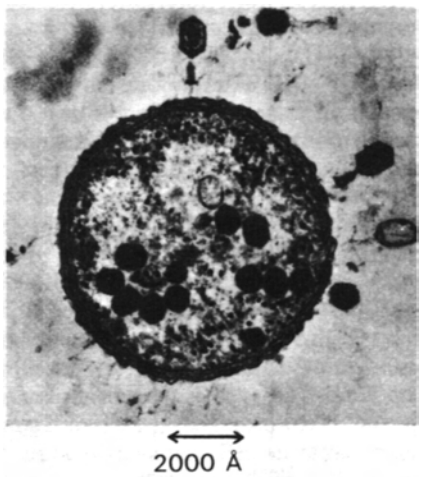


Рис. 25.3. Электронная микрофотография клетки *E. coli*, зараженной вирусами Т2. (Печатается с любезного разрешения д-ра Lee Simon.)

Как же происходит при заражении переключение синтеза с одних белков на другие? Одна возможность состояла в том, что фаговая ДНК программирует образование новых рибосом. Согласно этому предположению, гены определяют синтез специализированных рибосом, а каждая рибосома может синтезировать белок только одного вида. Альтернативное предположение, выдвинутое Жакобом и Моно, состояло в том, что рибосомы - неспециализированные структуры, которые получают генетическую информацию от гена в виде нестабильной информационной РНК (посредника). Эксперименты Бреннера, Жакоба и Меселсона были спланированы таким образом, чтобы можно было выяснить, происходит ли после заражения синтез новых рибосом или же новообразованная РНК присоединяется к предсуществовавшим рибосомам.

Бактерии выращивали в среде, содержавшей тяжелые изотопы (^{15}N и ^{13}C), заражали фагом и немедленно переносили в среду, содержащую легкие изотопы (^{14}N и ^{12}C). Рибосомы, синтезированные до и после заражения, можно было разделить центрифугированием в градиенте плотности, так как их плотности различались («тяжелые» и «легкие» соответственно; рис. 25.4). Новая РНК была помечена радиоактивными изотопами с помощью ^{32}P- и ^{14}C-урацила, а новый белок был помечен изотопом ^{35}S. В результате этих экспериментов было установлено следующее.

1. *Синтеза рибосом после заражения не происходит,* о чем свидетельствует отсутствие «легких» рибосом.

2. РНК синтезируется после заражения. Большая часть радиоактивно меченной РНК обнаруживается в «тяжелом» рибосомном пике. Итак, *большая часть новосинтезированной РНК ассоциирована с предсуществующими рибосомами.* Дополнительные эксперименты показали, что во время роста фага происходит быстрый распад и ресинтез этой новой РНК.

3. Радиоактивный изотоп ^{35}S временно появлялся в «тяжелом» рибосомном пике, из чего следует, что *синтез новых белков происходит на предсуществующих рибосомах.*

Эти эксперименты позволили сделать

Рис. 25.4. Центрифугирование рибосом и РНК контрольных бактерий и бактерий, зараженных фагом Т2, в градиенте плотности. Меченная ^{32}P РНК, синтезированная *после* заражения, попадает в полосу рибосом, образованных до заражения («тяжелые» рибосомы). После заражения синтеза рибосом не происходит.

следующий вывод: *рибосомы - неспециализированные структуры, синтезирующие в каждый данный момент тот белок, который закодирован в информационной РНК, находящейся в данный момент в рибосомах.* Исследования незараженных бактериальных клеток также показали, что информационная РНК служит звеном, переносящим информацию от гена к белку. Вскоре представление об информационной РНК стало одним из основополагающих в молекулярной биологии.

25.5. Опыты по гибридизации показали, что информационная РНК комплементарна кодирующей ее ДНК-матрице

В 1961 г. Сол Спигелман (Sol Spigelman) разработал новый метод, названный *гибридизацией*. Он должен был дать ответ на следующий вопрос: комплементарна ли последовательность оснований РНК, синтезированной после заражения фагом Т2, последовательности оснований ДНК фага Т2? Из работы Джулиуса Мармура и Пола Доти (Julius Marmur, Paul Doty) было известно, что при нагревании двухспиральной ДНК выше температуры плавления она переходит в одноцепочечную форму. При медленном охлаждении раствора эти цепи реассоциируют и образуют двухспиральную структуру, обладающую биологической активностью. Мармур и Доти обнаружили также, что двухспиральные молекулы образуются только в том случае, если цепи ДНК происходят из организмов одного вида или близкородственных видов. Это наблюдение подсказало Спигелману, что в смеси одноцепочечной ДНК и РНК должны образовываться гибриды ДНК-РНК, если их последовательности оснований комплементарны (рис. 25.5). Схема эксперимента была следующей:

1. РНК, синтезированную после заражения *E. coli* фагом Т2 (Т2-мРНК), метили изотопом ^{32}P. В другом эксперименте ДНК фага Т2 (Т2-ДНК) пометили изотопом ^{3}H.

2. Смесь Т2-мРНК и Т2-ДНК нагревали до 100°С. В результате двухспиральная ДНК расплавлялась и переходила в одноцепочечную форму. Этот раствор, содержащий одноцепочечные РНК и ДНК, медленно охлаждали до комнатной температуры.

3. Охлажденную смесь анализировали методом центрифугирования в градиенте плотности. Образцы центрифугировали несколько дней в бакет-роторе. Затем пласти-

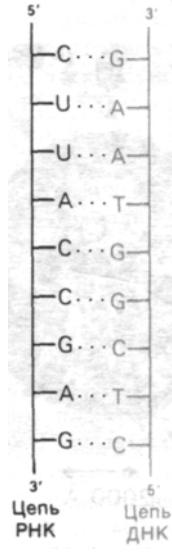


Рис. 25.5. Если РНК и ДНК имеют комплементарные последовательности, может образоваться гибрид РНК—ДНК.

ковые пробирки с образцами протыкали снизу и собирали фракции по каплям для дальнейшего анализа.

В результате были обнаружены три полосы (рис. 25.6). Полоса с наибольшей плотностью соответствовала одноцепочечной РНК. Вторая полоса соответствовала двухспиральной ДНК. Третья располагалась вблизи от полосы ДНК и состояла из двухцепочечных гибридных молекул ДНК—РНК. Итак, Т2-мРНК образовывала гибрид с Т2-ДНК. В отличие от этого Т2-РНК не гибридизовалась с ДНК многих бактерий и неродственных вирусов, даже если их нуклеотидный состав был подобен Т2-ДНК. Последующие эксперименты показали, что фракция мРНК из незараженных клеток гибридизуется с ДНК именно того организма, из которого она была выделена, но не с ДНК неродственных организмов. Эти убедительные эксперименты продемонстрировали, что *последовательность оснований мРНК комплементарна последовательности ДНК-матрицы. К тому же был разработан мощный метод, с помощью которого можно было исследовать поток генетической информации в клетках и выяснять, сходны ли две молекулы нуклеиновой кислоты.*

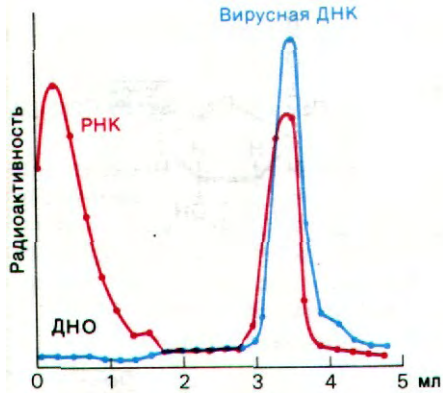


Рис. 25.6. РНК, образовавшаяся после заражения *E.coli* фагом Т2, комплементарна вирусной ДНК. В этих экспериментах по гибридизации РНК метили ^{32}P, а ДНК фага Т2 - ^{3}H. Распределение радиоактивности в градиенте плотности хлористого цезия показывает, что большая часть РНК, синтезированной после заражения, попадает в одну полосу с ДНК фага Т2. (Spiegelman S., Hybrid nucleic acids, Sci. Amer., 1964.)

25.6. Рибосомные РНК и транспортные РНК также синтезируются на ДНК-матрице

Метод гибридизации был использован затем, чтобы выяснить, синтезируются ли рРНК и тРНК также на ДНК-матрицах. Образование гибридов РНК—ДНК выявляли с помощью фильтров, а не центрифугированием в градиенте плотности, так как этот метод проще, чувствительнее и требует меньше времени. Одноцепочечные РНК проходят через нитроцеллюлозный фильтр, а двухспиральные ДНК и гибриды РНК—ДНК задерживаются на фильтре. РНК *E. coli* пометили изотопом ^{32}P и смешали с немеченой ДНК *E. coli*. Эту смесь нагревали, медленно охлаждали и затем отфильтровывали через нитроцеллюлозу. Радиоактивность, задержанную на фильтре, просчитывали. Результаты экспериментов не вызывали сомнений: *гибриды РНК—ДНК образовывались со всеми рРНК (5S, 16S и 23S) и мРНК. Отсюда следовало, что в геноме E. coli имеются последовательности, комплементарные этим молекулам РНК.*

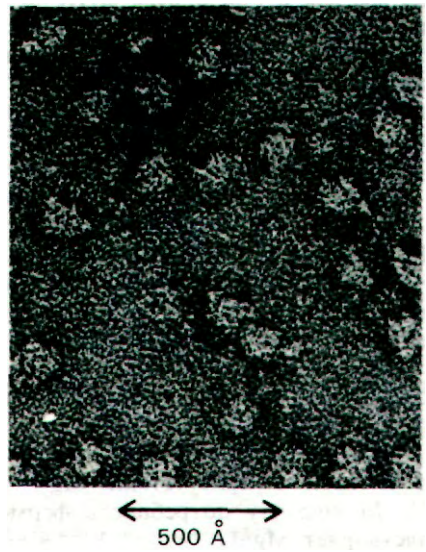


Рис. 25.7. Электронная микрофотография РНК-полимеразы *E. coli*. (Печатается с любезного разрешения д-ра Robley Williams и д-ра Michael Chemberlin.)

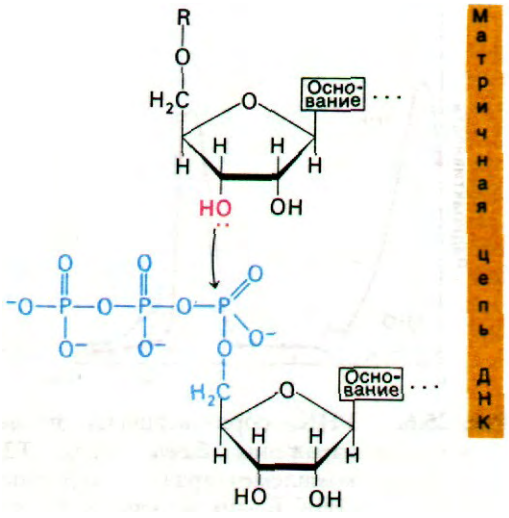


Рис. 25.8. Механизм реакции элонгации цепи, катализируемой РНК-полимеразой.

25.7. Все клеточные РНК синтезирует РНК-полимераза

Концепция мРНК стимулировала поиски фермента, который синтезирует РНК в соответствии с последовательностью ДНК-матрицы. Стратегия эксперимента была такой же, как и при поиске ДНК-полимеразы I. В 1960г. Джерард Хёрвиц и Сэмюэл Вейсс (Jerard Hurwitz, Samuel Weiss) независимо открыли такой фермент. Они назвали его *РНК-полимеразой.* Ферменту из клеток *E. coli* (рис. 25.7) нужны были для синтеза РНК следующие компоненты.

1. *Матрица.* Предпочтительная матрица - *двухцепочечная ДНК.* Одноцепочечная ДНК также может служить матрицей. Ни РНК (как одноцепочечная, так и двухцепочечная), ни гибриды РНК—ДНК не могут служить эффективными матрицами.

2. *Активированные предшественники.* Необходимы все четыре *рибонуклеозидтрифосфата* - ATP, GTP, UTP и CTP.

3. *Двухвалентные ионы металлов.* Фермент активен в присутствии Mg^{2+} или Mn^{2+}. *In vivo* эту потребность фермента удовлетворяет Mg^{2+}.

РНК-полимераза катализирует инициацию и элонгацию цепей РНК. Фермент катализирует следующую реакцию:

$$(РНК)_{n\ остатков} + Рибонуклеозидтрифосфат \rightleftarrows (РНК)_{n+1\ остаток} + PP_i.$$

Синтез РНК во многих отношениях подобен синтезу ДНК (рис. 25.8). Во-первых, как будет вскоре показано более подробно, синтез идет в направлении 5'—> —>3'. Во-вторых, по-видимому, механизм элонгации сходен. Происходит нуклеофильная атака внутреннего фосфата очередного нуклеозидтрифосфата 3'-OH-группой на конце растущей цепи. В-третьих, движущая сила синтеза - гидролиз пирофосфата.

Однако по некоторым важным особенностям синтез РНК отличается от синтеза ДНК. Во-первых, РНК-полимеразе не нужна затравка. Во-вторых, ДНК-матрица при синтезе РНК полностью сохраняется, тогда как при синтезе ДНК она сохраняется лишь наполовину. В-третьих, РНК-полимераза, насколько известно, не обладает никакими нуклеазными активностями.

Все три типа клеточной РНК *E. coli* - мРНК, тРНК и рРНК - синтезируются одной РНК-полимеразой в соответствии с инструкциями, заданными ДНК-матрицей. В клетках млекопитающих имеет место разделение труда между несколькими видами РНК-полимераз. Кроме того, необходимо отметить, что некоторые вирусы кодируют РНК-синтезирующие ферменты, совершенно отличные от ферментов клетки-хозяина. Таковы, например, РНК-полимераза, кодируемая ДНК-содержащим фагом T7, и РНК-репликаза, кодируемая РНК-содержащим фагом Qβ. Репликаза фага Qβ является РНК-зависимой РНК-полимеразой, так как она синтезирует РНК не по ДНК-матрице, а по РНК (гл. 30). Клеточные же ферменты, синтези-

5'-GCGGCGACGCGCAGUUAAUCCCACAGCCGCCAGUUCCGCUGGCGGCAUUUU-3' мРНК
3'-CGCCGCTGCGCGTCAATTAGGGTGTCGGCGGTCAAGGCGACCGCCGTAAAA-5'
5'-GCGGCGACGCGCAGTTAATCCCACAGCCGCCAGTTCCGCTGGCGGCATTTT-3' ДНК

Рис. 25.9. Последовательность оснований мРНК комплементарна последовательности матричной ДНК. Показана часть последовательности триптофанового оперона.

рующие РНК, наоборот, представляют собой *ДНК-зависимые РНК-полимеразы.*

25.8. РНК-полимераза получает инструкции от ДНК-матрицы

Подобно ДНК-полимеразам, описанным в предыдущей главе, РНК-полимераза использует информацию, содержащуюся в ДНК-матрице. Первым доводом в пользу этого утверждения послужили данные о том, что нуклеотидный состав новосинтезированной РНК комплементарен составу матричной цепи ДНК. Если в качестве матрицы использовать синтетический полидезоксирибонуклеотид poly(dT), содержащий только остатки тимидиловой кислоты, то в синтезируемую полирибонуклеотидную цепь включается только один рибонуклеозидтрифосфат - ATP. Продукт реакции - полирибоаденилат [сокращенное обозначение poly(rA)]. Если в качестве матрицы для РНК-полимеразы используется сополимер с чередующимися основаниями poly(dA-dT), то включаются UTP и ATP, а в качестве продукта реакции образуется poly(rA-rU). Нуклеотидный состав РНК, синтезированной с использованием в качестве матрицы одноцепочечной ДНК фага φX174, также свидетельствует о наличии комплементарности между РНК-продуктом и ДНК-матрицей (табл. 25.2). Эксперименты по гибридизации показывают, что РНК, синтезированная РНК-полимеразой, комплементарна матричной ДНК. Наиболее убедительный довод в пользу надежности копирования ДНК при транскрипции получен при изучении последовательности оснований; оказалось, что последовательность мРНК в точности комплементарна последовательности матричной ДНК (рис. 25.9).

Таблица 25.2. **Нуклеотидный состав РНК, синтезированной на вирусной ДНК в качестве матрицы**

ДНК-матрица (плюс-цепь фага φX174)		РНК-продукт	
A	0.25	0,25	U
T	0,33	0,32	A
G	0,24	0,23	C
C	0,18	0,20	G

25.9. Обычно в данном участке генома транскрибируется только одна цепь ДНК

Транскрибируются ли обе цепи двухспиральной матричной ДНК, или только одна? *A priori* кажется маловероятным, что в одном и том же участке ДНК обе цепи кодируют функциональные белки. Один из первых ответов на этот вопрос был получен при использовании метода гибридизации в опытах с *E. coli,* зараженной фагом φX174. Частицы фага φX174 содержат одноцепочечную ДНК, которую называют

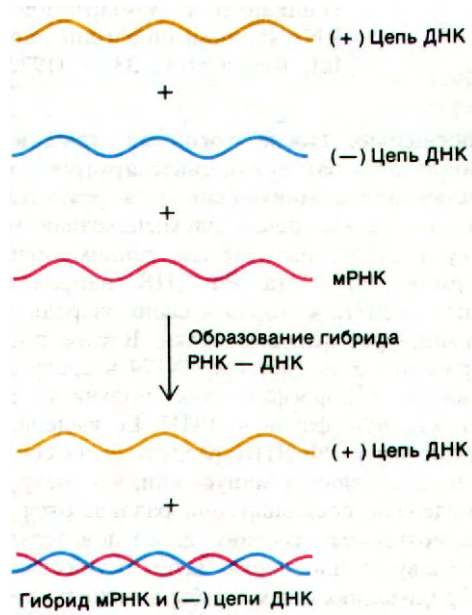


Рис. 25.10. Как показывает этот гибридизационный эксперимент, только одна цепь РФ-ДНК фага φX174 используется в качестве матрицы при транскрипции.

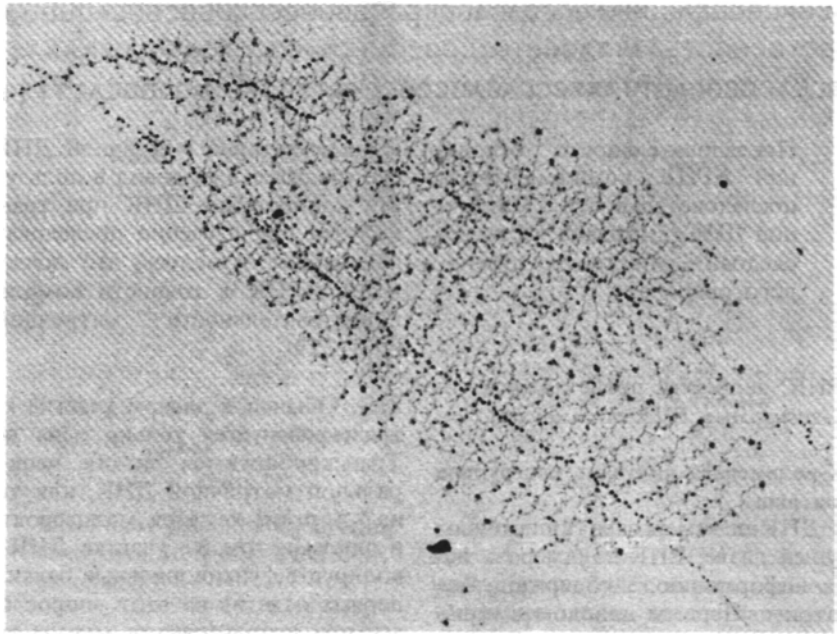


Рис. 25.11. Электронная микрофотография, на которой виден процесс транскрипции. [Miller O. L., Hamkalo B. A., Visualization of RNA synthesis on chromosomes, Int. Rev. Cytol., 33, 1 (1972).]

плюс-цепью. После того как плюс-цепь проникает в бактерию, синтезируется комплементарная минус-цепь, и в результате образуется кольцевая двухцепочечная молекула ДНК, называемая репликативной формой (РФ). Эта РФ-ДНК направляет синтез мРНК, которая в свою очередь детерминирует фаговые белки. Вскоре после заряжения *E. coli* фагом φX174 в среду добавляли ^{32}P-фосфат; так получили радиоактивную фаговую РНК. Ее выделили. Кроме того, РФ-ДНК разделили на составляющие плюс- и минус-цепи, что нетрудно сделать, поскольку они различаются по нуклеотидному составу и, следовательно, по плавучей плотности. Затем осуществили гибридизацию, с тем чтобы выяснить, комплементарна ли новосинтезированная мРНК плюс-цепи, или минус-цепи, или же обеим цепям. Был получен однозначный результат: только минус-цепь РФ-ДНК образовывала гибрид с меченой мРНК. Итак, *только одна цепь РФ-ДНК фага φX174 служит in vivo матрицей для транскрипции.*

Точно так же только одна цепь таких вирусов, как T7, SP8 и α, транскрибируется *in vivo*. В случае таких вирусов, как фаги T4 или λ, ситуация сложнее. В одних участках генома матрицей служит одна цепь, в других - другая. Такая же транскрипция с переменой матрицы в различных группах генов происходит и в клетках *E. coli*.

25.10. РНК-полимераза *E. coli* состоит из субъединиц

РНК-полимераза *E. coli* - очень большой и сложный фермент. Масса целого фермента равна примерно 500 кДа. РНК-полимераза состоит из отдельных субъединиц (табл. 25.3); это можно доказать, вызвав диссоциацию фермента в концентрированном растворе мочевины. Субъединичный состав целого фермента, называемого *голоферментом,* - $\alpha_2\beta\beta'\sigma$. Как это видно из

Таблица 25.3. **Субъединицы РНК-полимеразы** *E.coli*

Обозначение субъединицы	Число субъединиц	Масса, кДа
α	2	40
β	1	155
β'	1	165
σ	1	95

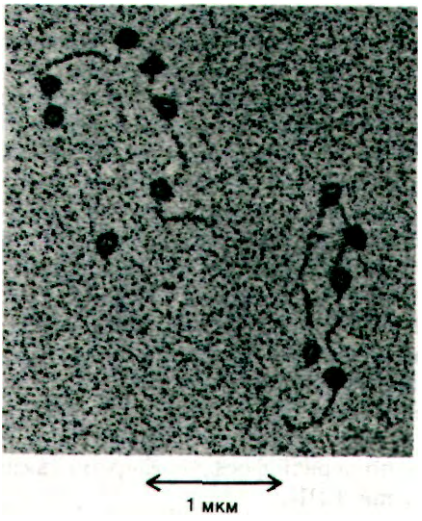


Рис. 25.12. Электронная микрофотография РНК-полимеразы-голофермента, связанного со многими промоторными участками фрагмента ДНК фага Т7. [Williams R.C., Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 2313 (1977).]

последующего текста, после того как инициация синтеза РНК произошла, σ-субъединица отделяется от фермента. РНК-полимераза без σ-субъединицы называется *минимальным ферментом или кор-ферментом* ($\alpha_2\beta\beta'$). Каталитический участок РНК-полимеразы находится в кор-ферменте. Установлено, что β'-субъединица участвует в связывании с ДНК-матрицей, а β-субъединица - в связывании субстратов - рибонуклеозидтрифосфатов. σ-Субъединица голофермента участвует в выборе участка инициации транскрипции.

Синтез РНК РНК-полимеразой *E.coli* происходит в три этапа, называемых 1) *инициация,* 2) *элонгация* и 3) *терминация.* С этими процессами мы познакомимся несколько ниже.

25.11. Транскрипция инициируется на промоторных участках матричной ДНК

Транскрипция начинается в определенных участках матричной ДНК, называемых *промоторами.* Как РНК-полимераза находит эти участки? Один из подходов к решению этой проблемы состоит в том, чтобы выделить те фрагменты, которые голофермент РНК-полимеразы защищает от расщепления панкреатической дезоксирибонуклеазой, и определить в этих фрагментах последовательность нуклеотидов. Другой подход сводится к тому, чтобы исследовать ряд мутантов с повышенной или пониженной интенсивностью транскрипции определенных генов. В результате таких исследований было установлено, что промоторные участки состоят примерно из сорока пар оснований, что соответствует фрагменту ДНК длиной примерно 140 А. Как показал анализ различных промоторов *E. coli* и фагов, функцию сигнала узнавания в основном выполняет последовательность семи пар оснований, середина которой находится на расстоянии примерно 10 нуклеотидов перед точкой, с которой начинается кодирование мРНК (рис. 25.13). Второй участок узнавания расположен на расстоянии около 35 нуклеотидов перед точкой начала мРНК; он также участвует в первоначальном связывании РНК-полимеразы.

25.12. σ-Субъединица обеспечивает узнавание промоторных участков РНК-полимеразой

Кор-фермент ($\alpha_2\beta\beta'$) РНК-полимеразы не может начинать транскрипцию в промоторных участках. *Для специфической инициации необходим голофермент* $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ Роль сигма-субъединицы была открыта следующим образом. Если РНК-полимеразу очищали хроматографией на колонке с фосфоцеллюлозой, то она была практи-

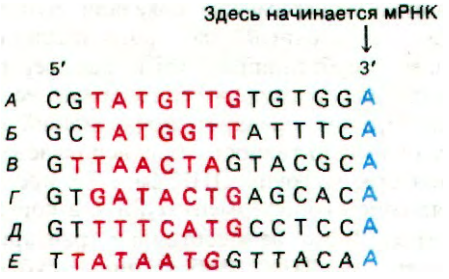


Рис. 25.13. Промоторные последовательности лактозного (*А*), галактозного (*Б*) и триптофанового *(В)* оперонов *E.coli,* фагов λ (*Г*) и φX174 (*Д*) и вируса SV-40 (*Е*). Предполагаемая область гомологии, так называемая последовательность Прибнова (Pribnow), показана зеленым.

Рис. 25.14. Разделение РНК-полимеразы на σ-субъединицу и кор-фермент (минимальный фермент; $\alpha_2\beta\beta'$) на колонке с фосфоцеллюлозой.

чески лишена активности при использовании в качестве матрицы ДНК фага Т4, но сохраняла активность в опытах с ДНК из тимуса теленка. Наряду с этим та же РНК-полимераза, очищенная центрифугированием в градиенте концентрации глицерола, была, напротив, весьма активна на обеих матрицах. Из этого наблюдения можно было сделать вывод, что в препарате РНК-полимеразы, очищенной на фосфоцеллюлозе, не хватает какого-то фактора. Так оно и было (рис. 25.14). Активность фермента, очищенного на фосфоцеллюлозе, значительно увеличивается при добавлении другой фракции, элюирующейся с колонки. Этот стимулирующий фактор сам по себе не обладает каталитической активностью. Он был назван сигма (σ)-фактором. Последующие эксперименты показали, что фермент, очищенный на фосфоцеллюлозе, лишен σ-субъединицы, тогда как фермент, очищенный в глицероле, содержит ее. Таким образом, препарат, проявлявший максимальную активность при использовании в качестве матрицы ДНК фага Т4, представлял собой голофермент $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ а кор-фермент $\alpha_2\beta\beta'$ был не в состоянии транскрибировать эту ДНК. Добавление σ-субъединицы к кор-ферменту приводило к реконструкции вполне активного голофермента. Кор-фермент обладал способностью транскрибировать ДНК тимуса теленка, так как эта матрица содержит много одноцепочечных разрывов. РНК, синтезированная кор-полимеразой *in vitro*, не соответствует транскриптам, образующимся *in vivo*. В частности, кор-фермент транскрибирует обе цепи фаговых ДНК-матриц, тогда как голофермент транскрибирует асимметрично одну цепь, как он это делает in vivo.

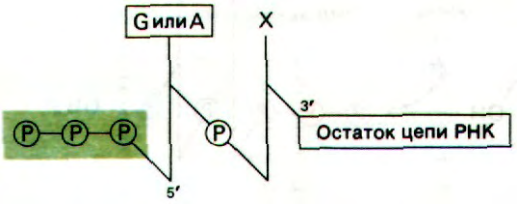
Сигма-субъединица обеспечивает специфическую инициацию, *снижая в 10^4 раз сродство РНК-полимеразы к ДНК, не содержащей промоторов.* Кроме того, *сигма-субъединица активирует узнавание промоторных последовательностей РНК-полимеразой.* Наконец, сигма-субъединица участвует в *раскрывании двойной спирали ДНК,* так чтобы одна из цепей могла служить матрицей. При связывании голофермента РНК-полимеразы расплетается примерно один виток спирали ДНК. Так происходит подготовка фермента к образованию первой фосфодиэфирной связи новой цепи РНК.

После того как начинается синтез новой цепи РНК, сигма-субъединица отделяется от голофермента. Кор-фермент продолжает транскрибировать матрицу ДНК. Таким образом, *функция голофермента — поиск промотора и инициация, а функция кор-фермента - элонгация.* Отделившаяся сигма-субъединица присоединяется к другой молекуле кор-полимеразы, чтобы участвовать в инициации нового цикла транскрипции.

Инициация новых цепей РНК регулируется многими способами. Некоторые промоторные последовательности обеспечивают высокую эффективность инициации, другие менее эффективны. Кроме того, эффективность инициации регулируется белками, которые связываются с самим промоторным участком или рядом с ним. Репрессоры блокируют транскрипцию, препятствуя связыванию РНК-полимеразы, а факторы положительной регуляции способствуют инициации, облегчая связывание РНК-полимеразы. Эти важные регуляторные механизмы мы рассмотрим подробнее в гл. 28.

25.13. Цепи РНК начинаются с pppG или pppA

Большинство новосинтезированных цепей РНК содержат своего рода ярлычок, который показывает, с чего начался их синтез. Новые цепи РНК имеют строго определенную структуру 5'-конца: *молекула начинается либо с pppA, либо с pppG.* В отличие от синтеза ДНК затравка в этом случае не нужна. *Цепи РНК могут образовываться de novo.*



Этот ярлычок на 5'-конце был открыт двумя способами. Было обнаружено, что цепи РНК включают ^{32}P, если инкубационная смесь содержит меченный по γ-атому ^{32}P-ATP. Очевидно, что включенная метка должна быть локализована на конце, так как только α-атом фосфора нуклеозидтрифосфата может участвовать в образовании внутренних фосфодиэфирных мостиков РНК. Кроме того, при щелочном гидролизе новосинтезированной РНК образуются продукты трех типов: нуклеозиды, нуклеозид-2'-монофосфаты (или нуклеозид-3'-монофосфаты) и нуклеозидтетрафосфаты (рис. 25.15). Если в качестве субстрата использовали γ-^{32}P-ATP, образовывался аденозин-3'-фосфат-5'-трифосфат. γ-Атом фосфора этого нуклеозидтетрафосфата содержал метку. Аналогичный результат был получен с γ-^{32}P-GTP. Однако, если взять γ-меченный CTP или UTP, радиоактивность не включается. Следовательно, *новообразованная цепь РНК имеет трифосфатную группу на 5'-конце и свободную ОН-группу на 3'-конце.*

25.14. Цепи РНК синтезируются в направлении 5'—>3'

В каком направлении синтезируется РНК? В направлении 5'—>3' или 3'—>5'? Два противоположных механизма роста цепи проиллюстрированы на рис. 25.16. При росте в направлении 5'—>3' трифосфатный конец образуется в начале роста цепи, а при росте 3'—>5' трифосфатный конец появляется с последним включенным остатком. Кинетика включения радиоактивности в РНК, синтезированную из γ-^{32}P-GTP (или ATP), указывает, какая из этих возможностей имеет место. Если в качестве субстрата использовать γ-^{32}P-GTP, то отношение включения ^{32}P к общему включению нуклеотидов в продукт достигает максимума очень быстро после смешивания компонентов, а затем постепенно снижается во времени. При этом общая радиоактивность уже помеченной РНК не снижается при последующем добавлении большого избытка нерадиоактивного GTP в инкубационную смесь. Таким образом, ^{32}P включается в молекулу РНК в начале синтеза, а не в конце. *Следовательно, рост цепи РНК идет в направлении 5'—>3', как при синтезе ДНК.*

Кор РНК-полимеразы движется вдоль цепи матричной ДНК в направлении 3'—>—>5', так как матричная цепь антипараллельна новосинтезированной цепи ДНК. Одна и та же молекула РНК-полимеразы синтезирует весь транскрипт - иными словами, транскрипция *процессивна*. По мере того как расплетается очередной участок ДНК, транскрибированный участок восстанавливает свою двухспиральную конформацию. Максимальная скорость элонгации составляет примерно 50 нуклеотидов в секунду.

Необходимо подчеркнуть, что РНК-полимераза не обладает нуклеазной актив-

Рис. 25.15. Продукты щелочного гидролиза цепи РНК, меченной с помощью γ-^{32}P-ATP.

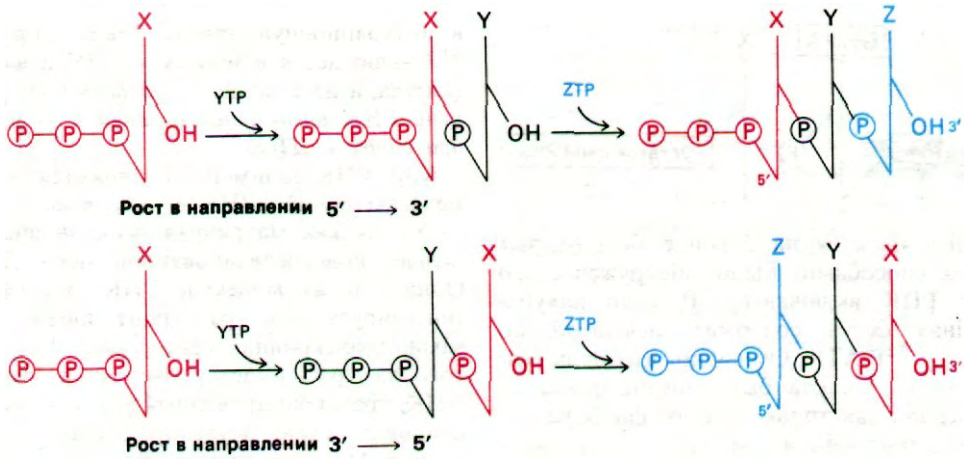


Рис. 25.16. Предполагаемое положение ^{32}P-метки в случае роста в направлении 5'—>3' и 3'—>5'. Наблюдаемое в действительности положение метки показывает, что РНК синтезируется в направлении 5'—>3'.

ностью. *В отличие от ДНК-полимеразы РНК-полимераза не проверяет правильности новообразованной полинуклеотидной цепи. В связи с этим надежность транскрипции значительно ниже, чем надежность репликации.* Частота ошибок при синтезе РНК составляет примерно одну ошибку на 10^4—10^5 нуклеотидов, что в 10^5 раз выше, чем при синтезе ДНК. Гораздо более низкую надежность синтеза РНК клетка обходит тем, что с одного гена синтезируется много копий РНК-транскриптов.

25.15. Матричная ДНК содержит стоп-сигналы для транскрипции

Терминирование транскрипции регулируется так же тонко, как и инициирование. В матричной ДНК имеются стоп-сигналы, которые были расшифрованы путем сравнения различных последовательностей оснований в этих участках. Все они имеют одну общую особенность: *вслед за GC-богатой областью перед участком терминации располагается АТ-богатая последовательность.* Отличительная особенность терминирующих последовательностей — *симметрия второго порядка этой GC-богатой области* (рис. 25.17). Следовательно, РНК-транскрипт этой области самокомплементарен, а это значит, что он способен к спариванию оснований, приводящему к образованию структуры шпильки (рис. 25.18). Кроме того, *новообразованные цепи РНК кончаются несколькими остатками U*, которые кодируются серией оснований А в АТ-богатой области ДНК-матрицы. Одна или несколько подобных структурных особенностей заставляют РНК-полимеразу задержаться, сделать паузу, когда она сталкивается с таким сигналом. В некоторых участках терминации новообразованные цепи РНК высвобождаются без участия дополнительных белков. В других местах для терминации цепи необходимо участие белка ρ (ро).

25.16. Белок ρ участвует в терминировании транскрипции

Тот факт, что терминирование транскрипции в некоторых участках происходит с участием белка ρ, подтверждается следующими данными: молекулы РНК, синтезированные in vitro в присутствии белка ρ, короче молекул, полученных в его отсутствие. Например, РНК, синтезированная на ДНК фага fd в присутствии белка ρ, имеет коэффициент седиментации 10S, тогда как РНК, синтезированная в отсутствие белка ρ,- 23S. Дополнительные сведения о действии белка ρ были получены при добавлении этого фактора терминации в инкубационную смесь через различные промежутки времени после начала синтеза РНК. Если белок ρ добавляли через несколько секунд, через 2 и 10 мин после инициации, получали РНК с коэффициентами седиментации 13, 17 и 23S соответственно. Этот ре-

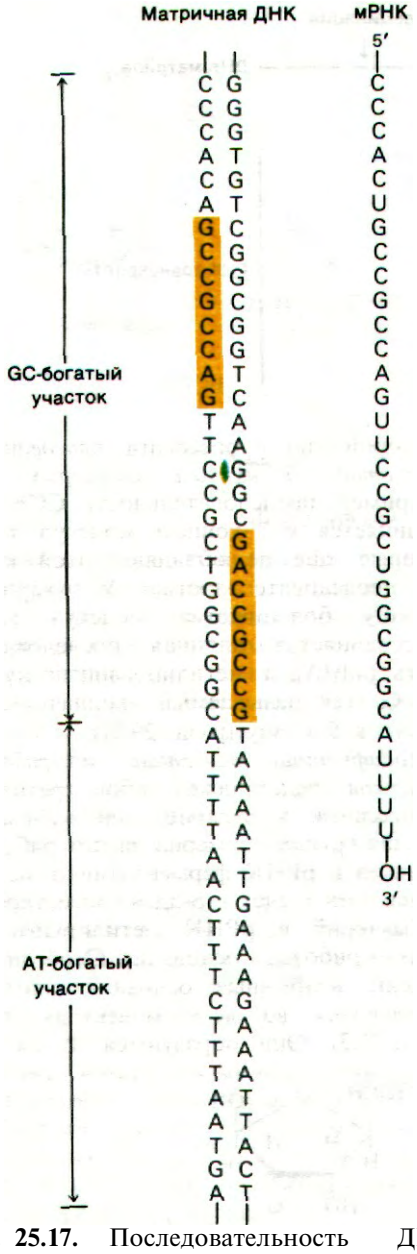


Рис. 25.17. Последовательность ДНК, соответствующая 3'-концу trp-мРНК *E.coli.* Последовательности оснований, показанные желтым цветом, обладают симметрией второго порядка относительно оси, обозначенной зеленым цветом.

зультат свидетельствует о том, что матрица содержит но крайней мере три участка терминации, чувствительных к белку ρ (они дают 10S-, 13S- и 17S-РНК), и один участок терминации, не требующий белка ρ (дает 23S-РНК). Следовательно, специфическая терминация может происходить и в отсутствие белка ρ. Однако белок ρ выявляет дополнительные сигналы терминации, которые сама по себе РНК-полимераза узнавать не может.

Каким образом белок ρ вызывает терминацию синтеза РНК по достижении определенных сигналов терминации? Одна из возможностей состоит в том, что этот белок-тетрамер с массой 200 кДа - садится на РНК и движется по направлению к молекуле РНК-полимеразы, останавливая ее на участке терминации. Согласно этой модели, белок ρ вытесняет РНК-полимеразу с 3'-конца РНК, что приводит к высвобождению РНК-транскрипта. Интересно отметить, что при терминировании транскрипции белок ρ гидролизует АТР.

Как можно было предвидеть, терминирование транскрипции некоторых генов контролируется. В ходе дальнейшего изложения мы увидим, что бактериофаг λ синтезирует *белки-антитерминаторы,* обеспечивающие возможность транскрипции и экспрессии некоторых генов (разд. 28.11), У *E. coli* действует система регуляции с использованием специализированных терминирующих сигналов, называемых *аттенюаторами,* для обеспечения пищевых потребностей клетки (разд. 28.9).

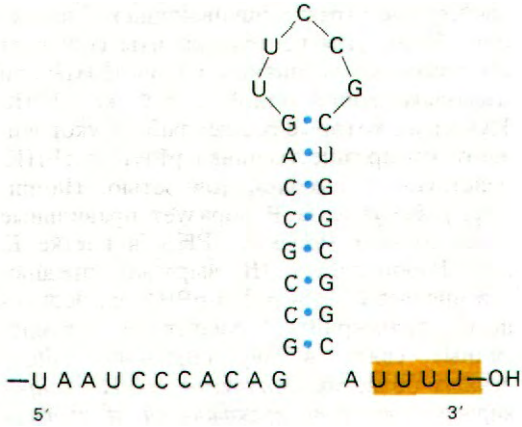


Рис. 25.18. Последовательность оснований 3'-конца мРНК, транскрибированной с триптофанового оперона *E.coli.* Возможно образование стабильной структуры шпильки.

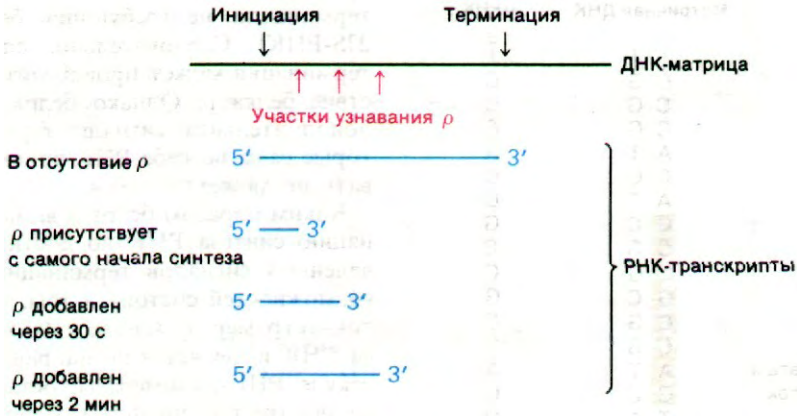


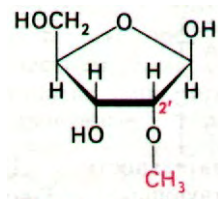
Рис. 25.19. Влияние фактора ρ на размер транскрибируемых РНК.

25.17. Многие молекулы РНК после транскрипции расщепляются и химически модифицируются

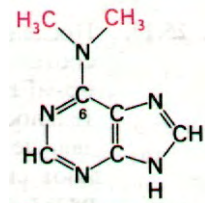
Образование функционально активных молекул РНК (процессинг) продолжается после завершения транскрипции. У *прокариот молекулы транспортных и рибосомных РНК образуются путем расщепления и химической модификации определенных новосинтезированных цепей РНК.* Например, у *E.coli* три вида молекул рибосомных РНК и одна молекула транспортной РНК вырезаются из первичного РНК-транскрипта, который, кроме того, содержит спейсерные (разграничивающие) участки (рис. 25.20). Другие транскрипты содержат по несколько различных видов тРНК или несколько копий одной и той же тРНК. Нуклеазы, которые расщепляют и укорачивают эти предшественники рРНК и тРНК, действуют с высокой точностью. Например, рибонуклеаза Р образует правильные 5'-концы всех молекул тРНК в клетке *E. coli.* Рибонуклеаза III вырезает предшественники 5S-, 16S- и 23S-рРНК из первичного транскрипта, расщепляя определенные связи в двухспиральных шпилечных областях. *Молекулы мРНК у прокариот, наоборот, практически не претерпевают модификации.* Более того, многие из них транслируются еще до того, как заканчивается их транскрипция. В то же время некоторые вирусные мРНК (например, мРНК фага Т7) расщепляются рибонуклеазой III раньше, чем начинается трансляция.

Второй тип процессинга - *присоединение нуклеотидов к концам некоторых РНК.* Например, последовательность ССА присоединяется к 3'-концам молекул тРНК. которые еще не обладают этой концевой последовательностью. У эукариот к 3'-концу большинства молекул мРНК присоединяется длинная последовательность poly(A), а метилированный нуклеотид G (так называемый «колпачок», или «кеп») - к 5'-концу (разд. 29.22).

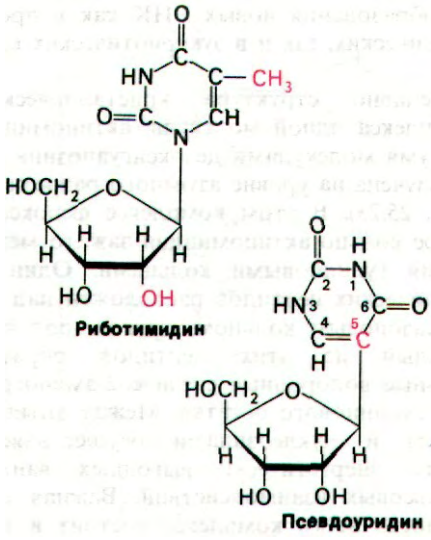
Модификации оснований и рибозных остатков представляют собой третий тип процессинга. У эукариот одна 2'-гидроксильная группа примерно на сто рибозных остатков в рРНК ферментативно метилируется за счет S-аденозилметионина. У бактерий в рРНК метилируются не остатки рибозы, а основания. Особенно интересны необычные основания, которые встречаются во всех молекулах тРНК (разд. 27.3). Они образуются путем ферментативной модификации обычных рибонуклеотидов, входящих в состав предшественника тРНК. Например, псевдоуридилат и риботимидилат образуются путем модификации уридиловых остатков после транскрипции.



2′-О-метилрибоза



6-диметиладенин



У эукариот все транскрипты подвергаются интенсивному процессингу. Расщепление и модификация предшественников рРНК и тРНК напоминают соответствующие процессы у прокариот. Удивительное отличие состоит в том, что *мРНК эукариот образуется путем расщепления большого транскрипта и последующего сращивания (сплайсинга) получающихся при этом фрагментов.* Это явление мы рассмотрим в одной из следующих глав (разд. 29.21). У эукариот транскрипция и трансляция происходят в различных компартментах клетки. *По всей вероятности, процессинг РНК играет ключевую роль в регуляции транспорта мРНК, рРНК и тРНК из ядра в цитозоль.*

25.18. Антибиотики - ингибиторы транскрипции: рифамицин и актиномицин

Антибиотики - очень интересные молекулы, так как многие из них представляют собой весьма специфические ингибиторы биологических процессов. Актиномицин и рифамицин - два антибиотика, ингибирующих

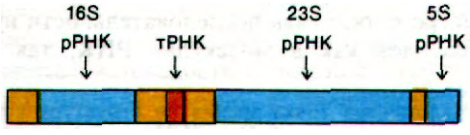
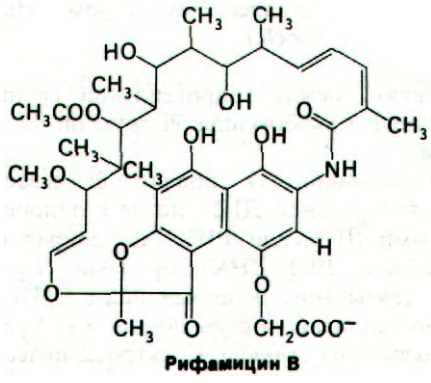


Рис. 25.20. При расщеплении этого первичного транскрипта образуются молекулы 5S, 16S и 23S рРНК и одна молекула тРНК. Спейсерные участки закрашены желтым цветом.

транскрипцию совершенно различным путем. Рифамицин, образуемый бактериями *Streptomyces,* и его полусинтетическое производное рифампицин *специфически ингибируют инициацию синтеза РНК.* Эти антибиотики не предотвращают связывания РНК-полимеразы с ДНК-матрицей. Рифампицин препятствует образованию первой фосфодиэфирной связи в цепи РНК. При этом антибиотик практически не влияет на элонгацию цепи. Столь высокая избирательность ингибирующего действия делает рифампицин ценным инструментом в молекулярно-биологических исследованиях. Например, его можно использовать для подавления инициации новых цепей РНК, не затрагивая транскрипции тех цепей, синтез которых уже начался. Мишенью для рифампицина, видимо, служит β-*субъединица РНК-полимеразы.* Были выделены мутанты *E. coli,* устойчивые к рифампицину (так называемые *rif-r-мутанты*). В некоторых из них электрофоретическая подвижность β-субъединицы изменена.

Механизм действия актиномицина D (со-



держащего полипептиды антибиотика, продуцируемого микроорганизмом *Streptomyces*) совершенно отличен от механизма действия рифампицина. *Актиномицин D прочно связывается с двухспиральной ДНК и за счет этого подавляет ее активность в качестве матрицы для синтеза РНК.* Он состоит из двух идентичных циклических пептидов, соединенных феноксазоновой системой колец (рис. 25.22). Состав этих циклических пептидов необычен: они содержат саркозин, метилвалин и D-валин. Кроме того, в их молекуле имеется эфир-

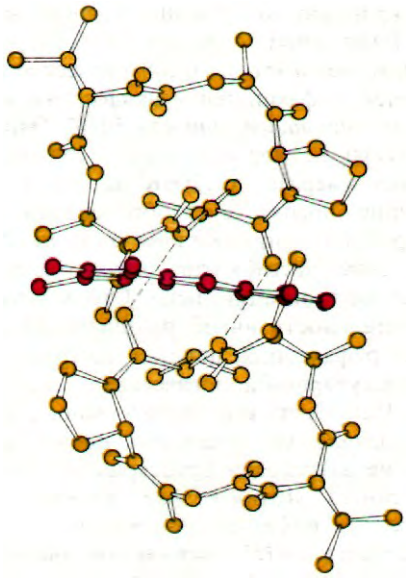


Рис. 25.21. Пространственная модель структуры актиномицина D. Феноксазоновое кольцо обозначено красным цветом, циклические пептиды - желтым. (По рисунку, любезно предоставленному д-ром Henry Sobell.)

ная связь между гидроксильной группой треонина и карбоксильной группой метилвалина.

Актиномицин D прочно связывается с двухспиральной ДНК, но не с одноцепочечными ДНК или РНК, двухспиральной РНК или РНК-ДНК-гибридами. Кроме того, связывание актиномицина с ДНК заметно усиливается с *увеличением содержания остатков гуанина.* Спектроскопические и гидродинамические исследования комплексов актиномицина D с ДНК свидетельствуют о том, что феноксазоновое кольцо актиномицина проникает в ДНК между двумя соседними парами оснований. Такой способ связывания называется *интеркаляцией* (рис. 25.23). При низких концентрациях *актиномицин D ингибирует транскрипцию, не оказывая сколько-нибудь существенного влияния на репликацию ДНК. На синтез белка непосредственно актиномицин также не влияет.* Благодаря этому актиномицин D широко использовался в качестве специфического ингибитора образования новых РНК как в прокариотических, так и в эукариотических клетках.

Недавно структура кристаллического комплекса одной молекулы актиномицина с двумя молекулами дезоксигуанозина была изучена на уровне атомного разрешения (рис. 25.23). В этом комплексе феноксазоновое кольцо актиномицина зажато между двумя гуаниновыми кольцами. Один из циклических пептидов расположен над феноксазоновым кольцом, другой - под ним. Каждый из этих пептидов образует сильные водородные связи с 2-аминогруппой гуанинового остатка. Между антибиотиком и нуклеозидами осуществляется много энергетически выгодных вандерваальсовых взаимодействий. Важная особенность этого комплекса состоит в том, что он почти симметричен. Ось симметрии второго порядка проходит вдоль линии, соединяющей средние атомы O и N феноксазонового кольца. Конформация всего комплекса показывает, что *актиномицин узнает в ДНК последовательность оснований GpC.* Обратите внимание, что если в одной цепи ДНК имеется последовательность 5'GpC3', то в комплементарной цепи последовательность будет 3'CpG5'. По-видимому, актиномицин интеркалирует в ДНК между двумя GC-парами оснований и взаимодействует с остатками G в основном таким же образом, как и в комплексе с динуклеотидом. Согласно этой модели, циклические пептидные остатки локализованы в малой бороздке спирали ДНК. *Главная особенность этой модели состоит в том, что симметрия молекулы актиномицина соответствует симметрии определенной последовательности в ДНК*[1].

25.19. Разработаны совершенные методы определения последовательности нуклеотидов в РНК

Высокая разрешающая способность метода гель-электрофореза дает возможность быстро определять последовательности нуклеотидов как в молекулах РНК, так и

[1] Изложенная точка зрения на структуру комплекса актиномицина D с ДНК не является общепризнанной. Существует и другая гипотеза, согласно которой актиномицин не интеркалирует в ДНК, а связывается в малой бороздке, причем структура комплекса актиномицина D с динуклеотидом GpC не отражает структуры его комплексов с протяженными молекулами ДНК.- *Прим. перев.*

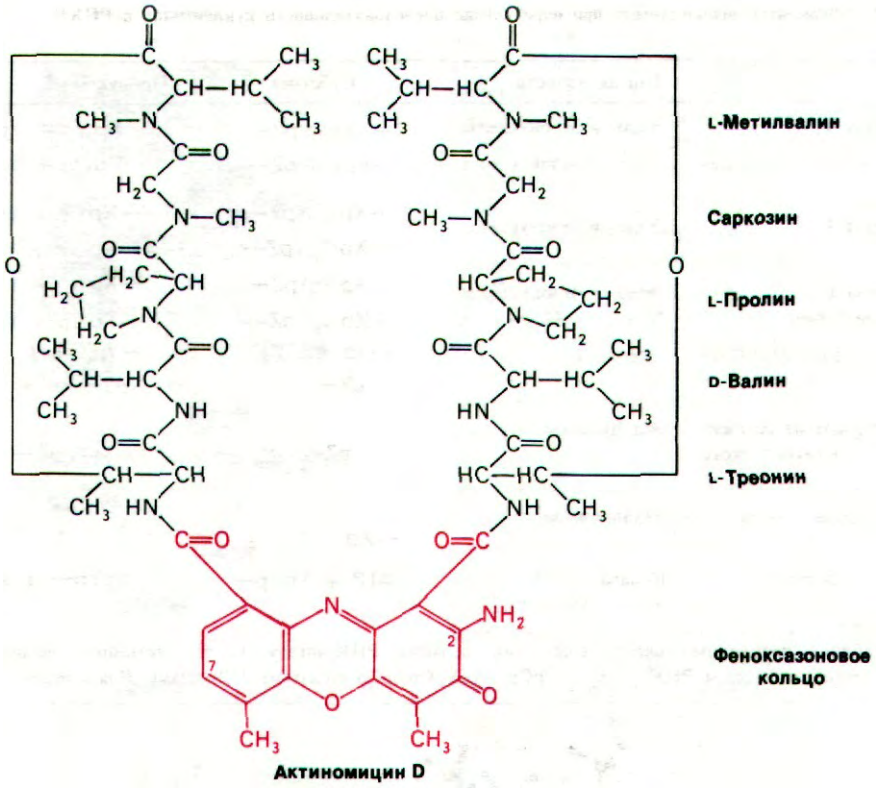


Рис. 25.22. Структура актиномицина D.

в молекулах ДНК. Для этого 3'- или 5'-конец цепи РНК метят радиоактивной группой. Затем меченую цепь частично расщепляют по одному из четырех оснований, чтобы получить набор фрагментов. Специфическое (или избирательное) расщепление можно провести с помощью ферментов, *специфичных к определенному основанию эндонуклеаз* (табл. 25.4). Например, рибонуклеаза T_1 гидролизует РНК с 3'-стороны остатков G. Кроме того, РНК можно специфически расщепить с помощью *химической модификации одного из четырех оснований*. Затем остов расщепляют в месте, где расположено модифицированное основание. После этого четыре набора фрагментов разделяют гель-электрофорезом и последовательность оснований РНК читают непосредственно с радиоавтографа (рис. 25.24), как и в случае ДНК (разд. 24.28). Эти подходы позволяют легко определять в молекулах РНК последовательность 100-200 нуклеотидов.

Другая стратегия сводится к тому, чтобы *определять последовательность нуклеотидов* не в самой РНК, а *в комплементарной ДНК*. Но как получить комплементарные фрагменты ДНК? Один из методов состоит в следующем. С помощью рестрикционных эндонуклеаз фрагментируют большие молекулы ДНК. Затем методом *гибридизации* идентифицируют рестрикционные фрагменты, содержащие последовательность, комплементарную исследуемой РНК. В другом случае комплементарную ДНК синтезируют ферментативно по РНК-матрице с помощью *обратной транскриптазы* из опухолеродных вирусов (разд. 30.19). Именно так была расшифрована полная последовательность 576 нуклеотидов мРНК, колирующей β-цепь гемоглобина человека.

Заключение

Поток генетической информации в нормальных клетках происходит в направлении: ДНК—>РНК—>белок. Синтез РНК по ДНК-матрице называется транскрипцией, а синтез белка по РНК-матрице - трансляцией. Существует три типа моле-

Таблица 25.4. **Ферменты, используемые при определении последовательности нуклеотидов в РНК**[1)]

Фермент	Тип активности	Субстрат	Продукты
Рибонухлеаза T_1	Эндо- и экзонуклеаза	—XpGpYpZ—	—XpGp + YpZ—
Панкреатическая рибонуклеаза	Эндо- и экзонуклеаза	—XpUpYpZ—	—XpUp + YpZ—
Рибонуклеаза U_2	Эндо- и экзонуклеаэа	—XpCpYpZ—	—XpCp + YpZ—
		—XpGpYpZ—	—XpGp + YpZ—
Рибонуклеаза I (из *P. polycephalum*)	Эндо- и экзонуклеаза N = A, G, U, но не C	—XpApYpZ—	—XpAp + YpZ—
		—XpNpYpZ—	—XpNp + YpZ
Щелочная фосфатаза (из *E.coli*)	Фосфатаза	—YpZp	—YpZ + P_i
		pXpY—	XpY— + P_i
Фосфодиэстераза из селезенки крупного рогатого скота	Экзонуклеаза	XpYpZ—	Xp + YpZ—
Фосфодиэстераза змеиного яда	Экзонуклеаза	—XpYpZ	—XpY + pZ
Полинуклеотидкиназа	Киназа	ATP + XpYp—	pXpYp— + ADP

[1)] В эту таблицу необходимо внести еще один фермент - РНК-лигазу. С его помощью осуществляется включение метки в 3'-концы РНК: —XpY + pCp—>XpYpCp (pCp содержит ^{32}P-метку).- *Прим. перев.*

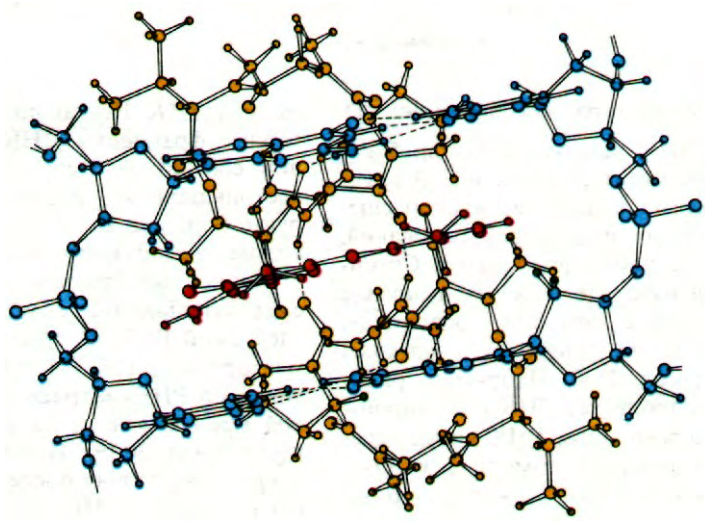


Рис. 25.23. Предполагаемая структура комплекса актиномицина D с ДНК. Феноксазоновое кольцо актиномицина (показано красным цветом) интеркалирует между двумя GC-парами ДНК (показаны синим цветом). Циклические пептиды актиномицина D (желтые) связываются с малой бороздкой спирали ДНК. Между актиномицином D и соседними гуанинами возникает несколько водородных связей. Ось симметрии субъединиц актиномицина D совпадает с осью симметрии сахарофосфатного остова и последовательности оснований ДНК. (По рисунку, любезно предоставленному д-ром Henry Sobell.)

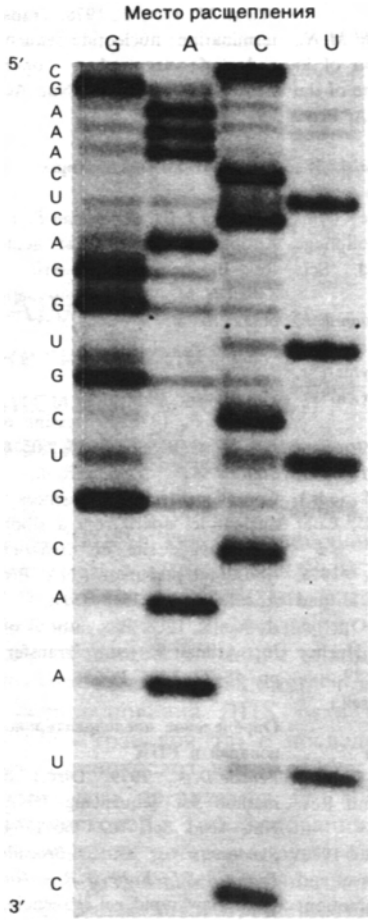


Рис. 25.24. Радиоавтограф фрагмента 5S-РНК дрожжей. 3'-конец помечен радиоактивной меткой. Четыре дорожки соответствуют расщеплению по остаткам G, A, C и U. На геле можно прочитать последовательность 5'-CGAAACUCAGGUGCUG-CAAUC-3'. [Peattie D. A., Proc. Nat. Acad. Sci., **76,** 1762 (1979).]

кул РНК: информационная РНК (мРНК), транспортная РНК (тРНК) и рибосомная РНК (рРНК). Все эти РНК одноцепочечные. Транспортная РНК и рибосомная РНК содержат протяженные двухспиральные участки, которые образуются при складывании цепи в шпильки. Самыми маленькими молекулами РНК являются тРНК; они содержат около 75 нуклеотидов. Самые длинные молекулы РНК встречаются среди мРНК; они могут содержать более 5000 нуклеотидов. Последовательность нуклеотидов в длинных цепях РНК можно определить, расщепляя их и разделяя фрагменты гель-электрофорезом.

Все клеточные РНК синтезирует РНК-полимераза в соответствии с последовательностью ДНК-матрицы. Активированными промежуточными продуктами служат рибонуклеозидтрифосфаты. Синтез РНК, как и синтез ДНК, происходит в направлении 5'—>3'. РНК-полимераза отличается от ДНК-полимеразы тем, что не нуждается в затравке и не обладает нуклеазными активностями. Еще одно отличие состоит в том, что ДНК-матрица при синтезе РНК полностью сохраняется, тогда как при синтезе ДНК она сохраняется наполовину. РНК-полимераза *E. coli* имеет субъединичную структуру $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ и массу, достигающую 500 кДа. Кор-фермент имеет состав $\alpha_2\beta\beta'$. Сигма-субъединица увеличивает скорость и специфичность транскрипции, так как она обеспечивает узнавание РНК-полимеразой сигналов начала транскрипции в матричной ДНК. Связывание РНК-полимеразы с такими промоторными участками вызывает локальное расплетание матрицы, что создает условия для образования первой фосфодиэфирной связи. Цепи РНК начинаются с pppG или pppA. После инициации синтеза новой цепи сигма-субъединица отделяется от голофермента. Терминация транскрипции так же тонко регулируется, как и инициация. Матричная ДНК содержит стоп-сигналы транскрипции. Некоторые из этих сигналов узнает белок ρ. Некоторые специфические ингибиторы могут блокировать транскрипцию. Например, антибиотик рифампицин ингибирует инициацию синтеза РНК, а актиномицин D блокирует элонгацию РНК. Многие молекулы РНК подвергаются после транскрипции расщеплению и химической модификации (например, метилируются). У прокариот молекулы тРНК и рРНК подвергаются интенсивному процессингу, а молекулы мРНК почти не претерпевают модификаций. У эукариот все транскрипты сильно модифицируются.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Miller O. 1973. The visualization of genes in action, Sci. Amer, 228(3), 34-42.

Spiegelman S., 1964. Hydrid nucleic acids, Sci. Amer., 210(5), 48-56.

Chamberlin M.J., 1976. RNA polymerase: an overview. In: Losick R. and Chamberlin M. (eds.), RNA Polymerase, pp. 17-67, Cold Spring Harbor Laboratory.

Открытие информационной РНК

Jacob F., Monod J., 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins, J.Mol.Biol., 3, 318-356.

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

Hall B.D., Spiegelman S., 1961. Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA, Proc. Nat. Acad. Sci., 47, 137-146.

РНК-полимераза

Losick R., Chamberlin M. (eds.), 1976. RNA Polymerase, Cold Spring Harbor Laboratory. (Книга содержит ряд превосходных статей.)

Chamberlin M.J., 1974. The selectivity of transcription, Ann. Rev. Biochem., 43, 721-776.

Travers A., 1976. RNA polymerase specificity and the control of growth, Nature, 263, 641-646.

Инициирование транскрипции

Hayashi M., Hayashi M.N., Spiegelman S., 1963. Restriction of in vivo genetic transcription to one of the complementary strands of DNA, Proc. Nat. Acad Sci., 50, 664-672.

Taylor K., Hradecna Z., *Szybalski W.,* 1967. Asymmetric distribution of the transcribing regions on the complementary strands of coliphage λ DNA, Proc. Nat. Acad. Sci., 57, 1618-1625.

Burgess R.R., Travers A.A., Dunn J.J., Bautz E.K.F., 1969. Factor stimulating transcription by RNA polymerase, Nature, **221,** 43-46. (Открытие сигма-фактора.)

Gilbert W., 1976. Starting and stopping sequences for the RNA polymerase. In: Losick R. and Chamberlin M. (eds.), RNA Polymerase, pp. 193-205, Cold Spring Harbor Laboratory.

Reznikoff W.S., Abelson J.N., 1978. The *lac* promoter. In: Miller J. H. and Reznikoff W. S. (eds.), The Operon, pp. 221-243, Cold Spring Harbor Laboratory. (Сопоставляются 29 промоторных последовательностей.)

Терминирование транскрипции

Adhya S., Gottesman M., 1978. Control of transcription termination, Ann. Rev. Biochem., 47, 967-996.

Das A., Merril C., Adhya S., 1978. Interaction of RNA polymerase and rho in transcription termination: coupled ATPase, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 4828-4832.

Wu A.M., Platt T., 1978. Transcription termination: nucleotide sequence at 3' end of tryptophan operon in *Escherichia coli,* Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 5442-5446.

Антибиотики - ингибиторы синтеза РНК

Goldberg J.H., Friedman P.A., 1971. Antibiotics and nucleic acids, Ann. Rev. Biochem., 40, 775-810.

Sobell H.M., 1974. *How actinomycin binds to DNA. Sci. Amer.,* 231(2), 82-91.

Процессинг РНК

Perry R.P., 1976. Processing of RNA, Ann. Rev. Biochem., 45, 605-630.

Steitz J.A., Young R.A., 1978. Complementary sequences 1700 nucleotides apart from a ribonuclease III cleavage site in *Escherichia coli* ribosomal precursor RNA, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 3593-3597.

Altman S., 1978. Biosynthesis of tRNA. In: Atlman S. (ed.), Transfer RNA, pp. 48-77, MIT Press.

Определение последовательности оснований в РНК

Peattie D.A., 1979. Direct chemical method for sequencing RNA, Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 1760-1764.

Simoncsits A., Brownlee G.G., Brown R.S., Rubin J.R., Guilley H., 1977. New rapid gel sequencing method for RNA, Nature, 269, 833-836.

Вопросы и задачи

1. Сравните ДНК-полимеразу I и РНК-полимеразу *E. coli* по каждому из следующих свойств.
а) Субъединичная структура.
б) Активированные предшественники.
в) Направление элонгации цепи.
г) Нуклеазные активности.
д) Сохранение матрицы.
е) Потребность в затравке.
ж) Энергетика реакции элонгации.

2. Напишите последовательность молекулы мРНК, синтезированной на матричной цепи ДНК со следующей последовательностью:

5'-ATCGTACCGTTA-3'.

3. РНК легко гидролизируется щелочью, а ДНК нет. Почему?

4. Каким образом кордицепин (3'-дезоксиаденозин) блокирует синтез РНК?

5. Какие продукты должны получиться при частичном гидролизе олигорибонуклеотида
5'-pGCAGUACUGUC-3'
следующими ферментами:
а) панкреатической рибонуклеазой,
б) рибонуклеазой T1,
в) рибонуклеазой U_2,
г) рибонуклеазой I из *Physarum*!

6. Исчерпывающий гидролиз олигорибонуклеотида панкреатической рибонуклеазой дает следующие продукты: Cp 2Up, AGCp и GAAUp. Гидролиз того же олигонуклеотида рибонуклеазой T_1 дает AAUp, UAGp и CCUGp. Какова его последовательность?

Дополнительные вопросы см.: Wood W. B., Wilson J.H., Benbow R.M., Hood L.E. Biochemistry: A Problem Approach, ens. 16, 17 Benjamin, 1974, chs. 16,17.

ГЛАВА 26
Генетический код и зависимость между генами и белками

В главе 25 была описана роль информационной РНК в качестве посредника между геном и его полипептидным продуктом. В настоящей главе мы рассмотрим дальнейший поток информации от гена к белку. В центре внимания находится генетический код, связывающий последовательность оснований ДНК (или соответствующего транскрипта) с последовательностью аминокислот в белке. Код универсален для всех организмов. Он восхищает своей простотой. Три основания, составляющие кодон, детерминируют одну аминокислоту. Кодоны считываются последовательно молекулами транспортных РНК (тРНК), играющих при синтезе белка роль адаптеров. Полная расшифровка генетического кода в 60-х годах - одно из выдающихся достижений современной биологии.

26.1. Транспортная РНК - адапторная молекула в синтезе белка

Мы уже видели, что мРНК служит матрицей для синтеза белка. Каким образом она осуществляет соединение аминокислот в правильном порядке? В 1958 г. Фрэнсис Крик (Francis Crick) писал:

> «Одно из первых предположений, довольно наивных, состояло в том, что РНК будет принимать конфигурацию, способную образовать двадцать различных «полостей», по одной для боковой цепи каждой из двадцати аминокислот. Если бы это было так, можно было бы попробовать проиграть эту задачу в обратном направлении, т.е. найти необходимую конфигурацию РНК, пытаясь воссоздать форму этих полостей. Все подобные попытки закончились неудачей. Физико-химические соображения также не дают никаких оснований считать это предположение правдоподобным.»

Крик отметил, что РНК не имеет выпуклых гидрофобных поверхностей, позволяющих отличить валин от лейцина и изолейцина, и не содержит соответствующим образом расположенных заряженных групп, чтобы различать положительно и отрицательно заряженные боковые цепи аминокислот. Затем Крик предлагает принципиально иной механизм для узнавания мРНК:

> «РНК - это прежде всего последовательность участков, способных образовывать водородные связи. Поэтому независимо от того, что именно связывается с матрицей *специфичным* образом, связывание, очевидно, происходит путем образования водородных связей. Следовательно, естественно предположить, что аминокислоты переносятся к матрице адапторными молекулами и что именно адаптор соответствует РНК. В простейшем случае потребуется 20 адаптеров, по одному на каждую аминокислоту».

Эта новаторская гипотеза вскоре стала доказанным фактом. *Роль адаптера в белковом синтезе играет тРНК.* Структура этих замечательных адапторных молекул и реакции, в которых они участвуют, рассматриваются подробно в следующей главе. Здесь же достаточно отметить, что в тРНК имеются *место прикрепления аминокислот* и *участок узнавания матрицы* (рис. 26.1 и 26.2). Молекула тРНК переносит определенную аминокислоту в активированной форме к месту синтеза белка. Карбоксильная группа аминокислоты связана эфирной связью с 3'-гидроксильной

или 2'-гидроксильной) группой рибозного остатка, расположенного на 3'-конце цепи тРНК. Во время синтеза белка связанная аминокислота может перемешаться с 2'- на 3'-гидроксильную группу и обратно. Присоединение аминокислоты к тРНК с образованием аминоацил-тРНК катализируется особым ферментом, называемым аминоацил-тРНК—синтетазой (или активирующим ферментом). Эта реакция этерификации идет за счет энергии ATP. Для каждой из 20 аминокислот имеется по крайней мере одна специфическая синтетаза. Участок узнавания матрицы в тРНК представляет собой последовательность из трех оснований, называемую *антикодоном* (рис. 26.2). Антикодон тРНК узнает *кодон,* т. е. комплементарную последовательность из трех оснований в мРНК.

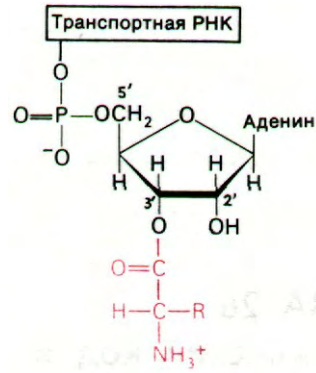


Рис. 26.1. Присоединение аминокислоты (показана красным цветом) к молекуле тРНК. Аминокислота связана эфирной связью с 3'-гидроксильной группой концевого аденозина РНК. Молекула тРНК, несущая ковалентно привязанную аминокислоту, называется аминоацил-тРНК или «нагруженная» тРНК, а тРНК без аминокислоты - «ненагруженная».

26.2. Аминокислоты кодируются группами из трех оснований, начиная со строго определенной точки

Генетический код связывает последовательность оснований в ДНК (или в соответствующих транскриптах) и последовательность аминокислот в белках. К 1961 г. благодаря экспериментам Фрэнсиса Крика, Сиднея Бреннера (Francis Crick, Sydney Brenner) и других исследователей были установлены следующие свойства генетического кода.

1. *Чему равно кодирующее отношение?* Поскольку в ДНК имеется четыре вида оснований, то при кодировании одной аминокислоты одним основанием могло бы кодироваться всего лишь четыре аминокислоты. При кодировании одной аминокислоты двумя основаниями кодировалось бы 16 аминокислот (4•4=16), а при кодировании тремя основаниями - 64 аминокислоты (4•4•4 = 64). Белки состоят из двадцати аминокислот основного набора. Из этого несложного подсчета было очевидно, что для кодирования одной аминокислоты, видимо, необходимы три или более оснований. Генетические эксперименты показали, что *на самом деле одну аминокислоту кодирует группа из трех оснований.* Эта группа оснований называется *кодоном.*

2. *Является ли код перекрывающимся*? В случае непрерывающегося триплетного кода каждая группа из трех оснований ко-

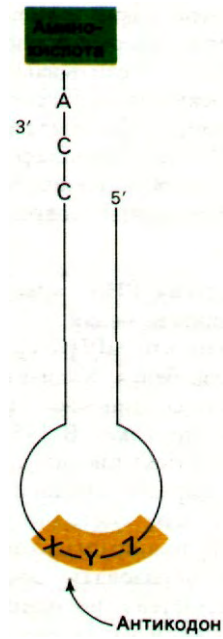
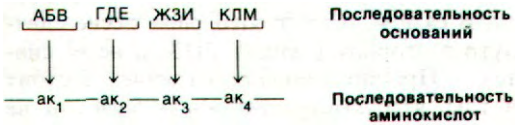


Рис. 26.2. Схематическое изображение аминоацил-тРНК. Показаны участок прикрепления аминокислоты и антикодон (участок узнавания матрицы).

дирует только одну аминокислоту, тогда как в случае полностью перекрывающегося триплетного кода АБВ кодирует первую аминокислоту, БВГ-вторую, ВГД-третью и т.д.

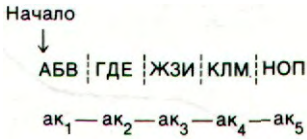
Эту дилемму удалось решить путем определения последовательности аминокислот в мутантах. Предположим, что основание В мутировало в В'. Если код не перекрывается, изменится только одна аминокислота. При полностью перекрывающемся коде мутация В в В' приведет к изменению аминокислот 1, 2 и 3. Изучение последовательности аминокислот белка оболочки мутантов вируса табачной мозаики показало, что у этих мутантов измененной обычно оказывалась только одна аминокислота. Напомним также, что как уже говорилось при обсуждении аномальных гемоглобинов в гл. 5, и в этом случае у большинства мутантов происходило изменение только одной аминокислоты. Отсюда был сделан вывод, что *генетический код не перекрывается:*



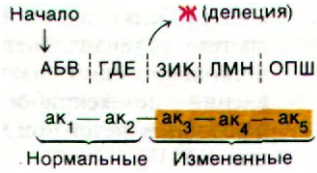
3. *Как происходит правильное считывание группы из трех оснований? A priori* одна из возможностей состоит в том, что одно из четырех оснований (оно обозначено Q) служит «запятой» между группами по три основания:

. . . QАБВQГДЕQЖЗИQКЛМQ. . .

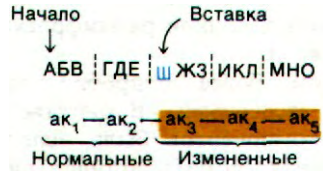
Оказалось, что это не так. *Последовательность оснований читается последовательно, начиная со строго определенной точки:*



Запятых в коде нет. Предположим, что в результате мутации произошла делеция основания Ж:



Первые две аминокислоты в этой полипептидной цепи будут нормальными, но остальная последовательность оснований будет прочитана неправильно, так как в результате делеции Ж *произошел сдвиг рамки считывания.* Теперь предположим, что между Е и Ж добавилось основание Ш:



Эта вставочная мутация также нарушает рамку считывания, начиная с кодона аминокислоты 3. В действительности генетические исследования вставочных и делеционных мутантов позволили выяснить многие свойства генетического кода,

4. Как уже было сказано выше, существует 64 возможных триплета оснований и 20 аминокислот. Соответствует ли каждой из 20 аминокислот только один триплет, или некоторые аминокислоты кодируются более чем одним триплетом? Генетические исследования показали, что большинство из 64 триплетов кодируют аминокислоты. В последующих биохимических исследованиях было установлено, что 61 триплет из 64 кодирует определенные аминокислоты. Таким образом, *для большинства аминокислот имеется более одного кодового слова.* Другими словами, генетический код *вырожден.*

26.3. Расшифровка генетического кода: синтетические РНК могут служить информационными РНК

Каково соотношение между 64 видами кодовых слов и 20 аминокислотами? В принципе на этот вопрос можно получить прямой ответ, если сравнить последовательность аминокислот в каком-либо белке с соответствующей последовательностью оснований его гена или мРНК. Однако в 1961 г. этот подход был совершенно недоступен, так как о последовательностях оснований в генах и молекулах мРНК ничего не было известно. Тогда казалось, что проблема генетического кода не может быть решена в близком будущем, но внезапно ситуация изменилась. Маршалл Ни-

ренберг (Marshall Nirenberg) обнаружил, что *добавление полиуридилата [poly(U)] в бесклеточную систему синтеза белка приводит к синтезу полифенилаланина*. Очевидно, poly(U) выполнил функцию информационной РНК. Первое кодовое слово было расшифровано: UUU кодирует фенилаланин Этот замечательный эксперимент указал путь к полной расшифровке генетического кода.

Обсудим более подробно этот эпохальный эксперимент. В качестве двух основных компонентов были использованы бесклеточная система, активно синтезировавшая белок, и синтетический полирибонуклеотид, сыгравший роль информационной РНК. Бесклеточная система синтеза белка была получена из *E. coli* следующим образом. Бактериальные клетки осторожно разрушали, перемалывая с тонко измельченным порошком окиси алюминия, чтобы получить клеточный сок. Затем обрывки клеточной стенки и клеточной мембраны удаляли центрифугированием. В результате получали экстракт, содержащий ДНК, мРНК, тРНК, рибосомы, ферменты и другие клеточные компоненты. При добавлении ATP, GTP и аминокислот в этой бесклеточной системе синтезировался белок. По крайней мере одна из добавленных аминокислот была радиоактивной, что давало возможность обнаружить ее включение в белок. Эту смесь инкубировали при 37°C примерно в течение 1 ч. Затем добавляли трихлоруксусную кислоту, чтобы остановить реакцию и осадить белки. При этом свободные аминокислоты оставались в надосадочной фракции. Осадок промывали и просчитывали его радиоактивность, определяя таким образом сколько меченой аминокислоты включилось в новосинтезированный белок. Важная особенность этой системы состоит в том, что синтез белка можно остановить добавлением дезоксирибонуклеазы, разрушающей матрицы для синтеза новых мРНК. Поскольку та мРНК, которая уже имелась в смеси ко времени добавления дезоксирибонуклеазы, лабильна, синтез белка можно прекратить в течение нескольких минут. Затем Ниренберг обнаружил, что синтез белка возобновляется при добавлении неочищенной фракции мРНК. Таким образом, в руках Ниренберга была *бесклеточная система синтеза белка, зависящая от добавления мРНК*.

Другим важнейшим компонентом в этом эксперименте был синтетический полирибонуклеотид poly(U). Poly(U) синтезировали с помощью *полинуклеотид-фосфорилазы* - фермента, открытого в 1955 г. Марианной Грюнберг-Манаго и Северо Очоа (Marianne Grunberg-Manago, Severo Ochoa). Этот фермент катализирует синтез полирибонуклеотидов из рибонуклеозиддифосфатов:

$$(\text{РНК})_n + \text{Рибонуклеозиддифосфат} \rightleftarrows (\text{РНК})_{n+1} + P_i.$$

Полинуклеотид-фосфорилаза и РНК-полимераза катализируют совершенно различные реакции. В приведенной реакции активированными предшественниками служат рибонуклеозиддифосфаты, а не трифосфаты. Продукт реакции - ортофосфат, а не пирофосфат. Следовательно, равновесие в реакции не может быть сдвинуто вправо в результате гидролиза пирофосфата. В самом деле, *in vivo* равновесие сдвинуто в сторону распада РНК, а не ее синтеза. Принципиальное отличие состоит в том, что *полинуклеотид-фосфорилаза не использует матрицы*. Состав РНК, синтезированной этим ферментом, определяется соотношением рибонуклеотидов в инкубационной смеси, а последовательность близка к случайной. Благодаря этому полинуклеотид-фосфорилаза оказалась ценнейшим инструментом в экспериментах по расшифровке генетического кода. Например, poly(U) синтезировали, инкубируя в присутствии фермента раствор высокой

Рис. 26.3. Синтез белка в бесклеточной системе останавливается через несколько минут после добавления дезоксирибонуклеазы и возобновляется при добавлении мРНК.

концентрации UDP. Сополимеры двух рибонуклеотидов, например U и A, со случайной последовательностью готовили, также инкубируя UDP и ATP с этим ферментом.

Различные синтетические рибонуклеотиды вводили в бесклеточную систему синтеза белка и измеряли включение меченного ^{14}C L-фенилаланина. Результаты оказались поразительными:

Добавленный полинуклеотид	^{14}C, имп./мин
Контроль	44
Poly(A)	50
Poly(C)	38
Poly(U)	39800

Тот же эксперимент был проделан с различными ^{14}C-аминокислотами в каждой инкубационной смеси. Оказалось, что *poly(A) вызывает синтез полилизина, а poly(C) - синтез полипролина*. Так было расшифровано три кодовых слова:

Кодовое слово	Аминокислота
UUU	Фенилаланин
AAA	Лизин
CCC	Пролин

Кодовое слово GGG невозможно было расшифровать таким же образом, потому что poly(G) не работает в качестве матрицы. Возможно, это объясняется тем, что он образует трехцепочечную спиральную структуру. Полирибонуклеотиды, образующие протяженные участки с упорядоченной структурой, не эффективны в качестве матриц для синтеза белка.

26.4. Состав кодонов многих аминокислот был определен с помощью сополимеров в качестве матриц

Для дальнейшего изучения генетического кода были использованы в качестве матриц полирибонуклеотиды, состоящие из оснований двух типов. Например, случайный сополимер U и G содержит восемь различных триплетов: UUU, UUG, UGU, GUU, UGG, GUG, GGU и GGG. Относительную частоту этих триплетов можно легко вычислить, исходя из молярного соотношения U и G в сополимере. Оно составляло 0,76:0,24 (табл. 26.1). Относительное включение различных аминокислот в присутствии этой матрицы приведено в табл. 26.2. В наибольшей степени включался, как и можно было предполагать, фенилаланин, так как триплет UUU встречался чаще всего. Затем шли валин, лейцин и цистеин. Уровень их включения составлял чуть больше трети от включения фенилаланина, что соответствует вычисленной частоте встречаемости триплетов, содержащих два U и одно G. Включение других аминокислот было очень низким. Отсюда был сделан вывод, что *валин, лейцин и цистеин кодируются кодонами, содер-*

Таблица 26.1. **Ожидаемая встречаемость триплетов в случайном сополимере U (0,76) и G (0,24)**

Триплет	Вероятность	Относительная встречаемость, %
UUU	0,76 • 0,76 • 0,76=0,439	100
UUG	0,75 • 0,24 • 0,24 = 0,139	31,6
UGU	0,76 • 0,24 • 0,76 = 0,139	31,6
GUU	0,24 • 0,76 • 0,76 = 0,139	31,6
UGG	0,76 • 0,24 • 0,24 = 0,0438	10,0
GUG	0,24 • 0,76 • 0,24 = 0,0438	10,0
GGU	0,24 • 0,24 • 0,76 = 0,0438	10,0
GGG	0,24 • 0,24 • 0,24 = 0,0138	3,1

Таблица 26.2. **Включение аминокислот в присутствии случайного сополимера U (0,76) и G (0,24)**

Аминокислота	Относительное включение, %	Состав соответствующего кодона
Фенилаланин	100	UUU
Валин	37	2U, 1G
Лейцин	36	2U, 1G
Цистеин	35	2U, 1G
Триптофан	14	1U, 2G
Глицин	12	1U, 2G

жащими 2U и 1G, а триптофан и глицин кодируются кодонами, которые содержат 1U и 2G.

Эксперименты того же типа проводили и с другими случайными сополимерами, а именно с UA, UC, AC и AG, а также с UGC, AGC, UAC и UAG. Таким образом в лабораториях Ниренберга и Очоа был определен *состав* кодонов, соответствующих каждой из 20 аминокислот.

26.5. Тринуклеотиды способствуют связыванию определенных молекул тРНК с рибосомами

При использовании смешанных сополимеров в качестве матриц удалось установить *состав кодонов,* соответствующих определенным аминокислотам, *но не их последовательность* (кроме UUU, AAA и CCC). Как уже говорилось, валин кодируется триплетом из 2U и 1G. Какой же это триплет: UUG, UGU или GUU? Ответ на этот вопрос был получен с помощью двух совершенно различных экспериментальных подходов: во-первых, с использованием синтетических полирибонуклеотидов с упорядоченной последовательностью и, во-вторых, с помощью зависимого от кодона специфического связывания молекул тРНК с рибосомами.

В 1964 г. Ниренберг установил, что *тринуклеотиды способствуют связыванию определенных молекул тРНК с рибосомами в отсутствие синтеза белка.* Например, добавление pUpUpU вызывает связывание фенилаланиновой тРНК, а pApApA значительно увеличивает связывание лизиновой тРНК, как и pCpCpC - связывание пролиновой тРНК. Динуклеотиды не стимулируют связывания тРНК с рибосомами. Эти работы показали, что *тринуклеотид (как и триплет в мРНК) специфически связывается с определенной молекулой тРНК, для которой он является кодовым словом.* Был разработан простой и быстрый тест на связывание: связанные с рибосомами молекулы тРНК задерживаются на нитроцеллюлозном фильтре, а несвязанные молекулы тРНК проходят через фильтр. Для того чтобы определить, какие именно молекулы тРНК садятся на фильтр, использовали молекулы тРНК, несущие определенную аминокислоту, меченную ^{14}C.

С помощью методов органической химии и биохимии были синтезированы все 64 тринулеотида. Для каждого тринуклеотида было проверено связывание молекул тРНК, соответствующих всем 20 аминокислотам. Например, было показано, что pUpUpG стимулирует связывание только лейциновой тРНК, pUpGpU - только цистеиновой тРНК, а pGpUpU - связывание только валиновой тРНК. Отсюда был сделан вывод, что кодоны UUG, UGU и GUU соответствуют лейцину, цистеину и валину соответственно. С несколькими кодонами не было получено избирательного связывания какой-либо тРНК, тогда как с несколькими другими связывалось более одной тРНК. Для большинства кодонов были получены вполне четкие результаты. В общем этот простой и элегантный подход позволил расшифровать около 50 кодонов.

26.6. Еще один инструмент расшифровки кода - сополимеры с определенной последовательностью

Примерно в то же время Гобинду Кoране (Gobind Khorana) удалось синтезировать полирибонуклеотиды с определенной повторяющейся последовательностью. Сочетая методы органической химии и ферментативные методы, он синтезировал ряд сополимеров с повторяющейся последовательностью из двух, трех и четырех оснований. Рассмотрим, к примеру, стратегию синтеза poly(GUA). Этот упорядоченный сополимер имеет последовательность

GUAGUAGUAGUAGUAGUAGUA...

Прежде всего Корана синтезировал с помощью методов органической химии два комплементарных дезоксирибонуклеотида по девять нуклеотидов длиной: $d(TAC)_3$ и $d(GTA)_3$. Затем эти два олигонуклеотида были использованы в качестве матрицы для синтеза длинных цепей ДНК из четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов под действием ДНК-полимеразы I. Ни один олигонуклеотид в отдельности не был эффективной матрицей. Если же присутствовали оба олигонуклеотида, то $d(TAC)_3$ служил матрицей для синтеза poly(dGTA), а $d(GTA)_3$ - для синтеза poly(dTAC). Эти длинные комплементарные ДНК образовывали двухспиральные молекулы. Следующим шагом было получение длинных

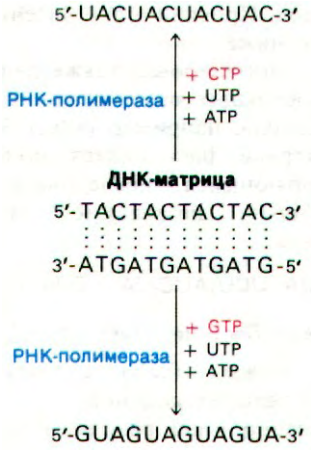


Рис. 26.4. Цепь этой двухспиральной матричной ДНК, которая должна транскрибироваться, определяется набором рибонуклеозидтрифосфатов в инкубационной смеси.

полирибонуклеотидных цепей с последовательностью, соответствующей poly (dTAC) и poly(dGTA). Для этого дуплекс poly(dTAC): poly(dGTA) использовали в качестве матрицы для РНК-полимеразы. Цепь ДНК для транскрипции можно выбрать, добавляя три подходящих рибонуклеозидтрифосфата. Если в инкубационную смесь добавить GTP, UTP и ATP, го на матричной цепи poly(dTAC) синтезируется полирибонуклеотидный продукт poly(GUA). Другая цепь не транскрибируется, так как не хватает одного из необходимых субстратов - CTP. Если же добавить CTP, UTP и ATP, то на другой матричной цепи синтезируется poly(UAC). Итак, *органический синтез и вслед за ним матричный синтез с помощью ДНК-полимеразы и РНК-полимеразы позволили синтезировать два длинных полирибонуклеотида со строго определенной повторяющейся последовательностью оснований* (рис. 26.4).

Эти регулярные сополимеры были использованы в качестве матриц в бесклеточной системе синтеза белка. Рассмотрим некоторые результаты такого эксперимента. Сополимер, состоящий из чередующейся последовательности двух оснований - А и Б:

АБА | БАБ | АБА | БАБ | АБА |. . .

содержит кодоны двух видов - АБА и БАБ. Поэтому полипептидный продукт должен представлять собой чередующуюся последовательность из двух аминокислот (сокращенно обозначенных $ак_1$ и $ак_2$):

$ак_1$—$ак_2$—$ак_1$—$ак_2$—$ак_1$—

Стоит ли на N-конце полипептидного продукта $ак_1$ или $ак_2$, зависит от того, начинается ли рамка считывания с А или с Б. Если в качестве матрицы использовали poly(UG), то синтезировался полипептид из чередующихся валина (Val) и цистеина (Cys):

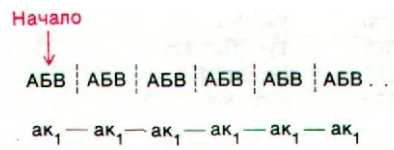
UGU|GUG|UGU|GUG|UGU|GUG

Cys—Val—Cys—Val—Cys—Val

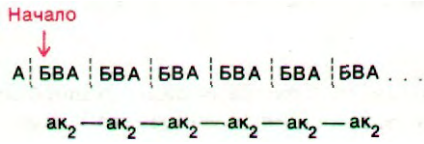
Этот результат однозначно доказывал триплетность кода и показывал, что один из триплетов - UGU или GUG - кодирует цистеин, а другой - валин. В сочетании с данными по связыванию тРНК было очевидно, что UGU кодирует цистеин, а GUG - валин. В присутствии некоторых чередующихся сополимеров из двух оснований происходил синтез следующих полипептидов:

Матрица	Продукт	Смысл кодонов
Poly(UC)	Poly(Ser-Leu)	UCU → Ser; CUC → Leu
Poly(AG)	Poly(Arg-Gln)	AGA → Arg; GAG → Gln
Poly(AC)	Poly(Thr-His)	ACA → Thr; CAC → His

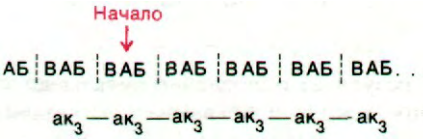
Рассмотрим теперь матрицу, состоящую из повторяющейся последовательности трех оснований, поли(АБВ). Если рамка считывания начинается с А, образующийся полипептид должен содержать аминокислоту только одного вида, кодируемую триплетом АБВ:



Если рамка считывания начинается с Б, синтезирующийся полипептид должен содержать другую аминокислоту, кодируемую триплетом БВА:



Если же рамка считывания начинается с В, должен образовываться полипептид третьего типа, содержащий аминокислоту, кодируемую триплетом ВАБ:



Таким образом, предполагаемые продукты - три различных гомополипептида. Действительно, именно такой результат получался в случае большинства матриц, состоящий из повторяющейся последовательности трех нуклеотидов. Например, на poly(UUC) синтезировались полифенилаланин, полисерин и полилейцин. Этот результат в сочетании с результатами других экспериментов показывал, что UUC кодирует фенилаланин, UCU-серин и CUU-лейцин. Полипептиды, которые синтезировались на других матрицах этого типа, приведены в табл. 26.3. Обратите внимание, что в присутствии poly(GUA) и poly(GAU) происходил синтез двух, а не трех гомополипептидов. Причина этого явления станет ясна чуть ниже.

Таблица 26.3. **Гомополинпептнды, синтезирующиеся на матрицах, которые состоят из повторяющихся последовательностей тринуклеотидов**

Матрица	Синтезирующиеся полипептиды
Poly(UUC)	Phe; Ser; Leu
Poly(AAG)	Lys; Glu; Arg
Poly(UUG)	Cys; Leu; Val
Poly(CCA)	Gln; Thr; Asn
Poly(GUA)	Val; Ser
Poly(UAC)	Tyr; Thr; Leu
Poly(AUC)	Ile; Ser; His
Poly(GAU)	Met; Asp

Корана синтезировал также ряд сополимеров, состоящих из повторяющегося тетрануклеотида, например poly(UAUC). На этой матрице шел синтез полипептида с повторяющейся последовательностью Tyr-Leu-Ser-Ile независимо от рамки считывания:

UAU | CUA | UCU | AUC | UAU | CUA | UCU | AUC

Tyr—Leu—Ser—Ile—Tyr—Leu—Ser—Ile

Отсюда можно было сделать вывод о смысле четырех кодонов.

Совершенно иной результат был получен при использовании в качестве матрицы poly(GUAA). Единственными продуктами были ди- и трипептиды. Почему не было более длинных цепей? Объясняется это тем, что один из триплетов, встречающихся в этом сополимере, а именно UAA, кодирует не аминокислоту, а терминацию синтеза белка:

GUA | AGU | AAG | UAA | GUA | A . . .

Val—Ser—Lys—Стоп

На матрице poly(AUAG) также получались только ди- и трипептиды, так как UAG-второй сигнал терминации цепи:

AUA | GAU | AGA | UAG | AUA | G . . .

Ile—Asp—Arg—Стоп

Посмотрим теперь снова на табл. 26.3. На матрице poly(GUA) синтезировались два, а не три гомополипептида по той причине, что третья рамка считывания соответствует последовательности

G | UAG | UAG | UAG - - -

Стоп — Стоп — Стоп

т. е. представляет собой повторяющуюся последовательность сигнала терминации. Как же обстоит дело с poly(GAU)? На этой матрице синтезировались только два гомополипептида, потому что третья рамка считывания соответствует еще одному сигналу терминации - UGA:

GA | UGA | UGA | UGA | U . . .

Стоп — Стоп — Стоп

Таблица 26.4. **Генетический код**[1)]

Первое положение (5'-конец)	*Второе положение*				*Третье положение (3'-конец)*
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Стоп	Стоп	A
	Leu	Ser	Стоп	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Me	Thr	Asn	Ser	C
	Me	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

[1)] Зная положение оснований в кодоне, можно найти соответствующую аминокислоту. Например, кодон 5'-AUG-3' в мРНК детерминирует метионин, тогда как CAU детерминирует гистидин. Кодоны UAA, UAG и UGA - сигналы терминации (стоп-кодоны). AUG является частью сигнала инициации помимо того, что он кодирует внутренние остатки метионина.

В действительности оказалось, что *только три кодона не кодируют никакой аминокислоты: UAG, UAA и UGA.*

Синтез полинуклеотидов с определенной последовательностью в лаборатории Кораны был выдающимся достижением. Использование этих полимеров в качестве матриц для синтеза белка в сочетании с работами Ниренберга по связыванию тРНК с рибосомами в присутствии тринуклеотидов привели к полной расшифровке генетического кода к 1966 г. Еще за шесть лет до этого такое событие казалось несбыточной мечтой. Благодаря разработке совершенных методов синтеза в лаборатории Кораны стало возможным и еще одно достижение: полный синтез молекулы ДНК, соответствующей последовательности молекулы транспортной РНК.

26.7. Основные свойства генетического кода Были расшифрованы все 64 кодона (табл. 26.4). 61 триплет соответствует определенным аминокислотам, а три кодируют терминацию. Поскольку существует 20 аминокислот и 61 триплет для их кодирования, очевидно, что код в высокой степени *вырожден.* Иными словами, *многие аминокислоты детерминируются более чем одним триплетом. Только* триптофан и метионин кодируются всего одним триплетом. Остальные 18 аминокислот кодируются двумя и более триплетами. Так, в частности, лейцин, аргинин и серин кодируются шестью кодонами каждый. В нормальных физиологических условиях код *однозначен:* каждый кодон обозначает только одну аминокислоту.

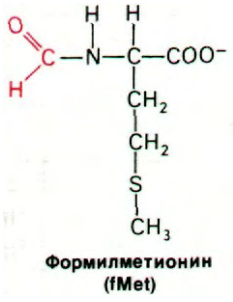
Кодоны, соответствующие одной аминокислоте, называют *синонимами.* Например. CAU и CAC - синонимы для гистидина. Обратите внимание, что синонимы не разбросаны случайным образом по таблице генетического кода (табл. 26.4). Аминокислота, кодируемая двумя или более синонимами, занимает одну клетку в таблице (за исключением тех случаев, когда для данной аминокислоты существует более четырех синонимов). Аминокислоты, расположенные в одной клетке, кодируются кодонами, у которых два первых основания одинаковые, а третье различается, например GUU, GUC, GUA и GUG. *Большинство синонимов различается только последним основанием триплета.* Рассмотрение кода показывает, что XYC и XYU всегда кодируют одну и ту же аминокислоту, а XYG и XYA чаще (но не всегда) кодируют одну и ту же аминокислоту. Структурные основы такой эквивалентности кодонов станут понятны после обсуждения природы антикодонов в молекулах тРНК (разд. 27.6).

Каков биологический смысл сильной вырожденности генетического кода? Один из возможных ответов состоит в том, что *вырожденность сводит к минимуму пагубное действие мутаций.* Если бы код не был вырожден, 20 кодонов кодировали бы аминокислоты, а 44 вызывали бы терминацию цепи.

Таким образом, вероятность превращения кодона в сигнал терминации была бы гораздо выше в случае невырожденного кода, чем в существующем коде. Важно учесть, что мутации, приводящие к образованию сигнала терминации цепи, обычно приводят к синтезу неактивных белков, тогда как замещение одной аминокислоты другой обычно относительно безвредно. Кроме того, *вырожденность кода может иметь определенное значение постольку, поскольку она позволяет нуклеотидному составу ДНК меняться в широких пределах, не влияя на аминокислотную последовательность белков, кодируемых этой ДНК,* ([G] + + [C])-содержание бактериальных ДНК колеблется от 30% до более 70%. Молекулы ДНК с сильно различающимся содержанием [G] + [C] могут кодировать одни и те же белки благодаря систематическому использованию различных синонимов.

26.8. Сигналы инициации и терминации синтеза белка

Как мы уже упоминали, *UAA, UAG и UGA (стоп-кодоны) обозначают терминацию цепи.* Эти кодоны считываются не молекулами тРНК, а особыми белками - факторами терминации. Сигнал начала (инициации) синтеза белка более сложен. Полипептидные цепи у бактерий начинаются с модифицированной аминокислоты формилметионина (fMet).



Формилметионин (fMet)

Существует особая тРНК, которая переносит fMet. Эта fMet-тРНК узнает кодон AUG (или реже GUG). Однако AUG является также кодоном для метионина, расположенного внутри полипептида, а GUG-кодон внутреннего валина. Это значит, что сигнал для первой аминокислоты полипептидной цепи должен быть сложнее, чем для всех последующих аминокислот. AUG (или GUG) представляет собой *часть сигнала инициации.* Существует другой сигнал, предшествующий AUG (или GUG), который определяет, будет ли кодон считан как сигнал инициации цепи или как кодон для внутреннего остатка метионина (или валина). Механизмы инициации и терминации синтеза белка мы рассмотрим в следующей главе (разд. 27.13).

26.9. Генетический код универсален

Как мы уже сказали, генетический код был расшифрован в результате исследований поведения тринуклеотидов и синтетических матричных РНК в бесклеточных системах, полученных из бактерий. Возникают два вопроса. Одинаков ли генетический код in vivo и *in vitro*? Одинаков ли генетический код у всех организмов? Убедительный ответ на эти вопросы был получен при анализе мутаций у вирусов, бактерий и высших организмов. Известно множество аминокислотных замен, возникающих в результате мутаций в генах гемоглобина человека, белка обо-

лочки вируса табачной мозаики (ВТМ) и α-цепи триптофан-синтазы *E.coli. Почти все эти аминокислотные замены объясняются заменами всего лишь одного основания* (табл. 26.5). *Это - надежная проверка правильности всего генетического кода и его универсальности.*

Почему код не изменился за миллионы лет эволюции? Обсудим действие мутации, изменяющей считывание мРНК. Такая мутация изменит последовательность аминокислот в большинстве, если не во всех белках, синтезируемых в клетках мутантного организма. Многие их этих изменений, безусловно, окажутся губительными, и, следовательно, должно существовать сильное давление отбора против таких мутаций.

26.10. Последовательность оснований гена и последовательность аминокислот соответствующего полипептида коллинеарны

Обратимся теперь к взаимоотношениям между генами и белками. Как показала работа Сеймура Бензера (Seymour Benzer) по генетическому картированию высокого разрешения, гены - неразветвленные структуры. Этот важный результат согласовывался с установленным фактом, что ДНК представляет собой линейную последовательность пар оснований. Полипептидные цепи также имеют неразветвленную структуру. Поэтому в начале 60-х годов возник следующий вопрос: *существует ли линейное соответствие между геном и его полипептидным продуктом?*

Подход Чарлза Янофски (Charles Yanofsky) к этой проблеме состоял в использовании мутантов *E.coli,* у которых образуется измененная молекула фермента. Было выделено много мутантов по α-цепи триптофан-синтазы и определена локализация мутаций на генетической карте α-цепи с помощью рекомбинационных экспериментов с трансдуцирующим фагом. Некоторые из этих мутаций были локализованы близко друг к другу на генетической карте, тогда как другие были сильно удалены в пределах одного гена. Следующей важной задачей было определить положение аминокислотной замены для каждого из этих десяти мутантов. Прежде всего была определена последовательность 168 аминокислот α-цепи дикого типа. Затем с помощью метода «отпечатков пальцев» были установлены место и природа аминокислотной замены в каждом случае. *Порядок расположения мутаций на генетической карте был таким же, как порядок соответствующих замен в последовательности аминокислот полипептидного продукта* (рис. 26.5). Другими словами, *ген, кодирующий α-цепь, и его полипептидный продукт коллинеарны.*

26.11. Некоторые последовательности вирусных ДНК кодируют более одного белка

Открытие того факта, что ДНК фага φX174 кодирует больше белков, чем позволяет имеющееся в ней количество нуклеотидов, было совершенно загадочным. Как этот вирус может кодировать более 2000 аминокислотных остатков, если он содержит всего лишь 5375 нуклеотидов? Ответ был получен из полной последовательности оснований (разд. 24.29), когда обнаружилось, что в ДНК фага φX174 некоторые *гены перекрываются.* Определенные участки соответствующих транскриптов транслируются в различных рамках считывания, что приводит к образованию белков с различными последовательностями аминокислот (рис. 26.6). Например, одни и те же 300 нуклеотидов кодируют белок гена E и большую часть белка гена D. Еще более поразительный

Таблица 26.5. **Мутации в гемоглобине человека, триптофан-синтазе *E.coli* и белке оболочки вируса табачной мозаики (ВТМ)**

Белок	Замена аминокислоты	Предполагаемое изменение кодона
Гемоглобин	Glu—>Val[1)]	GAA—>GUA
Гемоглобин	Glu—>Lys[1)]	GAA —>AAA
Гемоглобин	Glu—>Gly	GAA—>GGA
Триптофан-синтаза	Gly—>Arg	GGA —>AGA
Триптофан-синтаза	Gly—>Glu	GGA —>GAA
Триптофан-синтаза	Glu—>Ala	GAA—>GCA
Белок оболочки ВТМ	Leu—>Phe	CUU—>UUU
Белок оболочки ВТМ	Glu—>Gly	GAA—>GGA
Белок оболочки ВТМ	Pro—>Ser	CCC—>UCC

[1)] Замена Glu—>Val и Glu—>Lys происходит в положении 6 в β-цепи гемоглобинов S и C человека соответственно.

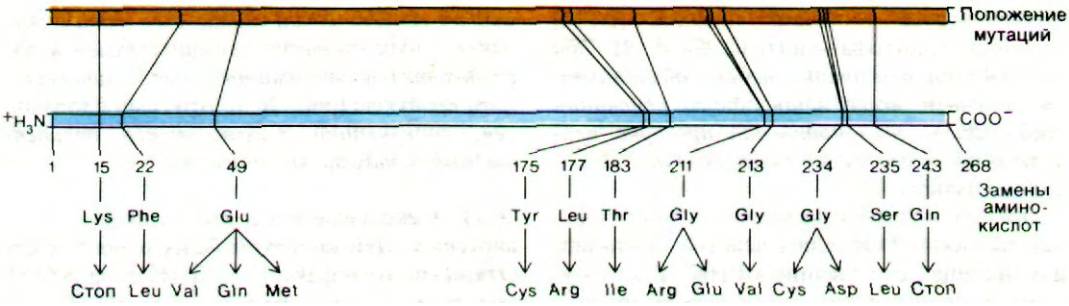
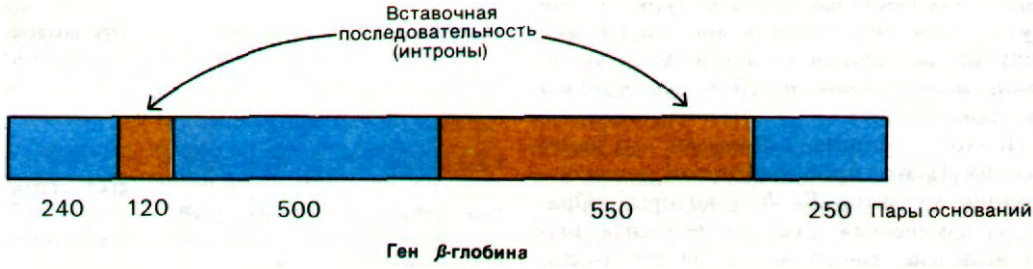


Рис. 26.5. Коллинеарность гена и аминокислотной последовательности α-цепи триптофан-синтазы. Положение мутаций в ДНК (желтая линия) было определено методами генетического картирования. Аминокислотные замены в последовательности аминокислот (синяя линия) расположены в том же порядке, что и соответствующие мутации. (Yanofsky C., Gene Structure and Protein Structure, Sci. Amer., 1967.)

пример представляет родственный бактериофаг G4, в ДНК которого некоторые короткие участки кодируют три различных белка. *Эти вирусы используют перекрывающиеся гены, чтобы ввести больше информации в маленькие молекулы ДНК.* Однако за эту генетическую экономию приходится платить: на последовательности аминокислот, кодируемые перекрывающимися генами, накладываются строгие ограничения. Поэтому перекрывающиеся гены, по-видимому, широко используются лишь в тех случаях, когда количество ДНК строго лимитировано, как в случае вирусов с белковой оболочкой строго определенных размеров.

26.12. Гены эукариот представляют собой мозаику из транслируемых и нетранслируемых последовательностей ДНК

У бактерий полипептидные цепи кодируются непрерывной последовательностью триплетных кодонов. В течение многих лет считалось, что гены высших организмов также непрерывны. Эта точка зрения была неожиданно опровергнута в 1977 г., когда в нескольких лабораториях было открыто, что некоторые гены имеют *прерывистое строение.* Например, ген β-цепи гемоглобина прерывается в области, кодирующей аминокислотную последовательность, длинной *некодирующей вставочной последовательностью* из 550 пар оснований и короткой последовательностью из 120 пар оснований. Таким образом, *ген β-глобина разделен на три кодирующие последовательности:*



Эта удивительная структура была открыта с помощью электронно-микроскопических исследований гибридов между β-глобиновой мРНК и фаргментом ДНК мыши, содержащим ген β-глобина (рис. 26.7). Двухцепочечная ДНК частично денатурируется, что позволяет мРНК гибридизоваться с комплементарной цепью ДНК. Затем одноцепочечный участок ДНК образует петлю и на электронных микрофотографиях выглядит как тонкая линия в отличие от двухцепочечной ДНК или ДНК-РНК-гибридных участков, которые выглядят значительно толще. Если бы ген β-глобина был

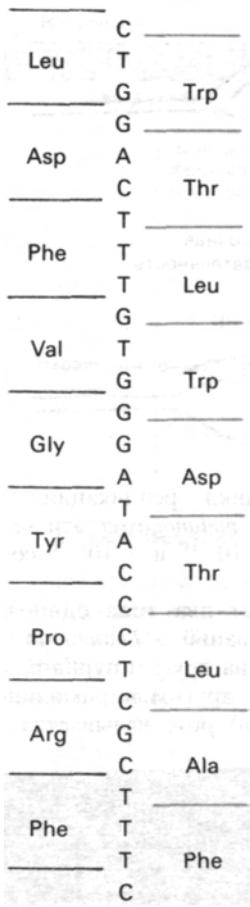


Рис. 26.6. Перекрывающиеся гены в ДНК фага φX174. Рядом с последовательностью оснований показаны две последовательности аминокислот, детерминируемые различными рамками считывания.

непрерывен, была бы видна одна петля. Однако на электронных микрофотографиях таких гибридов (рис. 26.8) отчетливо видны три петли. Это показывает, что ген прерывается по крайней мере одним участком ДНК, которого нет в соответствующей мРНК. Дополнительные данные о вставочных последовательностях были получены при картировании рестрикционных фрагментов гена β-глобина и продукта обратной транскрипции мРНК. Большие различия между этими картами показали, что геномная ДНК содержит нетранслируемые последовательности между кодирующими последовательностями. Рестрикционные карты позволили уточнить локализацию таких вставочных последовательностей.

На каком этапе экспрессии гена удаляются вставочные последовательности? Новосинтезированные РНК, выделенные из ядра, значительно длиннее молекул мРНК, которые из них получаются. В частности, первичный транскрипт гена β-глобина содержит две нетранслируемые области. *Эти вставочные последовательности в первичном 15S-транскрипте вырезаются, а кодирующие последовательности одновременно соединяются под действием фермента сплайсинга. Этот фермент обладает высокой точностью. Так, образуется зрелая 9S-мРНК* (рис. 26.9). Кодирующие последовательности прерывистых («разорванных») генов называются *экзонами,* а вставочные последовательности - *интронами* (от англ. слов expressed regions - экспрессирующиеся участки и intervening sequence - прерывающая последовательность).

Еще один прерывистый эукариотический ген - ген овальбумина куриного яйца, который состоит из восьми экзонов, разделенных семью длинными интронами (рис. 26.10). Еще более удивителен ген кональбумина: он содержит не менее 17 экзонов. Общее свойство экспрессии этих генов - то, что их экзоны располагаются в мРНК и в ДНК в одной и той же последовательности. Таким образом, *прерывистые гены, подобно непрерывным генам, коллинеарны своим полипептидным продуктам.*

Все картированные до настоящего времени гены птиц и млекопитающих, кроме генов гистонов (разд. 29.13), *содержат интроны.* Почему практически все гены высших эукариот содержат вставочные последовательности? Один из возможных ответов состоит в том, что прерывистые гены отражают процесс эволюции. Экзоны могут соответствовать крупным структурным или функциональным элементам (доменам), которые соединились и образовали белки с новыми свойствами. Другая возможность состоит в том, что вырезание вставочных последовательностей регулирует поток мРНК из ядра в цитозоль. В соответствии с этой гипотезой сплайсинг (сращивание) первичного транскрипта играет ключевую роль: он определяет, какие белки синтезирует клетка. Открытие прерывистых генов у высших организмов ввело нас в увлекательную область

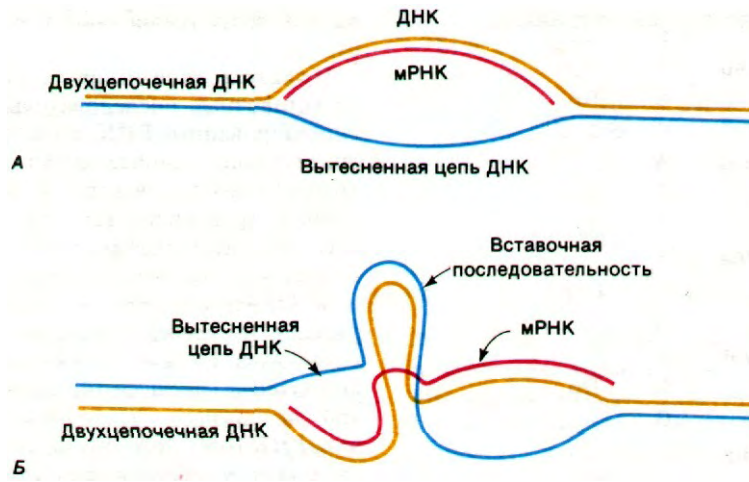


Рис. 26.7. Выявление вставочных последовательностей с помощью электронной микроскопии. Молекула мРНК (красная линия) гибридизуется с геномной ДНК, содержащей соответствующий ген. *А* - если ген непрерывен, видна одна петля одноцепочечной ДНК (показано синим цветом); *Б* - если ген содержит вставочную последовательность, видны две петли одноцепочечной ДНК (показано синим цветом) и одна петля двухцепочечной ДНК (синий и желтый цвет).

познания, которая, по-видимому, имеет большое значение для понимания роста и дифференцировки клеток.

26.13. Мутации возникают в результате изменений последовательности оснований ДНК

Существуют мутации нескольких типов: 1) *замена* одной пары оснований (или нескольких пар) другой парой; 2) *делеция* одной или более пар оснований; 3) *вставка (включение, инсерция)* одной или более пар оснований (рис. 26.11). *Наиболее распространенный тип мутаций - замена одной пары оснований другой парой.* Частота спонтанных мутаций у бактериофага Т4 была оценена в $1{,}7 \cdot 10^{-8}$ на одну пару оснований за один цикл репликации. Для *E.coli* и *Drosophila melanogaster* эти величины составляют $4 \cdot 10^{-10}$ и $7 \cdot 10^{-1}$ соответственно.

Существует два типа одиночных замен пары оснований. *Транзиция* - замещение одного пурина другим пурином или одного пиримидина другим пиримидином. *Трансверсией,* наоборот, называется замещение

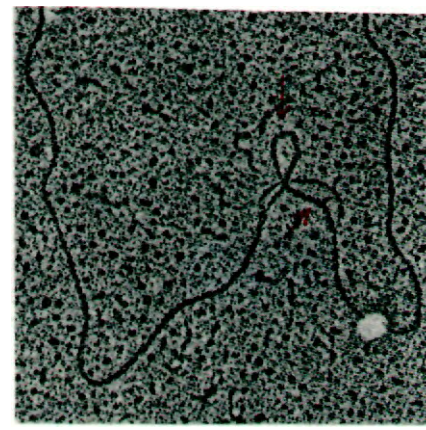


Рис. 26.8. Электронная микрофотография гибрида β-глобиновой мРНК и фрагмента геномной ДНК, содержащего ген β-глобина. Толстые петли двухспиральной ДНК - вставочные последовательности в ДНК, которых нет в мРНК (как на рис. 26.7, *Б*). Верхняя стрелка указывает на большую вставочную последовательность, нижняя стрелка - на маленькую. (Печатается с любезного разрешения д-ра Philip Leder.)

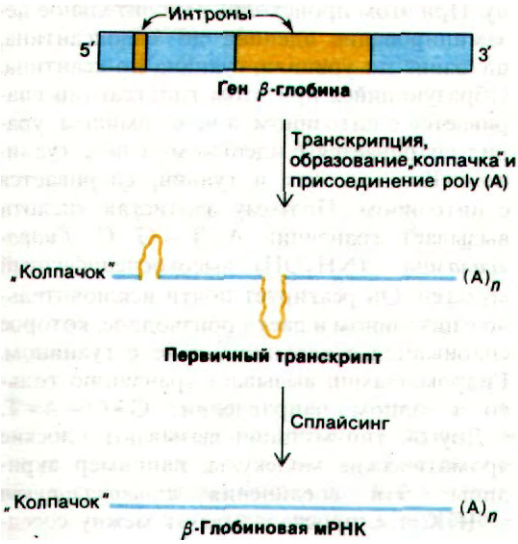
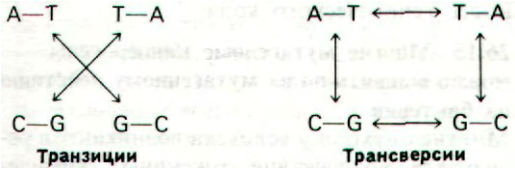


Рис. 26.9. Транскрипция гена β-глобина и удаление вставочных последовательностей из первичного РНК-транскрипта. Образование «колпачка» и присоединение poly(A) обсуждаются в разд. 29.22.

пурина пиримидином или пиримидина пурином:



Механизм спонтанного возникновения транзиций был предложен Уотсоном и Криком в их классической работе о двойной спирали ДНК. Они отметили, что некоторые атомы водорода каждого из четырех оснований могут менять свое положение. *Такие таутомерные формы, которые возникают с низкой вероятностью, могут образовывать необычные пары оснований, отличные от A-T и G-C.* Например, таутомерная иминоформа аденина может спариваться с цитозином (рис. 26.12). В следующем цикле репликации этот аденин, возможно, снова перейдет в свое обычное таутомерное состояние и будет спариваться с тимином, тогда как цитозин будет спариваться с гуанином. В результате одна из дочерних молекул ДНК будет содержать пару G-C вместо пары A-T (рис. 26.13).

Кроме того, мутации могут вызывать *дефектные ДНК-полимеразы.* Существует мутант *E.coli,* у которого частота мутаций в 1000 раз выше, чем в норме, возможно, из-за измененной полимеразы. Отличительная особенность мутаций этих клеток состоит в том, что почти все они являются трансверсиями A-T—>G-C.

26.14. Некоторые химические мутагены весьма специфичны

В ДНК можно включить *аналоги оснований,* например 5-бромурацил и 2-аминопурин. Они вызывают транзиции, нарушая правила спаривания оснований в процессе их собственного включения в состав ДНК или в следующем цикле репликации (рис. 26.14). Аналог тимина *5-бромурацил* в норме спаривается с аденином. Однако доля енольного таутомера в 5-бромурациле выше, чем в тимине, возможно, из-за высокой электроотрицательности атома брома по сравнению с метильной группой при C-5. Енольная форма 5-бромурацила спаривается с гуанином, и это вызывает транзиции A-T—>G-C. *2-аминопурин* в норме спаривается с тимином. В отличие от аденина обычный таутомер 2-аминопурина может образовать одну водородную связь с цитозином. Поэтому 2-аминопурин способен вызывать транзиции A-T—>G-C.

В основе действия других мутагенов лежат химические модификации оснований ДНК. Например, азотистая кислота реагирует с основаниями, имеющими аминогруп-

Рис. 26.10. Структура гена овальбумина куриного яйца. Интроны (некодирующие участки) показаны желтым цветом, а экзоны - синим.

На примере типогралских ошибок
Замена

На примере типожграфских ошибок
Вставка

На примере тпографских ошибок
Делеция

На примере типограф-савдкмыэм
Нонсенс

Рис. 26.11. На примере типографских ошибок можно проиллюстрировать различные типы мутаций.

Рис. 26.12. Редкая таутомерная форма аденина спаривается с цитозином вместо тимина. Этот таутомер образуется при сдвиге протона 6-аминогруппы к атому N-1.

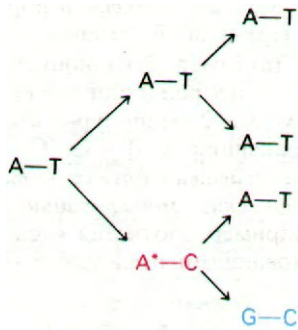


Рис. 26.13. Спаривание редкой таутомерной формы аденина (A*) с цитозином (C) приводит к появлению пары G—C в следующем поколении.

пу. При этом происходит окислительное дезаминирование аденина до гипоксантина, цитозина до урацила, гуанина до ксантина. Образующийся при этом гипоксантин спаривается с цитозином, а не с тимином, урацил спаривается с аденином, а не с гуанином. Ксантин, как и гуанин, спаривается с цитозином. Поэтому азотистая кислота вызывает транзиции A-T—>G-C. *Гидроксиламин* (NH_2OH) - высокоспецифичный мутаген. Он реагирует почти исключительно с цитозином и дает производное, которое спаривается с аденином, а не с гуанином. Гидроксиламин вызывает транзицию только в одном направлении: G-C—>A-T.

Другой тип мутаций вызывают плоские ароматические молекулы, например акридины. Эти соединения *интеркалируют* в ДНК, т.е. проскальзывают между соседними парами оснований в двойной спирали ДНК (разд. 25.18). Интеркаляторы, видимо, стабилизируют спаривание оснований со сдвигом в повторяющихся последовательностях, таких, например, как CGCGCGCG. В результате *они вызывают включения или делеции одной или более пар оснований.* Действие таких мутаций заключается в изменении рамки считывания, если только общее число делетированных или включившихся оснований не кратно трем. Именно анализ таких мутантов позволил доказать триплетность генетического кода.

26.15. Многие мутагенные канцерогены можно выявить по их мутагенному действию на бактерии

Многие опухоли у человека возникают в результате воздействия токсичных химических веществ. Поскольку эти химические канцерогены обычно мутагенны, можно думать, что *повреждение ДНК лежит в основе и канцерогенеза, и мутагенеза.* Эти соединения важно идентифицировать и оценить их потенциальную биологическую активность, чтобы свести к минимуму то воздействие, которое они оказывают на человека. Брюс Эймс (Bruce Ames) разработал простой и чувствительный тест для выявления химических мутагенов. На чашку Петри помещают тонкий слой агара, содержащий около 10^9 клеток специально сконструированного тест-штамма *Salmonella.* Эти бактерии не способны расти в отсутствие гистидина, поскольку они несут мутацию в одном из генов биосинтеза этой аминокислоты. Добавление мутагена в центр чашки индуцирует появление множества новых мута-

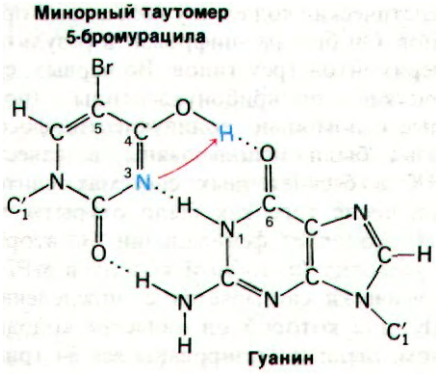


Рис. 26.14. Аналог тимина 5-бромурацил иногда спаривается с гуанином вместо аденина. Присутствие атома брома при С-5 увеличивает долю редкого таутомера, образующегося при сдвиге протона от N-3 к атому кислорода при С-4.

ций. Небольшая часть этих мутаций приводит к реверсии исходной мутации (возврат к дикому типу), так что клетки приобретают способность синтезировать гистидин. Эти *ревертанты* размножаются в отсутствие экзогенного гистидина и появляются в виде отдельных колоний на чашке после инкубации чашки в течение двух дней при 37°С (рис. 26.15). Например, 0,5 мкг 2-аминоантрацена дают 11.000 колоний ревертантов по сравнению всего лишь с 30 спонтанными ревертантами в отсутствие этого мутагена. Можно легко поставить опыт с различными концентрациями исследуемого соединения, чтобы получить кривую доза-ответ. Обычно эта зависимость имеет линейный характер; отсюда следует, что пороговой концентрации в процессах мутагенеза нет.

Некоторые тест-линии чувствительны к *заменам пар оснований,* тогда как другие можно использовать для выявления *делеций или вставок пар оснований (сдвигов рамки).* Чувствительность этих штаммов, сконструированных специально для оценки мутагенов, увеличена генетически: они лишены системы эксцизионной репарации. Кроме того, у них нет липополисахаридной оболочки, которая обычно окружает клетки *Salmonella.* Отсутствие этого барьера облегчает проникновение в клетку потенциальных мутагенов. Еще одна важная особенность этой системы выявления мутагенов - добавление *гомогената печени млекопитающих.* Напомним, что некоторые потенциальные канцерогены превращаются в активную форму под действием ферментативных систем печени или других тканей млекопитающих (разд. 20.21). В бактериях эти ферменты отсутствуют, в связи с чем на чашку наносят несколько миллиграммов гомогената печени, чтобы активировать подобные мутагены. Например, соединение

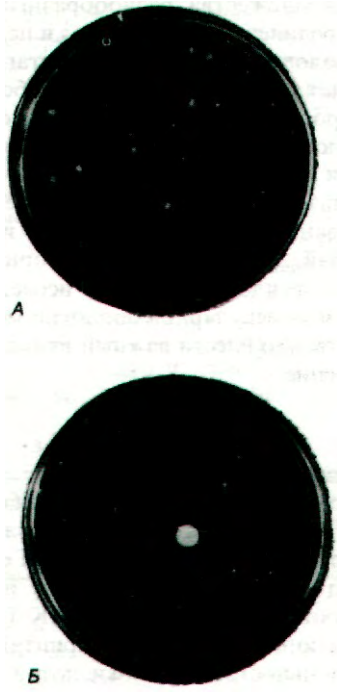


Рис. 26.15. Тест на мутагены с использованием сальмонеллы. *А.* На чашку Петри посеяно примерно 10^9 бактерий, неспособных синтезировать гистидин. *Б.* На чашку помещен кружок фильтровальной бумаги, пропитанный мутагеном. В результате возникает множество ревертантов, способных синтезировать гистидин. Эти ревертанты видны в виде ореола колоний вокруг белого кружочка. Небольшое число колоний на чашке *А* - спонтанные ревертанты. [Ames B.N., McCann J., Yamasaki E., Mutation Res., 31, 347 (1975).]

с реакционноспособной боковой цепью (дающее ему возможность образовать ковалентную связь с ДНК) и с ароматической группой (которое позволяет ему интеркалировать) обладает значительно большей мутагенностью, чем такое же соединение, состоящее из одной ароматической группы.

В настоящее время тест с использованием *Salmonella* широко используется для оценки опасности мутагенного и канцерогенного действия множества разнообразных химических соединений. Эта быстрая и недорогая бактериологическая проба на мутагенность дополняет эпидемиологические обследования и пробы на животных, которые всегда оказываются более трудоемкими, медленными и дорогими. Тест на мутагенность с использованием *Salmonella* - ответвление исследований взаимосвязи гена и белка у бактерий. Это - удивительный пример того, как фундаментальные исследования в области молекулярной биологии могут непосредственно внести важный вклад в здравоохранение.

Заключение

Последовательность оснований гена коллинеарна аминокислотной последовательности полипептидного продукта. Генетический код - это взаимосвязь между последовательностью оснований в ДНК (или соответствующего РНК-транскрипта) и последовательностью аминокислот в белках. Аминокислоты кодируются группами по три основания (они называются кодонами), начиная с фиксированной точки. 61 кодон из 64 кодирует определенную аминокислоту, а остальные три кодона (UAA, UAG и UGA) служат сигналами терминации. Таким образом, для большинства аминокислот имеется более одного кодового слова. Другими словами, код вырожден. Кодоны, определяющие одну и ту же аминокислоту, называются синонимами. В большинстве случаев синонимы различаются только последним основанием триплета. Некоторые последовательности вирусных ДНК кодируют более одного белка, так как их транскрипты транслируются в различных рамках считывания.

Генетический код един у всех живых организмов. Он был расшифрован в результате экспериментов трех типов. Во-первых, синтетические полирибонуклеотиды (полученные с помощью полинуклеотид-фосфорилазы) были использованы в качестве мРНК в бесклеточных системах синтеза белка, после того как было открыто, что poly(U) кодирует фенилаланин. Во-вторых, тринуклеотид (подобный кодону в мРНК) специфически связывается с определенной тРНК, для которой он является кодовым словом. Были синтезированы все 64 тринуклеотида и проверена их способность стимулировать связывание определенных тРНК с рибосомами. В-третьих, в качестве мРНК были использованы синтетические полирибонуклеотиды с известной последовательностью. Например, на матрице poly(UAUC) синтезировался poly(Tyr-Leu-Ser-Ile).

Многие гены высших эукариот имеют «разорванное» строение. Кодирующие последовательности (экзоны) в таких генах разделены вставочными последовательностями (интронами), которые удаляются в ходе превращения первичного транскрипта в мРНК. Например, ген β-глобина млекопитающих содержит два интрона. Прерывистые гены, как и непрерывные гены, коллинеарны своим полипептидным продуктам.

Мутации обусловлены изменениями в последовательности оснований ДНК. Основные типы мутаций - замены, делеции и включения. Самый распространенный тип мутаций - замена одной пары оснований на другую. Замена одного пурина другим или одного пиримидина другим пиримидином называется транзицией. Трансверсия - замещение пурина пиримидином и наоборот. Мутации могут возникать вследствие спонтанной таутомеризации оснований или под действием аналогов оснований (например, 5-бромурацила) или других химических мутагенов (например, азотистой кислоты). Потенциальную канцерогенную активность многих веществ можно выявить по их мутагенному действию на бактерии.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Yanofsky C., 1967. Gene structure and protein structure, Sci. Amer, **216(5),** 80-94. (Статья содержит данные, свидетельствующие о коллинеарности гена и пептида.)

Nirenberg M.W., 1963. The genetic code II. Sci. Amer., **208(3),** 80-94. (Описано использование синтетических полирибонуклеотидов для расшифровки кода.)

Crick F.H.C., 1966. The genetic code III, Sci. Amer., **215(4),** 55-62. (В статье рассматриваются представления о генетическом коде в тот момент, когда он был почти полностью расшифрован.)

Kourilsky P., *Chambon P.*, 1978. The ovalbumin gene: an amazing gene in eight pieces, Trends Biochem. Sci., 3, 244-247.

Гипотеза адаптера (роль тРНК)

Crick F.H.C., 1958. On protein synthesis, Symp. Soc. Exp. Biol, 12, 138-163. (Блистательное предвидение механизма белкового синтеза. Изложена гипотеза адаптера.)

Генетический код

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

Khorana H.G., 1968. Nucleic acid synthesis in the study of the genetic code. In: Nobel Lectures: Physiology or Medicine (1963-1970), pp. 341-369, American Elsevier (1973).

Nirenberg M., 1968. The genetic code. In: Nobel Lectures: Physiology or Medicine (1963-1970), pp. 372-395, American Elsevier (1973).

Garen A., 1968. Sense and nonsense in the genetic code, Science, 160, 149-159.

Woese C.K., 1967. The Genetic Code, Harper and Row.

Cold Spring Harbor Laboratory, 1966. The Genetic Code (Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. 31). (Сборник выдающихся статей, в которых установлены основные свойства кода.)

Перекрывающиеся гены

Barrell B.C., Air G.M., Hutchinson C.A., III, 1976. Overlapping genes in bacteriophage φX174, Nature, 264, 34-40.

Коллинеарность гена и белка

Yanofsky C., Carlton B.C., Guest J.R., Helinski D.R., Henning U., 1964. On the colinearity ofgene structure and protein structure, Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 266-272.

Sarabhai X.S., Stretton O.W., Brenner S., Bolle A., 1964. Colinearity of gene with polypeptide chain, Nature, 201, 13-17.

Разорванные гены и вставочные последовательности

Crick F., 1979. Split genes and RNA splicing in evolution of eukaryotic cells, Science, 202, 1257-1260.

Jeffreys A.J., Flavell R.A., 1977. The rabbit β-globin gene contains a large insert in the coding sequence, Cell, 12, 1097-1108.

Breathnack R., Mandel J.L., Chambon P., 1977. Ovalbumin gene is split in chicken DNA, Nature, 270, 314-319.

Cochet M., Gannon F., Hen R., Maroteaux L., Perrin F., Chambon P., 1979. Organisation and sequence studies of the 17-piece chicken conalbumin gene, Nature, 282, 567-574.

Tilghman S.M., Tiemeier D.C., Seidman J.G., Peterlin B.M., Sullivan M., Maijel J.V., Leder P., 1978. Intervening sequence of DNA identified in the structural portion of a mouse β-globin gene, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 725-729.

Мутагенез

Hayes W., 1968. The Genetics of Bacteria and Their Viruses (2nd ed.), Wiley. (В гл. 13 четко и кратко описана природа мутаций.)

Drake J. W., Baltz R.H., 1976. The biochemistry of mutagenesis, Ann. Rev. Biochem., **45,** 11-38.

Drake J.W., 1970. The Molecular Basis of Mutation, Holden-Day.

Выявление канцерогенов

Ames B.N., 1979. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer, Science, 204, 587-593.

Devoret R., 1979. Bacterial tests for potential carcinogens. Sci. Amer, 241(2), 40-49.

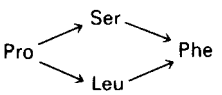
McCann J., Spingarn N.E., Kobori J., Ames B.N., 1975. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids, Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 979-983.

Вопросы и задачи

1. Какую последовательность аминокислот кодирует следующая последовательность оснований молекулы мРНК? Считайте, что рамка считывания начинается с 5'-конца: 5'-UUGCCUAGUGAUUGGAUG-3'.

2. Какова последовательность полипептида, который образуется при добавлении poly(UUAC) в бесклеточную систему синтеза белка?

3. Одноцепочечную РНК вируса табачной мозаики обработали химическим мутагеном. Были получены мутанты, у которых в определенном положении вместо пролина располагается серин или лейцин. Повторная обработка мутантной РНК тем же мутагеном привела к появлению в том же положении фенилаланина:



а) Каковы предполагаемые кодоны для этих четырех аминокислот?

б) Что применялось в качестве мутагена: 5-бромурацил, азотистая кислота или акридиновый краситель?

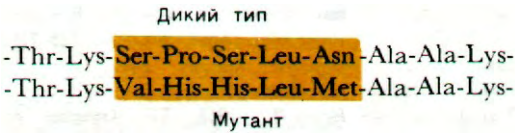
4. Специалист по химии белка сказал молекулярному генетику, что он нашел новый мутантный гемоглобин, в котором аспартат замещает лизин.

Молекулярный генетик удивился и отправил своего приятеля еще повозиться в лаборатории.

а) Почему молекулярный генетик выразил сомнения в возможности такой аминокислотной замены?

б) Какая аминокислотная замена показалась бы молекулярному генетику более приемлемой?

5. Ниже приведены последовательности аминокислот в фрагменте лизоцима бактериофага Т4 дикого типа и мутанта:



а) Могла ли эта мутация возникнуть путем замены одной пары оснований в ДНК фага Т4? Если нет, то как мог возникнуть такой мутант?

б) Какова последовательность оснований мРНК, кодирующей пять аминокислот в белке дикого типа, отличающихся от той же последовательности у мутанта?

6. РНК-транскрипт одного участка ДНК фага G4 содержит последовательность 5'-AAAUGAGGA-3'. Этот фрагмент кодирует три различных белка. Каковы их последовательности?

Дополнительные вопросы см.: Wood W.B., Wilson J. H., Benbow R. M., Hood L. E, Biochemistry: A Problems Approach, Benjamin, 1974, ch. 19.

ГЛАВА 27
Синтез белка

Из предыдущей главы нам известно, что последовательность аминокислот в белках определяется последовательностью кодонов в мРНК, считываемых молекулами тРНК. Обратимся теперь к механизму синтеза белка. Этот процесс называется *трансляцией* (от англ. translation - перевод), так как информация, записанная на четырехбуквенном языке нуклеиновых кислот, переводится на язык белков, состоящий из 20 букв. Как и следовало ожидать, трансляция - процесс более сложный, чем репликация или транскрипция ДНК, которые происходят с использованием одного и того же языка спаривания оснований. Трансляция осуществляется в результате согласованного взаимодействия более чем сотни видов макромолекул. Помимо рибосом, необходимы молекулы тРНК, активирующих ферментов, растворимых факторов и мРНК.

Прежде чем перейти к подробному описанию синтеза белка, рассмотрим процесс в общих чертах. Белок синтезируется в направлении от аминоконца к карбоксильному концу путем последовательного присоединения аминокислот к карбоксильному концу растущей пептидной цепи. Аминоацил-тРНК, в которых карбоксильная группа аминокислоты присоединена к 3'-концу тРНК, играют в этом процессе роль активированных предшественников. Присоединение аминокислоты к соответствующей тРНК катализирует аминоацил-тРНК—синтетаза. Эта реакция активации, будучи аналогична активации жирных кислот, также запускается энергией гидролиза ATP. Для каждой аминокислоты имеется по крайней мере один вид тРНК и специфический активирующий фермент. Синтез белка осуществляется в три стадии, называемые инициацией, элонгацией и терминацией. *Инициация* приводит к связыванию инициаторной тРНК с сигналом начала транскрипции в мНРК. Инициаторная тРНК занимает Р-участок рибосомы (от англ. peptidyl - пептидильный) - один из двух участков связывания тРНК. *Элонгация* начинается со связывания аминоацил-тРНК с другим участком связывания тРНК на рибосоме, называемым А-участком (от англ. aminoacyl - аминоацильный). Затем образуется пептидная связь между аминогруппой второй аминоацил-тРНК и карбоксильной группой fMet, связанного с инициаторной тРНК. Теперь образовавшаяся в результате дипептидил-тРНК перемещается из А-участка в Р-участок, в то время как освободившаяся молекула тРНК покидает рибосому. Связывание аминоацил-тРНК, перемещение пептидил-тРНК из А-участка в Р-участок и одновременное перемещение рибосомы к следующему кодону мРНК требуют гидролиза GTP. Затем новая аминоацил-тРНК связывается со свободным А-участком и начинается новый цикл реакции элонгации, подобный уже описанному. *Терминация* происходит тогда, когда стоп-кодон (сигнал терминации) в молекуле тРНК считывается фактором освобождения белка. Это приводит к отделению завершенной полипептидной цепи от рибосомы. В настоящей главе мы будем говорить главным образом о синтезе белка в клетках *E.coli,* где этот процесс лучше всего изучен. Некоторые различия между синтезом белка у прокариот и эукариот будут рассмотрены в разд. 29.25.

27.1. Аминокислоты активируются и присоединяются к транспортным РНК под действием специфических синтетаз

Образование пептидной связи между аминогруппой одной аминокислоты и СООН-группой другой аминокислоты термодина-

мически невыгодно. Этот термодинамический барьер преодолевается путем активации COOH-группы аминокислот-предшественников. *Активированными промежуточными продуктами синтеза белка служат эфиры аминокислот,* в которых карбоксильная группа аминокислоты связана с 2'- или 3'-гидроксильной группой рибозного остатка на 3'-конце тРНК. Аминоацильная группа может быстро перемещаться из 2'-положения в 3'-положение и обратно. Этот активированный промежуточный продукт называется *аминоацил-тРНК* (рис. 27.1).

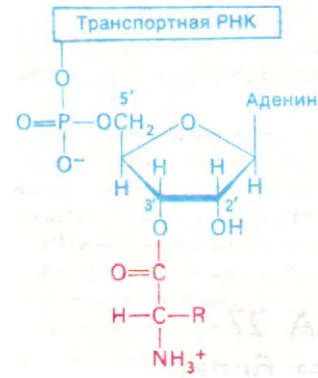
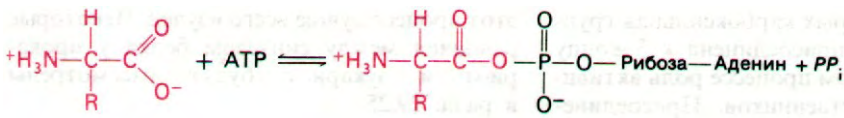


Рис. 27.1. В аминоацил-тРНК аминокислота связана эфирной связью с 2'- или 3'-гидроксильной группой концевого аденозина.

Присоединение аминокислоты к тРНК имеет значение не только потому, что при этом активируется ее карбоксильная группа и она может образовать пептидную связь, но и потому, что аминокислоты сами по себе не способны узнавать кодоны в мРНК. Аминокислоты переносятся к рибосомам специфическими тРНК, которые и узнают кодоны в мРНК. Таким образом, эти тРНК выполняют роль адапторных молекул.

В 1957 г. Пол Замечник и Малон Хогланд (Paul Zamecnik, Mahlon Hoagland) установили, что активация аминокислот и их последующее присоединение к тРНК катализируются специфическими *аминоацил-тРНК—синтетазами,* которые также называют *активирующими ферментами.* В реакциях, катализируемых некоторыми синтетазами, первая стадия состоит в образовании *аминоациладенилата* из аминокислоты и ATP. Это активированное соединение представляет собой смешанный ангидрид, в котором карбоксильная группа аминокислоты присоединена к фосфатной группе AMP. Другие синтетазы катализируют реакцию ATP, аминокислоты и тРНК без промежуточного образования доступного для обнаружения аминоациладенилата.



Аминоациладенилат (Аминоацил-AMP)

Следующий этап - перенос аминоацильной группы аминоацил-AMP на молекулу тРНК с образованием *аминоацил-тРНК*-активированного промежуточного продукта в синтезе белка. Переносится ли аминоацильная группа на 2'- или 3'-гидроксильную группу рибозного остатка на 3'-конце тРНК, зависит от того, о какой аминокислоте и какой аминоацил-тРНК—синтетазе идет речь. Активированная аминокислота может очень быстро перемещаться из 2'- в 3'-положение и обратно.

Аминоацил-AMP + тРНК ⇄
Аминоацил-тРНК + AMP.

Суммарная реакция этапов активации и переноса описывается следующим уравнением:

Аминокислота + ATP + тРНК ⇄
⇄ Аминоацил-тРНК + AMP + PP_i.

$\Delta G'$ для этой реакции близко к нулю, так как свободная энергия гидролиза эфирной связи аминоацил-тРНК соответствует свободной энергии гидролиза концевой фосфорильной группы ATP. Что же в таком случае запускает синтез аминоацил-тРНК? Как и можно было ожидать, реакция запускается гидролизом пирофосфата. Суммарная реакция этих превращений высокоэкзергонична:

Аминокислота + ATP + тРНК + H_2O ⇄
⇄ Аминоацил-тРНК + AMP + $2P_i$.

Таким образом, *на синтез аминоацил-тРНК затрачиваются две богатые энергией фосфатные связи.* Одна из них расходуется на образование эфирной связи аминоацил-тРНК, другая сдвигает равновесие реакции в сторону образования продукта.

Стадии активации и переноса определенной аминокислоты катализируются одной и той же аминоацил-тРНК—синтетазой. В действительности *аминоацил-АМР не диссоциирует из комплекса с синтетазой.* Он прочно связывается с активным центром фермента нековалентными взаимодействиями. В норме аминоацил-АМР, образующийся в качестве промежуточного продукта синтеза аминоацил-тРНК, существует в течение непродолжительного времени, но он вполне стабилен и может быть легко выделен, если в реакционной смеси нет тРНК.

Мы уже встречались с ациладенилатным промежуточным продуктом при активации жирных кислот (разд. 17.6). Интересно отметить, что Пол Берг (Paul Berg) первым открыл этот промежуточный продукт в реакции активации жирных кислот, и он же позже выяснил, что этот продукт образуется также при активации аминокислот. Основное различие между этими реакциями состоит в том, что в первом случае роль акцептора ацильных групп играет CoA, а во втором - тРНК. Энергетика этих биосинтетических реакций очень сходна: обе они становятся необратимыми благодаря гидролизу неорганического пирофосфата.

Для каждой аминокислоты имеется по крайней мере одна аминоацил-тРНК—синтетаза. Эти ферменты различаются по размеру, субъединичной структуре и аминокислотному составу (табл. 27.1).

Таблица 27.1. **Свойства некоторых аминоацил-тРНК-синтетаз**

Источник	Специфичность к аминокислоте	Масса, кДа	Субъединичная структура
E.coli	Гистидин	85	α_2
E.coli	Изолейцин	114	Одна цепь
E.coli	Лизин	104	α_2
E.coli	Глицин	227	$\alpha_2\beta_2$
Дрожжи	Лизин	138	α_2
Дрожжи	Фенилалакин	270	$\alpha_2\beta_2$
Поджелудочная железа быка	Триптофан	108	α_2

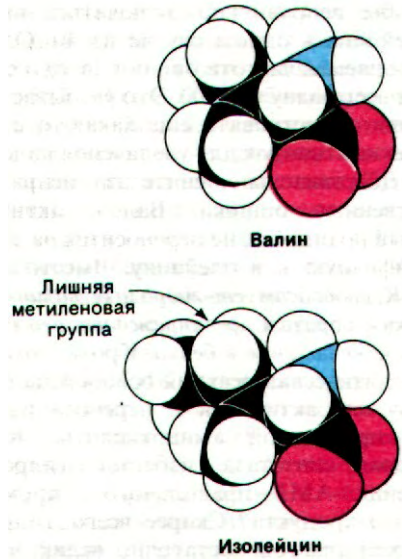


Рис. 27.2. Пространственные модели валина и изолейцина. Синтетазы, активные в отношении этих аминокислот, высоко специфичны.

27.2. Надежность синтеза белка определяется высокой специфичностью аминоацил-тРНК-синтетаз

Правильная трансляция генетических матриц обеспечивается высокой специфичностью аминоацил-тРНК—синтетаз. Эти *ферменты весьма избирательны в отношении активируемых аминокислот и соответствующей тРНК-акцептора.* Как будет указано несколько ниже, молекулы тРНК, акцептирующие различные аминокислоты, имеют различные последовательности оснований, благодаря чему синтетазы легко узнают их. Гораздо более сложная задача для этих ферментов - различать сходные аминокислоты. Например, единственное различие между изолейцином и валином состоит в том, что изолейцин содержит лишнюю метиленовую группу (рис. 27.2). Дополнительная энергия связывания, которую вносит эта лишняя группа $—CH_2—$, благоприятствует тому, что активация изолейцина происходит примерно в 200 раз чаще, чем активация валина. Концентрация валина *in vivo* примерно в 5 раз выше концентрации изолейцина, так что валин должен

был бы неправильно включаться вместо изолейцина в одном случае из 40. Однако наблюдаемая частота ошибок *in vivo* составляет всего одну на 3000. Это указывает, что должна существовать еще какая-то стадия коррекции ошибок для увеличения надежности. Действительно, синтетаза исправляет собственные ошибки. Валин, активированный по ошибке, не переносится на тРНК, специфичную к изолейцину. Вместо этого *тРНК способствует гидролизу валин-АМР и таким образом предупреждает его неправильное включение в белки*. Кроме того, эта гидролитическая реакция освобождает синтетазу для активации и переноса изолейцина правильной аминокислоты. Каким образом синтетаза избегает гидролиза изолейцин-АМР - правильного промежуточного продукта? Скорее всего, гидролитический участок достаточно велик, чтобы там поместился валин-АМР, но слишком мал для связывания изолейцин-АМР.

Многие другие аминоацил-тРНК—синтетазы также содержат, помимо участков синтеза, гидролитические участки. Возможно, эти участки действуют как *двойные фильтры,* обеспечивающие высокую надежность. Участок синтеза отбрасывает аминокислоты, превышающие по размеру нужную аминокислоту, а гидролитический участок разрушает те активированные промежуточные продукты, которые *меньше* по размеру, чем требуется. Очевидно, *высокая надежность синтеза белка в первую очередь зависит от механизма коррекции с помощью гидролитической активности, которой обладают многие аминоацил-тРНК—синтетазы.*

Рис. 27.3. Исправление ошибок с помощью гидролиза ошибочного продукта.

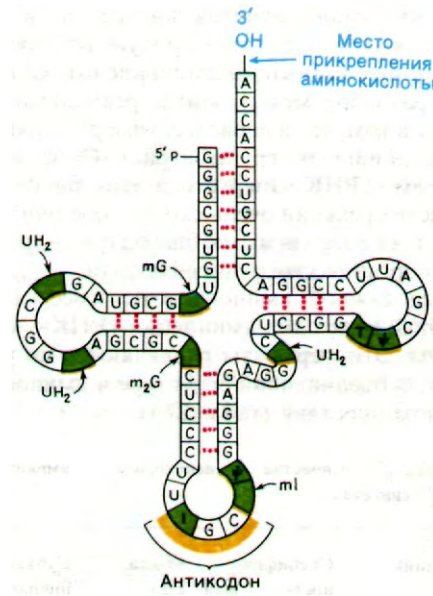


Рис. 27.4. Последовательность оснований дрожжевой аланиновой тРНК. Модифицированные нуклеозиды (отмечены зеленым) сокращенно обозначаются следующим образом: инозин - I, метилинозин - mI, дигидроуридин - UH_2, риботимидин - T, псевдоуридин - ψ, метилгуанозин - mG и диметилгуанозин – m_2G.

27.3. Молекулы транспортных РНК имеют общий план строения

В 1965 г, Роберт Холли (Robert Holley) после семи лет упорных поисков впервые определил последовательность оснований одной из транспортных РНК. При исследовании дрожжевой аланиновой тРНК была получена первая полная последовательность нуклеиновой кислоты. Эта работа стала источником новых идей, касающихся биологической активности молекулы тРНК. В процессе расшифровки последовательности Холли разработал общие методы для определения последовательности нуклеотидов в нуклеиновых кислотах. Последовательность дрож-

жевой аланиновой тРНК показана на рис. 27.4. Молекула представляет собой одну цепь из 76 рибонуклеотидов. 5'-конец фосфорилирован (pG), а 3'-конец имеет свободную 3'-гидроксильную группу. Характерная особенность этой молекулы - высокое содержание оснований, отличных от A, U, G и C. В ней содержится девять необычных нуклеотидов: инозин, псевдоуридин, дигидроуридин, риботимидин и метилированные производные гуанозина и инозина. *Участок прикрепления аминокислоты* представляет собой 3'-гидроксильную группу остатка аденозина на 3'-конце молекулы. Последовательность IGC в середине молекулы - *антикодон*. Он комплементарен GCC - одному из кодонов аланина.

Вскоре были определены последовательности нескольких других молекул тРНК. К настоящему времени уже известны последовательности более 70 тРНК. Самое удивительное, что все эти последовательности можно изобразить в форме клеверного листа, в котором около половины нуклеотидов образует пары оснований. Следовательно, *молекулы тРНК обладают многими общими структурными особенностями*. В этом факте нет ничего неожиданного, так как все молекулы тРНК должны взаимодействовать примерно одинаковым образом с рибосомами и мРНК. Говоря конкретно, все молекулы тРНК должны укладываться в A- и P-участки рибосомы и должны взаимодействовать с ферментом, катализирующим образование пептидной связи.

Все молекулы транспортных РНК обладают следующими общими свойствами.

1. Все они представляют собой одну цепь длиной от *73 до 93 рибонуклеотидов* (масса около 25 кДа).

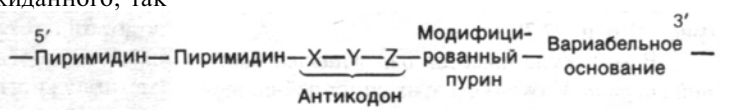
2. Они содержат *много необычных оснований,* как правило, от 7 до 15 на молекулу. Многие из этих необычных оснований представляют собой метилированные или диметилированные производные A, U, C и G, которые образуются путем ферментативной модификации тРНК-предшественника (разд. 25.17). Роль этих необычных оснований неизвестна. Вполне возможно, что метилирование препятствует спариванию некоторых оснований и делает их таким образом доступными для других взаимодействий. Кроме того, метилирование изменяет гидрофобность некоторых участков тРНК, что может иметь важное значение для их взаимодействия с синтетазами и рибосомными белками.

3. 5'-конец тРНК фосфорилирован. На 5'-конце обычно расположен остаток pG.

4. На 3'-конце всех тРНК находится последовательность CCA. Активированная аминогруппа прикрепляется к 3'-гидроксильной группе концевого аденозина.

5. Примерно половина нуклеотидов тРНК спарена и образует участки двойной спирали (рис. 27.5). Не спарены пять групп оснований: *3'-концевая область CCA (акцепторная ветвь); TψC-петля,* которая получила свое название по последовательности риботимидин - псевдоурацил - цитозин; *добавочная петля,* число остатков которой различно в разных тРНК; *дигидроуридиловая петля,* которая содержит несколько остатков дигидроуридина; *антикодоновая петля.*

6. *Антикодоновая петля* состоит из семи оснований, расположенных в следующей последовательности:



27.4. Транспортная РНК имеет L-образную форму

К настоящему времени трехмерная структура молекулы тРНК установлена на атомном уровне благодаря рентгеновским кристаллографическим исследованиям, осуществленным в лабораториях Александра Рича и Арона Клуга (Alexander Rich, Aaron Klug). В результате проведенного ими независимого рентгенографического изучения фенилаланиновой тРНК получено множество новых данных о структуре молекулы тРНК.

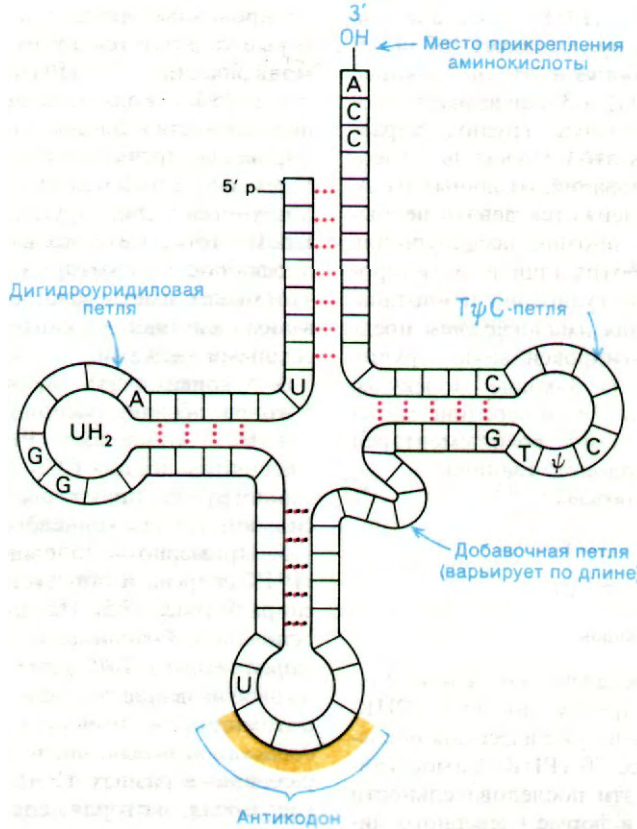


Рис. 27.5. Общая схема строения молекул тРНК.

1. Молекула имеет *L-образную форму* (рис. 27.6 и 27.7).

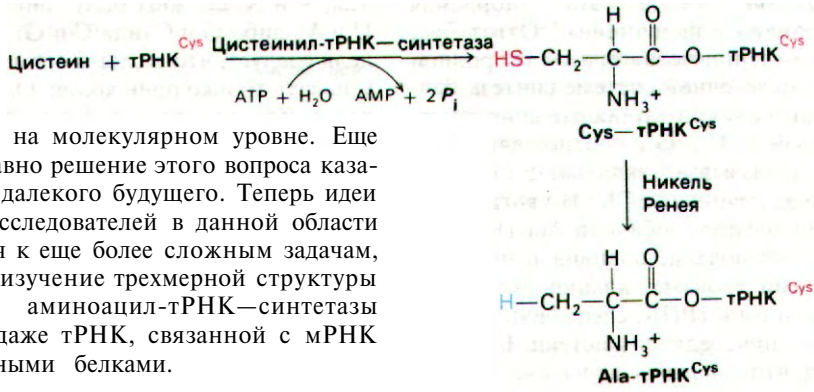
2. В молекуле имеется *два участка двойной спирали.* Каждая из этих спиралей содержит примерно десять пар оснований, что соответствует одному витку спирали. Спиральные участки расположены перпендикулярно друг другу, что и придает молекуле L-образную форму. Схема спаривания оснований, постулированная в модели клеверного листа, построенной по результатам определения последовательности, оказалась правильной.

3. Большинство оснований вне спиральных участков образует необычные водородные связи. Эти *третичные взаимодействия* возникают между основаниями, которые обычно не комплементарны друг другу (например, G—G, A—A и A—C). Более того, рибозофосфатный остов взаимодействует с некоторыми основаниями и даже с другим участком самого остова. Во многих подобных взаимодействиях 2'-OH-группа остатков рибозы выступает в качестве донора или акцептора при образовании водородных связей. Кроме того, значительная часть оснований упакована в стопки (межплоскостные взаимодействия). Эти гидрофобные взаимодействия между соседними ароматическими кольцами играют основную роль в молекулярной архитектуре.

4. ССА-конец - *участок прикрепления аминокислоты* - расположен на одном из концов L. Другой конец L представляет собой *антикодоновую петлю.* Таким образом, *аминокислота, связанная в аминоацил-тРНК, удалена от антикодона* (на расстояние примерно 80 А). Дигидроуридиловая петля и TψC-петля образуют угол буквы L.

5. ССА-конец и прилегающая к нему спиральная область не очень сильно взаимодействуют с остальной молекулой. Эта часть молекулы может изменять конформацию при активации аминокислоты и при синтезе белка на рибосоме.

Определение трехмерной структуры тРНК - важный шаг в изучении процесса



трансляции на молекулярном уровне. Еще совсем недавно решение этого вопроса казалось делом далекого будущего. Теперь идеи и усилия исследователей в данной области обращаются к еще более сложным задачам, таким, как изучение трехмерной структуры комплексов аминоацил-тРНК—синтетазы с тРНК и даже тРНК, связанной с мРНК и рибосомными белками.

27.5. В узнавании кодона участвует антикодон, а не активированная аминокислота

Мы уже упоминали, что антикодон тРНК - участок, узнающий кодон мРНК, и что узнавание происходит путем спаривания оснований. Играет ли какую-нибудь роль в этом процессе аминокислота, присоединенная к тРНК? Ответ на этот вопрос был получен следующим путем. Вначале цистеин присоединили к соответствующей тРНК (она обозначается $тРНК^{Cys}$). Затем присоединенный остаток цистеина превратили в аланин, обработав Cys-$тРНК^{Cys}$ никелем Ренея. В результате атом серы отделился от активированного остатка цистеина; связь цистеина с тРНК при этом не затрагивалась.

Так была получена *гибридная аминоацил-мРНК,* в которой аланин ковалентно присоединен к тРНК, специфичной к цистеину.

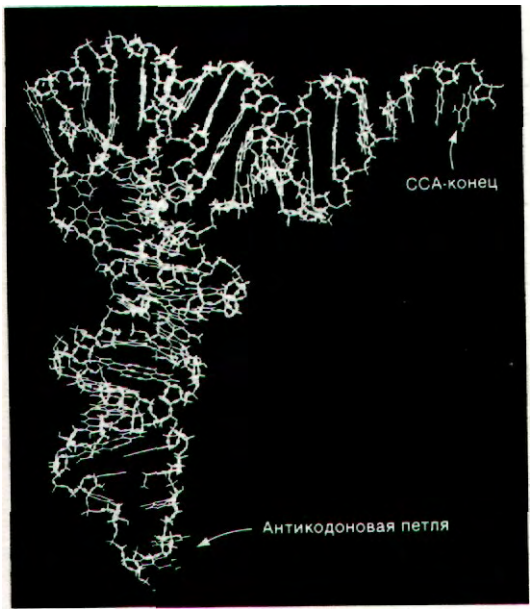


Рис. 27.6. Фотография скелетной модели дрожжевой фенилаланиновой тРНК, основанная на карте электронной плотности с разрешением 3 А. (Печатается с любезного разрешения д-ра Sung-Hou Kim.)

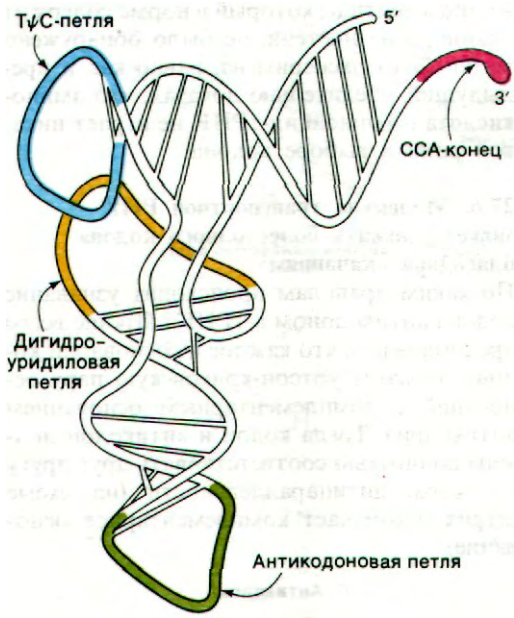


Рис. 27.7. Схематическое изображение трехмерной структуры дрожжевой фенилаланиновой тРНК. (По рисунку, любезно предоставленному д-ром Sung-Hou Kim.)

Какой кодон узнаёт эта гибридная тРНК - аланина или цистеина? Ответ был получен при использовании этой гибридной тРНК в бесклеточной системе синтеза белка. Матрицей служил случайный сополимер, построенный из U и G в соотношении 5:1; в норме он вызывает включение цистеина (UGU), но не аланина (GCX). Но когда в инкубационную смесь добавили Ala-тРНК^{Cys}, произошло включение аланина в полипептид. Другими словами, аланин включался так, как если бы к тРНК, специфичной к цистеину, был присоединен цистеин. Был сделан вывод, что *узнавание кодона не зависит от аминокислоты, прикрепленной к тРНК.*

Такой же результат был получен в тех случаях, когда роль матрицы выполняла гемоглобиновая мРНК. В качестве гибридной аминоацил-тРНК использовали ^{14}С-аланил-тРНК^{Cys}. Единственный радиоактивный триптический пептид (т. е. пептид, содержащий ^{14}С-аланин) соответствовал пептиду, который в норме содержит цистеин, а не аланин. С другой стороны, ни в одном пептиде, который в норме содержит аланин, а не цистеин, не было обнаружено метки. Этот эксперимент, равно как и предыдущий, убедительно доказал, что аминокислота в аминоацил-тРНК не играет никакой роли в выборе кодона.

27.6. Молекула транспортной РНК может узнавать более одного кодона благодаря «качаниям»

По каким правилам происходит узнавание кодона антикодоном в тРНК? Проще всего предположить, что каждое из оснований кодона образует уотсон-криковскую пару оснований с комплементарным основанием антикодона. Тогда кодон и антикодон должны полностью соответствовать друг другу с учетом антипараллельности (на схеме штрих обозначает комплементарное основание):

Так, X и X' должны быть либо A и U (или U и A), либо G и C (или C и G). Из этой модели следует, что каждый антикодон может узнавать только один кодон. Однако факты, которыми мы располагаем, противоречат этому. *Некоторые выделенные в чистом виде молекулы тРНК могут узнавать более одного кодона.* Например, дрожжевая аланиновая тРНК, изученная Холли, связывается с *тремя* кодонами: GCU, GCC и GCA. Только первые два основания этих кодонов одинаковы, третье различается. Может быть, узнавание третьего основания кодона иногда менее избирательно, чем узнавание двух других? Общая картина вырожденности генетического кода показывает, что дело может обстоять именно так. XYU и XYC *всегда* кодируют одну и ту же аминокислоту, а XYA и XYG *обычно* имеют одинаковый смысл. Исходя из этих данных, Крик предположил, что на спаривание третьего основания должны накладываться менее строгие стерические ограничения, чем на спаривание двух других. Были построены модели различных вариантов спаривания оснований, чтобы определить, какие из них сходны со стандартными A—U- и G—C-парами в отношении расстояния и угла между гликозидными связями. В это исследование был включен инозин, так как он встречается в некоторых антикодонах. Если предположить, что в спаривании третьего основания кодона допустима некоторая стерическая свобода («качание», или неоднозначное соответствие), то комбинации, приведенные в табл. 27.2, кажутся вполне возможными.

В настоящее время правомочность гипотезы «качаний» доказана. Антикодоны тРНК с известной последовательностью связываются с теми кодонами, которые предсказывает эта теория. Например, антикодоном дрожжевой аланиновой тРНК

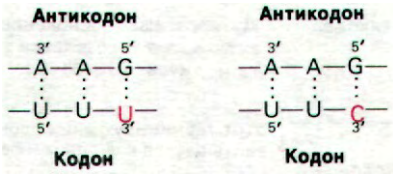
Таблица 27.2. **Допустимые типы спаривания третьего основания кодона в соответствии с гипотезой «качаний»**

Первое основание антикодона	Третье основание кодона
C	G
A	U
U	A или G
G	U или C
I	U, C или A

является IGC. Эта тРНК узнает кодоны GCU, GCC и GCA:

Итак, I спаривается с U, C и A, как и предсказывает теория.

Фенилаланиновая тРНК, имеющая антикодон GAA, узнает кодоны UUU и UUC, но не UUA и UUG:



Таким образом, G спаривается с U или с C в третьем положении кодона, как и предсказывает гипотеза качаний.

Можно сделать два обобщения, касающихся кодон-антикодонового взаимодействия.

1. Первые два основания кодона спариваются обычным образом. Узнавание происходит точно. Следовательно, *кодоны, которые различаются по одному из первых двух оснований, должны узнаваться различными тРНК.* Например, и UUA, и CUA кодируют лейцин, но считываются различными тРНК.

2. Первое основание антикодона определяет, считывает ли данная молекула тРНК один, два или три типа кодонов: C и A узнают по одному кодону, U и G - по два кодона, I - три кодона. Итак, *одна из причин вырожденности генетического кода заключается в неточности, или неоднозначности, спаривания («качании») третьего основания кодона.* Именно в этом мы усматриваем основную причину распространенности необычного нуклеозида инозина в антикодонах. Инозин увеличивает число кодонов, которые способна считывать данная молекула тРНК (рис. 27.8).

27.7. Мутантные молекулы транспортных РНК могут подавлять другие мутации

Новый этап в изучении процесса узнавания кодона начался в связи с исследованиями мутантных тРНК, в которых изменено одно основание в антикодоне. Эти спонтанные события противоположны по своей сути химической модификации *in vitro* аминокислоты, прикрепленной к тРНК. Любопытна история открытия таких мутантных тРНК. В течение многих лет генетики знали, что повреждающее действие некоторых мутаций может быть подавлено другой мута-

Рис. 27.8. Благодаря «качаниям» инозин может давать пары оснований с цитозином, аденином и урацилом.

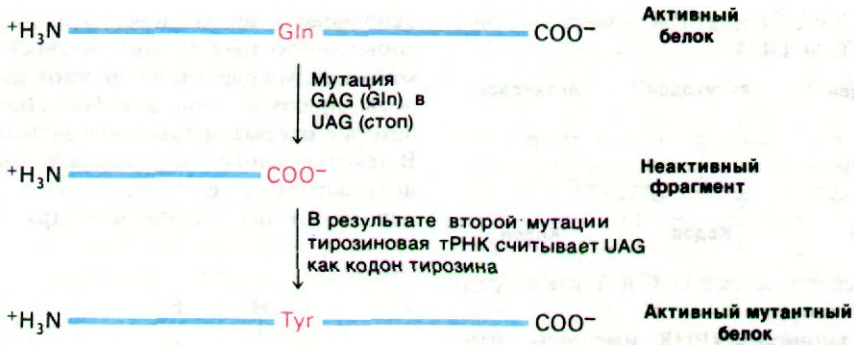


Рис. 27.9. Супрессия мутации, приводящей к терминации цепи, второй мутацией в молекуле тРНК.

цией. Предположим, какой-то фермент стал неактивным из-за превращения кодона GCU (аланин) в кодон GAU (аспартат). Мутации какого рода могли бы восстановить активность этого фермента?

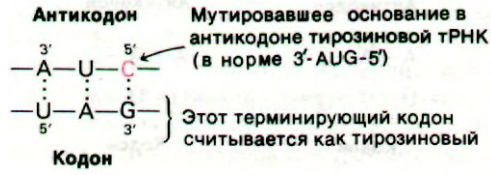
1. Обратная мутация того же основания A—>C даст исходное кодовое слово.

2. Другая мутация A—>U даст валин (GUU), который, возможно, полностью или частично восстановит активность фермента.

3. Мутация в другом месте того же гена может обратить действие первой мутации. Такой измененный белок будет отличаться от белка дикого типа двумя аминокислотами.

4. Мутация *в другом гене* может преодолеть повреждающее действие первой мутации. Это явление называется *межгенной супрессией*.

В течение долгого времени механизм действия межгенных супрессоров оставался загадкой. Теперь мы знаем из генетических и биохимических исследований, что *большинство таких супрессоров действует, изменяя считывание мРНК*. Рассмотрим к примеру мутацию, которая приводит к появлению терминирующего кодона UAG (т. е. стоп-кодона, или сигнала терминации). Результатом мутации будет образование неполных полипептидных цепей. Такие мутации называются нонсенс-мутациями (от англ. nonsense - бессмысленный), так как неполные полипептиды обычно неактивны. Действие нонсенс-мутации UAG может быть подавлено мутациями в нескольких различных генах. Один из этих супрессоров считывает UAG как кодон тирозина,



что может привести к синтезу активного белка вместо неполной полипептидной цепи (рис. 27.9). Почему же эта мутантная РНК вставляет тирозин в ответ на кодон UAG? В норме тирозиновая тРНК узнает кодоны UAC и UAU. Эта мутантная тРНК идентична нормальной тирозиновой тРНК, за исключением одной замены основания в антикодоне: GUA—>CUA. Мутация G—>C первого основания антикодона меняет специфичность узнавания. Как предсказывает теория «качаний», измененный антикодон может узнавать только UAG.

Супрессорная тРНК этого типа будет закреплена отбором скорее всего в том случае, если мутировавшая тРНК не была необходимой. Иными словами, должна существовать другая разновидность тРНК, которая узнает те же кодоны, что и мутировавшая тРНК. Действительно, у *E.coli* имеются две различные тРНК, которые в норме узнают кодоны UAC и UAU. Изменяется та тРНК, которая присутствует в небольшом количестве. Функция этой минорной разновидности тирозиновой тРНК в норме неясна. В связи с существованием такой супрессорной мутации возникает еще один вопрос. Если мутантный кодон в UAG считывается как тирозин, а не как сигнал терминации, что происходит при нормальной терминации цепей? Как ни странно, большинство полипептидных цепей в клетках супрессорного мутанта терминируется нормально, возможно, по той причине, что сигнал тер-

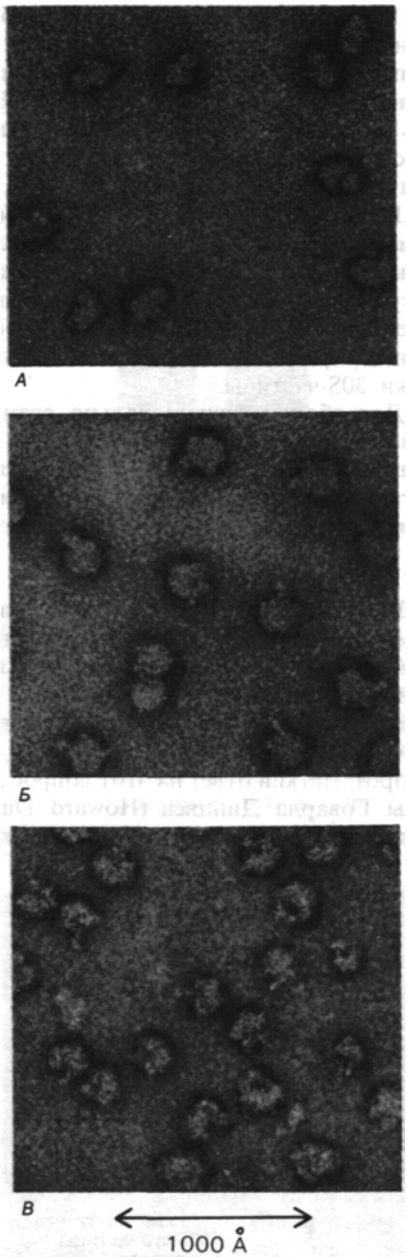


Рис. 27.10. Электронные микрофотографии 70S-рибосом (*А*), 50S-субчастиц (*Б*) и 30S-субчастиц (*В*). (Печатается с любезного разрешения д-ра James Lake.)

минации представляет собой нечто большее, чем просто кодон UAG. Действительно, известно, что некоторые кодирующие последовательности заканчиваются двумя различными стоп-кодонами. Кроме того, супрессия не обладает стопроцентной эффективностью.

Были обнаружены и другие виды мутантных тРНК. *Миссенс-супрессоры* изменяют считывание мРНК, так что в ответ на некоторые кодоны вставляется измененная аминокислота (например, глицин вместо аргинина). Особенно интересны *супрессоры сдвига рамки*. Одна из таких тРНК содержит лишнее основание в антикодоновой петле. Благодаря этому она считывает в качестве кодона *четыре* основания вместо трех. Например, UUUC считывается как кодон фенилаланина вместо UUU. Такая измененная тРНК может супрессировать вставку лишнего основания.

27.8. Рибосомы - органеллы, в которых происходит синтез белка,- состоят из большой и малой субчастиц

Перейдем теперь к механизму синтеза белка. Этот сложный процесс происходит в рибосомах, которые можно рассматривать как органеллы синтеза белка, подобно тому как митохондрии считают органеллами окислительного фосфорилирования. Рибосома - весьма специализированная и сложная структура. Ее диаметр - примерно 200 А. Лучше всего изучены рибосомы *E.coli*. Масса этой рибосомы составляет 2500 кДа, а коэффициент седиментации 70S. Ее можно диссоциировать на *большую (50S) и малую (30S) субчастицы*. Далее эти субчастицы можно диссоциировать на составляющие их белки и РНК. 30S-субчастица содержит 21 белок и одну молекулу 16S-РНК. 50S-субчастица содержит примерно 34 белка и 2 молекулы РНК (23S и 5S). Рибосома *E.coli* примерно на две трети состоит из РНК и на одну треть - из белка.

Рибосомы цитоплазмы эукариотических клеток несколько крупнее бактериальных рибосом. Интактная эукариотическая рибосома имеет коэффициент седиментации 80S. Подобно бактериальной рибосоме, она диссоциирует на большую (60S) и малую (40S) субчастицы. Малая субчастица содержит одну молекулу 18S-РНК, а большая субчастица - три молекулы РНК (28S, 7S[1)] и 5S). Рибосомы митохондрий и хлоропластов отличаются от цитоплазматических рибосом

[1] Эту рРНК по сложившейся традиции чаще обозначают 5,8S-РНК.- *Прим. перев.*

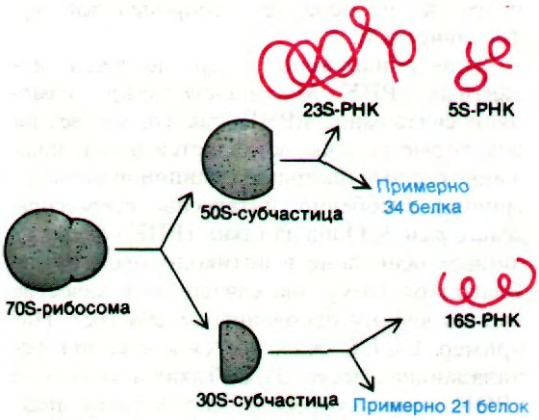


Рис. 27.11. Рибосомы можно диссоциировать примерно на 55 белков и три молекулы РНК.

эукариот. Они больше похожи на 70S-частицы, а не на 80S. Между синтезом белка в митохондриях, хлоропластах и бактериях имеется много общего.

27.9. Рибосомы можно реконструировать из составляющих их молекул белков и РНК

Рибосомную 30S-субчастицу можно реконструировать из смеси 16S-РНК и 21 белка, входящего в ее состав. Сборку этих компонентов с образованием функционально активной 30S-субчастицы впервые осуществил Масаясу Номура (Masayasu Nomura) в 1968 г. Через несколько лет была реконструирована 50S-субчастица. Эти эксперименты имели важное значение в двух отношениях. Во-первых, они продемонстрировали, что вся информация, необходимая для сборки этой органеллы, содержится в структуре ее компонентов. Для сборки не нужны никакие внерибосомные факторы. Таким образом, *образование рибосом in vitro представляет собой процесс самосборки.* Во-вторых, реконструкцию можно использовать для того, чтобы выяснить, необходим ли тот или иной компонент для сборки рибосомы или собственно для ее функционирования. Например, таким образом был выявлен компонент рибосомы, отвечающий за ее чувствительность к антибиотику стрептомицину (разд. 27.20). Из работ по реконструкции 30S-субчастицы были сделаны следующие выводы.

1. 16S-РНК необходима для ее сборки и функционирования. Эта потребность весьма специфична, так как 16S-РНК из дрожжей не может заменить 16S-РНК из *E.coli.* Роль молекул рибосомной РНК остается областью пристального интереса со стороны исследователей.

2. В опытах по реконструкции каждый раз из системы исключали один из белков, чтобы выяснить, может ли интактная 30S-субчастица образоваться из остальных 20 белков и 16S-РНК. Оказалось, что по крайней мере шесть белков необходимо для сборки 30S-частицы.

3. Для сборки функционально активной 30S-частицы необходимо большинство входящих в нее белков. Итак, *30S-субчастица представляет собой кооперативную целостную в функциональном отношении структуру.*

27.10 Белки синтезируются в направлении от аминоконца к карбоксильному концу

Одним из первых вопросов, касающихся механизма синтеза белка, был вопрос о том, синтезируются ли белки в направлении от аминоконца к карбоксильному концу или наоборот. Четкий ответ на этот вопрос дали опыты Говарда Динциса (Howard Dintzis) с импульсной меткой. Ретикулоциты, актив-

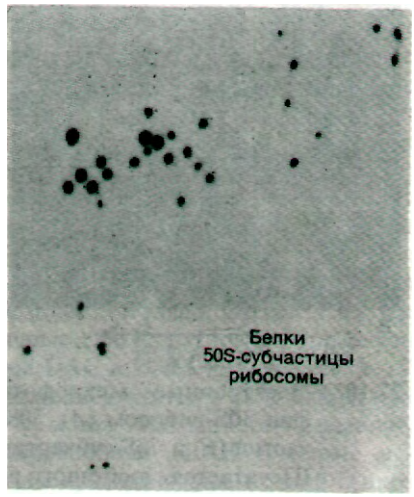


Рис. 27.12. Разделение белков рибосомной 50S-субчастицы с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле. (Печатается с любезного разрешения д-ра Charles Cantor.)

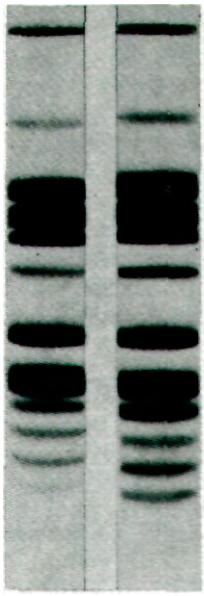


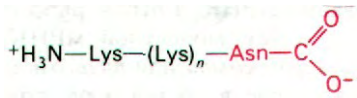
Рис. 27.13. Электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле белков нативной рибосомной 30S-субчастицы *(слева)* и реконструированной 30S-субчастицы (справа). В реконструированной субчастице присутствуют все те же белки, что и в нативной. (Печатается с любезного разрешения д-ра Masayasu Nomura.)

но синтезирующие гемоглобин, инкубировали в присутствии ^{3}H-лейцина в течение коротких промежутков времени, недостаточных для синтеза полных цепей. Синтезированный в этих условиях гемоглобин разделяли на α- и β-цепи и обрабатывали трипсином. Затем определяли удельную радиоактивность полученных пептидов, т.е. отношение их радиоактивности к общему содержанию лейцина. В пептидах, расположенных в нативном белке вблизи карбоксильного конца, было больше радиоактивности, чем в пептидах вблизи аминоконца. *Наблюдалось постепенное возрастание радиоактивности от аминоконца к карбоксильному концу* (рис. 27.14). Сильнее всего был помечен карбоксильный конец, так как он синтезировался последним. Следовательно, *направление роста цепей — от аминоконца к карбоксильному концу.*

27.11. Информационная РНК транслируется в направлении 5'—>3'

Направление считывания мРНК определяли с помощью синтетического полинуклеотида

использованного в качестве матрицы в бесклеточной системе синтеза белка. ААА кодирует лизин, а ААС-аспарагин. Полипептидный продукт имел структуру



Поскольку аспарагин был расположен на карбоксильном конце, кодон ААС был считан последним. Следовательно, *трансляция идет в направлении 5'—>3'*. Напомним, что мРНК также синтезируется в направлении 5'—>3'(разд. 25.14). Это означает, что мРНК может транслироваться уже в то время, когда она еще синтезируется. Действительно,

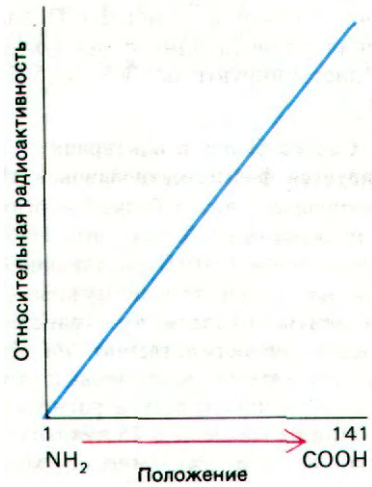


Рис. 27.14. Распределение ^{3}H-лейцина в α-цепи гемоглобина, синтезированного после инкубации ретикулоцитов в течение короткого времени в присутствии метки. Более высокая радиоактивность С-конца по сравнению с N-концом указывает, что С-конец синтезируется последним.

у *E.coli* 5'-конец мРНК взаимодействует с рибосомами вскоре после того, как он синтезируется (рис. 27.15). Таким образом, *трансляция тесно сопряжена с транскрипцией*.

27.12. Одну молекулу мРНК одновременно транслирует несколько рибосом

Одну молекулу мРНК могут одновременно транслировать несколько рибосом. Это существенно увеличивает эффективность использования мРНК. Группа рибосом, связанных с одной молекулой мРНК, называется *полирибосомой* или *полисомой*. Рибосомы, входящие в состав этой структуры, работают независимо, и каждая из них синтезирует полную полипептидную цепь. При максимальной плотности рибосом на мРНК одна рибосома приходится на 80 нуклеотидов. Полирибосомы, синтезирующие гемоглобин (цепь гемоглобина содержит 145 аминокислот, а мРНК - соответственно 500 нуклеотидов), обычно состоят из пяти рибосом. Рибосомы, расположенные ближе всего к 5'-концу мРНК, несут самые короткие полипептидные цепи, а те, что ближе к 3'-концу,- почти полные цепи. После освобождения полипептидного продукта рибосомы диссоциируют на 30S- и 50S-субчастицы.

27.13. Синтез белка в бактериях инициируется формилметиониновой тРНК

Как начинается синтез белка? *A priori* простейшая возможность состоит в том, что транслируется вся мРНК, и никакие особые сигналы начала синтеза не нужны. Однако эксперименты показали, что трансляция не начинается непосредственно на 5'-конце мРНК. На самом деле первый транслируемый кодон почти всегда расположен на расстоянии не менее чем 25 нуклеотидов от 5'-конца. К тому же многие молекулы мРНК у прокариот *полицистронны,* т.е. кодируют две или более полипептидные цепи. Например, одна молекула мРНК длиной около 7000 нуклеотидов кодирует пять ферментов пути биосинтеза триптофана у *E.coli.* Каждый из этих пяти ферментов имеет собственные сигналы начала и конца трансляции в мРНК. На деле *все изученные молекулы бактериальных мРНК содержат сигналы начала и конца каждой кодируемой ими полипептидной цепи.*

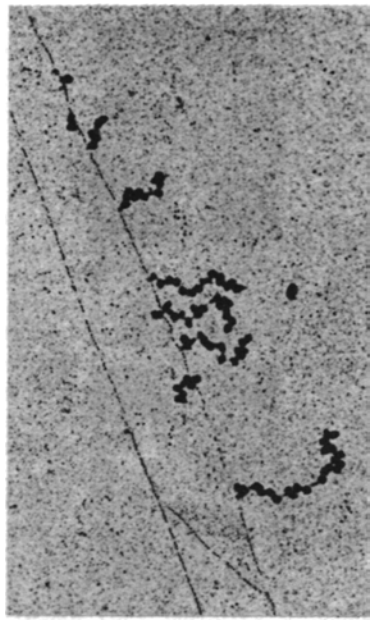


Рис. 27.15. Транскрипция участка ДНК *E.coli* и трансляция новообразующейся мРНК. Транскрибируется лишь часть хромосомы. [Miller O. L, Hamkalo B. A., Thomas C. A., Jr., Visualization of Bacterial Genes in Action, Science, 169, 392 (1970).]

Ключом к изучению механизма инициации цепи стало открытие того факта, что примерно половина N-концевых аминокислот белков *E.coli* - метионин, хотя в других положениях полипептидной цепи эта аминокислота встречается редко. Кроме того, N-конец новообразованных белков обычно модифицирован, из чего следует, что в инициации, очевидно, участвует какое-то производное метионина. Действительно, *синтез белка у бактерий начинается с формилметионина* (fMet). Существует особая тРНК, которая переносит формилметионин к рибосоме для инициации синтеза белка. Эта *инициаторная* тРНК (сокращенно обозначается $mPHK_f$) отличается от той тРНК, которая вводит метионин во внутренние положения (сокращенно $тРНК_m$). Буква f указывает, что метионин, присоединенный к инициаторной тРНК, может быть формилирован, тогда как метионин, присоединенный к $тРНК_m$,- нет.

Метионин присоединяет к этим двум раз-

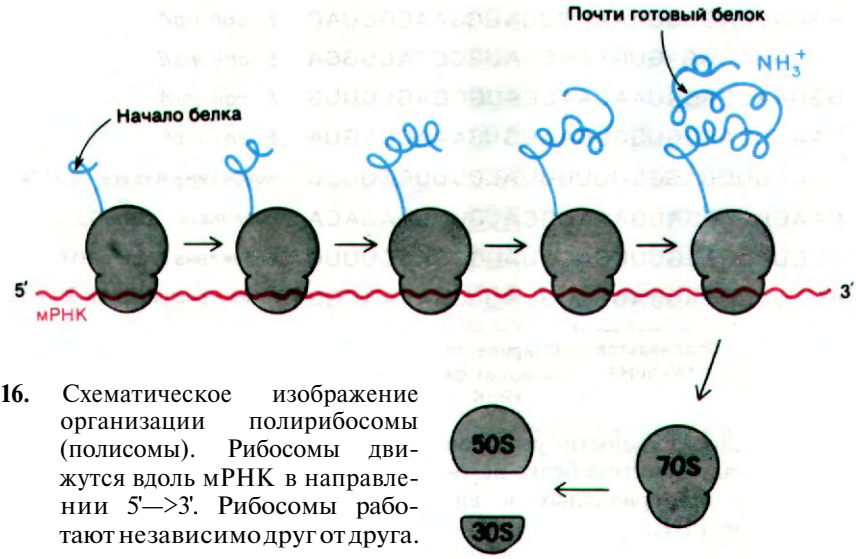


Рис. 27.16. Схематическое изображение организации полирибосомы (полисомы). Рибосомы движутся вдоль мРНК в направлении 5'—>3'. Рибосомы работают независимо друг от друга.

новидностям тРНК одна и та же аминоацил-тРНК—синтетаза. Затем специальный фермент формилирует аминогруппу метионина, присоединенного к $тРНК_f$. Донор активированной формильной группы в этой реакции N^{10}-формилтетрагидрофолят.

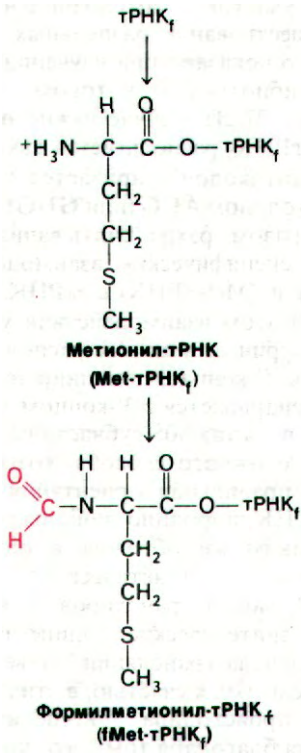


Рис. 27.17. Образование формилметионил-$тРНК_f$.

27.14. Сигналом инициации служит кодон AUG (или GUG), которому предшествует несколько оснований, способных спариваться с 16S-РНК

Какие структурные особенности мРНК позволяют системе синтеза белка различать кодоны AUG? Первым шагом на пути к решению этого вопроса было выделение инициаторных участков ряда мРНК. Для этого комплексы мРНК с рибосомами, образовавшиеся в условиях, допускающих инициацию, но не элонгацию, расщепляли панкреатической рибонуклеазой. Во всех случаях от расщепления была защищена последовательность длиной около 30 нуклеотидов. Как и предполагалось, каждый из этих инициирующих участков содержал кодон AUG или GUG (рис. 27.18).

Кроме того, каждый участок инициации содержит богатую пуринами последовательность, центр которой находится на расстоянии примерно 10 нуклеотидов в 5'-сторону от инициирующего кодона. Роль этого богатого пуринами участка стала ясна, когда была расшифрована последовательность 16S-РНК. 3'-конец этой рибосомной РНК содержит последовательность из нескольких оснований, комплементарную богатому пурином участку в областях инициации

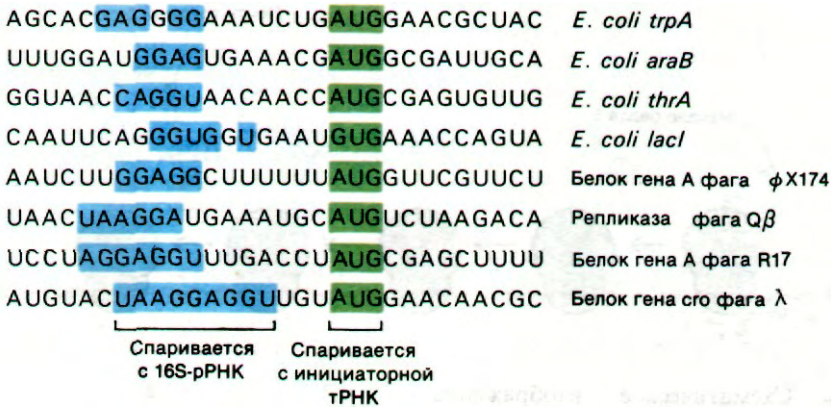


Рис. 27.18. Последовательности участков инициации синтеза белка некоторых бактериальных и вирусных РНК.

мРНК. Из продуктов ферментативного расщепления инициирующего комплекса удалось выделить комплекс 3'-концевого фрагмента 16S-мРНК и области инициации мРНК (рис. 27.19). Последовательности более чем 70 изученных участков инициации показывают, что число пар оснований, которые мРНК образует с 16S-РНК, колеблется от 3 до 9. Интересно, что изменение силы этого взаимодействия дает возможность регулировать эффективность инициации. *Итак, место начала синтеза белка определяется взаимодействиями двух типов: спариванием оснований мРНК с 3'-концом 16S-рРНКи с формилметиониновой инициаторной тРНК.*

27.15. В результате образования инициирующего 70S-комплекса формилметиониновая тРНК связывается с Р-участком

Синтез белка начинается с ассоциации мРНК, рибосомной 30S-субчастицы и формилметиониновой тРНК. Они образуют *30S-комплекс инициации* (рис. 27.20). Для образования этого комплекса необходимы GTP и три белковых фактора, называющихся IF-1, IF-2 и IF-3. Один из этих *факторов инициации* - IF-3 - участвует в связывании мРНК с 30S-субчастицей. Кроме того, IF-3 препятствует ассоциации 50S- и 30S-субчастиц с образованием непродуктивного 70S-комплекса без мРНК, а IF-1 и IF-2 способствуют связыванию инициаторной тРНК с комплексом мРНК и 30S-субчастицы.

Затем 50S-субчастица присоединяется к инициаторному 30S-комплексу, образуя *инициаторный 70S-комплекс*. На этом этапе происходит гидролиз связанного GTP. 70S-инициаторный комплекс (рис. 27.20) готов к стадии элонгации белкового синтеза. Молекула $fMet\text{-}тРНК_f$ занимает Р-участок (пептидильный участок) рибосомы. Второй участок на рибосоме для связывания молекулы тРНК-А-участок (аминоацильный) - еще пуст. Существование раздельных участков Р и А было показано при изучении пуромицина - антибиотика, о котором говорится ниже (разд. 27.21). Сейчас важно отметить, что $fMet\text{-}тРНК_f$ располагается таким образом, что антикодон спаривается с инициирующим кодоном AUG (или GUG) в мРНК. Таким образом, рамка считывания устанавливается специфическим взаимодействием рибосомы и $fMet\text{-}тРНК_f$ с мРНК. Напомним, что в этом взаимодействии участвует богатый пурином участок, расположенный со стороны 5'-конца от инициирующего кодона. Он спаривается с 3'-концом 16S-РНК, входящей в состав 30S-субчастицы. Выяснение этого сложного способа, которым достигается правильная ориентация инициаторной тРНК, породило любопытную проблему. Каким же образом в опытах по расшифровке генетического кода (разд. 26.3) могли транслироваться poly(U) и другие синтетические полипептиды без сигналов начала трансляции? Ответ заключается в том, что, к счастью, в этих экспериментах происходила неспецифическая трансляция благодаря тому, что концентрация Mg^{2+} в реакционной смеси была выше, чем это имеет место in vivo.

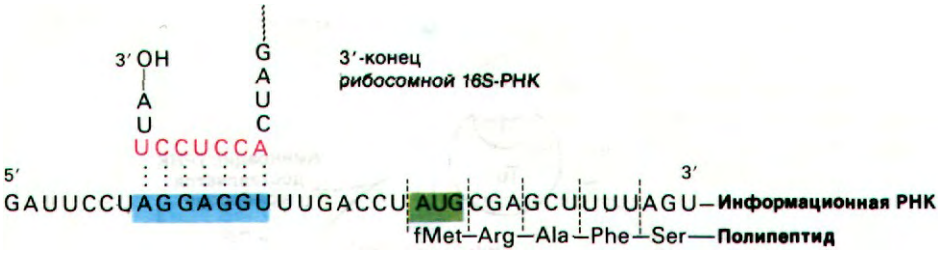


Рис. 27.19. Спаривание богатого пурином участка (показано синим цветом) в области инициации мРНК и 3'-концевого участка 16S-рРНК (красный цвет). Кодон AUG (зеленый цвет) определяет начало полипептидной цепи. Показанная на рисунке мРНК кодирует А-белок фага R17.

27.16. Фактор элонгации Tu доставляет аминоацил-тРНК в А-участок рибосомы

Цикл элонгации белкового синтеза включает три этапа: 1) *связывание аминоацил-тРНК (узнавание кодона);* 2) *образование пептидной связи;* 3) *транслокация.* Цикл начинается с введения аминоацил-тРНК в пустой А-участок рибосомы. Выбор определенной разновидности тРНК зависит от того, какой кодон мРНК находится в А-участке. Комплементарная аминоацил-тРНК доставляется в А-участок белком, который называется *фактором элонгации EF-Tu*. Когда аминоацил-тРНК занимает правильное положение на рибосоме, происходит гидролиз GTP, связанного с EF-Tu. GDP остается прочно связанным с EF-Tu до тех пор, пока он не вытесняется другим фактором элонгации, а именно *EF-Ts.* Образовавшийся комплекс Tu с Ts распадается при связывании GTP с Tu; новый комплекс Tu-GTP готов для следующего раунда элонгации. Эта ассоциация и диссоциация белков (рис. 27.21) ускоряется и приобретает характер повторяющегося цикла за счет энергии гидролиза GTP.

Важно отметить, что *EF-Tu не взаимодействует с $fMet\text{-}mPHK_f$.* Поэтому инициаторная тРНК не попадает в А-участок. В то же время Met-$тРНК_m$ связывается с EF-Tu, подобно всем другим аминоацил-тРНК. Этим и объясняется тот факт, что *внутренние кодоны AUG не считываются инициаторной мРНК.*

27.17. После образования пептидной связи происходит транслокация

Теперь у нас имеется комплекс, в котором аминоацил-тРНК занимает А-участок,

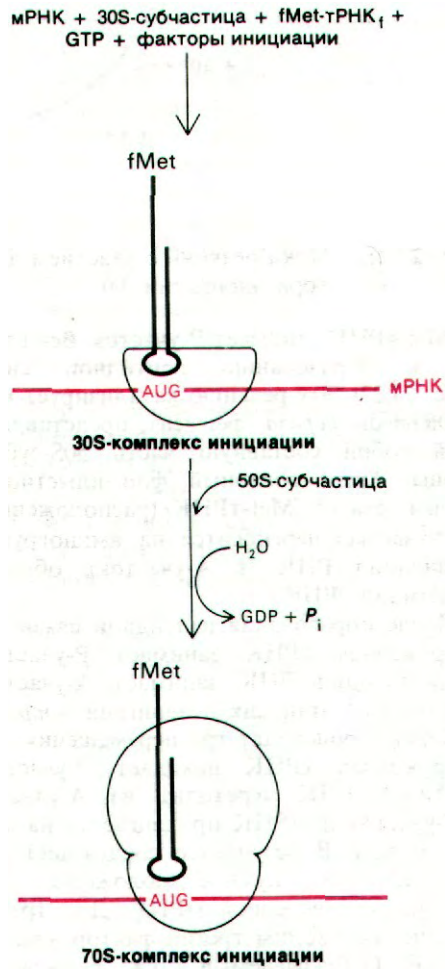


Рис. 27.20. Стадия инициации синтеза белка: образование 30S-комплекса инициации и затем 70S-комплекса инициации.

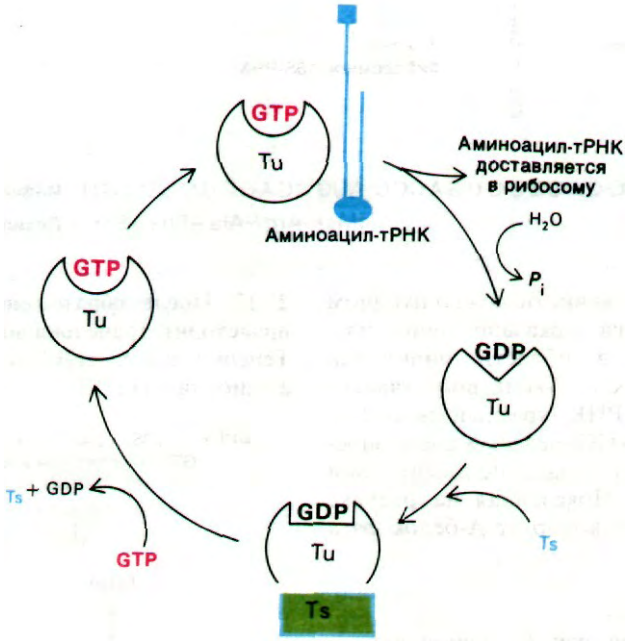


Рис. 27.21. Цикл реакций с участием фактора элонгации Tu.

а fMet-тРНК занимает Р-участок. Все готово к образованию пептидной связи (рис. 27.22). Эту реакцию катализирует *пептидилтрансфераза* - фермент, представляющий собой составную часть 50S-субчастицы. Активированный формилметиониновый остаток fMet-$TPHK_i$ (расположенной в Р-участке) переносится на аминогруппу аминоацил-тРНК (в А-участок), образуя дипетидил-тРНК.

После образования пептидной связи ненагруженная тРНК занимает Р-участок, а дипептидил-тРНК занимает А-участок. Следующий этап цикла элонгации - *транслокация.* Происходят три перемещения: ненагруженная тРНК покидает Р-участок, пептидил-тРНК переходит из А-участка в Р-участок и мРНК продвигается на три нуклеотида. В результате следующий кодон занимает нужное положение для считывания очередной мРНК. Для транслокации необходим третий фактор элонгации - EF-G (называемый также *транслоказой*). Во время транслокации происходит гидролиз GTP, связанного с EF-G. Гидролиз GTP обусловливает отделение EF-G от рибосомы. Следовательно, GTP может действовать каталитически. *Транслокация - еще один пример направленного движения, энергию для которого обеспечивает гидролиз нуклеозидтрифосфата.* После транслокации А-участок освобождается и подготавливается к связыванию аминоацил-тРНК, чтобы начать новый цикл элонгации (рис. 27.23).

27.18. Синтез белка терминируется факторами освобождения

Если А-участок рибосомы занят кодонами UAA, UGA или UAG, то связывания аминоацил-тРНК обычно не происходит. Нормальные клетки не содержат тРНК с антикодонами, комплементарными сигналам термииации. Их узнают белковые факторы освобождения. Один из этих факторов освобождения - RF-1 - узнает кодоны UAA или UAG. Второй фактор освобождения — RF-2 - узнает UAA или UGA. Таким образом, белки способны узнавать тринуклеотидные последовательности с высокой специфичностью.

Связывание одного из факторов освобождения с терминирующим кодоном в А-участке каким-то образом активирует пептидилтрансферазу, и она гидролизует связь между полипептидом и тРНК в Р-участке. Фактор освобождения изменяет специфичность пептидилтрансферазы таким образом, что акцептором активированного пептидильного остатка становится

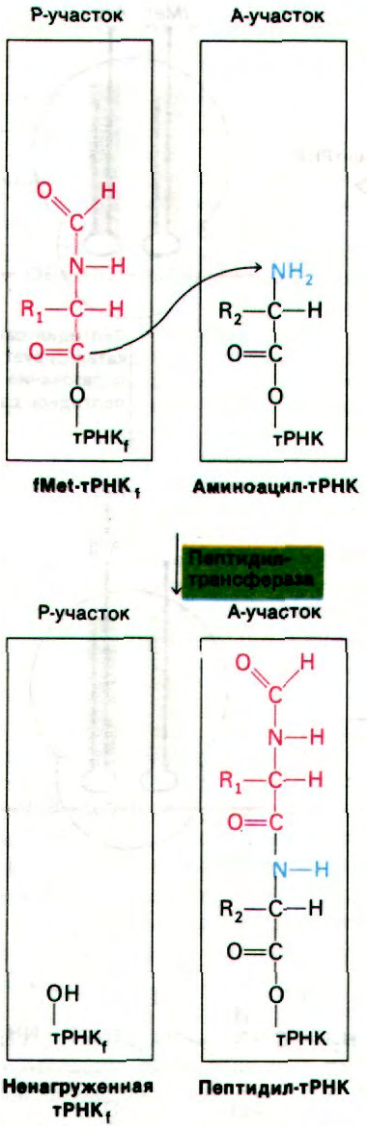


Рис. 27.22. Образование пептидной связи.

H_2O, а не аминогруппа. Затем полипептидная цепь покидает рибосому. 70S-рибосома диссоциирует на 30S- и 50S-субчастицы и приготавливается к синтезу новой белковой молекулы.

27.19. Многие белки модифицируются после трансляции

Многие полипептиды, образующиеся при трансляции мРНК,- еще не окончательные продукты. Они могут быть впоследствии модифицированы различными способами.

1. Формильная группа на N-конце бактериальных белков гидролизуется *деформилазой*. Под действием *аминопептидазы* может произойти отщепление одного или нескольких N-концевых остатков. И у прокариот, и у эукариот концевой метионин иногда отщепляется в то время, когда синтез остальной полипептидной цепи еще продолжается.

2. При окислении двух цистеиновых остатков могут образоваться *дисульфидные связи*.

3. Боковые цепи некоторых аминокислот могут быть специфически модифицированы. Например, некоторые остатки пролина и лизина в коллагене *гидроксилируются*. Гликопротеины образуются путем присоединения сахаров к боковым цепям аспарагина, серина и треонина. Некоторые белки *фосфорилируются*. К ферментам ковалентно присоединяются *простетические группы*, например липоевая кислота.

4. Полипептидные цепи могут подвергаться специфическому *расщеплению*, например при превращении проколлагена в коллаген и проинсулина в инсулин. Трансляция мРНК вируса полиомы дает очень длинную полипептидную цепь, которая гидролизуется с образованием нескольких белков.

27.20. Стрептомицин ингибирует инициацию и вызывает неправильное считывание информационной РНК

Мы уже видели, что антибиотики - чрезвычайно важный инструмент в биохимических исследованиях, так как действие многих антибиотиков весьма специфично. Например, рифампицин - мощный ингибитор инициации синтеза РНК (разд. 25.18). Известно много антибиотиков, ингибирующих синтез белка (табл. 27.3). В случае некоторых из них установлен и механизм действия. *Стрептомицин* - сильно основной трисахарид - препятствует связыванию формилметионил-тРНК с рибосомами и нарушает таким образом правильную инициацию белкового синтеза. Кроме того, стрептомицин вызывает неправильное считывание мРНК. Если в качестве матрицы используется poly(U), то наряду с включением фенилаланина (UUU) происходит включение изолейцина (AUU). Место действия стрептомицина в рибосоме было определено в результате опытов по реконструкции компонентов рибосом из чув-

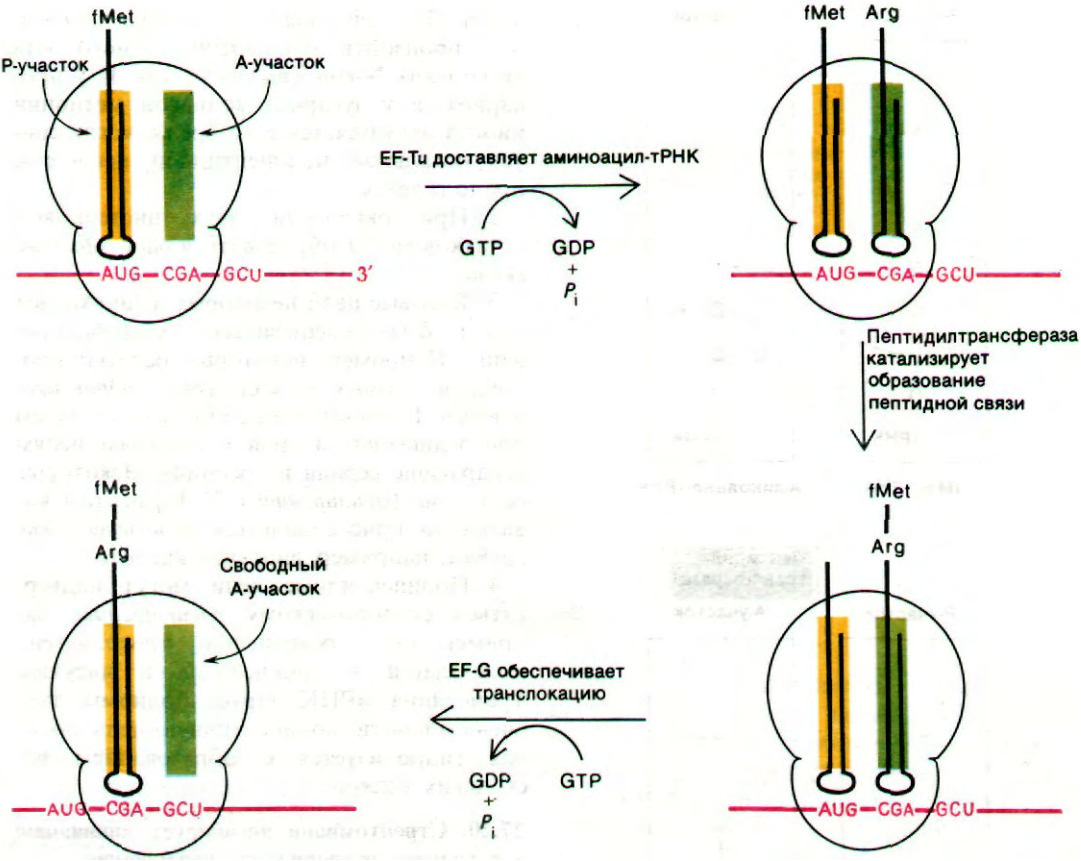


Рис. 27.23. Стадия элонгации синтеза белка: связывание аминоацил-тРНК, образование пептидной связи и транслокация.

ствительных и устойчивых к стрептомицину бактерий. Такие штаммы бактерий различаются мутацией в единственном гене. Чем же различаются эти рибосомы? Поскольку рибосомы можно диссоциировать и реконструировать in vitro, представлялась возможность выяснить, где расположен детерминант чувствительности к стрептомицину - в 50S- или 30S-субчастице. Гибридные рибосомы из 50S-субчастиц устойчивых бактерий и 30S-субчастиц чувствительных бактерий оказались чувствительными к стрептомицину, а рибосомы, полученные из субчастиц в обратной комбинации, устойчивы к нему. Этот эксперимент показал, что детерминант чувствительности к стрептомицину локализован в 30S-суб-

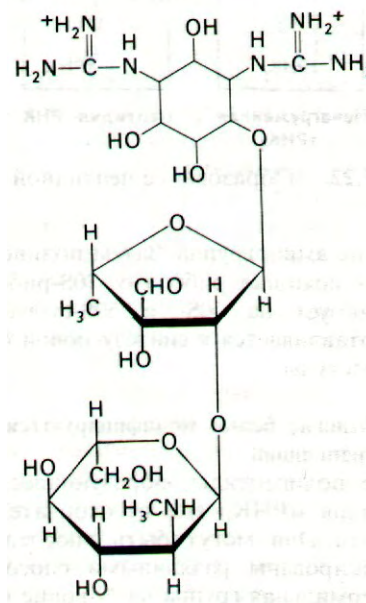


Таблица 27.3. **Антибиотики - ингибиторы синтеза белка**

Антибиотик	Действие
Стрептомицин	Ингибирует инициацию и вызывает неправильное считывание мРНК (у прокариот)
Тетрациклин	Связывается с 30S-субчастицей и ингибирует связывание аминоацил-тРНК (у прокариот)
Хлорамфеникол	Ингибирует пептидилтрансферазную активность 50S-субчастицы рибосом (у прокариот)
Циклогексимид	Ингибирует пептидилтрансферазную активность 60S-субчастины рибосом (у эукариот)
Эритромицин	Связывается с 50S-субчастицей и ингибирует транслокацию (у прокариот)
Пуромицин	Вызывает преждевременную терминацию цепи, действуя в качестве аналога аминоацил-тРНК (у прокариот и эукариот)

частице. Следующий эксперимент продемонстрировал, что чувствительность к стрептомицину определяется каким-то белком 30S-субчастицы, а не молекулой 16S-РНК. Наконец, после ряда сложных экспериментов оказалось, что чувствительность к стрептомицину детерминируется только одним белком, входящим в состав 30S-субчастицы S12.

27.21. Пуромицин вызывает преждевременную терминацию цепи, так как имитирует аминоацилированную транспортную РНК

Антибиотик пуромицин ингибирует синтез белка, поскольку он освобождает новообразованные полипептидные цепи еще до того, как завершается их синтез. Пуромицин-аналог концевого участка аминоацил-тРНК аминоациладенозина (рис. 27.24). Он связывается с А-участком рибосомы и препятствует связыванию аминоацил-тРНК. Кроме того, пуромицин содержит α-аминогруппу. Эта аминогруппа, подобно аминогруппе аминоацил-тРНК, образует пептидную связь с карбоксильной группой растущей пептидной цепи в результате реакции, катализируемой пептидилтрансферазой. Образующийся продукт представляет собой пептид с ковалентно присоединенным остатком пуромицина на карбоксильном конце. Затем пептидилпуромицин сходит

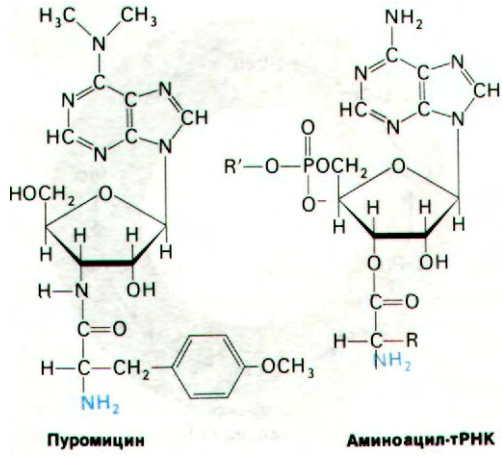


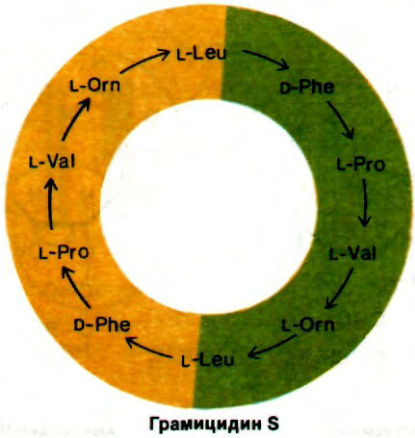
Рис. 27.24. Структура пуромицина напоминает аминоацилированный конец аминоацил-тРНК.

с рибосомы. Пуромицин был использован для изучения функционального состояния рибосом. Концепция существования А- и Р-участков возникла в результате опытов с использованием пуромицина для выяснения локализации пептидил-тРНК. Когда пептидил-тРНК находится в А-участке (до транслокации), она не может вступать в реакцию с пуромицином.

27.22. Некоторые короткие пептиды синтезируются без участия рибосом

Теперь мы перейдем к другому механизму образования пептидной связи в биологических системах. Рассмотрим в качестве примера биосинтез грамицидина S - циклического пептидного антибиотика, состоящего из двух идентичных пентапептидов, соединенных «голова к хвосту» (рис. 27.25). Этот антибиотик продуцируют некоторые штаммы спорообразующей бактерии *Bacillus brevis.*

Биосинтез грамицидина S происходит в отсутствие рибосом или мРНК. Для него необходим гораздо более простой синтетический аппарат, состоящий всего лишь из двух ферментов - E_I и E_{II}. Фермент E_{II} (масса 100 кДа) активирует фенилаланин, остальные четыре аминокислоты пентапептидного фрагмента активируются E_I (масса 180 кДа). Кроме того, оба фермента уча-

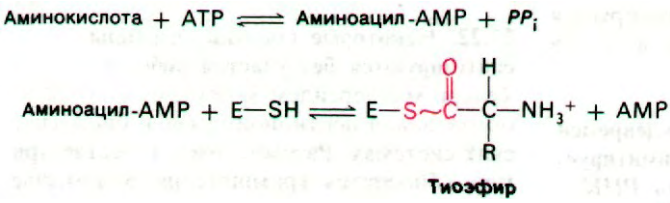


Грамицидин S

Рис. 27.25. Последовательность аминокислот в грамицидине S, циклическом пептиде, состоящем из двух одинаковых пентапептидных групп.

ствуют в образовании пептидной связи.

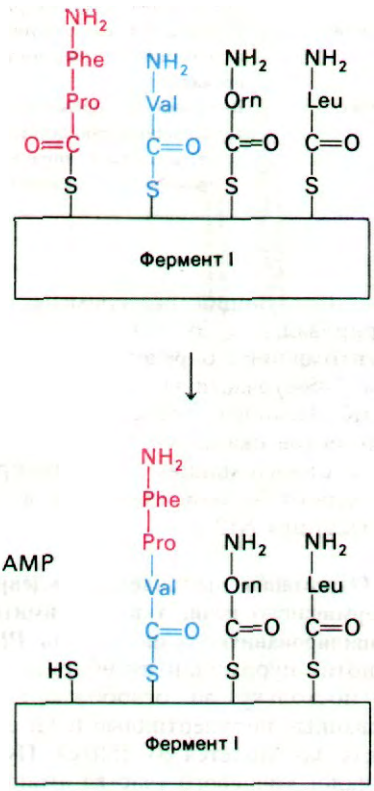
В этой системе аминокислоты активируются путем образования *тиоэфиров,* связанных с ферментами. Вместо 3'-концевой гидроксильной группы тРНК активированные аминокислоты присоединяются к сульфгидрильной группе E_I и E_{II}:

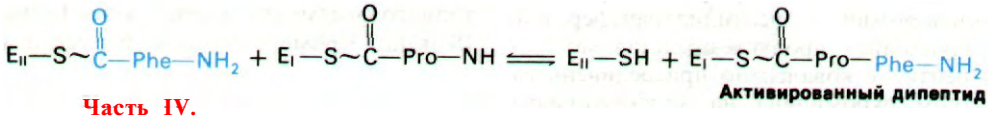


Тиоэфир

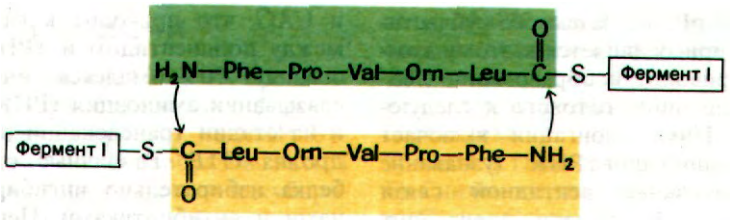
Если инкубировать L-пролин, L-валин, L-орнитин и L-лейцин с E_I в присутствии ATP, они образуют тиоэфирные связи с определенными сульфгидрильными группами E_I. Точно так же D-фенилаланин в присутствии ATP образует тиоэфирную связь с E_{II}.

Синтез пептида в этой системе инициируется взаимодействием E_I и E_{II}. Остаток D-фенилаланина, присоединенный к E_{II}, переносится на иминогруппу L-пролинового остатка, присоединенного к E_I, с образованием дипептида. В последующих реакциях участвует только E_I. Активированная карбонильная группа остатка пролина в составе дипептида реагирует с аминогруппой валинового остатка, прикрепленного к тому же ферменту, и дает трипептид. Этот процесс повторяется с участием орнитина и затем лейцина, образуя в результате пентапептид, связанный с ферментом. С возникновением каждой новой пептидной связи растущий пептид переносится на новую сульфгидрильную группу. Наконец, активированные пентапептиды, присоединенные к двум различным молекулам E_I, реагируют друг с другом с образованием циклического грамицидина S.





Активированный дипептид



Следует отметить две особенности этого биосинтетического пути.

1. Аминокислотная последовательность грамицидина S определяется пространственной организацией и специфичностью ферментов E_I и E_{II}. На каждую пептидную связь приходится по меньшей мере одна субъединица белка. Выходит, что *этот способ синтеза уступает по экономичности рибосомному механизму. Поэтому пептиды, содержащие более чем примерно 15 остатков, не синтезируются с помощью этого механизма.*

2. *Синтез грамицидина* S *напоминает синтез жирных кислот* в том отношении, что активированными промежуточными продуктами в обоих процессах служат тиоэфиры. Кроме того, E_I содержит ковалентно связанный остаток фосфопантетеина. Возможно, этот тиол переносит растущую пептидную цепь с одного участка E_I на следующий. Фриц Липман (Fritz Lipmann) предположил, что *синтез полипептидных антибиотиков, возможно, представляет собой как бы атавизм, напоминающий о примитивном механизме синтеза белка, который использовался на заре эволюции.* Синтез рибосомных белков мог возникнуть в результате эволюции синтеза жирных кислот.

Заключение

Синтез белка (трансляция) зависит от координированного взаимодействия более чем 100 макромолекул, к которым, помимо рибосом, относятся мРНК, тРНК, активирующие ферменты и белковые факторы. Синтез белка начинается с активации аминокислот аминоацил-тРНК-синтетазами (активирующими ферментами) за счет энергии ATP. Синтетазы соединяют карбоксильную группу аминокислоты с 2'- или 3'-гидроксильной группой остатка аденозина на 3'-конце тРНК. Для каждой аминокислоты имеется по меньшей мере один активирующий фермент. Кроме того, для каждой аминокислоты имеется хотя бы одна специфическая тРНК. Все транспортные РНК, обладающие различной специфичностью, характеризуются общим планом строения. Это - одиночные цепи РНК длиной примерно 80 нуклеотидов, содержащие некоторые модифицированные (например. метилированные) производные обычных оснований. Последовательности оснований всех известных тРНК могут быть написаны в виде клеверного листа, в котором примерно половина нуклеотидов спарена. Кристаллографические исследования с помощью рентгеновских лучей показали, что молекула тРНК имеет L-образную форму. На одном конце L-образной структуры находится 3'-концевая CCA-последовательность, являющаяся местом присоединения аминокислоты, на другом конце, на расстоянии около 80А,- антикодон. Информационная РНК узнает антикодон тРНК, а не присоединенную к тРНК аминокислоту. Кодон мРНК образует пары оснований с антикодоном тРНК. Некоторые тРНК узнают более одного кодона благодаря тому, что спаривание третьего основания кодона менее избирательно, чем спаривание двух других (гипотеза «качаний», неоднозначного соответствия; wobble-hypothesis). Синтез белка происходит на рибосомах, образованных из больших и малых субъединиц. В каждом из них примерно две трети массы приходится на долю РНК и одна треть-на белок. 70S-рибосома *E.coli (*масса 2500 кДа) состоит из 30S- и 50S-субчастиц.

Синтез белка происходит в три этапа, называемых соответственно инициацией, элонгацией и терминацией. Информационная РНК, формилметионил-$тРНК_f$ и 30S-субчастица рибосомы соединяются, образуя 30S-комплекс инициации. Сигналом начала трансляции служит кодон AUG (или GUG), которому предшествует богатая пурином последовательность, способная спа-

риваться с 16S-рРНК. Затем 50S-субчастица рибосомы присоединяется к этому комплексу, что приводит к образованию 70S-комплекса инициации, готового к следующему этапу. Цикл элонгации включает связывание аминоацил-тРНК (узнавание кодона), образование пептидной связи и транслокацию. Рост цепи происходит в направлении от N-конца к С-концу. Терминацию синтеза белка осуществляют факторы освобождения, которые узнают терминирующие кодоны UAA, UGA и UAG, что приводит к гидролизу связи между полипептидом и тРНК. При образовании 70S-комплекса инициации, при связывании аминоацил-тРНК с рибосомой и на стадии транслокации происходит гидролиз GTP. Различные стадии синтеза белка избирательно ингибируются токсинами и антибиотиками. Пептидные антибиотики и другие короткие полипептиды синтезируются без рибосом, причем механизм их образования напоминает синтез жирных кислот.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Miller O.L., Jr., 1973. The visualization of genes in action, Sci. Amer., **228(3),** 34-42.

Rich A., Kim S.H., 1978. The three-dimensional structure of transfer RNA, Sci. Amer., 238(1), 52-62.

Clark B.F.C., Marcher K.A., 1968. How proteins start, Sci. Amer., **218(1),** 36-42.

Книги, посвященные синтезу белка

Weissbach H., Pestka S. (eds.), 1977. Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis, Academic Press. (Содержит статьи о синтетазах, структуре и функции рибосом, инициации, элонгации, транслокации, терминации и антибиотиках-ингибиторах белкового синтеза.)

Cold Spring Harbor Laboratory, 1969. Mechanisms of Protein Biosynthesis (Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, vol. 34).

Рибосомы

Nomura M., Tissieres A., Lengyel P. (*eds.*) 1975. Ribosomes, Cold Spring Harbor Laboratory. (Содержит великолепные статьи о структуре, функции и сборке рибосом.)

Brimacombe K., Staffer G., Wittmann H.G., 1978. Ribosome structure, Ann. Rev. Biochem., 47, 217-249.

Wittman H.G., 1977. Structure and function of *Escherichia coli* ribosomes, Fed. Proc., **36,** 2025-2080.

Nomura M., 1973. Assembly of bacterial ribosomes, Science, 179, 864-873.

Транспортная РНК

Schimmel P., Soil D., Abelson J. (eds.) 1979. Transfer RNA. Cold Spring Harbor Laboratory. (В части I рассмотрены структура, свойства и узнавание, а в части II - биосинтез и генетика тРНК. Авторитетный и содержательный труд.)

Kim S.-H., 1978. Three-dimensional structure of transfer RNA and its functional implications, Advan. Enzymol, **46,** 279-315.

Jack A., Ladner J.E., Klug A., 1976. Crystallographic refinement of yeast phenylalanine transfer RNA ot 2,5 A resolution, J. Mol. Biol., 108, 619-649.

Sussman J.L., Kim S.-H., 1976. Three-dimensional structure of a transfer RNA in two crystal forms, Science, 192, 853-858.

Амноацил-тРНК синтетазы

Schimmel P.R., Soil D., 1979. Amino acyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs, Ann. Rev. Biochem., 48, 601-648.

Инициация, элонгация и терминация

Dintzis H.M., 1961. Assembly of the peptide chains of hemoglobin, Proc. Nat. Acad. Sci., 47, 247-261. (Важные эксперименты по импульсной метке, показавшие, что белки синтезируются в направлении от аминоконца к карбоксильному концу.)

Steitz J.A., 1979. Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA. In: Goldberger R.F. (ed.), Biological Regulation and Development, vol. I, pp. 349-399, Plenum.

Shine J., Dalgarno L., 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites, Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 1342-1346.

Steitz J.A., Jakes K., 1975. How ribosomes select initiator regions in mRNA: base pair formation between the 3'-terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in *Escherichia coli,* Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 4734-4738.

Gupta S.L, Waterson J., Sopori M., Weissman S.M., Lengyel P., 1971., Movement of the ribosome along the messenger ribonucleic acid during protein synthesis, Biochemistry, 10, 4410-4421.

Kaziro Y., 1978. The role of GTP in polypeptide chain elongation, Biochim. Biophys. Acta, **505,** 95-127.

Надежность трансляции

Fersht A., Dingwall C., 1979. Evidence for the double-sieve editing mechanism in protein biosynthesis, Biochemistry, **18,** 2627-2631.

Антибиотики и токсины

Pestka S., 1971. Inhibitors of ribosome function, Ann. Rev. Microbiol., 25, 487-562.

Jimenez A., 1976. Inhibitors of translation, Trends Biochem. Sci., 1, 28-29.

Tai P.-C., Wallace B.J., Davis B.D., 1978. Streptomycin causes misreading of natural messenger by interacting with ribosomes after initiation, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 275-279.

Нерибосомный синтез пептидов

Lipmann F., 1971. Attempts to map a process evolution of peptide biosynthesis, Science, 17 , 875-884.

Perlman D., Bondanszky M., 1971. Biosynthesis of peptide antibiotics, Ann. Rev. Biochem., 40, 449-464.

Lipmann F., 1973. Nonribosomal polypeptide synthesis on polyenzyme templates, Ace. Chem. Res., 6, 361-367.

Вопросы и задачи

1. Образование Ile-тРНК происходит через связанный с ферментом промежуточный продукт Ile-AMP. Будет ли, по вашему мнению, образовываться ^{32}P-меченный ATP из $^{32}PP_i$, если инкубировать каждый из следующих наборов компонентов в присутствии специфического активирующего фермента?

а) ATP и $^{32}PP_i$.

б) тРНК, ATP и $^{32}PP_i$.

в) Изолейцин, ATP и $^{32}PP_i$.

2. Из бактерий, выращенных на «тяжелой» (содержащей ^{13}C и ^{15}N) и на «легкой» (^{12}C и ^{14}N) среде, получили рибосомы. Эти 70S-рибосомы добавили в систему с активным синтезом белка *in vitro*. Через несколько часов из смеси отобрали пробу и проанализировали ее центрифугированием в градиенте плотности. Сколько полос 70S-рибосом вы ожидаете увидеть в градиенте плотности?

3. Сколько богатых энергией фосфатных связей затрачивается на синтез белка из 200 остатков, если исходить из готовых аминокислот?

4. Существует два основных механизма элонгации биологических молекул (рис. 27.26). 1-й механизм основан на отщеплении активирующей группы (помеченной на рисунке крестиком) от растущей цепи. При синтезе по 2-му механизму активирующая группа отщепляется от присоединяющегося к растущей цепи мономера. Укажите, по какому из механизмов, 1-му или 2-му, протекают следующие реакции биосинтеза.

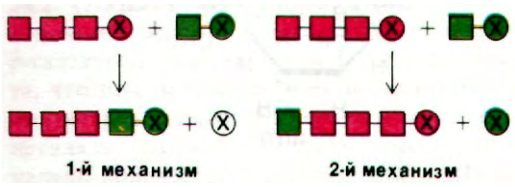


Рис. 27.26. Два механизма элонгации.

а) Синтез гликогена.

б) Синтез жирных кислот.

в) $C_5 \rightarrow C_{10} \rightarrow C_{15}$ при синтезе холестерола.

г) Синтез ДНК.

д) Синтез РНК.

е) Синтез белка.

5. Мутации, в результате которых возникают терминирующие кодоны, называются нонсенс-мутациями. Эти мутации могут быть супрессированы измененными тРНК. Например, мутантная РНК считывает кодон UGA как триптофановый кодон. Какое наиболее вероятное замещение основания произошло в этой мутантной тРНК?

6. Придумайте реактив для ковалентного мечения по сродству участков связывания тРНК в рибосоме. Как бы вы синтезировали такой реактив?

7. мРНК-транскрипт одного гена фага T7 содержит следующую последовательность оснований:

↓
5′-AACUGCACGAGGUAACACAAGAUGGCU-3′

Предскажите, к какому результату приведет мутация отмеченного стрелкой G при его замене на A.

8. Что общего между коррекцией ошибок при синтезе белка и ДНК?

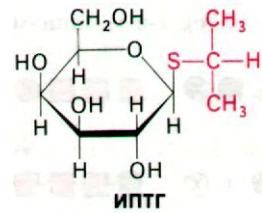
Дополнительные вопросы см.: Wood W. B., Wilson J.H., Benbow R.M., Hood L. E., Biochemistry: A Problems Approach, Benjamin, 1974, ch. 18.

ГЛАВА 28
Регуляция выражения гена в фенотипе

Мы уже видели, что активность многих белков регулируется с помощью различных механизмов, например протеолитической активации, аллостерических взаимодействий и ковалентной модификации. В этой главе рассматривается *регуляция скорости синтеза белка,* которая также играет принципиально важную роль в обшей картине метаболизма клетки. У бактерий активность гена регулируется в основном на уровне *транскрипции,* а не трансляции. Мы сосредоточим внимание на лактозном и триптофановом оперонах *E. coli* и на регуляторных аспектах цикла развития бактериофага λ, так как молекулярные механизмы регуляции в этих системах хорошо изучены. Более того, именно интенсивное исследование этих систем позволило сформулировать некоторые общие принципы регуляции выражения гена в фенотипе (экспрессии гена) у прокариот и вирусов. Экспрессия гена у эукариот регулируется иначе, как это станет очевидно из следующей главы.

28.1. β-Галактозидаза - индуцибельный фермент

E. coli может использовать лактозу в качестве единственного источника углерода. Главный фермент в метаболизме этого сахара - β-*галактозидаза,* гидролизующая лактозу на галактозу и глюкозу (рис. 28.1). При выращивании на лактозе клетка *E. coli* содержит несколько тысяч молекул β-галактозидазы. Если же выращивать *E. coli* на других источниках углерода, например на глюкозе или глицероле, то число молекул β-галактозидазы на клетку не достигает десяти. Лактоза индуцирует значительное увеличение количества β-галактозидазы в клетке *E. coli,* причем она вызывает синтез новых молекул фермента, а не активирует профермент (рис. 28.2). Следовательно, β-галактозидаза - индуцибельный фермент. Одновременно и согласованно с β-галактозидазой синтезируются еще два белка - *галактозид-пермеаза* и *тиогалактозид-трансацетилаза.* Пермеаза необходима для переноса лактозы через бактериальную клеточную мембрану, трансацетилаза же не имеет существенного значения для метаболизма лактозы. Физиологическая роль трансацетилазы пока не установлена, *in vitro* она катализирует перенос ацетильной группы ацетил-CoA на гидроксильную группу при C-6 тиогалактозида.



Физиологическим индуктором β-галактозидазы является *аллолактоза,* которая образуется из лактозы в результате реакции трансгликозилирования. Синтез аллолактозы катализируется теми несколькими молекулами β-галактозидазы, которые имеются в клетке еще до индукции. Изучение природы индукторов показало, что некоторые β-галактозиды служат индукторами,

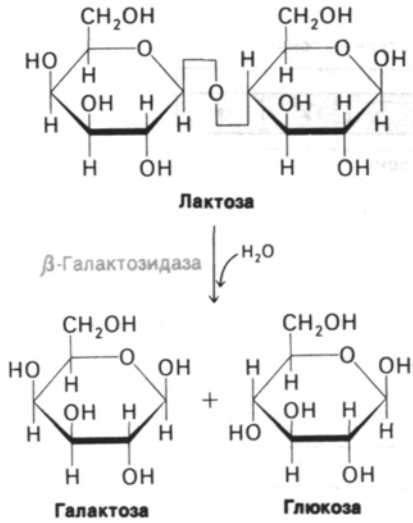


Рис. 28.1. β-Галактозидаза гидролизует лактозу.

не являясь при этом субстратами β-галактозидазы, тогда как другие соединения ведут себя как субстраты, не будучи при этом индукторами. Например, *изопропилтиогалактозид* (ИПТГ) неметаболизируемый индуктор (его также называют холостым индуктором).

28.2. Открытие регуляторного гена

Ключом к изучению механизма индукции β-галактозидазы стало открытие того факта, что под действием всех исследованных индукторов количество пермеазы и трансацетилазы возрастало прямо пропорционально количеству β-галактозидазы. Дальнейший прогресс был достигнут при изучении мутантов. Оно показало, что β-галактозидаза, пермеаза и трансацетилаза кодируются тремя генами - *z, y* и *a* соответственно - которые расположены друг за другом. Были получены мутанты, утратившие способность к синтезу одного из этих белков. Например, генотип $z^{--}y^{+}a^{+}$ обозначает, что у данного мутанта нет β-галактозидазы, но имеются в нормальном количестве пермеаза и трансацетилаза. Наибольший интерес представляет класс мутантов, у которого мутацией затронуты все три белка. Такие *конститутивные мутанты* синтезируют без всякого индуктора большие количества β-галактозидазы, пермеазы и трансацетилазы. Франсуа Жакоб и Жак Моно (Francois Jacob, Jacques Monod) пришли к выводу, что *скорость синтеза этих трех белков зависит от какого-то общего элемента, отличного от генов, кодирующих их последовательности.* Ген этого общего регуляторного элемента был обозначен *i.* Индуцибельные бактерии дикого типа имеют генотип $i^{+}z^{+}y^{+}a^{+}$, а конститутивные мутанты по лактозным генам - генотип $i^{--}z^{+}y^{+}a^{+}$.

Каким образом осуществляется влияние гена *i* на скорость синтеза белков, кодируемых генами *z*, *y* и *a*? Проще всего было предположить, что ген *i* кодирует синтез некоего компонента цитоплазмы, названного *репрессором,* которого либо совсем нет в i^{--}-клетках, либо он там неактивен. Эта идея была проверена в ряде изящных генетических экспериментов с частично диплоидными бактериями, имевшими два набора генов лактозной области. Один набор содержался в бактериальной хромосоме, а второй - в половом факторе F', введенном в клетку при конъюгации. Например, был получен диплоид $i^{+}z^{--}/Fi^{--}z^{+}$. У этого диплоида гены $i^{+}z^{--}$ находятся в хромосоме, а гены $i^{--}z^{+}$ - в эписоме. Является ли этот диплоид индуцибельным или конститутивным в отношении β-галактозидазы? Другими словами, может ли ген i^{+} бактериальной хромосомы подавлять экспрессию гена z^{+}, расположенного в эписоме? Эксперимент дал совершенно

Рис. 28.2. Увеличение количества β-галактозидазы идет параллельно увеличению числа клеток в растущей культуре *E.coli.* Наклон этого графика указывает, что β-галактозидаза составляет 6,6% всего синтезируемого белка.

Рис. 28.3. Карта лактозного оперона и его регуляторного гена. В карте масштаб не соблюден: участки *p* и *o* в действительности гораздо меньше, чем кодирующие участки генов.

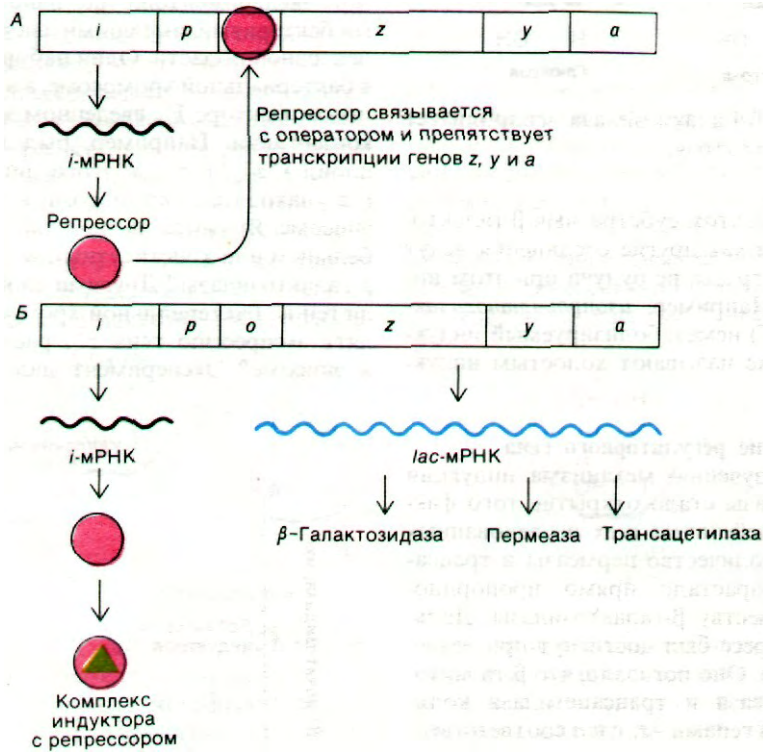


Рис. 28.4. Схема лактозного оперона в репрессированном (*А*) и индуцированном (*Б*) состояниях.

четкий результат: *диплоид индуцибелен, а не конститутивен.* Такой же результат был получен и в отношении диплоида $i^{--}z^{+}/Fi^{+}z^{--}$. *Следовательно, ген i кодирует способный к диффузии репрессор.*

28.3. Оперон - единица координированной генетической экспрессии

На основе только что описанных экспериментов Жакоб и Моно постулировали *модель оперона,* объясняющую регуляцию белкового синтеза. Генетические элементы этой модели - *регуляторный ген, операторный ген* и набор *структурных генов* (рис. 28.3). Регуляторный ген продуцирует *репрессор,* который может взаимодействовать с операторным геном. В дальнейшем выяснилось, что репрессор представляет собой белок. Операторный ген расположен рядом по соседству со структурными генами, которые

он контролирует. Связывание репрессора с операторным геном препятствует транскрипции структурных генов. Операторный ген в совокупности со структурными генами, рядом с которыми он расположен, называется *опероном*. В случае лактозного оперона ген *i* - регуляторный ген, ген *o* - ген-оператор, а гены *z*, *y* и *a* - структурные гены. Кроме того, существует еще *промоторный участок* (обозначаемый символом *p*) для связывания РНК-полимеразы. Этот участок инициирования транскрипции расположен перед операторным геном. *Индуктор,* например изопропилтиогалактозид (ИПТГ), связывается с репрессором и тем самым нарушает его взаимодействие с операторным геном. Теперь гены *z*, *y* и *a* могут транскрибироваться. При этом образуется одна длинная молекула РНК, кодирующая все три белка (рис. 28.4). Молекулу мРНК, кодирующую более одного белка, называют *полицистронным (или полигенным) транскриптом*.

28.4. *lac*-Репрессор - тетрамерный белок

При выделении репрессора лактозного оперона (*lac*-репрессор) была использована его способность связываться с ИПТГ. Уолтер Гилберт и Бенно Мюллер-Хилл (Walter Gilbert, Benno Muller-Hill) установили, что *lac*-репрессор - белок, который связывается с ДНК, содержащей *lac*-оперон, но не связывается ни с одной другой ДНК. Как и предполагалось, ИПТГ подавляет связывание *lac*-репрессора с *lac*-операторной ДНК. Клетка *E. coli* дикого типа содержит всего около десяти молекул *lac*-репрессора. При очистке репрессора возникли трудности, связанные с тем, что он составляет всего 0,001% общего содержания белка. Однако существуют i^{sq}-мутанты, имеющие, по-видимому, более эффективный промотор гена *i*. У этих мутантов образуется гораздо больше *lac*-репрессора. Количество *lac*-репрессора увеличивается еще сильнее, если использовать трансдуцирующие фаги, несущие область *lac*. Зараженные таким фагом клетки *E. coli* содержат около 20 000 молекул репрессора (примерно 2% всего белка). Это прекрасный исходный материал для выделения *lac*-репрессора.

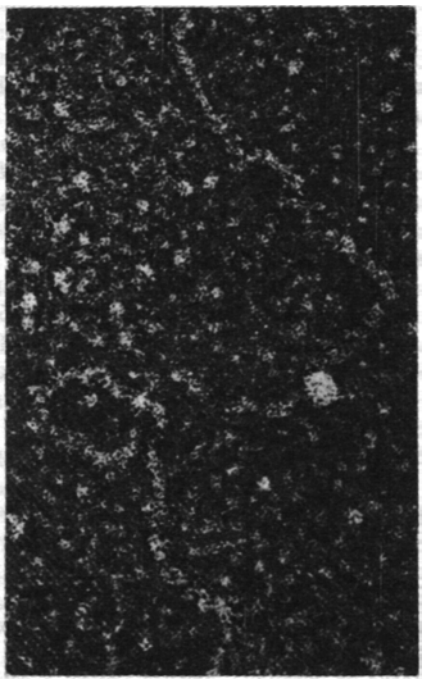


Рис. 28.5. Электронная микрофотография *lac*-репрессора, связанного с ДНК, содержащей *lac*-оператор. (Печатается с любезного разрешения д-ра Jack Griffith.)

Репрессор - тетрамер из идентичных субъединиц с массой 37 кДа, каждая из которых имеет один участок связывания с индуктором. Константа диссоциации ИПТГ составляет примерно 10^{-6} М. Репрессор очень прочно и быстро связывается с оператором. Константа диссоциации комплекса репрессор-оператор составляет примерно 10^{-13} М. Такое высокое сродство обусловлено тем, что в клетке *E. coli* дикого типа содержится всего несколько молекул репрессора. Константа скорости ассоциации поразительно высока - $7 \cdot 10^{9}$ $м^{-1} \cdot с^{-1}$. Из этого следует, что репрессор находит операторный участок, диффундируя вдоль молекулы ДНК (одномерный поиск), а не ищет его, находясь в водной среде (трехмерный поиск)[1].

28.5. Последовательность оснований в *lac*-операторе симметрична

Наличие чистого *lac*-репрессора сделало возможным выделение *lac*-оператора

[1] Недавно проведенные исследования показали, что ситуация намного сложнее: поиск оператора репрессором включает оба указанных механизма и в очень большой степени зависит от ионного состава среды.- *Прим. перев.*

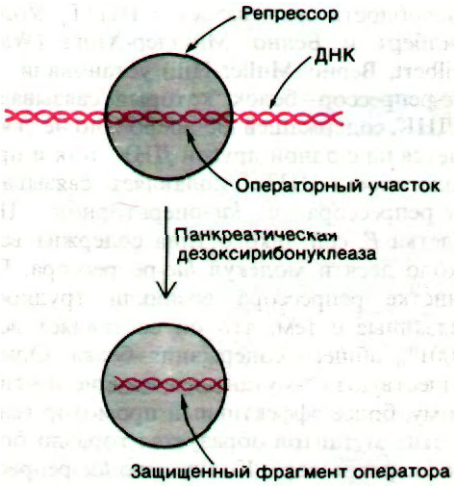


Рис. 28.6. *lac*-Репрессор защищает *lac*-оператор от расщепления панкреатической дезоксирибонуклеазой.

и определение его последовательности оснований. Гилберт и его сотрудники, воздействовав ультразвуком на ДНК фага, содержащего *lac*-область, получили фрагменты длиной примерно 1000 пар оснований. К смеси фрагментов добавили *lac*-репрессор и затем профильтровали раствор через нитроцеллюлозную мембрану. Фрагменты ДНК, не связанные с *lac*-репрессором, прошли через фильтр, а комплексы ДНК-репрессор прочно связались с ним. Связанную ДНК сняли с фильтра с помощью ИПТГ. Эти элюированные фрагменты ДНК обработали панкреатической дезоксирибонуклеазой в присутствии репрессора. Идея этого этапа эксперимента состояла в том, что операторный участок, связанный в комплексе с репрессором, должен быть защищен от расщепления дезоксирибонуклеазой (рис. 28.6). Затем установили последовательность оснований этих операторных фрагментов, определив последовательность транскрибированной с этих фрагментов РНК. Последовательность оснований этого участка оказалась очень интересной: 28 пар оснований расположены симметрично относительно оси второго порядка (рис. 28.7). *Симметрия репрессора, по-видимому, соответствует симметрии оператора.* Этот принцип узнавания приложим также к сигналам терминирования транскрипции (разд. 28.8) и к связыванию пептидного антибиотика актиномицина D с ДНК (разд. 25.18)[1].

28.6. Циклический AMP стимулирует транскрипцию многих индуцибельных катаболических оперонов

Давно уже известно, что в клетках *E. coli,* растущих на глюкозе, активность катаболических ферментов, таких, как β-галактозидаза, галактокиназа, арабинозо-изомераза и триптофаназа, находится на очень низком уровне. Очевидно, было бы совершенно излишним синтезировать эти ферменты в условиях изобилия глюкозы[2]. Молекулярный механизм такого ингибирующего действия глюкозы, получивший название *каталитная репрессия,* был расшифрован. Ключом к выяснению этого вопроса явились данные о том, что глюкоза понижает концентрацию циклического AMP в клетках *E. coli.* Затем обнаружилось, что экзогенный циклический AMP снимает состояние репрессии, обусловленное присутствием глюкозы. Последующие биохимические и генетические исследования показали, что *циклический AMP стимулирует инициирование транскрипции многих индуцибельных оперонов.*

Циклический AMP, синтезированный в отсутствие глюкозы, связывается с БАК *(белковый активатор катаболизма)* - белком, представляющим собой димер из субъединиц массой 22 кДа. *Комплекс БАК с циклическим AMP стимулирует транскрипцию, связываясь вблизи от многих промоторных участков; БАК без AMP такой способностью не обладает.* Опытами по расщеплению дезоксирибонуклеазой было установлено, что в случае *lac*-оперона БАК связывается рядом с участком связывания РНК-полимеразы. Точнее, БАК защищает от расщепления нуклеотиды от —87 до —49, а РНК-полимераза - нуклеотиды от

[1] При детальном изучении механизма воздействия *lac*-репрессора с оператором оказалось, что вазимодействию не свойственна такая симметрия, так что пока остается не совсем ясным, почему последовательности *lac*-оператора (и многих других операторов) обладают элементами симметрии,- *Прим. перев.*

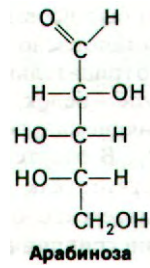
[2] Далеко не очевидно, почему клетки *E.coli,* как и многие другие клетки, предпочитают именно глюкозу всем остальным источникам углерода и энергии и используют ее до тех пор, пока ее содержание не будет исчерпано даже в присутствии значительного избытка других сахаров.— *Прим. перев.*

Рис. 28.7. Нуклеотидная последовательность *lac*-оператора. Симметричные участки закрашены одинаковым цветом.

—48 до +5 (рис. 28.8). При этой системе нумерации первый транскрибируемый нуклеотид обозначается +1. Последовательность оснований ДНК, узнаваемая БАК, обладает симметрией второго порядка, с которой мы постоянно сталкиваемся при рассмотрении взаимодействий белков с ДНК. Каким образом БАК стимулирует инициацию синтеза лактозной мРНК в 50 раз? *Последовательное расположение неперекрывающихся участков связывания БАК и РНК-полимеразы дает основание думать, что связывание БАК с ДНК порождает новые участки взаимодействия РНК-полимеразы с ДНК.* Лактозный репрессор, напротив, связывается с нуклеотидами от —3 до +21, которые в значительной степени перекрываются с участком РНК-полимеразы (нуклеотиды от —48 до +5). Таким образом, *репрессор препятствует инициации, блокируя связывание РНК-полимеразы.* По всей вероятности, комплекс циклический AMP-БАК действует таким же образом и на другие индуцибельные опероны. Итак, *индуцибельные опероны контролируются с помощью комплементарных механизмов, которые используют в качестве сигнальных молекул циклический AMP и специфические индукторы.*

28.7. Различные формы одного и того же белка активируют и ингибируют транскрипцию арабинозного оперона

Бактерии могут использовать арабинозу в качестве источника энергии, превращая ее в ксилулозо-5-фосфат - промежуточный продукт пентозофосфатного пути (разд. 15.4). Превращение арабинозы в ксилулозо-5-фосфат происходит в результате последовательного действия арабинозоизомеразы, рибулокиназы и рибулозо-5-фосфат-эпимеразы - ферментов, кодируемых генами *araA, araB* и *araD* соответственно. Эти структурные гены вместе с промотором (*araI*) и оператором (*araO*) образуют арабинозный оперон (рис. 28.9). Этот оперон регулируется геном (*araC*), расположенным рядом с операторным участком. *Подобно лактозному оперону, арабинозный оперон может быть активирован комплексом БАК с циклическим AMP.* Ара-



Арабиноза

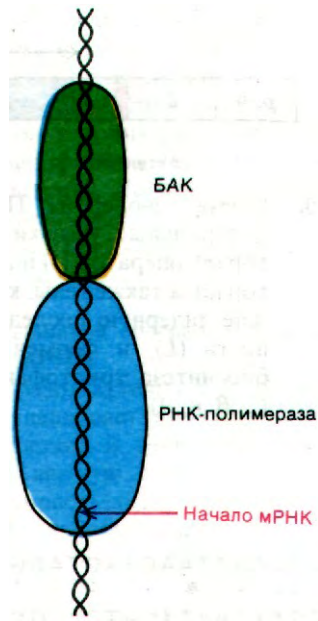


Рис. 28.8. На схеме показаны БАК и РНК-полимераза, сидящие на ДНК-матрице. Положение этих белков было определено с помощью расщепления нуклеазой.

Рис. 28.9. Карта арабинозного оперона и его регуляторного гена.

бинозный оперон был первым, в отношении которого было установлено наличие и положительной, и отрицательной регуляций. Продукт гена *araC* - белок, который существует в двух функционально различных состояниях P_1 и P_2. В отсутствие арабинозы этот белок действует как репрессор (P_1). Форма P_1 связывается с оператором, что препятствует транскрипции оперона. Арабиноза снимает P_1 с оператора и смещает конформационное равновесие в сторону P_2 (активирующей формы). Затем форма P_2 вместе с комплексом БАК-cAMP связывается с промоторным участком, что дает возможность РНК-полимеразе начать транскрипцию. Таким образом, *один и тот же регуляторный белок служит положительным и отрицательным регулятором.*

28.8. Транскрипция триптофанового оперона регулируется и аттенюатором, и оператором

Еще один регуляторный элемент был открыт Чарльзом Янофски (Charles Yanofsky) и его коллегами при изучении триптофанового оперона *E. coli*. Транскрибируемая с этого оперона мРНК длиной 7kb кодирует пять ферментов, превращающих хоризмат в триптофан (разд. 21.9). Эти пять белков синтезируются при трансляции полицистронной *trp*-мРНК последовательно, координированно и в эквимолярных количествах. Трансляция начинается раньше, чем заканчивается транскрипция. *trp*-мРНК синтезируется примерно за 4 мин и затем быстро разрушается. Короткое время жизни

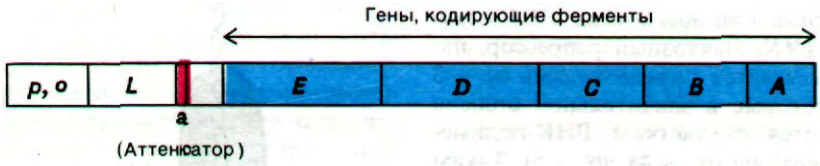


Рис. 28.10. Схема *trp*-оперона. Показаны контрольные участки - промотор (*p*), оператор (*o*) и аттенюатор (*a*), а также гены, кодирующие лидерную последовательность (*L*), и ферменты пути биосинтеза триптофана (*E, D, C, B* и *A*).

Рис. 28.11. Последовательность оснований *trp*-оператора. Ось симметрии второго порядка обозначена зеленым. Пара оснований, отмеченная +1, - начало транскрибируемой части оперона.

trp-мРНК, составляющее всего около 3 мин, позволяет бактериям быстро реагировать на изменяющуюся потребность в триптофане. *E. coli* может менять скорость образования ферментов биосинтеза триптофана более чем в 700 раз.

Как осуществляется эта регуляция? Первый уровень регуляции достигается путем взаимодействия специфического репрессора с *trp*-операторным участком ДНК. *trp*-репрессор - белок с массой 58 кДа, кодируемый геном *trpR,* удаленным от *trp*-оперона на довольно большое расстояние. *Комплекс этого репрессора и триптофана прочно связывается с оператором, тогда как сам по себе репрессор с ним не связывается.* Другими словами, триптофан является *корепрессором.* Мишень, на которую действует комплекс триптофана с репрессором, - участок ДНК, обладающий симметрией второго порядка (рис. 28.11); и в этом случае симметрия играет важную роль во взаимодействии белка с ДНК. Этот операторный участок перекрывается с промоторным участком инициирования транскрипции. Та-

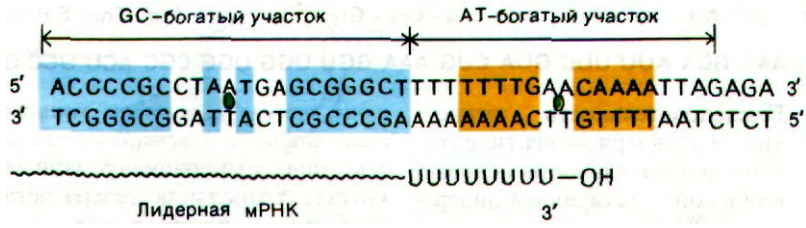


Рис. 28.12. Последовательность оснований аттенюаторного участка *trp*. Связанные симметрией второго порядка пары оснований GC-богатой области показаны синим цветом; такие же пары AT-богатой области показаны желтым цветом.

ким образом, *связывание trp-репрессора с оператором препятствует связыванию РНК-полимеразы с trp-промотором, и гены trp не транскрибируются.*

В течение некоторого времени считалось, что ингибирование конечным продуктом каталитической активности первого ферментативного комплекса в пути биосинтеза триптофана (разд. 21.11) и система ингибирования транскрипции с участием репрессора и оператора - основные регуляторные системы биосинтеза триптофана. Эта точка зрения была неожиданно опровергнута, когда было обнаружено, что у некоторых мутантов с *делециями* между оператором и геном первого фермента (*trpE*) в опероне происходит *повышенное* образование *trp*-мРНК. К тому же анализ 5'-концевой последовательности *trp*-мРНК показал, что там имеется *лидерная последовательность* длиной 162 нуклеотида, расположенная перед инициирующим кодоном *trpE*. Затем оказалось, что делеции, повышающие содержание *trp*-мРНК, картируются в этой лидерной области, примерно в 30-60 нуклеотидах от начала гена *trpE*. Следующее поразительное наблюдение состояло в том, что при высокой концентрации триптофана образовывался транскрипт, содержащий всего 130 нуклеотидов лидерной последовательности ; при нехватке же триптофана синтезировалась *trp*-мРНК длиной 7000 нуклеотидов, включающая полную лидерную последовательность. Отсюда Янофски сделал вывод, что транскрипция *trp*-оперона должна регулироваться *участком контролируемой терминации,* называемым аттенюатором. Он локализован между оператором и геном первого фермента пути биосинтеза триптофана. Этот участок терминации, регулируемый физиологическими условиями, подобен участкам терминации в конце других оперонов (разд. 25.15); он содержит GC-богатую последовательность и следом за ней AT-богатый участок. Каждый из этих участков аттенюатора обладает симметрией второго порядка (рис. 28.12). Кроме того, терминированный лидерный транскрипт заканчивается несколькими U подряд.

Аттенюаторный участок дополняет оператор в регуляции транскрипции trp-генов. При изобилии триптофана инициация транскрипции блокируется в результате связывания комплекса триптофан-репрессор с оператором. По мере снижения концентрации триптофана в клетке репрессия снижается и начинается транскрипция. Однако некоторые молекулы РНК-полимеразы покидают матрицу, дойдя до аттенюатора, тогда как другие продолжают синтезировать полную *trp*-матрицу. *По мере исчерпания триптофана увеличивается доля молекул РНК-полимеразы, проходящих через аттенюаторный участок.*

28.9. Аттенюация опосредуется трансляцией лидерной мРНК

Каким образом аттенюаторный участок *trp*-оперона улавливает концентрацию триптофана в клетке? В решении этого вопроса особенно важную роль сыграли данные о том, что часть лидерной мРНК транслируется. Весьма существенно, что в 14-членном лидерном полипептиде (рис. 28.13) имеются остатки триптофана в положениях 10 и 11. Когда триптофан находится в избытке, синтезируется полный лидерный пептид. *Но если триптофана не хватает, рибосома задерживается на двух расположенных тандемом кодонах UGG, поскольку в этом случае оказывается недостаточным содержание триптофанил-тРНК.* Застряв-

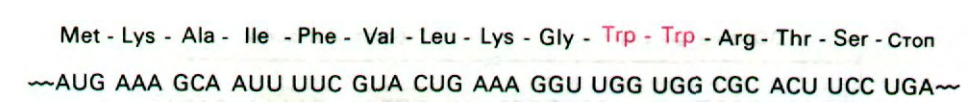


Рис. 28.13. Последовательность аминокислот в лидерном пептиде *trp* и последовательность оснований в соответствующей лидерной мРНК.

шая рибосома каким-то образом меняет структуру мРНК, так что РНК-полимераза транскрибирует оперон за пределами аттенюаторного участка. Ключевой аспект этого регуляторного механизма состоит в том, что трансляция и транскрипция тесно сопряжены между собой. Рибосомы, транслирующие лидерную *trp*-мРНК, следуют непосредственно за молекулой РНК-полимеразы, транскрибирующей ДНК-матрицу. Исследования, проведенные в последние годы, показали, что застрявшая рибосома изменяет вторичную структуру мРНК: конформация, при которой основания спариваются, благоприятствуя тем самым терминированию транскрипции, изменяется таким образом, что РНК-полимераза проскакивает аттенюатор (рис. 28.14). Мы начинаем понимать, что молекулы нуклеиновых кислот, как и белковые молекулы, могут принимать различные конформации и что изменения конформации регулируются и имеют далеко идущие физиологические последствия.

28.10. Аттенюаторный участок гистидинового оперона содержит семь гистидиновых кодонов подряд

В настоящее время известны еще два оперона биосинтеза аминокислот у *E. coli,* содержащих аттенюаторные участки. Фенилаланиновый оперон и гистидиновый оперон, подобно триптофановому оперону, содержат регулируемые участки терминации перед первым геном, кодирующим фермент. И в этих случаях лидерная область перед участком терминации транслируется. Удивительна последовательность аминокислот в лидерном пептиде фенилаланинового оперона: 7 из 15 остатков - фенилаланины (рис. 28.15). Еще поразительнее лидерный пептид гистидинового оперона: он содержит *семь остатков гистидина подряд. Очевидно, что эти лидерные мРНК предназначены, чтобы улавливать концентрации фенилаланина и гистидина.* Если соответствующих аминоацилированных тРНК не хватает, трансляция лидера останавливается. Как уже обсуждалось выше на примере *trp*-оперона, считается, что застрявшая рибосома таким образом изменяет конформацию мРНК, что у нее происходит спаривание оснований. Это дает возможность РНК-полимеразе проскакивать аттенюаторный участок[1]. Присутствие семи последовательно расположенных кодонов гистидина в лидерной мРНК гистидинового оперона существенно увеличивает чувствительность этого детектора. Действительно, падение концентрации гистидил-тРНК на 15% вызывает троекратное увеличение числа молекул мРНК, транскрибируемых с этого оперона.

28.11. Репрессоры и активаторы детерминируют развитие умеренных фагов

Обратимся теперь к роли репрессоров и активаторов транскрипции в регуляции жизненного цикла *бактериофага лямбда* (λ). Зрелая вирусная частица состоит из линейной двухспиральной молекулы ДНК (48 kb), упакованной в белковую оболочку. Существует два пути развития вируса: он может разрушить клетку-хозяина или он может стать ее компонентом (отсюда и название - *умеренный*). При *литическом пути* развития происходит полное выражение (экспрессия) фаговых генов, что приводит к лизису бактерии и образованию примерно 100 вирусных частиц потомства. В другом случае развитие фага λ может пойти по пути *лизогенизации клетки,* когда его ДНК становится ковалентно связанной с ДНК клетки-хозяина в строго определенном месте (сайт-специфическая интеграция). Этот процесс рекомбинации, в котором участвует кольцевая молекула ДНК фага λ, мы обсудим ниже (разд. 30.16). Когда ДНК фага интегрирует с ДНК клетки-хозяина, большинство фаговых функций выключается. Фаговая ДНК в таком состоянии называется *профагом,* а клетка-хозяин, содержащая профаг - *лизогенной бактерией.* Профаг реплицируется

[1] Автор противоречит собственному утверждению, что застрявшая рибосома разворачивает мРНК (см. предыдущий разд.); рибосома действительно способствует именно разворачиванию *мРНК.- Прим. перев.*

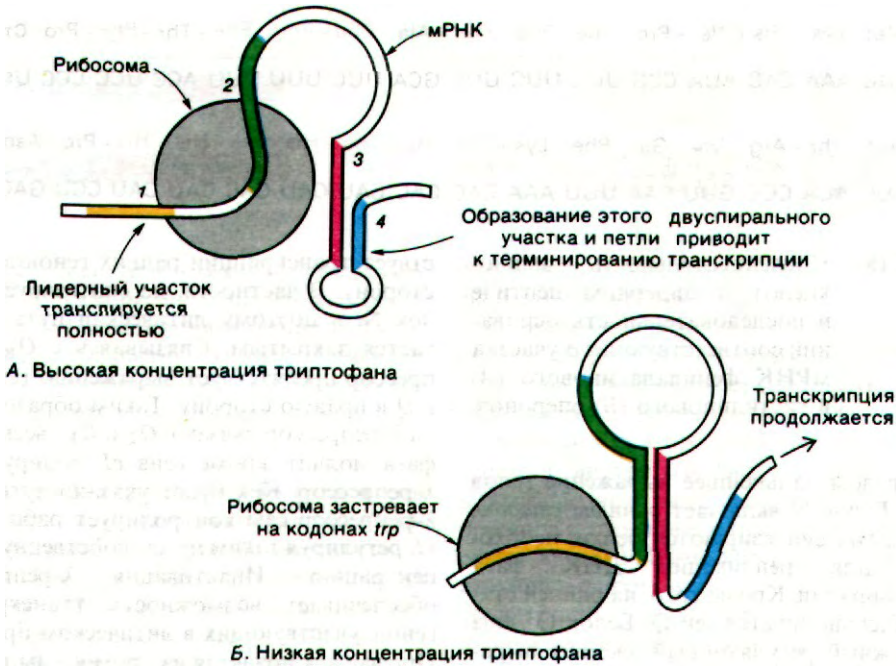


Рис. 28.14. Схематическое изображение аттенюации *trp*-оперона *E.coli*. Когда триптофан имеется в избытке (*А*), лидерный участок (обозначен цифрой *1*) *trp*-мРНК полностью транслируется. Участок *2* взаимодействует с рибосомой, что позволяет основаниям участков *5* и *4* спариваться. Эта спаренная область каким-то образом сигнализирует РНК-полимеразе о том, что следует закончить транскрипцию. Если же триптофана не хватает (*Б*), участки *3* и *4* не взаимодействуют, так как рибосома застревает на *trp*-кодонах участка *1*. Участок *2* взаимодействует с участком *3* вместо того, чтобы входить в рибосому, и в результате участки *3* и *4* не могут спариваться. Вследствие этого транскрипция продолжается. [Oxender D. L., Zurawski G., Yanofsky C., Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 5524 (1979).]

в лизогенной бактерии как часть клеточной хромосомы обычно на протяжении многих поколений. В лизогенном состоянии литические функции молчат, но не теряются (рис. 28.17). Многие агенты, нарушающие нормальную репликацию ДНК в клетке-хозяине, индуцируют профаг, и он переходит на путь литического развития.

Вначале рассмотрим выражение генов фага λ при литическом пути. Цель развития - образование многочисленного потомства - достигается путем *последовательной транскрипции вирусных генов*. Вначале образуются белки, необходимые для репликации и рекомбинации ДНК, затем белки головки и отростка вирусной частицы и белки, необходимые для лизиса клетки-хозяина. Чрезвычайно важное значение имеет строгая очередность этих событий; преждевременное разрушение клетки-хозяина для вируса, конечно, невыгодно. Выражение генов при литическом развитии происходит в три стадии: предраннюю, раннюю и позднюю (рис. 28.18). На *предранней стадии* начинается синтез РНК с двух промоторов - P_L и P_R. Один из образующихся при этом транскриптов служит матрицей для синтеза белка N, которому принадлежит важнейшая регуляторная роль. В отсутствие белка N предранние транскрипты заканчиваются на одном из двух участков терминации. Белок N препятствует терминированию транскрипции в этих участках и обеспечивает та-

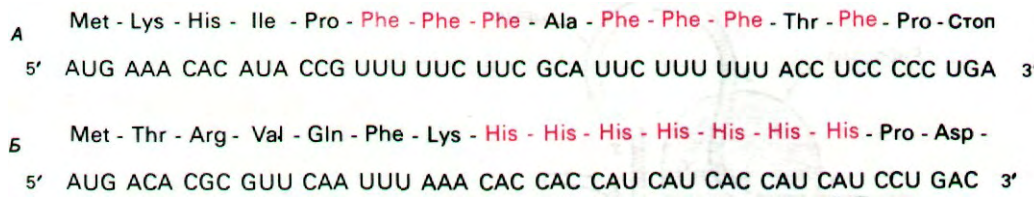


Рис. 28.15. Последовательность аминокислот в лидерном пептиде и последовательность оснований соответствующего участка мРНК фенилаланинового (*А*) и гистидинового (*Б*) оперонов.

ким образом дальнейшее выражение генов фага λ. Белок N включает *раннюю стадию*. В это время синтезируются белки, необходимые для репликации ДНК фага и рекомбинации. Кроме того, на ранней стадии транскрибируется ген Q. Белок Q - еще один важный регуляторный элемент выражения генов фага λ. Он необходим для перехода в *позднюю стадию*. На поздней стадии транскрибируются гены, необходимые для образования головки и отростка фага и для лизиса клетки-хозяина. Белок Q, подобно белку N, подавляет терминацию транскрипции. *Короче говоря, последовательная регуляция литического развития осуществляется двумя белками - положительными регуляторами, кодируемыми генами N и Q. Их действие заключается в том, что они позволяют РНК-полимеразе продолжать транскрипцию, проскочив несколько участков терминации.*

В лизогенном цикле различают три стадии: *установление лизогенного состояния, его поддержание и выход из лизогенного состояния*. Для установления состояния профага необходимо, чтобы вирусная ДНК интегрировалась с ДНК клетки-хозяина и литические функции вируса были инактивированы. Эти процессы протекают очень сложно, и до конца они не изучены. Поддержание состояния профага, наоборот, сравнительно несложный процесс. А. Дейл Кейзер (A. Dale Kaiser) показал, что из всех генов профага *экспрессируется только ген cI*. Этот ген кодирует λ-репрессор, который связывается с двумя операторными участками O_L и O_R (рис. 28.19). Связывание λ-репрессора с O_L непосредственно препятствует транскрипции ранних генов в левую сторону. В частности, не синтезируется белок N, и поэтому литический путь оказывается закрытым. Связываясь с O_R, λ-репрессор препятствует выражению генов *cro* и *Q* в правую сторону. Таким образом, когда λ-репрессор связан с O_L и O_R, весь геном фага молчит, кроме гена *cI*, кодирующего λ-репрессор. Как будет указано чуть ниже, λ-репрессор сам контролирует работу гена *cI*, регулируя таким путем собственную концентрацию. Инактивация λ-репрессора обеспечивает возможность транскрипции генов, участвующих в литическом процессе. Профаг исключается из хромосомы клетки-хозяина, и литические функции экспрессируются.

28.12. Два оператора фага лямбда содержат ряд участков связывания репрессора

λ-Репрессор был выделен и подробно изучен Марком Пташне (Mark Ptashne). Моно-

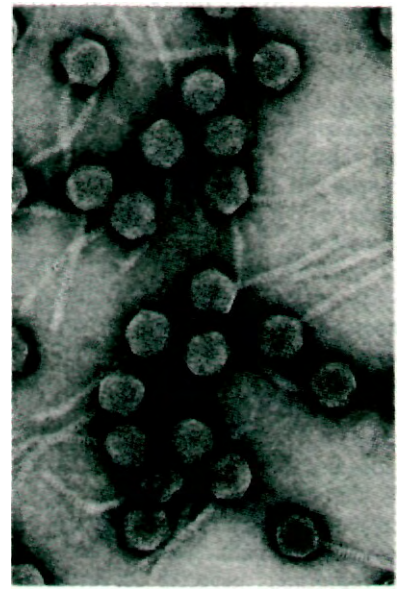


Рис. 28.16. Электронная микрофотография фагов λ. (Печатается с любезного разрешения д-ра A. Dale Kaiser.)

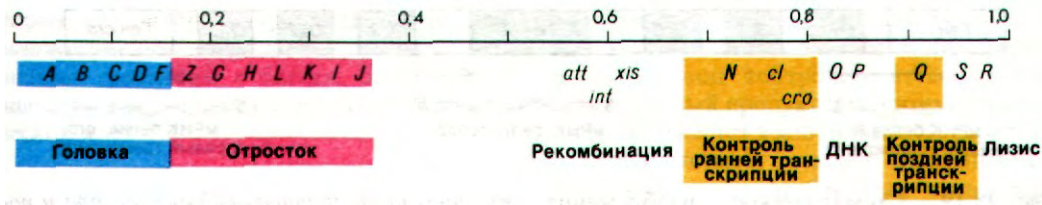


Рис. 28.17. Генетическая карта фага λ. Показаны лишь некоторые гены. После проникновения в бактериальную клетку линейная двухцепочечная ДНК переходит в кольцевую форму.

мере массой 26 кДа находится в равновесии с олигомерами. С ДНК связываются именно олигомеры. Два операторных участка - O_L и O_R - узнаются одним и тем же репрессором. Ген *cI*, кодирующий этот репрессор, расположен между O_L и O_R (рис. 28.19). Каждый их этих операторов содержит три участка связывания λ-репрессора. Расщепление с помощью нуклеаз показало, что участки связывания представляют собой последовательность из 17 пар оснований и отделены друг от друга АТ-богатыми участками длиной от 3 до 7 пар оснований. Последовательности оснований всех этих участков связывания λ-репрессора сходны, но не идентичны. Узнаваемая последовательность - 5'-TATCACCGC-3' или что-нибудь в этом роде. Как и *lac*-оператор, эти операторные участки обладают частичной симметрией второго порядка.

Самые сильные места связывания репрессора в операторах O_L и O_R расположены ближе всего к началу первого структурного гена оперона. Промоторный участок гена *N* расположен в пределах O_L а промотор гена *cro* - внутри O_R. Как и в лактозном, и в арабинозном оперонах, связывание репрессора с этими операторами препятствует связыванию РНК-полимеразы с соответствующим промотором, и, следовательно, транскрипция не начинается. Связывание λ-репрессора с двумя участками в O_L и O_R более эффективно блокирует промотор, чем связывание только с одним участком.

28.13. λ-Репрессор регулирует собственный синтез

Число молекул λ-репрессора в лизогенных клетках *E. coli* строго регулируется. Снижение количества репрессора (даже кратковременное) переводит клетку на литический путь. С другой стороны, избыток репрессора затруднит выход фага, если условия его существования в бактерии станут неблагоприятными. Как регулируется концентрация λ-репрессора? Проведенные сравнительно недавно исследования показали, что это репрессор регулирует собственный синтез. Для этого *λ-репрессор связывается с O_R3 операторным участком, локализованным*

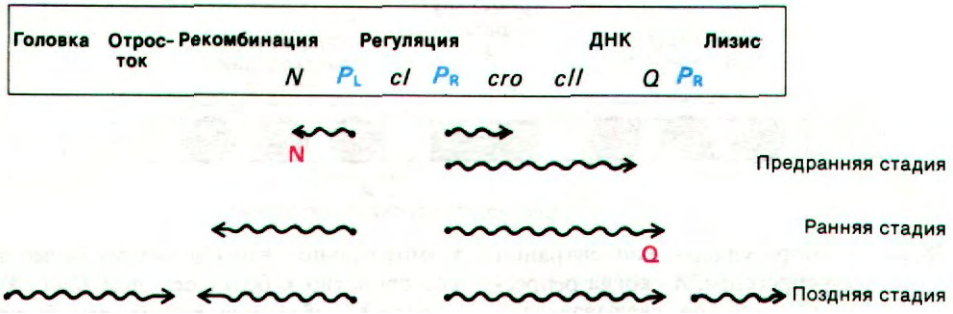


Рис. 28.18. Три стадии транскрипции при литическом цикле развития фага λ. Белок N образуется на предранней стадии и активирует раннюю стадию. Тогда в свою очередь синтезируется белок Q, который активирует позднюю стадию. [Echols H., The Bacteria, 8, 502 (1979).]

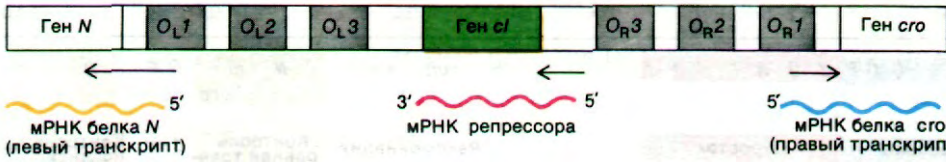


Рис. 28.19. Схематическое изображение операторных участков O_L и O_R и прилегающих генов. Самое высокое сродство к λ-репрессору имеют O_L1 и O_R1. *cI* - ген-репрессор. Левый транскрипт начинается с гена *N*, правый - с гена *cro*.

ближе всего к гену cI, и выключает транскрипцию этого гена (рис. 28.20). *Связывание репрессора с* O_R1, *напротив, усиливает транскрипцию гена cI.* Напомним, что сродство λ-репрессора к O_R1 выше, чем к O_R3. Таким образом, *транскрипция гена cI усиливается при низкой концентрации λ-репрессора и подавляется при высокой концентрации того же белка.* Другими словами, выражение гена *cI* - саморегулирующаяся система.

Описанная регуляция по принципу обратной связи стремится поддерживать концентрацию репрессора на таком уровне, чтобы остальной геном фага не экспрессировался. Как же тогда фаг может выйти из состояния лизогении? Литический цикл запускается при снижении числа молекул λ-репрессора; содержание λ-репрессора должно уменьшаться до такого уровня, которого достаточно только для транскрипции гена *cro*. Новообразованный белок *cro* связывается с O_R3 и подавляет транскрипцию гена *cI*.

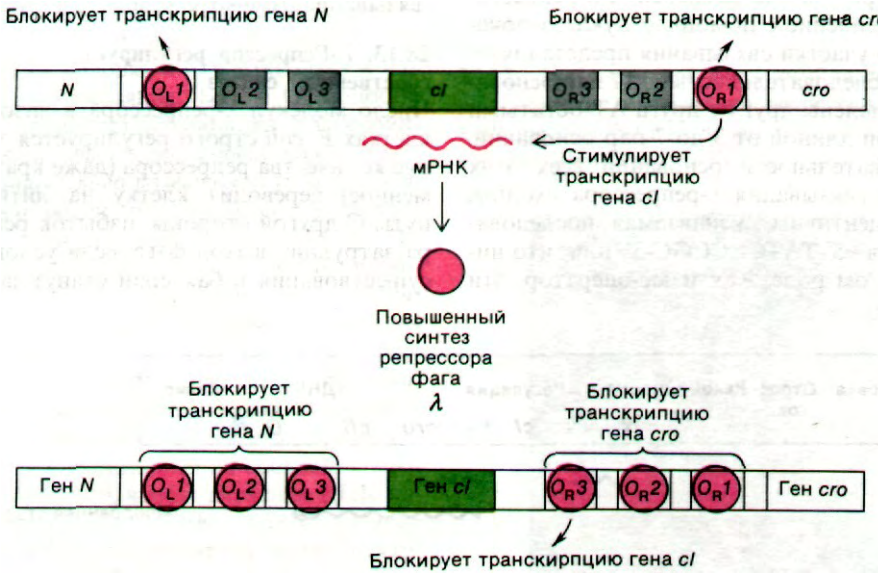


Рис. 28.20. Саморегуляция концентрации λ-репрессора. *А* - когда репрессора мало, он связывается с O_R1 и стимулирует транскрипцию гена *cI*. *Б* - по мере увеличения концентрации λ-репрессора он связывается с O_R3 и ингибирует дальнейшую транскрипцию гена *cI*.

Самое главное, что O_R3 имеет более высокое сродство к белку *cro,* чем O_R1. Таким образом, *небольшое количество белка cro подавляет синтез λ-репрессора, не выключая синтеза самого белка cro.* Вследствие этого λ-репрессор уже не может руководить ходом событий. С этого момента необратимо запускается цепь реакций, ведущих к лизису. Таким образом, тонкое взаимодействие всего нескольких белков и операторных участков определяет путь развития фага. Было бы интересно выяснить, имеют ли неко-

торые регуляторные системы, такие, как *множественные операторные участки с различным сродством к белкам,* более общее значение в регуляции развития прокариотических клеток.

Заключение

Клетки регулируют количество синтезируемых белков различными способами. У *E. coli* выражение генов регулируется в первую очередь на уровне транскрипции, а не трансляции. Многие гены организованы в опероны - координированные единицы генетической экспрессии. Оперон состоит из регуляторных участков (оператора и промотора) и нескольких структурных генов. Вне оперона имеется регуляторный ген, кодирующий белок, который взаимодействует с операторным участком. Последовательность оснований лактозного оператора симметрична. Вообще симметрия играет основную роль в узнавании определенных участков в ДНК белками. *lac*-Оперон индуцируется β-галактозидами, например аллолактозой и изопропилтиогалактозидом. Связывание индуктора с *lac*-репрессором приводит к его вытеснению с оператора. Теперь РНК-полимераза может пройти через оператор и транскрибировать *lac*-оперон. Триптофановый оперон репрессируется триптофаном, который связывается со специфическим репрессором и дает ему таким образом возможность связаться с оператором. В результате транскрипция генов, кодирующих ферменты биосинтеза триптофана, выключается.

Кроме того, некоторые опероны биосинтеза аминокислот, в том числе *trp*-оперон, находятся под контролем аттенюаторов. Если конечный продукт биосинтеза - аминокислота - имеется в изобилии, транскрипция в аттенюаторном участке прекращается. Для аттенюации необходима трансляция лидерной мРНК. Регуляция широкого спектра генов осуществляется циклическим AMP, который связывается с особым белком (БАК). Этот комплекс взаимодействует с промоторными участками нескольких индуцибельных оперонов и стимулирует инициирование транскрипции. Концентрация циклического AMP повышается только при недостатке глюкозы. Таким образом, глюкоза косвенно подавляет синтез различных ферментов катаболизма.

Бактериофаг λ может размножаться и разрушать клетки-хозяева (литический путь); в другом случае его ДНК может интегрировать с хромосомой клетки-хозяина (лизогенный путь). При литическом развитии происходит последовательная транскрипция трех групп генов. На предранней стадии образуется белок N, активирующий транскрипцию ранних генов. При этом в свою очередь синтезируется белок Q - активатор поздней стадии транскрипции. Лизогенное состояние поддерживается λ-репрессором, который кодируется геном *cI*. Репрессор связывается с операторами O_R и O_L и препятствует транскрипции предранних генов. Присутствие многочисленных участков связывания в этих операторах позволяет λ-репрессорам регулировать собственный синтез.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Jacob F., Monod J., 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins, J. Moi. Biol., 3, 318-356. (В этой блистательной статье была предложена модель оперона и сформулировано представление об информационной РНК.)

Ptashne M., Gilbert W., 1970. Genetic repressers, Sci. Amer, 222(6), 36-44.

Maniatis T., Ptashne M., 1976. A DNA operator-repressor system, Sci. Amer., **234(1),** 64-76.

Лактозный оперон

Miller J.H., Reznikoff W.S., 1978. The Operon, Cold Spring Harbor Laboratory. (Превосходный сборник статей, касающихся регуляторных механизмов *E. coli* и фага λ. Детально рассмотрены лактозный, триптофановый, арабинозный, гистидиновый и галактозный опероны.)

Gilbert W., Muller-Hill B., 1966. Isolation of the *lac* represser, Proc. Nat. Acad. Sci., **56,** 1891-1898.

Dickson R., Abelson J., Barnes W., Reznikoff W., 1975. Genetic regulation: the *lac* control region, Science, 187, 27-35.

Арабинозный оперон

Wilcox G., Meuris P., Bass P., Englesberg E., 1974. Regulation of the arabinose operon in vitro, J. Biol. Chem., 249, 2946-2952.

Hirsh J., Schleif R., 1976. Electron microscopy of gene regulation: the L-arabinose operon, Proc. Nat. Acad. Sci., 73, 1518-1522.

Триптофановый и гистидиновый опероны

Platt T., 1978. Regulation of gene expression in the tryptophan operon of *Esherichia coli.* In: Miller J. H. and Reznikoff W. S.(eds.), The Operon, pp. 213-302, Cold Spring Harbor Laboratory. (Четко изложены представления о *trp*-опероне.)

Oxender D.L., Zurawski G., Yanofsky C., 1979. Attenuation in the *Escherichia coli* tryptophan operon: the role of RNA secondary structure involving the Trp codon region, Proc. Nat. Acad. Sci., **76,** 5524-5528.

Bertrand K., Korn L., Lee F,, Platt T., Squires C.L., Squires C., Yanofsky C., 1975. New features of the regulation of the tryptophan operon, Science, **189,** 22-26. (Рассказ об истории открытия аттенюации транскрипции.)

Barnes W.M., 1978. DNA sequence from the histidine operon control region: seven histidine codons in a row, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 4281-4285.

Stephens J. C., Artz S. W., Ames B. N., 1975. Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp): positive effector for histidine operon transcription and general signal for amino acid deficiency, Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 4389-4393.

Циклический AMP и катаболитная репрессия

Pastan L, Adhya S., 1976. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in *Escherichia coli,* Bacteriol. Rev., 40, 527-551.

Zubay G., Schwartz D., Beckwaith J., 1970. Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: a positive control system, Proc. Nat. Acad. Sci., **66,** 104-110.

Регуляция транскрипции фага λ

Ptashne M., Backman K., Humayun M.Z., Jeffrey A., Maurer R., Meyer B., Sauer R. T., 1976. Autoregulation and function of a represser in bacteriophage lambda, Science, 194, 156-161.

Johnson A., Meyer B.J., Ptashne M., 1978. Mechanism of action of the *cro* protein of bacteriophage λ, Proc. Nat Acad. Sci., 75, 1783-1787.

Ptashne M., Jeffrey A., Johnson A.D., Maurer R., Meyer B.J., Pabo C.O., Roberts T.M., Sauer R.T, 1980. How the λ represser and *cro* work, Cell, **19,** 1-11.

Hershey A.D. (ed.), 1971. The Bacteriophage Lambda, Cold Spring Harbor Laboratory. [Имеется перевод: Фаг лямбда.- М.: Мир, 1975.] (Содержит множество сведений о фаге λ.)

Reichardt L., Kaiser A.D., 1971. Control of λ represser synthesis, Proc. Nat. Acad. Sci., 68, 2185-2189.

Вопросы и задачи

1. К какому результату приведут следующие мутации?

а) Делеция регуляторного гена *lac*-оперона.
б) Делеция регуляторного гена *trp*-оперона.
в) Делеция регуляторного гена *ara*-оперона.
г) Делеция гена *cI* фага λ.
д) Делеция гена *N* фага λ.

2. Суперрепрессированные мутанты по *lac*-оперону (i^S) ведут себя как неиндуцибельные мутанты. Ген i^S доминирует над геном i^+ в частичных диплоидах. Каким может быть молекулярный механизм этой мутации?

3. Имеется мутант *E. coli,* синтезирующий большие количества β-галактозидазы независимо от того, присутствует ли в среде индуктор. Частичные диплоиды, образованные из этого мутанта и $Fi^+o^+z^-$, также синтезируют много β-галактозидазы независимо от присутствия индуктора. Какая мутация могла бы привести к такому результату?

4. Из культуры дикого типа выделен мутант, неспособный расти на галактозе, лактозе, арабинозе и ряде других источников углерода. Концентрация циклического AMP в клетках мутанта нормальна. Какая мутация могла бы привести к такому результату?

5. Клетка *E. coli,* несущая профаг λ, иммунна к литическому инфицированию этим фагом. Почему?

6. Транскрипция *cI* может быть инициирована с промотора p_{RE}, предназначенного для установления лизогении, или p_{RM}, предназначенного для ее поддержания. Транскрипты с p_{RM} начинаются с 5'-концевого кодона AUG λ-репрессора, а в транскрипте p_{RE} этому кодону инициации предшествует последовательность, комплементарная 3'-концевой последовательности 16S-рРНК. Для инициации на участке p_{RE} необходимы белки, кодируемые фагом, которые не экспрессируются в лизогенном состоянии.

а) Какой транскрипт будет транслироваться с большей эффективностью?
б) Каково возможное физиологическое значение этого различия?

Дополнительные вопросы см.: Hood L.E., Wilson J. H, Wood W. B., Molecular Biology of Eucaryotic Cells, Benjamin, 1975, ch. 1.

ГЛАВА 29
Эукариотические хромосомы и выражение генов у эукариот

Эукариотическая клетка содержит гораздо больше генетической информации, чем прокариотическая. Например, в клетке человека в 1000 раз больше ДНК, чем в клетке *E. coli,* и примерно в 100000 раз больше, чем в одном вирионе фага λ. Это изобилие ДНК наделяет эукариот большими потенциальными возможностями, которых нет у прокариот. Другое отличие состоит в том, что ДНК высших организмов ассоциирована с основными белками - *гистонами,* а хромосомы низших организмов таких белков не содержат. Предназначение этих основных белков - упаковывать ДНК, с тем чтобы при контурной длине, равной многим сантиметрам, она могла бы поместиться в объеме диаметром несколько микрометров. Характерная морфология эукариотических хромосом, которую легко наблюдать в световом микроскопе, показывает, что они организованы значительно сложнее, чем геномы прокариотических клеток. К тому же форма эукариотических хромосом резко меняется в ходе клеточного цикла. Еще одна важная особенность, которая собственно и отличает эукариот от прокариот, состоит в том, что эукариотические хромосомы окружены *ядерной мембраной.* Этой мембраны у прокариот нет, равно как нет и других внутренних мембран. Благодаря наличию мембраны *транскрипция и трансляция у эукариот разделены во времени и в пространстве,* тогда как у прокариот они тесно сопряжены. В ядрах высших организмов первичные транскрипты подвергаются значительной модификации, расщепляются и их фрагменты соединяются. Лишь небольшая часть синтезированных в ядре РНК выходят в цитозоль в виде мРНК. Очевидно, что у эукариот выражение (экспрессия) генов осуществляется значительно более сложным путем, чем у прокариот. Исследования в этой области быстро развиваются, поскольку мы научились выделять и клонировать гены эукариот, определять в них последовательность нуклеотидов и осуществлять их выражение в хорошо изученных системах. По всему чувствуется, что мы находимся на пороге раскрытия одной из важнейших проблем биологии — механизма клеточной дифференцировки.

Рис. 29.1. Фазово-контрастная микрофотография хромосомы типа ламповой щетки из ооцита. (Печатается с любезного разрешения д-ра Joseph Gall.)

Рис. 29.2. Радиоавтограф молекулы ДНК *Drosophila melanogaster.* Контурная длина этой ДНК равна 1,2 см. [Kavenoff R., Klotz L. C., Zimm B. H., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38, 4 (1974).]

29.1. Эукариотическая хромосома содержит одну молекулу двухспиральной ДНК

Можно ли утверждать, что хромосома содержит одну длинную молекулу ДНК? В течение многих лет на этот вопрос было трудно ответить, так как очень длинные молекулы ДНК невероятно чувствительны к разрыву под действием сил сдвига. Бруно Зимм (Bruno Zimm) решил эту проблему с помощью метода *вязкостной эластометрии,* позволяющего измерять длину *самых крупных молекул ДНК в смеси.* Молекулы ДНК растягивают в потоке жидкости, и затем им дают свернуться в нормальное состояние. Время, за которое свертывается половина молекул, зависит от их молекулярной массы. Клетки плодовых мушек лизировали в камере для измерений, чтобы избежать разрывов ДНК при переносе образцов. Нуклеазы инактивировали, инкубируя образцы в присутствии детергента при 65°С. Кроме того, для гидролиза связанных с ДНК белков добавляли проназу.

Масса самых крупных молекул ДНК в полученной смеси составляла $41 \cdot 10^6$ кДа. Эта величина хорошо согласуется с известным содержанием ДНК в самой большой хромосоме *Drosophila melanogaster* - $43 \cdot 10^6$ кДа. Превосходное совпадение результатов наблюдалось также в случае мутанта с транслокацией, затрагивающей самую большую хромосому. В этой хромосоме содержится дополнительный кусок ДНК, благодаря которому содержание ДНК в ней достигает $59 \cdot 10^6$ кДа. Измеренное количество ДНК в этой молекуле составило $58 \cdot 10^6$ кДа. Радиоавтографы ДНК *D. melanogaster* (рис. 29.2) подтверждают существование очень длинных молекул ДНК. Эти исследования показали, что *хромосома дрозофилы содержит одну непрерывную молекулу ДНК. Кроме того, эта молекула ДНК линейная и неразветвленная.*

29.2. Эукариотическая ДНК прочно связана с основными белками - гистонами

ДНК эукариотических хромосом находится не в свободном виде, а прочно связана с группой небольших основных белков, называемых *гистонами.* На долю гистонов приходится около половины массы эукариотических хромосом; вторую половину составляет ДНК. Этот нуклеопротеиновый материал хромосомы называется *хроматином.* Если обработать хроматин солью или разбавленной кислотой, гистоны и ДНК можно диссоциировать. Образовавшуюся смесь можно затем разделить с помощью ионообменной хроматографии. Гистоны подразделяются на пять типов, обозначаемых соответственно H1, H2A, H2B, H3 и H4. Они имеют массу от 11 до 21 кДа (табл. 29.1). Удивительная особенность гистонов - высокое *содержание положительно заряженных боковых цепей:* примерно каждый четвертый остаток - лизин или аргинин.

Благодаря *посттрансляционным моди-*

фикациям определенных боковых цепей каждый гистон существует в нескольких формах. Например, лизин-16 гистона H4 может быть ацетилирован. Кроме того, гистоны могут быть метилированы, ADP-рибозилированы и фосфорилированы. Изменения заряда, способности к образованию водородных связей и формы молекул гистонов в результате таких ковалентных модификаций могут играть важную роль в регуляции доступности ДНК для репликации и транскрипции.

29.3. Последовательности аминокислот в гистонах H3 и H4 почти одинаковы у всех животных и растений

Эмиль Смит и Робер Де-Ланж (Emil Smith, Robert DeLange) показали, что последовательности аминокислот в гистоне H4 из проростков гороха и из тимуса теленка различаются только по двум положениям из 102. Замены эти очень незначительны: валин - вместо изолейцина и лизин - вместо аргинина. Таким образом, *последовательность аминокислот гистона H4 сохранилась почти без изменений на протяжении $1{,}2 \cdot 10^9$ лет, прошедших со времени разделения всего живого на царства растений и животных.* Гистон H3 также мало изменился на протяжении этого колоссального периода эволюции. Последовательности аминокислот в гистоне H3 из проростков гороха и из тимуса теленка различаются по четырем положениям. Интересно сравнить скорость изменения последовательности этих гистонов в ходе эволюции со скоростью изменения других белков. Обычно для этого используется *величина единичного эволюционного периода.* Она равна времени, за которое последовательность аминокислот изменяется на 1% после того, как дивергируют две эволюционные линии. Эта величина для гистонов H3 и H4 составляет $3 \cdot 10^8$ и $6 \cdot 10^8$ лет соответственно и значительно выше, чем для других исследованных до настоящего времени белков, Например, для цитохрома *c* единичный эволюционный период составляет $2 \cdot 10^7$ лет, для гемоглобина - $6 \cdot 10^6$ лет, для фибринопептидов - $1 \cdot 10^6$ лет. Замечательная консервативность структуры гистонов H3 и H4 свидетельствует о том, что они выполняют какую-то чрезвычайно важную функцию, возникшую на заре эволюции эукариот и сохранившуюся с тех пор почти без изменений.

Таблица 29.1. **Гистоны**

Тип	Отношение [Lys]/[Arg]	Число аминокислотных остатков	Масса, кДа	Локализация
H1	20,0	215	21,0	Линкер
H2A	1,25	129	14.5	Сердцевина
H2B	2.5	125	13,8	"
H3	0,72	135	15,3	"
H4	0,79	102	11,3	"

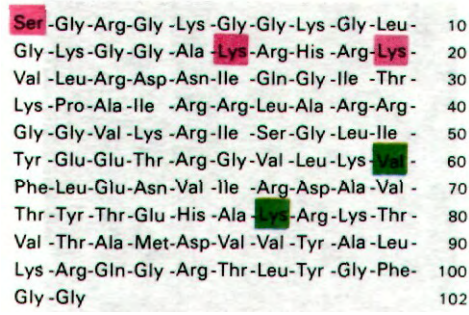


Рис. 29.3. Последовательность аминокислот в гистонах H4 из тимуса теленка. Несколько остатков модифицированы. α-Аминогруппа ацетилирована, равно как и ε-аминогруппа Lys-16. ε-Аминогруппа Lys-20 метилирована или диметилирована. Гистон H4 из проростков гороха имеет такую же последовательность аминокислот, за исключением положений 60 (изолейцин) и 77 (аргинин).

29.4. Нуклеосомы - повторяющиеся субъединицы хроматина

Как происходит взаимодействие гистонов с ДНК и образование нити хроматина? Основываясь на данных, полученных различными методами, Роджер Корнберг (Roger Kornberg) высказал в 1974 г. предположение, что *хроматин состоит из повторяющихся субъединиц, каждая из которых включает 200 пар оснований ДНК*

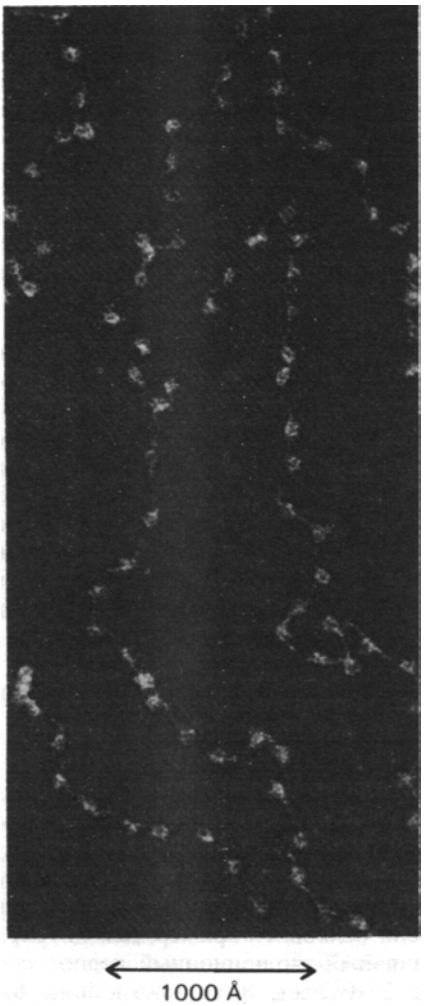


Рис. 29.4. Электронная микрофотография хроматина. Частицы, похожие на бусины, имеют диаметр около 100 А. (Печатается с любезного разрешения д-ра Ada Olins и д-ра Donald Olins.)

и по 2 молекулы гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Теперь эти повторяющиеся единицы называют нуклеосомами. Большая часть ДНК намотана на гистоновую сердцевину (гистоновый кор). Остальная ДНК, так называемый линкер, или межнуклеосомная ДНК, соединяет соседние нуклеосомы и обеспечивает гибкость *хроматиновой нити.* Таким образом, *хроматиновая нить представляет собой гибкую цепочку нуклеосом,* напоминающую бусины на нитке.

Целый ряд экспериментальных данных свидетельствует в пользу этой модели структуры хроматина.

1. *Электронная микроскопия.* На электронных микрофотографиях хроматина видны группы расположенных друг за другом бусин диаметром 100 А, соединенных тонкой нитью (рис. 29.4). Степень растяжения хроматиновой нити зависит от способа подготовки образцов для микроскопии. Некоторые методы дают электронные микрофотографии с более компактным расположением 100-ангстремных бусин. Следовательно, электронная микроскопия прямо подтверждает, что хроматин - цепочка почти сферических частиц, между которыми расположены гибкие участки.

2. *Дифракция рентгеновских лучей и нейтронов.* При рентгеновской дифракции на нитях хроматина также виден повтор длиной 100 А. Нейтронная дифракция показывает, что ДНК расположена снаружи нуклеосомы.

3. *Нуклеазный гидролиз.* Свободную ДНК в растворе можно расщепить по любой из ее фосфодиэфирных связей с помощью панкреатической дезоксирибонуклеазы I (ДНКазы I) или микрококковой нуклеазы. ДНК в хроматине, за исключением нескольких участков, наоборот, защищена от гидролитического действия нуклеазы. Характер расщепления хроматина поражает своей простотой: на электрофореграмме видна лесенка четко выраженных полос (рис. 29.5). В этих фрагментах содержатся фрагменты ДНК, кратные основному повтору длиной примерно 200 пар оснований. Электронные микрофотографии показывают, что число сферических частиц во фрагменте хроматина равно числу 200-парных повторов (рис. 29.6). Например, фрагмент, содержащий ДНК длиной 600 пар оснований, состоит из трех 100-ангстремных частиц. Следовательно, бусина, видимая на электронной микрофотографии, соответствует нуклеосоме, получаемой при нуклеазном гидролизе.

4. *Реконструкция.* Если добавить гистоны к ДНК аденовируса или обезьяньего вируса SV-40, можно получить *in vitro* хроматиноподобную нить. Количество ДНК, связанной с нуклеосомой в таких системах реконструкции, составляет около 200 пар оснований. Кроме того, для образования нуклеосомы необходимо эквимолярное количество гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Если

какого-либо гистона в смеси для реконструкции оказывается недостаточно, образования характерных бусин не происходит. Однако гистон H1 для реконструкции не нужен; этот факт перекликается с тем, что гистон H1 присутствует не во всех нуклеосомах эукариотических клеток. Исследования дифракции рентгеновских лучей также показывают, что для получения картины, характерной для хроматина, необходимо добавить гистоны H2A, H2B, H3 и H4.

29.5. Минимальная нуклеосома («ядро» нуклеосомы) состоит из ДНК длиной 140 пар оснований, намотанной на октамер гистонов

Содержание ДНК в нуклеосомах различных организмов и типов клеток колеблется от 160 до 240 пар оснований (табл. 29.2). Что лежит в основе этих различий? И в этом случае использование нуклеаз оказалось весьма

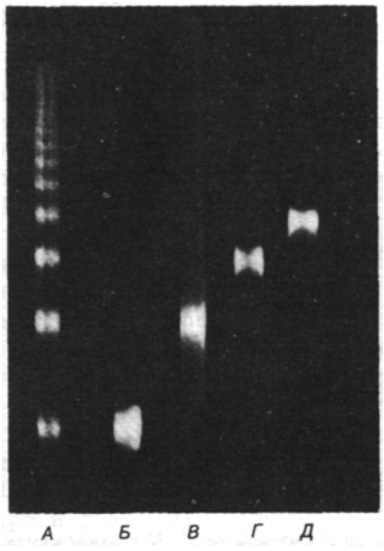


Рис. 29.5. Гель-электрофорез фрагментов ДНК хроматина, полученных с помощью ограниченного гидролиза микрококковой нуклеазой. На дорожку *А* была нанесена нефракционированная смесь. При центрифугировании в градиенте концентрации сахарозы были получены фракции мономеров (*Б*), димеров (*В*), тримеров (*Г*) и тетрамеров (*Д*). [Finch J. T., Noll M., Kornberg R. D., Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 3321 (1975).]

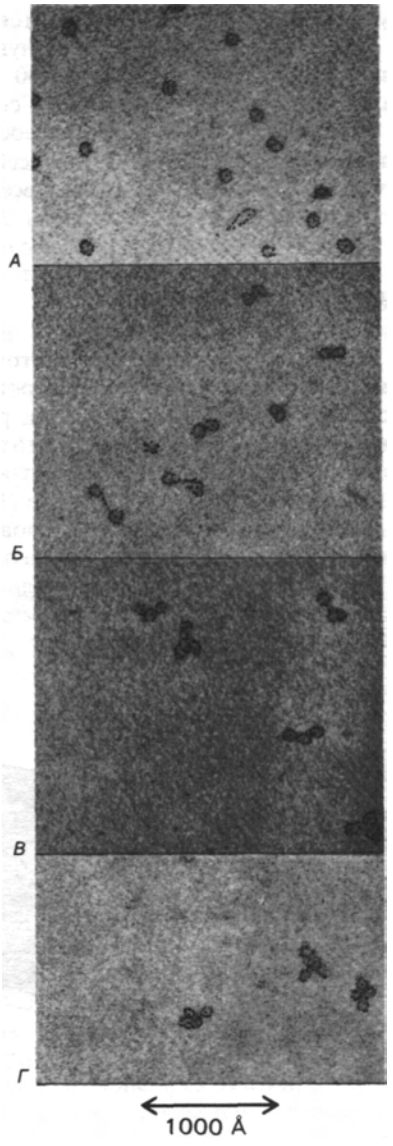


Рис. 29.6. Электронные микрофотографии мономеров (*А*), димеров (*Б*), тримеров (*В*) и тетрамеров (*Г*) нуклеосом, полученных, как описано в подписи к рис. 29.5. [Finch J. T., Noll M, Kornberg R.D., Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 3321 (1975).]

информативным. Нуклеосомы можно в свою очередь гидролизовать микрококковой нуклеазой; при этом получаются *частицы минимальной нуклеосомы* (нуклеосомного «ядра»), содержащие 140 пар оснований, независимо от исходного содержания ДНК в расчете на одну нуклеосому. Эта минимальная нуклеосома, по всей вероятности, практически одинакова у всех эукариот. *Она состоит из фрагмента ДНК длиной 140 пар оснований, связанного с октамером гистонов (по два гистона H2A, H2B, H3 и H4).*

Минимальные нуклеосомы были получены в кристаллическом виде и в настоящее время исследуются с помощью электронной микроскопии (рис. 29.7) и дифракции рентгеновских лучей. Кристаллизация этих частиц показывает, что нуклеосомы хроматина весьма гомогенны. Арон Клуг и Джон Финч (Aaron Klug, John Finch) установили, что минимальная нуклеосома (нуклеосомное «ядро») представляет собой уплощенную частицу размером 110 x 100 x 55 А и состоит из двух слоев. Фрагмент ДНК

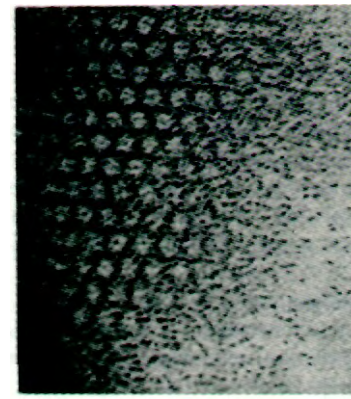


Рис. 29.7. Электронная микрофотография кристалла минимальных нуклеосом. Центры соседних нуклеосом в этом гексагональном слое находятся на расстоянии 100 А друг от друга. [Finch J. T. et al, Nature, 269, 31 (1977).]

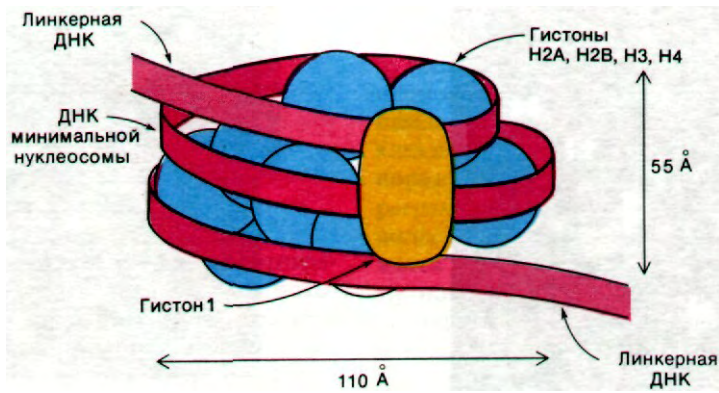


Рис. 29.8. Схематическое изображение нуклеосомы. Двойная спираль ДНК (красная полоса) намотана на октамер гистонов (по две молекулы H2A, H2B, H3 и H4; изображены голубым). Гистон H1 (желтый цвет) связывается с наружной стороной этой минимальной нуклеосомы и с линкерной ДНК. (Kornberg A., DNA Replication. Freeman and. Co., 1980.)

Таблица 29.2. **Содержание ДНК в нуклеосомах**

Тип клеток	Число пар оснований
Дрожжи	165
Клетки HeLa	183
Костный мозг крысы	196
Печень крысы	
Почки крысы	196
Яйцевод курицы	
Эритроциты курицы	207
Гаструла морского ежа	218
Сперма морского ежа	241

длиной 140 пар оснований намотан снаружи на сердцевину и образует $1^3/_4$ оборота левозакрученной суперспирали с шагом примерно 28 А (рис. 29.8).

Как уже упоминалось, гистон Н1 не всегда присутствует в нуклеосоме. Последовательность аминокислот в гистоне Н1 наиболее вариабельна из всех пяти гистонов. К тому же гистон Н1 отличается от других гистонов по стехиометрии: на нуклеосому приходится одна молекула гистона Н1. Кроме того, гистон Н1 легко отделяется от нуклеосом, что указывает на его периферическую локализацию, т.е. он не является частью гистоновой сердцевины. Нуклеосомы теряют гистон Н1, когда ДНК в их составе укорачивается со 160 до 140 пар оснований. Таким образом, гистон Н1 почти наверняка расположен вне нуклеосомы, ближе к линкерной ДНК. Гистон Н1 может служить мостиком между различными нуклеосомами и способствовать таким образом повышению компактности хроматина.

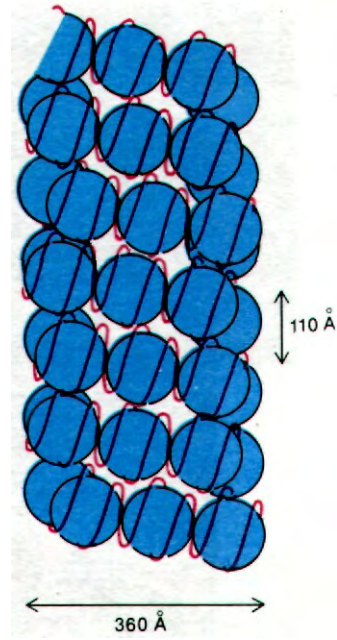


Рис. 29.9. Предполагаемая соленоидная модель хроматина. На один оборот спирали приходится шесть нуклеосом (показаны синим цветом). Двойная спираль ДНК (красная) намотана на каждую нуклеосому. [Finch J.T., Klug A., Proc. Nat. Acad. Sci., 73, 1900 (1976).]

29.6. Нуклеосома - первый уровень конденсации ДНК

Накручивание ДНК на нуклеосомную сердцевину обеспечивает конденсацию ДНК, так как уменьшает ее линейные размеры. Участок ДНК длиной 200 пар оснований имеет в растворе длину 680 А. В нуклеосоме это количество ДНК укладывается в частицу диаметром 100 А. Таким образом, *плотность упаковки* (степень конденсации) нуклеосомы составляет примерно 7. Сравнима ли эта величина со степенью конденсации ДНК в хромосоме? Метафазные хромосомы человека, которые находятся в сильно конденсированном состоянии, содержат $5{,}3 \cdot 10^9$ пар оснований, что соответствует контурной длине ДНК 180 см. Эта ДНК упакована в 46 цилиндрических структур, общая длина которых составляет 200 мкм. Таким образом, плотность упаковки ДНК в метафазных хромосомах равна приблизительно 10^4. В интерфазных ядрах, где хроматин находится в более дисперсном состоянии, плотность упаковки для ДНК составляет примерно 10^2–10^3. Очевидно, нуклеосома представляет собой лишь первый уровень конденсации ДНК.

Каков следующий уровень организации ДНК? Одна из возможностей состоит в том, что сами нуклеосомы укладываются в спираль. Например, предложена соленоидная модель хроматина диаметром 360 А с плотностью упаковки около 40 (рис. 29.9). Складывание таких соленоидов в петли может дать дополнительную конденсацию. По всей вероятности, в стабилизации структуры хромосомы высших порядков участвуют различные негистоновые белки. Например, в лишенных гистонов метафазных хромосомах выявляется центральный белковый остов, окруженный множеством очень длинных петель ДНК (рис. 29.10). По-видимому, эти петли ДНК закреплены на остове. Такая организация может иметь важное значение для передвижения хромосом в митозе и мейозе.

29.7. Репликация эукариотической ДНК начинается во многих местах и идет в двух направлениях

Подобно другим молекулам ДНК, эукариотическая ДНК *реплицируется полуконсерва-*

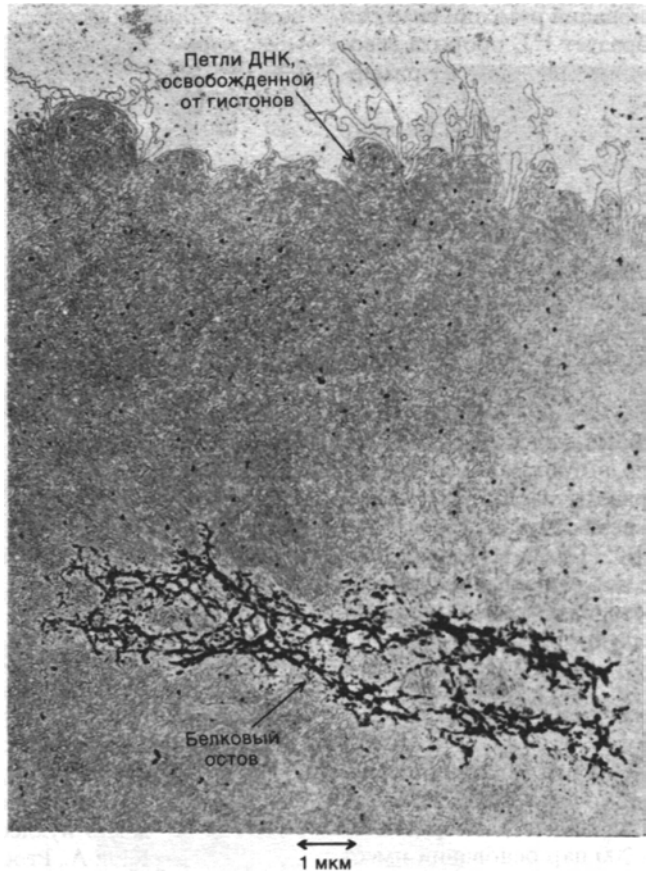


Рис. 29.10. Электронная микрофотография ДНК, с которой удалены гистоны. ДНК прикрепляется к центральному белковому остову. Гистоны удалили из метафазных хромосом клеток HeLa, обработав их полианионами. (Печатается с любезного разрешения д-ра Ulrich Laemmli.)

тивно. Кроме того, реплицированная ДНК полуконсервативно распределяется между сестринскими хроматидами метафазных хромосом (рис. 29.11). Методом электронной микроскопии было показано, что репликация эукариотической ДНК *начинается во многих точках и идет в двух направлениях.* Использование многих точек инициации необходимо для быстрой репликации, так как эукариотические ДНК имеют огромную длину. Например, самая длинная хромосома дрозофилы содержит ДНК длиной 2,1 см, или 62000 kb. Репликационная вилка ДНК дрозофилы движется со скоростью 2,6 kb/мин (сравните со скоростью движения вилки у *E. coli* 16 kb/мин). Если бы в самой большой хромосоме дрозофилы существовала только одна точка начала репликации, то ее удвоение заняло бы более 16 сут. На самом деле время репликации составляет менее 3 мин. Это достигается *кооперативным действием более чем 6000 репликационных вилок на одну молекулу ДНК.* Молекула ДНК из ядра дрозофилы, находящегося на стадии дробления, представляет собой набор следующих один за другим участков репликации, или «глаз» (рис. 29.12). Активирование каждой точки инициации порождает две расходящиеся репликационные вилки. Расширяющиеся в обоих направлениях «глаза» сливаются и образуют две дочерние молекулы ДНК (рис. 29.13). «Глаз» внутри другого «глаза» никогда не наблюдался. Из этого следует что начало репликации не может снова реактивироваться, пока не закончится реплика-

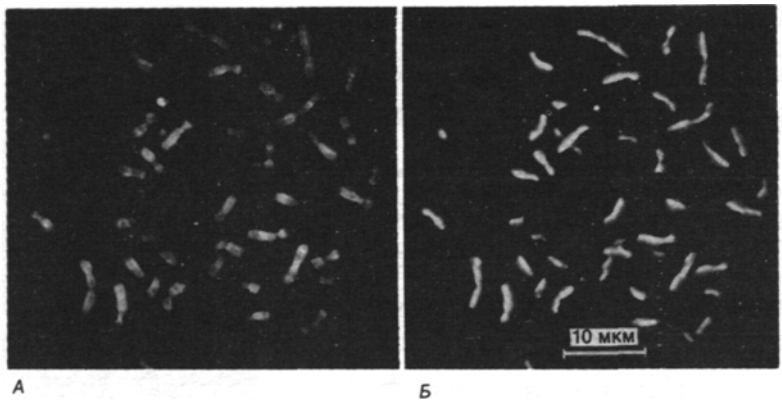


Рис. 29.11. Флуоресцентная микрофотография метафазных хромосом мужчины. ДНК в клетках дважды реплицировалась в среде, содержащей аналог тимидина 5-бромдезоксиуридин (BrdU). Хромосомы сначала окрасили хинакрином (*А*), отмыли и снова окрасили *бис*-бензимидазольным красителем Хехст 33258 (*Б*). BrdU тушит флуоресценцию второго красителя, поэтому сестринские хроматиды, содержащие ДНК, в которой только одна полинуклеотидная цепь замещена BrdU, флуоресцирует ярче, чем ДНК с BrdU в обеих цепях. (Печатается с любезного разрешения д-ра Sammuel Latt.)

ция всей молекулы ДНК.

В эукариотических клетках имеются ДНК-полимеразы трех типов (табл. 29.3*)*. α-Полимераза играет основную роль в репликации хромосомы, а β-фермент участвует в репарации ДНК. Когда покоящиеся клетки начинают быстро делиться, количество α-полимеразы возрастает более чем в 10 раз. γ-Полимераза отвечает за репликацию митохондриальной ДНК. Как и прокариотические ДНК-полимеразы, эти ферменты используют в качестве активированных предшественников дезоксирибонуклеозидтрифосфаты и осуществляют элонгацию затравки по матрице в направлении 5'—>3'. Но в отличие от прокариот эукариотические ДНК-полимеразы не обладают

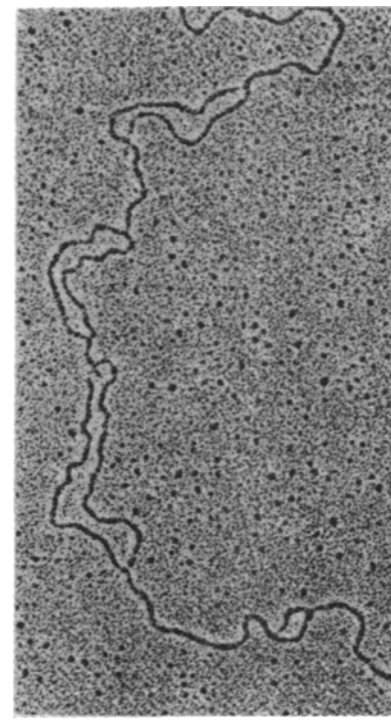


Рис. 29.12. Электронная микрофотография реплицирующейся хромосомной ДНК из дробящегося ядра эмбриона дрозофилы. «Глаза» - только что реплицированные участки. (Печатается с любезного разрешения д-ра David Hogness.)

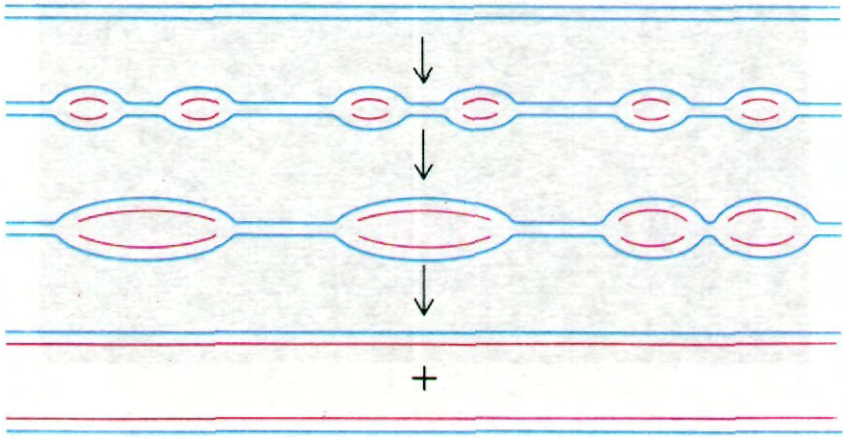


Рис. 29.13. Схематическое изображение репликации эукариотической хромосомы. Родительская ДНК показана синим цветом, новообразованная ДНК-красным.

нуклеазной активностью. Скорее всего функцию исправления ошибок выполняют нуклеазы, ассоциированные с этими полимеразами в мультиферментных комплексах.

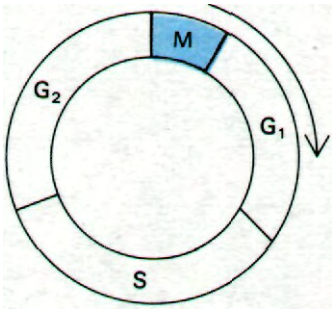


Рис. 29.14. Фазы клеточного цикла эукариотической клетки: митоз (M); фаза покоя 1, перед синтезом ДНК (G_1); период синтеза ДНК (S); фаза покоя 2, после синтеза ДНК (G_2). Продолжительность фаз зависит от типа клеток и условий культивирования. Митоз - обычно самая короткая фаза.

29.8. Новые гистоны образуют новые нуклеосомы на отстающей дочерней цепи ДНК

В репликационных вилках синтез ДНК идет в направлении 5'—>3' по одной дочерней цепи и в направлении 3'—>5' по другой. Как и при репликации прокариотической ДНК (разд. 24.19), это происходит следующим образом: одна цепь, ведущая, синтезируется непрерывно, а другая, отстающая,- прерывисто. Как распределяются старые и новые гистоны? Чтобы решить этот вопрос, синтез ДНК проводили в присутствии ингибитора белкового синтеза циклогексимида. В этих условиях синтез ДНК прекращается в течение примерно 15 мин. При действии ДНКазы I половина новообразованной ДНК полностью распадается, а другая половина расщепляется на фрагменты длиной 200 пар оснований. Этот эксперимент, а также данные, полученные с помощью метки тяжелыми изотопами, показали, что родительские гистоны ассоциированы только с одной из двухспиральных дочерних ДНК, тогда как другая остается голой из-за отсут-

Таблица 29.3. **Эукариотические ДНК-полимеразы**

Тип	Локализация	Основная функция	Масса, кДа
α	Ядро	Репликация ядерной ДНК	140
β	»	Репарация ядерной ДНК	40
γ	Митохондрии	Репликация митохондриальной ДНК	150

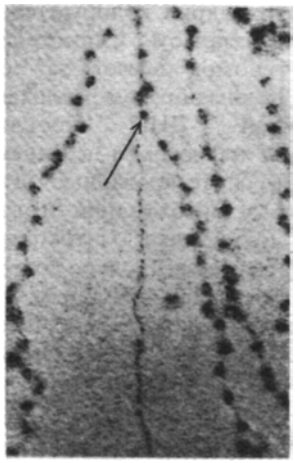


Рис. 29.15. Асимметричная репликационная вилка, возникшая в результате синтеза ДНК в присутствии циклогексимида, блокирующего образование новых гистонов. Одна из дочерних молекул ДНК покрыта бусинами, другая остается голой. Это показывает, что родительские гистоны связаны только с одной из дочерних молекул. [Riley D., Weintraub H., Proc. Nat. Acad. Sci., **76,** 331 (1979).]

ствия новых гистонов. Эта интерпретация находит прямое подтверждение на электронных микрофотографиях, где видно, что в области репликационной вилки одна из дочерних нитей покрыта бусинами, а другая - нет (рис. 29.15). Иными словами, родительские гистоны распределяются во время репликации консервативно[1]. Такое поведение гистонов показывает, что гистоны не отделяются от ДНК во время репликации. *Старые гистоны остаются на двухцепочечной ДНК, содержащей ведущую цепь, тогда как новые гистоны садятся на ДНК, содержащую отстающую цепь.* Причина этого различия между дочерними молекулами ДНК заключается, очевидно, в том, что гистоны гораздо прочнее связываются с двухцепочечной ДНК, чем с одноцепочечной. Старые гистоны, по-видимому, не удерживаются на отстающей цепи по той причине, что до соединения фрагментов Оказаки она содержит одноцепочечные участки.

[1] Недавно этот вывод подвергался серьезной критике в связи с тем, что по некоторым данным циклогексимид нарушает нормальное распределение гистонов во время репликации.— *Прим. перев.*

29.9. Митохондрии и хлоропласты содержат собственную ДНК

Не вся наследственная информация эукариотических клеток содержится в ядерной хромосомной ДНК. В результате генетических исследований дрожжей был открыт митохондриальный геном, отличный от ядерного генома. В 1949 г. Борис Эфрусси (Boris Ephrussi) обнаружил, что некоторые мутанты пекарских дрожжей не способны к окислительному фосфорилированию. Эти дефектные по дыханию мутанты медленно растут за счет брожения. Они называются petites (что по-французски означает «маленькие»), так как образуют очень маленькие колонии. Генетический анализ привел к неожиданному открытию, что мутации petites сегрегируют независимо от ядра; это навело на мысль о том, что митохондрии обладают собственным геномом. И действительно, через несколько лет в митохондриях была обнаружена ДНК. Более того, митохондриальная ДНК из штамма petite отличалась по плавучей плотности от митохондриальной ДНК дрожжей дикого типа; из этого следовало, что у мутанта изменена значительная часть митохондриального генома. Вслед за этим было показано, что хлоропласты фотосинтезирующих эукариот тоже содержат ДНК и что она реплицируется, транскрибируется и транслируется.

Митохондриальная ДНК животных клеток - кольцевая двухцепочечная молекула с контурной длиной около 5 мкм, что соответствует 15 kb. Дрожжевая митохондриальная ДНК обычно примерно в 5 раз длиннее, а хлоропластная - в 10 раз длиннее. Молекулы ДНК в митохондриях и хлоропластах не связаны с гистонами. Они относительно невелики, сравнимы по величине с вирусными геномами. Лучше всего изучен митохондриальный геном дрожжей, кодирующий примерно десять белков, две молекулы рибосомной РНК и около 26 видов транспортной РНК. Молекулы, кодируемые митохондриальной ДНК и синтезируемые внутри этой органеллы, составляют всего около 5% митохондриального белка. Таким образом, большая часть белков митохондрии кодируется ядерным геномом. Однако

генетический вклад митохондриальной ДНК необходим. Например, три из семи субъединиц цитохромоксидазы и три из десяти субъединиц АТРазы внутренней мембраны митохондрий кодируются митохондриальным геномом. Существование отдельных геномов влечет за собой ряд вопросов. Каким образом репликация митохондриальной ДНК координируется с удвоением хромосом и делением клетки? Как белки, синтезированные в цитозоле, проникают в митохондрии и взаимодействуют с продуктами митохондриальных генов? Но самое загадочное состоит в следующем: зачем митохондриям нужны собственные геномы, если 95% их белков кодируются ядерным геномом? Ответов на эти интригующие вопросы пока нет.

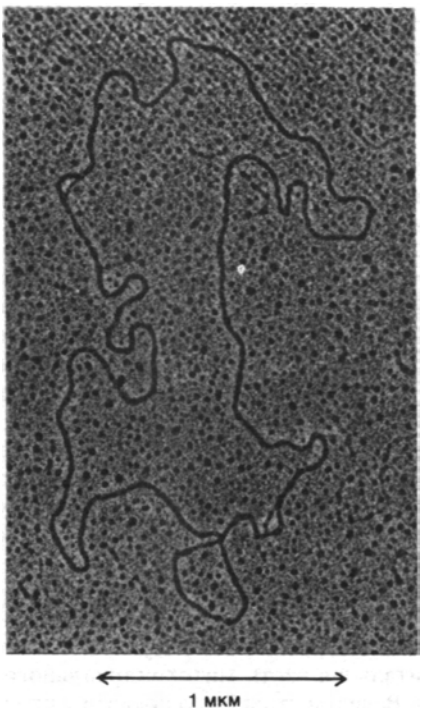


Рис. 29.16. Электронно-микроскопическое изображение молекулы митохондриальной ДНК, содержащей два генома, соединенных «голова к хвосту» с образованием кольца. Репликация этой молекулы ДНК только что началась. Стрелками показаны две петли, расположенные на противоположных сторонах кольца. Эти петли с вытесненной цепью (D-петли, от англ. displacement - вытеснение) содержат новосинтезированную ДНК. Более тонкая линия в каждой петле - вытесненный одноцепочечный участок родительской ДНК. (Печатается с любезного разрешения д-ра David Clayton.)

29.10. Эукариотическая ДНК содержит много повторяющихся последовательностей оснований

Рой Бриттен (Roy Britten) и его сотрудники исследовали кинетику реассоциации ДНК, денатурированной нагреванием, и обнаружили, что эукариотическая ДНК в отличие от прокариотической ДНК содержит много повторяющихся последовательностей оснований. В этих экспериментах ДНК дробили на короткие фрагменты и затем денатурировали нагреванием раствора выше температуры плавления ДНК ($T_{пл}$). Затем полученный раствор одноцепочечной ДНК охлаждали до температуры примерно на 25°С ниже $T_{пл}$, оптимальной для реассоциации комплементарных цепей с образованием двухспиральной ДНК. Кинетику реассоциации можно регистрировать самыми различными способами. Один из методов состоит в измерении поглощения раствора при 260 нм (разд. 24.9). При этой длине волны коэффициент поглощения двухцепочечной ДНК примерно на 40% ниже, чем соответствующая величина для одноцепочечной ДНК; это явление называется *гипохромизмом*. В основе другого экспериментального подхода лежит тот факт, что *двухцепочечная ДНК связывается колонками с гидроксиапатитом (фосфатом кальция), а одноцепочечная проскакивает*. В этом методе привлекает то, что он позволяет фракционировать большие количества ДНК на основе скорости ее реассоциации после тепловой денатурации.

Наблюдаемая кинетика реассоциации ДНК *E. coli* или фага Т4 соответствует ожидаемой кинетике бимолекулярной реакции

$$S + S' \xrightarrow{k} D,$$

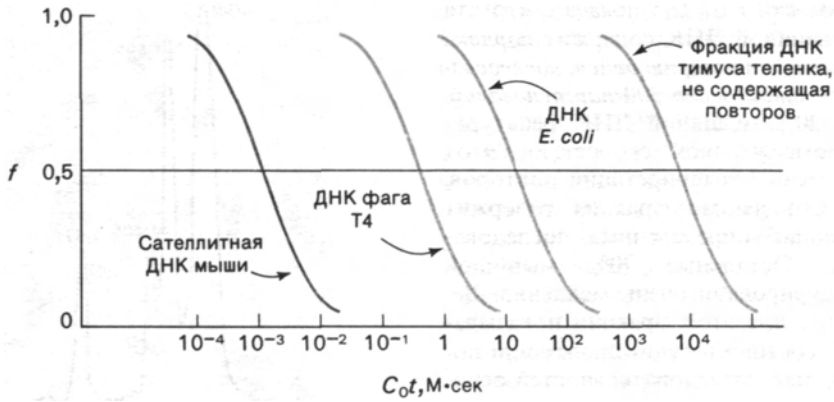


Рис. 29.17. Кривые зависимости f от C_0t («кривые C_0t») отображают кинетику реассоциации нескольких денатурированных нагреванием ДНК. По оси ординат отложена доля одноцепочечных молекул, по оси абсцисс - C_0t. Быстрая реассоциация сателлитной ДНК мыши показывает, что она содержит огромное количество повторяющихся последовательностей. [Britten R. J., Kohne D. E., Science, **161,** 530 (1968).]

где S и S' - комплементарные одноцепочечные молекулы, D - реассоциировавшая двойная спираль и k - константа скорости ассоциации. В такой реакции доля одноцепочечных молекул f снижается со временем в соответствии с уравнением

$$f = \frac{1}{1 + kC_0t},$$

где C_0 - исходная концентрация ДНК (выраженная в молях нуклеотидов в 1 л), а t - время в секундах. Для определенной ДНК и заданных экспериментальных условий (т. е. ионной силы, температуры, размера фрагментов ДНК) f зависит только от C_0t - произведения концентрации ДНК на время. Кинетику реассоциации удобно графически изображать, откладывая зависимость f от десятичного логарифма C_0t. Такая *кривая* C_0t имеет сигмоидную форму (рис. 29.17). Характеристикой того или иного препарата ДНК служит величина $C_0t_{0,5}$, которую легко определить с помощью этой кривой. $C_0t_{0,5}$ - значение C_0t, при котором происходит реассоциация половины ДНК (f= 0,5). Для ДНК *E. coli* значение $C_0t_{0,5}$ составляет примерно 9 М•с, для фага T4 $C_0t_{0,5}$ = 0,3 М•с. Эти числа показывают, что ДНК *E. coli* реассоциирует примерно в 30 раз медленнее, чем ДНК фага T4. Объясняется это тем, что ДНК *E. coli* длиннее и число разных видов фрагментов, которые содержатся в препарате ДНК, разрушенной силами сдвига, больше, чем в препарате ДНК T4. Итак, *концентрация комплементарных фрагментов в растворе фрагментированной ДНК E. coli ниже, чем в растворе ДНК фага T4* (содержащем такое же количество нуклеотидов), *и, следовательно, скорость реассоциации ниже.* Исследование ряда прокариотических ДНК показало, что величина $C_0t_{0,5}$ прямо пропорциональна размеру генома.

Когда с помощью этого метода стали исследовать ДНК мыши, получили неожиданный результат. Геномы млекопитающих примерно на три порядка величины больше, чем геном *E. coli,* и предполагалось, что будет получена величина $C_0t_{0,5}$ порядка 10^4 М•с. Раствор ДНК с концентрацией 10^{-4} М и с такой величиной $C_0t_{0,5}$ должен реассоциировать наполовину за 10^8 с (примерно 3 года). К удивлению исследователей, они обнаружили, что 10% ДНК мыши реассоциирует наполовину за несколько секунд. *Эта фракция ДНК мыши реассоциирует быстрее, чем даже самые маленькие вирусные ДНК, и, следовательно, содержит много повторяющихся последовательностей.* Анализ кри-

вой зависимости f от C_0t показал, что эта фракция мышиной ДНК содержит *порядка миллиона копий повторяющейся последовательности длиной около 300 пар оснований.* Примерно 20% мышиной ДНК ренатурирует с промежуточной скоростью. Этот факт, согласно интерпретации авторов, указывал, что данная фракция содержит 10^3—10^4 копий определенных последовательностей. Остальные 70% мышиной ДНК ренатурировали очень медленно. Величина $C_0t_{0,5}$ для этой фракции показывала, что она состоит из уникальных или почти уникальных последовательностей оснований.

Все изученные до настоящего времени эукариотические геномы, кроме, возможно, дрожжей, содержат повторяющиеся последовательности ДНК, тогда как прокариоты ее не содержат. Например, человеческая ДНК на 30% состоит из последовательностей, повторяющихся по меньшей мере 20 раз. Относительное содержание высокоповторяющейся, умеренно повторяющейся и уникальной ДНК различно у разных видов.

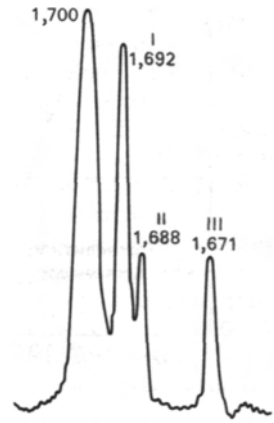


Рис. 29.18. На этой кривой седиментации видны три отчетливых пика сателлитной ДНК (ρ = 1,692, 1,688 и 1,671). Показан результат равновесного центрифугирования ДНК *D. virilis* в нейтральном градиенте CsCl. [Gall J. G., Cohen E. H., Atherton D. D., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38, 417 (1974).]

29.11. Высокоповторяющаяся ДНК (сателлитная ДНК) локализована в центромерах

Многие высокоповторяющиеся ДНК можно выделить методом центрифугирования в градиенте плотности, так как их плавучая плотность отличается от плотности основной ДНК. Например, ДНК *Drosophila virilis* дает главный пик и три сателлитных пика с меньшей плотностью (рис. 29.18). Эти сателлитные пики содержат исключительно повторяющуюся ДНК. Каждая из них представляет собой повторяющуюся последовательность гептануклеотидов:

Роль высокоповторяющейся ДНК неизвестна. Но хромосомная локализация этой фракции была определена с помощью метода *гибридизации in situ,* разработанного Джозефом Голлом и Мэри Лу Пардью (Joseph Gall, Mary Lou Pardue). Клетки иммобилизовали под тонким слоем агара и обрабатывали щелочью для денатурации ДНК. Затем этот препарат инкубировали с меченной тритием РНК, транскрибированной *in vitro* очищенной сателлитной ДНК в качестве матрицы. Гибриды радиоактивной РНК с участками хромосомы, содержащими сателлитную ДНК, выявляли с помощью радиоавтографии (рис. 29.19). Был получен очень четкий результат: *сателлитная ДНК мыши встречается только в области центромер.* Локализация этих последовательностей и отсутствие в клетке комплементарных им РНК объясняются, по-видимому, тем, что сателлитные последовательности участвуют в перемещениях хромосом во время митоза и мейоза.

29.12. Гены, кодирующие рибосомные РНК, расположены один за другим тандемно и повторяются несколько сот раз

Гены, кодирующие молекулы рибосомных РНК, отличаются двумя особенностями. Во-первых, они *повторяются тандемно*

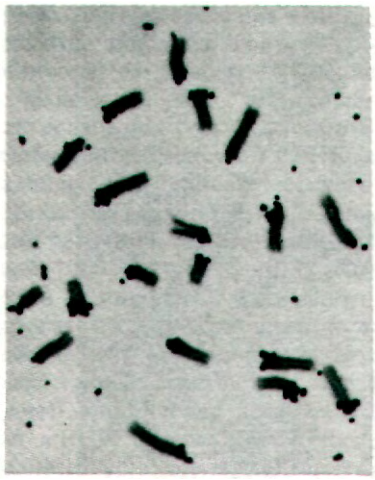


Рис. 29.19. Радиоавтограф мышиных клеток, на котором видна локализация сателлитной ДНК. (Печатается с любезного разрешения д-ра Joseph Gall.)

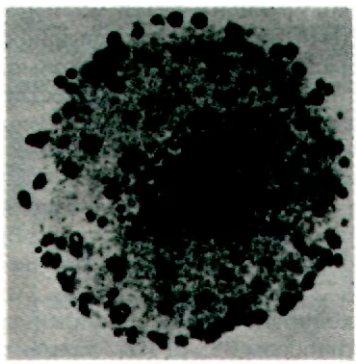


Рис. 29.20. Микрофотография ядра, выделенного из ооцита ксенопуса. Ядро окрашено, чтобы были видны сотни ядрышек, образующихся при амплификации генов рибосомной РНК. [Brown D. D., Dawid I. B., Science, 160, 272 (1968).]

один за другим. Почти у всех эукариот имеется более 100 копий этих генов. Во-вторых, большинство генов рРНК расположено в особых участках хромосом, ассоциированных с *ядрышками*. В клетках мутантов, лишенных ядрышек, синтезируется очень мало рРНК; поэтому они нежизнеспособны. Об этих генах многое известно, главным образом благодаря работам Макса Бернстила, Доналда Брауна, Оскара Миллера (Max Birnstiel, Donald Brown, Oscar Miller) и их сотрудников. Гены, кодирующие четыре рибосомные РНК - 18S-, 5,8S-, 28S- и 5S-рРНК,- были выделены в чистом виде из ДНК африканских шпорцевых лягушек *Xenopus laevis* и *Xenopus mulleri*. Выбор пал на шпорцевых лягушек по той причине, что их ооциты содержат особенно много этих генов.

Гены 18S-, 5,8S- и 28S-рРНК собраны вместе (образуют кластеры) и тандемно повторяются. Гибридизация *in situ* показала, что эти гены расположены в ядрышках. Повторяющаяся единица состоит из *гена, кодирующего 40S-предшественник РНК и спейсер* (рис. 29.21). 40S-предшественник (8kb) модифицируется и расщепляется, давая зрелые 18S-, 5,8S- и 28S-рРНК

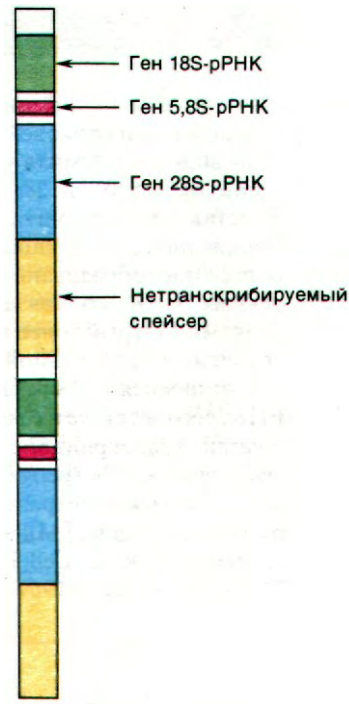


Рис. 29.21. Организация генов 40S-предшественника 18S- 5,8S- и 28S-рРНК у ксенопуса. Тандемно повторяющиеся гены разделены нетранскрибируемыми участками (спейсерами). Длина повторяющегося элемента 13 kb.

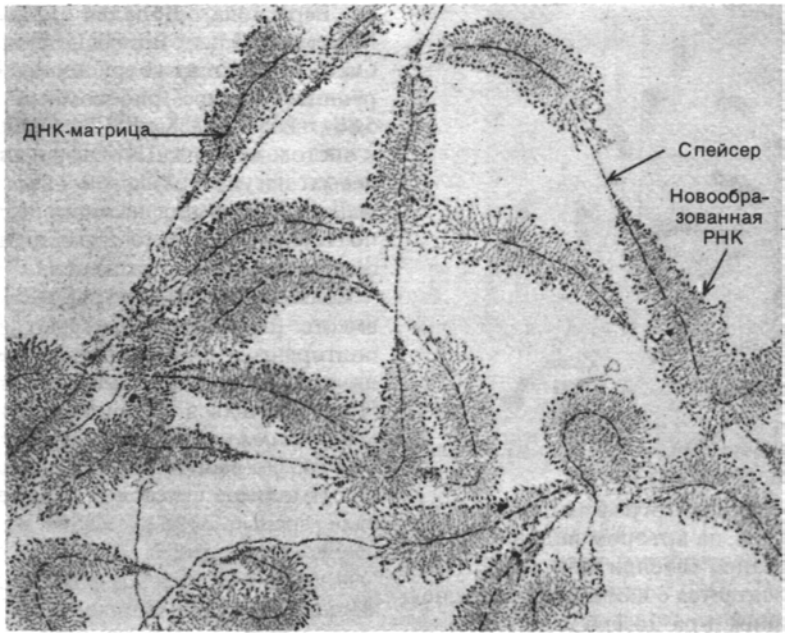


Рис. 29.22. На этой электронной микрофотографии ядрышковой ДНК ясно видна тандемная укладка генов 18S-, 5,8S- и 28S-рРНК. Толстая осевая нить - ДНК. Тонкие нити, отходящие в стороны,- новообразованные молекулы РНК со связанными белками. Острый конец каждой «елочки», образованной синтезирующимися молекулами РНК, соответствует точке инициации транскрипции. Голые участки между острыми концами «елочек» - нетранскрибируемые спейсеры. [Miller O. L., Jr., Beatty B. R., J. Cell Physiol., 74 (suppl. 1), 225 (1969).]

(разд. 29.21). Спейсер (нетранслируемый участок) не транскрибируется (рис. 29.22). Соматические клетки лягушек содержат примерно 500 копий этой повторяющейся единицы, и все они расположены друг за другом. В процессе оогенеза происходит удивительная избирательная амплификация (увеличение количества) этих генов. Они реплицируются несколько тысяч раз и дают примерно $2 \cdot 10^6$ копий. Количество генов, кодирующих рРНК, достигает 75% всей ДНК ооцита. Амплифицированная ДНК представляет собой внехромосомные кольца, прикрепленные к множеству новых ядрышек. Такая *избирательная амплификация гена* позволяет ооцитам накопить 10^{12} рибосом, необходимых для очень быстрого синтеза белка во время дробления. Если бы амплификации гена не было, образование 10^{12} рибосом заняло бы несколько веков!

Ген, кодирующий самую маленькую молекулу рибосом - 5S-рРНК, также тандемно повторяется. И соматические клетки, и ооциты содержат около 24000 копий этого гена, кодирующего молекулу РНК длиной 120 нуклеотидов. Эти гены собраны в группы (в кластеры) и располагаются на концах большинства хромосом лягушки. И в этом случае между генами данной рРНК имеется область нетранскрибируемого спейсера (рис. 29.23). На самом деле спейсер в несколько раз длиннее самого гена. Любопытно, что он содержит нетранскрибируемый псевдоген, последовательность оснований которого сходна с самим геном. Роль спейсера в этом и в других эукариотических генах остается загадкой.

29.13. Гены гистонов собраны вместе и повторяются тандемно много раз

Как организованы гены, кодирующие белки? Одними из первых были выделены и охарактеризованы гены гистонов благодаря изобилию гистоновой мРНК в быстро делящихся эмбрионах морского ежа. Эти морские беспозвоночные развиваются от стадии зиготы до стадии бластулы, содержащей 1000 клеток, за 10 ч. Поэтому для сборки нового хроматина необходимо синтезировать большое количество гистонов. Действительно, в период раннего эмбриогенеза гистоны составляют более четверти всего синтезированного белка. Гистоновая мРНК содержится в еще большем количестве - на ее долю приходится около 70% всех информационных РНК, синтезируемых на этой стадии, поэтому ее сравнительно легко выделить. После выделения гистоновой мРНК была исследована кинетика ее гибридизации с ДНК морского ежа для определения числа копий гистоновых генов. *Скорость гибридизации была в несколько сот раз выше, чем она должна быть в случае уникальных последовательностей: это показывало, что для гистоновых генов характерна очень высокая повторяемость.* Число копий гистоновых генов у различных видов морского ежа колеблется от 300 до 1000. У других организмов повторяемость ниже (табл. 29.4). Число копий гистоновых генов у того или иного организма, по-видимому, коррелирует с потребностью в быстром синтезе гистоновых мРНК.

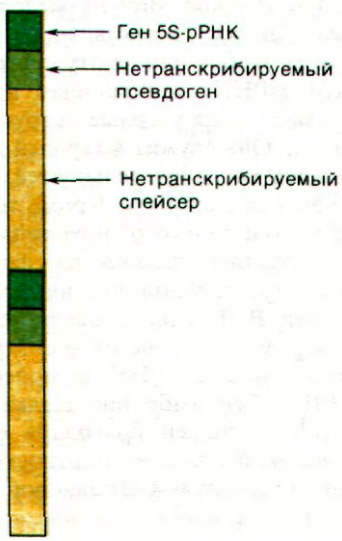


Рис. 29.23. Организация генов 5S-рРНК *Xenopus laevis*. Эти тандемно повторяющиеся гены также разделены нетранскрибируемыми спейсерами. Повторяющийся элемент имеет длину примерно 750 пар оснований.

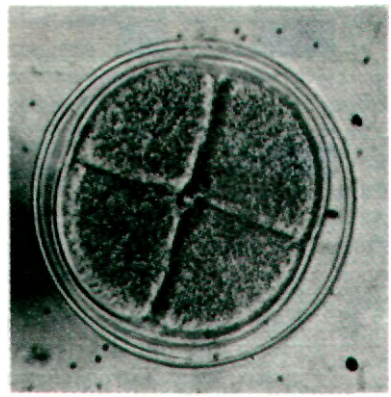


Рис. 29.24. Световая микрофотография эмбриона морского ежа на стадии четырех клеток. (Печатается с любезного разрешения д-ра Annamma Spudich.)

Как организованы в геноме многократно повторяющиеся гены гистонов? Для получения фракции ДНК, обогащенной генами гистонов, использовали тот факт, что эти гены содержат больше пар G—C (55%), чем большая часть ДНК морского ежа (42%), и, следовательно, имеют более высокую плавучую плотность. При расщепле-

Таблица 29.4. **Повторяемость гистоновых генов**[1]

Вид	Число копий
Морской еж	300-1000
Плодовая мушка (*Drosophila melanogaster*)	110
Шпорцевая лягушка (*Xenopus laevis*)	20-50
Мышь	10-20
Курица	10
Человек	30-40

[1] У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* имеется только два гистоновых гена на гаплоидный геном.- *Прим. перев.*

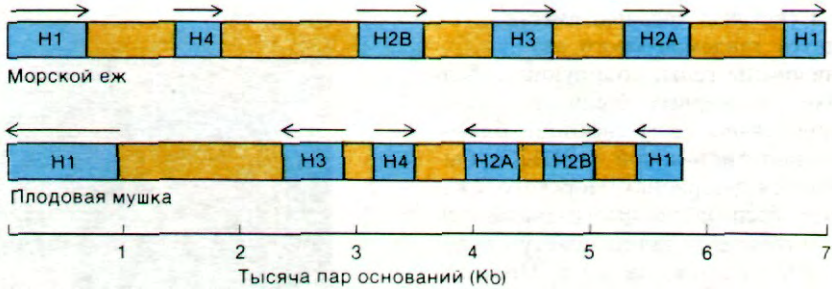


Рис. 29.25. Карта сгруппированных в кластеры гистоновых генов морского ежа (*Strongylocentrotus purpuratus*) и плодовой мушки (*Drosophila melanogaster*). Кодирующиеучасткизакрашенысиним цветом, спейсеры (нетранскрибируемые участки) - желтым. Стрелки показывают направление транскрипции.

нии такой обогащенной ДНК одной из рестриктирующих эндонуклеаз получались фрагменты длиной 7kb, которые гибридизовались с гистоновой мРНК. Затем эти фрагменты клонировали в клетках *E. coli* и исследовали с помощью ферментов рестрикции и электронной микроскопии. Результаты исследований показали, что *гены, кодирующие пять основных гистонов, сгруппированы вместе в составе основного повторяющегося элемента длиной 7 kb* (рис. 29.25). В этом повторяющемся элементе пять кодирующих участков чередуются с пятью спейсерами. Кодирующие последовательности не прерываются вставочными последовательностями в отличие от других эукариотических генов, описанных выше (разд. 26.12). *Группа из пяти гистоновых, генов повторяется тандемно много раз.* Повторы очень сходны друг с другом, но не идентичны. Это согласуется с тем, что гистоны H1, H2A и H2B представляют собой группы очень сходных белков, а не совершенно однородные полипептиды. В различных тканях и на разных стадиях развития экспрессируются различные гистоновые гены.

Какова функциональная роль такой организации генов? Их повторяемость, несомненно, имеет важное значение для быстрого синтеза большого количества гистоновой мРНК. Но причина, по которой повторы собраны тандемно вместе, не очень ясна. Соседство генов, кодирующих пять гистонов, может быть, играет важную роль в координации их синтеза, чтобы гистоны H2A, H2B, H3 и H4 образовывались в эквимолярном количестве, а гистон H1 - в половинном.

29.14. Многие белки, синтезирующиеся в больших количествах, кодируются уникальными генами

Мы уже видели, что гены рибосомных РНК и гистонов повторяются много раз. Представлены ли гены, кодирующие большое количество продукта, большим числом копий? Для ответа на этот вопрос Доналд Браун (Donald Brown) выделил ген фиброина шелка шелковичного червя *Bombyxmori*. Выбор пал на эту систему потому, что мРНК, кодирующая фиброин шелка, имеет характерные структурные особенности. Она служит матрицей для повторяющихся последовательностей аминокислот, богатых глицином. Кроме того, гигантские клетки только одного типа синтезируют огромные количества фиброина шелка на определенной стадии развития. Для очистки РНК использовали ее большой размер (9,1 kb) и высокое содержание G по сравнению с рРНК и молекулами других РНК. Ген фиброина шелка также был частично очищен благодаря его необычно высокой плавучей плотности. Гибридизация очищенной фиброиновой мРНК с ДНК показала, что *в гаплоидном геноме имеется только один ген фиброина шелка.*

Этот результат имел чрезвычайно важное значение для изучения экспрессии генов и дифференцировки у эукариот. Он показал, что большие количества одного определенного белка могут быть синтезированы, даже если в геноме имеется только одна копия кодирующего его гена. *Единственный ген фиброина шелка служит*

Рис. 29.26. Шелковичный червь (Фотография любезно представлена д-ром Karen Spraque.)

матрицей для синтеза примерно 10^4 молекул мРНК, сохраняющихся в течение нескольких дней. Каждая молекула мРНК служит матрицей для синтеза порядка 10^5 молекул белка. Таким образом, одного гена хватает для синтеза порядка 10^9 молекул белка в течение четырех дней. Создается впечатление, что повторяющиеся гены рибосомных РНК и гистонов скорее представляют собой исключение, чем правило. *Единственный ген фиброина шелка гораздо типичнее для генов, кодирующих белки, даже белки, синтезирующиеся в больших количествах.* Например, ретикулоциты содержат одну или несколько копий генов, кодирующих субъединицы гемоглобина (разд. 29.26). Подобно этому, большие количества овальбумина - основного компонента яичного белка - синтезируются в яйцеводе пасущихся кур, клетки которого содержат только одну копию овальбуминового гена на гаплоидный геном. Однако не следует упускать из виду и возможность избирательной амплификации гена как способ увеличения синтеза того или иного белка в клетках определенного типа. Некоторые опухолевые клетки в культуре приобретают устойчивость к аналогам фолиевой кислоты путем синтеза 200-кратного количества дигидрофолят-редуктазы по сравнению с нормальными чувствительными клетками. Такое количество фермента возникает вследствие *избирательной амплификации* гена дигидрофолят-редуктазы. Очевидно, эукариотический геном представляет собой весьма динамичную систему.

29.15. Большинство уникальных генов перемежается повторяющимися последовательностями

Примерно 70% ДНК самых разнообразных эукариот представляет собой уникальные последовательности. Как расположены эти уникальные гены относительно повторяющихся последовательностей? Анализ эукариотических хромосом различными методами показал, что *уникальные последовательности обычно чередуются с умеренно повторяющимися последовательностями, длина которых в типичном случае составляет 300 пар оснований.* Существует несколько тысяч различных умеренно повторяющихся последовательностей. Они повторяются в геноме несколько сот раз и в совокупности составляют 20% ДНК. Функция рассеянных, умеренно повторяющихся последовательностей ДНК неизвестна. Возможно, они служат участками связывания специфических регуляторных макромолекул, которые могут контролировать транскрипцию соседних уникальных структурных генов.

29.16 Почти все гены высших эукариот, кодирующие белки, имеют разорванное строение

Существование у эукариот повторяющихся генов и их чередование с уникальными генами не имеют никаких аналогий у прокариот. *Еще одно удивительное отличие в организации генома - присутствие у высших эукариот вставочных последовательностей практически во всех генах, кодирующих белки.* Как уже обсуждалось (разд. 26.12), эти вставочные последовательности (*интроны*) транскрибируются вместе с кодирующими последовательностями (*экзонами*), а затем удаляются в процессе образования зрелой мРНК. Число интронов в изученных до сих пор разорванных генах колеблется от 2 до 17 (табл. 29.5 и рис. 29.27)[1]. Некоторые интроны имеют большую длину. Например, ген β-глобина мыши содержит интрон длиной 550 пар оснований, т.е. он длиннее, чем его экзоны. Два фрагмента иммуноглобулинового гена разделены еще более длинным интроном - длиной 1250 пар оснований. В неко-

[1] Ген миозина содержит свыше 50 интронов! — *Прим. перев.*

Рис. 29.27. Карта гена кональбумина. Вставочные последовательности (интроны), которые транскрибируются, но не входят в состав зрелой мРНК, показаны желтым цветом.

торых генах общая длина интронов превышает длину экзонов. Так, ген овальбумина содержит около 7700 пар оснований, а его мРНК имеет длину всего 1859 нуклеотидов. *Как правило, вставочные последовательности разорванных генов длиннее, чем экспрессирующиеся последовательности.* Интересно отметить, что эволюционные изменения в последовательностях интронов происходят быстрее, чем в экзонах. Последовательности оснований меньшего интрона генов β-глобина мыши и кролика совершенно различны. Однако по длине они близки, а их положение в гене идентично. Еще более существенно, что последовательности на стыке интронов и экзонов, по которым происходит сплайсинг (сращивание), консервативны.

Были обнаружены и разорванные гены, кодирующие РНК. Например, один из генов транспортных РНК дрожжей содержит интрон длиной 14 пар оснований рядом с антикодоновой петлей зрелой тРНК. Митохондриальный ген, кодирующий рибосомную РНК, также имеет разорванное строение. В то же время многие рРНК и тРНК непрерывны. Гены гистонов морского ежа и плодовой мушки, по-видимому, также не содержат вставочных последовательностей. До настоящего времени такие «разорванные» структурные гены были обнаружены только у птиц и млекопитающих. Интересно выяснить, много ли разорванных генов у низших эукариот[1].

Открытие разорванных генов было полной неожиданностью и повлекло за собой возникновение ряда увлекательных проблем. Может быть, интроны отражают образование в эволюции новых белков из фрагментов старых? Участвуют ли интроны в регуляции выражения генов? Ясно, что появилась новая важная область исследований. Быстро накапливаются данные, касающиеся существенного вопроса - вырезания вставочных последовательностей из первичного транскрипта. Вскоре мы рассмотрим эти данные.

29.17. РНК в эукариотических клетках синтезируется тремя различными РНК-полимеразами

Перейдем теперь к транскрипции. В эукариотических клетках существует три вида РНК-полимераз, синтезирующих РНК. Они различаются по специфичности к матрице, локализации и чувствительности к ингибиторам. Полимераза типа I локализована в ядрышках, где она транскрибирует тандемные повторы, кодирующие рибосомные 18S-, 5,8S- и 28S-РНК. Другие молекулы РНК - 5S-рРНК и все тРНК - синтезируются другой РНК-полимеразой типа III, которая находится не в ядрышке, а в нуклеоплазме. Большие молекулы РНК-предшественники, из которых образуются мРНК, синтезируются РНК-полимеразой II, также содержащейся в нуклеоплазме. У прокариот же все виды клеточной РНК синтезируются одной и той же РНК-полимеразой. Общее свойство эукариотических РНК-полимераз заключается в том, что в их состав входят две большие и несколько маленьких субъединиц.

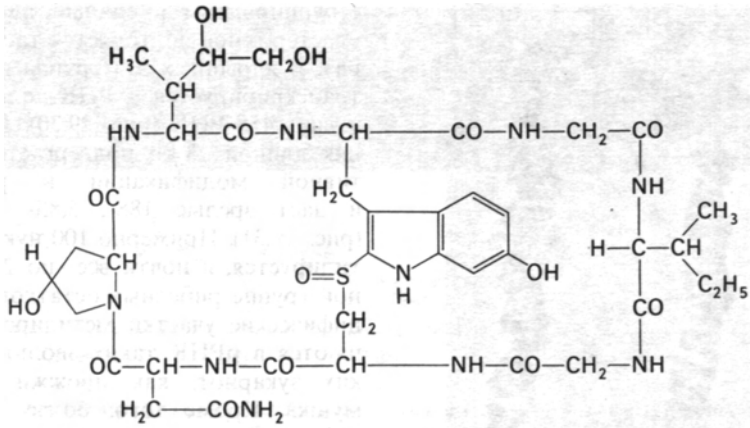
29.18. Грибной яд α-аманитин - мощный ингибитор РНК-полнмеразы II

Каждый год во всем мире более 100 человек погибает от отравления ядовитыми грибами, в частности *Amanitia phalloides,* (бледной поганкой). Один из токсинов этих

Таблица 29.5. **Некоторые эукариотические гены, имеющие разорванное строение**

Ген	Число интронов	Ген	Число интронов
Овальбумин	7	β-Глобин	2
Овомукоид	6	δ-Глобин	2
Кональбумии	17	L-цепь иммуноглобулина	2
α-Глобин	2	Н-цепь иммуноглобулина	4

[1] В настоящее время вырисовывается следующая тенденция: чем выше эволюционное положение организма, тем, как правило, больше интронов содержат его гены и тем они длиннее.— *Прим. перев.*



α-Аманитин
(ингибитор РНК-полимеразы II)

грибов - α-*аманитин* - циклический пептид, содержащий несколько необычных аминокислот. α-Аманитин очень прочно связывается с РНК-полимеразой II (K = 10^{-8} М) и блокирует таким образом синтез предшественников мРНК. Полимераза III ингибируется при более высоких концентрациях α-аманитина (10^{-6} М), а полимераза I не чувствительна к этому токсину. α-Аманитин блокирует стадию элонгации в синтезе РНК.

29.19. Специфические гены могут активироваться для транскрипции

Выражение генов у эукариот, как и у прокариот, регулируется в значительной степени на уровне транскрипции. Одно из наиболее надежных доказательств было получено при исследовании хромосом развивающихся насекомых. Гигантские *политенные хромосомы* из слюнных желез *Drosophila* содержат более тысячи молекул ДНК, не разошедшихся при репликации и лежащих бок о бок друг с другом. В каждой политенной хромосоме имеется ряд характерных полос (диски, или хромомеры), видимых под световым микроскопом. При развитии личинки в куколку некоторые диски временно увеличиваются (образуют пуфы), так как ДНК в этой области переходит из конденсированного состояния в разрыхленное (рис. 29.29). *Пуфы* соответствуют транскрипционно активным участкам. Был обнаружен поразительный факт: пуфы могут быть индуциро-

Таблица 29.6. **Эукариотические РНК-полимеразы**

Тип	Локализация	Клеточные транскрипты	Вирусные транскрипты
I	Ядрышко	18S-, 5,8S- и 28S-рРНК	Не обнаружены
II	Нуклеоплазма	Предшественники мРНК и гяРНК	Предшественники мРНК
III	Нуклеоплазма	тРНК и 5S рРНК	Малые РНК

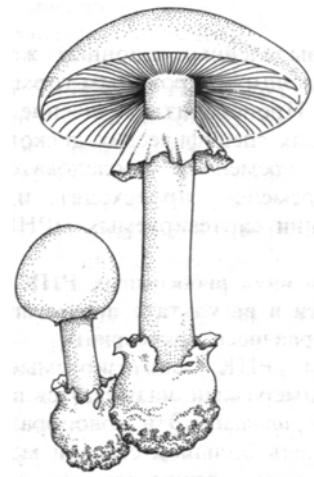


Рис. 29.28. Ядовитый гриб *Amanita phalloides,* содержащий α-аманитин. (Lincoff G., Mitchell D. H., Toxic and Hallucinogenic Mushroom Poisoning, Van Nostrand Reinhold, 1977, p. 30.)

Рис. 29.29. Образование пуфа в политенной хромосоме на определенной стадии развития. Стрелкой показан наиболее крупный пуф в хромосоме дрозофилы. (Печатается с любезного разрешения д-ра Joseph Gall.)

ваны в выделенных слюнных железах *in vitro экдизоном* - стероидным гормоном насекомых. Происходит увеличение и затем конденсация специфических дисков в определенной временной последовательности, и одновременно происходят изменения в популяции синтезируемых мРНК.

29.20. Три вида рибосомных РНК образуются в результате процессинга одного первичного транскрипта

Молекулы РНК, синтезируемые тремя РНК-полимеразами, называются *первичными транскриптами*. Эти новообразованные РНК в очень большой степени модифицируются в ядре, прежде чем они переходят в цитозоль в виде зрелых молекул рРНК, тРНК и мРНК. Образование рибосомных РНК из первичного транскрипта было изучено детально, лучше, чем процессинг каких-либо других видов РНК. Выше уже обсуждалось, что гены 18S-, 5,8S- и 28S-рРНК сгруппированы в единый кластер и этот кластер генов повторяется тандемно много раз. В ядрышках эта группа из трех генов транскрибируется РНК-полимеразой I и дает 45S-РНК (рис. 29.30). Предшественник длиной 13 kb подвергается ферментативной модификации и расщеплению и дает зрелые 18S-, 5,8S- и 28S-рРНК (рис. 29.31). Примерно 100 нуклеотидов метилируется, и почти все - по 2'-гидроксильной группе рибозных остатков. Высокоспецифические участки метилирования сохраняются в рРНК таких эволюционно далеких эукариот, как дрожжи и плодовая мушка. Кроме того, более 100 остатков уридина изомеризуются в остатки псевдоуридина. Во время созревания происходит ассоциация множества рибосомных белков с этими РНК и их предшественниками. Возможно, именно взаимодействие РНК с рибосомными белками делает определенные участки чувствительными к действию нуклеаз.

29.21. Информационные РНК избирательно образуются из больших ядерных предшественников РНК (гетерогенной ядерной РНК, гяРНК)

Образование рибосомных РНК у эукариот сходно с ее образованием у прокариот (разд. 25.17). В то же время между эукариотическими и прокариотическими мРНК имеются существенные различия.

1. *Первичные транскрипты у эукариот не используются непосредственно в качестве мРНК.* Прежде чем они переходят из ядра в цитозоль, они подвергаются процессингу. *Трансляция и транскрипция у эукариот разобщены во времени и в пространстве, тогда как у прокариот они тесно сопряжены.*

2. Первичные транскрипты у эукариот имеют в длину от 2 до 20 kb, в связи с чем их называют *гетерогенной ядерной РНК (гяРНК).* Обычно эти первичные транскрипты в несколько раз длиннее, чем мРНК, которые из них получаются. Образование эукариотических мРНК сопряжено со сплайсингом и расщеплением. До сих пор неизвестно, выполняет ли гяРНК еще какую-нибудь роль, кроме того, что она служит предшественником мРНК.

3. Эукариотические мРНК содержат на 5'-конце *«колпачки»* (кэпы), которые представляют собой модифицированные нуклеотиды. Кроме того, большинство мРНК не-

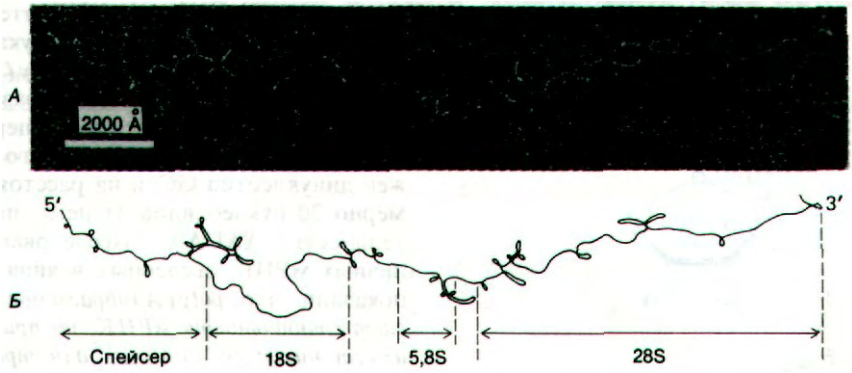


Рис. 29.30. Если расправить молекулу 45S-предшественника рибосомной РНК из клеток HeLa и исследовать ее с помощью электронного микроскопа, видна весьма характерная картина шпилек и петель. Благодаря этому можно картировать расположение молекул 28S- и 18S-РНК, образующихся из этого предшественника. *А* - электронная микрофотография 45S-предшественника. *Б* - схематическое изображение молекулы, изображенной на рис. *А*. [Wellauer P. K., Dawid I. B., Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 2828 (1973).]

Рис. 29.31. Образование рибосомной РНК млекопитающих из первичного транскрипта. Спейсерные участки показаны желтым.

сет на 3 -коние длинную *poly(A)-последовательность.*

4. Эукариотические мРНК *моноцистронны,* т.е. они являются матрицами для синтеза только одной полипептидной цепи. Многие прокариотические мРНК, наоборот, *полицистронны* (например, мРНК лактозного оперона - матрица для синтеза трех полипептидных цепей).

5. Популяция молекул мРНК эукариотической клетки зависит не только от скорости транскрипции определенных генов; в эукариотических клетках имеется и еще один уровень принятия решений; *должен ли тот или иной первичный транскрипт подвергнуться деградации или процессингу с образованием зрелой мРНК и последующим транспортом ее в цитозоль*[1].

29.22. На 5'-конце мРНК находятся «колпачки», а на 3'-конце, как правило, poly(A)-последовательности

5'-конец всех известных эукариотических мРНК (но не тРНК или рРНК) модифицирован особым образом. К мРНК присоединен 7-метилгуанилат необычной пирофосфатной связью 5'—5' (рис. 29.32). Эта характерная структура называется «колпачком». Она присоединяется к первичному транскрипту. 5'-трифосфатный конец новообразованной цепи гидролизуется до дифосфата, и на него переносится остаток гуанилата GTP. Затем N-7 этого концевого гуанина метилируется S-аденозилметиони-

[1] Следует указать еще одно важное отличие прокариотических мРНК от эукариотических — время жизни. У прокариот оно составляет не более нескольких минут, а у эукариот - десятки минут или часы, а в исключительных случаях недели и месяцы.- *Прим. перев.*

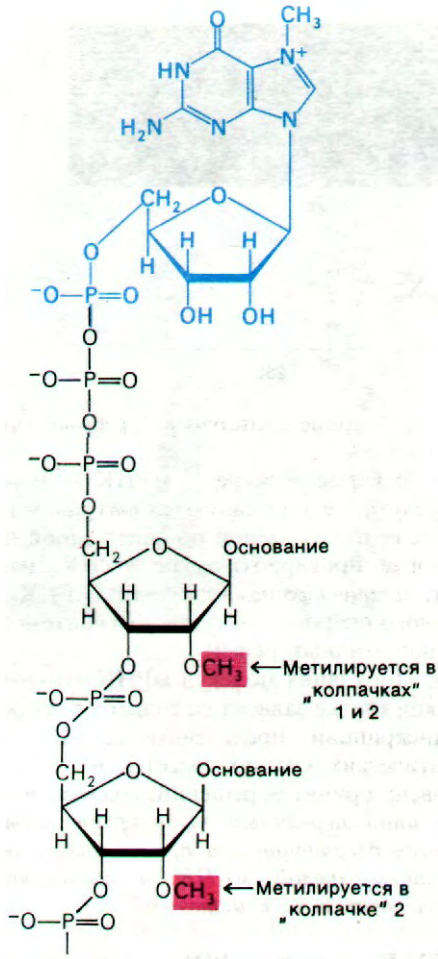


Рис. 29.32. Структура «колпачков», расположенных на 5'-конце эукариотических мРНК. Все «колпачки» содержат 7-метилгуанилат (изображен синим цветом), присоединенный пирофосфатной связью к 5'-концу. В «колпачке» 0 ни одна рибоза не метилирована, в «колпачке» 1 метилирована одна рибоза, в «колпачке» 2 - две.

ном и образуется так называемый «колпачок» 0. Соседние остатки рибозы могут быть метилированы, при этом образуется *«.колпачок» 1 или «колпачок» 2* (рис. 29.32). Эти «колпачки» способствуют стабилизации мРНК, защищая их 5'-концы от фосфатаз и нуклеаз. Кроме того, «колпачки» повышают эффективность трансляции мРНК в эукариотических системах синтеза белка.

Кроме того, большинство эукариотических мРНК имеет на 3'-конце *poly(A)-последовательности.* Poly(A)-полимераза присоединяет 150-200 нуклеотидов к первичному транскрипту, на 3'-конце которого расположен динуклеотид GC, а на расстоянии примерно 20 нуклеотидов от него - последовательность AAUAA. Исследования различных мРНК, введенных в яйца *Xenopus,* показали, что *poly(A)-фрагмент увеличивает стабильность мРНК, но при этом не имеет никакого значения для трансляции.* Кроме того, отсутствие poly(A) на конце гистоновых мРНК показывает, что он не обязательно должен присутствовать в мРНК для ее транспорта из ядра в цитозоль.

29.23. Ферменты сплайсинга с высокой точностью удаляют интроны из первичных транскриптов разорванных генов

При сплайсинге (расщепление с последующим сращиванием) мРНК происходит разрыв двух фосфодиэфирных связей и образование одной новой. Эндонуклеазная и лигазная активности, вероятно, содержатся в одном ферментном комплексе, и последовательные реакции сплайсинга согласованы между собой. В настоящее время многие лаборатории пытаются выделить ферменты сплайсинга. Очевидно, их действие должно обладать высокой точностью. Ошибка в точке сплайсинга на один нуклеотид приведет к сдвигу рамки считывания в сторону 3'-конца от этого места, что даст совершенно иную последовательность аминокислот. Как ферменты сплайсинга узнают свои мишени? В настоящее время известен ряд нуклеотидных последовательностей в месте стыка экзонов и интронов, кодирующих РНК-транскрипты (табл. 29.7). В этих последовательностях есть общий мотив: *интрон начинается с GU и кончается AG.* Следует отметить, что один и тот же сигнал сплайсинга встречается у кур, кроликов, мышей и в ДНК вируса SV-40, который заражает клетки обезьян и человека[1].

[1] В последнее время получен ряд данных, свидетельствующих об участии т.н. низкомолекулярных ядерных РНК в сплайсинге, а также в созревании 3'-концов РНК. Эта фракция РНК исследуется уже давно. Она весьма консервативна и содержит последовательности, комплементарные участкам экзонов, прилежащим к интронам. Низкомолекулярные ядерные РНК, по-видимому, обеспечивают узнавание участков сплайсинга соответствующими ферментами. - *Прим. перев.*

Таблица 29.7. **Последовательности оснований транскриптов, содержащих интроны, вблизи участков сплайсинга**

Участок гена	Экзон	Интрон	Экзон
Овальбумин, интрон 2	U A A G G U G A	∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼	A C A G G U U G
Овальбумин, интрон 3	U C A G G U A C	∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼	U C A G U C U G
β-Глобин, интрон 1	G C A G G U U G	∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼	U C A G G C U G
β-Глобин, интрон 2	C A G G G U G A	∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼	A C A G U C U C
Иммуноглобулин λ_1, интрон 1	U C A G G U C A	∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼	G C A G G G G C
Ранний Т-антиген вируса SV-40	U A A G G U A A	∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼∼	U U A G A U U C

В молекулах транспортной РНК точки сплайсинга окружены совершенно другими последовательностями. Из этого, очевидно, следует, что существует по крайней мере два фермента сплайсинга: один для образования мРНК, другой - тРНК. Процесс сплайсинга тРНК, по-видимому, очень сходен у эволюционно далеких видов. Клонированные гены одной из дрожжевых тРНК вводили в ооциты *Xenopus c* помощью микроинъекции для того, чтобы выяснить, может ли ген одноклеточного эукариота транскрибироваться, а его продукт - процессироваться в клетке амфибии. Самое поразительное, что в клетке *Xenopus* происходят транскрипция дрожжевого гена и правильный процессинг его продукта, несмотря на то что гены этой тРНК у двух видов совершенно различны. В частности, 14-нуклеотидная вставочная последовательность правильно удаляется (рис. 29.33). Итак, *специфичность ферментов сплайсинга сохранилась на протяжении огромного периода эволюции.*

29.24. В настоящее время известны последовательности оснований многих информационных РНК

Многие эукариотические мРНК были выделены в очищенном виде. У некоторых из них была определена последовательность оснований. Выделение какой-либо мРНК начинается с выбора клеток, в которых она содержится в большом количестве. Например, ретикулоциты богаты глобиновой мРНК, яйцеводы кур - мРНК овальбумина, плазматические клетки - мРНК иммуноглобулинов, эмбрионы морского ежа - мРНК гистонов. Выделение мРНК начинается с получения клеточного экстракта, из которого удаляют белки и ДНК. Затем большую часть мРНК отделяют от других видов РНК, используя наличие в них poly(A)-фрагментов. Эти мРНК прочно связываются с колонками, содержащими ковалентно привязанные полинуклеотиды poly(U) и poly(T). После элюции с такой аффинной колонки мРНК ее можно фракционировать по размеру молекул методом гель-электрофореза или седиментации. Другой способ выделения индивидуальной мРНК - иммунопреципитация. Например, если добавить в белоксинтезирующий экстракт антитела, специфичные к овальбумину, это переведет в осадок полисомы, содержащие овальбуминовую мРНК. Для того чтобы проверить препарат мРНК, его добавляют в бесклеточную систему синтеза белка, которая работает только в присутствии экзогенной РНК. Для этого часто используются экстракты проростков пшеницы.

Наличие очищенных индивидуальных мРНК открывает возможности для ряда интересных экспериментов. Во-первых, с помощью метода гибридизации соответствующей мРНК (или комплементарной ей ДНК-копии) с хромосомной ДНК можно определить число определенных генов в геноме. Во-вторых, можно идентифицировать фрагменты ДНК, содержащие данный ген, гибридизуя их с мРНК. Затем эти фрагменты можно клонировать (разд. 31.11), чтобы получить сам ген и прилегающие к нему участки хромосомы в большом коли-

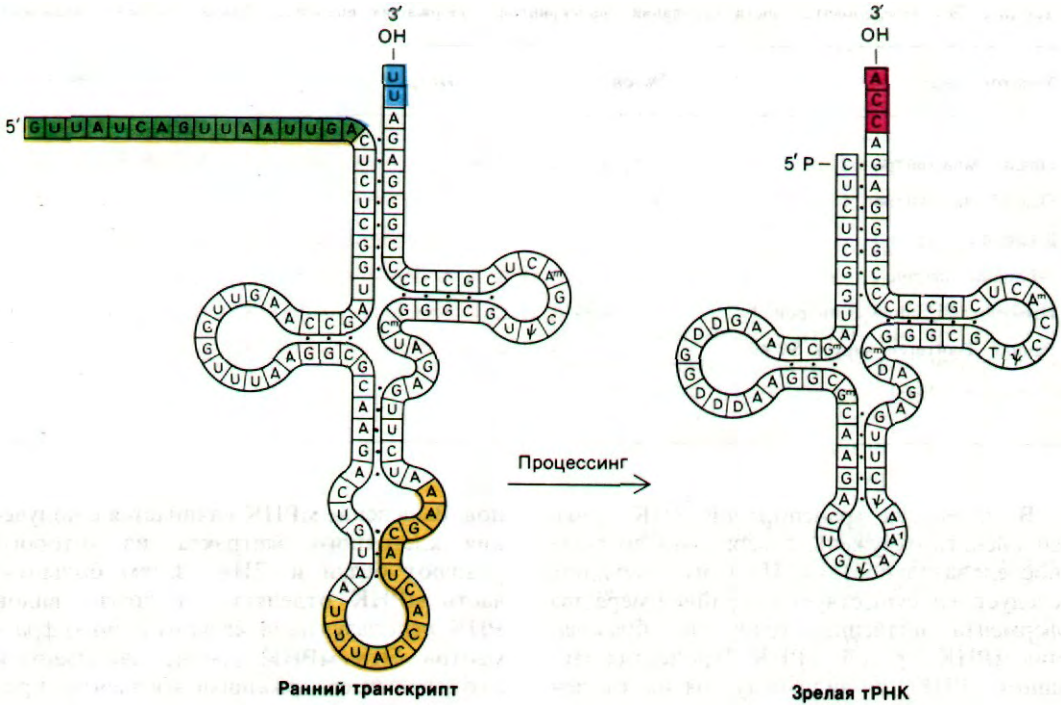


Рис. 29.33. Процессинг предшественника дрожжевой тирозиновой тРНК. Происходит удаление 14-нуклеотидной вставочной последовательности (показано желтым цветом), и ряд оснований модифицируется. Продукт длиной 92 нуклеотида получается из первичного транскрипта длиной 108 нуклеотидов путем отщепления 5'-концевой лидерной последовательности и присоединения CCA к 3'-концу.

честве. В-третьих, с помощью электронной микроскопии можно выявить вставочные последовательности в этом гене (разд. 26.12). В-четвертых, можно определить последовательность нуклеотидов мРНК, чтобы идентифицировать регуляторные сигналы.

Недавно была определена последовательность овальбуминовой мРНК. Эта мРНК содержит 1859 нуклеотидов на участке от «колпачка» *на 5'-конце до poly(A) на 3'-конце* (рис. 29.34). *1158 нуклеотидов, кодирующих белок, обрамлены с обеих сторон нетранслируемыми последовательностями.* С 5'-стороны она короче, чем с 3'-стороны. Нетранслируемый 5'-концевой участок длиной 64 нуклеотида содержит «колпачок», инициирующий кодон AUG, взаимодействует с белоксинтезирующим аппаратом и участвует в инициации синтеза белка. Весьма многозначителен тот факт, что этот участок содержит последовательность, комплементарную 3'-концу 18S-рРНК. Напомним, что у прокариот инициирующая последовательность в мРНК спаривается с 3'-концом 16S-рРНК (разд. 27.14). Роль очень длинной нетранслируемой последовательности, расположенной с 3'-стороны, неизвестна. Для этого участка длиной 637 нуклеотидов характерно обилие коротких повторяющихся последовательностей. Фрагменту poly(A) в овальбуминовой мРНК, как и в других мРНК, предшествует GC, а примерно за 20 нуклеотидов до этого - AAUAAA.

29.25. Эукариотическая рибосома (80S) состоит из малой (40S) и большой (60S) субчастиц

Аппарат синтеза белка у эукариот аналогичен соответствующему аппарату у прока-

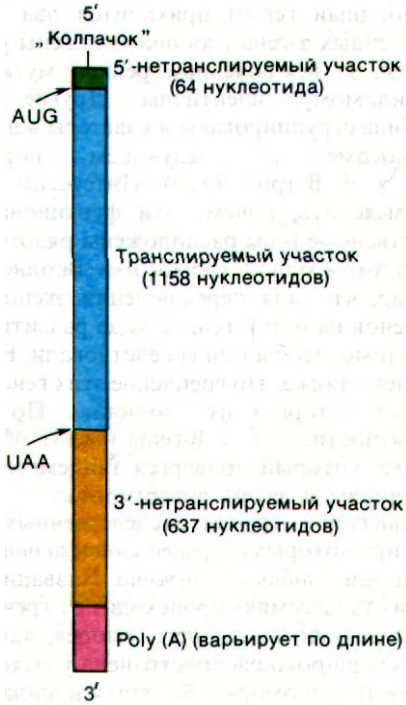


Рис. 29.34. Схема организации овальбуминовой мРНК курицы.

Рис. 29.35. Электронная микрофотография эукариотических 80S рибосом. (Печатается с любезного разрешения д-ра Miloslav Boublik.)

риот, но составляющие его белки и РНК отличаются от прокариотических и, кроме того, они содержатся в большем количестве. Цитоплазматические рибосомы эукариотических клеток несколько крупнее, чем рибосомы бактерий. Эукариотические рибосомы (рис. 29.35) имеют коэффициент седиментации 80S, а не 70S. Подобно бактериальным рибосомам, они диссоциируют на большую (60S) и малую (40S) субчастицы. 40S-субчастица содержит молекулу 18S-РНК и примерно 30 белков. Остальные три рибосомные РНК - 5S, 5,8S и 28S - локализованы в 60S-субчастице, в которую входит также примерно 45 белков.

Стадии трансляции - инициация, элонгация и терминация - в основном сходны у эукариот и прокариот. Однако в некоторых частностях механизмы реакции различаются. Так, *эукариоты используют для инициации особую тРНК (она называется* $mPHK_i^{Met}$ *), но она у них не формилируется.* Эукариоты и прокариоты различаются также по чувствительности к некоторым ингибиторам трансляции. *Циклогексимид* ингибирует элонгацию только у эукариот, тогда как *эритромицин* блокирует эту же стадию только у прокариот. *Любопытно отметить, что рибосомы митохондрий и хлоропластов имеют больше общего с бактериальными рибосомами, чем с рибосомами окружающего их цитозоля.* Кроме того, в митохондриях и хлоропластах используется формилированная инициаторная тРНК, а их рибосомы чувствительны к большинству ингибиторов, избирательно блокирующих трансляцию у прокариот.

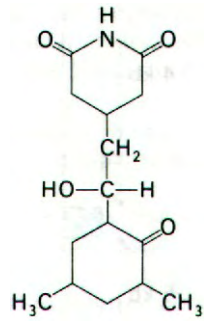


Рис. 29.36. Структура циклогексимида - ингибитора стадии элонгации синтеза белка у эукариот, но не у прокариот.

29.26. Талассемия - генетически обусловленное нарушение синтеза гемоглобина

Изучение гемоглобина внесло большой вклад в наши представления о структуре и функции белка (гл. 4 и 5). Точно так же исследования, посвященные генам гемоглобина и их выражению, оказались важным источником данных о функционировании эукариотических генов. В процессе внутриутробного развития происходит замена эмбриональных гемоглобинов гемоглобином плода (HbF, $\alpha_2\gamma_2$), а затем гемоглобином взрослого типа (HbA, $\alpha_2\beta_2$). Кроме того, во взрослом организме образуется небольшое количество гемоглобина HbA_2, субъединичная структура которого $\alpha_2\delta_2$. Напомним, что HbF имеет более высокое сродство к кислороду, чем HbA, так как он менее прочно связывает бисфосфоглицерат (разд. 4.7). Это повышенное сродство к кислороду благоприятствует его переносу из кровеносной системы матери в кровеносную систему плода. В действительности HbF представляет собой смесь двух разновидностей, одна из которых содержит в положении 136 γ-цепи глицин, а другая - аланин. Эти разновидности обозначаются G_γ и A_γ соответственно.

Все гены гемоглобина картированы. На

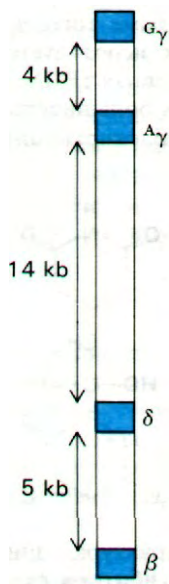


Рис. 29.37. Карта генов γ-, δ- и β-глобина человека.

гаплоидный геном приходится два тесно сцепленных α-гена глобина. Эти гены у всех людей, за исключением редких мутантов, по-видимому, идентичны. Другие гены глобина сгруппированы в кластеры в другой хромосоме в следующем порядке: G_γ-A_γ-δ-β (рис. 29.37). Интересно было бы выяснить, почему эти функционально родственные гены расположены рядом друг с другом в одной хромосоме. Вполне возможно, что для переключения экспрессии с γ-генов на δ- и β-гены в ходе развития необходимо, чтобы они соседствовали. Не исключено также, что сцепление этих генов отражает историю их эволюции. По всей вероятности, γ-, δ- и β-гены имеют общего предка, который подвергся тандемным дупликациям и затем дивергировал.

Талассемии - группа наследственных анемий, при которых *скорость синтеза одной из цепей гемоглобина понижена.* Название болезни «талассемия» происходит от греческого слова, обозначающего «море», так как болезнь широко распространена у выходцев из Средиземноморья. Большая и малая талассемии наблюдаются у гомозиготных и гетерозиготных больных соответственно. Буквенное обозначение α или β указывает, какая цепь синтезируется с пониженной скоростью. В настоящее время в результате изучения глобиновой мРНК и клонированной глобиновой ДНК начинает проясняться причина этих заболеваний. Установлены молекулярные механизмы некоторых видов талассемий.

1. *Делеция гена.* При некоторых видах α-талассемий делетированы один или оба α-глобиновых гена.

2. *Нестабильность мРНК.* В гемоглобине Constant Spring α-цепь содержит 172 остатка вместо 141 из-за мутации, приводящей к замене стоп-кодона UAA в кодон глутамина CAA. Трансляция участка, который в норме не является кодирующим, каким-то образом делает мутантную мРНК чувствительной к действию нуклеаз.

3. *Нарушение инициации цепей.* При некоторых видах β-талассемии инициирование трансляции происходит слишком медленно, что, возможно, объясняется дефектом в 5'-нетранслируемой области.

4. *Преждевременная терминация цепи.* Один из видов β-талассемии возникает в результате замены одного основания в кодоне лизина AAG, приводящей к образованию стоп-кодона UAG в 17-м положении.

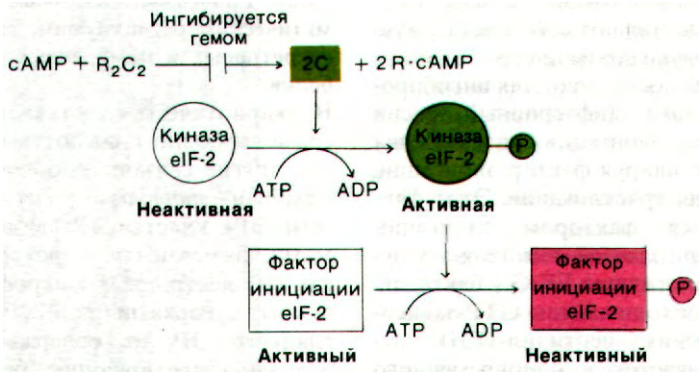


Рис. 29.38. Каскад фосфорилирования, инактивирующий фактор инициации eIF-2.

5. *Пониженное образование мРНК.* При многих видах β-талассемии, как оказалось, ген β-глобина имеется, но β-глобиновой мРНК образуется очень мало. В настоящее время причина этого явления интенсивно изучается. Не исключена возможность, что при некоторых видах β-талассемии не происходит правильного вырезания вставочных последовательностей[1].

29.27. Трансляция регулируется каскадом протеинкиназ, инактивирующим один из факторов инициации

В экстрактах ретикулоцитов происходит с высокой скоростью синтез субъединиц гемоглобина до тех пор, пока не иссякает гем. В отсутствие гема синтез белка останавливается из-за быстрого образования ферментативного ингибитора белкового синтеза. Этим ингибитором является протеинкиназа. Мишенью для киназы служит eIF-2 - фактор инициации, связывающий GTP и доставляющий Met-тРНК$_f$ к 40S-субчастице рибосомы[2]. Инактивация eIF-2 в результате фосфорилирования приводит к блокированию инициации синтеза белка. Каким же образом гем регулирует активность этой киназы? Действие это опосредуется еще одной киназой (рис. 29.38). Киназа eIF-2, модифицирующая фактор инициации, сама существует в двух формах - неактивной дефосфорилированной и активной фосфорилированной. Фосфорилирование киназы eIF-2 катализируется зависимой от циклического AMP киназой, состоящей из двух типов субъединиц - двух регуляторных (R) и двух каталитических (C). Неактивный комплекс R_2C диссоциирует под действием циклического AMP на две каталитически активные C-субъединицы и две R-субъединицы. *Гем блокирует процесс диссоциации. и как следствие этого активации двух киназ регуляторной системы не происходит. В результате фактор eIF-2 не фосфорилируется и сохраняет свою активность в инициации белкового синтеза. Этот каскад протеинкиназ напоминает регуляцию метаболизма гликогена* (разд. 16.15). Эти процессы имеют еще и то общее, что в обоих случаях регуляторное действие этих киназ обращается специфическими фосфатазами.

29.28. Дифтерийный токсин блокирует синтез белка у эукариот, ингибируя транслокацию

До появления эффективной иммунизации дифтерия была основной причиной детской смертности. Летальное действие этой болезни обусловлено главным образом токсином *Corynebacterium diphteriae* - бактерии, развивающейся в верхних дыхательных путях. Структурный ген токсина локализован в лизогенизирующем фаге, который содержат некоторые штаммы *C. diphteriae*. Несколько

[1] В случае так называемой β^+-талассемии это оказалось именно так, причем единственное отличие мутантного гена от гена дикого типа-замена одного-единственного нуклеотида в интроне. - *Прим. перев.*

[2] Каскадный механизм регуляции, описанный автором и предложенный в лаборатории Очоа, оказался ошибочным. Хотя cAMP-зависимая протеинкиназа фосфорилирует многие белки. она не затрагивает eIF-2 и никак не влияет на активность протеинкиназы в физиологических условиях. [Hunt T., Phil. Trans. R. Soc. Lond., B 302. 127-134 (1983).] - *Прим. перев.*

микрограммов этого токсина с массой 61 кДа обычно представляют собой летальную дозу для неиммунизированного человека, так как этой дозы достаточно для ингибирования синтеза белка. Дифтерийный токсин блокирует стадию элонгации синтеза белка у эукариот, инактивируя фактор элонгации, необходимый для транслокации. Этот фактор, называемый фактором элонгации 2 (EF-2) или *транслоказой,* выполняет у эукариот роль, аналогичную EF-G у бактерий. Транслоказа необходима для GTP-зависимого перемещения пептидил-тРНК из А-участка в Р-участок и одновременного перемещения информационной РНК сразу после образования пептидной связи. Особенно интересен механизм инактивации транслоказы дифтерийным токсином. *Токсин катализирует ковалентную модификацию транслоказы.* При этом NAD^+ служит донором остатка аденозиндифосфатрибозы

(ADPR); в результате реакции высвобождается никотинамид.

Молекула дифтерийного токсина состоит из двух частей. Ее можно расщепить на два фрагмента - с массой 21 кДа (фрагмент А) и 40 кДа (фрагмент В). *Домен В связывается с поверхностью чувствительных клеток, а домен А катализирует ADP-рибозилирование транслоказы.* Точнее, домен В связывается с ганглиозидом G_{M1} плазматической мембраны, что позволяет каталитическому домену проникнуть в клетку. При этом связанный токсин расщепляется, так что фрагмент В остается на поверхности клетки, а гидрофильный фрагмент А переносится в цитозоль. Интересно отметить, что многие другие токсины, например холерный токсин (разд. 35.7), также состоят из домена, предназначенного для связывания с поверхностью клетки, и каталитического домена, который инактивирует какой-либо важный компонент клетки.

29.29. Рибосомы, связанные с эндоплазматическим ретикулумом, синтезируют секреторные и мембранные белки

В эукариотических клетках некоторые рибосомы свободно плавают в цитозоле, тогда как другие связаны с обширной системой мембран - *эндоплазматическим ретикулумом* (ЭР). Участки ЭР, связанные с рибосомами, называются *шероховатым ЭР,* так как на электронных микрофотографиях он покрыт бугорками (рис. 29.39), в отличие от гладкого ЭР, не содержащего рибосом. Клетки, секретирующие большое количество белка, например ацинарные клетки поджелудочной железы, имеют сильно развитый шероховатый ЭР. В общем все известные секреторные белки синтезируются связанными с ЭР рибосомами. Кроме того, рибосомы, связанные с этой мембранной системой, синтезируют многие белки клеточной мембраны и таких органелл, как лизосомы.

Связанные с мембранами рибосомы в ооцитах ящериц, впавших в зимнюю спячку, образуют кристаллические слои (рис. 29.40). Эти упорядоченные слои изучаются в настоящее время методами реконструкции трехмерного изображения. На карте низкого разрешения видно, что и большая (60S), и малая (40S) субчастицы лежат вблизи поверхности мембраны. На большой субча-

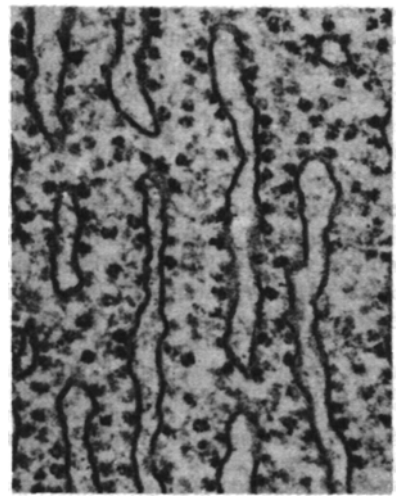


Рис. 29.39. Электронная микрофотография шероховатого эндоплазматического ретикулума. (Печатается с любезного разрешения д-ра George Palade.)

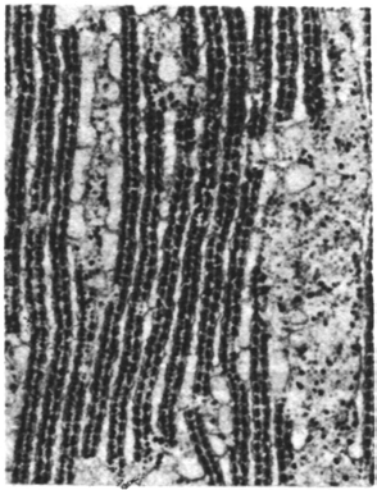


Рис. 29.40. Электронная микрофотография кристаллических слоев, связанных с мембранами рибосом в ооцитах ящериц, впавших в зимнюю спячку. (Печатается с любезного разрешения д-ра Nigel Unwin.)

Рис. 29.41. Связанная с мембраной рибосома. Это изображение низкого разрешения получено методом реконструкции на основе анализа ряда электронных микрофотографий упорядоченных рибосом, сделанных под различными углами. (По схеме, любезно предоставленной д-ром Nigel Unwin.)

стице имеется выступ, вдающийся в мембрану (рис. 29.41). Шероховатый ЭР (в отличие от гладкого ЭР) содержит два трансмембранных белка, называемых *рибофоринами,* которые специфически взаимодействуют с большой рибосомной субчастицей.

В связи с синтезом и дальнейшей судьбой белков, образованных на рибосомах ЭР, возникают три основных вопроса.

1. *Существует ли два класса рибосом - свободные рибосомы цитозоля и связанные с мембранами рибосомы - или все рибосомы по сути одинаковы*? Если существует только один класс рибосом, чем определяется, остается ли данная рибосома свободной или связывается с шероховатым ЭР?

2. *Каким образом новообразованная полипептидная цепь, выходящая из связанной с мембраной рибосомы, преодолевает барьер проницаемости шероховатого ЭР*? Например, такие секреторные белки, как проферменты поджелудочного сока (разд. 8.1), вскоре после синтеза обнаруживаются в полости ЭР.

3. *Чем определяется судьба белка, синтезированного на связанной с мембраной рибосоме*? Некоторые из этих белков экспортируются из клетки, тогда как другие предназначены для органелл внутри клетки. Кроме того, белки синтезированные шероховатым ЭР, обнаруживаются в качестве составной части плазматической и внутриклеточных мембран.

29.30. Сигнальные последовательности позволяют секреторным белкам проходить через мембрану эндоплазматического ретикулума

Исследования белоксинтезирующей активности рибосом в бесклеточных системах дали ответ на первый вопрос. Выделяли свободные рибосомы из цитозоля и добавляли их к препарату мембран шероховатого ЭР, с которых были удалены рибосомы. Эта реконструированная система в присутствии соответствующих мРНК и других растворимых факторов активно синтезировала секреторные белки. Точно так же рибосомы, полученные из препарата шероховатого ЭР, проявляли нормальную активность при синтезе белков, которые остаются в цитозоле. Кроме того, никаких структурных различий между свободными рибосомами и рибосо-

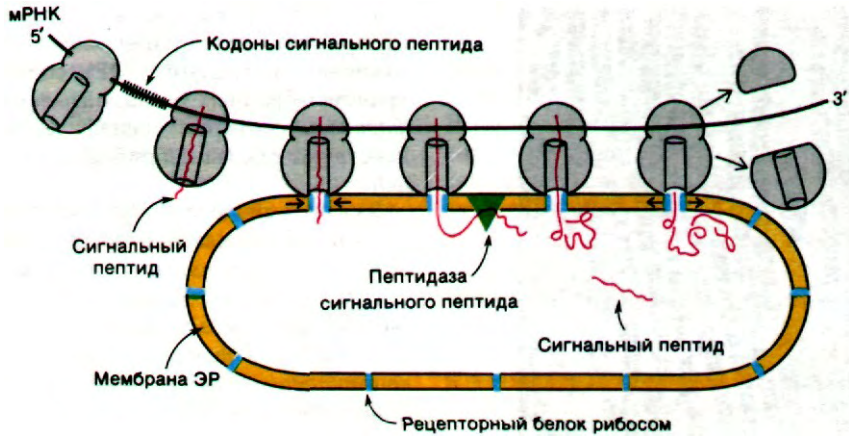


Рис. 29.42. Гипотеза сигнальной последовательности, образующейся при биосинтезе секреторных и мембранных белков. Согласно этой гипотезе, N-концевая последовательность новообразованной полипептидной цепи (показана красным) привязывает рибосому к мембране ЭР. Затем сигнальная последовательность удаляется пептидазой, расположенной на внутренней стороне ЭР. (Blobel G. In: International Cell Biology, Brinkley B. R., Porter K. R., eds., Rockefeller Univ. Press, N. Y., 1977, p. 318.)

мами, полученными из шероховатого ЭР, не обнаруживалось. *Следовательно, связанные с мембранами рибосомы и свободные рибосомы, по сути, одинаковы. Остается ли данная рибосома свободной или прикрепляется к шероховатому ЭР, определяется только природой белка, который она синтезирует.*

Какая же особенность синтезирующегося белка определяет, плавает ли ассоциированная с ним рибосома свободно в цитозоле или связывается с мембраной ЭР? В 1970 г. Дэвид Сабатини и Гюнтер Блобел (David Sabatini, Gunter Blobel) постулировали, что *сигналом прикрепления служит последовательность аминокислотных остатков, прилегающая к N-концу новообразующейся полипептидной цепи.* Вскоре эта *гипотеза сигнальной последовательности* (рис. 29.42) нашла подтверждение в работах Сезара Милстайна и Джорджа Браунли (Cesar Milstein, George Brownlee), показавших, что иммуноглобулиновая цепь, синтезированная in vitro свободными рибосомами, содержит N-концевую последовательность из 20 остатков, которой нет в зрелом белке, синтезированном *in vivo*. Затем Блобел обнаружил, что все основные секреторные белки поджелудочной железы, синтезированные *in vitro* на свободных рибосомах, содержат на N-конце дополнительные фрагменты длиной около двадцати аминокислот. В настоящее время сигнальные последовательности многих секреторных белков расшифрованы. Они имеют длину от 15 до 30 остатков и содержат много неполярных аминокислот (рис. 29.43).

Гидрофобные сигнальные последовательности, видимо, принимают конформации, которые узнаются белками мембраны ЭР, образующими каналы. *По всей вероятно-*

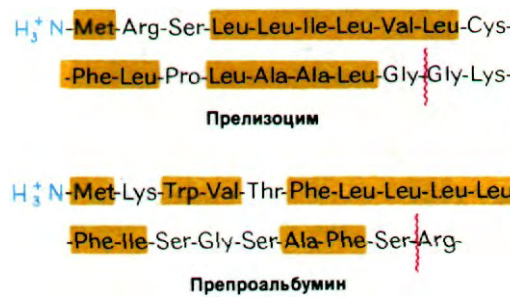


Рис. 29.43. Сигнальные последовательности двух секреторных белков. Гидрофобные остатки отмечены желтым. Место расщепления указано красной чертой.

Сокращения, принятые для обозначения сахаров:

Fuc - фукоза
Gal - галактоза
Glc - глюкоза
GlcNAc - N-ацетилглюкозамин
Man - манноза
NAN - N-ацетилнейраминидат (сиаловая кислота)

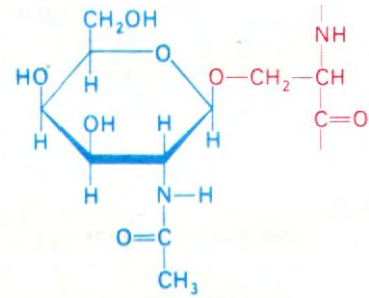
сти, новообразующиеся полипептидные цепи активно протягиваются через канал в ЭР по мере синтеза. Затем особая пептидаза отщепляет сигнальные последовательности на внутренней стороне ЭР (см. рис. 29.42). Новообразующиеся цепи, которые должны стать составной частью мембраны, по-видимому, содержат специальные последовательности, блокирующие перенос полипептида через мембрану ЭР до тех пор, пока синтез не доходит до С-конца. В случае же секреторных белков, наоборот, через мембрану ЭР транспортируется вся полипептидная цепь.

Главная особенность механизма сигнальных последовательностей состоит в том, что перенос полипептида через мембрану ЭР сопряжен с трансляцией. *Однако некоторые белки могут пересекать мембрану уже после того, как их синтез завершен.* Например, белки митохондрий и хлоропластов в большинстве своем кодируются ядерными генами и синтезируются па свободных рибосомах. Эти белки выходят в цитозоль и затем проходят через мембрану органеллы. Очевидно, транспорт этих белков происходит *посттрансляционно,* а не во время трансляции. Интересно отметить, что эти митохондриальные и хлоропластные белки, подобно секреторным белкам, содержат N-концевые последовательности, которые удаляются вскоре после их проникновения через мембрану.

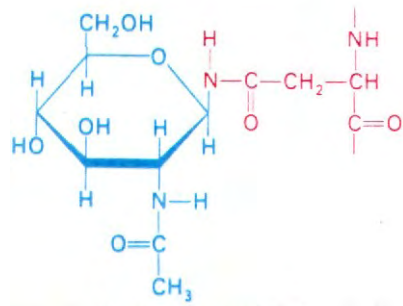
29.31. Присоединение сахарных остатков «ядра» к гликопротеинам происходит в эндоплазматическом ретикулуме при участии донора долихола

Почти ко всем белкам, синтезированным рибосомами, связанными с ЭР, присоединяются ковалентно связанные углеводные остатки. Растворимые белки, синтезируемые свободными рибосомами в цитозоле, наоборот, почти никогда не связаны с углеводами. Как уже упоминалось (разд. 10.12), остатки сахара, очевидно, ориентируют гликопротеины в мембранах. Кроме того, углеводные группы могут в какой-то степени предопределять судьбу гликопротеина. Обычно гликопротеин содержит одну или несколько олигосахаридных групп, присоединенных к аспарагиновым боковым цепям N-гликозидными связями. Реже сахара прикрепляются к сериновым или треониновым боковым цепям О-гликозидными связями. Непосредственно с остатками аспарагина всегда связан N-ацетилглюкозамин, тогда как к серину и треонину присоединяется N-ацетилгалактозамин.

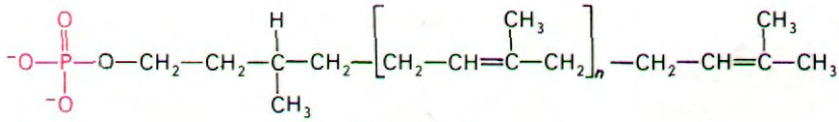
В гликопротеинах встречаются самые разнообразные олигосахариды (рис. 29.44). Однако в основе этого разнообразия лежит общий план строения: *углеводные остатки,*



N-ацетилгалактозамин, присоединенный к остатку серина О-гликозидной связью



N-ацетилглюкозамин, присоединенный к остатку аспарагина N-гликозидной связью



Долихолфосфат
(n = 15 ÷ 19)

присоединенные к остаткам аспарагина (через атом азота), имеют общее внутреннее олигосахаридное «ядро». Этот повторяющийся мотив отражает способ биосинтеза олигосахаридной части гликопротеинов: *общий олигосахаридный блок* (рис. 29.45) *переносится с активирующего липидного переносчика на растущую полипептидную цепь на внутренней стороне мембраны ЭР.* Переносчиком служит *долихолфосфат* - липид с очень длинной цепью, содержащий около двадцати изопреновых (C_5) остатков. Концевая фосфатная группа этого весьма гидрофобного переносчика - место прикрепления активированного олигосахарида.

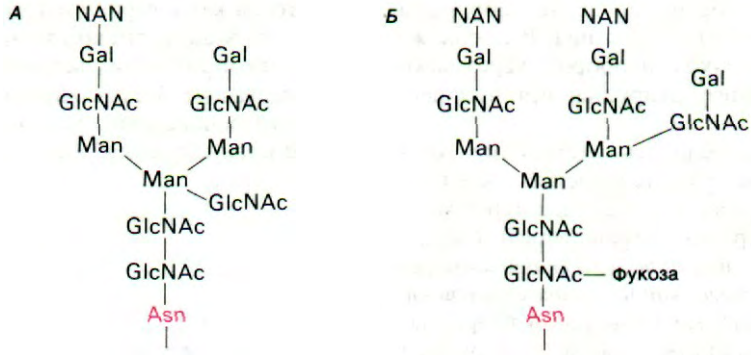


Рис. 29.44. Структура олигосахаридного остатка, связанного с аспарагином в человеческом иммуноглобулине (*А*) и в тиреоглобулине свиньи (*Б*).

К долихолфосфату присоединяется олигосахаридный блок, состоящий из двух остатков N-ацетилглюкозамина, девяти манноз и трех глюкоз. Его образование идет путем последовательного присоединения моносахаридов (рис. 29.46).

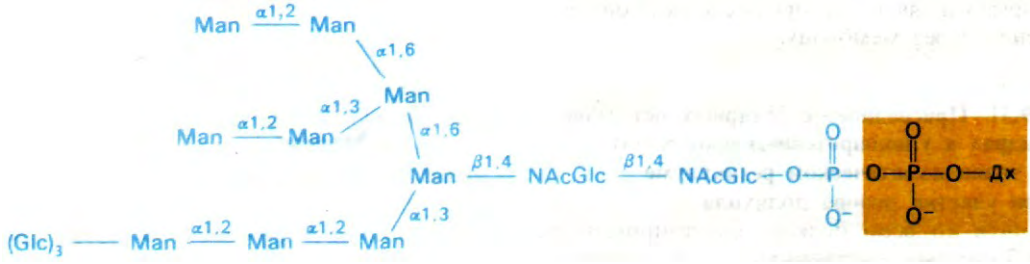


Рис. 29.45. Структура активированного олигосахаридного «ядра» (показано синим цветом). Переносчик (показан желтым цветом) - долихолфосфат (Дх).

Активированные доноры сахаров в этих реакциях - производные UDP, GDP и долихола. Ряд специфических трансфераз катализирует синтез активированного олигосахаридного «ядра». Затем оно переносится целиком на определенный остаток аспарагина растущей полипептидной цепи. Активированный олигосахарид и специфическая

трансфераза расположены на внутренней стороне ЭР. Об этом свидетельствует тот факт, что белки в цитозоле не гликозилированы. Олигосахарид может быть присоединен только к такому аспарагину, который входит в последовательность Asn-X-Ser или Asn-X-Thr. В большинстве случаев два из трех остатков глюкозы присоединенного олигосахарида быстро удаляются, когда гликопротеин еще связан с ЭР.

При переносе олигосахарида на белок высвобождается долихолпирофосфат, который под действием фосфатазы снова превращается в долихолфосфат. Это превращение блокируется антибиотиком *бацитрацином* (разд. 32.6). Еще один интересный антибиотик-ингибитор - *туникамицин,* гидрофобный аналог UDP-N-ацетилглюкозамина. Туникамицин блокирует первый этап образования олигосахаридного «ядра» - присоединение N-ацетилглюкозамина к долихолфосфату.

29.32. Модификация и сортировка гликопротеинов происходит в аппарате Гольджи

Белки, находящиеся во внутреннем пространстве ЭР и в его мембране, переносятся в *аппарат Гольджи* - стопку уплощенных мембранных мешков (рис. 29.47). В этой органелле олигосахаридное «ядро» гликопротеинов удаляется и к ним присоединяются новые сахара. Кроме того, аппарат Гольджи сортирует и упаковывает гликопротеины для транспортировки в другие участки клетки. Гликопротеины доставляются из ЭР к выпуклой поверхности аппарата Гольджи в пузырьках диаметром 500 А, окруженных оболочкой, покрытой чем-то вроде щетинок (рис. 29.48). Эта оболочка представляет собой многогранную решетчатую структуру, состоящую из субъединиц *клатрина* массой 180 кДа (рис. 29.49). Эти так называемые *окаймленные пузырьки* отпочковываются от ЭР и затем сливаются с аппаратом Гольджи. Кроме того, они переносят мембранные белки от вогнутой поверхности аппарата Гольджи в лизосомы, к плазматической мембране и в другие участки клетки. К тому же окаймленные пузырьки переносят белки и липиды от плазматической мембраны к внутренним мембранам. *Таким образом, клатрин играет ключевую роль в переносе фрагментов мембраны в пределах клетки.* Важно отметить, что во время этих процессов переноса асимметрия мембран сохраняется. Внутренняя поверхность мембраны

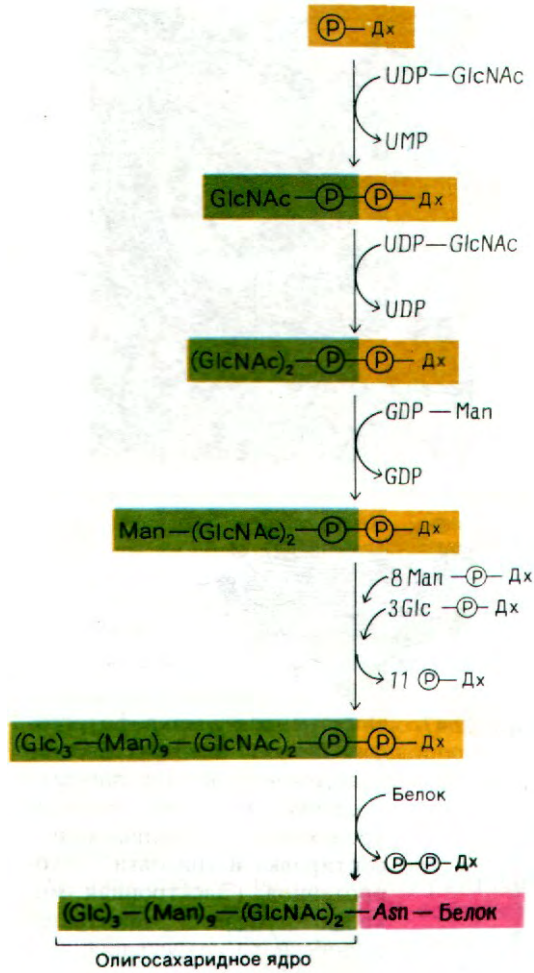


Рис. 29.46. Активированное олигосахаридное ядро синтезируется путем последовательного присоединения отдельных остатков сахаров. Затем весь блок переносится на боковую цепь определенного остатка аспарагина новообразованного белка во внутреннем пространстве ЭР.

окаймленного пузырька и аппарата Гольджи соответствует внутренней стороне мембраны ЭР. Когда окаймленные пузырьки сливаются с плазматической мембраной, их внутренняя поверхность становится наружной поверхностью плазматической мембраны. Следовательно, внутренние поверх-

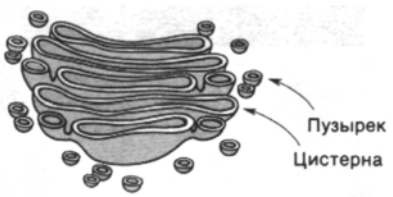
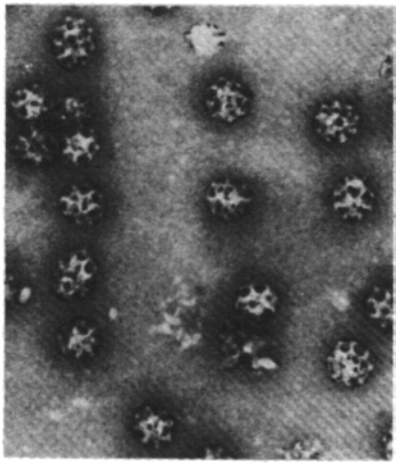


Рис. 29.47. Электронная микрофотография (*вверху*) и схематическое изображение (*внизу*) аппарата Гольджи. В этой органелле происходит модификация, сортировка и упаковка гликопротеинов. (Электронная микрофотография печатается с любезного разрешения д-ра Lynne Mercer.)



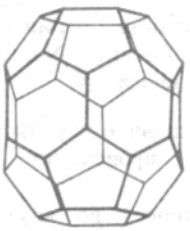


Рис. 29.48. Электронная микрофотография окаймленных пузырьков (*вверху*). Схема окаймленного пузырька. (Печатается с любезного разрешения д-ра Barbara Pearse.)

ности мембраны ЭР и других органелл соответствуют наружной поверхности плазматической мембраны (рис. 29.50). По этой причине углеводные группы гликопротеинов плазматической мембраны всегда расположены на ее наружной поверхности (разд. 10.12).

В аппарате Гольджи происходит перестройка олигосахаридных групп гликопротеинов. Единственная оставшаяся глюкоза и несколько оставшихся манноз олигосахаридного «ядра» удаляются. На этом формирование углеводных остатков некоторых гликопротеинов заканчивается. Более сложные олигосахариды других гликопротеинов образуются путем последовательного присоединения сахаров к остаткам

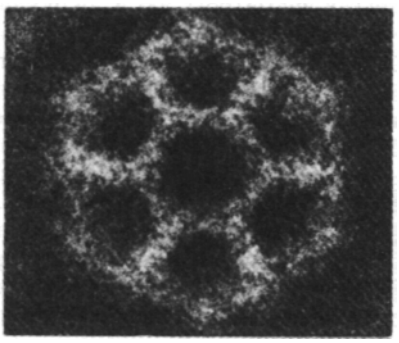


Рис. 29.49. Изображение реконструированного окаймленного пузырька. Оно получено наложением многих электронных микрофотографий. [Woodwart M, P., Roth T. F., J. Supramol. Structure, **11,** 240 (1979).]

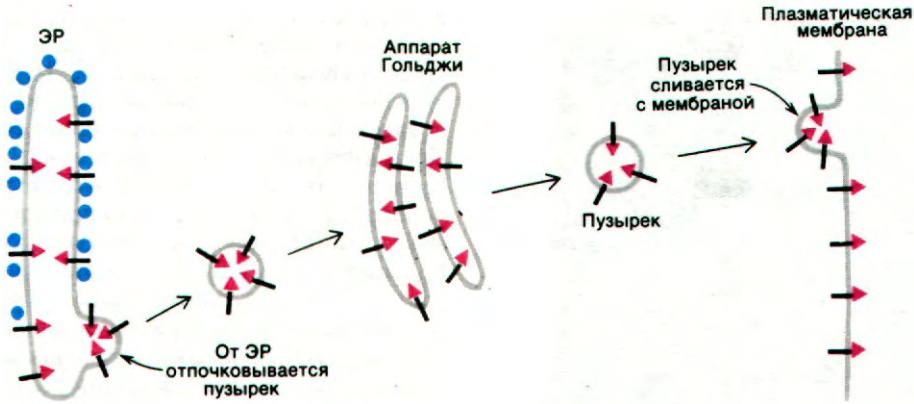


Рис. 29.50. Асимметрия клеточных мембран. Внутренние поверхности ЭР и других органелл соответствуют наружной поверхности плазматической мембраны.

«ядра». Например, в качестве активированных доноров при синтезе концевого трисахаридного остатка, обнаруженного в некоторых гликопротеинах, выступают UDP-N-ацетилглюкозамин, UDP-галактоза и CMP-нейраминидат (рис. 29.51). Этот последний этап биосинтеза, протекающий в аппарате Гольджи, получил название *окончательного гликозилирования* - в отличие от *гликозилирования олигосахаридного «ядра»,* которое происходит в ЭР.

Как происходит сортировка гликопротеинов в аппарате Гольджи? Каким путем они доставляются в места назначения? Ответа на эти интригующие вопросы пока нет, но ключом к пониманию проблемы может послужить *болезнь I-клеток* (ее также называют муколипидозом II). Это нарушение функции лизосом наследуется как аутосомный рецессивный признак и характеризуется сильной задержкой психомоторного развития и деформацией скелета. Лизосомы в соединительных тканях больных содержат крупные включения (название болезни происходит от англ. inclusion - включение) непереваренных гликозаминогликанов и гликолипидов. *Наличие этих включений обусловлено отсутствием в лизосомах больных по меньшей мере восьми ферментов, необходимых для их расщепления.* В то же время огромные количества этих ферментов обнаруживаются в моче и крови больных. Следовательно, синтез активных ферментов при болезни I-клеток происходит, но вместо того, чтобы запасаться в лизосомах, они экспортируются из клетки. Другими словами. *при болезни I-клеток целый ряд ферментов локализуется в неправильном месте.* Эти ферменты не содержат маннозо-6-фосфата, который обычно с ними связан. Следовательно, *маннозо-6-фосфат, по всей вероятности, представляет собой маркер, направляющий в норме многие гидролитические ферменты из аппарата Гольджи в лизосомы.* Интересно выяснить, участвуют ли углеводные остатки других гликопротеинов в регуляции внутриклеточных передвижений.

Заключение

Эукариотическая хромосома содержит одну молекулу двухспиральной ДНК, которая по крайней мере в 100 раз длиннее, чем молекулы ДНК в клетках прокариот. ДНК прочно связана с основными белками, которые называются гистонами. Хроматиновая нить представляет собой гибкую цепь нуклеосом. «Ядро» этого повторяющегося элемента (минимальная нуклеосома, кор) содержит фрагмент ДНК длиной 140 пар оснований, накрученный на октамер гистонов, в состав которого входят по две молекулы гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Минимальные нуклеосомы соединены между собой линкерной ДНК, длина которой обычно составляет 60 пар оснований, связанной с одной молекулой гистона H1. Благодаря нуклеосомам ДНК может укорачиваться в семь раз. Это - первый уровень конденсации ДНК. Эукариотическая ДНК реплицируется полуконсервативным путем и наполовину непрерывно (т.е. получает по одной из родительских цепей), причем репликация на-

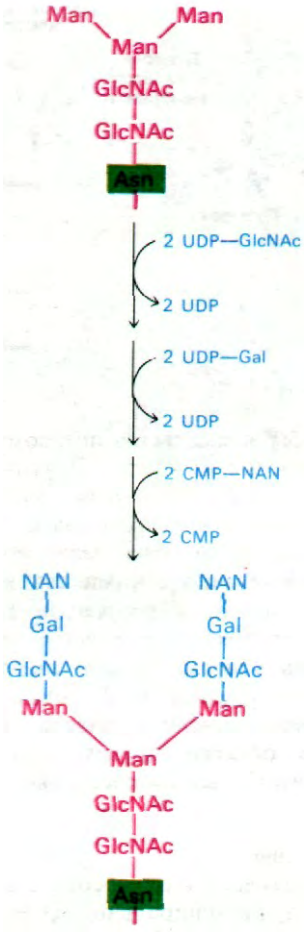


Рис. 29.51. Завершающая стадия синтеза содержащего нейраминидат углеводного остатка гликопротеина (трансферрина человека). Эта реакция происходит в аппарате Гольджи.

чинается в нескольких тысячах мест. Большое число точек инициации обусловлено огромной длиной эукариотической ДНК по сравнению с прокариотической.

Кинетика реассоциации денатурированной нагреванием ДНК показывает, что эукариотическая ДНК в отличие от прокариотической содержит много повторяющихся последовательностей оснований. *ДНК с большим числом повторов* (сателлитная ДНК) обычно расположена вблизи от центромер. Некоторые сателлитные ДНК представляют собой гептануклеотидную последовательность, повторенную более 10^4 раз. Другая фракция *ДНК с умеренным числом повторов.* В геноме многих эукариот гены рибосомных РНК и гистонов присутствуют в количестве десятков или сотен копий. Большая часть ДНК с умеренным числом повторов играет, по-видимому, какую-то регуляторную роль. Третья фракция - *уникальная ДНК.* Она состоит из последовательностей, которые встречаются в гаплоидном геноме только один или несколько раз. Многие из таких белков, как фиброин шелка, гемоглобин и овальбумин, кодируются уникальными генами. Эти гены дают большие количества стабильной мРНК. Уникальные последовательности обычно перемежаются с умеренно повторяющимися последовательностями. Кроме того, для высших эукариот характерно наличие вставочных последовательностей во многих генах, кодирующих белки.

РНК в эукариотических клетках синтезируется тремя типами РНК-полимераз. Первичные транскрипты претерпевают существенные изменения, прежде чем они перейдут из ядра в цитозоль в виде зрелых молекул рРНК, тРНК и мРНК. Информационные РНК получаются из гораздо более длинных первичных транскриптов (гяРНК) путем расщепления и воссоединения фрагментов. Эукариотическая информационная РНК имеет на 5'-конце «колпачок» и на 3'-конце обычно длинную poly(A)-последовательность. Единственный транслируемый участок мРНК обрамлен некодирующими последовательностями, иногда очень длинными. Набор мРНК в эукариотической клетке зависит от избирательного процессинга первичных транскриптов, а также от скорости транскрипции различных генов. Регуляция на уровне трансляции, по-видимому, играет менее важную роль при детерминировании набора белков, синтезируемых каждой данной клеткой. 80S-рибосома эукариот состоит из 60S- и 40S-субчастиц. Как и у прокариот, у эукариот имеется особая инициаторная тРНК, но она не формилирована. Инициация у эукариот регулируется каскадом протеинкиназ, инактивирующих один из факторов инициации (eIF-2). Митохондрии и хлоропласты содержат собственную ДНК, которая не связана с гистонами. Синтез белка в этих органел-

лах напоминает синтез белка у бактерий.

Секреторные и мембранные белки синтезируются рибосомами, связанными с эндоплазматическим ретикулумом. Многие из этих белков содержат сильно гидрофобную N-концевую последовательность, которая служит сигналом для прикрепления рибосомы к мембране ЭР. Затем синтезирующаяся полипептидная цепь активно протягивается через мембрану ЭР, а сигнальная последовательность отщепляется на внутренней стороне. Почти ко всем белкам, синтезированным на связанных с мембранами полисомах, ковалентно присоединяется один или несколько углеводных остатков. В ЭР происходит перенос универсального олигосахаридного блока с активированного донора долихола на специфическую аспарагиновую боковую цепь. Гликопротеины переносятся из ЭР в аппарат Гольджи в окаймленных пузырьках. Эти пузырьки, покрытые клатрином, участвуют во многих процессах обмена между мембранными структурами. В аппарате Гольджи происходит укорачивание и окончательное гликозилирование олигосахаридных остатков. Кроме того, здесь гликопротеины сортируются и отправляются по назначению. Углеводные остатки, по-видимому, играют важную роль в этом процессе сортировки.

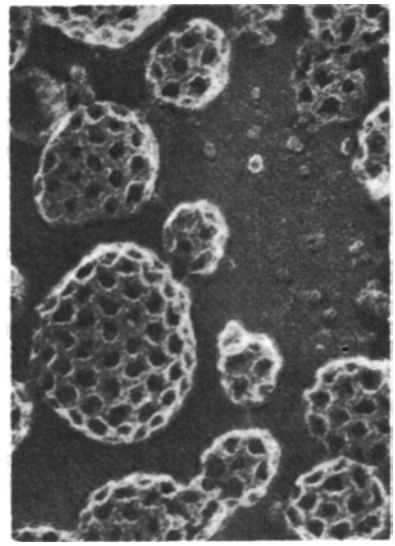


Рис. 29.52. Электронная микрофотография окаймленных пузырьков, лежащих на плазматической мембране клетки. (Печатается с любезного разрешения д-ра John Heuser.)

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Crick F., 1979. Split genes and RNA splicing, Science, 204, 264-271.

DeRobertis E.M., Gurdon J.B., 1979. Gene transplantation and the analysis of development, Sci. Amer., 241(6), 74-82.

Beerman W., Clever U., 1974. Chromosomal puffs, Sci. Amer., 210(4), 50-58.

Palade G., 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. Science, 189, 347-358. (Доступная и весьма информативная Нобелевская лекция.)

Rothman J.E., Lodish H.F., 1979. The assembly of cell membranes, Sci. Amer., 240(1), 48-63. (Превосходное обсуждение проблемы асимметрии мембран.)

Хроматин

Cold Spring harbor Symposia, 1978. Chromatin, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. 42.

McGhee J.D., Felsenfeld G., 1980. Nucleosome structure, Ann. Rev. Biochem., 49, 1115-1155.

Kornberg R.D., 1977. Structure of chromatin, Ann. Rev. Biochem., 46, 931-954.

Kornberg R.D., 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA, Science, 184, 868-871.

Sperling R., Wachtel E.J. The histones, Advan. Protein Chem., in press.

Репликация ДНК

Kornberg A., 1980. DNA Replication, Freeman. (В гл. 6 идет речь об эукариотической ДНК-полимеразе и о репликации у эукариот.)

DePamphilis M.L., Wassarman P.M., 1980. Replication of eucaryotic chromosomes: a close-up of the replication fork, Ann. Rev. Biochem., 49, 627-666.

Kriegstein H.J., Hogness D.S., 1974. The mechanism of DNA replication in *Drosophila* chromosomes: structure of replication forks and evidence for bidirectionality, Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 135-139.

Организация генома

Britten R., Kohn D., 1968. Repeated segments of DNA, Sci. Amer., 222(4), 24-31.

Davidson E.H., Britten R.J., 1979. Regulation of gene expression: possible role of repetitive sequences, Science, 204, 1052-1059.

Long E.O., Dawid I.B., 1980. Repeated genes in eucaryotes, Ann. Rev. Biochem., 49, 727-766.

Schimke R.T., Kaufman R.J., Alt F.W., Kellems R.F., 1978. Gene amplification and drug resistance in cultured murine cells, Science, 202, 1051-1055.

Kedes L.H., 1979. Histone genes and histone messengers, Ann. Rev. Biochem., 48, 837-870.

Tzagoloff A., Macino G., Sebald W., 1979. Mitochondrial genes and

translation products, Ann. Rev. Biochem., **48,** 419-441.

Разорванные гены, транскрипция и процессинг РНК

Darnell J.E., Jr., 1979. Transcription units for mRNA production in eukaryotic cells and their DNA viruses, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 22, 327-353.

Abelson J., 1979. RNA processing and the intervening sequence problem, Ann, Rev. Biochem., **48,** 1035-1069.

Royal A., Garapin A., Cami B., Perrin F., Mandel J.L., LeMeur M., Bregegegre F., Gannon F., LePennec J.P., Chambon P., Kourilsky P., 1979, The ovalbumin gene region: common features in the organisation of three genes expressed in chicken oviduct under hormonal control, Nature, 279, 438-445.

DeRobertis E.M., Olson M.V., 1979. Transcription and processing of cloned yeast tyrosine tRNA genes microinjected into frog oocytes, Nature, 278, 137 143.

Shatkin A.J., 1976. Capping of cucaryotic mRNAs, Cell, 9, 645 653.

Трансляция

*Wool I.*G., 1979, Structure and function of eukaryotic ribosomes, Ann. Rev, Biochem., **48,** 719-754.

Revel M., Groner Y., 1978. Post-transcriptional and translational controls of gene expression in eukaryotes, Ann. Rev. Biochem., 47, 1079-1126.

Parrenheimer A.M., Jr., 1977. Diphtheria toxin, Ann. Rev. Biochem., 46, 69-94.

Гены гемоглобина и талассемия

Weatherall D.J., Clegg J.B., 1979. Recent developments in the molecular genetics of human hemoglobin, Cell, 12, 467-479,

Leder A., Miller H.I., Hamer D.H., Seidman J.G., Norman B., Sullivan M., Leder P., 1978. Comparison of cloned mouse α- and β-globin genes: conservation of intervening sequence locations and extragenic homology, Proc. Nat, Acad. Sci., 75, 6187-6191.

Weatherall D.J., 1978. The thalassemias. In: Stanbury J.B., Wyngaarden J.B. and Fredrickson D.S. (eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease (4th ed.), pp. 1508-1523, McGraw-Hill

Синтез мембранных белков и секретируемые белки

Blobel G., Walter P., Chang G.N., Goldman B.M., Erickson A.H., Lingappa V.R., 1979. Translocation of proteins across membranes; the signal hypothesis and beyond, Symp. Soc. Exp. Biol., 33, 9-36.

Unwin P. N. T., 1977. Three-dimensional model of membrane-bound ribosomes obtained by electron microscopy, Nature, 269, 118-122.

Rothman J.E., Lodish H.F., 1977. Synchronised transmembrane insertion and glycosylation of a nascent membrane protein. Nature 269, 775-780.

Waechter C.J., Lennartz W.J., 1976. The role of polyprenol-linked sugars in glycoprotein synthesis, Ann, Rev. Biochem., 45, 95-112.

Kornfeld R., Kornfeld S., 1976. Comparative aspects of glycoprotein structure, Ann, Rev, Biochem., 45, 217-237.

Robbins P.W., Hubbard S.C., Turco S.J., Winh D.F., 1977. Proposal for a common oligosaccharide intermediate in the synthesis of membrane glycoproteins, Cell, 12, 893-900,

Pearse B.M.F., 1980, Coated vesicles, Trends Biochem, Sci., 5, 131-134, (Краткий обзор о структуре и функции клатрина.)

Rothman J.E., Fine R.E., 1980. Coated vesicles transport newly synthesized membrane glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma membrane in two successive stages, Proc. Nat. Acad, Sci., 77, 780-784

ГЛАВА 30
Вирусы

Вирусы представляют собой инфекционные нуклеиновые кислоты, упакованные в защитную оболочку. Это - наиболее эффективные из внутриклеточных паразитов. В отличие от клеток вирусы не способны вырабатывать энергию с помощью метаболических реакций или синтезировать белки. Они отличаются от клеток и тем, что содержат только ДНК или только РНК, но никогда не содержат и то и другое одновременно. Одни вирусы содержат одноцепочечную нуклеиновую кислоту, другие - двухцепочечную. По сложности строения вирусы широко варьируют - от фага Qβ - РНК-содержащего фага, имеющего всего 4 гена, - до вируса оспы, геном которого насчитывает примерно 250 генов. Готовый внеклеточный продукт размножения вируса называется *вирионом* (или *вирусной частицей*). Нуклеиновая кислота, входящая в состав вариона, одета белковым *капсидом,* защищающим ее от ферментативного расщепления и механических повреждений. Именно капсид обеспечивает внедрение нуклеиновой кислоты в клетки чувствительной клетки-хозяина. У некоторых более сложно устроенных вирусов животных капсид окружен *оболочкой,* содержащей липид и гликопротеин.

Мы уже видели, что изучение вирусов оказало глубокое воздействие на развитие молекулярной биологии. В качестве примера можно привести открытие информационной РНК. Неослабевающий интерес исследователей к вирусам объясняется несколькими причинами. Во-первых, размножение вируса - модель *развития клетки,* так как оно сопровождается последовательным выражением генов и сборкой макромолекул в весьма упорядоченные структуры. Относительно небольшое число вирусных генов, высокая скорость репликации и легкость генетического анализа также делают вирусы весьма привлекательной моделью. Во-вторых, вирусы - источник представлений об *эволюционных процессах* и молекулярных аспектах *взаимоотношений хозяин-паразит.* В третьих, *некоторые вирусы вызывают у экспериментальных животных рак.* Интенсивно изучается и возможная роль вирусов в раковых заболеваниях человека.

30.1 Оболочка мелких вирусов состоит из множества идентичных белковых субъединиц

Общее число аминокислот в оболочке вируса всегда превосходит число нуклеотидов в его геноме. Например, белковая оболочка

Таблица 30.1. **Типы вирусов** (Davis B.D., Eisen H.N., Ginsberg H.S., Wood W.B., Jr., Microbiology, Harper and Row., 1973)

Нуклеиновая кислота	Представитель	Примерное число генов
Одноцепочечная ДНК	Фаг φX174	5
Двухцепочечная ДНК	Вирус полиомы	6
	Аденовирус 2	30
	Фаг T4	150
	Вирус коровьей оспы	240
Однопепочечная РНК	Фаг Qβ	3
	Вирус саркомы Рауса	4
	Вирус табачной мозаики	6
	Вирус полиомиелита	8
	Вирус гриппа	12
Двухцепочечная РНК	Реовирус	22

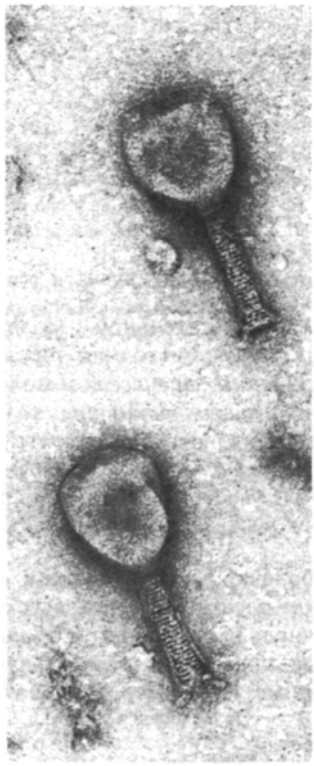


Рис. 30.1. Электронная микрофотография вирионов Т4 в зараженных клетках. (Печатается с любезного разрешения д-ра Jonathan King, д-ра Yoshiko Kikuchi и д-ра Elaine Lenk.)

одной частицы вируса табачной мозаики (ВТМ; рис. 30.2) содержит около 340000 аминокислотных остатков, а его РНК - всего 6400 нуклеотидов. В 1957 г. Френсис Крик и Джеймс Уотсон (Francis Crick, James Watson) обратили внимание на то, что белковая оболочка вируса не может состоять из одной большой молекулы или набора множества различных мелких белков, так как количество вирусной нуклеиновой кислоты слишком мало, чтобы кодировать такое огромное число аминокислотных остатков. С другой стороны, белковую оболочку нельзя уменьшить в размере, так как она должна закрывать всю нуклеиновую кислоту. Вирусы решают эту задачу генетической бедности, образуя оболочку из *большого числа белковых субъединиц одного или нескольких видов*. Например, оболочка ВТМ состоит из 2130 идентичных субъединиц (каждая длиной 158 остатков).

Число способов построения вирусной оболочки из идентичных субъединиц весьма ограниченно. Стабильность достигается путем образования максимального числа связей и использования одинаковых контактов между субъединицами. Образующаяся структура должна быть симметричной. Наиболее вероятны два способа укладки белковой оболочки: *цилиндрическая оболочка, обладающая спиральной симметрией, и сферическая оболочка, обладающая икосаэдрической симметрией* (рис. 30.3). По существу, *все мелкие вирусы представляют собой палочки или сферические частицы* (или сочетание этих двух форм). Правила, определяющие структуру сферических вирусов, сформулировали Дональд Каспар и Арон Круг (Donald Caspar, Aaron Klug). Толчком для вдохновения им послужили архитектурные проекты Бакминстера Фуллера (Buckminster Fuller).

30.2. Самосборка вируса табачной мозаики (ВТМ)

Самый простой и лучше всего изученный процесс сборки вируса - сборка ВТМ. Этот

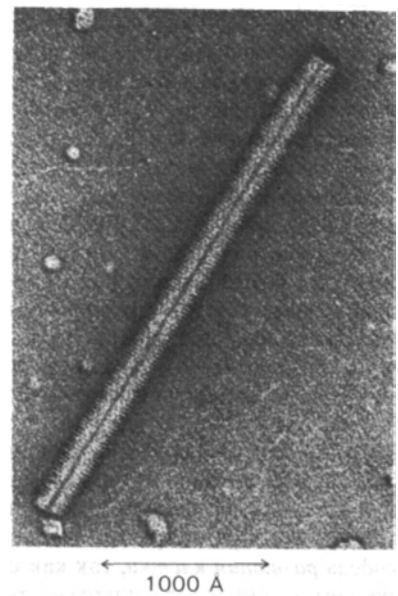


Рис. 30.2. Электронная микрофотография частицы вируса табачной мозаики (ВТМ). (Печатается с любезного разрешения д-ра Robley Williams.)

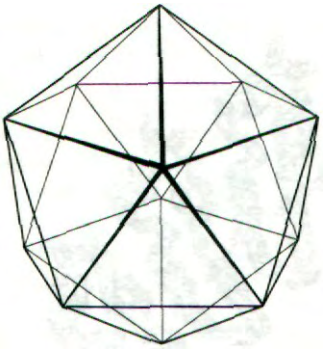


Рис. 30.3. Модель икосаэдра.

палочковидный вирус имеет длину 3000 А, диаметр 180 А (рис. 30.4) и массу примерно 40000 кДа. 2130 идентичных субъединиц белка оболочки плотно упакованы в спираль вокруг одноцепочечной РНК, содержащей 6390 нуклеотидов. РНК глубоко погружена в белок, что делает ее неуязвимой для рибонуклеаз. Каждая белковая субъединица взаимодействует с тремя нуклеотидами. Отделившись от белкового капсида, РНК весьма лабильна, тогда как интактный ВТМ сохраняет инфекционность десятилетиями.

Субъединицы ВТМ не связаны между собой ковалентно. Можно вызвать диссоциацию ВТМ на белок и РНК с помощью, например, концентрированной уксусной кислоты. В 1955 г. Хайнц Френкель-Конрат и Робли Уильяме (Heinz Fraenkel-Conrat, Robley Williams) показали, что в *соответствующих условиях диссоциированные субъединицы оболочки и РНК ВТМ спонтанно реассоциируют и образуют вирусные частицы, неотличимые от исходного ВТМ по структуре и инфекционности*. Это был первый пример самосборки активной биологической структуры. *Процесс самосборки - это такой процесс, при котором в подходящих условиях среды происходит спонтанная ассоциация компонентов и образуется специфическая структура.*

30.3. При сборке вирусной частицы ВТМ белковые диски присоединяются к петле РНК

A priori простейший механизм сборки ВТМ заключался бы в ступенчатом присоединении отдельных белковых субъединиц к РНК. Трудность, однако, состоит в этом случае в том, что скорость нуклеации будет чрезвычайно мала. Прежде чем комплекс замкнется сам на себя, образовав один оборот спирали, и таким образом стабилизируется, к гибкой молекуле РНК должно присоединиться примерно 17 субъединиц оболочки. Эта проблема может быть решена присоединением к РНК сразу целого комплекса из многих субъединиц. Действительно, белок оболочки легко образует *двухслойный диск* из 34 субъединиц. Каждый слой диска представляет собой кольцо из 17 субъединиц; примерно столько субъединиц ($16\,^{1}/_{3}$) приходится на один оборот спирали ВТМ. Клуг и его сотрудники исследовали трехмерную структуру диска (рис. 30.5) и показали, что он представляет собой главный промежуточный продукт при сборке ВТМ. *Важнейшее свойство диска состоит в том, что его субъединицы скользят относительно друг друга и образуют спираль их двух оборотов, так называемую «запорную шайбу»* (рис. 30.6).

Диск гораздо быстрее взаимодействует с РНК ВТМ, чем с чужеродной ДНК. Следовательно, РНК ВТМ, по-видимому, содержит последовательность оснований, которую специфически узнает диск и которая

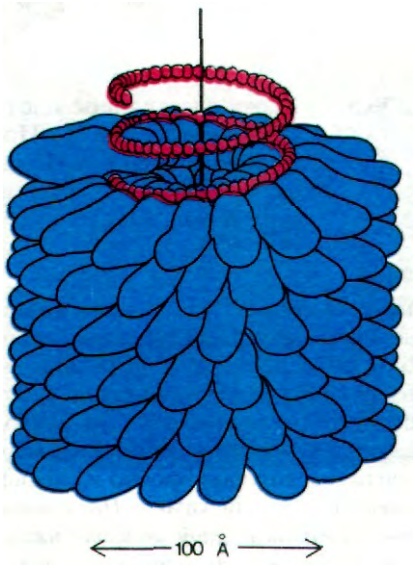


Рис. 30.4. Модель части ВТМ, на которой показана спиральная укладка белковых субъединиц вокруг одноцепочечной молекулы РНК. [Klug A., Caspar D. L. D., Advan. Virus Res., 7, 274 (1960).]

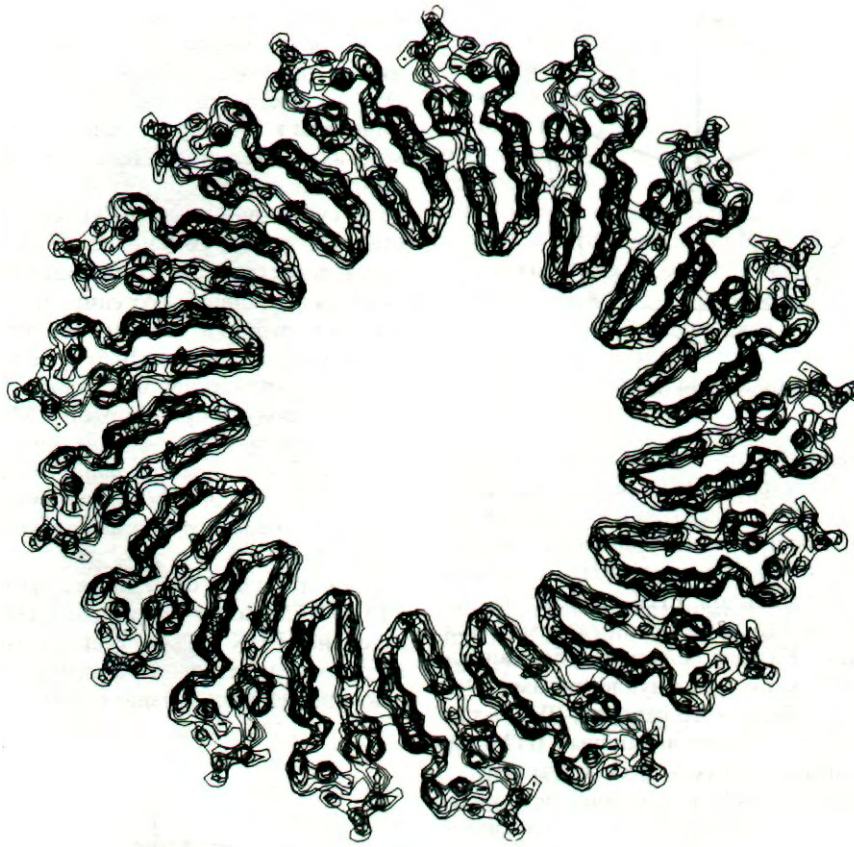


Рис. 30.5. Карта электронной плотности белкового диска ВТМ. Показан слой толщиной 6 А. (Печатается с любезного разрешения д-ра Aaron Klug.)

инициирует сборку. Эта область инициации была выделена следующим образом. К РНК ВТМ добавляли несколько дисков, чтобы покрыть область инициации, и затем расщепляли остальную РНК нуклеазой. Защищенный фрагмент содержит примерно 65 нуклеотидов, которые прочно и специфично связываются с дисками. *Последовательность оснований в этой области инициации дает все основания думать, что этот фрагмент РНК образует структуру шпильки со стеблем, состоящим из спаренных оснований, и петлей* (рис. 30.7). Самое интересное. что петля содержит в каждом третьем положении G. Такое расположение оснований в триплетах соответствует стехиометрии субъединиц оболочки вируса - одна субъединица на три нуклеотида. Следовательно, по всей вероятности, петля связывается с первым диском, и с этого начинается сборка вирусной частицы.

Неожиданно оказалось, что петля инициации расположена далеко от обоих концов РНК. Точка начала сборки расположена на расстоянии 5300 нуклеотидов от 5'-конца и примерно 1000 нуклеотидов от 3'-конца РНК. Другой неожиданностью было то, что оба конца РНК выходят с *одной и той же* стороны растущей частицы ВТМ (рис. 30.8). Длина 3'-конца на протяжении процесса сборки остается более или менее постоян-

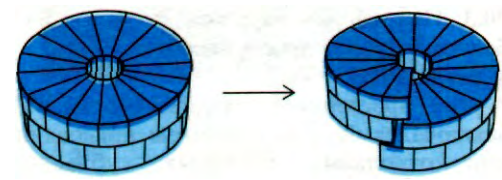


Рис. 30.6. Схема превращения белкового диска ВТМ в спиральную форму «запорной шайбы». [Klug A., Fed. Proc., 31, 40 (1972).]

ной, а 5'-конец по мере удлинения вирусной частицы становится короче.

Наиболее вероятная модель образования частиц проиллюстрирована на рис. 30.9. Сборка начинается с проникновения петли инициации в центральное отверстие двухслойного белкового диска. Петля связывается с первым оборотом диска, и прилегающий стебель, состоящий из спаренных оснований, раскрывается. Это взаимодействие переводит диск в форму спиральной запорной шайбы, и диск захватывает РНК. Так начинается построение спирали вируса. Затем к новообразованной петле РНК, торчащей из центрального отверстия, присоединяется еще один диск. Благодаря протаскиванию 5'-конца через центральное отверстие растущей вирусной частицы при добавлении каждого следующего диска образуется новая петля. Наконец, происходит одевание 3'-конца каким-то пока непонятным способом.

Помимо того что двухслойный диск обеспечивает быструю нуклеацию, он существенно увеличивает специфичность образования оболочки. Диск может связываться со многими нуклеотидами, тогда как одна субъединица - только с тремя. Следовательно, диск обладает гораздо более высокой избирательностью по отношению к РНК ВТМ по сравнению с мРНК клетки-хозяина, чем одна субъединица. Еще одно важное свойство дисков состоит в том, что в физиологических условиях они не образуют спиралей без РНК. В этом отношении важнейшую роль играют две карбоксильные группы в каждой субъединице. При нейтральном значении pH в спиральной форме ионизированы обе карбоксильные группы, а в диске - только одна. Электростатическое отталкивание между близко расположенными карбоксилат-ионами в спиральной форме благоприятствует образованию диска. Связывание РНК со спиральной формой сопровождается достаточным изменением свободной энергии, чтобы преодолеть электростатическое отталкивание карбоксилатных ионов. Итак, *карбоксилат-ионы - негативный регулятор, препятствующий образованию спирали без РНК.*

30.4. Заражение фагом Т4 полностью перестраивает синтез макромолекул в клетке *E.coli*

Бактериофаг Т4 - гораздо более сложный вирус, чем ВТМ. Его двухспиральная ДНК содержит примерно 165 генов по сравнению

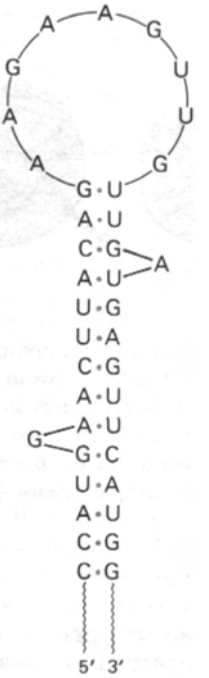


Рис. 30.7. Участок РНК ВТМ, обеспечивающий инициирование сборки вирусной частицы ВТМ.

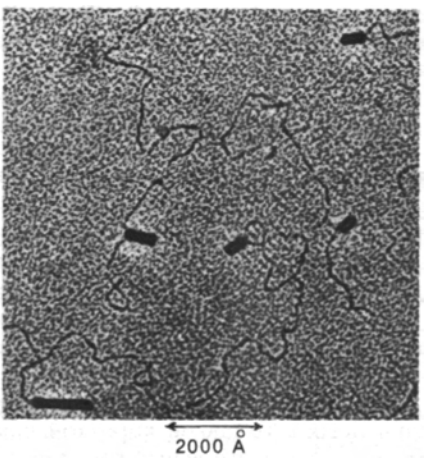


Рис. 30.8. Электронная микрофотография частично реконструированных частиц ВТМ. Видны два хвоста РНК, отходящие от каждого растущего вириона. [Lebeurier G., Nicholaeff A., Richards K. E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 150 (1977).]

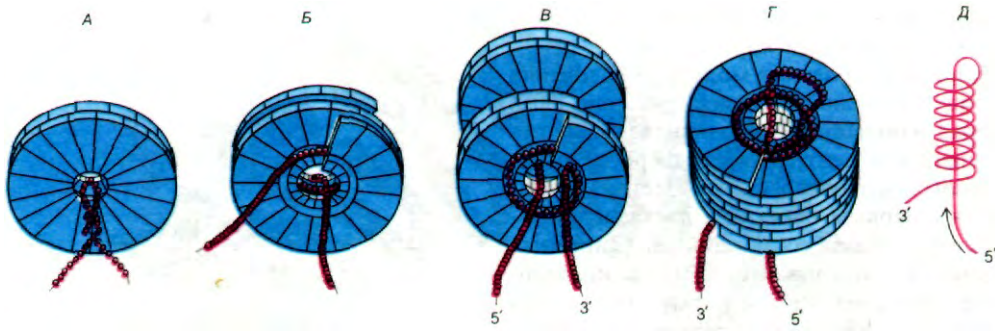


Рис. 30.9. Схема сборки ВТМ. *А* - область инициации в РНК образует петлю и проходит в центральное отверстие белкового диска. *Б* - диск переходит в спиральную форму «запорной шайбы». *В* - к тому концу РНК, где расположена петля, присоединяются новые диски. *Г* - одна из концов РНК все время протаскивается через центральное отверстие и взаимодействует с новыми дисками. *Д* - схематическое изображение молекулы РНК в частично собранном вирусе. Направление движения РНК, обозначено стрелкой. (Butler P. J.G., Klug A., Sci.Amer., 1978.)

с 6 генами ВТМ. Однако структура, размножение и процесс сборки фага Т4 изучены довольно хорошо, так как он подвергался интенсивному генетическому и биохимическому анализу. Вирион Т4 состоит из *головки. отростка* и шести *нитей (фибрилл) отростка* (рис. 30.10). Его молекула ДНК плотно упакована внутри икосаэдрической белковой оболочки и образует головку вируса. Отросток состоит из двух соосных трубок, соединенных с головкой короткой шейкой. В отростке сократительный чехол окружает центральный стержень, через который ДНК вводится в бактерию-хозяина. Отросток несет на конце базальную пластинку с шестью короткими зубцами, от которой отходит шесть длинных тонких нитей.

Концы нитей отростка связываются с определенными участками на клетке *E.coli.* В результате АТР-зависимого сокращения чехол подтягивает головку фага к базальной пластинке и нитям отростка, и в результате центральный стержень проникает через клеточную стенку, но не через мембрану клетки. Затем обнаженная фаговая ДНК проникает через клеточную мембрану. *По истечении несколько минут все реакции синтеза клеточных ДНК, РНК и белка останавливаются и начинается синтез вирусных макромолекул.* Другими словами, заразивший клетку вирус овладевает синтетическими механизмами бактериальной клетки и замещает ее гены своими.

В ДНК фага Т4 имеется три группы генов, которые транскрибируются на различных стадиях заражения: *предранние, ранние и по-*

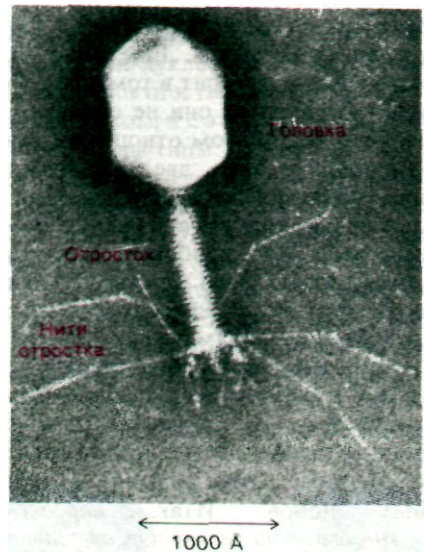


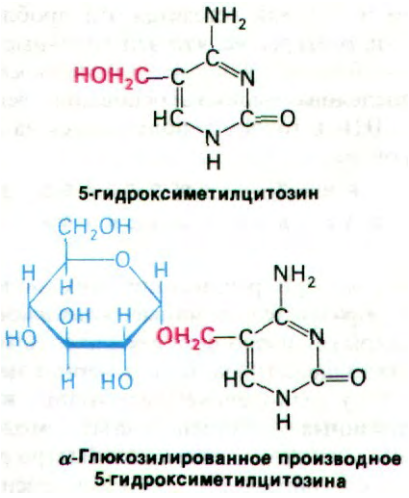
Рис. 30.10. Электронная микрофотография фага Т4. (Williams R. C., Fisher H. W., An electron micrographic atlas of viruses, C. C. Thomas, Springfield, Illinois, 1974. Печатается с любезного разрешения издателя.)

Таблица 30.2. **Гены фага Т4** [Wood W.B., Revel H.R., Bacteriol. Rev., 40, 860 (1976)]

Тип	Число
Метаболические, необходимые	22
Метаболические, необходимыми не являются	60
Сборка частицы, структурные белки	40
Сборка частицы, другие белки	13
Общее число идентифицированных генов	135

здние. Предранние и ранние гены транскрибируются и транслируются до того, как синтезируется ДНК фага Т4. Некоторые белки, кодируемые этими генами, обеспечивают выключение синтеза клеточных макромолекул. *Вскоре после заражения ДНК клетки-хозяина распадается под действием дезоксирибонуклеазы, кодируемой одним из ранних генов фага Т4. ДНК самого фага Т4 не гидролизуется под действием этого фермента, поскольку в ней нет кластеров (сгруппированных остатков) цитозина.* В ДНК фага Т4 вместо цитозина находится *гидроксиметилцитозин* (ГМЦ). К тому же остатки ГМЦ в ДНК Т4 *глюкозилированы*.

Эти производные цитозина включаются в ДНК бактериофага Т4 благодаря действию нескольких фагоспепифических ферментов, синтезирующихся на ранней стадии заражения. Один из них гидролизует dCTP с образованием dCMP, чтобы воспрепятствовать включению dCTP в ДНК фага Т4. Затем второй фермент вводит в dCMP гидроксиметильную группу, и образуется 5-гидроксиметилцитидилат. Третий фермент превращает 5-гидроксиметилцитидилат в трифосфат, который служит субстратом для ДНК-полимераз. Наконец, четвертый фермент гликозилирует некоторые из содержащихся в ДНК остатки гидроксиметилцитозина.



Синтез *поздних белков* сопряжен с репликацией ДНК фага Т4. На этом этапе образуются белки капсида и лизоцим. Когда сборка вирионов потомства завершена, лизоцим гидролизует клеточную стенку бактерии и разрушает ее. Примерно через 20 мин после заражения возникает около двухсот новых вирусных частиц.

30.5. В упорядоченной сборке фага Т4 участвуют вспомогательные белки и протеазы

Сборка фага Т4 - гораздо более сложный процесс, чем сборка ВТМ, так как капсид фага Т4 значительно сложнее по своей структурной организации и содержит примерно 40 различных белков. Еще тринадцать дополнительных белков (по сравнению с ВТМ) участвуют в сборке фага Т4, но не входят в состав капсида. Механизм сборки этого вируса был исследован с помощью сочетания генетических, биохимических и электронно-микроскопических методов. Работы Вильяма Вуда и Роберта Эдгара (William Wood, Robert Edgar), посвященные мутантам фага Т4, дефектным по способности к сборке, позволили установить следующее.

1. *Существует три основных пути превращений, которые приводят к образованию вируса.* В результате этих превращений независимо формируются головка, отросток и нити отростка (рис. 30.11). Если блокировать образование одного из перечисленных компонентов, это не повлияет на синтез двух других.

2. Каждая из этих последовательностей превращений идет *в строго определенном порядке.* Все белки капсида синтезируются одновременно во второй половине цикла заражения. Таким образом, строгой последовательности сборки головки, отростка и нитей отростка способствуют структурные особенности самих промежуточных продуктов. *Ни один из этих процессов ассоциации не может идти с заметной скоростью, пока не закончится предыдущий.* Возможно, часть

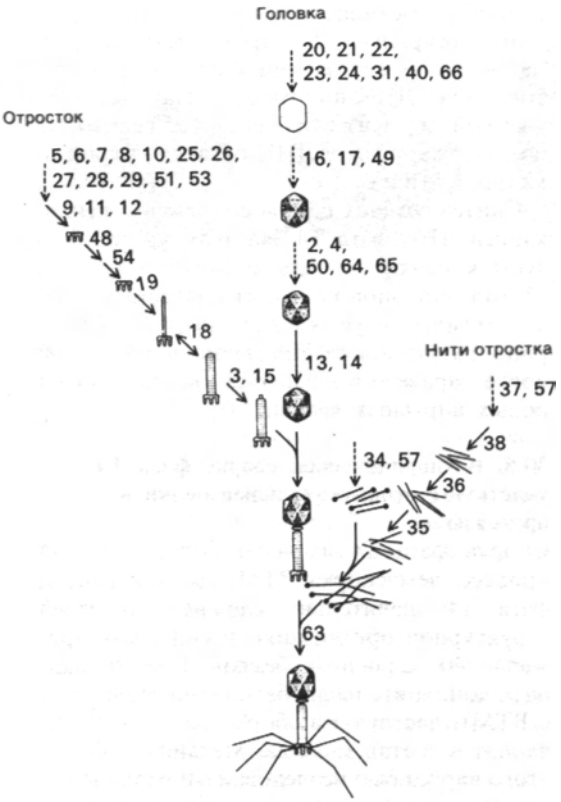


Рис. 30.11. Морфогенез фага Т4. Числа возле стрелок обозначают гены, продукты которых необходимы для соответствующих этапов сборки. (Wood W.B., Genetic mechanisms of development, Ruddle F. H., ed., Academic Press, 1973, p. 29.)

энергии связывания на каждом этапе используется для снижения энергии активации следующего процесса ассоциации и таким образом увеличивает его скорость.

3. Головка и отросток должны быть полностью собраны, прежде чем они соединяются друг с другом. Затем готовые нити отростка присоединяются к базальной пластинке. И в этом случае строгая последовательность событий обеспечивает выход только готовых вирусных частиц.

Образование вирионов фага Т4 идет не только путем самосборки. Важную роль на некоторых этапах этого процесса играют *вспомогательные (морфопоэтические) белки* и *протеазы.* Например, для образования центральной «втулки» базальной пластинки отростка нужны три белка, которые не входят в состав собранного отростка. Эти вспомогательные белки служат временными шаблонами для ассоциации компонентов «втулки». Протеазы играют важную роль в сборке головки. Основной белок головки с массой 45 кДа, который называется *gp*23* (*gp* - от англ. gene product - продукт гена), образуется из предшественника gp23 с массой 55 кДа. Расщепление происходит в тот момент, когда головка частично собрана; это свидетельствует о том, что оно запускает механизм втягивания ДНК в головку. Известны еще три белка головки, которые расщепляются в процессе сборки. *Таким образом, фаг Т4 образуется путем самосборки и сборки с участием вспомогательных (морфопоэтических) белков и ферментов.*

30.6. В репликации фага Т4 участвует конкатемерный промежуточный продукт

При репликации линейных молекул ДНК, в частности ДНК фага Т4, возникает особая проблема. 5'-концы новообразованной дочерней ДНК застроены не до конца, так как РНК-затравка была удалена, но не была замещена ДНК (рис. 30.12). Напомним, что ДНК-полимераза не способна синтезировать цепи ДНК *de novo* в направлении 3'—>5' (разд. 24.19). При репликации кольцевых молекул ДНК такой проблемы не возникает, так как 3'-конец новой цепи служит затравкой для завершения синтеза дочерней цепи. Как же решают эту проблему фаг Т4 и другие вирусы, геном которых представляет собой линейную ДНК? Важным указанием на то, как решается эта проблема, послужило открытие, что эти линейные молекулы обладают *концевой избыточностью,* т.е. последовательность оснований левого конца ДНК в точности повторяется на правом конце:

5′ А Б В Г Д——Ш Щ Э Ю Я А Б В 3′
3′ а б в г д——ш щ э ю я а б в 5′

К тому же при репликации этих молекул ДНК образуются длинные *конкатемеры,* Эти открытия позволили предложить механизм заполнения 5'-концов дочерних цепей. Поскольку одноцепочечные концы новообразованных двухцепочечных молекул взаимно комплементарны, они быстро реассоциируют (рис. 30.13). Эта комплементар-

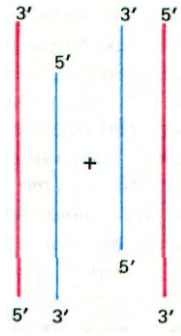


Рис. 30.12. 5'-концы новосинтезированных линейных молекул ДНК застроены не до конца. Родительские цепи ДНК показаны красным цветом, а дочерние - синим.

Рис. 30.13. Конкатемерный промежуточный продукт репликации линейных двухцепочечных молекул ДНК. Двухцепочечные молекулы ДНК с незастроенными концами ассоциируют друг с другом благодаря спариванию комплементарных одноцепочечных концов (АВ с ab). Затем одноцепочечные пробелы застраиваются.

ность - следствие концевой избыточности последовательности оснований. В конкатемерной цепочке, состоящей из повторяющихся звеньев - двухспиральных молекул фаговой ДНК, 3'-конец одной молекулы служит затравкой для заполнения 5'-конца другой.

30.7. ДНК фага Т4 вводится в преобразованную головку

Как образуется молекула ДНК, соответствующая одному фаговому геному, и как она упаковывается в головку? Эта проблема невероятно сложна: ДНК имеет контурную длину 56 мкм и при этом должна уместиться в головку, длина которой по большей оси 0,1 мкм. К тому же объем ДНК ($1{,}8 \cdot 10^{-4}$ мкм^3) ненамного меньше объема головки ($2{,}5 \cdot 10^{-4}$ мкм^3). *A priori* имеются две возможности: ДНК может входить в предобразованную головку или головка может собираться вокруг «ядра» конденсированной ДНК. Выделение пустых головок фага, способных упаковать ДНК, прямо доказывает, что *ДНК фага Т4 вводится в предобразованные головки* (рис. 30.14). В то время как ДНК входит в головку и свертывается в структуру, напоминающую моток пряжи, происходит расщепление нескольких белков головки. Одновременно происходит разбухание головки. Наконец, *когда в головку входит фрагмент ДНК, соответствующий длине одного генома, конкатемерная*

Рис. 30.14. Схема упаковки ДНК при сборке головки фага Т4.

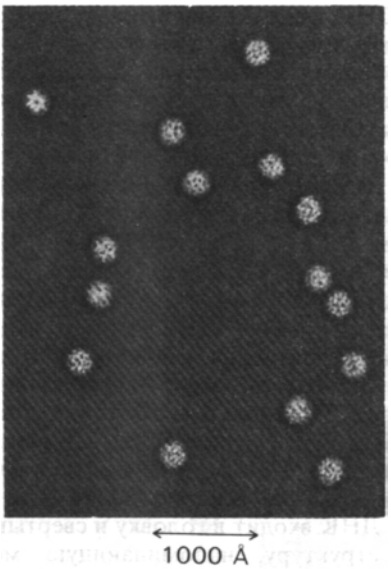


Рис. 30.15. Электронная микрофотография вируса кустистой карликовости томата. (Печатается с любезного разрешения д-ра Robley Williams.)

ДНК расщепляется. Нуклеаза действует не путем узнавания какой-либо определенной последовательности, а расщепляет ДНК именно в тот момент, когда головка наполнена. Этим и объясняется тот факт, что концы молекул ДНК Т4 обладают концевой избыточностью, ДНК упаковывается таким образом, что она может быть очень быстро введена в бактерию при следующем цикле заражения. Чем обеспечивается такая поразительная подвижность, остается загадкой.

30.8. Гибкость белка оболочки ВККТ позволяет ему образовывать икосаэдрический капсид

Вирус кустистостой карликовости томатов (ВККТ) - сферический вирус, иллюстрирующий другой принцип организации вируса (рис. 30.15). ВККТ содержит одну молекулу РНК длиной 4800 нуклеотидов, окруженную оболочкой из 180 идентичных белковых субъединиц массой 41 кДа. Как уложены эти субъединицы оболочки? Максимально возможная симметрия изотермической оболочки достигается в случае икосаэдра и имеет порядок 60 (рис. 30.16, *А*). Другими словами, не более 60 идентичных субъединиц могут быть упакованы в сферическую оболочку с соблюдением *абсолютной* симметрии. Но ВККТ и ряд других сферических вирусов содержат 180 идентичных субъединиц. *Биологическое преимущество построения оболочки из 180 вместо 60 субъединиц такого же размера состоит в том, что в более крупный вирион можно упаковать больше нуклеиновой кислоты. Это достигается не нарушением симметрии, а некоторым ее ослаблением* (рис. 30.16, *Б*). Рентгеноструктурный анализ структуры ВККТ высокого разрешения, проведенный Стивеном Харрисоном (Stephen Harrison), показал, что химически идентичные субъединицы его оболочки можно отнести к трем группам (А, В и С), каждая из которых состоит из 60 белков, подчиняющихся строгой икосаэдрической симметрии. В то же время молекулы из разных групп расположены по отношению друг к другу несколько по-разному; поэтому их называют *квазиэквивалентными*.

Как объяснить квазиэквивалентность с физической точки зрения? Рентгеноструктурный анализ показал, что каждая субъединица состоит из S-домена, образующего часть поверхности оболочки; Р-домена, выступающего наружу; N-концевого участка, направленного внутрь. Р- и S-домены всех субъединиц имеют примерно одинаковое строение. В то же время угол между Р- и S-доменами в субъединицах группы С сильно отличается от угла в субъединицах А и В. Р- и S-домены соединены *шарниром,* обеспечивающим поворот на угол до 20°. Еще одно отличие состоит в том, что N-концевая часть в субъединицах группы С упорядочена, а в субъединицах А и В находится в беспорядочной конформации. *Благодаря такой гибкости структурной организации субъединицы, принадлежащей к различным группам, могут взаимодействовать друг с другом почти идентичным образом, что необходимо для самосборки.* С другой стороны, РНК внутри частицы, по-видимому, не находится в какой-нибудь определенной конформации. Гибкие N-концевые участки субъединиц оболочки проникают внутрь и взаимодействуют с РНК.

30.9. Бактериальные рестрикционные эндонуклеазы расщепляют чужеродные молекулы ДНК

Мы уже видели, что фаг Т4 обладает ферментативной системой для избирательного расщепления ДНК клетки-хозяина. Подоб-

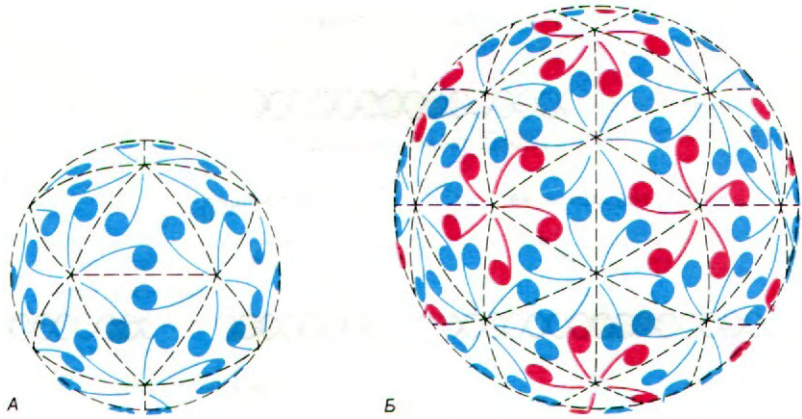


Рис. 30.16. Икосаэдрическая поверхностная решетка, демонстрирующая упаковку 60 совершенно одинаковых субъединиц (*А*) и 180 квазиэквивалентных субъединиц (*Б*). Обратите внимание, что все контакты типа «хвост к хвосту» на рис. *А* образуются кольцевыми группами по пять субъединиц, а на рис. *Б* некоторые такие контакты образуются группами по пять, а другие — по шесть субъединиц. [Harrison S.C., Trends Biochem. Sci., 3,4 (1978).]

но этому, у бактерий имеются ферменты, называемые *рестриктирующими эндонуклеазами,* которые расщепляют чужеродные молекулы ДНК. Эти ферменты были открыты в результате наблюдения, что фаги, выращенные на одном штамме бактерий (например, *E.coli* B), плохо растут на другом штамме (*E.coli* K) и наоборот. Такое явление, когда фаг плохо растет на штамме, отличном от того, на котором он был выращен, было названо *рестрикцией.* Однако небольшая часть фага (примерно 10^{-5}) избегает рестрикции и в дальнейшем хорошо растет на новом хозяине. При этом фаги теряют способность расти на старом хозяине.

Все эти данные показали, что специфическая модификация в клетках-хозяевах защищает фаг от рестрикции. Затем Вернер Арбер (Werner Arber) продемонстрировал, что специфическая модификация клеткой-хозяином на самом деле воздействует на фаговую ДНК и что рестрикция обусловлена деградацией ДНК фага. ДНК клетки-хозяина *и другие молекулы ДНК, содержащиеся в клетках-хозяевах, метилированы по определенным участкам. Те же участки узнает и рестриктирующая эндонуклеаза, которая расщепляет только неметилированные последовательности. Таким образом, метилирование определенного основания в последовательности-мишени (участке узнавания) препятствует гидролизу ферментом рестрикции* (рис. 30.17). Момент, в который происходит модификация, имеет принципиально важное значение: бактериальная ДНК не подвергается расщеплению, потому что она метилируется раньше. Только что реплицированная бактериальная хромосома, метилированная только по одной - родительской - цепи, устойчива к действию фермента рестрикции. Такая наполовину модифицированная ДНК становится полностью метилированной до начала следующего цикла репликации.

У бактерий обнаружено два типа систем рестрикция-модификация. В системах типа I активность метилазы и нукдеазы ассоциирована с крупным комплексом, состоящим из нескольких субъединиц. Например, такие комплексы у *E.coli* K и B состоят из полипептидных цепей трех типов. α-Цепь обладает эндонуклеазной активностью, β-цепь - метилазной активностью, а γ-цепь несет участок узнавания ДНК. Ферменты типа I нуждаются в S-аденозилметионине и в ATP для проявления как нуклеазной, так и метилазной активности. *Ферменты типа I расщепляют немодифицированную ДНК в случайном месте на расстоянии 1900 пар оснований или более в 5'-сторону от участка*

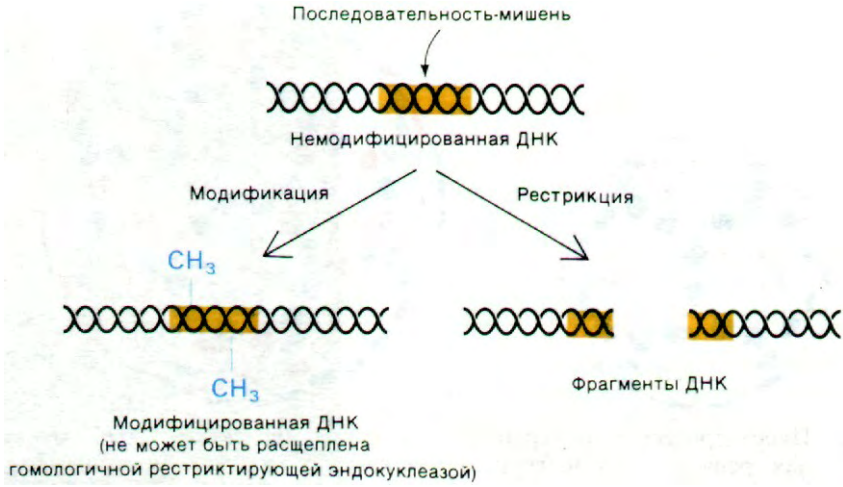


Рис. 30.17. Метилирование участков узнавания (последовательностей-мишеней) защищает их от расщепления рестриктирующей эндонуклеазой.

узнавания[1] *и одновременно гидролизуют ATP.* В системах типа II, наоборот, метилазы и нуклеазы разделены. S-аденозилметионин служит донором метильной группы в реакции модификации, но не участвует в расщеплении ДНК. Еще одно отличие состоит в том, что нуклеазы и метилазы типа II не нуждаются в ATP. Самое удивительное, что *места расщепления нуклеазами типа II весьма специфичны.* Как уже обсуждалось в одной из предыдущих глав (разд. 24.27), многие из этих ферментов узнают определенную последовательность из *4-6* пар оснований и гидролизуют в каждой цепи единственную строго определенную фосфодиэфирную связь в этой области. Отличительная особенность этих участков расщепления состоит в том, что они *симметричны относительно оси вращения второго порядка* (рис. 30.18). Ферменты рестрикции - незаменимый инструмент в исследовании структуры ДНК (разд. 24.27) и создании новых молекул ДНК (разд. 31.9).

[1] Арбер изучал систему рестрикции—модификации типа *I* на содержащем одноцепочечную ДНК фаге fd, поэтому он мог указать положение участка расщепления относительно участка узнавания так, как это сделано в тексте.- *Прим. перев.*

30.10. Стратегия репликации РНК-содержащих вирусов

Репликация РНК-содержащих вирусов представляет собой особую проблему, так как в незараженных клетках-хозяевах нет ферментов для синтеза РНК по РНК-матрице. Следовательно, РНК-содержащие вирусы должны нести генетическую информацию для синтеза *РНК-зависимой РНК-полимеразы* (которую называют также *РНК-репликазой или РНК-синтетазой*) или для *РНК-зависимой ДНК-полимеразы* (называемой также *обратной транскриптазой*). РНК-содержащие вирусы удобно классифицировать в зависимости от РНК, содержащейся в вирионе, и мРНК. По определению мРНК представляет собой (+)РНК, а ком-

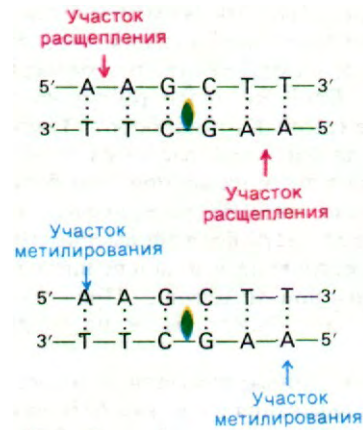


Рис. 30.18. Специфичность рестриктирующей эндонуклеазы *Hind III* из *Hemophilus influenza* и соответствующей метилазы. Зеленым цветом показана ось симметрии второго порядка.

Пикорнавирусы - группа мелких (*pica*) РНК-содержащих (*рна* - от айгл. RNA) вирусов. Одна одноцепочечная молекула (+)РНК окружена икосаэдрической белковой оболочкой диаметром 270 А. К пикорнавирусам относятся вирус полиомиелита, риновирус (вызывающий обычную простуду) и вирус ящура крупного рогатого скота.

Рис. 30.19. Способы экспрессии генов РНК-содержащих вирусов. [Baltimore D., Bacteriol. Rev., 35, 326 (1971).]

плементарная ей цепь - (−)РНК. Известны четыре пути репликации и транскрипции РНК-содержащих вирусов (рис. 30.19). Вирусы 1-го класса (например, вирус полиомиелита) - вирусы, *содержащие положительную цепь РНК.* Они синтезируют (−)РНК, которая используется в качестве матрицы для образования (+)мРНК. Вирусы 2-го класса (например, вирусы бешенства) содержат *отрицательную цепь РНК,* у них (−)РНК вириона служит матрицей для синтеза (+)мРНК. Вирусы 3-го класса (например, реовирусы) содержат *двухцепочечную РНК;* (±)РНК вириона направляет асимметрический синтез (+)мРНК. Наиболее необычны вирусы 4-го класса - *ретровирусы* (например, вирус саркомы Рауса). У них выражение генетической информации, содержащейся в (+)РНК вириона, опосредовано образованием ДНК, которая служит матрицей для синтеза (+)РНК. Таким образом, поток генетической информации ретровирусов направлен от РНК к ДНК и затем обратно к РНК.

30.11. Белки вируса полиомиелита образуются путем множественного расщепления гигантского предшественника

Вирус полиомиелита состоит из одноцепочечной (+)РНК длиной 7,5 kb, заключенной в икосаэдрический капсид. Проникнув в цитоплазму клетки-хозяина, эта молекула РНК вириона используется в качестве матрицы для синтеза белка. Она транслируется рибосомами клетки-хозяина с образованием белков капсида и особой РНК-полимеразы, работающей по РНК-матрице (*РНК-репликазы*). Затем РНК-репликаза синтезирует (−)цепи на матрице (+)РНК вириона (рис. 30.21). (−)РНК в свою очередь служит матрицей для синтеза множества (+)цепей, которые участвуют в синтезе белка или упаковываются в капсиды и дают новые вирионы.

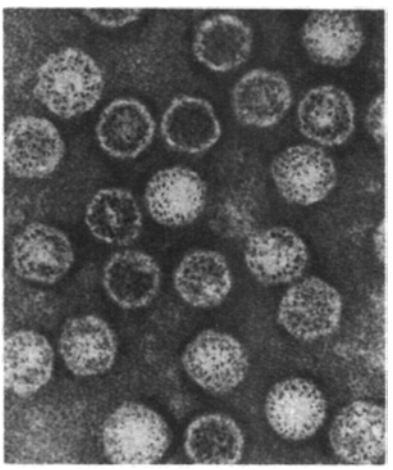


Рис. 30.20. Электронная микрофотография частиц вируса полиомиелита. (Печатается с любезного разрешения д-ра John Finch.)

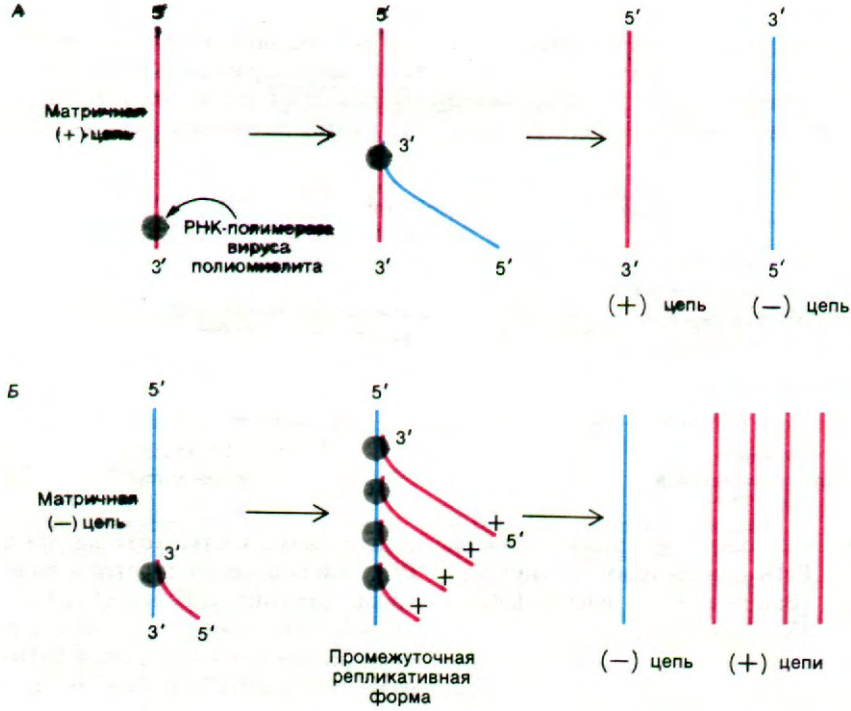


Рис. 30.21. Репликация РНК вируса полиомиелита.

Поразительная особенность выражения генов вируса полиомиелита состоит в том, что (+)РНК вириона служит матрицей для синтеза непрерывной полипептидной цепи, содержащей более 2000 аминокислотных остатков. Дэвид Балтимор (David Baltimore) показал, что этот *гигантский полипептид расщепляется протеазами клетки-хозяина на семь белков:* четыре белка оболочки, одну РНК-репликазу и два белка, функция которых пока еще неизвестна (рис. 30.22). Новообразованная полипептидная цепь расщепляется на три куска, которые затем подвергаются дальнейшему расщеплению. В частности, два белка оболочки образуются из предшественника на завершающей стадии сборки вириона.

Почему вирус полиомиелита синтезирует свои белки таким на первый взгляд сложным путем? По-видимому, у него нет выбора. Напомним, что *в эукариотических клетках молекула мРНК по непонятной пока причине может при трансляции дать только одну полипептидную цепь.* Прокариотические мРНК, наоборот, сплошь и рядом полицистронны (например, мРНК лактозного оперона). Таким образом, вирус полиомиелита использует расщепление полипротеина, чтобы преодолеть ограничения, накладываемые особенностями животной клетки-хозяина.

30.12. С геномной РНК вируса везикулярною стоматита транскрибируется пять моноцистронных мРНК

Вирус везикулярного стоматита вызывающий легкое заболевание крупного рогатого скота, и вирус бешенства - примеры второго способа выражения генов. Их вирионы содержат одноцепочечную молекулу (−)РНК, которая не может служить матрицей. *Поэтому первый этап ее экспрессии - синтез (+)РНК. Поскольку в незараженных клетках нет РНК-репликазы, вирусы должны содержать этот фермент в составе вириона и вводить его при заражении в клетку.* Действительно, два из пяти белков вириона ВВС осуществляют репликацию РНК. Для проявления инфекционности вируса необходимы белок L массой 200 кДа (от англ. large - большой) и белок NS массой 45 кДа (от англ. nonstructural - неструктурный), присутствующие в небольших количествах. Геномная РНК находится в комплексе с большим числом молекул белка нуклео-

Рабдовирусы - вирусы, имеющие форму пули. К ним относятся вирусы везикулярного стоматита и бешенства. Название происходит от греческого слова rhabdo, что означает «палочка».

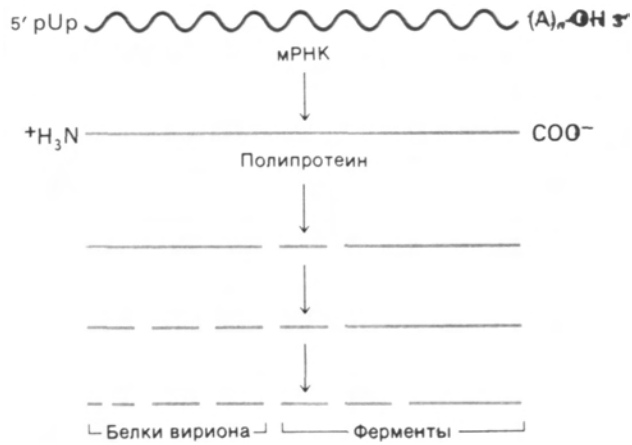


Рис. 30.22. Синтез белков вируса полиомиелита путем множественного расщепления гигантского полипептидного предшественника.

капсида N массой 50 кДа - основного белка вириона. ВВС заключен в липидную двуслойную мембрану, которую он захватывает из плазматической мембраны в процессе отпочковывания от клетки (рис. 30.23). Белок G (от англ. glycoprotein - гликопротеин) массой 65 кДа, кодируемый вирусом, образует шипы, выступающие из этой мембраны. Белок матрикса M массой 29 кДа располагается между оболочкой и нуклеокапсидом. *Эти пять белков ВВС образуются при трансляции пяти (+)мРНК, а не путем расщепления одного полипротеина.* Та же самая РНК-репликаза синтезирует и длинную (+)РНК, содержащую всю генетическую информацию вируса. Эта полная (+)РНК в свою очередь служит матрицей для синтеза (—)РНК, которая упаковывается и дает новые вирионы.

30.13. Геном реовируса состоит из десяти различных молекул двухцепочечной РНК

Реовирус, содержащий двухцепочечную РНК, поражает клетки млекопитающих и представляет третий тип вирусных генетических систем. Сердцевина вириона содержит *десять различных двухцепочечных молекул (±)РНК,* ассоциированных с белками. Проникнув в клетку-хозяина, вирион теряет наружную икосаэдрическую оболочку, состоящую из трех видов белков. Удаление этой оболочки активирует РНК-полимеразу, содержащуюся в сердцевине вириона. Эта РНК-зависимая полимераза полностью транскрибирует 10 молекул (+)РНК, так что образующиеся (+)мРНК имеют такую же длину, как фрагменты ге-

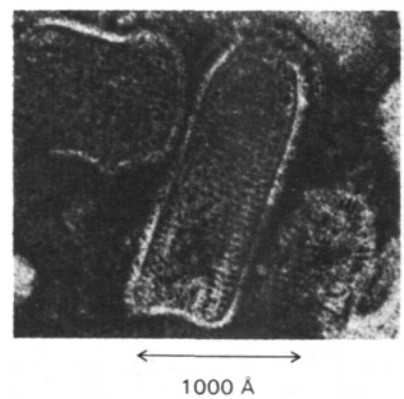


Рис. 30.23. Электронная микрофотография вируса везикулярного стоматита. (Williams R. C., Fisher H. W., Electron Micrographic Atlas of Viruses, C. C. Thomas, 1974. Печатается с любезного разрешения издателя.)

Реовирус - вирус, содержащий двухцепочечную РНК, выделен из дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта людей и других млекопитающих; насколько известно, он не вызывает заболевания. Приставка *рео* составлена из первых букв английских слов respiratory enteric orphan, что означает энтеро-респираторный вирус-сирота (сирота, поскольку бродит «не пристроенный» ни к какой болезни).

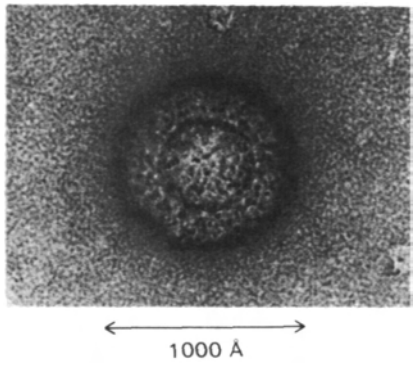


Рис. 30.24. Электронная микрофотография реовируса. (Williams R. C., Fisher H. W., An electron micrographic atlac of viruses, C. C. Thomas, 1974. Печатается с любезного разрешения издателя.)

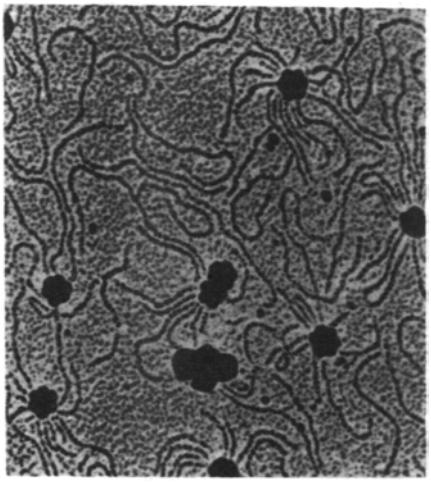


Рис. 30.25. Синтез мРНК в сердцевине реовируса. Молекулы мРНК выглядят нитями, отходящими от темных телец-сердцевин. [Bartlett N. M., Gillies S. G., Bullivant S., Bellamy A. R., J. Virol., 14, 324 (1974).]

нома. (±)РНК матрица транскрибируется *асимметрично и консервативно,* т.е. образуются только (+)РНК, а исходные (±)РНК разрушаются. В сердцевине вириона к 5'-концам этих мРНК присоединяются «колпачки» под действием ферментов. Затем эти концы выходят через каналы в сердцевине (рис. 30.25). Следовательно, сердцевина - высокоорганизованная система синтеза мРНК. *Каждая из этих десяти мРНК дает при трансляции один белок.* Затем весь набор десяти (+)РНК соединяется с некоторыми вирусными белками и образует предшественник сердцевины («прекор»), в котором синтезируется десять (—)цепей.

Для чего геном реовируса разделен на фрагменты? Как уже было указано выше, вирусы животных не могут иметь полицистронных мРНК. Вирус полиомиелита решает эту проблему путем расщепления гигантского белка-предшественника, а вирус везикулярного стоматита транскрибирует РНК вириона в виде коротких мРНК, каждая из которых соответствует одному белку. *Стратегия реовируса состоит в том, чтобы иметь отдельную «хромосому» для каждого синтезируемого белка.*

Четвертый путь выражения генетической информации РНК-содержащих вирусов - использование ДНК-посредника, интегрирующей с геном клетки-хозяина. Это более сложная генетическая система, которую используют ретровирусы (РНК-содержащие опухолеродные вирусы). Мы обсудим ее ниже в этой главе (разд. 30.19).

30.14. Мелкие РНК-содержащие фаги содержат перекрывающиеся гены

Такие РНК-содержащие фаги, как R17 (MS2, F2) и Q_β, относятся к простейшим вирусам. Они имеют форму правильного многогранника и диаметр около 200 А. Капсид этих близкородственных фагов содержит 180 молекул белка оболочки массой 14 кДа и одну молекулу белка А (созревания) массой 38 кДа. Кроме того, одноцепочечная (+)РНК кодирует одну из субъединиц репликазы. До сих пор считалось, что эти мел-

кие РНК-содержащие вирусы содержат только три гена. Однако обнаружение мутанта фага, образующего нормальные вирионы, но не способного при этом лизировать клетку-хозяина, повлекло за собой поиск еще одного кодируемого вирусом белка. Действительно, у РНК-содержаших фагов имеется четвертый ген, кодирующий белок, необходимый для лизиса бактерии-хозяина. Ген этого белка лизиса перекрывается с генами белка оболочки и субъединицы репликазы (рис. 30.26). Эти *мелкие РНК-содержащие фаги, подобно маленькому ДНК-содержащему фагу φX174* (разд. 26.11), *используют перекрывающиеся гены для того, чтобы вместить больше информации в свои маленькие геномы.* Молекула (+)РНК вириона служит матрицей и для синтеза четырех белков, и для синтеза (—)РНК. Затем (—)РНК используется в качестве матрицы для образования множества копий (+)РНК. Таким образом, по генетической системе эти фаги напоминают вирус полиомиелита.

Репликаза, синтезирующая (+)- и (—)цепи фаговой РНК,- очень интересный фермент. Он проявляет высокую специфичность к гомологичной фаговой РНК. Поэтому молекулы РНК клетки-хозяина не конкурируют с фаговой РНК при репликации. Qβ-*репликаза состоит из четырех субъединиц, из которых только одна кодируется фаговой РНК. Три другие субъединицы репликазы - белки клетки-хозяина, которые фаг приспособил для собственных нужд.* Два из них - факторы элонгации синтеза белка EF-Tu и EF-Ts, а третий - один из компонентов 30S-субчастицы рибосомы. Так фаг Qβ создает весьма специфичный фермент максимально экономичным способом.

Регуляторные механизмы обеспечивают правильную временную последовательность трансляции и репликации. (+)РНК служит одновременно матрицей для синтеза белка и для синтеза (—)РНК. Было бы нежелательно, чтобы оба процесса происходили одновременно на одной и той же (+)РНК, поскольку рибосомы, движущиеся в направлении 5'—>3', сталкивались бы с репликазой, движущейся в направлении 3'—>5'. Этого не происходит, так как Qβ-репликаза сильно ингибирует связывание рибосом с (+)РНК до тех пор, пока не синтезируется достаточное число молекул (—)РНК.

Четыре фаговых белка синтезируются в различных количествах. Белок оболочки, который синтезируется на протяжении всего периода инфекции,- основной продукт трансляции. Одна из причин этого состоит в том. что рибосомы гораздо прочнее связываются с участком инициации соответствующего цистрона, чем с другими участками инициации в (+)РНК. Кроме того, белок оболочки подавляет трансляцию гена репликазы, блокируя его участок инициации. Таким образом, белок оболочки - специфический релрессор трансляции. Белок А транслируется только с незаконченных молекул (+)РНК, так как в полных молекулах РНК его участок инициации блокирован в результате спаривания оснований. Вторичная структура полной молекулы РНК позволяет транслировать лишь небольшое количество белка А.

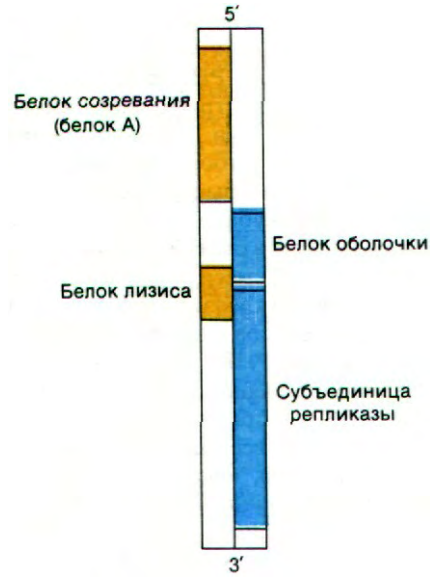


Рис. 30.26. Перекрывающиеся гены в РНК вирусов R17 и Qβ. Одна рамка считывания показана желтым цветом, другая - синим.

30.15. Дарвиновская эволюция фаговой РНК вне клетки

Очистка РНК фага Qβ и Qβ-репликазы от примесей нуклеаз позволила Солу Спигелману (Sol Spigelman) изучать эволюционные события вне живой клетки. Один из вопросов был сформулирован следующим образом: *что произойдет с молекулами РНК, ес-*

ли единственное предъявляемое к ним требование - это как можно быстрее размножаться? Молекулы РНК и репликазы фага Qβ и рибонуклеозидтрифосфаты инкубировали в течение 20 мин. Такое время инкубации способствует отбору мутантных молекул РНК, которые быстро реплицируются. Образец этой инкубационной смеси переносили и разводили в свежей порции стандартной реакционной смеси, содержащей Qβ-репликазу и рибонуклеозидтрифосфаты. Проводили 75 переносов и затем анализировали образовавшиеся РНК. Продолжительность инкубации постепенно снижали, так как молекулы РНК на протяжении эксперимента реплицировались все быстрее. *Самым удивительным было то, что после 75 переносов («поколений») длина молекул РНК составляла всего 12% длины исходной РНК фага* Qβ. Нуклеотиды, ненужные для репликации, были утрачены, так как укороченные молекулы реплицировались быстрее. Основное ограничение, которое накладывали условия этого эксперимента, - сохранение в мутантных молекулах инициирующей последовательности, которую узнает Qβ-репликаза.

30.16. Лизогенные фаги могут включать свою ДНК в состав ДНК клетки-хозяина

У некоторых бактериофагов существует два возможных пути, по которым может пойти их дальнейшее развитие после заражения клетки-хозяина: они могут размножаться и лизировать зараженную клетку (*литический путь развития*) или же их ДНК может включиться в ДНК зараженной клетки, не проявляя способности к размножению и лизису (*лизогенный путь развития*). Вирусы, которые не всегда убивают клетку-хозяина, называются *умеренными*. Лучше всего из умеренных вирусов изучен фаг λ (рис. 30.27); мы уже говорили о нем раньше в связи с регуляцией транскрипции (разд. 28.11). Напомним, что репрессор фага λ связывается с двумя группами операторных участков O_L и O_R и что он регулирует свой собственный синтез.

ДНК вириона λ - линейная двухцепочечная молекула длиной 48 kb. 5'-конец каждой ее цепи представляет собой одноцепочечную последовательность из 12 нуклеотидов. Эти последовательности называются *липкими концами,* так как они взаимно комплементарны и могут спариваться друг с другом. На самом деле они соединяются сразу после заражения. В результате 5'-фосфат каждой цепи оказывается рядом со своим собственным 3'-гидроксильным концом. ДНК-лигаза клетки-хозяина заделывает разрывы, и в результате образуется *кольцевая молекула ДНК фага* λ (рис. 30.28).

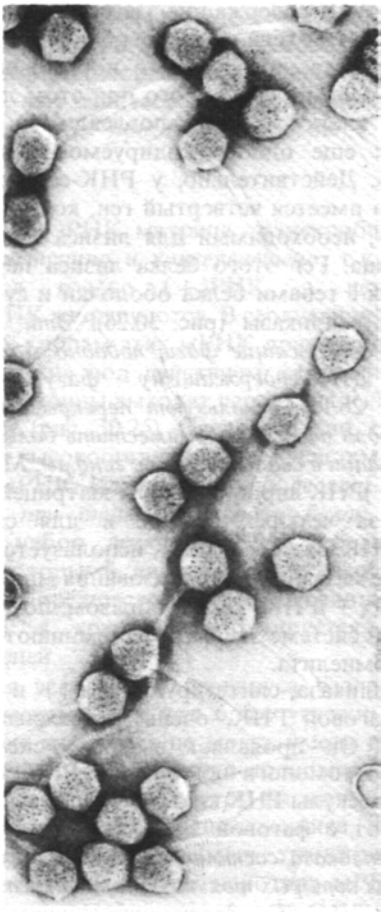


Рис. 30.27. Электронная микрофотография фага λ. (Печатается с любезного разрешения д-ра A. Dale Kaiser.)

Репликация этой кольцевой молекулы ДНК фага λ происходит путем взаимодействия белков, кодируемых фагом λ, с репликационными механизмами клетки-хозяина. В другом случае кольцевая ДНК фага λ может включиться в бактериальную хромосому с помощью одного акта реципрокной рекомбинации между специфическими участками ДНК фага λ и *E.coli* длиной по 15 пар

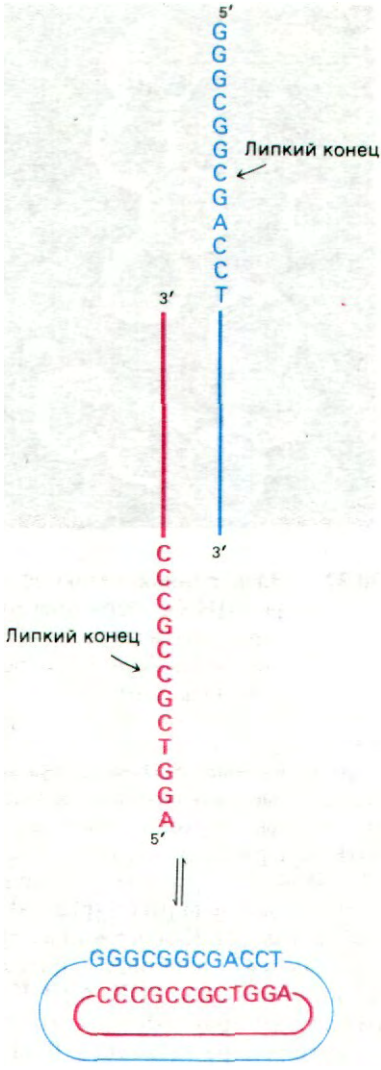


Рис. 30.28. Превращение линейной ДНК фага λ в кольцевую форму.

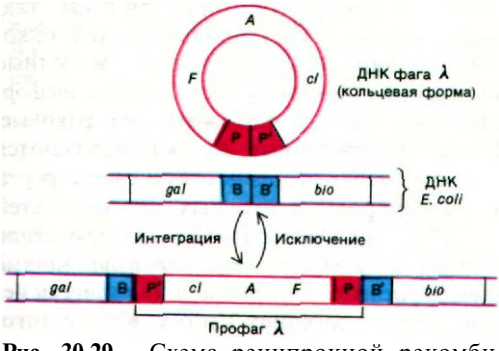


Рис. 30.29. Схема реципрокной рекомбинации ДНК фага λ и ДНК *E. coli*.

оснований. Сайт (участок) прикрепления фага λ в ДНК *E.coli* обозначается *att*λ и располагается между генами галактозного и биотинового оперонов *galE* и *bioA*. Последовательность оснований *att*λ можно символически обозначать B-B' (от англ. bacterial - бактериальный). Специфический сайт прикрепления в фаге λ называется *att* и локализован рядом с генами *int* (от англ. integrate - интегрировать) и *xis* (от англ. excise - вырезать). Последовательность оснований *att* обозначается P-P' (от англ. phage - фаг). Белок int узнает последовательность P-P' в фаговой ДНК и последовательность B-B' в ДНК *E.coli*. Затем происходит взаимный перенос: P соединяется с B', а B - с P'. Эта схема (рис. 30.29 и 30.30) была первоначально предложена Алланом Кэмпбеллом (Allan Campbell) на основании генетических данных.

Теперь ДНК фага λ составляет часть молекулы ДНК *E.coli*. Эта форма называется *профагом,* а клетка *E.coli,* содержащая профаг,- *лизогенной бактерией*. Профаг стабилен в отсутствие белка xis. Транскрипция гена *xis* блокируется репрессором фага λ (разд. 28.11). Когда репрессия снимается. белки xis и int совместно катализируют разрыв последовательностей B—P' и P—B', и снова происходит взаимный перенос (рис. 30.30): P соединяется с P', а B с B'; при этом снова получаются кольцевая молекула ДНК фага λ и нелизогенная хромосома *E.coli*. Главная особенность этой системы рекомбинации заключается в том. что белок int сам по себе не может узнавать две новые последовательности на концах профага (B-P' и P-B'), поэтому они устойчивы. Таким образом, внедрение фага происходит в присутствии одного белка int, тогда как вырезание профага - только в присутствии обоих белков - int и xis.

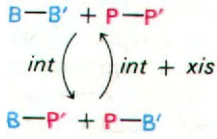


Рис. 30.30. Интеграция и исключение ДНК фага λ. Это неполная схема, так как некоторые факторы, участвующие в этих процессах, пока не идентифицированы.

30.17. Ретровирусы и некоторые ДНК-содержащие вирусы могут вызывать рак у чувствительных клеток-хозяев

В 1911 г. Пейтон Раус (Peyton Rous) приготовил бесклеточный фильтрат из опухоли соединительной ткани, которая спонтанно возникла у курицы и ввел его нормальным цыплятам. Как ни странно, у реципиентов развились высокозлокачественные опухоли такого же типа, которые называются *саркомами*. Кроме того, Раус обнаружил, что опухолеродный фактор фильтрата, известный в настоящее время под названием *вируса саркомы Рауса* (RSV) или *вируса саркомы птиц* (ASV) (рис. 30.31), можно размножить путем последовательного пассирования в курах. Вирус саркомы птиц относится к группе *РНК-содержащих опухолеродных вирусов* (онкогенных РНК-содержащих вирусов). Эти вирусы содержат в составе вирионов (+)РНК и размножаются с использованием двухспиральной ДНК-посредника. Поэтому их называют *ретровирусы*. Ретровирусы - единственные РНК-содержащие вирусы, способные вызывать рак. Кроме того, злокачественные опухоли может вызывать ряд ДНК-содержащих вирусов. *Обезьяний вирус 40* (SV-40) и *вирус полиомы* принадлежат к группе паповавирусов (рис. 30.32); из всех *онкогенных ДНК-содержащих* вирусов они изучаются наиболее интенсивно. Особый интерес к этим РНК- и ДНК-содержащим вирусам привлекает то, что они содержат всего четыре-пять генов. В индукции рака участвует всего один или два вирусных гена, и потому исследователи питают надежду выяснить механизм их действия.

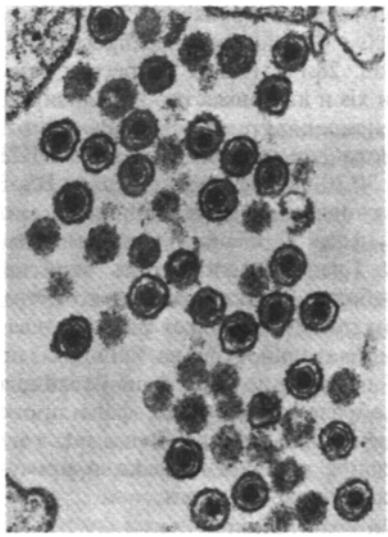


Рис. 30.31. Электронная микрофотография вируса саркомы птиц (вируса саркомы Рауса), относящегося к ретровирусам. Сильноокрашивающиеся вирионы расположены вблизи поверхности зараженной клетки цыпленка. (Печатается с любезного разрешения д-ра Samuel Dales.)

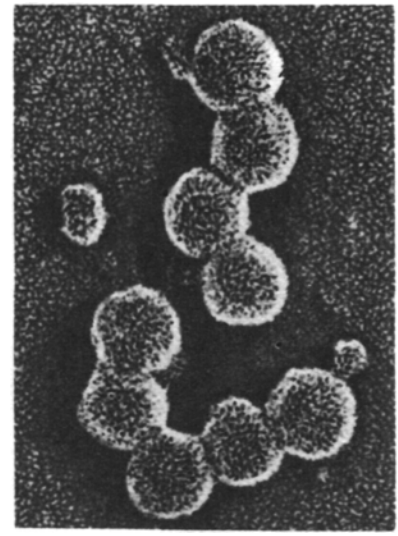


Рис. 30.32. Электронная микрофотография ДНК-содержащего опухолеродного вируса SV-40. (Печатается с любезного разрешения д-ра Jack Griffith.)

Для изучения рака на молекулярном уровне были разработаны системы тканевых культур. При проникновении онкогенного вируса в подходящие животные клетки они становятся постоянно *трансформированными,* т.е. похожими на раковые. Трансформированные клетки отличаются от нормальных особенностями своего роста и характером клеточных поверхностей (табл. 30.3). Самое разительное изменение состоит в том, что *трансформированные клетки растут непрерывно и хаотически* независимо от соседних клеток. Кроме того, трансформированные клетки содержат *вирусоспецифическую ДНК, интегрированную с геномом клетки-хозяина*. Этим объясняет-

Таблица 30.3. **Изменения свойств клеток при трансформации ДНК- или РНК-содержащими опухолероднымн вирусами** (Tooze J., ed.. The molecular biology of tumour viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, 1973, p. 351)

Характер роста
При введении чувствительным животным образуют опухоли
Растут до гораздо более высокой плотности
Рост становится не ориентированным в пространстве и клетки отделяются от поверхности, на которой растут
В среду выделяются активаторы протеаз, что повышает инвазивность клеток
Снижается потребность в факторах роста сыворотки
Свойства поверхности
Появляются новые вирусоспецифические антигены
Один из белков наружной поверхности клеток - фибронектин - исчезает
Падает содержание ганглиозидов
На поверхности клетки появляются антигены плода
Скорость транспорта питательных веществ увеличивается
Способность к агглютинации под действием растительных лектинов увеличивается
Признаки присутствия опухолеродного вируса
Имеются последовательности вирусной ДНК
Имеются вирусоспецифические мРНК
Выявляются вирусоспецифические антигены

ся тот факт, что трансформация является наследуемым изменением фенотипа. Культуры, полученные из трансформированных колоний, навсегда сохраняют аномальные свойства трансформированных клеток. Кроме того, некоторые *трансформированные клетки, полученные* из *культуры* ткани, *при введении в достаточном количестве в подходящего хозяина образуют раковую опухоль.*

30.18. Вирусы SV-40 и полиомы могут вызывать продуктивную инфекцию или трансформацию клеток-хозяев

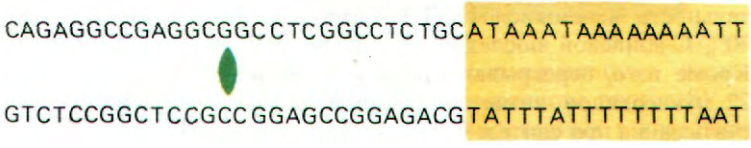
Вирусы SV-40 и полиомы содержат внутри икосаэдрической оболочки маленькую кольцевую двухспиральную ДНК. В некоторых клетках (они называются *пермиссивными клетками-хозяевами*) развитие этих вирусов идет по пути *литического цикла,* что приводит к образованию множества новых вирионов (рис. 30.33).

При продуктивной инфекции эти вирусы убивают клетки. В клетках других типов (*непермиссивных клеток-хозяев*) некоторые стадии экспрессии вирусного генома по непонятным причинам блокируются. Никакого вирусного потомства в них не образуется. но небольшая часть клеток - порядка одной на 10^5 - *трансформируется* в результате интеграции вирусной ДНК с геномом клетки-хозяина.

К настоящему времени расшифрована полная последовательность 5243 пар оснований ДНК вируса SV-40, а многие аспекты его репликации и транскрипции интенсивно исследуются. Половина ДНК транскрибируется на ранней стадии инфекции, другая половина ДНК - на поздней стадии, одновременно с синтезом вирусной ДНК (рис. 30.34).

Точка начала репликации находится в той же области, что и начало транскрипции ранней и поздней областей. *Ранняя область* транскрибируется в направлении против часовой стрелки и кодирует Т-антиген (белок А), необходимый для инициирования репликации ДНК. Другой, иммунологически отличный белок - малый t-антиген - также кодируется ранней областью. При синтезе мРНК для Т-антигена происходит вырезание вставочной последовательности из первичного транскрипта.

Таким образом, вирус SV-40 использует аппарат сплайсинга клеточного ядра. Заслуживает внимания также последовательность оснований в точке начала репликации. Здесь имеются две последовательности длиной по 13 пар оснований, симметричных относительно оси второго порядка, а рядом находится АТ-богатая область:



Паповавирусы - группа ДНК-содержащих вирусов. Название составлено по названиям трех представителей группы: вирусов папилломы, полиомы и вакуолизирующего вируса (SV-40).

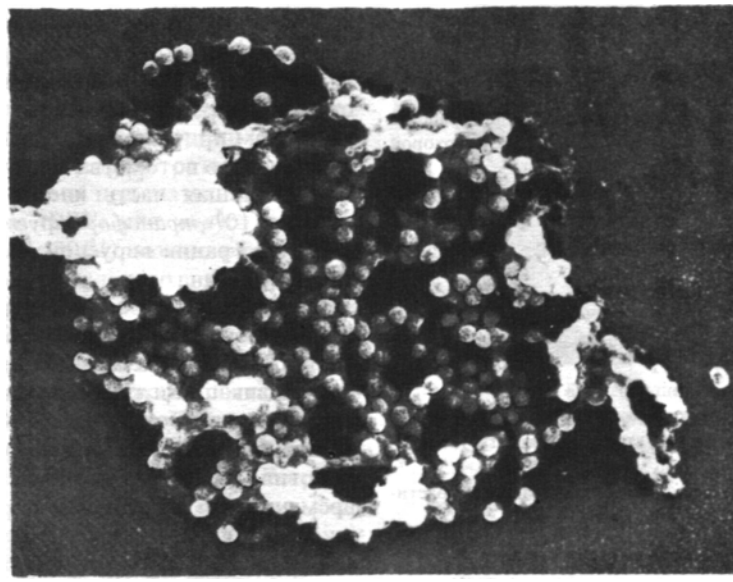


Рис. 30.33. Электронная микрофотография фрагмента ядерной мембраны клетки, зараженной вирусом SV-40. Видны ядерные поры и множество вирионов. (Печатается с любезного разрешения д-ра Jack Griffith.)

С этим участком связывается Т-антиген.

Транскрипция *поздней области* происходит по направлению часовой стрелки от начала репликации (рис. 30.34) и приводит к синтезу трех белков капсида: VP1, VP2 и VP3. И в этом случае происходит удаление вставочных последовательностей из первичного транскрипта. Три мРНК, по-видимому, образуются в результате различных реакций сплайсинга. N-концевая последовательность аминокислот VP3 перекрывает 70% С-концевой последовательности VP2. Кроме того, перекрывающийся участок из 22 нуклеотидов читается в одной рамке считывания при синтезе VP2 и VP3 и в другой рамке при синтезе VP1. Так, *ограниченное количество генетической информации у вируса SV-40 используется с максимальной эффективностью.* Еще один пример генетической экономии - то, что SV-40 не синтезирует собственных белков для упаковки ДНК. Новосинтезированная ДНК связывается с гистонами клетки-хозяина (рис. 30.35). Затем этот сверхспирализованный комплекс упаковывается в капсид с помощью белков VP1, VP2 и VP3. В конце концов вирионы потомства высвобождаются

Таблица 30.4. **Белки, кодируемые вирусом SV-40**

Белок	Масса, кДа	мРНК	Роль
Т-антиген (белок А)	94	Ранняя	Необходим для инициации, репликации ДНК и для трансформации
t-Антиген	21	Ранняя	Неизвестна
VP1	40	Поздняя	Основной белок капсида
VP2	39	Поздняя	Минорный белок капсида
VP3	27	Поздняя	Минорный белок капсида

при лизисе клетки-хозяина, которая в результате гибнет.

В непермиссивных клетках происходит экспрессия ранней области генома SV-40, поздняя же область не реплицируется и не транскрибируется. *Небольшая часть этих клеток трансформируется в результате интеграции генома SV-40 с клеточной ДНК.* В отличие от интеграции ДНК фага λ в механизме интеграции ДНК SV-40, по-видимому, не участвуют специфические участки ни вирусной, ни клеточной ДНК. Для трансформации, а также, по всей вероятности, для поддержания трансформированного состояния необходимы оба вирусных антигена (T и t). Введение таких трансформированных клеток чувствительным животным приводит к быстрому образованию опухолей. Основная цель ведущихся в настоящее время исследований вируса SV-40 состоит в том, чтобы выяснить, как экспрессия ранней области интегрированной формы этого вируса делает клетку раковой.

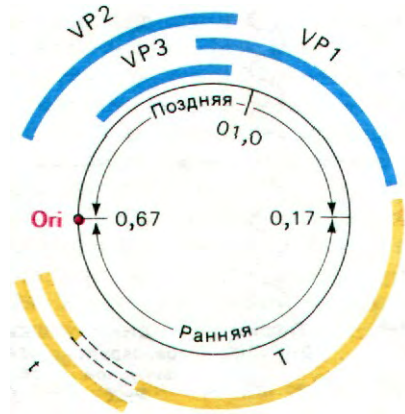


Рис. 30.34. Генетическая карта ДНК вируса SV-40, содержащая 5243 пары оснований. Ранняя область (транскрибируется в направлении против часовой стрелки) показана желтым цветом, поздняя область (транскрибируется по часовой стрелке) - синим, место начала репликации (ori) - красным.

30.19. Ретровирусы содержат обратную транскриптазу, которая синтезирует двухспиральную ДНК, используя в качестве матрицы (+)РНК

Еще один класс опухолеродных вирусов - ретровирусы - содержит (+)РНК-геном в икосаэдрическом «футляре». Это сферическое нуклеопротеиновое «ядро» окружено оболочкой, состоящей из кодируемых вирусом молекул гликопротеина в двуслойной липидной оболочке, происходящей из плазматической мембраны клетки-хозяина. Обычно диаметр ретровирусов составляет 1000 А (см. рис. 30.31).

В 1964 г. Говард Темин (Howard Temin) наблюдал, что заражение такими РНК-содержащими опухолеродными вирусами, как вирус саркомы птиц, блокируется ингибиторами синтеза ДНК. Ингибиторы, например аметоптерин, 5-фтордезоксиуридин и цитозинарабинозид, эффективны в течение первых двадцати часов после введения вирусов. В результате этого открытия было высказано предположение, что *для роста РНК-содержащих опухолеродных вирусов необходим синтез ДНК.* К тому же образование частиц вирусного потомства подавляется актиномицином D. Известно, что этот антибиотик ингибирует синтез РНК по ДНК-матрице (разд. 25.18). Так зародилось предположение о том. что *для размножения РНК-содержащих опухолеродных вирусов*

Рис. 30.35. Электронная микрофотография формирующихся частиц опухолеродного вируса SV-40, ассоциированных с клеточной хромосомой. (Печатается с любезного разрешения д-ра Jack Griffith.)

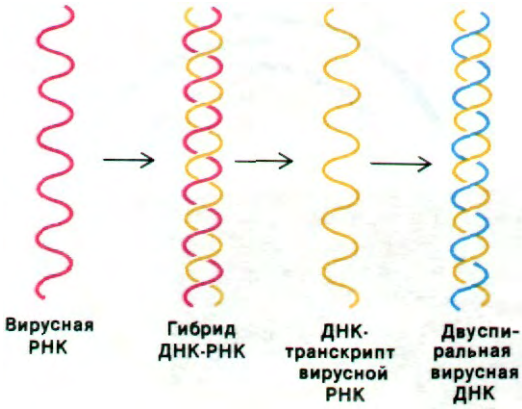


Рис. 30.36. Синтез ДНК по РНК-матрице обратной транскриптазой. Затравка не показана.

необходима транскрипция ДНК. Эти неожиданные данные привели Темина к мысли, что *ДНК-содержащий провирус служит промежуточным продуктом в репликации и в онкогенном действии этих вирусов*:

РНК-содержащий опухолеродный вирус → ДНК-содержащий провирус → РНК-содержащий опухолеродный вирус

Выдвинутая Темином гипотеза, что генетическая информация может переходить от РНК к ДНК, была вначале холодно встречена большинством исследователей. Она требовала существования неизвестного тогда еще фермента, способного синтезировать ДНК по РНК-матрице (*РНК-зависимой ДНК-полимеразы*). В 1970 г. Темин и Балтимор (Temin, Baltimore) независимо открыли такой фермент, который называется *обратной транскриптазой,* в вирионах некоторых РНК-зависимых опухолеродных вирусов. Все вирусы этой группы, исследованные в дальнейшем, содержали обратную транскриптазу, поэтому их и называют *ретровирусами* (от англ. reverse transcriptase - обратная транскриптаза).

Жизненный цикл обычного ретровируса начинается со связывания вирионов со специфическими рецепторами на поверхности клетки-хозяина и проникновения в клетку. В цитозоле вирусная (+)РНК скидывает оболочку. Затем обратная транскриптаза, содержавшаяся в вирусной частице, синтезирует (—)цепь ДНК. Тот же фермент расщепляет цепь геномной РНК в составе гибрида РНК—ДНК. Теперь обратная транскриптаза синтезирует (+)цепь ДНК, используя в качестве матрицы (—)цепь. *Таким образом, обратная транскриптаза осуществляет три последовательные реакции: РНК-зависимый синтез ДНК, гидролиз РНК и ДНК-зависимый синтез ДНК* (рис. 30.36).

Подобно другим ДНК-полимеразам, обратная транскриптаза синтезирует ДНК в направлении 5'—>3' и неспособна к инициации цепей *de novo.* Откуда же берется затравка для синтеза вирусной ДНК? Процесс инициации весьма экономичен: (+)РНК вирусного генома содержит нековалентно связанную транспортную РНК (в вирусе саркомы птиц это - триптофановая тРНК), которая была захвачена в клетке-хозяине во время предыдущего цикла заражения. *3'-ОН-группа этой тРНК, основания которой спарены с геномной РНК, действует в качестве затравки синтеза ДНК.* Как происходит репликация полной цепи (+)РНК? Напомним, что при репликации любой *линейной* ДНК возникает особая проблема заполнения 5'-концов (разд. 30.6). Ретровирусы нашли очень остроумный выход из этого положения. Их геномы состоят не из одной, а из *двух* молекул (+)РНК (рис. 30.37). Эти молекулы связаны друг с другом водородными связями вблизи 5'-концов. К тому же (+)РНК содержит одну и ту же последовательность у 5'- и у 3'-конца. Эта концевая избыточность, по-видимому, необходима для процесса репликации, как и в случае фага Т4 (разд. 30.6).

30.20. Ретровирусная ДНК транскрибируется только в том случае, если она интегрирована с геном клетки-хозяина

Двухспиральная вирусная ДНК переходит в кольцевую форму и проникает в ядро. Транскрипция ретровирусной ДНК происходит только после того, как она интегрирует с ДНК клетки-хозяина. Таким образом, *в жизненном цикле ретровирусов интеграция — этап обязательный.* В жизненном цикле онкогенных ДНК-содержащих вирусов, напротив, интеграция и продуктивная ин-

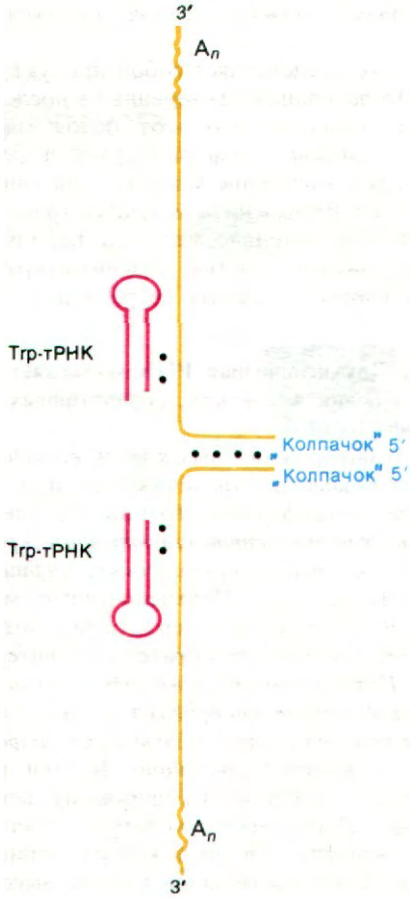


Рис. 30.37. Схематическое изображение генома вируса саркомы птиц. Две идентичные молекулы (+) РНК связаны между собой нековалентно. На 5'-концах находятся «колпачки», а на 3'-концах - poly(A)-последовательности. Молекула тРНК, которая служит затравкой, присоединена посредством спаривания оснований к каждой молекуле РНК.

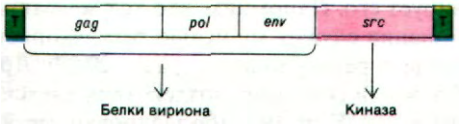


Рис. 30.38. Генетическая карта вируса саркомы птиц. Геном имеет длину 10 kb. Буквой Т обозначены концевые повторяющиеся последовательности.

фекция - альтернативные пути. Еще одно отличие заключается в том, что частота интеграции ретровирусной ДНК очень высока, как и следовало ожидать исходя из ее ключевой роли в продуктивной инфекции.

Геном вируса саркомы птиц длиной 10 kb содержит четыре гена (рис. 30.38). Три из них - *gag, pol* и *env* - необходимы для продуктивной инфекции. Ген *gag* кодирует полипротеин массой 76 кДа, который расщепляется на четыре белка, образующих сердцевину вируса. Ген *pol* кодирует обратную транскриптазу, состоящую из α- и β-субъединиц. α-Субъединица массой 65 кДа представляет собой фрагмент (массой 90 кДа) протеолиза β-цепи. Ген *env* кодирует гликопротеин оболочки вируса, необходимый для прикрепления вируса к поверхности клетки-хозяина. Четвертый ген - *src* (от англ. sarcoma - саркома) - не нужен для размножения вируса, но необходим для трансформации, как будет показано чуть ниже.

Различные вирусные мРНК, видимо, образуются в результате сплайсинга из первичного транскрипта длиной 10 kb. Затем они транспортируются в цитозоль и здесь транслируются. Геномная РНК и вирусные белки перемещаются к плазматической мембране и включаются в нее. Затем часть измененной мембраны отпочковывается и образует новые вирусные частицы. Таким образом, *продуктивная ретровирусная инфекция в отличие от инфекции онкогенными ДНК-содержащими вирусами не является литической. Ретровирусы обычно не убивают клеток-хозяев.* Ретровирусная ДНК остается в геноме зараженной клетки и продолжает экспрессироваться. Кроме того, интегрированная вирусная ДНК реплицируется вместе с клеточной ДНК, поэтому *дочерние клетки наследуют вирусный геном.*

30.21. Киназа, кодируемая геном *src* вируса саркомы птиц, участвует в трансформации

Изучение некоторых *температурочувствительных мутантов* принесло новые данные о механизме трансформации под действием вируса саркомы птиц. При высокой температуре эти мутанты нормально размножаются, но не трансформируют клеток-хозяев, а при низкой температуре оба процесса протекают нормально. Кроме того, фибро-

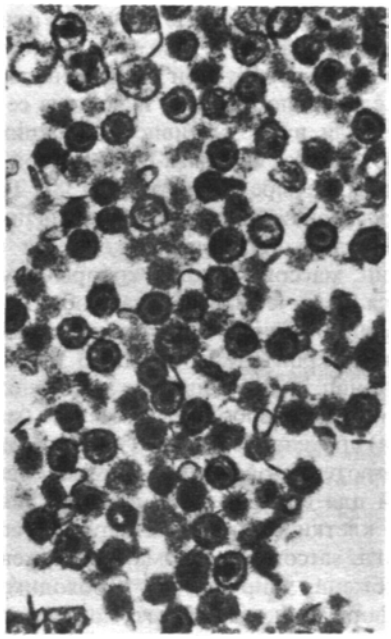


Рис. 30.39. Электронная микрофотография частиц вируса миелобластоза птиц. Введение этого опухолеродного РНК-содержащего вируса новорожденным цыплятам вызывает в течение 3 недель злокачественную лейкемию. (Печатается с любезного разрешения д-ра Ursula Heine, Национальный институт раковых исследований.)

бласты, трансформированные этими мутантами при низкой температуре, при повышении температуры возвращаются к нормальному фенотипу. Сдвиг от трансформированного состояния к нормальному оказывается полностью обратимым. Анализ этих мутантов показал, что в процессе трансформации участвует только один вирусный белок - продукт гена *src*. Ген *src* получил свое название потому, что *способен направлять синтез какого-то белка, вызывающего саркому.* Важно подчеркнуть, что в таких мутантных клетках при высокой температуре вирусная ДНК остается интегрированной с клеточным геном. Следовательно, *интеграция сама по себе не приводит к трансформации. Для этого должен экспрессироваться ген rsc.*

Что же представляет собой продукт гена *src*? Исследования, проведенные в последнее время, показали, что этот белок массой 60 кДа - киназа, фосфорилирующая белки. Проводится изучение мишени этой киназы, что позволит выяснить механизм трансформации. Поразительно, что один небольшой белок может полностью изменить характер роста клетки и сделать ее раковой.

30.22. Двухцепочечная РНК подавляет синтез белка в клетках, обработанных интерфероном

Устойчивость животных клеток ко многим вирусам заметно увеличивается под действием *интерферонов* - группы небольших белков, *которые синтезируются и секретируются клетками позвоночных, инфицированными вирусом.* Двухцепочечные молекулы РНК оказывают некоторое стимулирующее действие на образование интерферона. *Интерфероны связываются с плазматической мембраной других клеток организма и стимулируют их способность сопротивляться вирусной инфекции.* Клетки приобретают устойчивость к широкому спектру вирусов. Иммунность, которую обеспечивают антитела, наоборот, весьма специфична. Интерфероны обладают очень высокой активностью: всего 10^{-1} М достаточно для проявления выраженного противовирусного действия.

Интерферон повышает противовирусную устойчивость клеток путем увеличения синтеза трех ферментов: олигонуклеотид-синтетазы, эндонуклеазы и киназы. До тех пор пока сенсибилизированная клетка не заражается вирусом или не подвергается воздействию двухцепочечной РНК, эти три фермента бездействуют. *Активация этих ферментов блокирует синтез белков двумя различными путями* (рис. 30.40). Протеинкиназа фосфорилирует один из факторов инициации синтеза белка и тем самым инактивирует его. Напомним, что тот же фактор инициации служит мишенью регуляторного каскада в ретикулоцитах (разд. 29.27). Другой важный результат воздействия двухспиральной РНК на сенсибилизированные интерфероном клетки - стимулирование деградации мРНК. Эндонуклеаза активируется *олигоаденилатом,* который называется 2,5А. Двухцепочечная РНК стимулирует синтетазу, образующую этот стимулятор эндону-

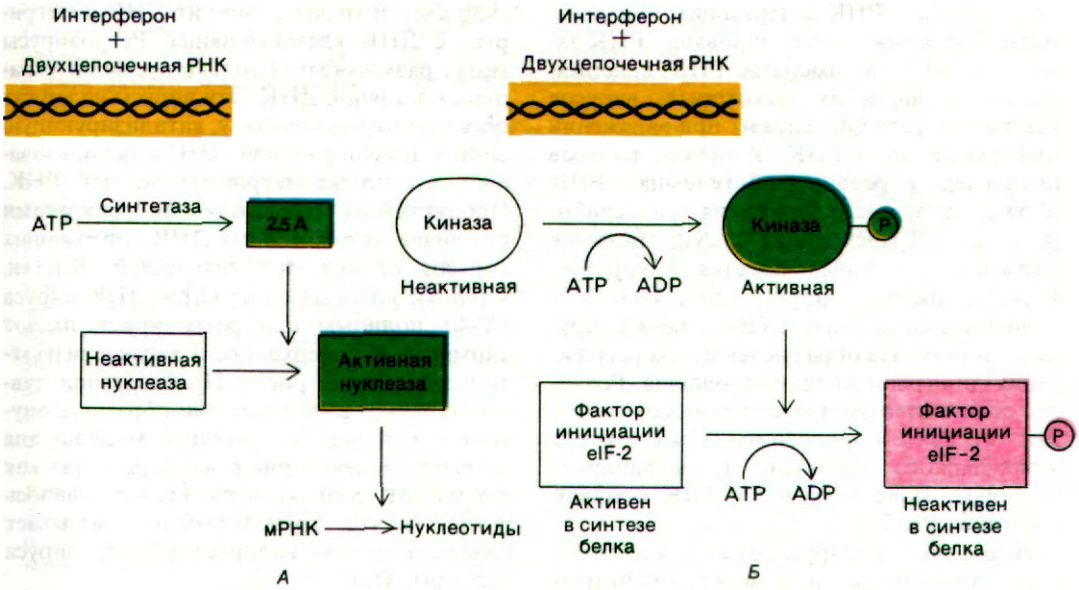
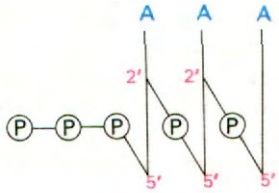


Рис. 30.40. Двухцепочечная РНК стимулирует расщепление мРНК (*А*) и ингибирует инициацию синтеза белка в клетках, обработанных интерфероном (*Б*). [Farrell P.J., Sen G.C, Dubois M. F., Ratner L., Slattery E., Lengyel P., Proc. Nat. Acad.Sci. USA, 75, 5896 (1978).]



2,5 A
(Активатор эндонуклеазы)

клеазы. Было бы крайне интересно выяснить, играют ли эти регуляторные пути какую-либо роль в незараженной клетке, помимо того что они защищают ее от вирусов.

Заключение

Вирусы представляют собой плотно упакованнуюинфекционнуюнуклеиновуюкислоту, окруженную защитной оболочкой. Они содержат ДНК или РНК, которые могут быть одно- или двухцепочечными. Простейшие вирусы имеют всего 3 гена, а наиболее сложные - около 250 генов. Вирусные оболочки в большинстве случаев состоят из большого числа белковых субъединиц одного или нескольких видов, так как вирусы содержат крайне ограниченное количество генетической информации. Два основных способа укладки - цилиндрическая оболочка, обладающая спиральной симметрией, и сферическая оболочка, обладающая икосаэдрической симметрией. Частица вируса (вирион) табачной мозаики состоит из 2130 идентичных субъединиц, уложенных спиралью вокруг одноцепочечной молекулы РНК; она образуется в результате самосборки, которая осуществляется путем присоединения белковых дисков к петле РНК. Вирус кустистой карликовости томатов образует икосаэдрическую оболочку, так как домены, из которых состоит его белок оболочки, связаны друг с другом подвижно. Сборка фага Т4 - гораздо более сложный процесс, в котором участвует примерно 50 белков. Три основных пути сборки ведут к независимому образованию головки, отростка и нитей отростка. Формирование фага Т4 идет в строго определенном порядке, в нем участвуют процессы самосборки и сборки с участием ферментов. Кроме того, важную роль в сборке фага Т4 играют вспомогательные (морфопоэтические) белки.

Незараженные клетки не могут синтезировать РНК по РНК-матрице. Следовательно, общее свойство РНК-содержащих виру-

сов (кроме РНК-содержащих опухолеродных вирусов) - это кодирование РНК-зависимой РНК-полимеразы. РНК, содержащаяся в вирионах некоторых вирусов (например, фага Qβ), служит при заражении информационной РНК. У других вирусов (например, у реовирусов) геномная РНК должна сразу после заражения транскрибироваться. Транскрипция осуществляется ферментом, который имеется в вирионе. РНК-содержащие вирусы используют различные способы синтеза белка. Белки вируса полиомиелита образуются путем расщепления гигантского предшественника. Реовирус содержит отдельную «хромосому» для каждого синтезируемого им белка, а вирус везикулярного стоматита транскрибирует несколько моноцистронных РНК с одной геномной РНК.

Не все вирусы разрушают свои клетки-хозяева. Умеренный фаг λ может принимать форму дремлющего профага, когда его ДНК интегрирована с бактериальной хромосомой путем реципрокной рекомбинации. Этот профаг сохраняет способность к размножению и лизису, которую он проявляет, когда происходит его исключение из клеточной ДНК. Подобно этому, ДНК-содержащие опухолеродные вирусы SV-40 и полиомы либо размножаются и лизируют свои клетки-хозяева, либо их ДНК интегрирует с ДНК клетки-хозяина. Ретровирусы могут размножаться только путем интеграции с клеточной ДНК. Эти вирусы содержат обратную транскриптазу, катализирующую синтез двухспиральной ДНК с использованием в качестве матрицы геномной РНК. Продуктивная инфекция ретровирусами в отличие от онкогенных ДНК-содержащих вирусов не является литической. Клетки, в геноме которых содержится ДНК вируса SV-40, полиомы или ретровируса, имеют аномальные поверхности и характеризуются нарушениями роста. При введении чувствительным животным они образуют опухоли. Эти вирусы - удобная модель для изучения молекулярных основ рака, так как они имеют всего около пяти генов. Удалось показать, что трансформацию вызывает киназа, которую кодирует ген *src* вируса саркомы птиц.

Устойчивость клеток животных ко многим - вирусам заметно увеличивается под действием интерферона - белка, который синтезируют и выделяют клетки, зараженные вирусом. Интерферон увеличивает образование трех ферментов, блокирующих синтез белка путем ингибирования фактора инициации и стимулирования деградации мРНК.

Биологические исследования представляют собой, в частности, упражнения по эстетике природы. Занимаясь биологией, мы получаем удовольствие главным образом оттого, что снова и снова осознаем, насколько экономичны, изящны и целесообразны те механизмы, которые случайно возникли в ходе эволюции и были закреплены отбором. Вирусолог может чувствовать себя одним из самых счастливых биологов, так как он может изучить избранный им объект до подробностей строения его отдельных молекул. Вирусолог наблюдает, как вирус - этот полнейший паразит - использует для своего существования наиболее общие принципы биологии клетки...
David Baltimore, Нобелевская лекция, 1976 г.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Butler P.J.G., King A., 1978. The assembly of a virus, Sci. Amer., 239(5), 62-69. (Сборка вируса табачной мозаики.)

Bishop J.M., 1980. The molecular biology of RNA tumor viruses: a physician's guide, New Engl. J. Med., 303, 675-682.

Campbell A.M., 1976. How viruses insert their DNA into the DNA of the host cell, Sci. Amer, 235(6), 102-113.

Temin H.M., 1972. RNA-directed DNA synthesis, Sci. Amer., 226(1), 24-33.

Nathans D., 1979. Restriction endonucleases, simian virus 40, and the new genetics, Science, 206, 903-909.

Книги

Luria S.E., Darnell J.E., Jr. Baltimore D., Campbell A., 1978. General Virology (3rd ed.), Wiley. [Имеется перевод: Лурия С, Дарнелл Дж., Балтимор Д., Кэмпбелл Э. Общая вирусология.- М.: Мир, 1981.] (Доступное и увлекательное введение в вирусологию.)

Tooze J. (ed.), 1980, The Molecular Biology of Tumour Viruses (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory.

Williams R.C., Fisher H.W., 1974. An

Electron Micrographic Atlas of Airuses, Thomas. (Сожержит превосходные электронные микрофотографии и очень увлекательные объяснения к ним.)

Строение вирусов

Bloomer A.C., *Champness J.N.*, *Bricogne G.*, *Staden R.*, *Klug A.*, 1978. Protein disk of tobacco mosaic virus at 2,8 A resolution showing the interactions within and between subunits, Nature, **276,** 362-368.

Stubbs G., *Warren S.*, *Holmes K.*, 1977. Structure of RNA and RNA binding site in tobacco mosaic virus from 4-A map calculated from X-ray fibre diagrams, Nature, 267, 216-221.

Harrison S.C., *Olson A.J.*, *Schutt C.E.*, *Winkler F.K.*, *Bricogne G.*, 1978. Tomato bushy stunt virus at 2,9 A resolution, Nature, 276, 368-373.

Harrison S.C., 1978. Structure of simple viruses: specificity and flexibility in protein assemblies, Trends Biochem. Sci., 3-6.

Crick F.H.C, *Watson J.D.*, 1957. Virus structure: general principles. In: Wolstenholme G. E. W. (ed.), Ciba Foundation Symposium on the Nature of Viruses, pp. 5-13.

Caspar *D.L.D.*, *Klug A.*, 1962. Physical principles in the construction of regular viruses, Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol., 27, 1-24. (В этой классической статье рассматривается теория строения сферических вирусов.)

Сборка вирусов

Lebeurier G., *Nicolaieff A.*, *Richards K.E.*, 1977. Inside-out model for self-assembly of tobacco mosaic virus, Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 149-153.

Butler P.J.G., *Finch J. T.*, *Zimmern D.*, 1977. Configuration of tobacco mosaic virus RNA during virus assembly, Nature, 265, 217-219.

Wood W.B., 1978. Bacteriophage T4 assembly and the morphogenesis of subcellular structures, Harvey Lectures, 73, 203-223.

Casjens S., *King J.*, 1975. Virus assembly, Ann. Rev. Biochem., 44, 555-611.

Рестрикция и модификация

Smith D.H., 1979. Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases, Science, 205, 455-462.

Arber W., 1979. Promotion and limitation of genetic exchange, Science, 205, 361-365.

Интерферон

Friedman R.M., 1977. Antiviral activity of interferon, Bacteriol. Rev., 41. 543-567.

Farrell P.J., *Sen G.C.*, *Dubois M.F.*, *Ratner L.*, *Slattery E.*, *Lengyel P.*, 1978. Interferon action: two distinct pathways for inhibition of protein synthesis by double-stranded RNA, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 5893-5897.

Burke D.C., 1977. The status of interferon, Sci. Amer., 236(4), 42-50.

Внеклеточная эволюция РНК фага Qβ

Mills D.R., *Peterson R.L.*, *Spiegelman S.*, 1967. An extracellular Darwinian experiment with a selfduplicating nucleic acid molecule, Proc. Nat. Acad. Sci., 58, 217-224.

Лизогения

Lwoff A., 1966. The prophage and I. In: Cairns J., Stent G. S. and Watson J. D. (eds.), Phage and the Origins of Molecular Biology, pp. 88-99, Cold Spring Harbor Laboratory. (Захватывающий рассказ об открытии основ лизогении.)

Опухолеродные вирусы

Baltimore D., 1976. Viruses, polymerases, and cancer, Science, 192, 632-636.

Timin H., 1976. The DNA provirus hypothesis: the establishment and implications of RNA-directed DNA synthesis, Science, 192, 1075-1080.

Dulbecco R., 1976. From the molecular biology of oncogenic DNA viruses to cancer, Science, 192, 437-440.

Bishop J.M., 1978. Retroviruses, Ann. Rev. Biochem., 47, 35-88.

Reddy V.B., *Thimmappaya B.*, *Dhar R.*, *Subramanian K.N.*, *Zain B.S.*, *Plan J.*, *Ghosh P.K.*, *Celma M.L.*, *Weissman S.* M., 1978. The genome of simian virus 40, Science, 200, 494-502.

ГЛАВА 31
Перестройки генов: рекомбинация, транспозиция и клонирование

Тема настоящей главы - перестройка генов путем перемещения крупных участков ДНК. Прежде всего мы обсудим *процесс генетической рекомбинации,* при котором новая молекула ДНК возникает путем разрыва и воссоединения цепей ДНК. Вероятность генетической рекомбинации существенно увеличивается при наличии обширных участков гомологии между взаимодействующими молекулами ДНК. Были выделены промежуточные продукты рекомбинации, а сравнительно недавно был охарактеризован и фермент, катализирующий взаимный обмен цепей ДНК. Затем мы обсудим *транспозицию* - перемещение гена из одной хромосомы в другую или с одного места на другое в пределах одной хромосомы. В отличие от общей рекомбинации для транспозиции не нужны протяженные участки гомологии. У прокариот присутствие так называемых *последовательностей-вставок,* или *IS-элементов* (от англ. insertion sequences), сообщает подвижность неродственным фрагментам ДНК, обеспечивая их соединение. Рекомбинация и транспозиция сыграли важную роль в эволюции, так как они *приводили к возникновению новых геномов.* В конце настоящей главы мы рассмотрим *конструирование новых комбинаций генов в пробирке* и их выражение в клетках-хозяевах. Гены можно ковалентно соединить с ДНК плазмид и вирусов с помощью рестриктирующих эндонуклеаз и ДНК-лигазы. *Такие рекомбинатные молекулы ДНК* могут реплицироваться и экспрессироваться в подходящих клетках-хозяевах. Кроме того, мы обсудим важность клонирования генов и возможность его практического применения. Исследования рекомбинации и транспозиции и разработка методов клонирования идут исключительно быстрым темпом. В результате этих работ возникают новые плодотворные методы изучения геномов, которые позволяют глубже проникнуть в механизмы их эволюции и выражения.

31.1 В основе генетической рекомбинации лежат разрыв и воссоединение цепей ДНК

При генетической рекомбинации возникает молекула ДНК, последовательность которой происходит частично от одной родительской молекулы, а частично от другой. Исследования клеток *E. coli,* зараженных смесью фагов Т4, меченных ^{32}P и бромдезоксиурацилом, позволили получить представление о молекулярной природе рекомбинантных молекул. Плавучая плотность ДНК, меченной бромурацилом, значительно выше, чем плотность ДНК, меченной ^{32}P, так что родительские молекулы можно отделить друг от друга и от рекомбинантных молекул центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия (CsCl). Результаты опытов по центрифугированию показали, что после заражения смесью фагов рекомбинантные молекулы содержат и ^{32}P, и бромурацил. Структура гибридных молекул зависела от того, происходил ли во время их образования синтез ДНК. В отсутствие синтеза ДНК ^{32}P-ДНК в составе рекомбинантных молекул не была ковалентно соединена с меченной бромурацилом ДНК. При нагревании выше температуры плавления двухспиральных молекул гибрид диссоциировал на легкий и тяжелый компоненты. Фрагменты родительских молекул в этом гибриде удерживаются вместе в результате спаривания оснований; поэтому этот промежуточный продукт называется *составным* (рис. 31.3). Если же синтез

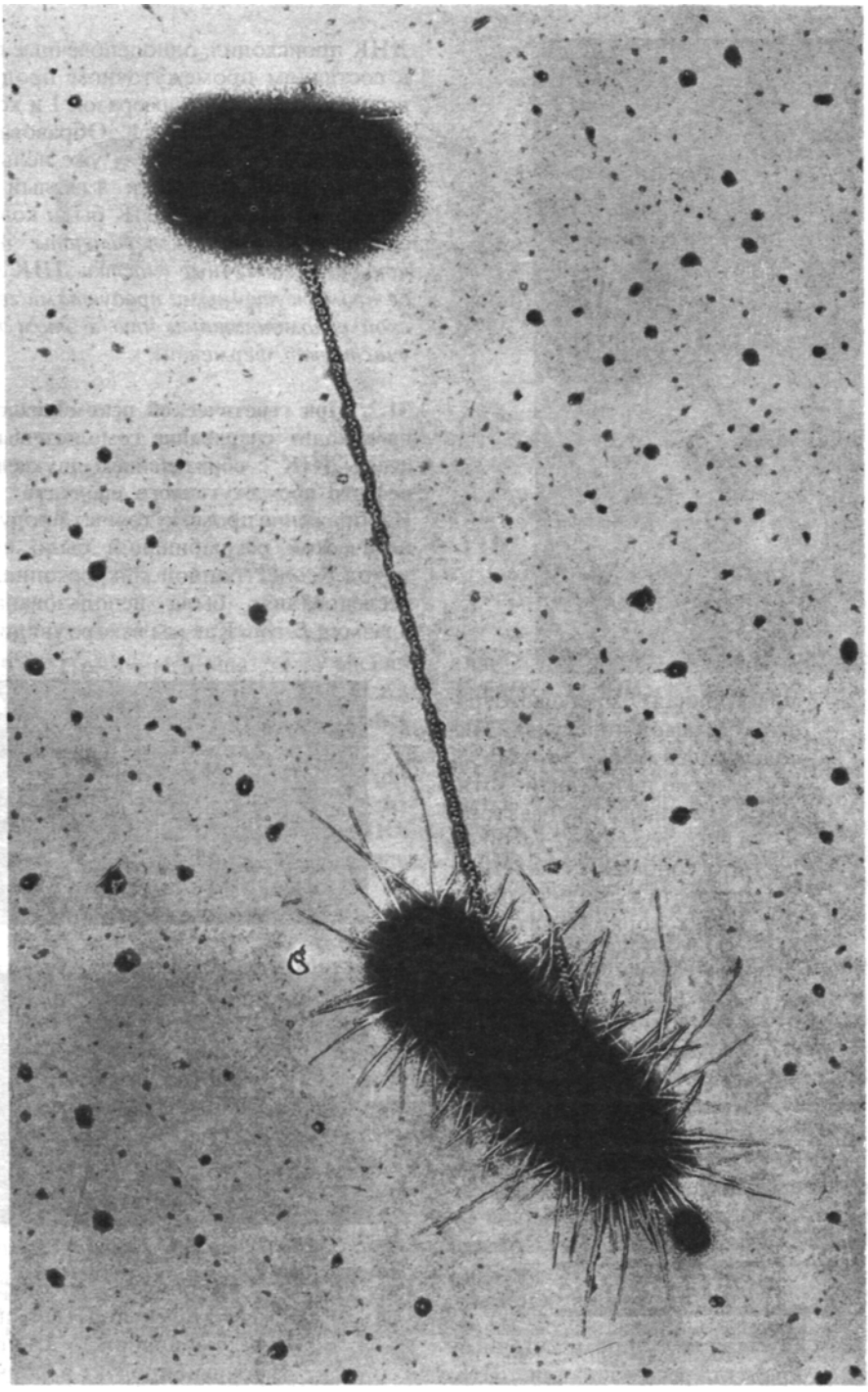


Рис. 31.1. Перенос генетической информации от одной клетки *E. coli* к другой. На этой электронной микрофотографии видны две клетки *E. coli*, соединенные при помощи пиля во время конъюгации. ДНК переносится через пиль из донорной клетки в акцепторную. (Печатается с любезного разрешения д-ра Charles Brinton и д-ра Judith Carnahan.)

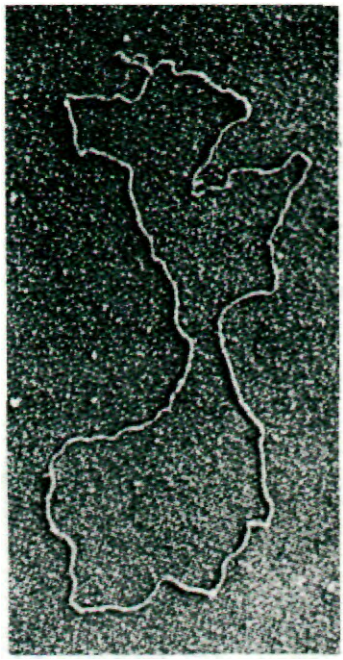


Рис. 31.2. Электронная микрофотография кольцевой молекулы ДНК, содержащей гены устойчивости к нескольким антибиотикам. Такие плазмиды (факторы R - от англ. resistance - устойчивость) сообщают клеткам устойчивость к различным веществам, которая может передаваться другим клеткам. (Печатается с любезного разрешения д-ра Stanley Cohen.)

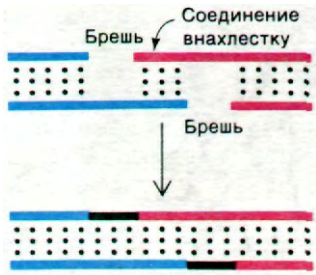


Рис. 31.3. Составной промежуточный продукт рекомбинации ДНК фага Т4 в зараженных бактериях. Меченная ^{32}P ДНК показана красным цветом, а ДНК, меченная бромурацилом,- синим.

ДНК происходил, одноценочечные пробелы в составном промежуточном продукте заполнялись ДНК-полимеразой I и концы соединялись ДНК-лигазой. Образовавшуюся рекомбинатную молекулу уже нельзя было разделить на легкий и тяжелый компоненты, так как куски ДНК были ковалентно соединены. Эти *эксперименты показали, что одноцепочечные участки ДНК являются промежуточными продуктами генетической рекомбинации и что в этом процессе участвуют ферменты.*

31.2. При генетической рекомбинации происходит спаривание гомологичных цепей ДНК с образованием двухцепочечного промежуточного продукта

Изображение промежуточных продуктов генетической рекомбинации было получено методом электронной микроскопии. В этих исследованиях была использована ДНК плазмид *E. coli.* Как мы вскоре увидим (разд.

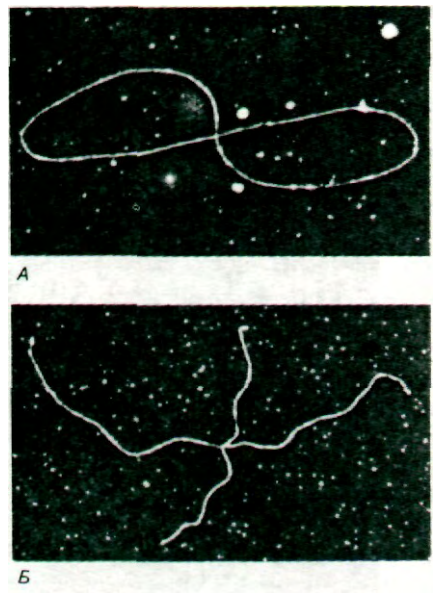


Рис. 31.4. Электронная микрофотография молекул ДНК в процессе рекомбинации: *А* - промежуточный продукт в форме восьмерки, состоящий из двух молекул ДНК; *Б* - при расщеплении этого промежуточного продукта рестриктирующей эндонуклеазой образуется *х*-форма. [Potter H., Dressier D., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 1089 (1976).]

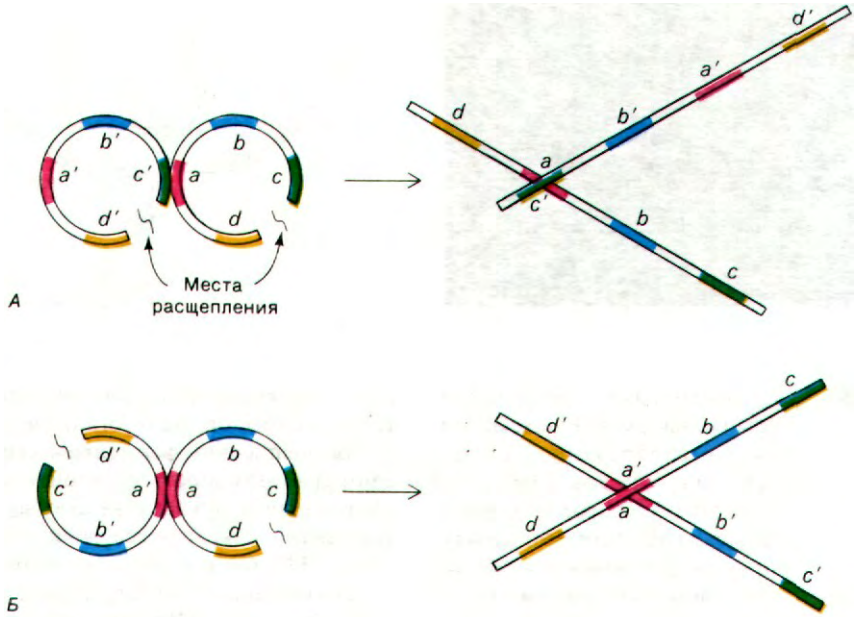


Рис. 31.5. Предполагаемая схема расщепления двух молекул ДНК, соединенных в негомологичных (*А*) и в гомологичных (*Б*) участках. Наблюдаемая симметрия χ-форм (как на рис. 31.4, *Б*) показывает, что молекулы ДНК в форме восьмерок соединены в гомологичных участках.

31.4), эти небольшие кольцевые двухцепочечные ДНК автономно реплицируются в бактериальной клетке. В присутствии хлорамфеникола число плазмид в одной бактерии увеличивается примерно с 20 до 1000. Этот антибиотик - ингибитор синтеза белка - подавляет репликацию бактериальной хромосомы, но не ингибирует репликации плазмид. Итак, бактериальная клетка оказывается наполненной молекулами плазмид, способными к рекомбинации. Электронная микроскопия плазмид, выделенных из этих клеток, показывает, что примерно четверть из них представляют собой димеры в форме восьмерок (рис. 31.4, *А*). Затем эти димеры расщепили рестриктирующей эндонуклеазой EcoRI. разрезающей мономер плазмиды в строго определенном месте. Если бы димеры были взаимозацепленными друг с другом мономерами или кольцами двухкратной длины, то под действием рестриктирующей эндонуклеазы образовались бы палочки одинаковой длины. С другой стороны, если два плазмидных кольца ковалентно соединены в области участка гомологии, должна быть видна структура с четырьмя ветвями в форме греческой буквы χ. В действительности почти все восьмерки превращаются в χ-форму (рис. 31.4, *Б*). Это служит надежным подтверждением, что *восьмерки представляют собой промежуточные продукты репликации.* В пользу этого вывода говорит и то, что у некоторых мутантов *E. coli,* дефектных по рекомбинации, восьмерки не образуются.

Какова структура области перекрестка двух геномов в восьмерках? Точка контакта (пересечения*)* χ-форм всегда делит всю структуру на две пары плеч равной длины. Это означает, что *геномы соединяются в области гомологии* (рис. 31.5). Если бы плазмиды соединялись в области негомологичных последовательностей, то длины всех четырех плеч распределялись бы случайным образом. Кроме того, точка контакта располагается примерно с равной вероятностью вдоль всей плазмиды; отсюда следует, что *спаривание может происходить во многих положениях.* Способ соединения нитей в области перекреста был исследован с помощью его избирательной денатурации. На электронных микрофотографиях видно, что *четыре двухцепочечные молекулы в местах соединения двух геномов отходят от кольца,*

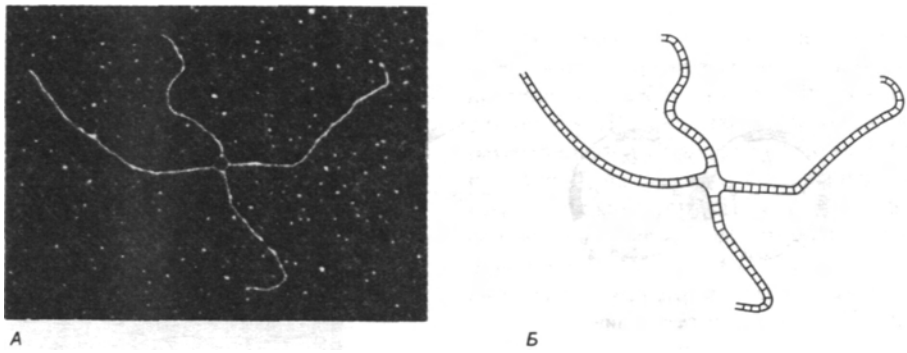


Рис. 31.6. *А* - электронная микрофотография χ-формы; *Б* - схема молекулы, изображенной на фотографии. Участок гомологии (богатый АТ-парами оснований) был избирательно денатурирован формамидом, чтобы было видно соединение цепей в области перекреста. [Potter H., Dressier D., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43, 973 (1979).]

состоящего из одиночных нитей (рис. 31.6). Затем этот промежуточный продукт может быть расщеплен и лигирован, так что образуются две пары различных рекомбинантных молекул (рис. 31.7).

31.3. Белок recA катализирует АТР-зависимый обмен цепей ДНК при генетической рекомбинации

Процесс, который мы обсуждали до сих пор, называется *общей генетической рекомбинацией,* поскольку обмены могут происходить между любыми парами гомологичных последовательностей в родительских молекулах ДНК. У *E. coli* общая рекомбинация зависит от генов *rec*. В клетках *rec*$^{--}$ бактериальная ДНК не может рекомбинировать с экзогенными молекулами ДНК. Были идентифицированы три гена *rec*: *recA, recB* и *recC.* Белки recB (масса 140 кДа) и recC (128 кДа) - две субъединицы одной нуклеазы, которая расплетает двухспиральную ДНК и расщепляет на куски сначала одну из расплетенных цепей, а затем другую. Эти куски, содержащие несколько сотен нуклеотидов, подвергаются дальнейшему расщеплению ферментом recBC, обладающим активностью экзонуклеазы. Расплетающая и нуклеазная активности этого ферментного комплекса зависят от гидролиза АТР. *Скорее всего роль белка recBC в рекомбинации сводится к образованию одноцепочечной ДНК, способной внедриться в двухцепочечную молекулу ДНК.*

Как одноцепочечная ДНК находит гомологичную последовательность в двухцепочечной молекуле, спаривается с комплементарной цепью и вытесняет вторую цепь? *Недавно было показано, что эту реакцию катализирует белок recA с массой 40 кДа, который гидролизует АТР и использует выделяющуюся энергию.* Продукт этой реакции состоит из двухцепочечного участка и вытесненной одноцепочечной петли и имеет форму буквы D; он называется *D-петлей* (рис. 31.8). Образованию D-петли способствует *белок, который специфически связывается с одноцепочечной ДНК.* Этот белок играет также важную роль в репликации ДНК (разд. 24.21); он стабилизирует одноцепочечную ДНК, образовавшуюся под действием нуклеазы recBC, и стимулирует внедрение этой цепи в гомологичную двухспиральную молекулу, катализируемую белком recA.

31.4. Бактерии содержат плазмиды и другие подвижные генетические элементы

Общая генетическая рекомбинация приводит к возникновению новых комбинаций специфических *аллелей,* но не изменяет расположения *локусов.* Другими словами, при гомологичной рекомбинации *ABCDE* с *A'B'C'D'E'* легко получится *ABC'D'E',* но не может получиться *ABXYZCDE* или *ABE.* Такие крупные генетические перестройки

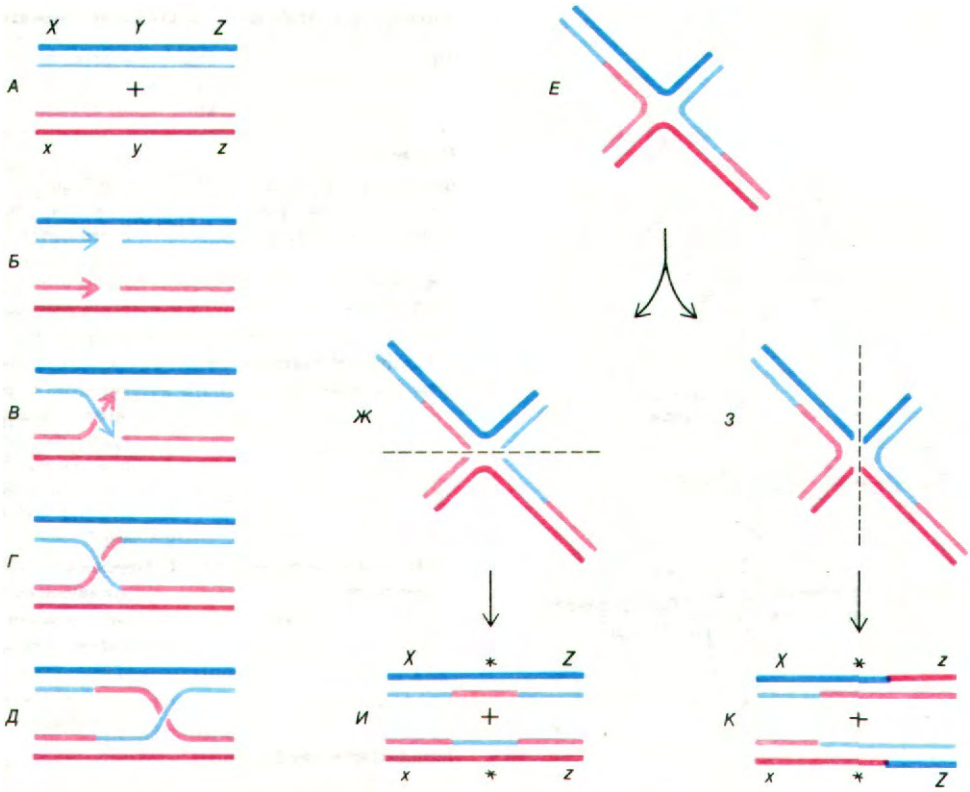


Рис. 31.7. Модель генетической рекомбинации, предложенная Робином Холидеем (Robin Holliday). Одна из родительских двухцепочечных молекул изображена синим цветом, а другая красным. Более темная нить в каждом дуплексе - (+)цепь. Буквами X, Y и Z обозначены три гена; *x, y* и *z* - их аллели. *В* и *Г* - ковалентное соединение родительских молекул ДНК. *Е* - иное представление комплекса молекул, изображенного на рис. *Д*. Обратите внимание, что эта структура на рис. *Е* может быть разрезана по горизонтальной или по вертикальной оси. Воссоединение нитей на рис. *Ж* и *З* дает два различных набора рекомбинантов (*И* и *К*). Участки, содержащие по одной цепи каждого из родительских дуплексов, отмечены звездочками. [Potter H., Dressier D., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43, 973 (1979).]

происходят при участии *подвижных генетических элементов* (табл. 31.1). Важный класс подвижных генетических элементов - *плазмиды*. Это кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК (рис. 31.9), размер которых колеблется от двух до нескольких сотен тысяч пар оснований (kb). Плазмиды содержат гены, ответственные за инактивирование антибиотиков, метаболизм природных соединений и образование токсинов. В сущности, *плазмиды представляют собой дополнительные хромосомы*. Они отличаются от бактериальной хромосомы тем, что без них в определенных условиях клетка может обойтись. Кроме того, *плазмиды обладают способностью реплицироваться независимо от клеточной хромосомы*. Клетка *E. coli* обычно содержит около 20 копий мелких хромосом и 1-2 большие.

31.5. Фактор F позволяет бактериям передавать гены реципиентам путем конъюгации

Некоторые плазмиды обусловливают перенос бактериями генетического материала

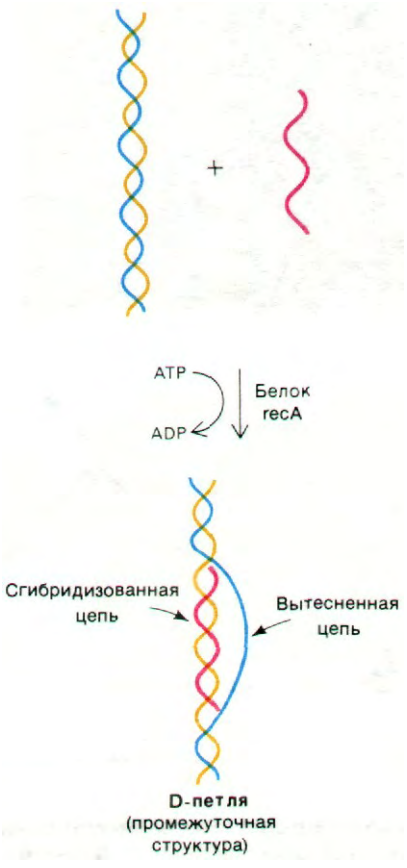


Рис. 31.8. Спаривание одноцепочечной молекулы ДНК (показана красным цветом) с комплементарной цепью (желтым) дуплекса, катализируемое белком rec A. В результате образуется структура, называемая D-петлей.

Таблица 31.1. **Мобильные генетические элементы**

Тип	Размер, kb	Свойства
Плазмиды		
Фактор F (фактор фертильности, фактор плодовитости)	93	Сообщает клетке мужской фенотип, переносится при конъюгации
Факторы F'	>100	Переносят, помимо генов фактора F, гены *E. coli*
Факторы R (факторы устойчивости)	4-117	Содержат гены устойчивости к различным веществам: кроме того, некоторые из них содержат гены, обеспечивающие конъюгацию
Факторы колицигенности	6-141	Переносят гены, продуцирующие колицин (токсин); некоторые содержат, кроме того, гены, обеспечиваюшие конъюгацию
Лизогенизирующие факторы		
Лямбда	48	Небольшая часть фагов переносит гены *E. coli* (*gal* или *bio*) наряду с вирусными генами
Мю	38	Все фаги мю несут короткий участок генома *E. coli*
Последовательности-вставки (IS-элементы)	От 0,8 до 1,4	Гены, обрамленные парой IS-элементов, могут переноситься с места на место внутри клетки

в другие бактерии путем образования непосредственных межклеточных контактов. Этот процесс, названный *конъюгацией,* открыли в 1946 г. Джошуа Ледерберг и Эдвард Татум (Joshua Lederberg, Edward Tatum). При конъюгации клеток *E. coli* один партнер (мужского пола) служит донором генетического материала, другой (женского пола) - реципиентом. Бактерии мужского пола имеют на поверхности особые отростки, получившие название *половых пилей,* а женские клетки несут рецепторные участки, которые связывают пили. Пиль связывает между собой мужскую и женскую клетки (рис. 31.1). Затем он сокращается, что позволяет клеткам вступить в непосредственный контакт для передачи ДНК (рис. 31.10). Бактерия мужского пола содержит плазмиду, называемую *фактором F* (от англ. fertility - плодовитость), которая несет гены, детерминирующие образование половых пилей и других компонентов, участвующих в конъюгации. При конъюгации одна цепь плазмиды фактора F разрывается в одном месте, и происходит расплетание двухцепочечной молекулы (рис. 31.11). 5'-конец разорванной цепи входит в реципиент-

ную клетку, и на ней синтезируется комплементарная цепь. При этом образуется замкнутая кольцевая двухцепочечная молекула. *Присутствие плазмиды фактора F в реципиентной клетке (первоначально F^-) превращает ее в мужскую клетку* (F^+). Мужская клетка может спонтанно терять свой фактор и ревертировать таким образом к генотипу F^-.

Плазмида фактор F может интегрировать с бактериальной хромосомой. Интеграция происходит путем кроссинговера с одним из множества мест в бактериальной хромосоме. Частота интеграции составляет примерно 10^{-5} в расчете на одну генерацию. Бактерии, несущие фактор F в своих хромосомах, называются *клетками Hfr* (от англ. high frequency of recombination - высокая частота рекомбинации). Клетки Hfr, как и клетки F^+, участвуют в конъюгации в качестве доноров (рис. 31.12). Различие между ними состоит в том, что *клетка Hfr передает всю бактериальную хромосому (включая интегрированный фактор F)*, тогда как клетка F^+ передает реципиенту только фактор F. При скрещивании Hfr x F^- вся хромосома переносится примерно за 90 мин. Порядок входа передаваемых генов в реципиентную клетку зависит от места, в котором произошла интеграция фактора F и от его полярности. Поэтому порядок генов в хромосоме донора можно легко установить, прерывая конъюгацию в различные моменты времени и определяя, какие маркеры успели перейти. Передаваемая хромосома донора может рекомбинировать с хромосомой реципиента. Частота рекомбинации выше всего для генов, которые вошли в реципиентную клетку первыми, так как они находятся там дольше всего. Таким образом, можно строить генетические карты, определяя *время входа и частоту рекомбинации маркеров, передаваемых* донором.

При исключении фактора F из хромосомы Hfr-клетки она переходит в состояние F^+. Этот процесс, обратный интеграции фактора F, также происходит с частотой примерно 10^{-5} за одну генерацию. В небольшой части ревертантов кроссинговер происходит в сайте, отличном от сайта интеграции. В результате *образуется плазмида, содержащая, помимо генов фактора F, хромосомные гены* (рис. 31.13). Такая плазмида называется *фактором F';* штрих обозначает, что в ней присутствуют хромосомные гены. Конъюгация клетки F' с клеткой F^- приводит к переносу этих хромосомных генов из донора в реципиентную клетку, которая в результате становится диплоидной по этим генам.

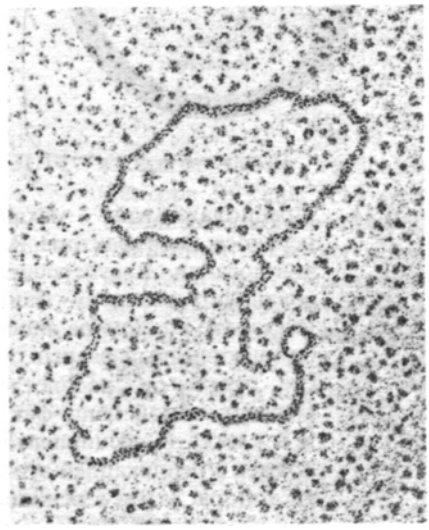


Рис. 31.9. Электронная микрофотография небольшой плазмиды фактора R. (Печатается с любезного разрешения д-ра Jack Griffith.)

Рис. 31.10. Электронная микрофотография двух клеток *E. coli* во время конъюгации. (Печатается с любезного разрешения д-ра Lucien Caro.)

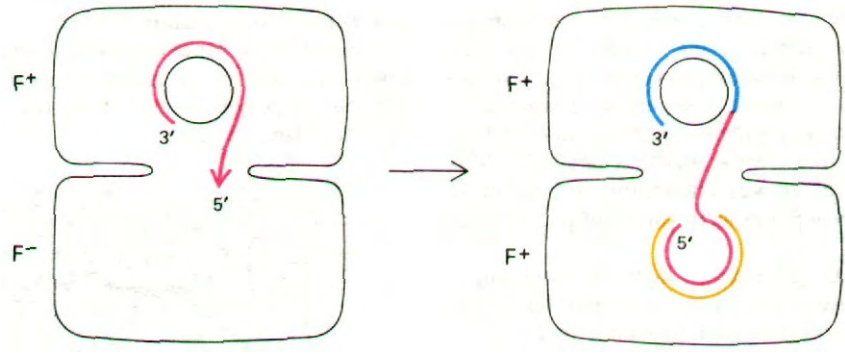


Рис. 31.11. Предполагаемый механизм переноса нити фактора R при конъюгации. В суперспирализованную молекулу фактора R в клетке F^+-донора вносится одноцепочечный разрыв, и после этого он расплетается, Перенос одной цепи фактора R в клетку F^--реципиента сопряжен с репликацией этой цепи донора. Затем в реципиентной клетке синтезируется комплементарная цепь. [Warren G.J., Twigg A.J., Sherratt D. J., Nature, 274, 260 (1978).]

Таким образом, у бактерий имеется механизм для переноса целых хромосом или нескольких генов из одной клетки в другую. *Фактор F можно рассматривать как особый переносчик (вектор), возникший специально для обмена генетическим материалом.* Интересно отметить, что *лизогенизирующие фаги также могут участвовать в обмене генов клетки-хозяина.* Например, ДНК фага λ может интегрировать между генами *gal* и *bio* хромосомы *E. coli* (разд. 30.16). Исключение профага из хромосомы обычно происходит точно, но не всегда. Примерно в одном вирионе на 10^5 ДНК фага λ содержит оперон *gal* или ген *bio*. При заражении такими фагами, называемыми λ*gal* и λ*bio*, эти гены вводятся в клетку *E. coli* вместе с генами фага λ. Другой родственный фаг, который называется φ80, интегрирует вблизи оперона *trp* и может переносить гены *trp*

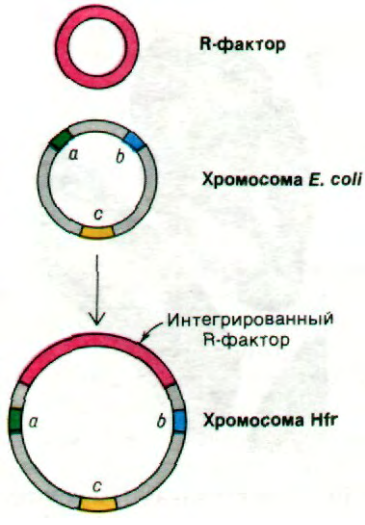


Рис. 31.12. Схема образования Hfr-клеток путем интеграции фактора F с хромосомой *E. coli.*

Рис. 31.13. Аномальное исключение фактора F приводит к образованию плазмиды F, содержащей часть хромосомы *E. coli.*

из одной зараженной клетки в другую. Бактериофаг μ интегрирует почти в любом месте хромосомы *E. coli* и при исключении всегда захватывает кусок бактериальной хромосомы. Эти *трансдуцирующие фаги, подобно фактору F, представляют собой подвижные генетические элементы, которые обеспечивают взаимообмен бактериальных генов. Не исключено, что трансдукция ускоряет эволюцию бактерий.*

31.6. Плазмиды-факторы R придают бактериям устойчивость к антибиотикам

Поразительным примером необычно быстрой эволюции бактерий может служить эпидемия бактериальной дизентерии, протекавшая в 1955 г. Один из штаммов *Shigella dysenteriae* приобрел устойчивость одновременно к хлорамфениколу, стрептомицину, сульфаниламидам и тетрациклину. Такого рода множественная устойчивость к лекарственным препаратам в настоящее время широко распространена среди многих патогенных микроорганизмов. Гены, придающие устойчивость к многим антибиотикам, соединены вместе *в плазмидных факторах R* (*от англ.* resistance - устойчивость), называемых также *факторами устойчивости*. Наиболее крупные из этих плазмид наряду с несколькими генами *r* содержат также фактор переноса устойчивости (resistance transfer factor - RTF) (рис. 31.14). Участок RTF позволяет плазмиде переноситься в другие бактерии с помощью конъюгации. В действительности гены участка RTF весьма сходны с аналогичными генами факторов F. Гены *r* кодируют ферменты, инактивирующие определенные лекарственные вещества. Факторы R, имеющие участок RTF, могут переноситься между различными видами бактерий при совместном культивировании. Следовательно, *множественная устойчивость к антибиотикам может быть трансмиссивной.*

Маленькие плазмиды факторы R лишены области RTF и обычно придают клетке устойчивость только к одному антибиотику. Например, плазмида R pSC101 длиной 8,2 kb несет ген устойчивости к тетрациклину, но она не может быть перенесена путем конъюгации. Однако этот ген *r* может присоединиться к другой плазмиде, несущей иной ген устойчивости к какому-либо веществу (рис. 31.15). Если эти гены *r* интегрируют с плазмидой, содержащей область RTF, возникает трансмиссивная R-плазми-

Рис. 31.14. Схематическое изображение фактора R. Гены RTF (ответственные за конъюгацию и репликацию) показаны зеленым цветом, а гены *r* (ответственные за устойчивость к различным лекарственным веществам) — красным. IS-элементы показаны желтым цветом.

Рис. 31.15. Инфекционный фактор R образуется, когда ген *r* присоединяется к плазмиде RTF.

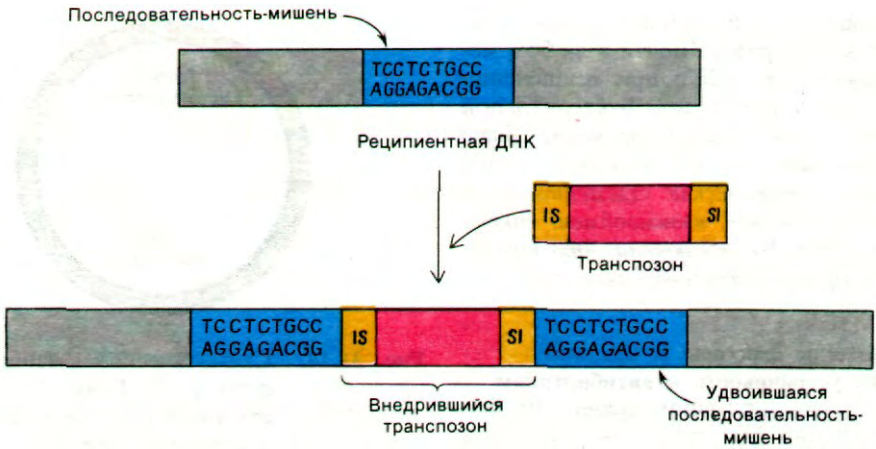


Рис. 31.16. Перенос гена (показано красным цветом), граничащего с обеих сторон с IS-элементами (желтый цвет). При транспозиции реципиентный участок (синий цвет) удваивается. Один конец транспозона представляет собой обращенный повтор другого конца.

да. *Следовательно, плазмиды, являющиеся сложными факторами R, образуются из весьма подвижных элементов, обусловливающих, устойчивость к отдельным химическим соединениям.* Такие генетические элементы, способные к переносу, теперь называют *транспозонами*.

31.7. IS-элементы могут присоединяться к неродственным генам

Что лежит в основе высокой подвижности транспозонов? Электронно-микроскопические исследования и определение последовательности нуклеотидов в ДНК показали, что *последовательность, расположенная на одном конце транспозона, повторяется на другом конце.* Например, концы Tn3-транспозона, кодирующего устойчивость к ампициллину,- представляют собой обращенные повторы длиной 38 пар оснований. Последовательности нуклеотидов в ДНК реципиенте, граничащие с обеих сторон с транспозоном, являются прямым повтором последовательности 5-9 пар оснований, присутствовавшей до вставки транспозона (рис. 31.16). Между этими обрамляющими последовательностями реципиентной ДНК и концевыми последовательностями транспозона нет никакой гомологии. Кроме того, гены *rec E. coli* не участвуют в процессе интеграции транспозона, что в корне отличает его от общей генетической рекомбинации. Концы транспозона, возможно, служат IS-*элементами,* направляя действие нуклеаз и других белков, участвующих в интеграции. Самое главное заключается в том, что *транспозон не обязательно гомологичен реципиентной ДНК, так как специфичность интеграции определяется в первую очередь ДНК-белковыми взаимодействиями, а не спариванием оснований.*

Самые маленькие подвижные генетические элементы - это *последовательности-вставки* (IS-элементы), которые имеют длину около 1 kb. В отличие от транспозонов IS-элементы не несут никаких генов. Однако они оказывают существенное влияние на выражение соседних генов. IS-элементы обычно блокируют транскрипцию дистальных генов транскрипционной единицы. Кроме того, они могут выступать в качестве новых промоторов. К тому же IS-элементы способствуют таким хромосомным перестройкам, как делеции и инверсии. В хромосоме *E. coli* было обнаружено несколько копий четырех различных IS-элементов (IS1, IS2, IS3 и IS4). К тому же концевые последовательности некоторых транспозонов идентичны одному из этих IS-элементов. *По всей вероятности, транспозон образуется в том случае, когда какой-либо ген оказывается окруженным парой IS-элементов.*

Мы уже видели, что плазмиды и фаги могут обмениваться блоками генов с бактериальными хромосомами. Кроме того, плазмиды и фаги способны рекомбиниро-

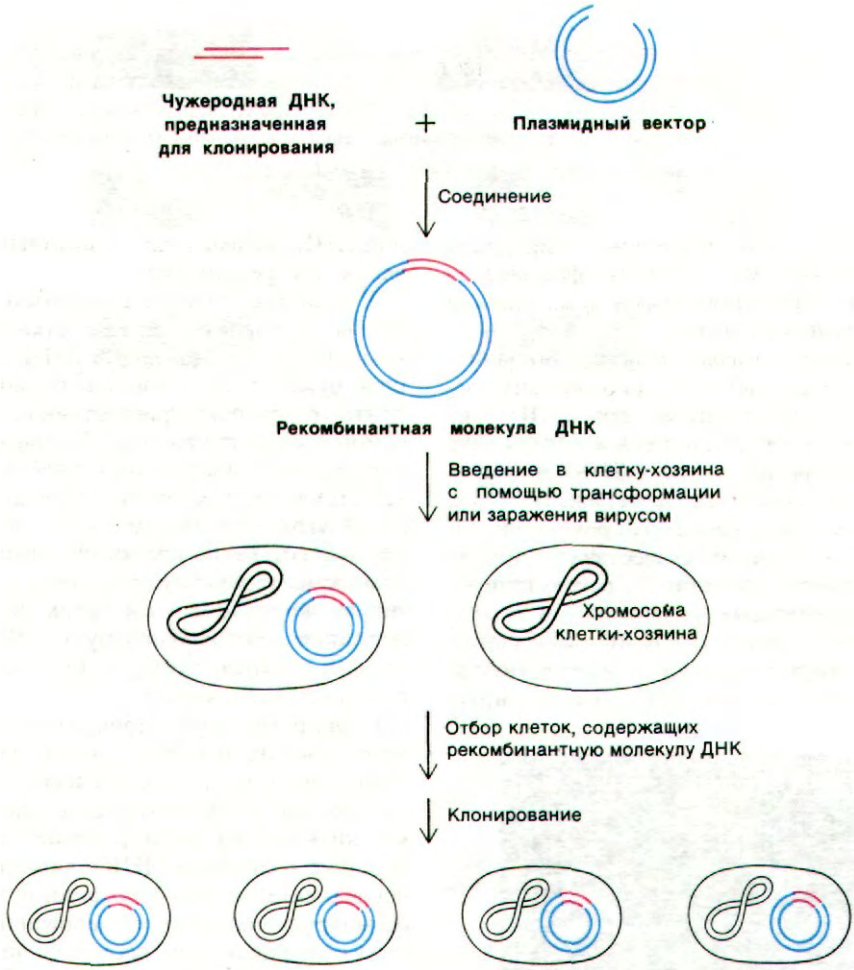


Рис. 31.17. Синтез и клонирование рекомбинантных молекул ДНК.

вать друг с другом. Было показано, что генетический элемент, отвечающий за устойчивость к тетрациклину, перемещается из плазмиды фактора R в фаг, размножающийся в клетках *Salmonella,* а оттуда в хромосому *Salmonella,* затем в фаг λ и из фага λ в *trp*-оперон *E. coli* и обратно в фаг λ. Это замечательное путешествие показывает, насколько подвижны гены прокариот. Было бы интересно выяснить, обладают ли гены эукариот столь же высокой подвижностью.

31.8. В лаборатории можно сконструировать новые геномы и клонировать их в клетках-хозяевах

Разработанная в последние годы технология рекомбинантных ДНК - важнейшее достижение молекулярной биологии. *Появилась возможность создать в лабораторных условиях новые комбинации неродственных генов.* Затем эти новые геномы можно ввести в подходящие клетки и *размножить* во много раз с помощью механизмов синтеза ДНК клетки-хозяина. Некоторые из таких введенных в клетки генов могут также транскрибироваться и транслироваться в новом окружении. Основные этапы клонирования ДНК сводятся к следующему (рис. 31.17).

1. *Создание рекомбинантной молекулы.* Интересующий исследователя фрагмент ДНК ковалентно присоединяется к ДНК *вектора.* Основное свойство вектора состоит в том, что он может автономно реплицироваться в подходящем хозяине. Например, плазмиды и фаг λ наиболее удобные векторы для клонирования генов в клетках *E. coli.* Как будет описано ниже, молекулы

Химерная ДНК - рекомбинантная молекула ДНК, содержащая неродственные гены. От слова химера - мифологическое существо с головой льва, телом козла и хвостом змеи. «...Коей порода была от богов, не от смертных: Лев головою, задом дракон и коза серединой, Страшно дыхала она пожирающим пламенем бурным». Гомер, «Илиада», пер. Н. Гнедича, гл. VI, стих 180.

ДНК можно соединить путем лигирования (т.е. воздействием лигазы) фрагментов с липкими одноцепочечными концами или же с тупыми концами.

2. *Введение в клетку-хозяина.* Большинство бактериальных и эукариотических клеток поглощает голые молекулы ДНК из среды. Эффективность поглощения низка (примерно 1 на 10^6 молекул ДНК), но в специально подобранных экспериментальных условиях можно трансформировать значительную часть клеток. Существует и другой метод: клетки заражают реконструированными вирионами, содержащими рекомбинантные молекулы ДНК. В таком синтетическом вирусном геноме интересующий исследователя ген замещает участок вирусной ДНК, не имеющий существенного значения для репликации.

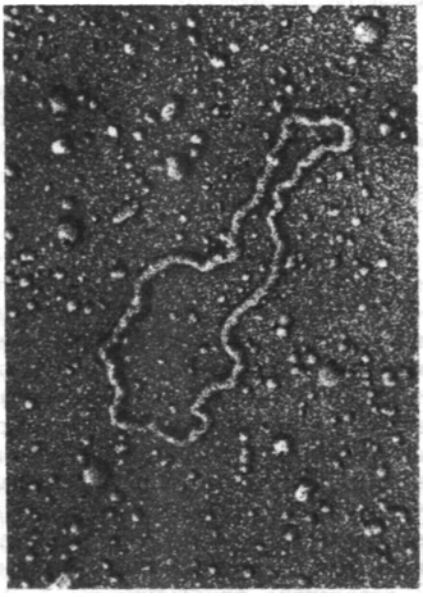


Рис. 31.18. Электронная микрофотография pSC101 - плазмидного вектора, использованного для клонирования ДНК. (Печатается с любезного разрешения д-ра Stanley Cohen.)

3. *Отбор.* Следующий этап состоит в том, чтобы определить, какие клетки несут рекомбинантную молекулу ДНК, содержащую нужный ген. Такие клоны можно отобрать по признаку присутствия вектора или самого встроенного гена. Например, некоторые плазмидные векторы сообщают клетке устойчивость к какому-либо антибиотику. Другой подход состоит в том, чтобы определить, какие клетки связывают РНК, комплементарную нужному гену, или синтезируют кодируемый им белок. Клоны, содержащие рекомбинантную ДНК, стабильны, по крайней мере в течение нескольких сотен поколений.

Клонирование рекомбинантной ДНК уже внесло большой вклад в наши представления о структуре хромосомы и выражении гена. Многие встроенные гены удалось размножить путем клонирования, что дало большие количества ДНК для определения последовательности оснований и электронно-микроскопических исследований. Кроме того, с помощью этих клонов были синтезированы в больших количествах белки, которые в обычных условиях образуются в ничтожных количествах. Методы рекомбинантных ДНК используются также для изучения сложных геномов и регуляции их выражения.

31.9. Ферменты рестрикции и ДНК-лигаза - необходимые инструменты для получения рекомбинантных молекул ДНК

Молекулы ДНК можно легко соединять *in vitro* с помощью рестриктирующих эндонуклеаз (разд. 24.27), ДНК-лигаз (разд. 24.15) и других высокоспецифических ферментов, действующих на ДНК. В эксперименте по получению рекомбинантной ДНК вектор подготавливают к соединению с клонируемым фрагментом путем расщепления в одном определенном месте с помощью рестрикционной эндонуклеазы. Например, небольшую плазмиду pSC101 можно расщепить в одном месте ферментом рестрикции EcoR1. Если с помощью этого фермента две

Рис. 31.19. Соединение молекул ДНК с помощью метода липких концов. Одна из родительских молекул ДНК (показано зеленым цветом) несет гены *P* и *Q*, разделенные участком рестрикции, а другая (красный цвет) несет гены *X* и *У*. Одна из рекомбинантных молекул несет гены *P* и *У*, а другая - *Q* и *X*.

к тетрациклину. Затем используют другой метод отбора для выявления клонов, содержащих плазмиду со встроенной ДНК.

Второй метод соединения двух неродственных молекул ДНК основан на присоединении poly(dA)-фрагментов к обоим 3'-концам одной молекулы и poly(dT)-фрагментов к обоим 3'-концам другой молекулы (рис. 31.20). Эти гомополимерные последовательности синтезируются *терминальной*

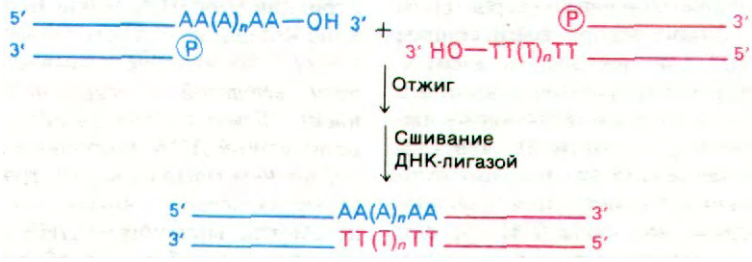


Рис. 31.20. Соединение молекул ДНК с помощью наращивания poly (dA)- и poly(dT)-концов (коннекторным методом).

цепи ДНК расщепить наискосок, то образуются *комплементарные одноцепочечные концы (липкие концы)*. Предположим теперь, что фрагмент ДНК, который необходимо ввести в эту плазмиду, образован путем расщепления большой молекулы ДНК эндонуклеазой EcoR1. Тогда одноцепочечные концы этого фрагмента будут комплементарны концам расщепленной плазмиды. Теперь фрагмент ДНК и плазмиду можно подвергнуть отжигу и соединить ДНК-лигазой (рис. 31.19). Затем бактерии инкубируют в присутствии этой смеси молекул ДНК. Небольшую часть бактерий, несущих плазмиду, отбирают, исходя из того что pSC101 сообщает клеткам устойчивость

дезоксинуклеотидил-трансферазой (терминальной трансферазой) - ферментом, присоединяющим нуклеотиды к 3'-гидроксильной группе цепи ДНК. Эта трансфераза в отличие от ДНК-полимеразы не зависит от матрицы, поэтому с ее помощью можно присоединить последовательности из нуклеотидов только одного тина (обычно длиной 100 остатков). *Po1y(dA)-концы одной молекулы ДНК отжигают с poly(dT)-концами другой.* Длины этих концевых последовательностей могут несколько колебаться, поэтому, прежде чем соединить цепи ДНК-лигазой, бреши заполняют с помощью ДНК-полимеразы I. Точно так же можно использовать для соединения различных молекул ДНК и концевые poly(dG)- и poly(dC)-последовательности.

Третий подход к соединению молекул

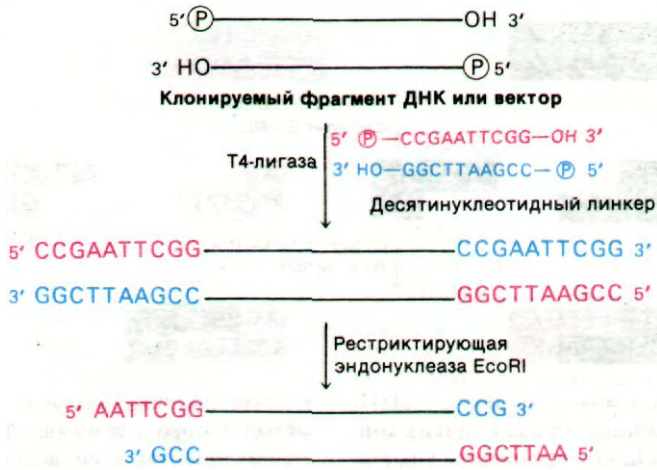


Рис. 31.21. Образование липких концов путем присоединения и расщепления химически синтезированного линкера.

ДНК сочетает преимущества метода липких концов с универсальным характером (dA—dT)-метода (коннекторного). К концам фрагмента ДНК или вектора ковалентно присоединяют *химически синтезированный линкер, т.е. связующую цепь* (длиной от шести до десяти пар оснований), чувствительный к расщеплению каким-либо ферментом рестрикции. 5'-концы десятинуклеотидного линкера и молекулы ДНК фосфорилируют полинуклеотидкиназой и соединяют лигазой фага Т4, которая может образовывать ковалентную связь между молекулами ДНК с тупыми концами. Если обработать эти концевые участки соответствующим ферментом рестрикции, образуются липкие концы (рис. 31.21). Таким образом, почти у любой молекулы ДНК можно вызвать образование липких концов, соответствующих специфичности данного фермента рестрикции.

31.10. Плазмиды и фаг лямбда - наиболее подходящие векторы для клонирования ДНК в бактериях

Для увеличения эффективности проникновения рекомбинантных ДНК в клетку и облегчения отбора содержащих такие молекулы бактерий создаются новые векторы. Например, плазмида pBR322 содержит гены устойчивости к тетрациклину и ампициллину (сходный с пенициллином антибиотик). Эту плазмиду пять различных рестриктаз расщепляют в каком-то одном определенном месте каждая (рис. 31.22). Введение ДНК в участок рестрикции EcoR1 не затрагивает генов устойчивости к антибиотикам. В то же время введение ДНК в участки рестрикции HindIII, SalI или BamHI приводит к инактивации гена устойчивости к тетрациклину; это явление называется *инактивацией вставкой (инсерционной инактивацией).* Клетки, содержащие pBR322 со вставленной ДНК, устойчивы к ампициллину, но чувствительны к тетрациклину; поэтому их легко отобрать. Клетки, которые не смогли воспринять ДНК вектора, чувствительны к обоим антибиотикам, а клетки, содержащие pBR322 без вставки ДНК, к обоим антибиотикам устойчивы.

Другая группа векторов создана на основе плазмиды ColE1, кодирующей колицин Е - белковый токсин, убивающий некоторые штаммы *E. coli.* Преимущество использования этих *колициногенных плазмид* в качестве

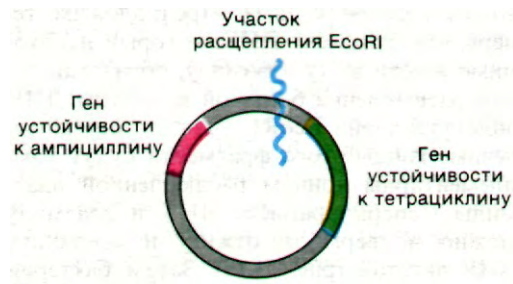


Рис. 31.22. Генетическая карта плазмиды pBR322, несущей два гена устойчивости к антибиотикам.

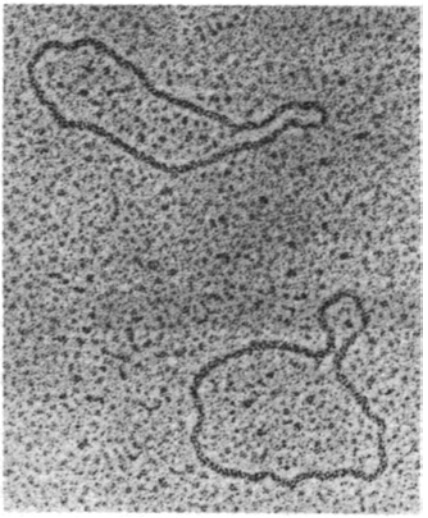


Рис. 31.23. Электронная микрофотография плазмид ColE1. (Печатается с любезного разрешения д-ра Jack Griffith.)

векторов состоит в том , что их репликация не находится под строгим контролем. В клетке, содержащей ColE1, обычно имеется 25 копий плазмиды. Обработка клеток хлорамфениколом блокирует синтез белка и репликацию клеточной хромосомы. Однако репликация ColE1 в этих условиях продолжается. В результате в клетках, обработанных хлорамфениколом, может накапливаться 1000 копий ColE1, так что количество этой плазмиды достигает примерно половины всей клеточной ДНК[1].

Фаг λ - другой удобный вектор. Большие участки его ДНК, имеющей в длину 48 kb, не являются необходимыми для литической инфекции или интеграции и могут быть замещены чужеродной ДНК. Были сконструированы мутантные фаги λ, предназначенные для клонирования ДНК. Один из этих мутантов, который называется λgt = λ, содержит два участка расщепления EcoR1 вместо пяти, имеющихся в фаге дикого типа (рис. 31.24). После расщепления центральный участок молекулы ДНК этого фага λ можно удалить. Два оставшихся куска ДНК составляют вместе 72% длины всего генома. Это количество ДНК недостаточно для упаковки в головку фага λ. Длина ДНК, которая может быть легко упакована в головку, достигает 75-105% длины генома дикого типа. Однако *достаточно длинный фрагмент ДНК (скажем, длиной 10* kb*), вставленный между двумя концами ДНК фага λ, позволяет такой рекомбинантной молекуле ДНК (93% генома) быть упакованной в головке (инкапсидироваться).* Почти все инфекционные частицы λ, образованные таким способом, будут содержать вставленный кусок чужеродной ДНК. Еще одно преимущество использования этих вирионов в качестве векторов состоит в том, что они проникают в бактерии с гораздо более высокой эффективностью, чем плазмиды. К настоящему времени разработаны методы упаковки молекул ДНК *in vitro* с образованием инфекционных вирионов λ. Для использования в качестве векторов были сконструированы самые разнообразные мутанты фага λ. Некоторые из них могут служить векторами для вставок фрагментов ДНК, достигающих 40 kb.

31.11. Из суммарной геномной ДНК, расщепленной рестриктирующими эндонуклеазами, можно выделить с помощью клонирования определенные эукариотические гены

Как уже говорилось в предыдущей главе, исследование эукариотических геномов представляет огромные трудности. Ген длиной 1 kb составляет $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ генома *E. coli* и всего лишь $3{,}4 \cdot 10^{-7}$ генома млекопитающих. Методы рекомбинантных ДНК позволяют в настоящее время вводить эукариотический ген в *E. coli,* что сильно упрощает задачу. Эксперимент начинается с частичного расщепления ДНК эукариотического генома, чтобы получить случайные фрагменты со средней длиной примерно 20 kb (рис. 31.25). К концам этих фрагментов присоединяют синтетические линкеры, образуют липкие концы и затем присоединяют к какому-нибудь вектору, например к ДНК фага λ. При упаковке ДНК в вирионы *in vitro* происходит отбор рекомбинантных молекул ДНК, содержащих большие вставки. Затем этими рекомбинантными фагами заражают клетки *E. coli.* Получается лизат, содержащий фрагменты эукариотической ДНК, заключенной в фаги и размноженной примерно в миллион раз. Этот лизат представляет собой *би-*

[1] Плазмида pBR322 создана на основе ColE1, поэтому она обладает способностью точно так же накапливаться в клетках в присутствии хлорамфеникола.- *Прим. перев.*

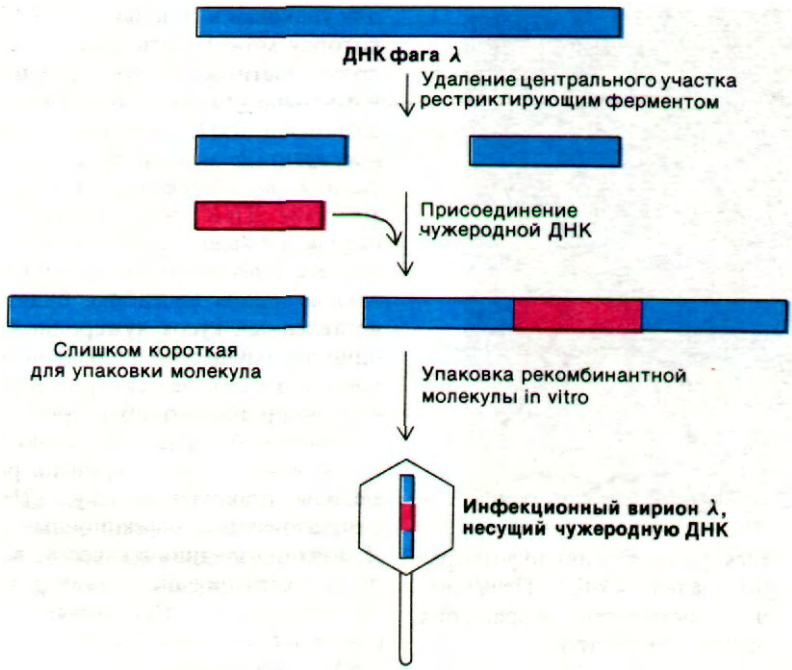


Рис. 31.24. В качестве вектора для клонирования может быть использован мутант фага λ. В ходе реакции упаковки фага происходит отбор молекул ДНК, содержащих вставку.

блиотеку клонированной эукариотической ДНК.

Затем в такой библиотеке можно провести отбор для идентификации фаговых клонов, содержащих нужный эукариотический ген. Вычисление показывает, что лишь один из 180000 клонов будет содержать уникальный эукариотический ген. Поэтому необходима очень быстрая и эффективная процедура отбора. Она основана на гибридизации. *Присутствие определенной последовательности ДНК в одной бляшке фага λ можно выявить с помощью радиоактивной молекулы комплементарной ДНК или РНК в качестве гибридизационной пробы. Связывание этой пробы можно обнаружить методом радиоавтографии.* Таким образом, можно проверить 1 млн. клонов за один день. Итак, клон, соответствующий определенному эукариотическому гену, можно легко идентифицировать и выделить при условии, что имеется транскрибированная с него РНК в более или менее чистом виде.

31.12. Эукариотические гены могут транскрибироваться в бактериальных клетках

Рекомбинантные молекулы ДНК, содержащие бактериальные гены, часто экспрессируются в клетках *E. coli.* Например, клонирование триптофанового оперона *E. coli* в составе плазмидного вектора ColE1 приводит к образованию больших количеств пяти биосинтетических ферментов, закодированных в этом опероне. Количество этих ферментов примерно в 20 раз выше, чем в обычной клетке *E. coli,* так как рекомбинантная плазмида представлена многими копиями. ДНК дрожжей, простого эукариотического организма, также может экспрессироваться в бактериях. В одном исследовании в качестве клетки-хозяина использовали мутант *E. coli,* нуждающийся в гистидине, так как он не содержал имидазолглицеролфосфат-дегидрогеназы. При заражении этого мутанта фагом λ, содержащим фрагмент дрожжевой ДНК, появилось несколько бактериальных клонов, которые уже не нуждались в экзогенном гистидине. Вставленный кусок дрожжевой ДНК нес недостающий ген, который экспрессировался с помощью механизмов транскрипции и трансляции бактериальной клетки.

Могут ли гены млекопитающих экспрессироваться в бактериях? Для ответа на этот вопрос в клетки *E. coli* ввели ген инсулина крысы (рис. 31.26). Отправной точкой этого

кДНК - комплементарная ДНК, синтезированная обратной транскриптазой на РНК-матрице.

исследования послужила инсулинома - опухоль поджелудочной железы, выделяющая большое количество инсулина. Эта опухоль богата мРНК препроинсулина, предшественника активного гормона (разд. 35.9). С помощью обратной транскрипции этой мРНК была получена двухцепочечная комплементарная ДНК (кДНК), а затем ее включили в плазмидный вектор. Почему именно кДНК, а не геномную ДНК ввели в *E. coli*? Как мы уже говорили, многие эукариотические гены содержат вставочные последовательности, которые вырезаются из первичных транскриптов (разд. 29.16). Поскольку бактерии, по всей вероятности, не способны удалять эти последовательности, представляется желательным трансформировать их участком ДНК, комплементарным зрелой мРНК. Действительно, оказалось, что несколько бактериальных клонов, трансформированных инсулиновой кДНК, синтезируют небольшое количество предшественника инсулина (около 100 копий на клетку). Недавно был получен еще один важный результат: последовательность ДНК, кодирующая овальбумин куриного яйца, экспрессируется в клетках *E. coli*. Около 1,5% белка, синтезированного в таких трансформированных бактериях, представляет собой полные молекулы овальбумина (масса 43 кДа). *Очевидно, гены эукариотических белков могут экспрессироваться в бактериях.*

31.13. Химически синтезированный ген пептидного гормона соматостатина экспрессируется в клетках E. coli

Последние достижения в химическом синтезе заданных последовательностей ДНК расширили масштаб и возможности метода рекомбинантных ДНК. Можно синтезировать de novo гены с практически любой нуклеотидной последовательностью и вставить их в вектор для введения в *E. coli*. Прекрасным примером такого подхода служит синтез гена *соматостатина* - 14-членного пептида (рис. 31.27), который обнаруживается в экстрактах гипоталамуса. Соматостатин подавляет секрецию гормона роста, инсулина и глюкагона. Молекулу ДНК, кодирующую этот пептид, синтезировали путем соединения восьми олигонуклеотидных блоков. Этот ген соединили с геном β-галактозидазы, локализованном в плазмидном векторе. При трансформации *E.coli* начался синтез гибридного белка, в котором соматостатин был присоединен к β-галактозидазе. Пептидную связь между этими двумя компонентами расщепляли *in vitro* с помощью бромциана (разд. 2.7). Для этого встроенный ген содержал кодон метиони-

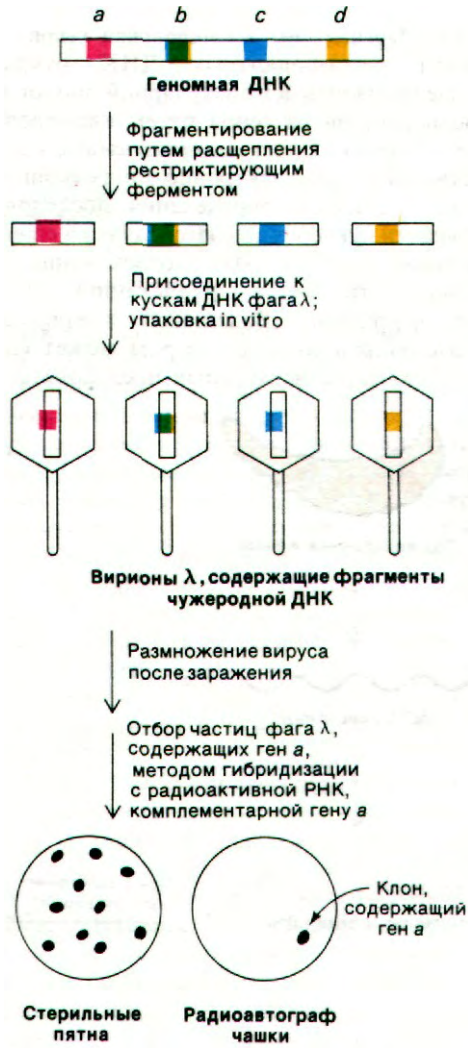


Рис. 31.25. Стратегия клонирования определенного эукариотического гена, начиная с расщепления суммарной геномной ДНК.

на перед первым кодоном соматостатина. С-конец соматостатина был свободен, так как после кодона последнего остатка пептида были расположены два стоп-кодона (рис. 31.27). На долю химерного белка приходилась значительная часть клеточного белка (около 3%). Более того, полученный таким способом соматостатин обладал биологической активностью. *Следовательно, клонированием химически синтезированного гена можно получать функционально активный полипептид.*

31.14. Перспективы клонирования генов

Метод рекомбинантных ДНК открыл новые горизонты в молекулярной биологии. Увеличение числа генов путем клонирования в бактериях дает неограниченные количества ДНК для электронно-микроскопического анализа и определения последовательности нуклеотидов. Исследуются специфические участки ДНК, отвечающие за подвижность генов, репликацию ДНК и транскрипцию. Возникают совершенно новые направления; примером может служить открытие вставочных последовательностей во многих эукариотических генах. Появилась возможность быстро картировать сложные хромосомы и разделять их на отдельные элементы, которые поддаются различным манипуляциям. Темпы исследований постоянно нарастают. Кроме того, клонирование генов становится важным способом получения определенных белков в больших количествах. Например, с помощью рекомбинантных молекул можно увеличить в 500 раз количество ДНК-лигазы, образующейся в клетках *E. coli.* Наиболее многообещающим представляется синтез пептидов и белков эукариот трансформированными бактериями. В недалеком будущем такие гормоны, как инсулин, и такие противовирусные агенты, как интерферон, будут продуцироваться бактериями[1]. В фармакологии начинается новая эра, которая, по-видимому, окажет глубокое воздействие на медицину. Исследуются также возможности клонирования генов для увеличения сельскохозяйственного производства. Эукариотические гены вводят в настоящее время не только в бактерии, но и в эукариотические клетки. Например, вирус SV-40 был использован в качестве вектора для переноса гена глобина кролика в клетки почек обезьяны. Такие зараженные клетки синтезировали значительные количества β-глобина кролика. Этот экспериментальный подход является многообещающим методом расшифровки регуляторных механизмов экспрессии эукариотических генов.

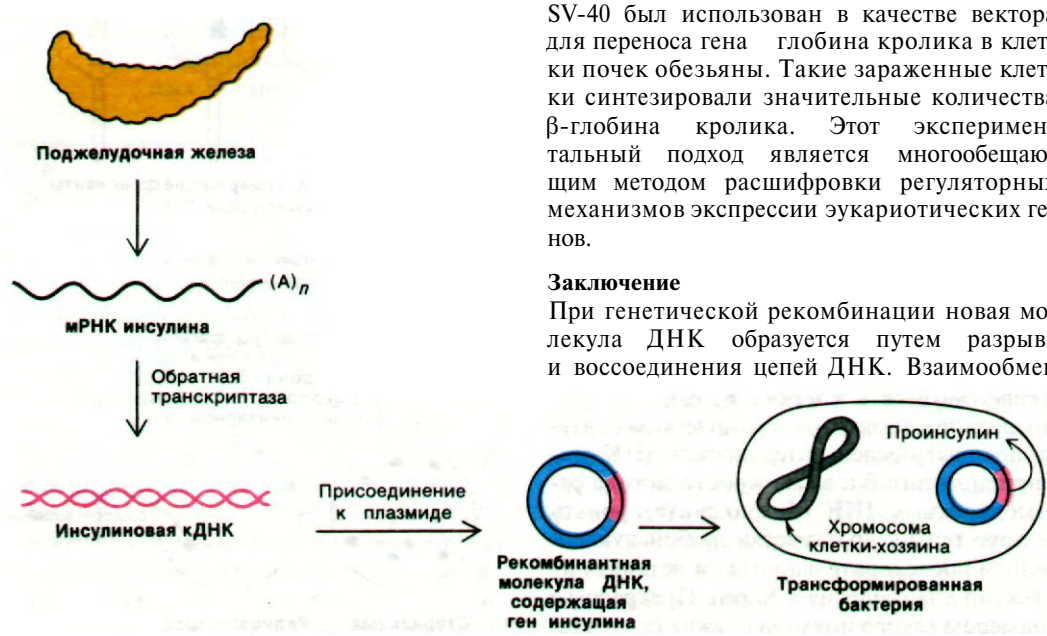


Рис. 31.26. Синтез предшественника инсулина - проинсулина в трансформированных клетках *E. coli.*

Заключение

При генетической рекомбинации новая молекула ДНК образуется путем разрыва и воссоединения цепей ДНК. Взаимообмен может произойти между любой парой гомологичных последовательностей родительских молекул ДНК, и потому этот процес называется общей генетической рекомбинацией. У *E. coli* общая рекомбинация осу-

[1] В Англии и США уже продается инсулин, синтезированный клетками бактерий.- *Прим. перев.*

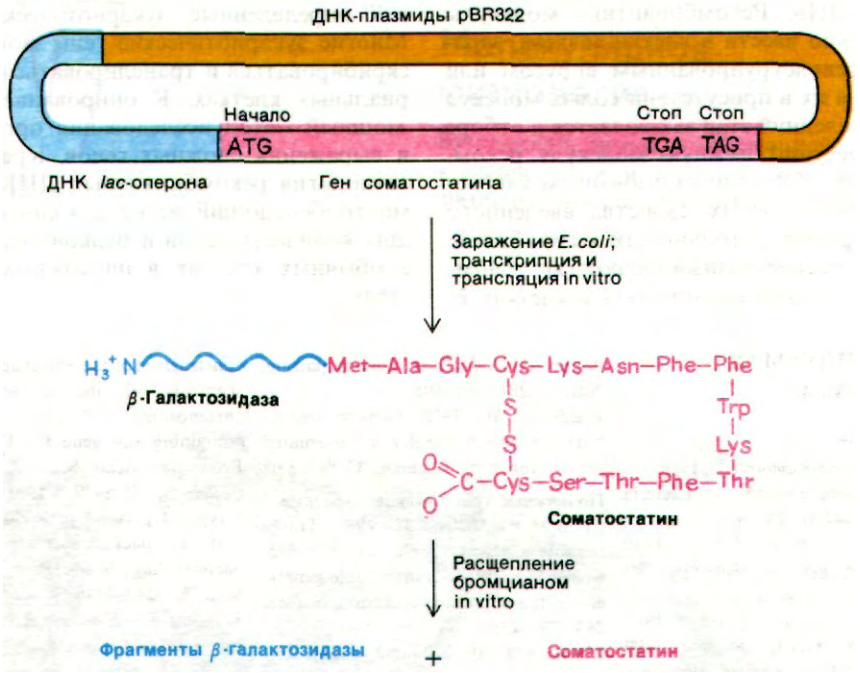


Рис. 31.27. Синтез пептидного гормона соматостатина клетками *E.coli,* трансформированными химически синтезированным геном.

ществляется под действием генов *rec*. Белок recBC - нуклеаза; она образует одноцепочечную ДНК, которая может внедряться в двухцепочечную молекулу ДНК. Эта реакция связывания одноцепочечной молекулы катализируется белком recA, который одновременно гидролизует ATP.

В генетических перестройках негомологичных локусов участвуют подвижные генетические элементы, называемые транспозонами (элементы, способные к переносу-транспозиции). Плазмиды (небольшие кольцевые двухцепочечные ДНК) - важный класс подвижных генетических элементов. Эти дополнительные хромосомы несут гены, отвечающие за инактивацию антибиотиков, метаболизм природных соединений и образование токсинов. Плазмиды могут реплицироваться автономно или интегрировать с хромосомой клетки-хозяина. Фактор F (фактор плодовитости) - плазмида, сообщающая бактериям способность передавать гены другим бактериям путем коньюгации. Для коньюгации необходим непосредственный физический контакт между донорной (F^+) и реципиентной (F^-) клетками. Плазмиды факторы R обеспечивают устойчивость к антибиотикам. Более крупные из этих плазмид содержат фактор переноса устойчивости (RTF), обусловливающий переход плазмиды в другую бактерию при коньюгации. Некоторые гены, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам, могут быть сцеплены с областью RTF. Поэтому множественная устойчивость к лекарственным средствам может быть трансмиссивной. Транспозоны обладают высокой подвижностью, так как они обрамлены IS-элементами. Эти концевые последовательности направляют действие белков, участвующих в их интеграции с ДНК. Транспозон не обязательно гомологичен реципиентной ДНК.

В лаборатории можно создать новые сочетания неродственных генов и клонировать их в клетках-хозяевах. Прежде всего синтезируется рекомбинантная молекула ДНК путем соединения какого-либо фрагмента ДНК с ДНК вектора, который может автономно реплицироваться в подходящем хозяине. Наиболее подходящие векторы - фаг лямбда, вирус SV-40 и плазмиды. Ферменты рестрикции и ДНК-лигаза - основные инструменты для получения новых молекул ДНК. Липкие концы, гомополимерные концевые фрагменты и химически синтезированные линкеры - три способа соединения

молекул ДНК. Рекомбинантные молекулы ДНК можно ввести в клетки-хозяева, заражая их реконструированным вирусом или инкубируя их в присутствии голых молекул ДНК. Последний этап заключается в отборе клеток, несущих нужную молекулу рекомбинантной ДНК, с использованием какого-либо отличительного свойства введенного гена (например, устойчивости к антибиотику). Имея рестриктазный гидролизат геномной ДНК, можно клонировать в клетках *E. coli* определенные эукариотические гены. Многие эукариотические гены могут транскрибироваться и транслироваться в бактериальных клетках. Клонирование генов — мощный метод исследования организации и выражения сложных генов. Кроме того, технология рекомбинантных ДНК - весьма многообещающий метод для синтеза больших количеств генов и белков, имеющихся в обычных клетках в ничтожных количествах.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Gilbert W., Villa-Komaroff L., 1980. Useful proteins from recombinant bacteria, Sci. Amer., **242(4),** 74-94.

Cohen S.N., Shapiro J.A., 1980. Transposable genetic elements, Sci. Amer., 242(2), 40-49.

Abelson J., Butz E. (*eds.*), 1980. Recombinant DNA, Science, 209, 1317-1438. (Этот весьма содержательный выпуск журнала Science содержит много прекрасных статей, посвященных структуре и изменениям генов эукариот и экспрессии клонированных генов.)

*Clowes R.*C., 1973. The molecule of infectious drug resistance, Sci. Amer., 228(4), 18-27.

Cohen S.N., 1975. The manipulation of genes, Sci, Amer., 233(l), 24-33. (Эта и некоторые другие статьи, посвященные той же проблеме, помещены в книге Freifelder D. (ed.), Recombinant DNA, Freeman, 1978.)

Stanier R.Y., Adelberg E.A., Ingraham J.L., 1976. The Microbial World (4 th ed.), Prentice-Hall. (Особенно удачна гл. 15, посвященная рекомбинации, конъюгации и трансдукции.)

Генетическая рекомбинация

Stahl F.W., 1979. Genetic Recombination, Freeman.

Potter H., Dressler D., 1978. In vitro system from *Escherichia coli* that catalyzes generalized genetic recombination, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 3698-3702.

McEntee K., Weinstock G.M., Lehman I.R., 1979. Initiation of general recombination catalyzed in vitro by the recA protein of *E. coli,* Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 2615-2619.

Cunningham R.P., Shibata T., Gas-Gupta C., Radding C.M., 1979. Single strands induce recA protein to unwind duplex DNA for homologous pairing, Nature, 281, 191-195.

Radding C.M., 1978. Genetic recombination: strand transfer and mismatch repair, Ann. Rev. Biochem., 47, 847-880.

Подвижные генетические элементы

Calos M.P., Miller J.H., 1980. Transposable elements, Cell, 20, 579-595.

Cohen S.N., 1976. Transposable genetic elements and plasmid evolution, Nature, 263, 731-738.

Kleckner N.. 1977. Translocatable elements in procaryotes, Cell, **11,** 11-23.

Hicks J., Strathern J.N., Klar A.J.S., 1979. Transposable mating type genes in *Saccharomyces cerevisiae, Nature,* 282, 478-483.

Gill R.E., Heffron F.. Falkow S., 1979. Identification of the protein encoded by the transposable element Tn3 which is required for its transposition, Nature, 282, 797-801.

Chou J., Lemaux P.G.,Casadaban M.J., Cohen S.N.. 1979. Transposition protein of Tn3: identification and characterisation of an essential represser-controlled gene product, Nature, 282, 801-806.

Bukhari A.I., Shapiro J.A., Adhya S.L. (*eds.*), 1977. DNA Insertion Elements and Episomes, Cold Spring Harbor Laboratory.

Broda P., 1979. Plasmids, Freeman. [Брода П. Плазмиды.- М.: Мир, 1982.]

Конструирование и клонирование рекомбинантных генов

Setlow J.K., Hollaender A. (*eds.*), 1979. Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum.

Scott W.A., Werner R., 1977. Molecular Cloning of Recombinant DNA, Academic Press.

Helinski D.R., 1978. Plasmids as vehicles for gene cloning: impact on basic and applied research, Trends Biochem. Sci., 3, 10-14.

Cameron J.R., Panesenko S.M., Lehman I.R., Davis *R.W.,* 1975. In vivo construction of bacteriophage λ carrying segments of the *Escherichia coli* chromosome: selection of hybrids containing the gene for DNA ligase, Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 3416-3420.

Collins J., Hohn B., 1978. Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packadeable in vitro in bacteriophage heads, Proc. Nat. Acad. Sci, 75, 4242-4246.

Maniatis T., Hardison R.C., Lacy E., Lauer J., O'Connell C., Quon D., Sim G.K., Efstratiadis A., 1978. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA, Cell, **15,** 687-701.

Экспрессия клонированных генов

Villa-Komaroff L, Efstratiadis A., Broome S., Lomedico P., Tizard R., Naber S.P., Chick W.L., Gilbert W., 1978. A bacterial clone synthesizing proinsulin, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 3727-3731.

Burrell C.J., Mackory P., Greenaway P.J., Hofschneider P.H., Murray K., 1979. Expression in *Escherichia coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR322, Nature, 279, 43-47.

Mulligan R.C., Howard B.H., Berg P., 1979. Synthesis of rabbit β-globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 β-globin recombinant genome, Nature, 277, 108-114.

Химический синтез генов

Khorana H.G., 1979. Total synthesis of a gene, Science, 203, 614-625.

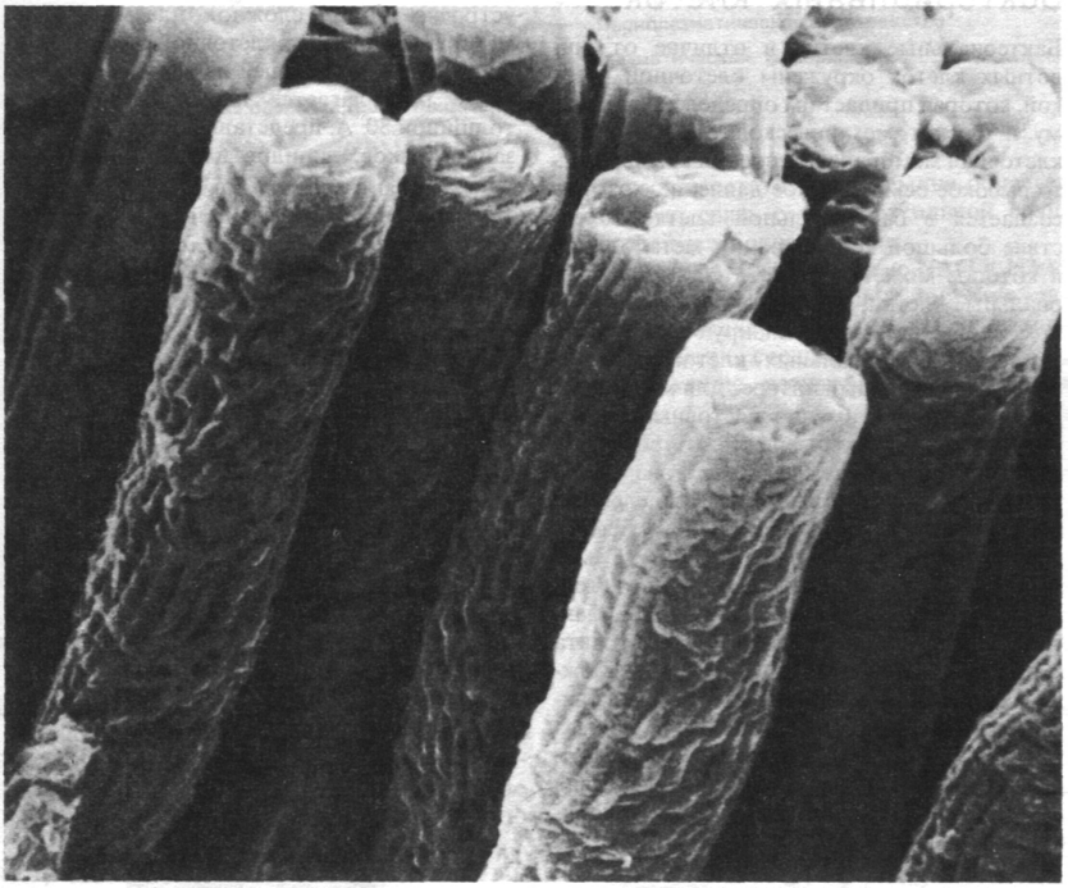
Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A.D., Heyneker H.L, Bolivar F., Boyer H.W., 1977. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin, Science, 198, 1056-1063.

Crea R., Kraszewski A., Hirose T., Itakura K., 1978. Chemical synthesis of genes for human insulin, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 5765-5769.

Часть V

Молекулярная физиология

Взаимосвязь между информацией, конформацией и метаболизмом в физиологических условиях



Микрофотография палочек сетчатки, полученная с помощью сканирующего микроскопа. Для возбуждения палочки достаточно одного фотона. (Печатается с любезного разрешения д-ра Deric Bownds.)

ГЛАВА 32
Оболочки бактериальных клеток

Бактериальные клетки в отличие от животных клеток окружены клеточной стенкой, которая придает им определенную форму и служит механической опорой. Одна клеточная мембрана не способна выдержать то высокое осмотическое давление, которое создается в бактериальной клетке вследствие большой концентрации метаболитов и которое может достигать 20 атм. Бактериальные клетки, лишенные клеточных стенок, в обычной среде лизируются.

Стенки бактериальных клеток представляют значительный интерес для медицины. Дело в том, что именно клеточные стенки и связанные с ними вещества определяют *вирулентность бактерий*. Так, введением экспериментальным животным выделенных бактериальных клеточных стенок удается воспроизвести симптомы многих микробных заболеваний. На клеточных стенках находятся *специфические антигены* бактерий. Введением животному экстракта клеточных стенок некоторых бактерий можно выработать у него иммунитет к этим бактериям. Наконец, при подавлении синтеза клеточных стенок бактерии погибают. Именно на этом основан механизм действия *пенициллина* и некоторых других антибиотиков.

Уже более полувека бактерии классифицируют на грам-положительные и грам-отрицательные в зависимости от их реакции на окраску по Граму. Основа этого эмпирически найденного различия стала теперь понятной. Указанные классы бактерий различаются по типу клеточной оболочки (рис. 32.2). Плазматическая мембрана *грам-положительных бактерий* окружена массивной клеточной стенкой толщиной, как правило, 250 А, состоящей из пептидогликана и тейхоевой кислоты. У *грам-отрицательных бактерий* клеточная оболочка устроена более сложно: плазматическая мембрана окружена клеточной стенкой толщиной 30 А, состоящей из пептидогликана; далее располагается наружная мембрана толщиной 80 А, представляющая собой мозаику белков, липидов и липополисахаридов.

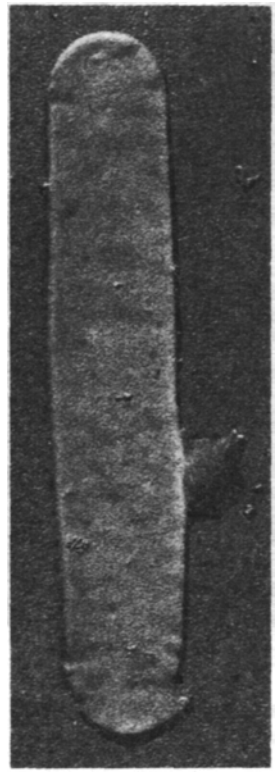


Рис. 32.1. Электронная микрофотография выделенной клеточной стенки *Bacillus licheniformis*. (Печатается с любезного разрешения д-ра Nathan Sharon.)

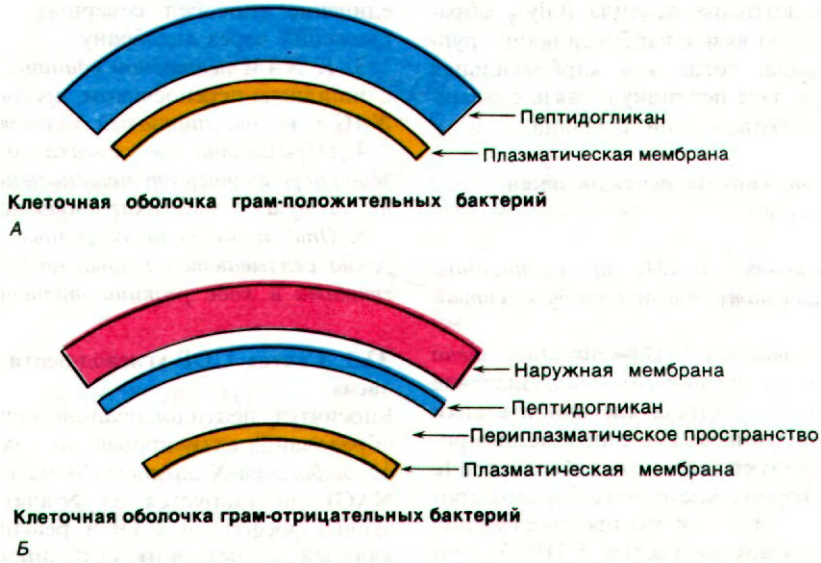


Рис. 32.2. Схематическое изображение клеточных оболочек грам-положительных (*А*) и грам-отрицательных (*Б*) бактерий.

32.1. Клеточная стенка - это огромная мешковидная макромолекула

Рассмотрим структуру и биосинтез клеточной стенки *Staphylococcus aureus* - грам-положительной бактерии, вызывающей гнойные процессы в таких тканях, как кожа, кости и легкие. Макромолекула, образующая клеточную стенку этой бактерии, называется *пептидогликаном,* поскольку она состоит из пептидных и углеводных единиц. В пептидогликане *линейные полисахаридные цепи поперечно сшиты короткими пептидами.* Благодаря обилию поперечных сшивок возникает одна огромная мешковидная макромолекула. В выделенном состоянии клеточные стенки сохраняют свою исходную форму (т.е. форму той бактерии, которую они окружали).

В состав пептидогликана входят три повторяющиеся единицы (рис. 32.3): 1) *дисахарид* N-ацетилглюкозамина (NAG) и N-ацетилмурамовой кислоты (NAM), соединенных β-1,4-гликозидной связью; 2) *тетрапептид из* L-аланина, D-глутамина, L-лизина, и D-аланина; 3) *пентаглициновый пептидный мостик.* Тетрапептид представляет собой совершенно необычное соединение в двух отношениях: в нем содержатся D-аминокислоты, никогда не встречающиеся в белках, и, кроме того, входящий в его состав остаток D-глутамина образует пептидную связь с γ-карбоксильной группой своей же боковой цепи.

В интактном протеогликане NAG и NAM чередуются последовательно, образуя линейную полисахаридную цепь. Пентаглициновый пептид соединяет остатки NAM, принадлежащие разным полисахаридным

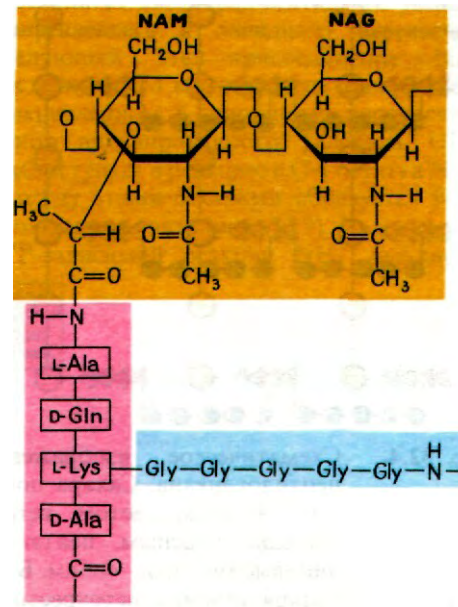


Рис. 32.3. Основное структурное звено пептидогликана из *Staphylococcus aureus.*

цепям. Аминогруппа пептида $(Gly)_5$ образует пептидную вязь с карбоксильной группой D-аланина, тогда как карбоксильная группа $(Cly)_5$ дает пептидную связь с ε-аминогруппой боковой цепи L-лизина.

32.2. Стадии синтеза пептидогликана

Синтез пептидогликана происходит в пять стадий.

1. *На остатке NAM, присоединенном к уридиндифосфату, выстраивается пептидное звено.*

2. *Образовавшееся NAM-пептидное звено переносится на липид-переносчик.* Значение этой стадии для синтеза клеточной стенки состоит в следующем. Конечный полимеризованный продукт расположен вне клетки (с наружной стороны клеточного барьера проницаемости), тогда как его предшественник синтезируется внутри клетки. UDP, будучи соединением полярным, не проникает сквозь клеточную мембрану. Липидный же переносчик как совершенно неполярное соединение способен совершать челночные движения через мембрану.

3. *К NAM-пептидной единице,* связанной с липидным переносчиком, *присоединяются NAG и пентаглициновый мостик.*

4. *Образовавшееся дисахарид-пептидное звено переносится от липидного переносчика на растущую полисахаридную цепь.*

5. *Отдельные полисахаридные цепи поперечно связываются пентаглициновыми мостиками в ходе реакции транспептидации.*

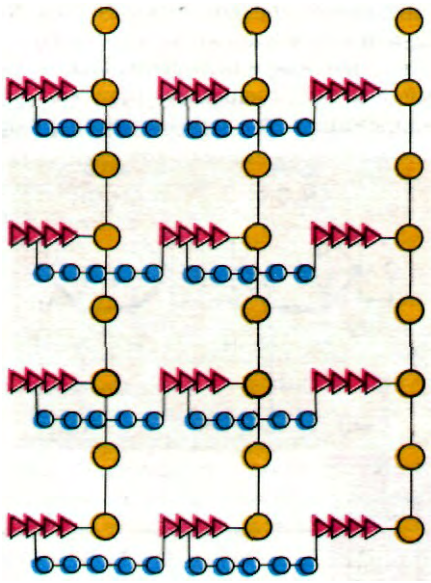


Рис. 32.4. Схематическое изображение пептидогликана. Сахара показаны желтым цветом, тетрапептиды - красным, пентаглициновые мостики синим. Благодаря обилию перекрестных сшивок клеточная стенка представляет собой одну огромную мешковидную макромолекулу.

32.3. Синтез UDP-углевод-пептидного звена

Биосинтез пептидогликанов начинается с образования активированных сахаров. *Уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамин* (UDP-NAG) синтезируется из N-ацетилглюкозамин-1-фосфата и UTP в реакции, протекающей за счет гидролиза пирофосфатной связи (рис. 32.5). Уридиндифосфат-N-ацетилмурамовая кислота (UDP-NAM) образуется из UDP-NAG и фосфоенолпирувата (рис. 32.6).

Рост *пептидной цепи* начинается с образования пептидной связи между аминогруппой L-аланина и карбоксильной группой остатка N-ацетилмурамовой кислоты в UDP-NAM. Далее последовательно присоединяются D-глутамат, L-ЛИЗИН и дипептид D-аланил-D-аланин (рис. 32.7). D-аминокислоты образуются из соответствующих L-изомеров под действием *рацемаз,* содержащих в качестве простетической группы пиридоксальфосфат. Образование каждой из этих пептидных связей протекает за счет энергии ATP. Подчеркнем, что *синтез в данном случае осуществляется не по обычному механизму синтеза белков на рибосомах, а специальными ферментами.* Следовательно, информация относительно последовательности аминокислот определяется только специфичностью ферментов, а не нуклеотидной последовательностью информационной РНК. Пептид такого рода не мог бы быть синтезирован обычным путем на рибосомах, поскольку он включает D-аминокислоты и γ-пептидную связь.

32.4. Перенос углевод-пептидного звена на липидный переносчик

На следующем этапе происходит перенос активированного углевод-пептидного звена от UDP на *липидный переносчик* (рис. 32.8). Последний представляет собой длиннонепочечный спирт, содержащий 11 изопреновых

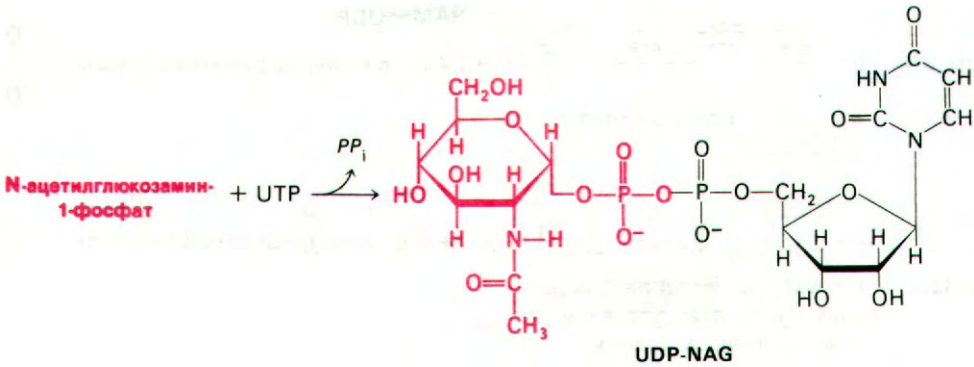


Рис. 32.5. Синтез UDP-NAG.

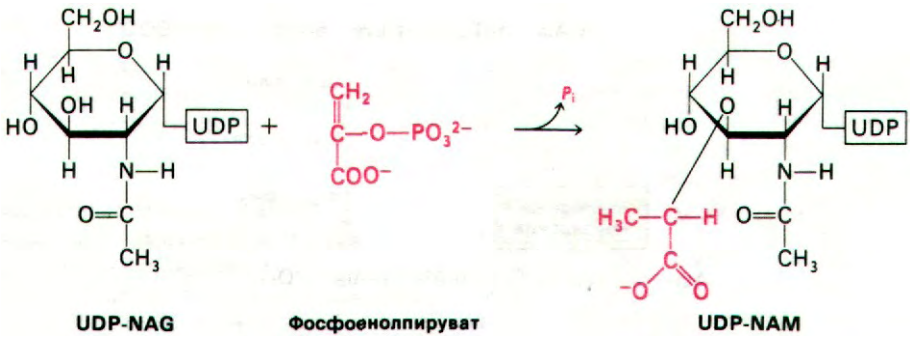
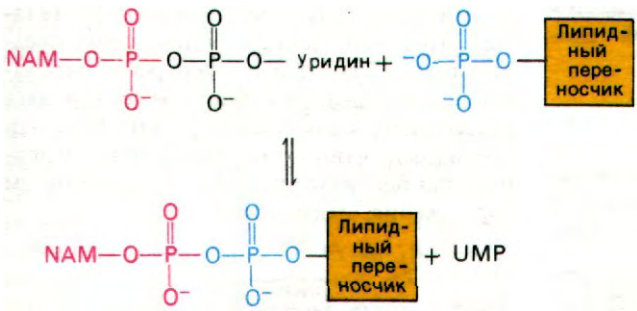


Рис. 32.6. Синтез UDP-NAM.

единиц и потому высокогидрофобный в отличие от UDP. По-видимому, именно благодаря гидробофному характеру этого C_{55}-липида новообразованное углевод-пептидное звено преодолевает барьер проницаемости, которым служит клеточная мембрана.



Вспомним, что другой высокогидрофобный переносчик - долихолфосфат - участвует в синтезе олигосахаридов, составляющих сердцевину (олигосахаридного «ядра») гликопротеинов у эукариот (разд. 29.31).

32.5. Синтез дисахарид-пептидного звена, прикрепленного к липидному переносчику

Следующий этап - присоединение NAG к остатку NAM в углевод-пептидном звене, прикрепленном к липидному переносчику. Донор активированного углевода UDP-NAG вступает в реакцию с C-4 остатка NAM и между этими сахарами образуется β-1,4-гликозидная связь (рис. 32.9). Далее в ходе АТР-зависимой реакции NH_4^+ амидирует свободную α-карбоксильную группу D-глутаминовой кислоты в пептиде. Вслед заэтим на ε-аминогруппе остатка лизина в пептиде выстраивается *пентаглициновый мостик.*

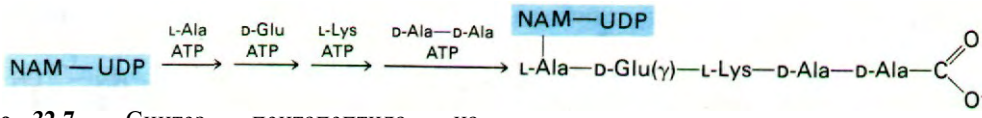


Рис. 32.7. Синтез пентапептида на UDP-NAM.

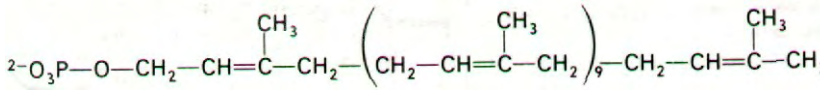


Рис. 32.8. Структура липидного переносчика, участвующего в биосинтезе клеточных стенок.

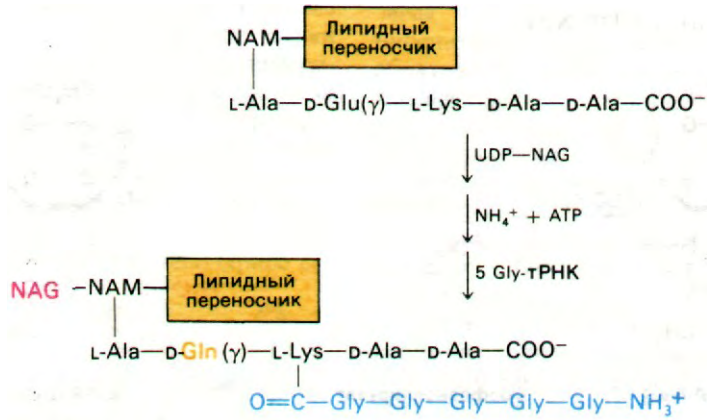


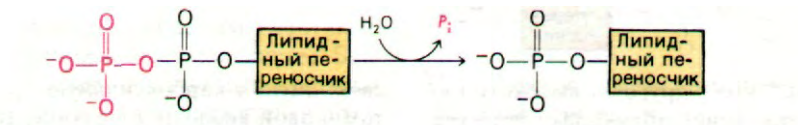
Рис. 32.9. Синтез дисахарид-пептидного звена на липидном переносчике.

Этот пентапептид синтезируется путем *последовательного присоединения глициновых остатков, доставляемых глицил-тРНК*. Это единственный случай, когда тРНК служит донором аминокислот в ходе внерибосомного синтеза пептида. На этом завершается образование основной структурной единицы клеточной стенки.

32.6. Перенос дисахарид-пептидного звена на растущую полисахаридную цепь

Дисахарид-пептидное звено переносится липидным переносчиком на нередуцирующий конец растущей полисахаридной цепи. Реакция протекает таким ооразом. Атом углерода С-1 остатка NAM находится в активированном состоянии, поскольку он связан с липидным переносчиком пирофосфатной связью. Поэтому он вступает в реакцию с С-4 концевого остатка NAG растущей полисахаридной цепи, образуя в итоге β-1,4-гликозидную связь (рис. 32.10).

Липидный переносчик высвобождается в форме пирофосфата и далее гидролизуется до монофосфата специфической фосфатазой. Этот этап дефосфорилирования представляет собой, по существу, регенерирование переносчика, способного акцептировать углевод-пептидное звено от UDP. Известен пептидный антибиотик бацитрацин, ингибирующий биосинтез клеточных стенок путем торможения этого этапа:



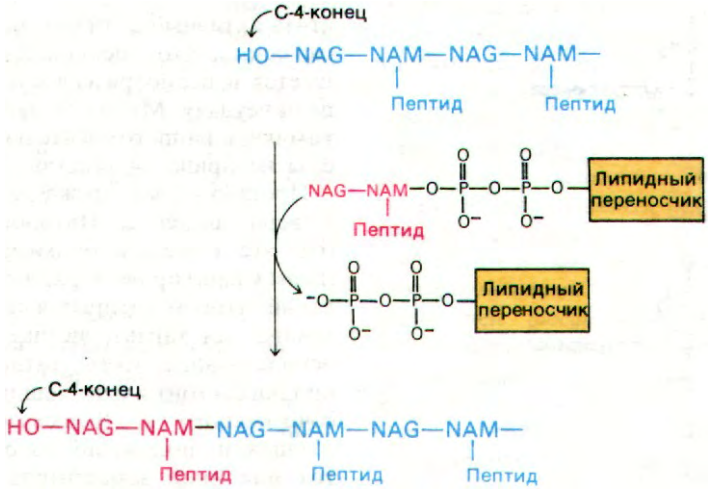


Рис. 32.10. Перенос дисахарид-пептидного звена на растущую полисахаридную цепь.

32.7. Поперечные мостики между полисахаридными цепями образуются в реакции транспептидирования

В результате реакции транспептидирования между полисахаридными цепями образуются поперечные сшивки, что приводит к формированию одной огромной молекулы, напоминающей по виду мешок. В ходе *транспептидирования концевая аминогруппа одного пентаглицинового мостика атакует пептидную связь между остатками D-Ala-D-Ala другой пептидной единицы* (рис. 32.11). При этом образуется пептидная связь между глицином и одним из остатков D-аланина, а второй остаток D-аланина высвобождается. Фермент, катализирующий эту реакцию, - *гликопептид-транспептидаза*. Обратите внимание, что синтез этой поперечной связи не требует расхода ATP: реакция идет за счет свободной энергии, уже содержащейся в связи D-Ala-D-Ala. Формирование пептидной связи таким необычным способом определяется, очевидно, тем, что реакция протекает вне клетки, т.е. в отсутствие ATP. Вспомните, что путем трансаминирования без использования ATP образуются пептидные связи при поперечной сшивке нитей фибрина (разд. 8.21).

32.8. У грам-положительных бактерий пептидогликан покрыт тейхоевой кислотой

Поверхность грам-положительных бактерий состоит из тейхоевой кислоты, которая представляет собой полимер остатков глицерола (или другого углевода, например рибитола), соединенных фосфодиэфирными мостиками (рис. 32.12). Свободные гидроксильные группы этерифицируются с аланином или сахарами, в частности с глюкозой. Тейхоевая кислота присоединяется к скелету пептидогликана - последовательности остатков NAG-NAM - фосфодиэфирной связью. Удлинение цепей тейхоевой кислоты происходит путем переноса глицерол-фосфата от CDP-глицерола на свободную концевую OH-группу цепи. Остатки глюкозы присоединяются к гидроксильным группам скелета тейхоевой кислоты в ходе реакции с UDP-глюкозой.

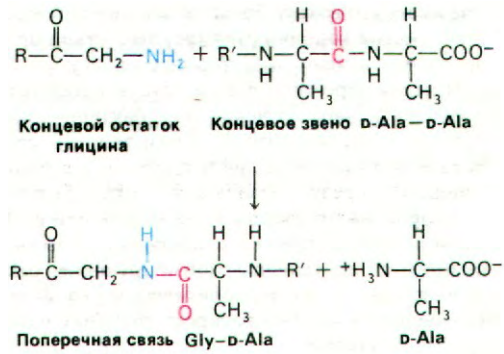


Рис. 32.11. Аминогруппа пентаглицинового мостика атакует пептидную связь между двумя остатками D-Ala; в результате формируется поперечная связь (сшивка).

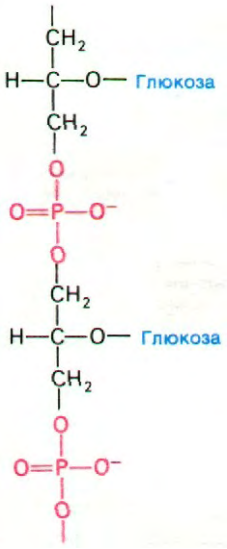


Рис. 32.12. Строение тейхоевой кислоты.

32.9. Пенициллин вызывает гибель растущих бактерий, ингибируя синтез клеточных стенок

Пенициллин был открыт в 1928 г. Александером Флемингом (Alexcander Fleming) довольно случайно.

При работе с различными штаммами стафилококка часть чашек с культурами откладывали в лабораторную коллекцию и время от времени просматривали. Поскольку, когда чашки просматривали, их приходилось открывать, в чашки неизбежно попадали из воздуха различные микроорганизмы. Обратили внимание на то, что вокруг большой колонии проросшей плесени колонии стафилококка стали прозрачными и явно подвергались лизису.

Плесень пересеяли и далее стали проводить предварительное изучение того бактериологического вещества, которое, очевидно, синтезировалось плесенью и диффундировало в окружающую среду. Оказалось, что бульон, в котором на протяжении 1-2 недель при комнатной температуре культивировали плесень, приобретал выраженные ннгибирующие, бактерицидные и бактериолитические свойства в отношении многих распространенных патогенных бактерий.

Далее было обнаружено, что экстракт из плесени *Pinicillium* при введении животным не оказывал заметного токсического действия. Это послужило стимулом для дальнейших исследований. Однако, когда Флеминг попытался сконцентрировать и очистить активный антибиотик, по его словам, оказалось, что «пенициллин легко разрушается, и, несмотря на все усилия, мы потерпели неудачу. Мы были бактериологи, а не химики, и наши относительно простые приемы не принесли успеха».

Прошло 10 лет, прежде чем к пенициллину вернулись снова. Патолог Хоуард Флори (Howard Florey) и биохимик Эрнст Чейн (Ernst Chain) провели ряд глубоких исследований, итогом которых явилось выделение, химическая характеристика и клиническое использование этого антибиотика. Пенициллин состоит из тиазолидинового кольца, сочлененного с β-*лактамным кольцом,* в одном из положений которого находится тот или иной заместитель (R), присоединенный с помощью пептидной связи. В *бензилпенициллине,* например, R является бензильной группой (рис. 32.13 и 32.14). Эта структура может подвергаться различным трансформациям, что служит причиной лабильности пенициллина, с которой впервые столкнулся Флеминг. Особенно неустойчиво β-лактамное кольцо. Как будет показано ниже, это свойство имеет прямое отношение к антибиотической активности пенициллина.

В 1957 г. Джошуа Ледерберг (Joshua Lederberg) показал, что бактерии, в обычных условиях чувствительные к пенициллину, могут расти в присутствии этого антибиотика, если используется гипертоническая среда. Выращенные таким образом микроорганизмы, так называемые *протопласты,* ли-

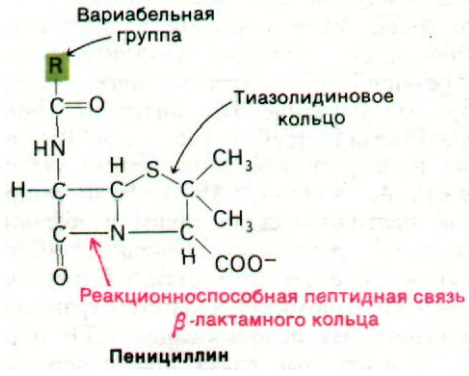
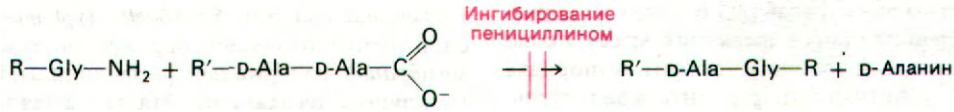


Рис. 32.13. Высокореакционноспособный участок пенициллина - пептидная связь β-лактамного кольца. В положении R могут стоять различные заместители (вариабельная группа); в бензилпенициллине R - бензильная группа.

шены клеточных стенок и потому при переносе в обычную среду подвергаются лизису. Отсюда был сделан вывод, что пенициллин препятствует синтезу клеточных стенок бактерий. В 1965 г. Джеймс Парк и Джек Стромингер (James Park, Jack Strominger) независимо друг от друга пришли к выводу, что пенициллин блокирует последний этап биосинтеза, а именно образование поперечных сшивок.

32.10. Пенициллин блокирует синтез клеточных стенок путем ингибирования реакции транспептидирования

Пенициллин ингибирует транспептидазу, поперечно сшивающую цепи протеогликана:



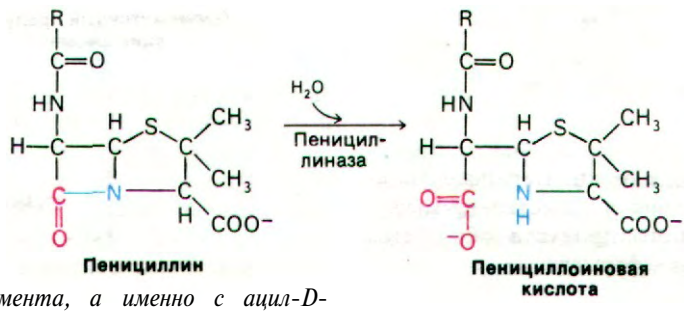
При нормальном течении реакции транспептидаза образует в качестве *промежуточного продукта ацильное производное* с остатком D-аланина в предпоследнем положении пептида (рис. 32.15). Этот промежуточный продукт взаимодействует далее с аминогруппой концевого глицина другого пептида. Как показали недавно проведенные исследования, пенициллин ингибирует транспептидазу путем образования ковалентной связи с остатком серина в активном центре фермента (рис. 32.16). *Комплекс пенициллиноил-фермент не подвергается деацилированию. В результате ингибирование транспептидазы пенициллином оказывается необратимым.*

Почему пенициллин является столь эффективным ингибитором транспептидазы? С помощью молекулярных моделей было выявлено, что *пенициллин сходен с одним из субстратов фермента, а именно с ацил-D-Ala-D-Ala* (рис. 32.17). Кроме того, четырехчленное β-лактамное кольцо пенициллина имеет напряженную конформацию, вследствие чего пептидная связь в нем становится высокореакционноспособной. В сущности, пенициллин имеет, по-видимому, структуру переходного состояния нормального субстрата этого фермента. Другими словами. пенициллин - аналог *переходного состояния.*

Любопытно сравнить пенициллин с другими необратимыми ингибиторами ферментов. Стабильный, неактивный *пенициллиноил-ферментный комплекс* совершенно аналогичен *фосфорил-ферментному комплексу,* образующемуся при взаимодействии органических фторфосфатов с ацетилхолинэстеразой или сериновыми протеиназами. Однако специфичность пенициллина намного выше, чем у фторфосфатных ингибиторов. Мишень действия пенициллина очень строго задана его структурным сходством с концевым участком D-Ala-D-Ala новообразующейся цепи пептидогликана. Следствием этой исключительной специфичности является низкая токсичность пенициллина, столь ценная при клиническом использовании. В организме человека нет ни одного фермента, распознающего D-Ala-D-Ala, а потому пенициллин не может помешать работе наших ферментов.

32.11. Некоторые бактерии резистентны к пенициллину, так как синтезируют разрушающий его фермент

Ряд бактерий синтезирует *пенициллиназу* - фермент, способный расщеплять амидную связь в β-лактамном кольце пенициллина с образованием пенициллоиновой кислоты, лишенной антибиотической активности:



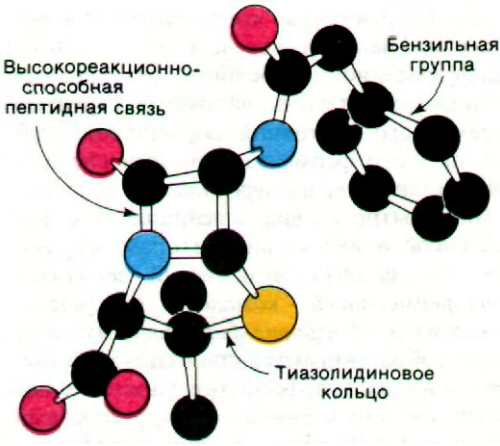


Рис. 32.14. Модель бензилпенициллина.

Был выделен целый ряд близких по структуре пенициллиназ, имеющих массу около 30 кДа и высокое число оборотов (порядка 10^3 $с^{-1}$). Активность фермента в значительной мере зависит от природы R-группы, присоединенной к β-лактамному кольцу пенициллина. Поэтому полусинтетические пенициллины с R-группами, защищающими их от действия пенициллиназы, представляют большую ценность для клинических целей.

Ген, кодирующий пенициллиназу, локализован в различных плазмидах (разд. 31.6). Эти внехромосомные генетические элементы у некоторых видов бактерий способны быстро появляться и исчезать. В ряде бактериальных штаммов пенициллиназа является индуцируемым ферментом. По-видимому, *пенициллиназа возникла в ходе эволюции как механизм детоксикации,* поскольку она свойственна только микроорганизмам, клеточная стенка которых образована пептидогликаном. Судя по тому, что утрата гена пенициллиназы не вызывает повреждения клетки в отсутствие антибиотика, у фермента, видимо, нет иной функции, кроме инактивации пенициллина. К тому же имеется хорошая корреляция между степенью устойчивости к действию пенициллина и общей пенициллиназной активностью.

32.12. Грам-отрицательные бактерии окружены наружной мембраной, богатой липополисахаридами

Как уже упоминалось, клеточная оболочка грам-отрицательных бактерий устроена более сложно, чем клеточная оболочка грам-положительных бактерий. У грам-отрицательных микроорганизмов (например, *Escherichia coli* или *Salmonella typhimurium*) слой пептидогликана окружен *наружной мембраной,* содержащей фосфолипиды, белки и липополисахариды. Эта наружная мембрана, подобно плазматической, имеет структуру бислоя. Итак, грам-отрицательные бактерии имеют две мембраны, а грам-положительные - одну. Особенность грам-отрицательных бактерий состоит также в наличии водной прослойки между плазматической мембраной и пептидогликановым слоем. В этом *периплазматическом пространстве* содержится много белков, участвующих в связывании и транспорте сахаров и других питательных веществ (разд. 37.20).

Липополисахариды (ЛПС) наружной мембраны представляют собой крайне необычные соединения, молекулы которых состоят из трех частей: *липида А,* олигосахаридов сердцевины (*«ядра»*) и *О-боковой цепи*

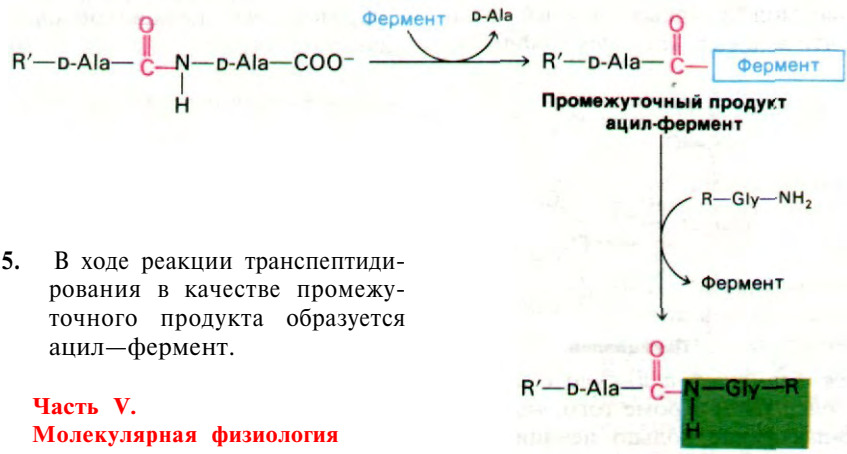


Рис. 32.15. В ходе реакции транспептидирования в качестве промежуточного продукта образуется ацил—фермент.

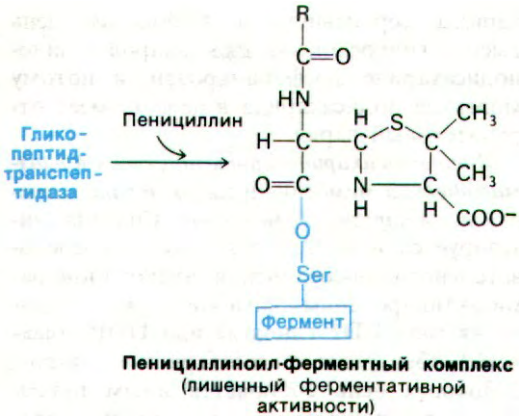


Рис. 32.16. Образование пенициллином ферментного комплекса, обладающего неограниченной стабильностью.

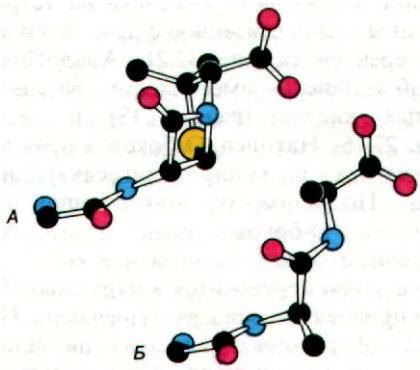


Рис. 32.17. Конформация пенициллина в области высокореакционноспособной пептидной связи (*А*) сходна с предполагаемой конформацией структуры R-D-Ala-D-Ala (*Б*) в переходном состоянии при протекании реакции транспептидирования. [Lee B., J.Mol.Biol., **61,** 464 (1971).]

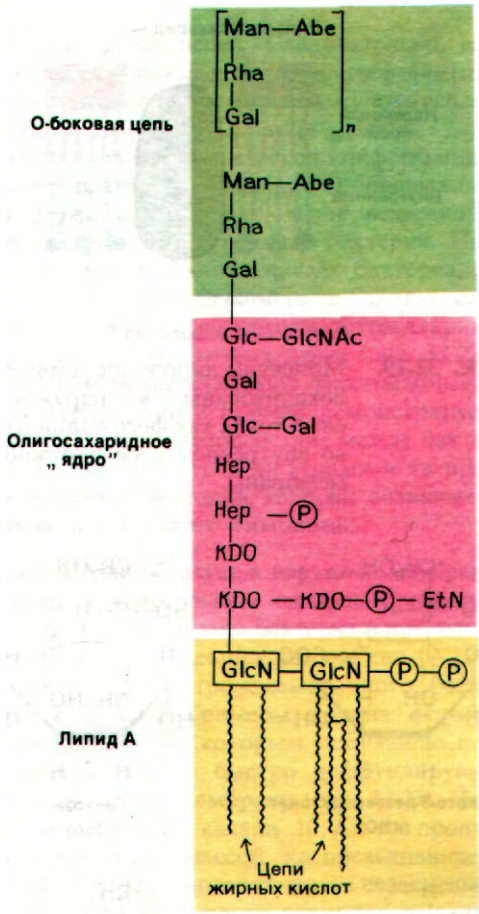


Рис. 32.18. Молекула липополисахарида состоит из трех частей: липида А, олигосахаридного «ядра» и О-боковой цепи. Здесь показана последовательность сахаров, характерная для *Salmonella typhimurium*. Сокращения: Abe - абеквоза; EtN - этаноламин; Gal-галактоза; Glc-глюкоза; GlcN - глюкозамин; GlcNAc - N-ацетилглюкозамин; Hep - гептулеза; KDO - 2-кето-3-дезоксиоктонат; Man - манноза; Rha - L-рамноза.

(рис. 32.18). Липид А - это гидрофобная часть большой (10 кДа) амфипатической молекулы. Он включает шесть цепей насыщенных жирных кислот, присоединенных к двум остаткам глюкозамина. Эти ацильные цепи составляют примерно половину наружного слоя наружной мембраны. Внутренний слой вместо цепей жирных кислот содержит фосфолипиды (рис. 32.19). Далее в молекуле липополисахарида идет область олигосахаридного «ядра». Здесь десять углеводных единиц вынесено кнаружи от липида А; еще более наружно располагается О-боковая цепь, состоящая из большого числа повторяющихся тетрасаха-

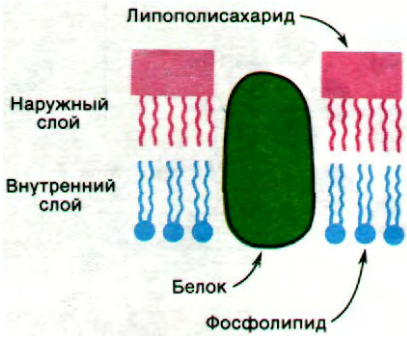


Рис. 32.19. Молекулы липополисахаридов локализованы в наружном слое, тогда как фосфолипиды - во внутреннем слое наружной мембраны.

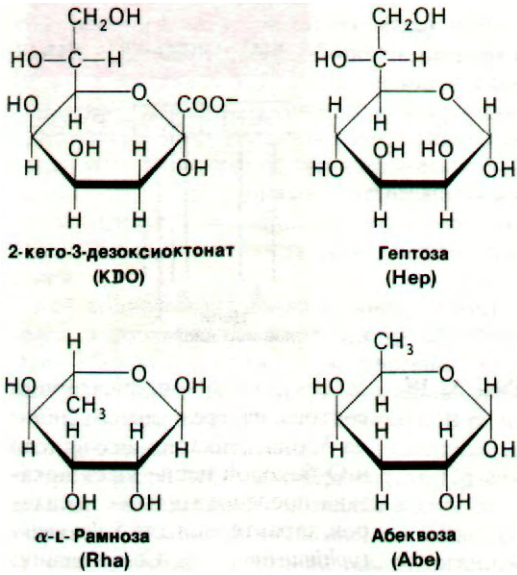


Рис. 32.20. Формулы ряда редких сахаров, входящих в состав липополисахаридов.

ридных единиц. В этих двух областях содержится несколько крайне редких в природе углеводов, а именно 8-углеродный сахар 2-кето-3-дезоксиоктонат (КДО, KDO), 7-углеродный сахар гептоза, а также 6-углеродные сахара L-рамноза и абеквоза, в молекуле которых в положении С-6 стоит $—CH_3$ вместо $—CH_2OH$ (рис. 32.20). В отличие от ацильной части липида А олигосахариды сердцевины и О-боковая цепь высоко гидрофильны. Ряд сахаров в липополисахариде фосфорилирован, и потому молекула полисахарида в целом имеет отрицательный заряд.

Липополисахариды синтезируются в плазматической мембране и затем транспортируются в наружную мембрану. Сначала синтезируется липид А, а затем путем последовательного присоединения сахаров (донорами активированных сахаров служат соединения типа UDP-глюкозы или UDP-галактозы) образуется полисахаридное «ядро». О-боковая цепь собирается иным путем. Ее повторяющееся тетрасахаридное звено синтезируется на том же самом C_{55}-изопреноидном липидном переносчике, который участвует в синтезе пептидогликана (разд. 32.4). Растущая цепь таких единиц удлиняется путем переноса олигосахарида с одной молекулы переносчика на тетрасахаридное звено, связанное с другой молекулой переносчика (рис. 32.21). Аналогичный способ удлинения имеет место при синтезе жирных кислот (разд. 17.18) и белков (разд. 27.16). Наконец, О-боковая цепь присоединяется к концу олигосахаридного «ядра». По-видимому, повторяющийся тетрасахарид О-боковой цепи образуется во внутреннем слое плазматической мембраны, затем переносится в наружный слой и там присоединяется к растущей цепи. Полностью сформированная молекула липополисахарида транспортируется из плазматической мембраны в наружную, по-видимому, в тех участках, в которых эти структуры соприкасаются.

32.13. Благодаря разнообразию О-боковых цепей грам-отрицательные бактерии противостоят защитным силам организма-хозяина

Липополисахариды содержат в высшей степени необычные сахара и своеобразные химические связи. Что дает такая вычур-

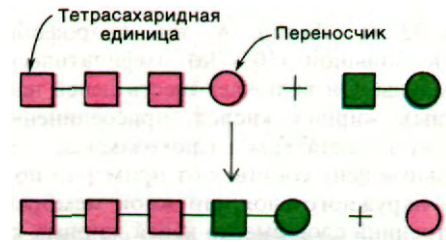


Рис. 32.21. Способ удлинения О-боковых цепей.

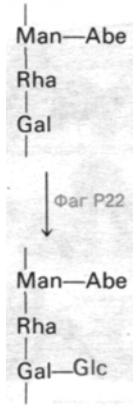


Рис. 32.22. Изменение структуры О-боковых цепей бактерии *Salmonella* при заражении умеренным фагом P22.

ность? Ключ к решению этого вопроса был получен при изучении мутантов, дефектных по синтезу липополисахаридов. Липид А и прилегающие к нему КДО олигосахаридного «ядра», по-видимому, абсолютно необходимы для выживания. Цепи насыщенных жирных кислот вносят определенный вклад в *барьерную* функцию наружной мембраны, благодаря которой периплазматические белки не выходят наружу, а наиболее ядовитые вещества не проникают в клетку. Так, пенициллин довольно плохо проходит сквозь клеточную мембрану грам-отрицательных бактерий. Кроме того, липид А придает наружной мембране *жесткость*. В отличие от липида А и олигосахаридного «ядра» О-боковые цепи не являются жизненно важными. Например, любимый многими биохимиками штамм K12 *E. coli* вообще лишен О-боковых цепей. Все же в естественных условиях грам-отрицательные бактерии почти всегда имеют О-боковые цепи. Полисахаридная наружная оболочка придает поверхности бактериальных клеток высокую степень гидрофильности, что повышает их устойчивость к фагоцитозу клетками хозяина. О-боковые цепи полисахаридов крайне разнообразны; показанная на рис. 32.18 структура - это только одна из многих известных. Грам-отрицательные бактерии способны быстро мутировать, изменяя таким путем состав своих О-боковых цепей. В результате популяция клеток хозяина, встретившись с новой для себя поверхностной структурой, не имеет на первых порах достаточного количества антител против О-боковых цепей. Следовательно, *видоизменяя О-боковые цепи, микроорганизмы на один шаг опережают систему иммунологической защиты организма-хозяина*.

Источником генетической информации, необходимой для изменения О-боковых цепей, может служить включение умеренного фага в грам-отрицательные бактерии. Например, фаг P22 обеспечивает бактериальную клетку геном фермента, добавляющего глюкозу к повторяющемуся тетрасахаридному звену в О-боковых цепях (рис. 32.22). Такое изменение называют *фаговой конверсией*. Приведенный пример демонстрирует удивительное взаимодействие между бактериальными и вирусными генами и те преимущества в эволюции, которые возникают в результате такого симбиоза.

32.14. Порин образует в наружной мембране каналы для небольших полярных молекул

В наружной мембране бактериальной клетки содержится большое количество ($\sim 10^5$) молекул *порина* - трансмембранного белка массой 37 кДа. Тримеры порина формируют каналы, по которым небольшие полярные молекулы быстро диффундируют, проходя сквозь мембрану (рис. 32.23). Поскольку диаметр канала 10 А, он пропускает молекулы массой, не превышающей 600 Да. Гидрофобные молекулы независимо от своего размера плохо проходят по каналу; *из этого следует, что пориновый канал наполнен водой и выстлан полярными группами*. Следовательно, канал приспособлен для пропускания небольших полярных метаболитов типа моносахара. Что касается полярных соединений с большей молекулярной массой, то для некоторых из них существуют специфические системы транспорта через наружную мембрану; примером может служить *система транспорта мальтозы*. Диффузия мальтозы (дисахарида) и мальтотриозы по пориновому каналу идет очень медленно; для их переноса через мембрану существует специальная система транспорта. Известны также специфические системы транспорта витамина B_{12} и хелатов железа. Некоторые фаги проникают в бактериальные клетки путем связывания со специфическими переносчиками. Так, фаг λ использует рецептор мальтозы.

Среди белков наружной мембраны количественно преобладает ($\sim 7 \cdot 10^5$ молекул на

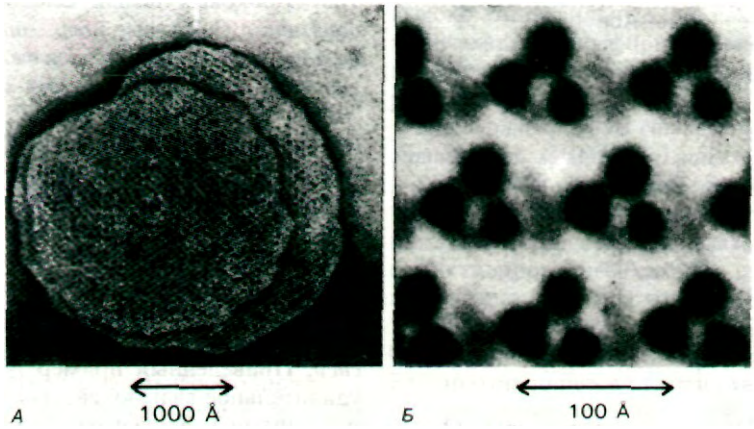


Рис. 32.23. *А.* Электронная микрофотография *E. coli.* Видно расположение негативно окрашенных пориновых каналов. *Б.* Изображение пориновых каналов, полученное после обработки и фильтрации (обесцвечивания фона) микрофотографии, приведенной на рис. *А. В.* Разъясняющая схема: показана проекция каналов порина при низком разрешении. [Steven A, C., Heggeler B. Ten, Muller R., Kistler J., Rosenbusch J. P., J. Cell Biol., 72, 292 (1977).]

клетку) небольшой *липопротеин,* содержащий всего лишь 58 остатков аминокислот. Этот белок характеризуется высокой степенью α-спирализованности; к его N-концевому цистеину ковалентно присоединены три жирные кислоты. Примерно 1/3 молекул липопротеина через ε-аминогруппы своего С-концевого лизина связана с СООН-группами расположенного над ним пептидогликана. *Таким образом, рассматриваемый липопротеин прикрепляет наружную мембрану к подлежащему пептидогликанномуслою и тем самым способствует механической устойчивости клеточной оболочки.*

32.15. Новообразованные белки наружной мембраны содержат отщепляемую сигнальную последовательность

Белки, синтезируемые грам-отрицательными бактериями, могут локализоваться в цитозоле, плазматической мембране, периплазматическом пространстве, наружной мембране или внеклеточной среде. Каким образом новосинтезированная молекула попадает в нужное место, выбирая из пяти возможных направлений правильное? Для выяснения этого вопроса очень важное значение имеет следующий факт: как оказалось, липопротеин наружной мембраны синтезируется в виде *пролипопротеина,* содержащего на N-конце 20 дополнительных остатков

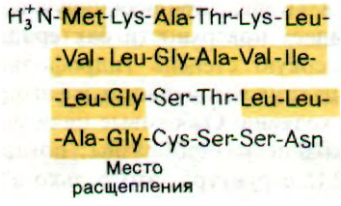


Рис. 32.24. Последовательность аминокислот N-концевой части пролипопротеина. Эта сигнальная последовательность содержит много гидрофобных остатков (показаны желтым цветом).

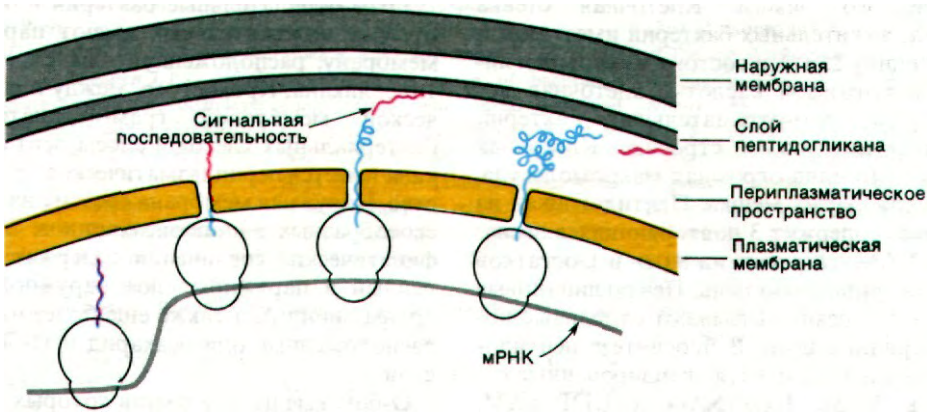


Рис. 32.25. У прокариот синтез белков клеточной оболочки происходит на рибосомах, прикрепленных к плазматической мембране. Сигнальная последовательность (показана красным цветом) новообразованного полипептида направляет рибосомы к плазматической мембране, а также обеспечивает перенос белка через нее.

аминокислот (рис. 32.24). Аналогичным образом и другие белки, предназначенные для плазматической мембраны или еще более наружно расположенных участков, несут *сигнальные последовательности,* отличающие их от тех белков, которые остаются в цитозоле. Рибосомы, синтезирующие белки, предназначенные для выхода из цитозоля, соединяются с плазматической мембраной посредством именно этих крайне гидрофобных N-концевых последовательностей. Таким образом, начальные этапы процесса секреции у прокариот и эукариот очень сходны (разд. 29.30). Однако есть и различие: *у прокариот* рибосомы, синтезирующие белки клеточной оболочки, *прикрепляются к плазматической мембране* (рис. 32.25), тогда как *у эукариот* рибосомы с аналогичной функцией связываются *с эндоплазматическим ретикулумом* (разд. 29.29). Как и у эукариот, пептидазы прокариот отщепляют сигнальные последовательности новосинтезированных белков, как только эти белки минуют барьер мембраны.

Гипотеза сигнальных последовательностей подтверждается данными, полученными при изучении бактериальных мутантов; проиллюстрируем это на примере белка, связывающего мальтозу: его масса 38 кДа, он участвует в поглощении мальтозы клеткой. Обычно этот белок локализован в периплазматическом пространстве. Однако при мутации, затрагивающей N-конец его предшественника, локализация белка (в его зрелой форме) меняется: замещение гидрофобной аминокислоты в сигнальной последовательности на заряженный остаток приводит к накоплению связывающего мальтозу белка в цитозоле. *Таким образом, следствием замены всего лишь одного аминокислотного остатка оказалось изменение локализации белка: вместо периплазматического пространства - цитозоль.* Рассмотрим обратную ситуацию: может ли белок цитозоля ошибочно попасть в наружную мембрану? Часть гена, ответственного за синтез N-концевой части белка-переносчика мальтозы (белок наружной мембраны, являющийся также рецептором фага λ), соединили с геном β-галактозидазы. Кодируемый полученным геном белок-химера накапливался не в цитозоле, как это свойственно β-галактозидазе, а в наружной мембране. Этот опыт показывает, что *N-концевая последовательность новосинтезированной полипептидной цепи - это своего рода форма записи адреса белков клеточной оболочки.* Совершенно очевидно, что клетки прокариот, как и эукариот, способны транспортировать белки в соответствующие участки. Молекулярные основы этого процесса сортировки белков - важная область современных исследований.

Заключение

Бактериальные клетки окружены клеточными стенками, которые защищают их от ос-

мотического лизиса. Клеточная стенка грам-положительных бактерий имеет обычно толщину 250 А и состоит из пептидогликана и тейхоевой кислоты; клеточная поверхность грам-отрицательных бактерий имеет более сложное строение. Клеточная стенка - это одна огромная макромолекула, имеющая форму мешка. Пептидогликан из *S. aureus* содержит 3 повторяющихся звена; NAG-NAM, тетрапептид из D- и L-остатков и пентаглициновую цепь. Пентаглициновые звенья поперечно связывают отдельные полисахаридные цепи. В биосинтезе пептидогликанов используются активированные сахара в форме UDP-NAG и UDP-NAM. Биосинтез протекает в пять этапов: 1) на остатке NAM, присоединенном к UDP, наращивается пептидное звено; 2) NAM-пептид переносится на липидный переносчик; 3) к NAM-пептидной единице присоединяются NAG и пентаглициновый мостик; 4) NAG-NAM-пептидное звено переносится от липидного переносчика на растущую полисахаридную цепь; 5) аминогруппа пентаглицинового мостика на одной полисахаридной цепи атакует концевую D-Ala-D-Ala-пептидную связь в тетрапептиде, принадлежащем другой цепи, и таким образом образуется поперечная сшивка между полисахаридными цепями.

Пенициллин убивает бактерии, подавляя синтез клеточных стенок. Пенициллин похож по структуре на ацил-D-Ala-D-Ala и содержит высокореакционноспособную пептидную связь. Он необратимо ингибирует гликопептид-транспептидазу и тем самым блокирует образование поперечных сшивок в пептидогликане. Некоторые бактерии резистентны к действию пенициллина благодаря наличию пенициллиназы, гидролизующей и тем самым инактивирующей пенициллин.

Грам-отрицательные бактерии в отличие от грам-положительных имеют наружную мембрану, расположенную над слоем пептидогликана. Кроме того, между плазматической мембраной грам-отрицательных бактериальных клеток и слоем пептидогликана имеется периплазматическое пространство. Наружная мембрана состоит из крайне своеобразных липополисахаридов. Эти амфипатические соединения содержат заякоренный в наружном слое наружной мембраны липид А, а также еще более наружно расположенные олигосахарид и О-боковые цепи.

О-боковые цепи, в состав которых входят необычные сахара, образуются путем полимеризации тетрасахаридных звеньев на липидном переносчике. Разнообразие структуры О-боковых цепей позволяет грам-отрицательным бактериям обойти иммунологическую защиту организма-хозяина. По содержащим воду каналам в наружной мембране происходит диффузия небольших полярных (но не гидрофобных) молекул; эти каналы образованы трансмембранно расположенным белком порином. Молекулы большей величины, например мальтоза или витамин B_{12}, проходят сквозь мембрану благодаря наличию специфических систем их транспорта. К числу основных белковых компонентов наружной мембраны относится небольшой липопротеин, посредством которого мембрана прикрепляется к подлежащему слою пептидогликана. Белки клеточной оболочки синтезируются на рибосомах, присоединенных к плазматической мембране. Предшественники этих белков содержат N-концевые сигнальные последовательности, которые отщепляются после переноса белка-предшественника через мембрану.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Nikaido H., Nakae T., 1979. The outer membrane of gram-negative bacteria, Advan. Microbiol. Physiol., 14, 163-250.

DiRienzo J.M., Nakamura K., Inouye M., 1978. The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions, Ann. Rev. Biochem., 47, 481-532.

Sharon N., 1969. The bacterial cell wall, Sci. Amer., 220(5), 92-98.

Оболочки бактериальных клеток

Leive L. (*ed.*), 1973. Bacterial Membranes and Walls, Marcel Dekker. [Прекрасный сборник критических обзоров. Статьи Гюйсена и Шокмана (Ghuysen, Shockman) по биосинтезу пептидогликана и Накайдо (Nikaido) по биосинтезу клеточных оболочек грам-отрицательных микроорганизмов имеют непосредственное отношение к теме данной главы.]

Nikaido H., 1979. Permeability of the outer membrane of bacteria, Angew. Chem. (Int.Ed.), 18, 337-350.

Hussey H., Baddiley J., 1976. Biosynthesis of bacterial cell walls. In: Martonosi A. (ed), The Enzymes of Biological Membranes, vol. 2, pp. 227-326, Plenum.

Osborn M.J., 1971. The role of membranes in the synthesis of macromolecules. In: Rothfield L.L. (ed.), Structure and Function of

Biological Membranes, pp. 343-400, Academic Press.
Steven A.C., ten Heggeler B., Muller R., Kistler J., Rosenbusch J.P., 1977. Ultrastructure of a periodic protein layer in the outer membrane of *Escherichia coli, J. Cell Biol.,* 72, 292-301.

Пенициллин и бацитрацин

Fleming A., 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillinium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae,* Brit. J. Exp. Pathol., 10, 226-236.
Chain E., 1971. Thirty years of penicillin therapy, Proc. Roy. Soc. London (B), 179, 293-319.
Strominger J.L., Blumberg P.M., Suginaka H., Umbreit J., Wickus G.G., 1971. How penicillin kills bacteria: progress and problems, Proc. Roy. Soc. London (B), 179, 369-383.
Yocum R.R., Waxman D.J., Rasmussen J.R., Strominger J.L., 1979. Mechanisms of penicillin action: penicillin and substrate bind covalently to the same active serine in two bacterial D-alanine carboxypeptidases, Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 2730-2734.
Stone K.J., Strominger J.L., 1971. Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C_{55}-isoprenyl pyrophosphate, Proc. Nat. Acad. Sci., 68, 3223-3227.
Boyd D.B.. 1977. Transition state structures of a dipeptide related to the mode of action of *b*-lactam antibiotics, Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 5239-5243.

Сигнальные последовательности и локализация белков

Chang C.N., Model P., Blobel G., 1979. Membrane biogenesis: cotranslational integration of the bacteriophage f1 coat protein into an *Escherichia coli* membrane fraction, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 4891-4895.
Inouye S., Wang S., Sekizawa J., Halejoua S., Inouye M., 1977. Amino acid sequence for the peptide extension on the prolipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane, Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 1004-1008.
Bedouelle H., Bassford P.J., Fowler A. V., Zabin I., Beckwith J., Hofnung M., 1980. Mutations which alter the function of the signal sequence of the maltose binding protein of *Escherichia coli, Nature,* 285, 78-81.
Emr S., Hedgpeth J., Clement J.-M., Silhavy T.J., Hofnung M., 1980. Sequence analysis of mutations that prevent export of λ receptor, an *Escherichia coli* outer membrane protein, Nature, 285, 82-91.
Bassford P., Beckwith J., 1979. *Escherichia coli* mutants accumulating the precursor of a secreted protein in the cytoplasm, Nature, 277, 538-541.
Emr S.D., Schwartz M., Silhary T.J., 1978. Mutations altering the cellular localization of the phage λ receptor, an *Escherichia coli* outer membrane protein, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 5802-5806.
Lin J.J.C., Kanazawa H., Ozols J., Wu H.C., 1978. An *Escherichia coli* mutant with an amino acid alteration within the signal sequence of outer membrane prolipoprotein, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 4891-4895.

ГЛАВА 33
Иммуноглобулины

К началу этого столетия были выявлены многие важнейшие свойства иммунного ответа. Однако представление о защитных механизмах возникло гораздо раньше, о чем свидетельствуют записи Фукидида о чуме, поразившей Афины в 430 до н.э.:

«Пусть другие рассуждают о ее происхождении и причинах, вызвавших ее появление, если только для такого страшного бедствия могут быть найдены достаточные причины... что до меня, я просто опишу ее природу и объясню, по каким симптомам ее можно распознать, если она когда-нибудь разразится снова. Тем лучше я смогу это сделать, что болел сам и видел, как развивалась болезнь у других...

Именно у тех, кто выздоровел после этой болезни, больные и умирающие вызывали особенное сочувствие. Пережившие болезнь знали по своему опыту, что это такое, и не боялись более за себя, *ибо один и тот же человек никогда не заболевал вторично* или по крайней мере не умирал при этом. И таких людей не только поздравляли другие, но и сами они в радости *преисполнялись тщетной надеждой, что отныне они спасены от какой-бы то ни было болезни*».

Называя надежду на спасение тщетной, Фукидид явно имел в виду *специфичность* защиты, свойственную иммунной системе.

33.1. Основные определения

Антитела (или *иммуноглобулины*) - это белки, синтезируемые в организме животного в ответ на присутствие чужеродного вещества. Антитело обладает специфическим сродством к стимулировавшему его синтез чужеродному веществу. *Антиген* (или *иммуноген*) - чужеродная макромолекула, способная вызвать образование антител. Эффективными антигенами обычно служат белки, полисахариды и нуклеиновые кислоты. Антитела проявляют специфичность в отношении определенного участка молекулы антигена; этот участок называют *антигенной детерминантой*.

Чужеродные молекулы малого размера не вызывают образования антител. Однако если они присоединены к макромолекулам, то может иметь место синтез специфических антител. В этом случае макромолекула выполняет функцию *носителя* присоединенной химической группы, называемой *гаптенной детерминантой*. Сама по себе чужеродная молекула малого размера называется *гаптеном*.

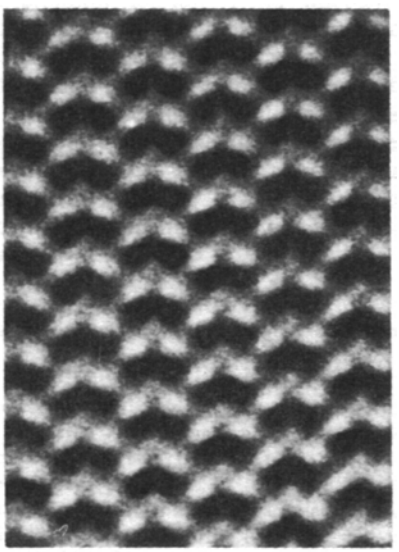


Рис. 33.1. Электронная микрофотография кристалла молекул антитела. [Labaw L. W., Davies D. R., J. Ultrastruct. Res., 40, 349 (1972).]

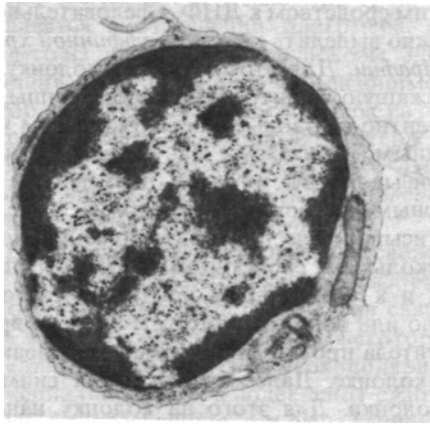


Рис. 33.2. Электронная микрофотография В-лимфоцита. (Печатается с любезного разрешения L. Mercer.)

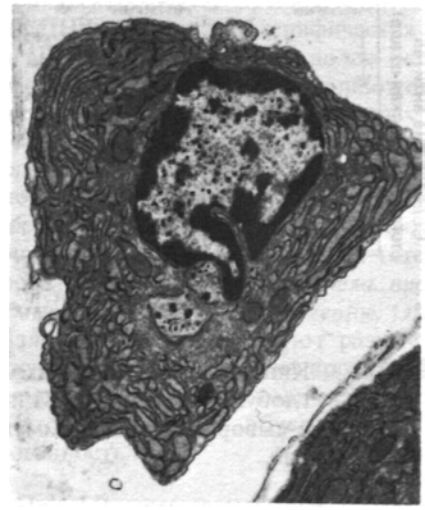


Рис. 33.3. Электронная микрофотография плазматической клетки. Виден очень хорошо развитый шероховатый эндоплазматический ретикулум. (Печатается с любезного разрешения L. Mercer.)

Молекулы антител секретируются *плазматическими клетками,* образовавшимися из В-лимфоцитов (рис. 33.2). Другой класс лимфоцитов, а именно *Т-лимфоциты,* обусловливает клеточный иммунный ответ, который дополняет гуморальный ответ, выражающийся в появлении растворимых антител. В этой главе мы рассмотрим только гуморальный ответ, поскольку его молекулярные основы изучены значительно лучше. Однако нужно подчеркнуть, что молекулы антител - всего лишь один из компонентов большой, согласованно функционирующей системы молекул и клеток, распознающих и удаляющих чужеродные вещества.

33.2. Синтез специфических антител в ответ на антиген

Животные способны синтезировать специфические антитела против практически любой химической группы. Особенно эффективно стимулирует образование антител динитрофенол (ДНФ), и потому его широко используют в качестве гаптенной детерминанты. Антитела против ДНФ получают следующим образом.

1. ДНФ-группы присоединяют ковалентно к белку-носителю, например к альбумину сыворотки быка (БСА), используя взаимодействие фтординитробензола с боковыми цепями лизина или других нуклеофильных остатков белка (рис. 33.4).

2. ДНФ-БСА вводят кролику в качестве иммуногена (антигена). Спустя несколько

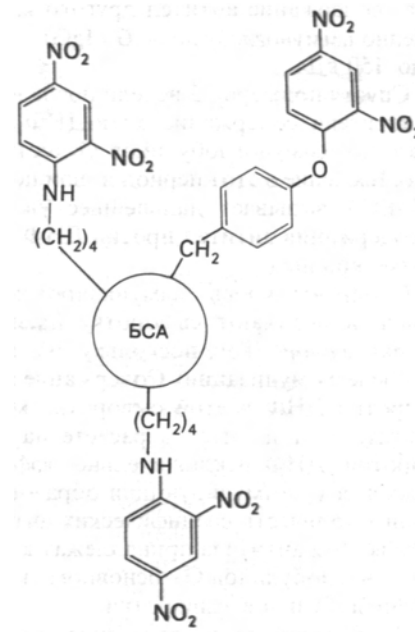


Рис. 33.4. Динитрофенильное производное бычьего сывороточного альбумина (ДНФ-БСА) - эффективного антигена.

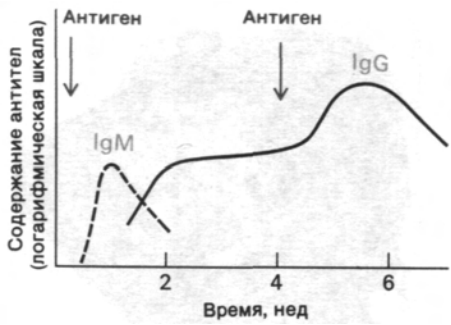


Рис. 33.5. Кинетика появления иммуноглобулинов M и G (IgM и IgG) в сыворотке после иммунизации.

дней содержание антител против ДНФ-альбумина начинает возрастать (рис. 33.5). Эти *первыми появляющиеся антитела* принадлежат к классу *иммуноглобулинов М* (IgM) массой около 1000 кДа.

3. Спустя примерно 10 дней после введения антигена количество иммуноглобулина М начинает уменьшаться, но одновременно растет содержание антител другого класса, а именно *иммуноглобулинов G* (IgG) массой около 150 кДа.

4. Спустя примерно 3 недели после введения антигена содержание анти-ДНФ-антител класса иммуноглобулинов G достигает плато. Введение в этот период новой порции ДНФ-БСА вызывает дальнейшее увеличение содержания антител против ДНФ в сыворотке кролика.

5. Собирают кровь иммунизированного кролика и получают сыворотку (называемую *антисывороткой,* поскольку она получена после иммунизации). Содержание антител против ДНФ в этой сыворотке может достигать 1 мг антител в расчете на 1 мл сыворотки. ДНФ исключительно эффективен как агент, стимулирующий образование больших количеств специфических антител. Почти все эти антитела принадлежат к классу иммуноглобулинов G - основному классу иммуноглобулинов сыворотки.

6. Следующий этап - отделение антител против ДНФ от антител с другой специфичностью и от прочих сывороточных белков. Антитела против ДНФ отличаются от остальных белков антисыворотки очень высоким сродством к ДНФ. Следовательно, их можно выделить методом *аффинной хроматографии.* Для этого готовят колонку, содержащую динитрофенильные группы, ковалентно связанные с нерастворимым углеводным носителем. На колонку наносят антисыворотку и затем промывают буферным раствором. Большая часть белков антисыворотки проходит сквозь колонку, поскольку их сродство как к ДНФ-группам, так и к углеводному носителю ничтожно мало или вовсе отсутствует. В то же время антитела против ДНФ прочно связываются на колонке. Далее эти антитела снимают с колонки. Для этого на колонку наносят ДНФ в высокой концентрации: добавленный ДНФ связывается с антителами, вытесняя их из связи с динитрофенильными группами нерастворимого углеводного носителя. Растворимый комплекс, состоящий из ДНФ и антител против ДНФ, выходит с колонки. Далее ДНФ удаляют путем диализа или ионно-обменной хроматографии, и в результате остается препарат очищенных антител.

33.3. Участки антител, связывающие антиген, подобны активным центрам ферментов

Участки связывания антигена в молекулах антител во многих отношениях сходны с активными центрами ферментов.

1. Константы связывания для гаптенов были определены методами равновесного диализа и спектроскопии. Например, присоединение окрашенного гаптена типа динитрофенильного производного тушит флуоресценцию остатков триптофана в белке-антителе. Степень тушения служит мерой насыщения участков связывания в молекуле белка. *Для большинства гаптенов константы связывания лежат в пределах от* 10^{-4} *до* 10^{-10} *М.* Следовательно, стандартная свободная энергия связывания составляет от —6 до —15 ккал/моль, т. е. лежит в границах, характерных для фермент-субстратных и фермент-коферментных комплексов. Кроме того, *комплексы гаптен-антитело образуются под действием тех же сил, что и фермент-субстратные комплексы.* Сочетание слабых нековалентных связей типа электростатических, водородных и вандерваальсовых обеспечивает прочное и специфическое связывание.

2. Проверяли способность антител к декстрану (полисахариду, состоящему из остатков глюкозы) связывать олигомеры. Обна-

ружили, что полное связывающее сродство проявляется в отношении олигомера, состоящего из шести остатков глюкозы. Здесь напрашивается сравнение с лизоцимом, у которого в щели активного центра размещается тоже шесть углеводных остатков. Из этого сопоставления следует, что *длина связывающего участка в молекулах антител против декстрана составляет 25 А.*

3. На основе спектроскопических свойств ряда гаптенов можно получить информацию о степени полярности участков связывания в молекулах антител. Так, некоторые нафталины, находясь в высокополярном окружении (например, в воде), дают слабую желтую флуоресценцию, а в выраженно неполярном окружении (например, в гексане) - интенсивно голубую. Если такой нафталиновый гаптен присоединяется к специфическому антителу, то появляется интенсивно голубая флуоресценция, что указывает на изгнание воды из участка связывания. Как правило, участки связывания представляют собой *неполярные ниши* в молекуле антитела; это увеличивает прочность связывания антигена по причинам, которые уже обсуждались применительно к ферментсубстратному взаимодействию (разд. 6.8).

4. Гаптен довольно точно соответствует связывающему участку по структуре. *Специфичность связывания, безусловно, очень высока, но не абсолютна.* Гаптен прочно удерживается в участке связывания, имея, таким образом, малую свободу вращения. Константа скорости связывания для многих гаптенов составляет около 10^8 $M^{-1} \cdot c^{-1}$. Столь высокая константа свидетельствует о том, что скорость процесса контролируется скоростью диффузии. Связывание гаптена не сопровождается, по-видимому, существенными структурными перестройками.

33.4. Препараты антител с определенной специфичностью обычно гетерогенны

Антитела имеют существенное отличие от ферментов: *большинство нормальных антител с определенной специфичностью, например антитела против ДНФ, неоднородны по молекулярному составу.* Анализ связывания динитрофенильных гаптенов с препаратом анти-ДНФ-антител выявил целый набор величин сродства. Некоторые молекулы антител связывают ДНФ с $K = 10^{-6}$ М, тогда как другие - с $K = 10^{-10}$ М. В отличие от этого ферменты, как правило, характеризуются только одной константой связывания данного субстрата или кофермента. Далее при электрофорезе препарата антител против ДНФ или других специфических антител выявляется множество полос белка. Ферменты же при электрофорезе дают одну полосу или небольшое число отдельных полос (например, изоферменты лактат-дегидрогеназы).

Гетерогенность антител с данной специфичностью определяется самой природой иммунного ответа. В чем причина гетерогенности? Оказалось, что *антитела, продуцируемые одной клеткой, гомогенны.* Однако различные клетки образуют разные по структуре антитела. Антитела против ДНФ синтезируются большим количеством различных клеток, что и обусловливает их гетерогенность.

33.5. При ферментативном расщеплении иммуноглобулина G образуются активные фрагменты

Иммуноглобулин G имеет массу 150 кДа. При изучении такого большого белка целесообразно предварительно расщепить его на активные фрагменты. В 1959 г. Родни Портер (Rodney Porter) показал, что при ограниченном протеолизе папаином имму-

Рис. 33.6. Флуоресценция ε-дансиллизина отчетливо меняется при связывании этого гаптена со специфическими антителами. Сдвиг максимума флуоресценции в сторону более коротких волн и увеличение интенсивности флуоресценции свидетельствуют о том, что связывание гаптена происходит в неполярном участке.

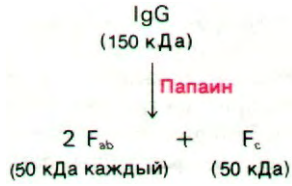


Рис. 33.7. Протеолитическое расщепление иммуноглобулина G (IgG).

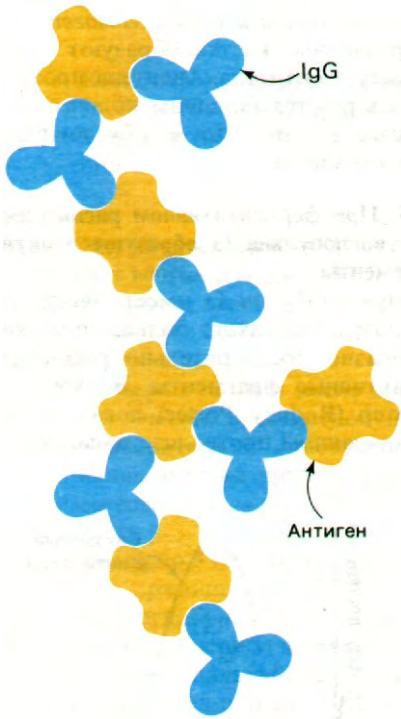


Рис. 33.8. Схематическое изображение решетки, формирующейся при образовании перекрестных связей между IgG (показано синим цветом) и антигеном (показано желтым цветом).

ноглобулин G расщепляется на три активных фрагмента массой по 50 кДа. Два фрагмента связывают антиген. Их обозначили F_{ab} (ab - от англ. antigen binding - связывающий антиген, F - от англ. fragment - фрагмент), *каждый из F_{ab} содержит по одному участку связывания гаптена или антигена,* причем по связывающему сродству этот участок не отличается от всей молекулы в целом. Однако, будучи одновалентным (т.е. имея один участок связывания), *F_{ab} не дает осадка с антигеном;* этим F_{ab} отличается от интактной молекулы иммуноглобулина G, содержащей два *идентичных* участка связывания антигена. Иммуноглобулин G может дать осадок с антигеном, содержащим не одну, а несколько антигенных детерминант. При этом формируется структура в виде протяженной решетки, где каждая молекула антитела образует перекрестные связи с двумя и более антигенами и наоборот (рис. 33.8). Осадок достигает наибольшего размера, если антитело и антиген присутствуют в эквивалентных количествах.

Третий фрагмент (также 50 кДа), обозначаемый F_c, не способен к связыванию антигена, но обладает другими биологически важными функциями. В отличие от F_{ab} этот фрагмент способен проникать через плацентарную мембрану. Следовательно, способность иммуноглобулина G проходить сквозь плаценту и попадать в систему кровообращения плода определяется *наличием на F_c специфического участка, обеспечивающего перенос через плаценту.* На F_c имеется также *участок связывания комплемента.* Связывание антитела с антигенной детерминантой на поверхности чужеродной клетки часто ведет к лизису последней. Такой результат взаимодействия антитела с антигеном опосредован группой белков, носящих общее название *комплемент.* Присоединение одного из этих белков к комплексу антиген—антитело и запускает последовательность реакций, приводящих к лизису чужеродной клетки. В обозначении фрагмента F_c индекс «с» (от англ. cristallizable - *кристаллизуемый*) указывает на способность этого фрагмента кристаллизоваться, Обнаружение этого свойства послужило первым указанием на гомогенность F_c; что касается фрагментов F_{ab}, то они гетерогенны и обычно не кристаллизуются.

33.6. Иммуноглобулин G состоит из L- и H-цепей

Следующий важный шаг в развитии иммунологии был сделан также в 1959 г., когда Джералду Эделману (Gerald Edelman) удалось показать, что иммуноглобулин G состоит из полипептидных цепей двух видов. Белок обрабатывали следующим образом: дисульфидные мостики в молекуле восстанавливали меркаптоэтанолом; далее разрушали нековалентные связи 6 М раствором

мочевины. При хроматографическом анализе смеси было обнаружено, что иммуноглобулин состоит из полипептидных цепей массой 25 и 50 кДа, обозначенных соответственно как *легкие* (L) и *тяжелые* (H) цепи.

Впоследствии Портер подобрал более мягкие условия обработки, позволившие реконструировать иммуноглобулин G из двух H- и двух L-пепей. На основе этих исследований он предложил модель (рис. 33.9) субъединичной структуры иммуноглобулина G, в соответствии с которой каждая L-цепь соединена с H-цепью дисульфидной связью. H-цепи, кроме того, связаны между собой по крайней мере одной дисульфидной связью. В целом *субъединичная структура иммуноглобулина G* L_2H_2.

Далее удалось определить, какие участки предложенной структуры соответствуют фрагментам, образующимся при расщеплении папаином. Папаин отщепляет H-цепи со стороны C-конца от дисульфидного мостика, соединяющего L- и H-цепи. В итоге F_{ab} состоит из целой L-цепи и аминоконцевой половины H-цепи, тогда как F_c состоит из C-концевых половин обеих H-цепей, Часть H-цепи, содержащаяся в F_{ab}, обозначается F_d.

33.7. Иммуноглобулин G - гибкая Y-образная молекула

Электронно-микроскопические исследования, проведенные Робином Валентайном и Майклом Грином (Robin Valentine, Michael Green), показали, что иммуноглобулин G имеет форму буквы Y и что гаптен присоединяется на концах F_{ab}-единиц. F_c-единица и две F_{ab}-единицы в интактном антителе соединены между собой своего рода шарниром, благодаря чему угол между F_{ab}-единицами может меняться быстро и в большом диапазоне величин (рис. 33.10). Этот вид *подвижности (гибкости) шарнирного типа* усиливает комплексообразование между антигеном и антителом, так как способствует лучшему связыванию поливалентных антигенов. В самом деле, таким путем расстояние между антиген-связывающими участками на концах F_{ab}-единиц может быть приведено в соответствие с расстоянием между специфическими детерминантами на антигене (например, на вирусе, имеющем много повторяющихся субъединиц). Как правило, если связывание поливалентного антигена происходит в двух участках связывания антигена, то сродство возрастает в 10^4 раз по сравнению со связыванием в одном участке. Не исключено, что подвижность шарнирного типа играет также определенную роль и в передаче информации от F_{ab}-единиц на F_c-единицу.

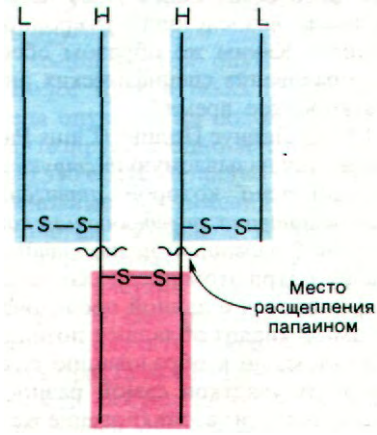


Рис. 33.9. Субъединичная структура IgG—L_2H_2. F_{ab}-фрагменты, высвобождающиеся при расщеплении папаином, показаны синим цветом, F_c-фрагмент - красным.

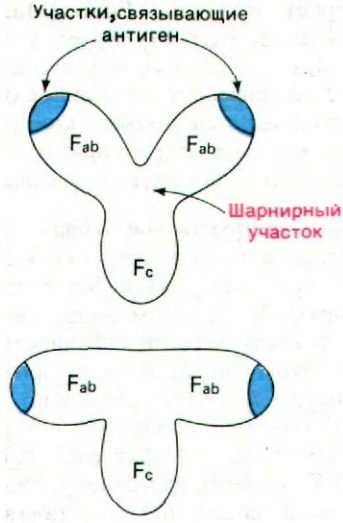


Рис. 33.10. Иммуноглобулин G имеет Y-образную форму. Наличие в молекуле шарнирного соединения обусловливает подвижность отдельных участков.

33.8. Антитела образуются под действием отбора или инструкции?

Специфичность ферментов вырабатывалась на протяжении миллионов лет эволюции. Специфические антитела появляются в крови животного всего лишь через несколько недель после воздействия чужеродной детерминанты. Каким же образом обеспечивается образование специфических антител в столь короткое время?

1. В 1940 г. Лайнус Полинг (Linus Pauling) предложил так называемую *инструктивную теорию,* согласно которой *антиген действует как матрица, определяющая конформацию новообразованной полипептидной цепи антитела.* При этом предполагалось, что молекулы антител с данной последовательностью аминокислот обладают потенциальной способностью к образованию антигенсвязывающих участков самой разнообразной специфичности; возникновение же определенной специфичности зависит от природы антигена, присутствующего во время свертывания полипептидной цепи. Согласно инструктивной теории, специфическое антитело не может образоваться в отсутствие соответствующего антигена.

2. *Селекционная теория (теория отбора),* которую в 50-х годах выдвинули Макферлейн Вернет и Нильс Ерне (Macfarlane Burnet, Niels Jerne), постулирует, что антиген регулирует только количество синтезируемых специфических антител. Согласно этой теории, *антиген-связывающие участки специфических антител полностью детерминированы еще до встречи с антигеном.*

33.9. Конец инструктивной теории

Инструктивная теория предсказывала, что если молекула антитела будет развернута (денатурирована), а затем вновь свернется (ренатурируется), то ее специфичность будет утрачена. Этому предсказанию противоречили экспериментальные данные по ренатурации рибонуклеазы, полученные в лаборатории Христиана Анфинсена (Christian Anfinsen). Вспомним, что денатурированная рибонуклеаза спонтанно восстанавливает исходную трехмерную структуру, специфичность и каталитическую активность после удаления денатурирующего агента (разд. 2.12). Для ренатурации присутствие субстрата не требуется. Этот принципиально важный факт относительно рибонуклеазы послужил стимулом для постановки аналогичных опытов с антителами (рис. 33.11). Были взяты F_{ab}-фрагменты антител против ДНФ; использование фрагментов относительно небольшого размера, а не целых антител значительно упрощает эксперимент. F_{ab}-фрагмент обрабатывали высокоэффективным денатурирующим агентом - 7М солянокислым гуанидином. Денатурированный таким образом F_{ab}-фрагмент терял сродство к гаптену (ДНФ). Данные гидродинамического и оптического анализа свидетельствовали о том, что конформация денатурированного F_{ab} была близка к случайному клубку. Далее гуанидин-HCl удаляли путем диализа; при этом денатурированный F_{ab} восстанавливал исходную пространственную структуру *в отсутствие гаптена ДНФ.* Самым поразительным было то, что ренатурированный F_{ab} обладал высоким сродством к динитрофенольным гаптенам. Поскольку ренатурация происходила в отсутствие гаптена, не оставалось сомнений, что *специфичность участка связывания антигена определяется только последовательностью аминокислот белка-антитела.* Результат этого эксперимента свидетельствовал в пользу отбора и противоречил основному предсказанию инструктивной теории. Более того, было обнаружено, что *клетки, продуцирующие антитела, способны синтезировать их в большом количестве в отсутствие антигена.* Это окончательно подтвердило основной тезис селекционной теории: *антиген влияет на количество продуцируемых специфических антител, но не на их аминокислотную последовательность или трехмерную структуру.*

33.10. Иммуноглобулины миеломы и гибридомы гомогенны

Как же могут синтезироваться специфические антитела до появления антигенов? Гетерогенность антител и трудности анализа смеси их молекул на протяжении многих лет служили препятствием к изучению этой проблемы. Выйти из этого положения удалось путем использования такого объекта исследования, как *множественная миелома* - злокачественное перерождение клеток, продуцирующих антитела. При этом виде рака происходит перерождение одного лимфоцита или плазматической клетки, что ведет к неконтролируемому клеточному делению. Следовательно, в этом случае образуется большое число клеток одного типа. Они составляют *клон,* т.е. происходят от одной

Рис. 33.11. F_{ab}-Фрагмент анти-ДНФ-антител восстанавливает способность к связыванию ДНФ после денатурации (развертывания структуры) и последующей ренатурации (восстановления исходной структуры) в отсутствие антигена. Этот опыт показывает, что специфичность определяется природой последовательности аминокислот.

клетки и имеют одни и те же свойства. Такие опухоли секретируют большие количества какого-то одного иммуноглобулина. *Иммуноглобулины миеломы обладают нормальной структурой и во всех отношениях соответствуют норме, но каждый из них представляет собой гомогенный образец одного из многочисленных антител, присутствующих в данном организме.* Миеломы развиваются у мышей. Эти опухоли можно трансплантировать другим мышам; после пересадки от одной мыши другой опухоль пролиферирует. Более того, в таких продуцирующих антитела опухолях из поколения в поколение синтезируется одно и то же антитело. Именно это обстоятельство привело к тому, что основные достижения молекулярной иммунологии связаны с изучением гомогенных миеломных иммуноглобулинов.

Сезар Милстайн и Джордж Кёлер (Cesar Milstein, Georges Kohler) обнаружили, что можно получить в большом количестве антитела практически любой заданной специфичности посредством *слияния клетки, продуцирующей антитело, с клеткой миеломы.* Для этого мышь иммунизируют определенным антигеном и спустя несколько недель удаляют у нее селезенку. Далее берут смесь иммунокомпетентных клеток этой селезенки и in vitro вызывают их слияние с клетками миеломы. Затем выделяют гибридные клетки путем культивирования смеси всех клеток в среде, поддерживающей рост только гибридных (но не исходных) клеток. В некоторых из полученных гибридных клеток сохраняются неопластические свойства миеломных клеток, и при этом они синтезируют антитела заданной специфичности. Такие *клетки гибридомы* как в первом, так и во всех последующих поколениях устойчиво продуцируют большие количества гомогенных антител со специфичностью, детерминированной исходной клеткой селезенки. К настоящему времени таким путем получено много различных *моноклональных антител,* которые используются в аналитических целях как высокоспецифические реагенты. Например, моноклональные антитела против определенного лекарственного средства или гормона позволяют определить его содержание в жидкостях тела даже при крайне низкой концентрации.

33.11. Каждая L- и H-цепь состоит из вариабельного и константного участков

При множественной миеломе в моче больных, как правило, появляются большие

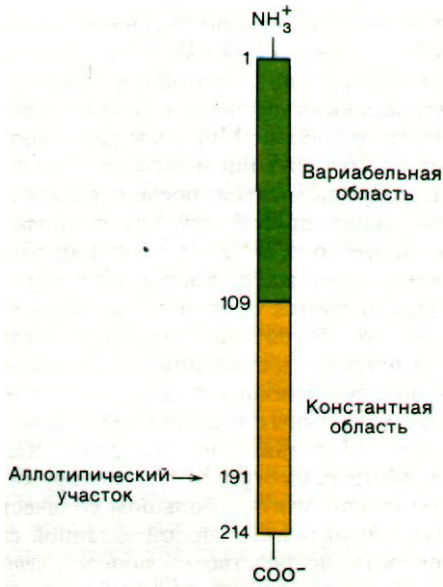


Рис. 33.12. Легкая цепь иммуноглобулина состоит из вариабельной и константной областей.

Рис. 33.13. Тяжелая цепь IgG также состоит из вариабельной и константной областей.

количества аномальных белков. На эти белки обратил внимание еще в 1847 г. Генри Бенс-Джонс (Henry Bence-Jones) в связи с их необычными свойствами: они выпадают в осадок при нагревании до 50°С и вновь растворяются при кипячении. Оказалось, что *белок Бенс-Джонса - это димер L-цепей* иммуноглобулина, продуцируемого миеломой больного; этот белок послужил удобным исходным материалом для анализа последовательности аминокислот в L-цепях.

В 1965 г. было проведено первое полное определение последовательностей аминокислот в миеломных L-цепях, содержащих 214 аминокислотных остатков. Эти исследования показали, что у разных больных белки Бенс-Джонса различаются по последовательности аминокислот. Самое удивительное состояло в том, что различия касались только N-концевой половины полипептидных цепей. Каждый из исследованных белков Бенс-Джонса характеризовался уникальной последовательностью аминокислот в положениях от 1 до 108, но начиная с положения 109, последовательность ряда белков Бенс-Джонса была идентичной. Следовательно, *L-цепи состоят из вариабельного участка (остатки 1-108)* и *константного* (постоянного) *участка (остатки 109-214).* Такое явление не имело прецедента в белковой химии.

Не все L-цепи имеют один и тот же константный участок. Существует два типа L-цепей, обозначаемых соответственно каппа (χ) и лямбда (λ), которые во многом сходны между собой. Так, оба типа L-цепей состоят из 214 остатков, содержат вариабельную N-концевую и константную С-концевую половины. Каждая из половин χ- и λ-цепей образует петлю из-за наличия внутрицепочечной дисульфидной связи. С-концевым остатком цепей обоих типов является цистеин, который участвует в образовании дисульфидного мостика с Н-цепью. Наконец, χ- и λ-цепи содержат идентичные аминокислотные остатки в 40% положений, т. е. проявляют примерно такую же степень гомологии, как α- и β-цепи гемоглобина человека.

Константные участки всех χ-цепей идентичны, за исключением положения 191, где может стоять либо лейцин, либо валин. Это *аллотипическое* различие наследуется по классическому правилу Менделя. λ-Цепи также вариабельны по положению 191, где может стоять лизин или аргинин.

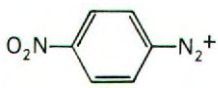
Н-цепи содержат 446 аминокислотных

остатков. Сравнение последовательностей Н-цепей иммуноглобулинов, продуцируемых разными миеломами, выявило, что и в этом случае вариабельными оказываются первые 108 остатков (от N-конца). Следовательно, тяжелые цепи, подобно легким, состоят из *вариабельной (V) и константной (С) области.* Вариабельные области Н- и L-цепей но размеру одинаковы, а константные - различны: в Н-цепях этот участок в 3 раза длиннее, чем в L-цепях (рис. 33.13).

33.12. Участок связывания антигена образован гипервариабельными фрагментами L- и Н-цепей

Как уже упоминалось выше, в состав антиген-связывающего фрагмента F_{ab} полностью входит L-цепь и частично - Н-цепь. Каков относительный вклад каждой из этих цепей в связывающую активность? Первые сведения в этом отношении были получены при сравнении последовательностей аминокислот в большом числе миеломных белков. Обнаружилось, что вариабельные области L- и Н-цепей вовсе не равномерно вариабельны, а именно три участка L-цепи и четыре Н-цепи проявляют значительно большую изменчивость, чем другие части вариабельных областей (рис. 33.14). В 1970 г. Элвин Кабат (Elwin Kabat) предположил, что эти *гипервариабельные участки* образуют область, связывающую антиген, и что именно от природы составляющих их аминокислот зависит специфичность антитела.

Для проверки этой гипотезы были проведены опыты с использованием аффинной метки. Гаптены, содержащие реакционноспособные группы, синтезируются просто. Реакционноспособный гаптен специфически связывается с антиген-связывающим участком антитела и далее образует ковалентную связь с ближайшим подходящим остатком в молекуле данного белка. Например, антитела против ДНФ можно пометить по антиген-связывающему участку гаптеном нитрофенилдиазонием:



Гаптен
п-нитрофенилдиазоний

Диазониевая группа высокореакционноспособна и образует диазосоединения с остатками тирозина, гистидина и лизина. Модифицированные таким образом антитела содержат метку и в L-цепях и в Н-цепях. При этом меченые остатки оказались локализованными в гипервариабельных участках этих цепей. Следовательно, *участки связывания антигена формируются гипервариабельными остатками аминокислот как L-цепей, так и Н-цепей.* При последующем рентгеноструктурном анализе были получены более прямые данные в пользу этого положения; мы их обсудим ниже.

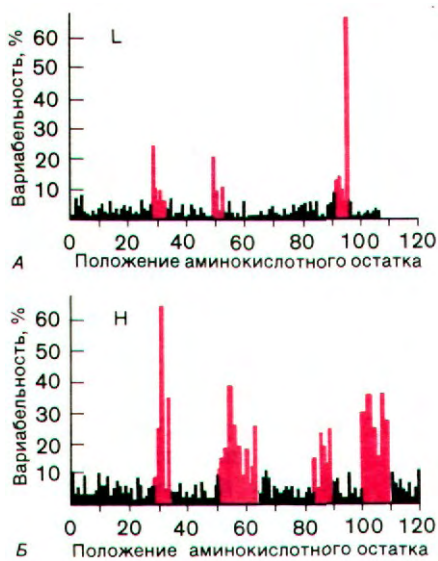


Рис. 33.14. Гипервариабельные участки легких (*А*) и тяжелых (*Б*) цепей. Степень вариабельности в последовательности аминокислот отложена как функция положения аминокислоты. (Capra J. D., Edmundson A. B., The antibody combining site, Scientific American, Inc., 1976.)

33.13. Вариабельная и константная области выполняют разные функции

N-концевые части легких и тяжелых цепей содержат вариабельные области, ответственные за связывание антигена. Различиями в последовательности аминокислот обусловлено формирование участков, связывания антигена, различающихся по специфичности. Остальная часть каждой из цепей - константная; она осуществляет такие эффекторные функции, как связывание комплемента и перенос антител через плацентарную мембрану. Одни и те же эффекторные функции свойственны антителам

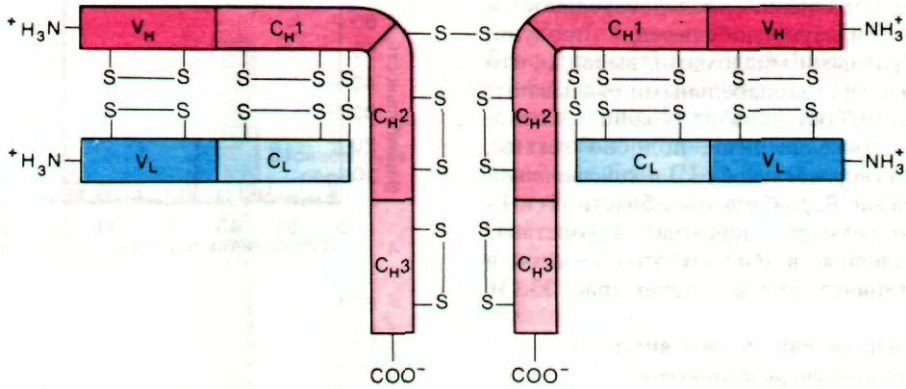


Рис. 33.15. Структура IgG. Показано расположение дисульфидных мостиков и участки гомологичных последовательностей. (Edelman G. M., The structure and function of antibodies, Scientific American, Inc., 15,70.)

самой разной специфичности. Таким образом, *антитела состоят из участка с уникальной последовательностью аминокислот, определяющей специфичность связывания антигена, и из участка с постоянной последовательностью, осуществляющего общие эффекторные функции.* Поразительная особенность структуры иммуноглобулинов состоит в том, что вариабельный и константный области в легких и тяжелых цепях имеют четкую границу раздела.

33.14. Молекулы антител уложены с образованием компактных доменов, имеющих гомологичные последовательности

Последовательность аминокислот в молекуле иммуноглобулина полностью раскрыл в 1968 г. Джералд Эделман (Gerald Edelman). Самая интересная особенность этой последовательности состоит в периодичности расположения внутрицепочечных дисульфидных связей и в легких, и в тяжелых цепях (рис. 33.15). Кроме того, имеется сходство в последовательности аминокислот разных частей молекулы иммуноглобулина. Так, вариабельная область легкой цепи (V_L) гомологична вариабельной области тяжелой цепи (V_H); константная область тяжелой цепи (C_H) состоит из трех равных частей (C_H1 C_H2 и C_H3), обладающих сходными последовательностями; наконец, константная область легкой цепи (C_L) гомологична трем доменам константной области тяжелой цепи.

Эта очевидная гомология последовательностей аминокислот свидетельствует о том, что молекулы иммуноглобулинов свернуты с образованием компактных доменов, каждый из которых содержит область, гомологичную по крайней мере одному активному участку, выполняющему определенную функцию, свойственную молекуле иммуноглобулина в целом (рис. 33.16). Представляется вероятным, что домены сходны по четвертичной структуре, поскольку сходны их последовательности аминокислот. Данные рентгеноструктурного анализа подтвердили гипотезу доменов. Роберто Поляк (Roberto Poljak) раскрыл пространственную структуру при разрешении 2,0 А фрагмента $F_{ab'}$ (практически идентичного фрагменту F_{ab}) человеческого иммуноглобулина. Фрагмент $F_{ab'}$ состоит из *четырех расположенных в виде тетраэдра глобулярных субъединиц - V_L, V_H, C_L и C_H1 - поразительно сходных по пространственной структуре* (рис. 33.17). Общая структурная особенность четырех доменов состоит в наличии двух широких антипараллельных β-складок (рис. 33.18). Между ними располагаются плотно упакованные боковые цепи многих гидрофобных остатков. Указанный повторяющийся элемент структуры назван *иммуноглобулиновой складкой.*

Трехмерную структуру интактного иммуноглобулина G раскрыл Дэвид Дэвис (David Davies). Анализ карты электронной плотности с разрешением 6 А показал, что молекула IgG имеет Т-образную форму (рис. 33.19). Домены в фрагменте F_c, также как и в фрагменте F_{ab}, имеют характерную иммуноглобулиновую складку. Углеводный компонент, ковалентно связанный с остат-

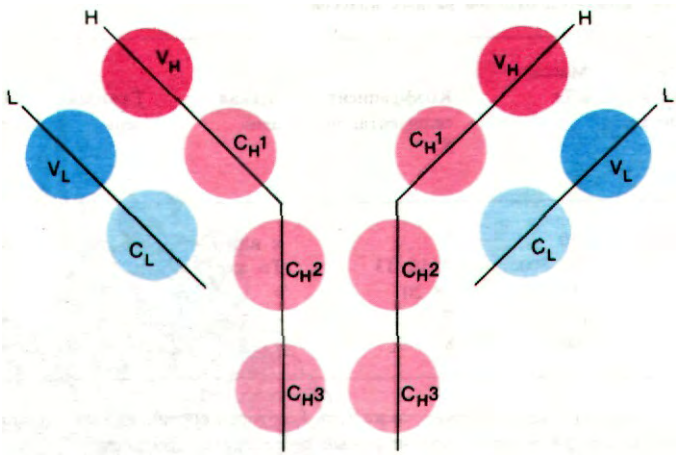


Рис. 33.16. Схема, иллюстрирующая гипотезу доменов.

ком аспарагина в $C_н2$-домене, расположен между доменами $C_н1$ и $C_н2$ (рис. 33.19) и составляет значительную часть области контакта между единицами F_{ab} и F_c. Сравнение взаимной ориентации прилегающих друг к другу доменов в разных иммуноглобулинах и их фрагментах показало, что полипептидные цепи между доменами обладают значительной гибкостью.

33.15. Рентгеноструктурный анализ связывающих участков антител показал, как происходит связывание некоторых гаптенов

Рентгеноструктурный анализ комплексов гаптенов с фрагментами F_{ab} позволил определить природу антиген-связывающих

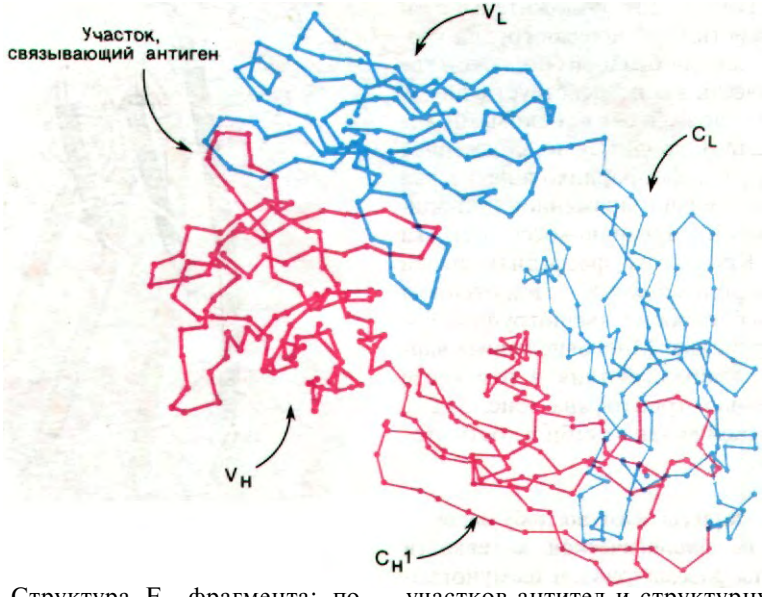


Рис. 33.17. Структура F_{ab}-фрагмента; показаны только α-углеродные атомы. L-цепи изображены синим цветом, H-цепи - красным. [Poljak R. L., Amzel L. M, Avey H. P., Chen B.L., Phizackerley R. P., Saul F., Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 3306 (1973).]

участков антител и структурную основу их специфичности. Подтвердилось предсказание, сделанное на основании сопоставления последовательностей аминокислот, а также опытов с аффинной меткой, что *антиген-*

Таблица 33.1. **Свойства иммуноглобулинов разных классов**[1].

Класс	Концентрация в сыворотке, мг/мл	Масса, кДа	Коэффициент седиментации, S	Легкая цепь	Тяжелая цепь	Субъединичный состав
IgG	12	150	7	χ или λ	γ	$\chi_2\gamma_2$ или $\lambda_2\gamma_2$
IgA	3	180-500	7, 10, 13	То же	α	$(\chi_2\alpha_2)_n$ или $(\lambda_2\alpha_2)_n$
IgM	1	950	18-20	»	μ	$(\chi_2\mu_2)_5$ или $(\lambda_2\mu_2)_5$
IgD	0,1	175	7	»	δ	$\chi_2\delta_2$ или $\lambda_2\delta_2$
IgE	0,001	200	8	»	ε	$\chi_2\varepsilon_2$ или $\lambda_2\varepsilon_2$

[1] n = 1,2 или 3. IgM и олигомеры IgA содержат также цепь J, которая соединяет между собой молекулы иммуноглобулина. Секретируемый IgA имеет дополнительный секреторный компонент.

связывающий участок антитела сформирован остатками гипервариабельных областей как L-цепи, так и H-цепи. Это хорошо видно на примере связывания производного витамина K_1 (рис. 33.20). Аналогично происходит связывание фосфорилхолина в полости, выстланной остатками, принадлежащими пяти гипервариабельным сегментам: двум L-цепи и трем H-цепи (рис. 33.21). Этот гаптен наиболее прочно связывается с остатками H-цепи. Его положительно заряженная триметиламмониевая группа уходит в глубь клинообразной полости, где электростатически взаимодействует с двумя отрицательно заряженными боковыми цепями глутамата. Отрицательно заряженная фосфатная группа фосфорилхолина связывается с положительно заряженной гуанидиниевой группой аргининового остатка в устье щели. Кроме того, фосфатная группа образует водородные связи с гидроксилом тирозинового остатка и с аминогруппой боковой цепи аргинина. Многочисленные ван-дерваальсовы взаимодействия, в том числе с боковой цепью триптофана (рис. 33.21), также вносят свой вклад в стабильность этого комплекса.

33.16. Разные классы иммуноглобулинов различаются по биологической активности

До сих пор мы рассматривали иммуноглобулин G. Однако существует 5 классов иммуноглобулинов (табл. 33.1), и все они состоят из тяжелых и легких цепей. Константные области тяжелых цепей у иммуноглобулинов разных классов неодинаковы, тогда как легкие цепи одни и те же: либо λ, либо χ. Тяжелые цепи иммуноглобулина G называются γ-цепями, а тяжелые цепи иммуноглобулинов A, M, D и E - соответственно α-, μ-, δ- и ε-цепями. Различие тяжелых цепей обусловливает и различие биологических свойств у пяти классов иммуноглобулинов. Как уже упоминалось выше, *иммуноглобулин M* (IgM) - это класс антител, которые первыми появляются в сыворотке

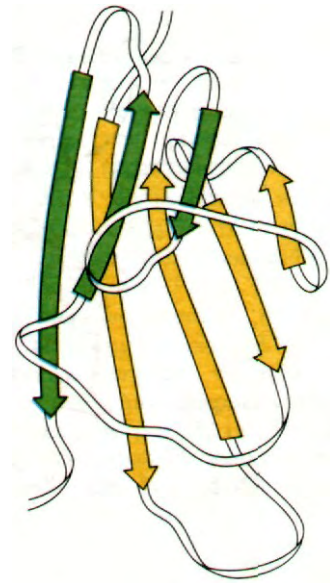


Рис. 33.18. Два слоя антипараллельных β-складок (показаны зеленым и желтым цветом) составляют основной структурный мотив доменов в иммуноглобулинах. (Capra J. D.. Edmundson A. B., The antibody combining site, Scientific American, Inc., 1976.)

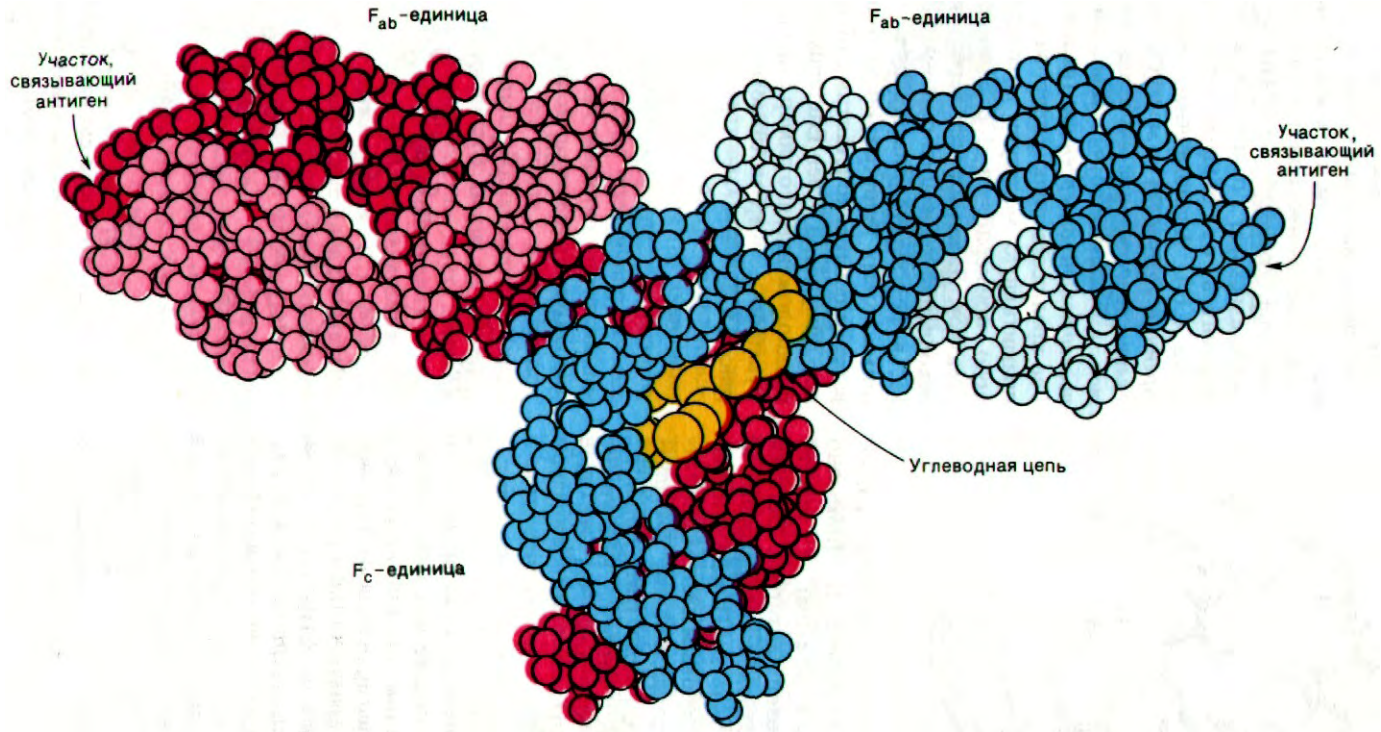


Рис. 33.19. Схематическое изображение трехмерной структуры молекулы IgG. Каждый аминокислотный остаток изображен в виде шарика. Одна из Н-цепей показана красным цветом, другая синим. Одна из L-цепей показана розовым цветом, другая голубым. Углеводная цепь присоединена к домену $C_н2$ (показана желтым цветом). [Silverton E. W., Navia M.A., Davies D. R., Proc. Nat. Acad. Sci.. 74, 5142 (1977).]

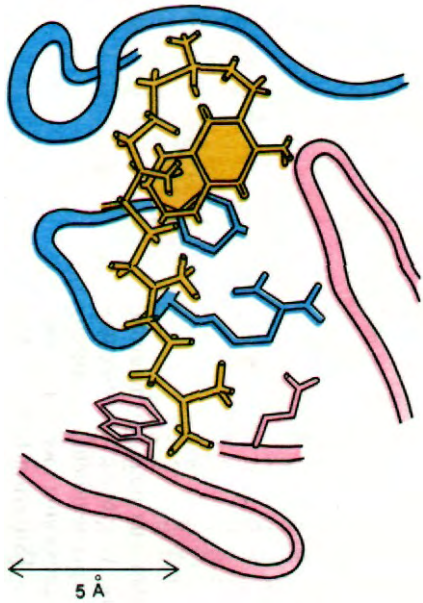


Рис. 33.20. Способ связывания производного витамина K_1 (показано желтым цветом) в участке связывания антигена. Остатки аминокислот гипервариабельного участка H-цепи изображены розовым цветом, а остатки, принадлежащие L-цепи,— синим. [Amzel I. M., Poljak R., Saul F., Varga J., Richards F., Proc. Nat. Acad. Sci., **71,** 1427 (1974).]

после введения антигена, тогда как *иммуноглобулин G* (IgG) - основной класс антител сыворотки. На протяжении многих лет IgG называли γ-*глобулином,* исходя из его электрофоретических характеристик и растворимости. *Иммуноглобулин A* (IgA) - это основной классе антител, секретируемых с различного рода продуктами внешней секреции (слезная жидкость, слизь бронхиального и кишечного эпителия). Таким образом, IgA служит первой линией зашиты против бактериальных и вирусных антигенов. Какова функция иммуноглобулинов D (IgD) и E (IgE), пока не известно. Установлено, однако, что *иммуноглобулин E* опосредует аллергические реакции и тем самым оказывает вредное действие.

33.17. Молекулы антител возникли в результате дупликации и последующей дивергенции генов

Структурная гомология доменов иммуноглобулинов указывает на характер их происхождения в эволюции. Выше уже рассматривался вопрос о том, что сходство последовательностей аминокислот в молекулах химотрипсина, трипсина, эластазы и тромбина свидетельствует о происхождении этих ферментов от общего предшественника (разд. 8.11). Аналогичным образом *внутренняя гомология в молекуле иммуноглобулина свидетельствует о появлении антител в процессе дупликации генов и их последующей дивергенции* (видоизменения). Ген-предшественник кодировал, вероятно, примитивную молекулу антитела, состоящую примерно из 108 аминокислотных остатков. Далее, по всей вероятности, происходила дупликация гена-предшественника; в результате дивергенции образовавшихся новых генов возникли разные типы вариабельных и константных областей. Аллен Эдмундсон (Allen Edmundson) высказал предположение, что димер L-цепи выполнял функцию примитивного антитела (рис. 33.22).

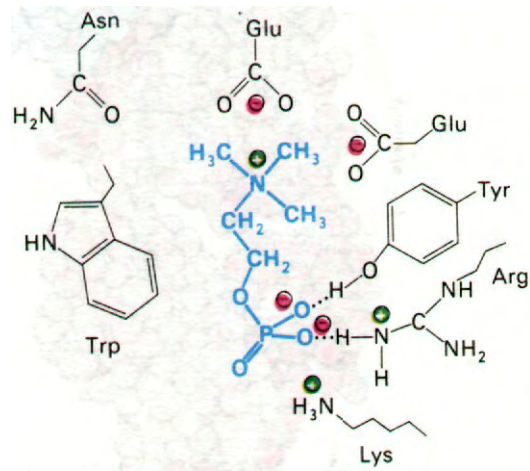


Рис. 33.21. Способ связывания фосфорилхолина (показан синим цветом) с антителом в участке, связывающем антиген. [Padlan E.A., Davies D. R., Rudikoff S., Potter M., Immunochemistry, **13,** 945 (1976).]

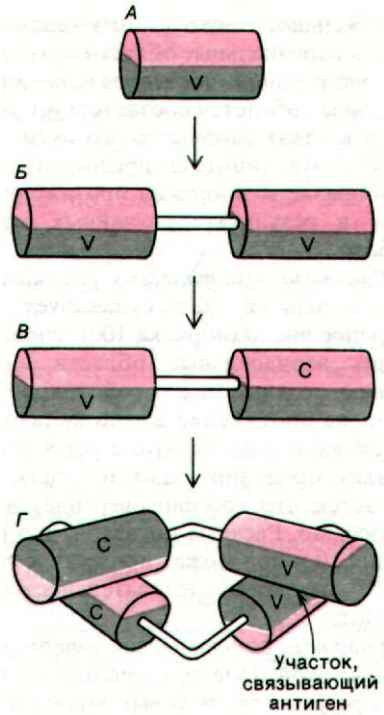


Рис. 33.22. Вероятные этапы эволюции примитивных антител. Ген, кодирующий одну полипептидную цепь (*А*) из 108 аминокислотных остатков, удваивается и дает два идентичных домена (*Б*), соединенных короткой линейной полипептидной цепью. В результате дивергентной эволюции образовавшихся при удвоении генов аминокислотный состав двух доменов становится различным и возникают (*В*) вариабельная (V) и константная (C) области, перевернутые одна по отношению к другой. При соединении этих молекул формируется (*Г*) примитивный F_{ab}-фрагмент, обладающий участком связывания антигена. (Capra J. D., Edmundson A. B., The antibody combining site, Scientific American, Inc., 1976.)

33.18. Вариабельные и константные области кодируются разными, но соединившимися генами

Как организованы и как функционируют гены иммуноглобулина? Обнаружение четкого различия между вариабельными и константными областями в L- и H-цепях дало основание думать, что гены иммуноглобулинов, так же как и кодируемые ими полипептиды, имеют необычную архитектуру. Ранее уже упоминалось, что константные области χ-цепей идентичны по всем положениям, кроме 191, где может стоять либо лейцин, либо валин. Как показал анализ родословной, указанные два варианта (аллотипа) наследуются в соответствии с классическим правилом Менделя, а это служит веским доводом в пользу того, что константная область χ-цепей кодируется только одним геном. Что касается вариабельных областей, то по данным генетического анализа они кодируются множеством генов. В 1965 г. Уильям Дрейер и Клод Беннетт (William Dreyer, Claude Bennett) выдвинули предположение, что в половых клетках множественные гены *V* пространственно отделены от одиночного гена *C*. Согласно этой гипотезе, в процессе дифференцировки клетки, продуцирующей антитело, один из генов *V* соединяется с геном *C*. Позднее стало известно, что действительно возможно сращивание ДНК (сплайсинг), аналогичное тому, которое имеет место, например, при включении ДНК фага в геном.

Окончательная проверка этой гипотезы транслокации сможет быть произведена только после того, как будет выделена чистая мРНК иммуноглобулина и будут разработаны методы анализа сложных геномов млекопитающих. Особенно интересно в этом отношении использование рестриктаз, расщепляющих большие хромосомы на специфические фрагменты ДНК, которые нетрудно далее подвергнуть анализу. Распределение генов *V* и *C* в этих фрагментах ДНК можно определить путем гибридизации их с фрагментами мРНК, специфичными в отношении либо вариабельной, либо константной области. В 1976 г. Сусуму Тонегава (*Susumu Tonegawa*), используя этот подход, определил, что *в ДНК половых клеток гены V и C расположены далеко друг от друга, а в клетках, продуцирующих антитела, они тесно связаны. Следовательно, в ходе дифференцировки лимфоцитов происходит перемещение генов иммуноглобулина* (рис. 33.23).

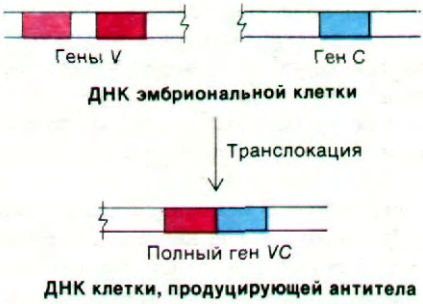


Рис. 33.23. При дифференцировке клеток, продуцирующих антитела, ген *V* транслоцируется, соединяясь с геном C.

33.19. Как возникает разнообразие специфичности антител?

Организм животного обладает способностью к синтезу больших количеств специфических антител спустя несколько недель после введения практически любой чужеродной детерминанты. Число различных видов антител, которые могут синтезироваться в организме животного, огромно - вероятно, оно превышает миллион. Как мы уже видели, структурной основой специфичности антител служат последовательности аминокислот в вариабельных областях легких и тяжелых цепей. Это подводит нас к ключевому вопросу: *каким образом возникают различные последовательности аминокислот вариабельных областей*? Можно сформулировать в связи с этим и более конкретные вопросы.

1. *Когда* возникает разнообразие? На протяжении жизни животного (соматически) или на протяжении эволюции (генетически)?

2. *Как* возникает разнообразие? В результате случайных мутаций в ходе эволюции, путем соматической рекомбинации или путем соматической гипермутации?

Обилие данных относительно последовательностей аминокислот миеломных иммуноглобулинов позволило иммунологам разработать несколько гипотез относительно того, как возникло разнообразие антител. Были предложены три возможных механизма.

1. *Гипотеза клеток зародышевых линий.* Согласно этой модели, разнообразие свойственно уже клеткам зародышевых линий (и эмбриональным клеткам), содержащим очень большое число ($>10^4$) генов, кодирующих вариабельные области антител. Каждой уникальной последовательности вариабельных областей соответствует участок ДНК в клетках зародышевого пути. Таким образом, эта гипотеза предполагает, что разнообразие возникло на протяжении эволюции в результате случайных мутаций и отбора.

2. *Гипотеза соматических рекомбинаций.* Согласно этой гипотезе, существует только небольшое число (порядка 100) генов, кодирующих вариабельные области антител. Эти гены, сходные между собой, но не идентичные, на протяжении жизни индивидуума претерпевают многократные рекомбинации в клетках, продуцирующих антитела. Предполагается, что кроссинговер идет внутрихромосомно. Расчеты показали, что рекомбинация 10 генов может привести к появлению 10^6 разных последовательностей аминокислот.

3. *Гипотеза соматических гипермутаций.* Согласно этой модели, разнообразие возникает в результате точковых мутаций одного-единственного гена вариабельной области данного подкласса. Однако только необычайно высокая частота мутаций могла бы создать на протяжении жизни индивидуума все разнообразие специфичности антител. Было высказано предположение, что в клетках, продуцирующих антитела (или в соответствующих клетках-предшественниках), увеличение скорости мутаций обеспечивается механизмом репарации ДНК, действие которого в данном случае направлено на производство ошибок.

33.20. Вариабельные участки L- и H-цепей кодируются несколькими сотнями генов

Революция в методах изучения ДНК, произошедшая в последние годы, сделала вопрос о происхождении разнообразия антител доступным для экспериментального анализа. Особенно ценными в данном случае оказались методы клонирования генов и быстрого определения последовательности протяженных участков ДНК. Благодаря использованию этих методов за короткий срок была получена информация, необходимая для ответа на два узловых вопроса: сколько генов вариабельных областей содержится в клетках зародышевого пути? Меняется ли последовательность оснований в процессе дифференцировки клеток, продуцирующих антитела?

Ответ на первый вопрос сводится к тому,

что *существует несколько сотен генов вариабельных областей х-легких (V_χ) и тяжелых цепей ($V_н$)*. 300 генов V_χ и 300 генов $V_н$, соединяясь в различных комбинациях (300 х 300), способны были бы кодировать $9 \cdot 10^4$ вариантов молекул антител, различающихся по специфичности. Этот расчетный максимум ($9 \cdot 10^4$) намного ниже реального числа антител различной специфичности, синтезирующихся в организме животного; считается, что число таких антител значительно превышает 10^6. Расхождение между расчетом и реальной величиной еще выше в отношении легких цепей λ, которые, как было показано, кодируются менее, чем 10 генами V_λ. В целом *число генов вариабельных областей в клетках зародышевого пути оказалось слишком малым, чтобы полностью обеспечить все разнообразие антител. Очевидно, в ходе дифференцировки лимфоцитов на протяжении жизни животного появляются какие-то дополнительные факторы, повышающие степень разнообразия.*

33.21. Открытие генов *J* (соединяющих) - дополнительного источника разнообразия антител

Следующий шаг в изучении механизма, обеспечивающего разнообразие антител, был сделан при определении последователь-

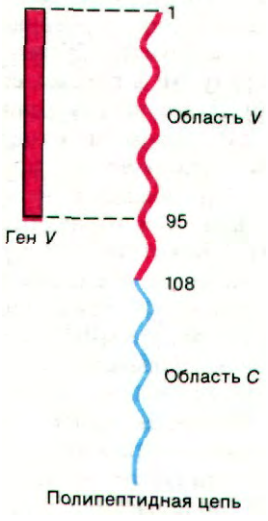


Рис. 33.24. Ген *V*, выделенный из эмбриональных клеток, укорочен. Он не кодирует последние 13 аминокислотных остатков вариабельной (V) области полипептидной цепи.

Рис. 33.25. Расположение тандемом группы генов *J*, кодирующих часть последнего гипервариабельного участка вариабельной области; гены *J* локализованы вблизи гена *С*.

ностей оснований клонированных генов, кодирующих иммуноглобулины в эмбриональных и миеломных клетках. Эти исключительно продуктивные исследования были проведены Тонегавой, Филиппом Ледером и Лероем Худом (Tonegawa, Philip Leder. Leroy Hood). Прежде всего, совершенно неожиданно выяснилось, чем *в эмбриональных клетках гены V кодируют вариабельные области L- и Н-цепей вовсе не целиком.* Ген *V* эмбриональных клеток (и клеток зародышевого пути) заканчивается кодом для аминокислотного остатка 95, а не 108, который составляет конец вариабельной области полипептидной цепи иммуноглобулина (рис. 33.24). Где же находится ДНК, которая кодирует последние 13 остатков вариабельной области? В эмбриональных клетках этот отрезок ДНК локализован в неожиданном месте: вблизи гена *С*. Указанный отрезок ДНК назвали геном *J* (от англ. join - соединять), потому что в дифференцированных клетках он соединяет гены *V* и *С*. В сущности, *в эмбриональных клетках вблизи гена С локализована целая группа расположенных тандемом генов J* (рис. 33.25). При дифференцировке клеток, продуцирующих антитела, происходит транслокация гена *V* в участок, расположенный рядом с геном *С*; эта транслокация осуществляется путем внутрихромосомной рекомбинации. При этом *ген V сращивается (сплайсинг) с геном J и формируется общий ген, полностью кодирующий вариабельный участок.* Каждый из указанных генов содержит короткую палиндромную (разд. 24.27) последовательность, расположенную рядом с участком рекомбинации. Эти палиндромы служат, вероятно, элементами узнавания в процессе рекомбинации.

Гены *J* вносят большой вклад в разнообразие антител, так как они кодируют

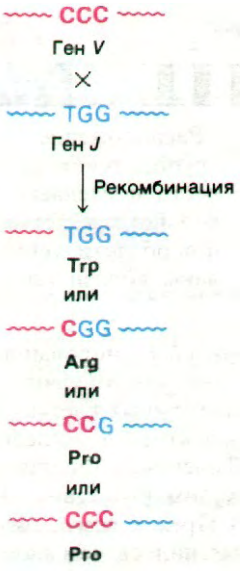


Рис. 33.26. Неточность места соединения генов *V* и *J* служит еще одним источником разнообразия антител.

часть последнего гипервариабельного участка L- и H-целей. При формировании полного гена V_χ любой из нескольких сотен генов *V* может присоединиться к любому из пяти генов *J*. Например, в результате комбинации 300 неполных генов *V* с пятью генами *J* может образоваться 1500 вариантов полного (непрерывного) гена *V*. Следовательно, *соматическая рекомбинация этих генных сегментов усиливает разнообразие, заложенное уже в клетках зародышевого пути.*

33.22. Соединение генов *V* и *J* в различных рамках также способствует разнообразию антител

Второе удивительное открытие состояло в том, что набор из пяти генов *J* обеспечивал синтез не пяти, а большего числа последовательностей аминокислот для соответствующих областей легкой цепи. Анализ последовательностей аминокислот и оснований показал, что рекомбинация генов *V* и *J* происходит не абсолютно точно. Как оказалось, рекомбинация этих генов может иметь место по тому или иному из оснований вблизи кодона, детерминирующего остаток 95 (рис. 33.26). *Следовательно, различие рамок, в которых происходит сращивание генов V и J, вносит дополнительный вклад в разнообразие антител в организме.* Похоже, что иммунная система получает удовольствие от мелких погрешностей!

В каждом данном лимфоците экспрессирован только один из двух аллельных генов. Следовательно, все участки, связывающие антиген, продуцируемые отдельной клеткой, одинаковы. Обнаружена структурная основа такого избирательного выражения гена (называемого *аллельным исключением*). Как показал анализ фрагментов, полученных после рестрикции, неполный ген *V* правильно соединяется с геном *J* только в одной из двух гомологичных хромосом; экспрессируется же только правильно рекомбинированный ген иммуноглобулина.

33.23. мРНК для L- и H-цепей образуются путем сращивания (сплайсинга) первичных продуктов транскрипции

мРНК легких χ-цепей содержит около 1250 оснований (рис. 33.27). Как и в других мРНК эукариот, в ней содержатся poly(A)-последовательность, присоединенная к 3'-концу, и нетранслируемые последовательности на 3'- и 5'-концах. *Лидерная последовательность* вблизи 5'-конца мРНК χ-цепи кодирует гидрофобную N-концевую область синтезируемой χ-цепи. Образующаяся *сигнальная последовательность* (рис. 33.28) направляет рибосому к эндоплазматическому ретикулуму и определяет способность новосинтезированной полипептидной цепи иммуноглобулина проходить через мембрану ЭР в просвет его трубочек (разд. 29.30). Далее на внутренней стороне мембраны ЭР происходит отщепление сигнальной последовательности под действием пептидазы. Вариабельная и константная области легкой цепи кодируются смежной областью мРНК, которая следует непосредственно за лидерной последовательностью.

Первичный продукт транскрипции, из которого образуется эта мРНК, содержит две вставочные последовательности (рис. 33.29). Одна из них отделяет лидерную последовательность от начала мРНК, кодирующей вариабельную область, а вторая расположена между дистальным концом последовательности, комплементарным гену *J*, и началом последовательности, комплементарной гену *C* (т.е. кодирующей константный участок). *При превращении первичного продукта в мРНК (процессинг) происходит удаление этих вставочных последовательностей.* Любопытно, что ген *J* несет информацию для

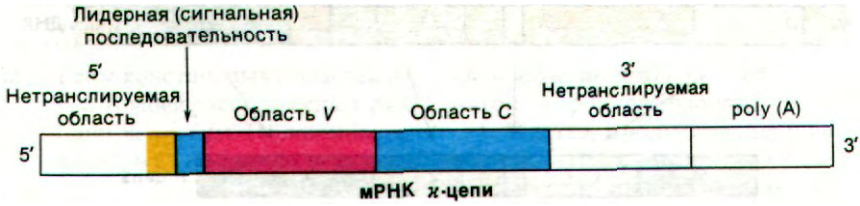


Рис. 33.27. Структура мРНК, кодирующей L-цепь.

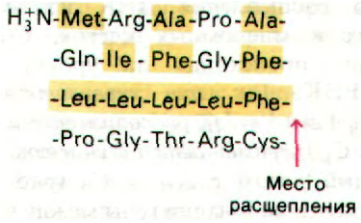


Рис. 33.28. Сигнальная последовательность новосинтезированной L-цепи. Желтым цветом отмечены гидрофобные остатки.

сплайсинга (сращивания) двух типов: одно - на уровне ДНК (слияние генов *V* и *J*) и другую - на уровне РНК (соединение *J*- и *C*-участков).

Какова структура гена, кодирующего тяжелую цепь? Вспомним, что H-цепь состоит из четырех доменов: $V_н$, $C_н1$, $C_н2$ и $C_н3$. Недавно было осуществлено клонирование фрагмента ДНК, определяющего константную область тяжелой цепи IgG. Электронно-микроскопические исследования показали, что $C_н1$, $C_н2$ и $C_н3$ кодируются разными участками ДНК (рис. 33.30). Еще один участок ДНК кодирует шарнирное соединение между $C_н1$ и $C_н2$. В целом *доменная структура иммуноглобулинов* (разд. 33.14) *является отражением архитектуры соответствующих генов. Благодаря сплайсингу организмы оказались способными создавать в ходе эволюции новые белки путем объединения участков ДНК, кодирующих разные домены.*

33.24. Разные классы антител образуются в результате перескока генов $V_н$

Как уже упоминалось, существует пять классов иммуноглобулинов. Клетки, продуцирующие антитела, сначала продуцируют IgM, а затем IgG, IgA, IgD или IgE *той же самой специфичности.* При этом переключении от IgM на другой класс иммуноглобулинов легкая цепь остается неизменной. Более того, неизменной остается и вариабельная область тяжелой цепи. *Меняется только константная область тяжелой цепи,* и потому этот этап дифференцировки клетки, продуцирующей антитела, называют *$C_н$-переключением* (рис. 33.31).

В эмбриональных клетках мыши гены, кодирующие константные области μ-, γ- *и* α-*тяжелых цепей (и обозначаемых соответственно $C_μ$, $C_γ$ и $C_α$), расположены в ряд, один за другим* (рис. 33.32). Как оказалось, существует четыре гена константных участков γ-цепей, что полностью соответствует данным генетического анализа, выявившего четыре подкласса IgG. Рядом с геном $C_μ$ локализуется набор расположенных тандемно генов *J,* кодирующих последний гипервариабельный участок вариабельной области. *Полный ген тяжелой цепи IgM образутся путем транслокации гена V_H к гену J_H* (рис. 33.33). В результате этой транслокации гены $V_н$, $J_н$ и $C_μ$ соединяются в функционально единый ген. Вставочные последовательности между лидерным отрезком и на-

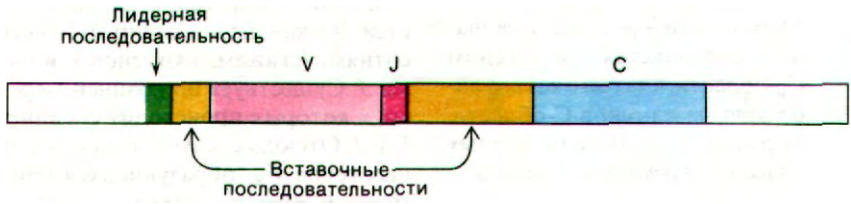


Рис. 33.29. Первичный транскрипт - предшественник мРНК L-цепи.

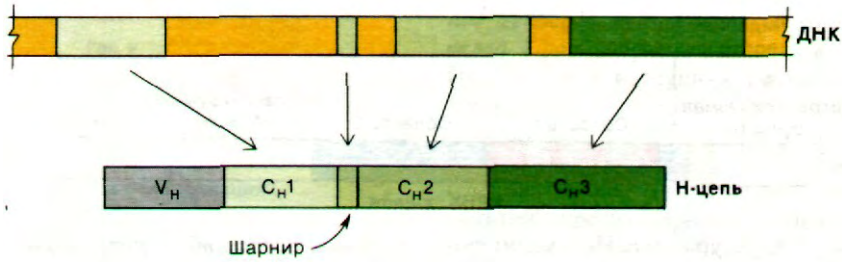


Рис. 33.30. Три домена константной (С) области тяжелой цепи и шарнирный участок кодируются разными участками гена.

чалом гена вариабельной области, между концом гена J_H и началом гена C_μ, а также в пределах гена C_μ выстригаются в ходе превращения первичного траскрипта в мРНК для μ-цепи.

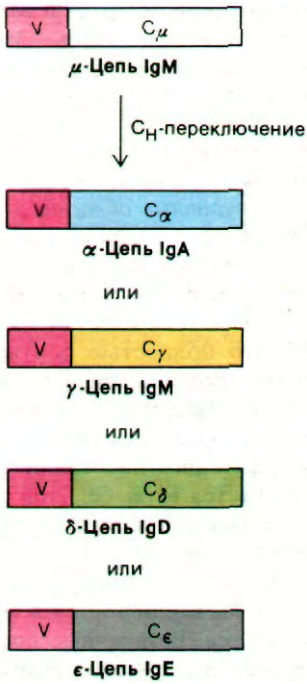


Рис. 33.31. Синтез различных классов иммуноглобулинов. В результате того, что ген V_H-области сначала соединяется с геном C_μ-области, а затем с каким-либо другим из генов С-области, формируются Н-цепи разных классов иммуноглобулинов.

Как показал анализ продуктов рестриктазного расщепления ДНК из эмбриональных и миеломных клеток, C_H-переключение происходит на уровне ДНК, а не РНК. Так, *при переключении от IgM к IgA ген $V_H J_H$, расположенный рядом с геном C_μ, перемещается в участок, расположенный рядом с геном C_α* (рис. 33.34). При этой рекомбинации гены между C_μ и C_α образуют петлю и выстригаются. Не исключено, что участки ДНК, претерпевающие рекомбинацию, несут палиндромную последовательность. Именно транслокация всего гена $V_H J_H$ лежит в основе того факта, что IgA, продуцируемый определенной клеткой, идентичен по антигенной специфичности IgM, синтезированному той же клеткой на более ранней стадии развития. Каким образом клетка выбирает для транслокации один из нескольких генов C_H, остается неизвестным. *Биологическое значение C_H-переключения состоит в том, что весь домен, ответственный за узнавание (вариабельный домен), перемещается от первоначальной константной области (C_μ) к другим константным областям, кодирующим полипептидные цепи с иными эффекторными функциями.*

33.25. Разнообразие антител обусловлено соматической рекомбинацией многих генов клеток зародышевого пути и соматической мутацией

Подытожим теперь те механизмы, которые обеспечивают разнообразие антител. Клетки зародышевого пути содержат довольно большой набор генов вариабельных областей. Легкая цепь х кодируется несколькими сотнями (скажем, 300) генов *V* и пятью генами *J*. Существует по крайней мере три рамки, в которых происходит соединение генов *V* и *J*. Отсюда следует, что общее число полных генов V_χ, образующихся при всех возможных сочетаниях генов *V* и *J*, составляет $300 \cdot 5 \cdot 3 = 4500$. Подобным же путем может возникнуть аналогичное число вариантов

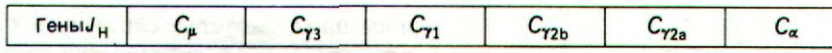


Рис. 33.32. Гены константных областей μ-, γ- и α-цепей расположены в ряд, один за другим. Положение генов C_δ и C_ε еще не установлено.

тяжелых цепей. Соединение 4500 L-цепей с 4500 H-цепями дает $4500 \cdot 4500 = 2 \cdot 10^7$ различных по антигенной специфичности антител. Это число достаточно велико, чтобы обеспечить то большое разнообразие антител, которое образуется в организме животного.

Как упоминалось выше, генов V_λ гораздо меньше, чем генов V_χ. Так, у мышей имеется, по-видимому, только 2 гена V_λ. Однако соответствующих этому гену последовательностей аминокислот обнаружено намного больше. Представляется вероятным, что разнообразие легких цепей λ возникает в результате соматических мутаций. *В целом, как мы видим, природа использует каждый из трех обсуждавшихся выше* (разд. 33.19) *источников разнообразия - большой набор генов клеток зародышевого пути, соматические рекомбинации и соматические мутации: в итоге возникает тот богатейший набор антител, который необходим для защиты организма от вторжения чужеродных веществ.*

33.26. Клонально-селекционная теория образования антител

В 50-х годах Нилс Ерне, Макферлейн Бёрнет, Дэвид Тэлмедж и Джошуа Ледерберг (Niels Jerne, Macfarlane Burnet, David Talmage, Joshua Lederberg) разработали клонально-селекционную теорию, дающую обобщенное описание иммунного ответа. Основные положения этой ныне общепринятой теории следующие.

1. Клетка, продуцирующая антитела, содержит ДНК с уникальной последовательностью оснований, определяющей последовательность аминокислот, характерную для синтезируемых ею цепей иммуноглобулина. Специфичность антитела целиком определяется последовательностью аминокислот.

2. Каждая отдельная клетка продуцирует антитела только одной специфичности. *Следовательно, способность к синтезу определенного антитела заложена в клетке еще до контакта с антигеном.*

3. Начинающая созревать клетка продуцирует небольшие количества антител одной специфичности. Часть из них прикрепляется к поверхности клетки. Если такая незрелая клетка встречается с антигеном, против которого оказались направлены ее антитела, то она погибает. Вследствие этого животное обычно не производит антител против собственных макромолекул, т. е. оно обладает *толерантностью к своему.* Действительно, клетки, продуцирующие антитела против собственных антигенов, элиминируются на протяжении эмбрионального развития. *На зрелые клетки* в отличие от незрелых *встреча с антигеном действует стимулирующим образом: усиливается синтез антител и запускается клеточное деление.* Потомки одной клетки составляют клон, обладающий всеми генетическими особенностями исходной клетки. Следовательно, деление клетки, инициированное контактом с антигеном, приводит к появлению клона клеток, синтезирующих антитела той же специфичности.

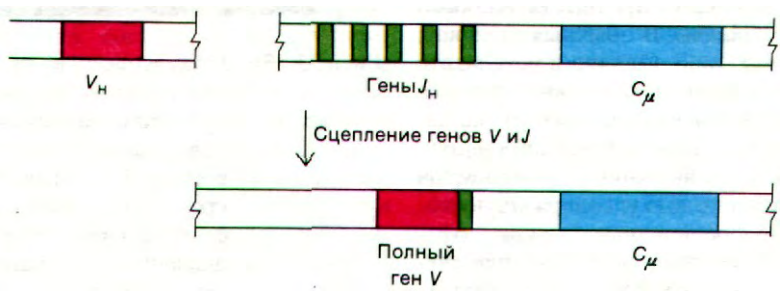


Рис. 33.33. В результате соединения генов V_H и J_H образуется ген, кодирующий μ-цепь.

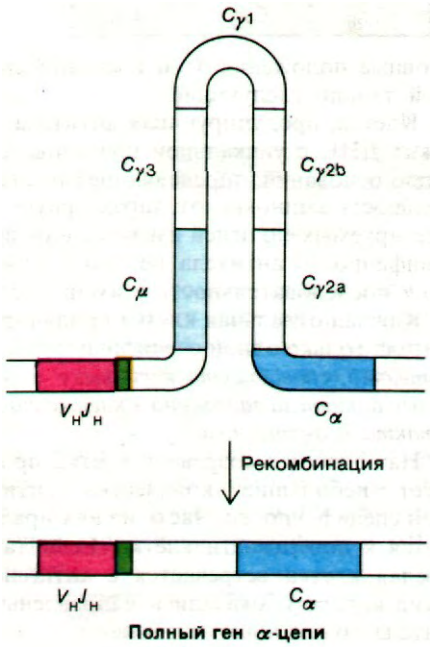


Рис. 33.34. Структурная основа $C_н$-переключения. В результате внутрихромосомной рекомбинации ген $V_н J_н$, находившийся возле гена $C_μ$, оказывается рядом с геном $C_α$.

4. Клон проявляет тенденцию к сохранению и после исчезновения антигена. В случае нового появления того же антигена происходит стимуляция этих клеток, что и обусловливает *иммунологическую память.*

33.27. На поверхности клеток, продуцирующих антитела, имеются рецепторы антигенов

Молекулы специфических антител расположены на поверхности продуцирующих их клеток. Клетками-предшественниками являются *лимфоциты.* В обычных условиях они делятся медленно. Однако в результате стимуляции антигеном лимфоцит превращается в *плазматическую клетку,* очень активно синтезирующую и продуцирующую антитела. Если популяцию лимфоцитов пропустить через колонку, содержащую ковалентно присоединенные динитрофенильные (ДНФ) группы, то на колонке свяжется только очень небольшая часть клеток, а именно те, которые синтезируют антитела против ДНФ и несут молекулы таких антител на своей поверхности. Не задержавшиеся на колонке лимфоциты таких антител против ДНФ не вырабатывают.

Как происходит стимуляция лимфоцитов под действием специфических антител? В отсутствие антигена молекулы антител на поверхности лимфоцита распределены случайным образом. Добавление антигена оказывает поразительный эффект: расположенные на поверхности лимфоцита антитела вместе с присоединенными антигенами собираются вместе на одном конце клетки. образуя так называемый «колпачок» («кэп»). По завершении перераспределения молекулы антител оказываются внутри клетки. *Образование «колпачка»* идет с потреблением энергии и при участии сократительных элементов клетки. Итак, формирование на поверхности клетки решетки из комплексов антиген—антитело ведет к образованию «колпачка», а это стимулирует клеточное деление. Антиген должен быть поливалентным (т. е. содержать более одной специфической детерминанты) для того, чтобы создать перекрестные связи между молекулами антител на поверхности лимфоцита. Вопрос о зависимости митотической активности клеточного ядра от этих событий,

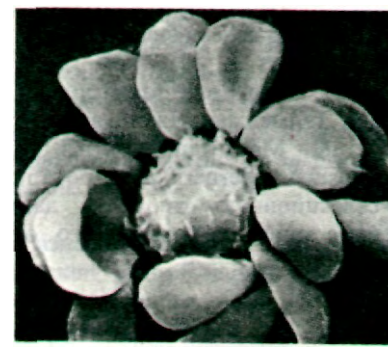


Рис. 33.35. Полученное в сканирующем электронном микроскопе изображение бараньих эритроцитов, связавшихся с человеческим Т-лимфоцитом (в центре). Поверхность этого лимфоцита имеет рецепторы, специфичные в отношении компонентов бараньих эритроцитов. (Печатается с любезного разрешения д-ра J. Thornthwaite, д-ра R. Life и д-ра M. Cayer.)

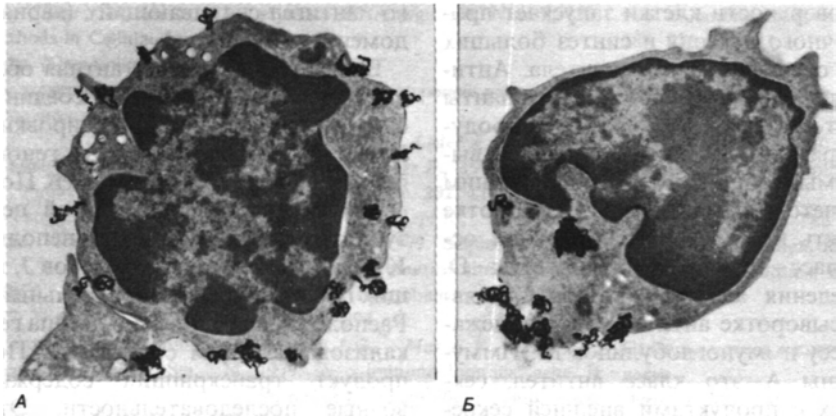


Рис. 33.36. Полученное методом радиоавтографии изображение иммуноглобулинов, образовавших «колпачок» на поверхности В-лимфоцита. Темные включения - меченные ^{125}I антитела против иммуноглобулинов, добавленные к В-лимфоцитам из селезенки мыши. *А* - при 4°С молекулы иммуноглобулинов равномерно распределяются на поверхности клетки; *Б* - после инкубации при 37°С метка концентрируется в виде «колпачка» на одном полюсе клетки и затем попадает внутрь посредством эндоцитоза. (Печатается с любезного разрешения д-ра Е. Unanue.)

разыгрывающихся на поверхности клетки, составляет интересную и важную область исследований.

33.28. Биологическое значение клональной селекции

Сущность теории селекции клонов в формулировке Бёрнета состоит в следующем:

> Ни один участок связывания антигена не адаптирован в эволюционном смысле в какой-либо определенной антигенной детерминанте. Структура участка, связывающего антиген, существует как таковая, и если она оказывается подходящей в том смысле, что сродство к данной антигенной детерминанте превышает какой-то определенный уровень, то инициируется иммунологически значимая реакция.

Отбор предсуществующих вариантов, возникающих случайным образом,- это не новая тема в биологии. В самом деле, в этом суть теории Дарвина. Любопытно отметить, что инструктивные теории предшествуют селекционным теориям: теория Ламарка предшествовала теории Дарвина, инструктивная теория в иммунологии была сформулирована раньше, чем клонально-селекционная теория.

Ерне высказал предположение, что механизмы отбора могут играть роль в функционировании нервной системы, например в механизмах памяти. По существу, инструктивная и селекционная теории обучения были сформулированы очень давно. Локк (Lock) считал, что мозг человека подобен чистому листу бумаги, на котором опыт выписывает почти бесконечные узоры. Сократ, напротив, утверждал, что «все обучение - это напоминание о том, что уже существует в мозгу». Будем надеяться, что эта глава вам кажется чем-то давно знакомым!

Заключение

Антитело - это белок, который синтезируется в организме животного в ответ на проникновение чужеродного макромолекулярного соединения (называемого антигеном или иммуногеном) и который обладает высоким сродством к нему. Небольшие чужеродные молекулы (гаптены) вызывают образование специфических антител только в том случае, если такие гаптены присоединены к макромолекулам. Синтез антител определяется действием отбора, а не инструкции. Антиген связывается на поверхности тех лимфоцитов, которые исходно синтезируют антитела, специфичные к данному антигену. Присоединение антигена к рецеп-

тору на поверхности клетки запускает процесс клеточного деления и синтез больших количеств специфического антитела. Антитела против специфической детерминанты обычно гетерогенны, поскольку они продуцируются разными клетками. Антитела, вырабатываемые одной клеткой или одним клоном клеток, гомогенны. В сыворотке имеется пять классов антител, причем основной класс - это иммуноглобулины D. После введения антигена первыми появляются в сыворотке антитела, принадлежащие к классу иммуноглобулинов M. Иммуноглобулины A - это класс антител, секретируемых с продуктами внешней секреции. Роль иммуноглобулинов D и E пока еще не установлена.

Антитела состоят из легких (L) и тяжелых (H) цепей. Иммуноглобулин G, имеющий субъединичную структуру L_2H_2, содержит два участка связывания антигена. При ферментативном расщеплении иммуноглобулина G образуются два F_{ab}-фрагмента, которые связывают антиген, но не дают с ним осадка, а также один F_c-фрагмент, обладающий функцией эффектора (в частности, связывает комплемент). Сравнение последовательностей аминокислот в миеломных иммуноглобулинах показало, что L- и H-цепи состоят из вариабельной (V) области (N-концевая последовательность, обычно из 108 остатков) и константной (C) области. Участки связывания антигена сформированы из остатков аминокислот, принадлежащих гипервариабельным участкам вариабельных областей как L-, так и H-цепей. Молекулы антител свертываются в компактные домены, содержащие примерно по 108 аминокислотных остатков в виде гомологичных последовательностей. Полагают, что домены константной области, выполняющие эффекторные функции, возникли в процессе эволюции путем удвоения и последующего расхождения гена, кодирующего антиген-связывающий (вариабельный) домен.

Вариабельная и константная области кодируются разными генами, соединяющимися в процессе дифференцировки клеток. Имеется несколько сотен генов вариабельных участков L- и H-цепей. Полный ген вариабельного участка легкой цепи образуется путем рекомбинации неполного гена *V* и одного из нескольких генов *J*, кодирующих последний гипервариабельный участок. Расположенная тандемно группа генов *J* локализована рядом с геном *C*. Первичный продукт транскрипции содержит вставочные последовательности. Эти вставочные последовательности удаляются, и в результате образуется мРНК, кодирующая вариабельные и константные области иммуноглобулина, а также N-концевую гидрофобную сигнальную последовательность, которая в последующем отщепляется от новосинтезированной полипептидной цепи. Синтез тяжелой μ-цепи IgM кодируется полным геном, также образовавшимся в результате сращивания генов *V* и *J*. Тяжелые цепи иммуноглобулинов других классов (в частности IgG) синтезируются после транслокации полного гена $V_н$ к другому гену *C* (C_γ). Этот перескок генов называется $C_н$-переключением. Разнообразие легких *x*-цепей, а также тяжелых цепей обусловлено соматической рекомбинацией довольно большого числа гаметных генов (т.е. генов клеток зародышевого пути) вариабельных областей и участков соединения. Степень разнообразия возрастает также в результате соединения генов в различных рамках. Разнообразие легких цепей обусловлено, по-видимому, соматическими мутациями. Сочетание нескольких тысяч видов L-цепей с таким же количеством видов H-цепей обеспечивает то огромное число различных антител, которое синтезируется в организме животного.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Capra J.D., Edmundson A.B., 1977. The antibody combining site, Sci. Amer., 236(1), 50-59.

Milstein C., 1980. Monoclonal antibodies, Sci. Amer., 243(4), 66-74.

Porter R.R., 1973. Structural studies of immunoglobulins, Science, 180, 713-716.

Edelman G.M., 1973. Antibody structure and molecular immunology, Science, 180, 830-840.

Книги

Hood L.E., Weissman I.L., Wood W.B., 1978. Immunology, Benjamin. (Ясное, легко читаемое изложение основ иммунологии.)

Kabat E.A., 1976. Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry, (2nd ed.), Holt, Rinehart, and Winston. (Прекрасное описание структуры иммуноглобулинов и ее связи со специфичностью связывания антигенов.)

Mishell B.B., Shiigi S.M. (eds.), 1980. Selected Methods in Cellular Immunology, Freeman. (Очень хорошее руководство по экспериментальным методам в иммунологии.)

Структура иммуноглобулинов

Amzel L.M., Poljak R.J., 1979. Three-dimensional structure of immunoglobulins, Ann. Rev. Biochem., **48,** 961-967.

Silverton E.W., Navia M.A., Davies D.R., 1977. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin, Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 5140-5144.

Valentine R.C, Green N.M., 1967. Electron microscopy of an antibody-hapten complex, J. Mol. Biol., 27, 615-617.

Архитектура генов

Tonegawa S., Maxam A.M., Tizard R., Bernard O., Gilbert W., 1978. Sequence of a mouse germ-line gene for a variable region of an immunoglobulin light chain, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 1485-1489.

Sakano H., Rogers J.H., Huppi K., Brack C., Traunecker A., Maki R., Wall R., Tonegawa S., 1979. Domains and the hinge region of an immunoglobulin heavy chain are encoded in separate DNA segments, Nature, 277, 627-633.

Механизмы, создающие разнообразие антител

Seidman J.G., Leder A., Nau M, Norman B., Leder P., 1978. Antibody diversity, Science, 202, 11-17.

Sakano H., Huppi K., Heinrich G., Tonegawa S., 1979. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes, Nature, **280,** 288-294.

Seidman J.G., Max E.E., Leder P., 1979. A χ-immunoglobulins gene is formed by site-specific recombination without further somatic mutation, Nature, 280, 370-375.

Schilling J., Clevinger B., Davie J.M., Hood L., 1980. Amino acid sequence of homogeneous antibodies to dextran and DNA rearrangements in heavy chain V-region gene segments, Nature, 283, 35-40.

Kataoka T., Kawakami T., Takahashi-N., Honjo T., 1980. Rearrangement of immunoglobulin γ^1-chain gene and mechanism for heavy-chain class switch, Proc. Nat. Acad. Sci, 77, 919-923.

Davis M.M., Calame K., Early P.W., Livant D.L., Joho R., Weissman I.L., Hood L., 1980. An immunoglobulin heavy-chain gene is formed by at least two recombinational events, Nature, 283, 733-739.

Эффекторные функции иммуноглобулинов

Porter R.R., Reid K.B.M., 1978. The biochemistry of complement, Nature, 275, 699-704.

Metzger H., 1978. The IgE-mast cell system as a paradigm for the study of antibody mechanisms, Immunol. Rev., **41,** 186-199.

Селекция клонов и клеточная иммунология

Burnet F.M., 1959. The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity, Cambridge University Press.

Jerne N.K., 1967. Antibodies and learning: selection versus instruction. In: Quarton G.C, Melnechuk T. and Schmitt F.O. (eds.), The Neurosciences: A Study Program, Rockefeller University Press.

Cunningham B.A., 1977. The structure and function of histocompatability antigens, Sci. Amer., 237(4), 96-107.

Raff M.C., 1976. Cell-surface immunology, Sci. Amer., 234(5), 30-39.

Jerne N.K., 1973. The immune system, Sci. Amer., **229(1),** 52-60.

ГЛАВА 34

Мышечное сокращение и подвижность клеток

Каким образом энергия химических связей трансформируется в координированное движение? Это один из самых острых вопросов современной молекулярной биологии. Направленное движение имеет место при расхождении хромосом в процессе клеточного деления, при внедрении ДНК бактериофага в бактериальную клетку, при биении ресничек и жгутиков, при активном транспорте молекул, при перемещении РНК в ходе белкового синтеза и - в наиболее очевидной форме - при мышечном сокращении. В данной главе мы будем рассматривать главным образом структурную основу процесса сокращения поперечнополосатых мышц позвоночных, поскольку этот процесс изучен наиболее полно. Сократительная система поперечнополосатой мышцы состоит из перекрывающихся белковых нитей, которые скользят относительно друг друга. Сокращение происходит за счет энергии, высвобождающейся при гидролизе АТР. В поперечнополосатой мышце оно зависит от концентрации Ca^{2+}, которая в свою очередь регулируется саркоплазматическим ретикулумом - специализированной системой мембран, накапливающей Ca^{2+} в состоянии покоя и высвобождающей его при воздействии на мышечное волокно нервного импульса.

34.1. Мышца состоит из взаимодействующих друг с другом толстых и тонких белковых нитей

Произвольные мышцы позвоночных в световом микроскопе выглядят *поперечно исчерченными* (рис. 34.1). Они состоят из клеток, окруженных электровозбудимой мембраной - *сарколеммой*. Мышечная клетка содержит большое число параллельных *миофибрилл* диаметром около 1 мкм каждая. Миофибриллы погружены во внутриклеточную жидкость, называемую *саркоплазмой*. В саркоплазме имеются гликоген, АТР, фосфокреатин и гликолитические ферменты. В активно функционирующих мышцах обнаруживается также много митохондрий, регулярно расположенных вдоль миофибрилл.

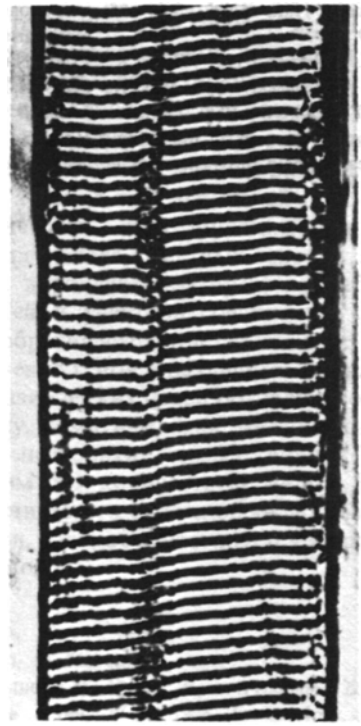


Рис. 34.1. Волокно скелетной мышцы в фазово-контрастном световом микроскопе. Диаметр волокна около 50 мкм. А-диски — темные, I-диски - светлые. (Печатается с любезного разрешения д-ра Hugh Huxley.)

Электронная микрофотография продольного среза миофибрилл выявляет множество деталей структуры (рис. 34.2 и 34.3). Функциональной единицей является *саркомер,* который повторяется каждые 2,3 мкм (23 000 А) по длинной оси фибриллы. Регулярно чередуются темная полоса - *А-диск* и светлая полоса - *I-диск.* Середина А-диска, называемая *зоной Н,* отличается меньшей электронной плотностью. По центру зоны Н проходит темная *М-линия.* I-диск пересекается узкой *Z-пластинкой* высокой электронной плотности.

О молекулярном устройстве саркомера в толщину можно судить по электронным микрофотографиям поперечного среза через миофибриллу. На них видны *два типа взаимодействующих друг с другом белковых нитей (миофиламентов).* Диаметр *толстых нитей* равен примерно 150 А, а диаметр тонких - около 70 А. Толстые нити содержат главным образом *миозин,* тонкие - актин, *тропомиозин* и *тропонин.* В Z-пластинке имеется α-актинин, а в М-линиях - М-белок.

I-диск состоит только из тонких нитей, тогда как в зоне Н А-диска присутствуют только толстые нити. В других частях А-диска присутствуют нити обоих типов. На поперечном срезе четко видно гексагональное устройство миофибриллы, при котором каждая тонкая нить соседствует с тремя толстыми, а каждая толстая нить окружена шестью тонкими (рис. 34.3). Взаимодействие толстых и тонких нитей осуществляется с помощью *поперечных мостиков,* которые представляют собой домены молекул миозина. Поперечные мостики, с регулярными интервалами выступающие на толстых нитях, перекрывают промежуток шириной 130 А между поверхностью толстых и тонких нитей (рис. 34.4 и 34.5). По существу, именно взаимодействие миозиновых поперечных мостиков с единицами актина в тонких нитях генерирует силу сокращения.

34.2. При мышечном сокращении происходит скольжение толстых и тонких нитей относительно друг друга

Когда мышца сокращается, степень ее укорочения может достигнуть $^1/_3$ первоначальной длины. С чем это связано? В 50-х годах две группы исследователей независимо друг от друга постулировали, исходя из данных дифракции рентгеновских лучей, световой и электронной микроскопии, модель мышечного сокращения, получившую название *модель скользящих нитей.* Основные черты этой модели (рис. 34.6), выдвинутой Эндрью Хаксли и Р. Нидергерке (Andrew Huxley, R. Niedergerke), а также Хью Хаксли и Джейн Хенсон (Hugh Huxley, Jean Hanson), заключаются в следующем.

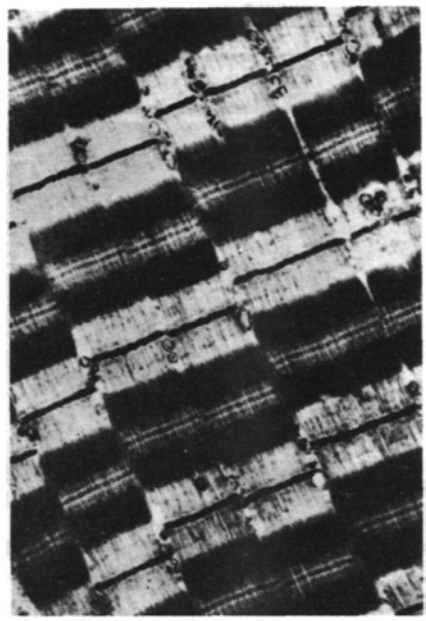


Рис. 34.2. Электронная микрофотография продольного среза волокна скелетной мышцы. (Печатается с любезного разрешения д-ра Hugh Huxley.)

1. Длина как толстых, так и тонких нитей в ходе мышечного сокращения не меняется.
2. В то же время длина саркомера при сокращении уменьшается вследствие того, что нити двух типов перекрываются в большей степени, а именно *в ходе сокращения толстые и тонкие нити скользят относительно друг друга.*
3. Сила сокращения генерируется в результате активного движения нитей одного типа вдоль прилегающих нитей другого типа.

В пользу этой модели свидетельствуют данные, полученные при измерении длины А- и I-дисков, а также зоны Н в растянутой, покоящейся и сократившейся мышце (рис. 34.6). А-диск характеризуется постоян-

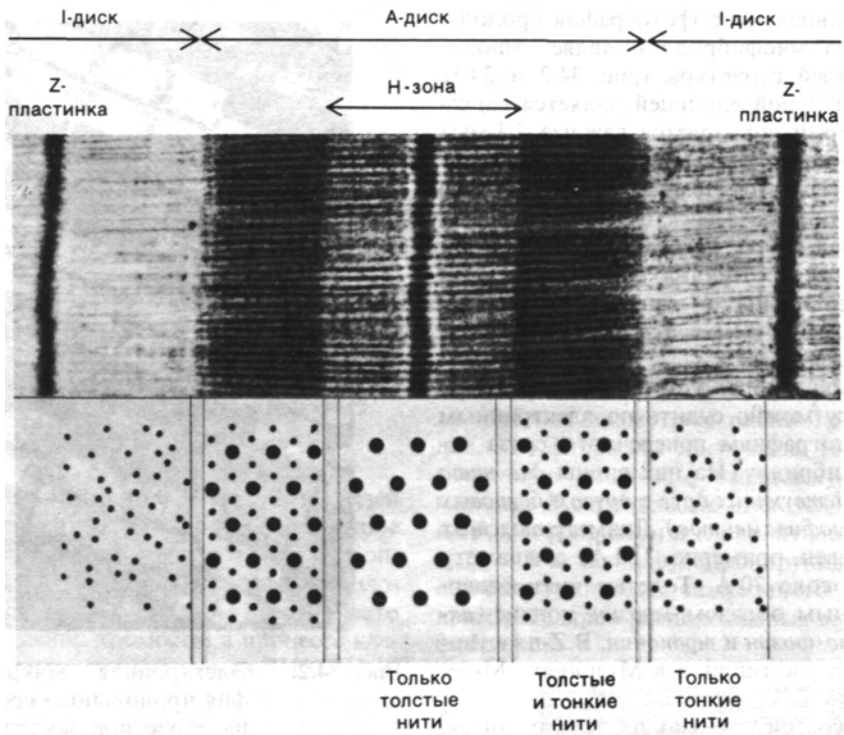


Рис. 34.3. Электронограмма продольного среза миофибриллы скелетной мышцы. Под микрофотографией приведено схематическое изображение соответствующих поперечных срезов. (Печатается с любезного разрешения д-ра Hugh Huxley.)

ной длиной, т. е. размер толстых нитей при сокращении не меняется. Расстояние между Z-пластинкой и началом ближайшей к ней зоны H также постоянно; следовательно, и размер тонких нитей не меняется при сокращении. Однако зона H и I-диск при сокращении становятся уже, поскольку в сократившемся волокне толстые и тонкие нити перекрываются в большей мере, чем в покоящейся мышце.

34.3. Миозин образует толстые нити; он гидролизует ATP и связывает актин

Миозин обладает тремя биологически важными функциями. Во-первых, при физиологических значениях ионной силы и pH молекулы миозина в растворе спонтанно образуют волокна. По существу, *толстые*

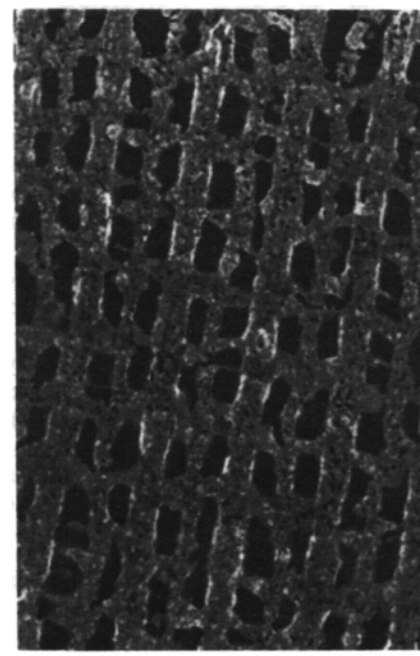


Рис. 34.4. Вид поперечных мостиков между толстыми и тонкими нитями под электронным микроскопом. (Печатается с любезного разрешения д-ра John Heuser.)

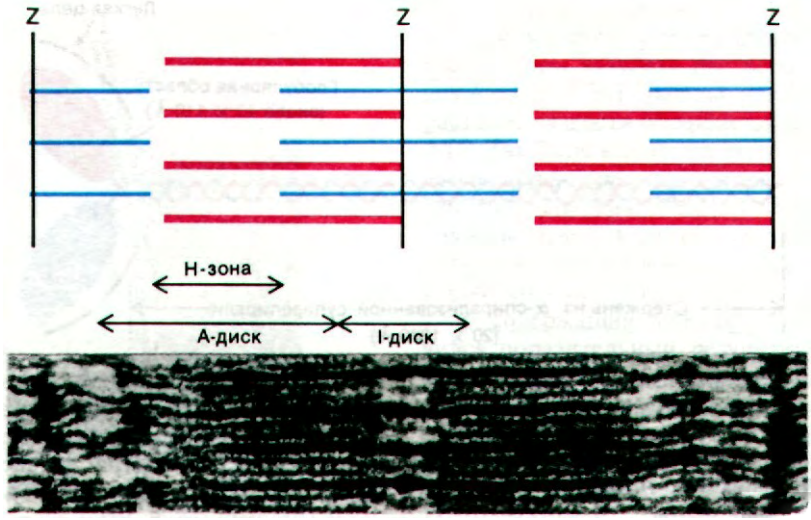


Рис. 34.5. Схематическое изображение структуры поперечнополосатой мышцы, показывающее взаимное перекрывание толстых и тонких нитей, и соответствующая электронная микрофотография сверхтонкого продольного среза. (Печатается с любезного разрешения д-ра Hugh Huxley.)

нити миофибрилл состоят в основном из молекул миозина. Во-вторых, миозин - это фермент. В 1939г. В. А. Энгельгардт и М. Н. Любимова обнаружили, что миозин обладает АТР-азной активностью:

$$ATP + H_2O \rightleftarrows ADP + P_i + H^+$$

Эта реакция является непосредственным источником свободной энергии, необходимой для мышечного сокращения. В-третьих,

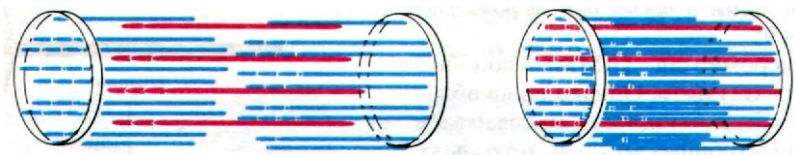


Рис. 34.6. Модель скользящих нитей. (Huxley H. E., The mechanism of muscular contraction, Scientific American, Inc., 1965.)

миозин связывает полимеризованную форму актина - основного компонента тонких нитей. Именно это взаимодействие играет ключевую роль в генерировании силы, обеспечивающей смещение толстых и тонких нитей относительно друг друга.

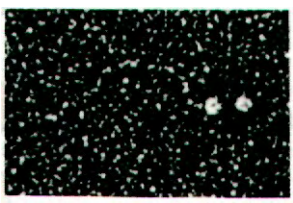


Рис. 34.7. Электронная микрофотография молекулы миозина. (Печатается с любезного разрешения д-ра Susan Lowey.)

Молекула миозина очень большая (500 кДа). Она состоит из двух идентичных основных цепей (по 200 кДа) и четырех легких цепей (примерно по 20 кДа). На электронных микрофотографиях видно, что миозин состоит из глобулярной, образующей две головки части, присоединенной к очень длинному стержню (рис. 34.7 и 34.8). Стержень представляет собой двухцепочечную α-спирализованную суперспираль.

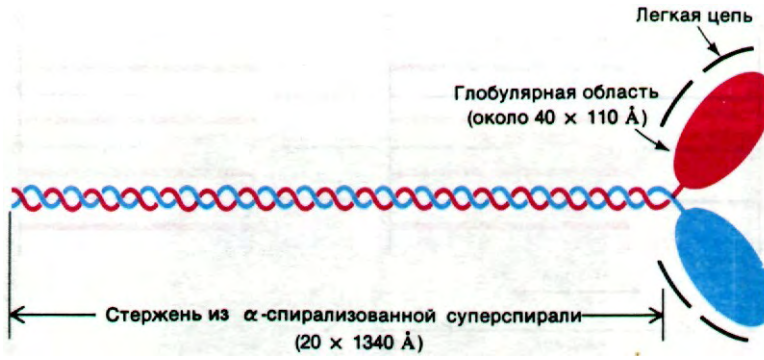


Рис. 34.8. Схематическое изображение молекулы миозина.

34.4. Миозин можно расщепить на активные фрагменты

Если миозин подвергнуть ферментативному расщеплению, то образуются фрагменты, сохраняющие некоторые функции интактной молекулы. Выше на примере иммуноглобулинов (разд. 33.5) уже было показано, насколько плодотворен такой экспериментальный подход при изучении макромолекул. На самом же деле этот подход был разработан для миозина раньше, чем для иммуноглобулинов. В 1953 г. Эндрью Сент-Дьёрдьи (Andrew Szent Gyorgyi) показал, что при обработке трипсином миозин расщепляется на два фрагмента, названные им *легким меромиозином* и *тяжелым меромиозином* (рис. 34.9).

Легкий меромиозин (ЛММ), подобно миозину, образует нити. Однако он не обладает АТР-азной активностью и не связывает актина. На электронных микрофотографиях видно, что ЛММ имеет форму стержня; удлиненность структуры обусловливает высокую вязкость растворов ЛММ. Данные определения оптического вращения показали, что 90% молекулы ЛММ имеет структуру α-спирали. Это подтверждалось и при анализе дифракции рентгеновских лучей; волокна ЛММ дают сильный рефлекс при 5,1 А, характерный для α-спирализованных суперспиралей. В целом, как было установлено, ЛММ представляет собой *двухцепочечный α-спирализованный стержень длиной 850 А.*

Тяжелый меромиозин (ТММ) обладает совершенно иными свойствами. ТММ катализирует гидролиз АТР и связывает актин, но не способен к образованию волокон. ТММ состоит из вытянутой стержневидной части и глобулярной (в виде двух головок) области (рис. 34.9). При дальнейшем ферментативном расщеплении ТММ распадается на два глобулярных субфрагмента (обозначаемых S1) и один фибриллярный субфрагмент (S2). *Каждый S1-фрагмент имеет участок с АТР-азной активностью и участок связывания актина.* Кроме того, к S1-фрагменту присоединены легкие цепи миозина. *Легкие цепи способны модулировать АТР-азную активность миозина.* Так, например, в гладких мышцах ими опосредовано регулирующее действие Ca^{2+} на сокращение.

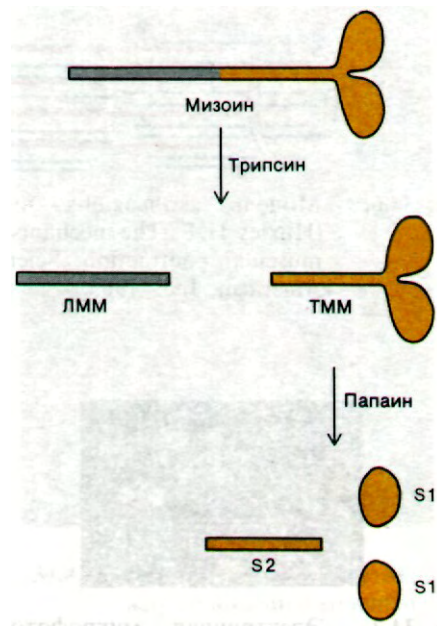


Рис. 34.9. Ферментативное расщепление миозина. На схеме не показаны 4 легкие цепи.

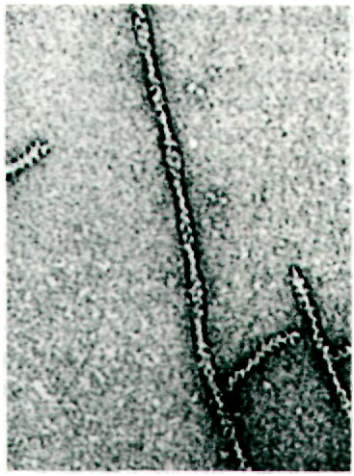


Рис. 34.10. Электронная микрофотография нити из очищенного F-актина. (Печатается с любезного разрешения д-ра James Spudich.)

34.5. Актин образует нити, которые соединяются с миозином

Актин - основной компонент тонких нитей. В растворах с низкой ионной силой актин существует в виде мономера массой 42 кДа, обозначаемого как *G-актин* (G от англ. globular - глобулярный). При повышении ионной силы до физиологического уровня G-актин полимеризуется в *F-актин* - фибриллярную форму, очень похожую на тонкие нити. На электронных микрофотографиях волокна F-актина выглядят как две нити бус, закрученные одна вокруг другой (рис. 34.10). Рентгеноструктурный анализ показал, что *F-актин представляет собой спираль из мономеров актина.* Диаметр спирали - около 70 А. Структура состоит из повторяющихся участков длиной 360 А по оси спирали (рис. 34.11).

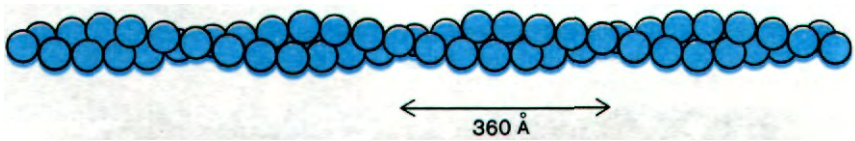


Рис. 34.11. Схематическое изображение F-актина, состоящего из спирально расположенных мономеров актина. (По схеме, любезно предоставленной д-ром James Spudich.)

При добавлении раствора актина к раствору миозина образуется комплекс этих белков *актомиозин.* Формирование этого комплекса сопровождается большим увеличением вязкости раствора. В 40-х годах Альберт Сент-Дьёрдьи показал, что возрастание вязкости обращается добавлением АТР. Так было выявлено, что АТР вызывает *диссоциацию актомиозина* на актин и миозин. Сент-Дьёрдьи получил также нити актомиозина, молекулы которого были ориентированы определенным образом током жидкости. Когда эти нити поместили в раствор, содержащий АТР, K^+ и Mg^{2+}, получился поразительный результат: *актомиозиновые нити сократились.* В тех же условиях нити, образованные из одного миозина, не сокращались. *Эти замечательные опыты дали основание думать, что мышечное сокращение возникает в результате взаимодействия миозина, актина и АТР.*

34.6. Актин повышает АТР-азную активность миозина

АТР-азная активность миозина значительно возрастает в присутствии стехиометрических количеств F-актина. Так, число оборотов увеличивается в 200 раз: от 0,05 до 10 $с^{-1}$. Собственно гидролиз АТР чистым миозином идет очень быстро, но продукты реакции-ADP и P_i - высвобождаются медленно. Актин увеличивает число оборотов миозина, присоединяясь к комплексу миозин—ADP—P_i и ускоряя высвобождение ADP и P_i (рис. 34.12). После акта гидролиза актомиозин связывается с АТР, что приводит к его диссоциации на актин и миозин. В результате вновь образуется комплекс миозин—АТР, входящий в новый каталитический цикл. Эти реакции идут с участием Mg^{2+}. Важнейшая особенность рассматриваемого цикла, который был предложен Эдвином Тейлором (Edwin Taylor) на основе изучения быстрой кинетики процесса, состоит в том, что актин обладает высоким сродством к миозину и комплексу миозин—ADP—P_i, но низким сродством к комплексу миозин—АТР. *Вследствие этого актин то присоединяется к миозину, то высвобождается из комплекса*

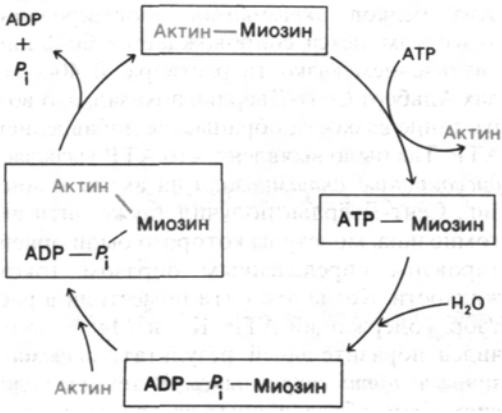


Рис. 34.12. Гидролиз ATP приводит к циклическому образованию и распаду комплекса актина и миозина.

с ним - в зависимости от гидролиза ATP. Как будет показано ниже, это ATP-зависимое изменение во взаимодействии миозина и актина лежит в основе генерирования силы при мышечном сокращении.

34.7. Толстые и тонкие нити мышечного волокна определенным образом ориентированы

Циклический процесс образования и диссоциации комплекса миозина и актина создает координированное движение потому, что эти белки входят в состав высокоорганизованной системы. Путем изучения интактных миофиламентов, отделенных от мышцы, а также искусственных волокон, образованных из очищенного миозина, Хью Хаксли показал, как расположены молекулы миозина в толстых нитях. *Выделенная* из мышечного волокна *толстая нить* имеет диаметр 160 А и длину примерно 1,5 мкм (15 000 А). Вдоль нити периодически по спирали выступают *поперечные мостики,* и только в середине остается *свободная от мостиков область* протяженностью 1500 А (рис. 34.13).

Аналогичную структуру имеют и *искусственные толстые нити,* образующиеся при снижении ионной силы раствора миозина. Длина наиболее короткой искусственной нити составляет около 3000 А, а расположенная в середине свободная от мостиков зона - 1500 А. Поскольку такая же протяженность свободной зоны свойственна и более длинным искусственным нитям, очевидно, что рост толстых нитей происходит путем добавления молекул параллельно к уже собранному ряду. *Молекулы миозина, расположенные по одну сторону от свободной от мостиков зоны, ориентированы в одном направлении, тогда как молекулы по другую сторону ориентированы в противоположном направлении. Следовательно, толстые нити по самой своей природе биполярны.*

ЛММ, подобно миозину, агрегирует в растворах с низкой ионной силой, образуя нити с периодической структурой, где длина

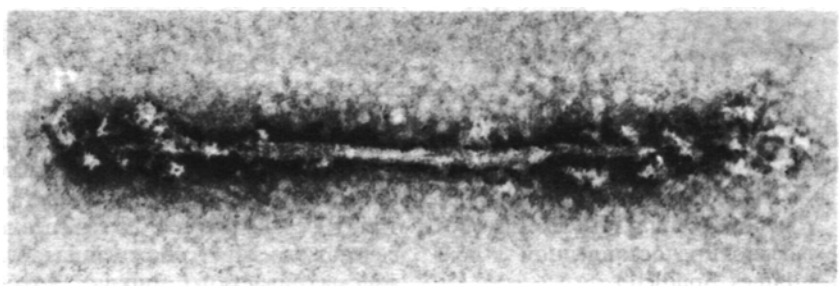


Рис. 34.13. Электронная микрофотография реконструированной толстой нити.
По обе стороны от свободной зоны видны выступающие поперечные мостики. (Печатается с любезного разрешения д-ра Hugh Huxley.)

повторяющегося участка составляет по оси 430 А, т. е. столько же, сколько составляет расстояние между поперечными мостиками в интактной толстой нити. Однако нити из ЛММ гладкие, без выступающих мостиков. Это показывает, что *поперечные мостики образуются в ТММ-части миозина, тогда как ЛММ-единицы миозина образуют скелет толстых нитей.*

Тонкие нити также имеют определенное направление. Если миозин (или ТММ, или

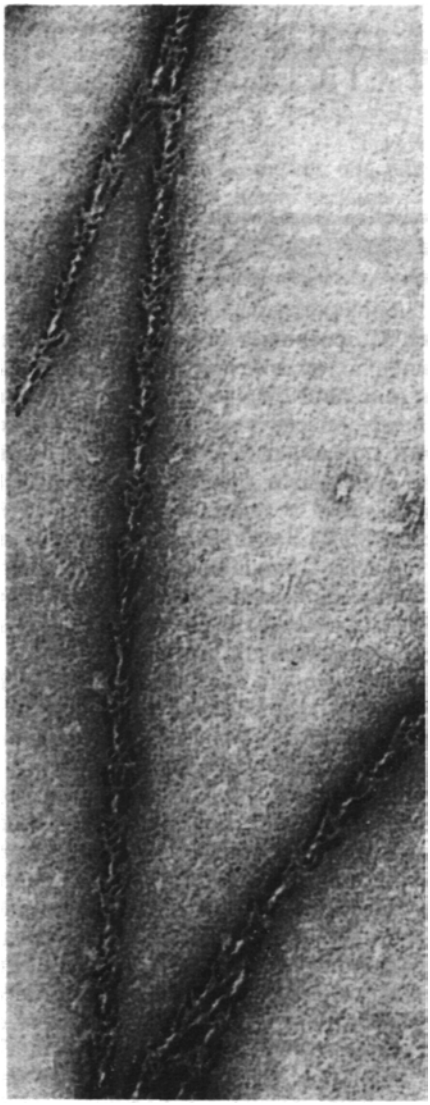


Рис. 34.14. Электронная микрофотография нити F-актина, декорированной S1-головками ТММ. Все стрелки ориентированы в одну сторону. (Печатается с любезного разрешения д-ра James Spudich.)

S1) добавить к тонким нитям или F-актину, то формируется структура, которая под электронным микроскопом выглядит как ряд последовательно расположенных стрелок (рис. 34.14). Такие структуры получили образное название *декорированные нити*. По всей длине декорированных нитей стрелки на обоих тяжах направлены в одну сторону. Таким образом, *тонким нитям изначально присуща направленность, одинаковая на обоих тяжах, составляющих тонкую нить.* В некоторых препаратах тонких нитей, полученных из гомогенизированных мышц, часть нитей сохраняет связь с Z-пластинкой. При декорировании таких препаратов тяжелым меромиозином стрелки на всех нитях оказались направлены в сторону от Z-пластинки. Отсюда следует, что *все тонкие нити по одну сторону от Z-пластинки ориентированы в одном направлении, тогда как нити, расположенные по другую сторону,- в противоположном.*

34.8. Полярность толстых и тонких нитей в середине саркомера меняется на противоположную

Полярность структуры толстых и тонких нитей играет решающую роль в координированном движении. Благодаря тому что участки взаимодействия на нитях актина и миозина ориентированы одинаково по отношению друг к другу, в ходе скольжения нитей происходит сложение сил, развивающихся в каждом участке взаимодействия. *Кроме того, посередине между двумя Z-пластинками направление нитей меняется на противоположное* (рис. 34.15). В итоге две тонкие нити при взаимодействии с одной толстой скользят навстречу друг другу, что приводит к уменьшению расстояния между Z-пластинками (рис. 34.16).

34.9. «Рабочим ходом» является поворот связанной с актином S1-головки миозина

Генерирование силы сокращения связано с циклическим образованием и диссоциацией комплекса между S1-головкой миозина и актином. Циклически повторяющиеся процессы присоединения, подтягивания

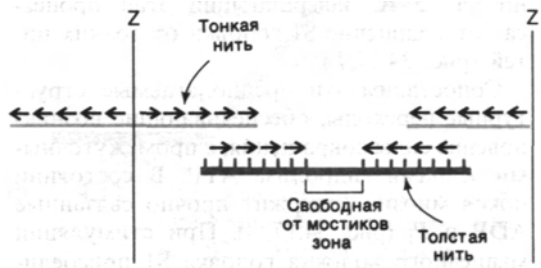


Рис. 34.15. Перемена полярности толстых и тонких нитей посередине между двумя Z-пластинками.

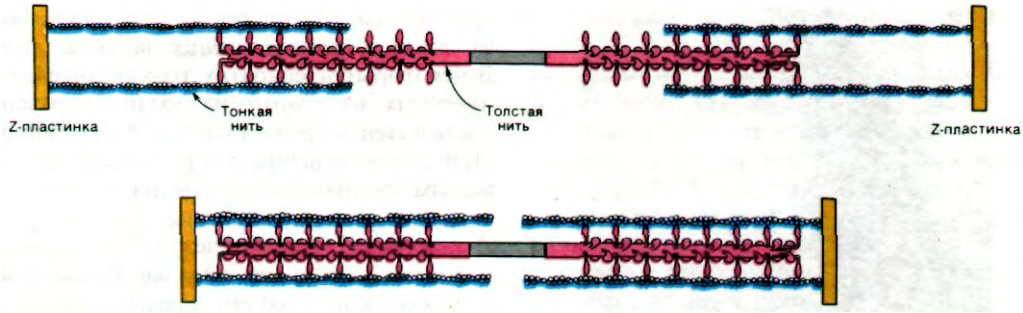


Рис. 34.16. Схема взаимодействия толстых и тонких нитей при сокращении скелетной мышцы. (По схеме, любезно предоставленной д-ром James Spudich.)

и отсоединения сопровождают даже одиночное сокращение. Механизм генерирования силы сокращения изучается в настоящее время методами биохимии, электронной микроскопии, дифракции рентгеновских лучей. Полученные данные показывают, что в покоящейся мышце головки S1 не связаны с тонкими нитями (рис. 34.17, *А*). В этом физиологическом состоянии головки S1 располагаются вокруг толстой нити по спирали. При стимуляции мышцы S1-головки отодвигаются от толстых нитей и прикрепляются к актиновым единицам на тонких нитях (рис. 34.17, *Б*). На следующем этапе головки S1 меняют свое направление так, что их длинная ось образует угол примерно 45° с осью тонких нитей (рис. 34.17, *В*). *Этот постулированный поворот головок миозина является, по-видимому, рабочим ходом мышечного сокращения.* Через S2-единицу миозина поворот S1-домена передается на толстую нить. В итоге толстая нить продвигается относительно тонкой примерно на 75 А. Завершающий этап процесса - отсоединение S1-головки от тонких нитей (рис. 34.17, *Г*).

Сопоставим эти предполагаемые структурные переходы, обеспечивающие возникновение силы сокращения, с промежуточными этапами гидролиза ATP. В состоянии покоя миозин содержит прочно связанные ADP и P_i (рис. 34.17, *А*). При стимуляции мышечного волокна головка S1 присоединяется к тонкой нити в перпендикулярном ей направлении (рис. 34.17, *Б*). Далее ADP и P_i, связанные с S1, высвобождаются, а головка S1 совершает поворот, принимая наклонное положение по отношению к тонкой нити (рис. 34.17, *В*). Таким образом, «рабочий ход» обеспечивается высвобождением прочно связанных ADP и P_i. На следующем этапе происходит отделение головки S1 от тонкой нити вследствие связывания ATP (рис. 34.17, *Г*). Далее отсоединенная от актина головка S1 вновь становится около тонкой нити перпендикулярно ей. Завершающий этап цикла - гидролиз ATP головкой S1, не связанной с актином.

В молекуле миозина имеется два типа шарнирных соединений, благодаря которым головка S1 обратимо присоединяется к актину или отсоединяется от него, а также, находясь в связанном с актином состоянии, меняет свое направление. Шарнир одного типа локализован между каждой из головок S1 и стержнем S2, а шарнир второго типа - между S2 и ЛММ-единицей миозина (рис. 34.18). Шарниры представляют собой гибкие участки полипептидной цепи, легко расщепляемые гидролитическими ферментами. Собственно сам факт ферментативного расшепления миозина на фрагменты ЛММ, S1 и S2 указывает на то, что *миозин образован из доменов, соединенных между собой шарнирными участками.* Функция домена S2 состоит в передаче напряжения от связанной с тонкой нитью головки S1 на домен ЛММ, составляющий часть толстой нити. Благодаря шарнирному участку между S1 и S2 головка S1 может поразному взаимодействовать с актином в зависимости от того, имеются ли на ней прочно связанные ADP и P_i или нет. Другой шарнирный участок, соединяющий S2 и ЛММ, допускает довольно большие изменения в положении S1 относительно толстой нити и тем самым обеспечивает точность взаимодействия S1 с актином. В итоге напряжение может генерироваться на большом протяжении латеральных поверхностей толстых и тонких нитей. В целом *сег-*

ментарная подвижность (гибкость) шарнирного типа играет критическую роль в мышечном сокращении, так же как и в механизме действия антител (разд. 33.7).

34.10. Тропонин и тропомиозин опосредуют регуляторное действие ионов кальция на мышечное сокращение

Физиологическим регулятором мышечного сокращения служит Ca^{2+}. Сетсуро Эбаши (Setsuro Ebashi) открыл, что влияние Ca^{2+} на взаимодействие актина и миозина опосредовано *тропомиозином* и *тропониновым комплексом,* которые локализованы в тонких нитях и составляют около трети их массы. Тропомиозин представляет собой двухцепочечный α-спирализованный тяж. Этот очень сильно вытянутый белок массой 70 кДа располагается почти параллельно длинной оси тонкой нити (рис. 34.19). Тропонин - комплекс трех полипептидных цепей: ТнС (18 кДа), ТнI (24 кДа) и ТнТ (37 кДа). ТнС связывает ионы кальция, ТнI связывается с актином, а ТнТ - с тропомиозином. Тропониновые комплексы расположены на тонких нитях на расстоянии 385 А друг от друга, причем этот интервал задается длиной тропомиозина. Тропониновый комплекс, связанный с одной молекулой тропомиозина, регулирует активность примерно 7 мономеров актина.

В отсутствие Ca^{2+} тропонин и тропомиозин ингибируют взаимодействие актина и миозина. При этом тропомиозин стерически блокирует участки связывания S1 на актине. Нервный импульс, как будет показано ниже, запускает высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума. Высвобожденный Ca^{2+} связывается с ТнС-компонентом тропонина, что вызывает конформационные сдвиги, передающиеся на тропомиозин и затем на актин. В частности, тропомиозин передвигается к центру длинной впадины, идущей спирально вдоль тонкой нити. Это разрешает взаимодействие S1-головок миозина с актиновыми единицами тонких нитей. Возникает сила сокращения и одновременно гидролизуется АТР; далее происходит удаление Ca^{2+}, и тропомиозин вновь блокирует доступ актина к S1-головкам миозина. Таким образом, *Ca^{2+} регулирует мышечное сокращение по аллостерическому механизму со следующей последовательностью передачи информации:*

Ca^{2+} —> Тропонин —> Тропомиозин —> —> Актин —> Миозин.

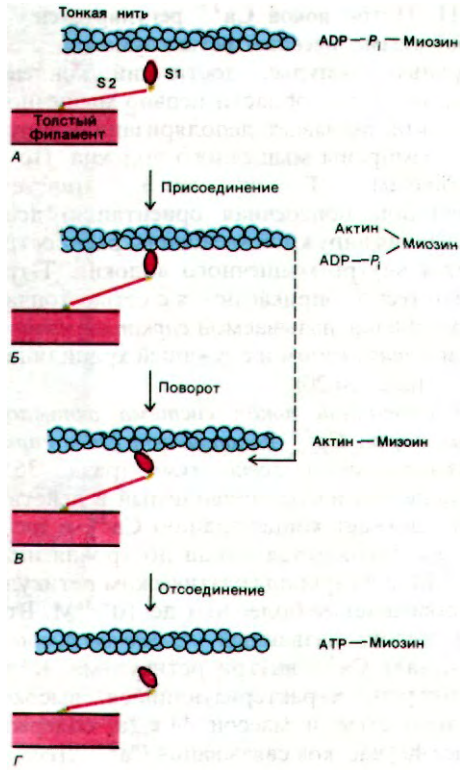


Рис. 34.17. Предполагаемый механизм генерирования силы при взаимодействии S1-головок нитей миозина с нитями актина. Поворот головки S1, связанной с актином, вызывает движение толстых нитей относительно тонких (на схеме - переход от *Б* к *В*).

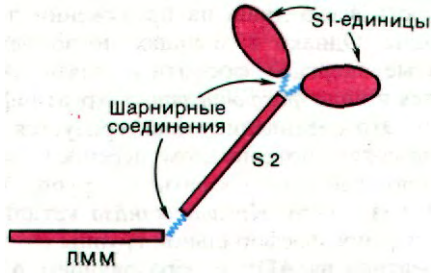


Рис. 34.18. Два типа шарнирных соединений в миозине - один между S1 и S2, второй между S2 и ЛММ - позволяют изменять положение головки S1 по отношению к актину во время «рабочего хода».

34.11. Поток ионов Ca^{2+} регулируется саркоплазматическим ретикулумом

Нервный импульс, достигший концевой пластинки, т.е. области нервно-мышечного контакта, вызывает деполяризацию наружной мембраны мышечного волокна. По Т-трубочкам (Т от англ. transverse orientation - поперечная ориентация) деполяризация наружной мембраны распространяется внутрь мышечного волокна. Т-трубочки тесно соприкасаются с сетью тончайших каналов, называемой *саркоплазматическим ретикулумом* и служащей хранилищем Ca^{2+} (рис. 34.20).

В состоянии покоя система активного транспорта Ca^{2+} накапливает его в саркоплазматическом ретикулуме (разд. 36.9). Кальциевый насос, приводимый в действие АТР, снижает концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме покоящихся мышц до уровня ниже 10^{-6} М, а в саркоплазматическом ретикулуме повышает ее более чем до 10^{-3} М. Второй белок, названный *кальсеквестрином,* связывает Ca^{2+} внутри ретикулума. Кальсеквестрин, характеризующийся высокой кислотностью и массой 44 кДа, содержит более 40 участков связывания Ca^{2+}. *Деполяризация мембран Т-трубочек вызывает выброс Ca^{2+} из цистерн саркоплазматического ретикулума.* Высвобожденный Ca^{2+} связывается с ТнС-компонентом тропонинового комплекса и стимулирует мышечное сокращение, как это было описано выше.

34.12. Фосфокреатин - форма запасания ~Р

То количество АТР, которое имеется в мышце, может поддержать сократительную активность всего лишь на протяжении доли секунды. Однако в мышцах позвоночных богатые энергией фосфатные связи запасаются в виде *фосфокреатина* (креатинфосфата). Это соединение характеризуется более высоким потенциалом переноса высокоэнергетических фосфатных групп, чем АТР (разд. 11.6). *Креатинкиназа* катализирует перенос фосфорильной группы от фосфокреатина на ADP с образованием АТР:

Фосфокрсатин + ADP ⇄ ATP +

+ Креатин.

Некоторые беспозвоночные для накопления высокоэнергетических фосфорильных групп используют *фосфоаргинин.* Фосфо-

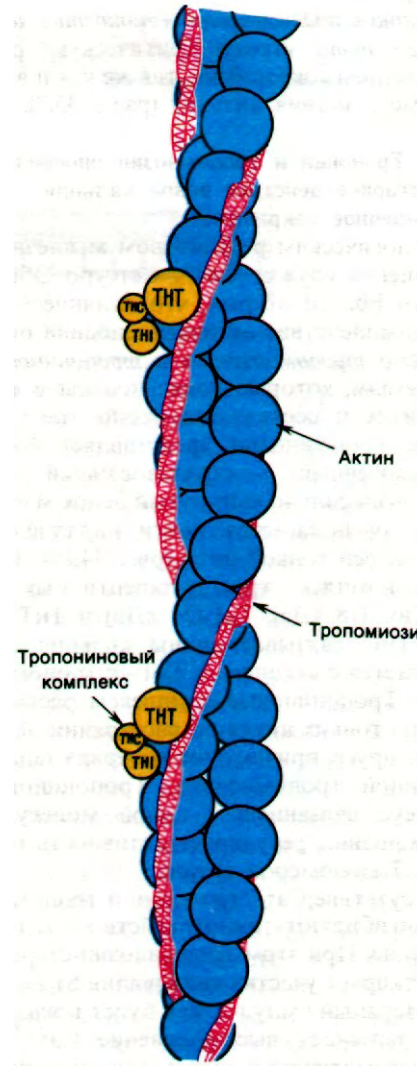


Рис. 34.19. Предполагаемая структура тонкой нити в состоянии покоя. Двойная спираль тропомиозина (показано красным цветом) блокирует участки актина (синий цвет), в которых при сокращении происходит связывание S1-головок миозина. Присоединение Ca^{2+} к ТнС-компоненту тропонинового комплекса (показано желтым цветом) вызывает смещение спирали тропомиозина, при этом открываются участки связывания головок S1 на актине, и в итоге происходит сокращение. (Cohen C., Protein switch of muscle contraction, Scientific American, Inc., 1975.)

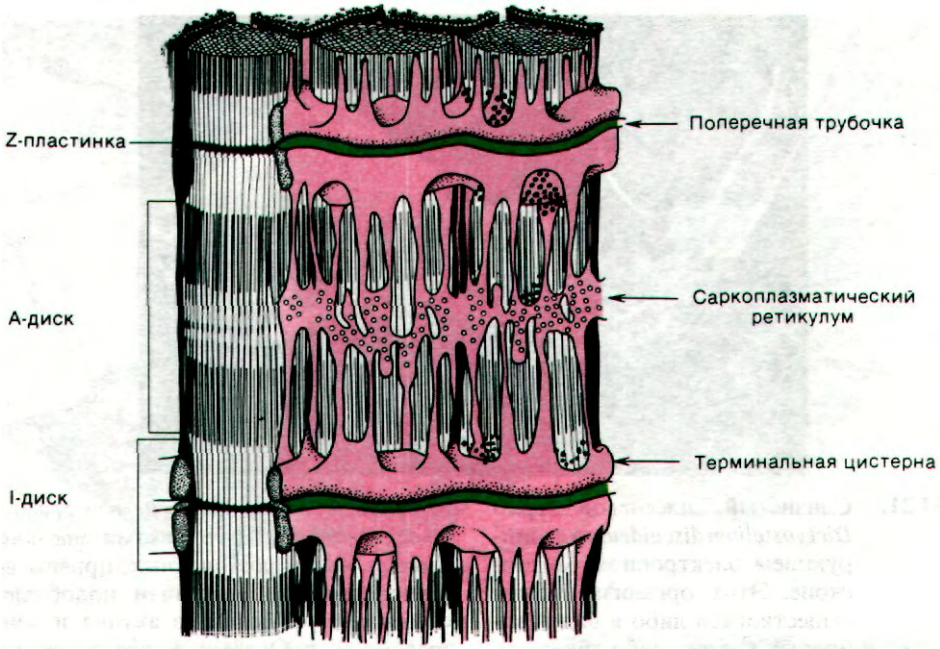
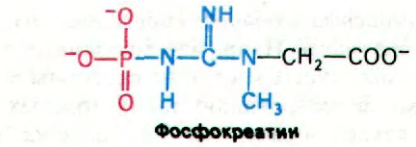
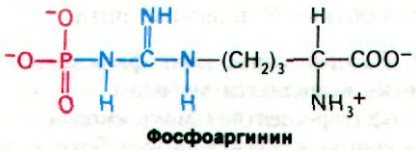


Рис. 34.20. Схематическое изображение саркоплазматического ретикулума. [Peachey L. D., J. Cell Biol., 25, 222 (1965).]

креатин и фосфоаргинин называют *фосфагенами.*



Фосфокреатин



Фосфоаргинин

В работающей мышце запас фосфокреатина быстро истощается, а следовательно, снижается и содержание ATP. При этом возрастает концентрация ADP и P_i, а также - под действием аденилаткиназы (миокиназы) - содержание AMP:

$$2ADP \rightleftarrows ATP + AMP.$$

Понижение энергетического заряда приводит к стимуляции гликолиза, цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования (разд. 14.13) в работающей мышце. Относительный вклад каждого из этих процессов в генерирование ATP зависит от типа мышц. Так, в красных мышцах, цвет которых обусловлен высоким содержанием миоглобина и цитохромов дыхательной цепи, уровень аэробного обмена намного выше, чем в белых мышцах.

34.13. Актин и миозин служат сократительными элементами почти во всех эукариотических клетках

Давно уже установлено, что многие немышечные клетки способны передвигаться и менять свою форму. Миграция клеток в процессе развития эмбриона, передвижение макрофагов к поврежденным тканям, ретракция сгустка тромбоцитами, биение микроворсинок кишечного эпителия - все это примеры, иллюстрирующие универсальность клеточной подвижности. Некоторые аспекты подвижности клеток можно исследовать на культурах ткани. Так, культивируемые клетки различных типов имеют плоские складчатые выросты, так называемые *ламеллиподии,* форма которых медленно меняется. Они напоминают легкие складки платья на ветерке, и потому их называют также *складчатыми краями* или *активными краями* (рис. 34.21). Складчатые края выступают наружу на несколько микрометров, и с их помощью клетка может прикрепляться

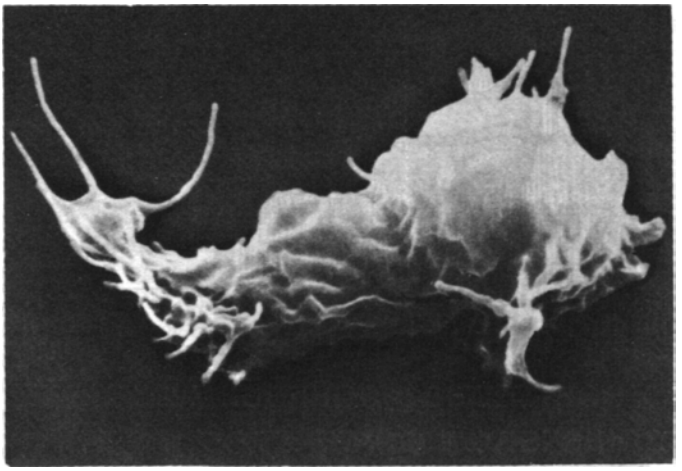


Рис. 34.21. Слизистый плесневой гриб *Dictyostelium discoideum* в сканирующем электронном микроскопе. Этот организм может существовать либо в виде свободных клеток, либо как часть организованной колонии. На поверхности *Dictyostelium* хорошо видны активные края и филоподии, богатые актином. (Печатается с любезного разрешения д-ра *James Spudich*.)

к поверхности. Если прикрепившаяся клетка втягивает складки на одном конце и вытягивает на другом, то при этом она постепенно перемещается.

Каковы молекулярные основы движения клеток? Первые сведения по этому вопросу были получены Ариелем Лёви (Ariel Loewy) при изучении слизистого плесневого гриба *Physarum polycephalum*. Этот слизевик образует плазмодий и содержит перетекающие массы цитоплазмы. Полученные при высокой ионной силе экстракты гриба были сходны по свойствам с актомиозином поперечнополосатых мышц. Так, добавление АТР вызывало быстрое падение вязкости, которая затем вновь медленно возрастала по мере гидролиза АТР. Спустя несколько лет Садаси Гатано и Фумио Осава (Sadashi Hatano, Fumio Osawa) обнаружили в грибе высокое содержание актина, очень сходного с мышечным. Он образовывал тонкие нити и взаимодействовал с миозином. Самое интересное, что *актин плесневого гриба* взаимодействовал с S1-головками *миозина скелетных мышц позвоночных,* причем возникали декорированные нити, подобные тем, которые образуются из актина и миозина позвоночных. Оказалось, что плесневой актин отличается от актина мышц кролика только по 17 из 375 аминокислотных остатков. Следовательно, *актин - это высококонсервативный, древний белок эукариот.* Аналогично актину из рассматриваемого плесневого гриба, а также из многих других эукариотических клеток был выделен и миозин. Однако *свойства миозинов из разных источников варьировали в большей степени, чем свойства актинов, выделенных из тех же источников.* Например, миозины из многих немышечных клеток не способны к быстрому формированию таких толстых нитей, какие образуются из миозина скелетных мышц. Немышечные миозины образуют короткие биполярные нити.

34.14. Распределение микрофиламентов в клетке выявляется методом иммунофлуоресцентной микроскопии

Как правило, клетки эукариот богаты актином, содержание которого составляет обычно 10% общего количества белка. По существу, актин - количественно превалирующий белок во многих типах клеток. Содержание миозина в немышечных клетках обычно в 10 раз ниже, чем актина. Следовательно, количественное отношение актина к миозину в немышечных клетках выше, чем в мышцах.

Часть актина в немышечных клетках полимеризуется с образованием *микрофиламентов* (рис. 34.22), напоминающих тонкие нити мышечного волокна. *Микрофила-*

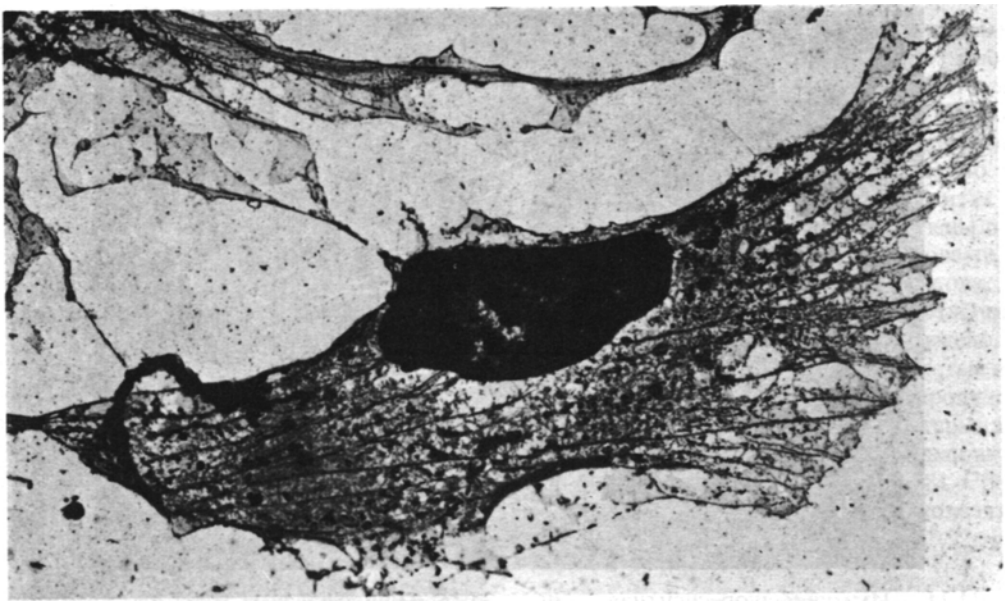


Рис. 34.22. Электронная микрофотография, демонстрирующая большое количество микрофиламентов в цитоскелете фибробластов эмбриона цыпленка. (Печатается с любезного разрешения д-ра *Susan Brown*.)

менты диаметром 70А выявляются на электронных микрофотографиях почти всех клеток эукариот. Декорирование микрофиламентов головками S1 приводит к возникновению характерной структуры регулярно расположенных стрелок; из этого следует, что микрофиламенты состоят из актина и могут взаимодействовать с миозином (рис. 34.23).

Распределение микрофиламентов в клетке выявляется с помощью *иммунофлуоресцентной микроскопии*. Метод состоит в том, что получают специфические к актину антитела, ковалентно связывают их с флуоресцентной меткой, например с флуоресцеином, и добавляют к культивируемым клеткам. В результате проявляется сеть микрофиламентов, видимая под флуоресцентным микроскопом (рис. 34.24). Некоторые пучки флуоресцирующих нитей тянутся через всю клетку. В покоящейся клетке, прикрепленной к твердому субстрату, многие актиновые нити идут параллельно длинной оси клетки. В складчатых краях, напротив, флуоресценция имеет диффузный характер, что связано с наличием мономеров актина или

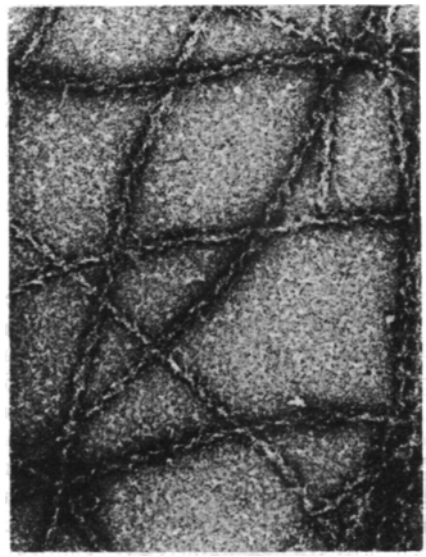


Рис. 34.23. Электронная микрофотография F-актина из *Dictyostelium*, декорированного S1-головками миозина также из *Dictyostelium*. Видно, что образуются такие же «наконечники стрел», как и в случае декорирования F-актина скелетных мышц S1-головками мышечного миозина. (Печатается с любезного разрешения д-ра James Spudich.)

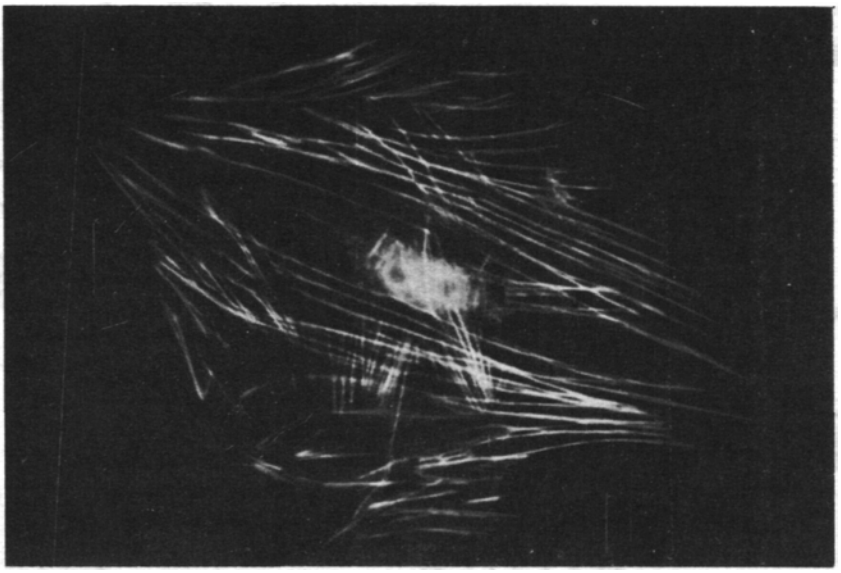


Рис. 34.24. Иммунофлуоресцентная микрофотография прикрепленной к поверхности покоящейся культивируемой клетки. Клетка окрашена флуоресцирующими антителами против актина. Видны длинные пучки микрофиламентов. (С любезного разрешения Elias Lazarides.)

коротких нитей актина (рис. 34.25). Методом иммунофлуоресцентной микроскопии было также исследовано внутриклеточное распределение других сократительных белков. В микрофиламентах был обнаружен *тропомиозин* (рис. 34.26), тогда как тропонина в них, по-видимому, нет. Ионы кальция играют важную роль в регуляции не только мышечной, но и немышечной подвижности, хотя в целом эти два процесса регулируются по-разному. Относительно внутриклеточного распределения миозина известно очень мало. В немышечных клетках обнаружен также α-*актинин,* который в мышцах связывает актин с Z-пластинками миофибрилл. Этот белок присутствует в наибольшем количестве в складчатых краях и других участках клетки, где происходит быстрое формирование и распад нитей актина. Возможно, что α-актинин создает мостики между нитями актина в цитоскелете и другими образованиями, связанными с подвижностью.

34.15. Прикрепленные к мембране нити актина опосредуют сокращение микроворсинок кишечника

Микроворсинки эпителиальных клеток кишечника (рис. 34.27) - это одна из наиболее изученных немышечных сократительных систем. Микроворсинки представляют собой выпячивания цитоплазмы на апикальной

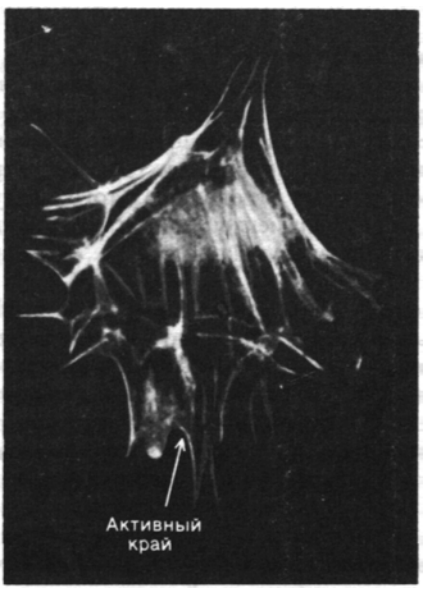


Рис. 34.25. Более диффузное распределение нитей актина в движущейся клетке, особенно в ее активных краях. (Печатается с любезного разрешения д-ра Elias Lazarides.)

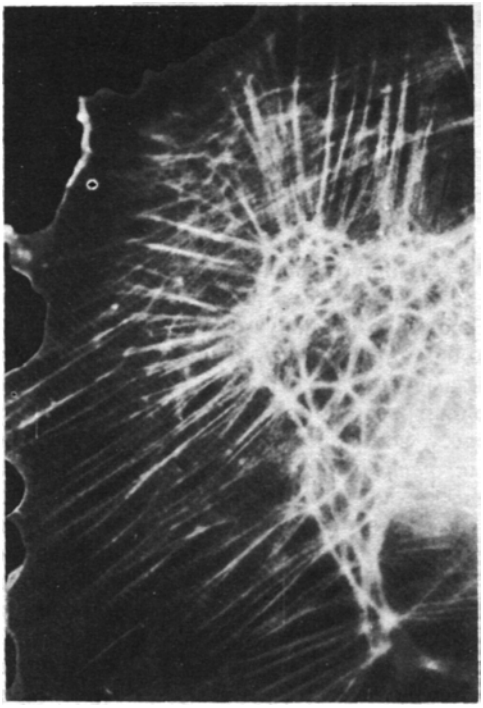


Рис. 34.26. В клетках, окрашенных флуоресцирующими антителами против актина, видны похожие на геодезические вышки куполообразные структуры. (Печатается с любезного разрешения д-ра Elias Lazarides.)

поверхности эпителиальных клеток кишечника, и в своей массе они образуют так называемую *щеточную каемку,* видимую в световом микроскопе. Каждая из микроворсинок содержит пучок актиновых нитей, которые на выступающем конце прикрепляются к плазматической мембране. Кроме того, во многих точках вдоль микроворсинки актиновые нити связаны с плазматической мембраной тонкими нитевидными соединениями. Остов актиновых филаментов проникает под поверхность клетки, достигая так называемой терминальной сети. Плазматическую мембрану изолированных щеточных каемок можно удалить, обработав их детергентом; остальная часть структуры при этом сохраняется интактной. Был обнаружен поразительный факт: лишенная мембраны щеточная каемка сокращается при добавлении ATP и Ca^{2+} и актиновые нити быстро погружаются в терминальную сеть.

Какова структурная основа этой подвижности? Путем декорирования актиновых нитей микроворсинок S1-головками миозина было выявлено, что все нити имеют одинаковую полярность (рис. 34.28). Образовавшиеся стрелки оказались направленными к основанию микроворсинок (подобно тому как на декорированных тонких нитях мышечных волокон стрелки направлены в сторону Z-пластинок). Другими словами, полярность актиновых нитей такова, что микроворсинки при сокращении втягиваются в клетку. Было также обнаружено, что в терминальной сети имеются толстые нити, содержащие миозин. По всей вероятности, биполярные миозиновые нити терминальной сети взаимодействуют с нитями актина прилежащих ворсинок (рис. 34.28). Согласно этой гипотезе, нити актина скользят от-

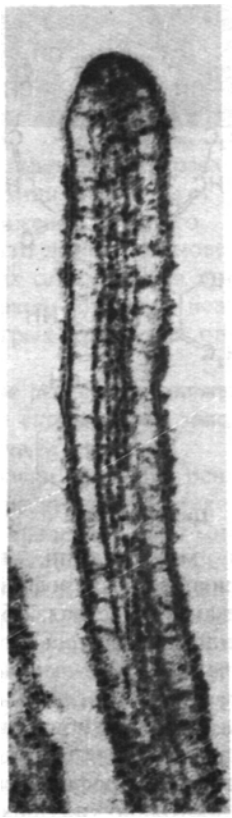
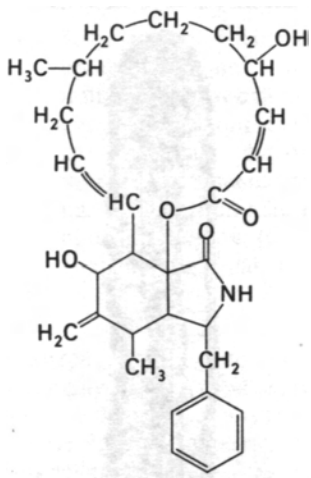


Рис. 34.27. Электронная микрофотография щеточной каемки кишечного эпителия. Микроворсинки содержат нити актина. [Mooseker M. S., Tilney L. G., J. Cell Biol., 67, 725 (1975).]

носительно нитей миозина, так что в целом движение направлено к центру клетки. В итоге микроворсинки укорачиваются, что способствует всасыванию питательных веществ клеткой.

34.16. Цитохалазин и фаллоидин тормозят подвижность, сопряженную с процессами сборки и дезагрегации нитей актина

Цитохалазин В (алкалоид из грибов) при добавлении к эукариотическим клеткам изменяет их форму и подавляет многие формы подвижности. Так, этот алкалоид ингибирует образование складчатых краев у фибробластов, отрастание аксонов от ганглиев, ретракцию кровяного сгустка тромбоцитами, деление оплодотворенной яйцеклетки морского ежа. Судя по данным



Цитохалазин В

электронной микроскопии, цитохалазин оказывает влияние на микрофиламенты, так как они исчезают в клетках, обработанных этим алкалоидом. Оказалось, что *цитохалазин препятствует сборке актиновых нитей, специфически взаимодействуя с одним из концов нити.* Этот ингибиторный эффект цитохалазина свидетельствует о динамичности структуры микрофиламентов.

Значение постоянно идущих процессов сборки и дезагрегации микрофиламентов для клеточного движения было выявлено также при изучении механизма действия *фаллоидина*. Этот токсический агент присутствует в ядовитом грибе *Amanita phalloides,* содержащем также α-аманитин - ингибитор РНК-полимеразы (разд. 29.18). Подобно цитохалазину, фаллоидин блокирует те формы подвижности, в которых участвуют микрофиламенты. *Фаллоидин присоединяется к единицам актина в микрофиламентах и тем самым препятствует его деполяризации.* Таким образом, фаллоидин как бы запирает микрофиламенты.

34.17. Микротрубочки участвуют в различных видах клеточной подвижности и частично формируют цитоскелет

До сих пор мы рассматривали роль микрофиламентов в различных видах клеточной подвижности. Обратимся теперь к другому классу волокнистых элементов, а именно к *микротрубочкам,* которые имеются практически во всех эукариотических клетках и участвуют как в поддержании архитектуры клетки, так и в сократительной активности (рис. 34.29). Микротрубочки представляют собой полые цилиндрические структуры, образованные из двух сходных (массой по 55 кДа) типов субъединиц - α- и β-*тубулина*. Наружный диаметр микротрубочек составляет около 240 А, и этим они четко отличаются от микрофиламентов (диаметром 70 А) и от промежуточных филаментов (структур диаметром 100 А, выполняющих роль связывающих элементов). Жесткая стенка микротрубочек образована из спирально уложенных, чередующихся

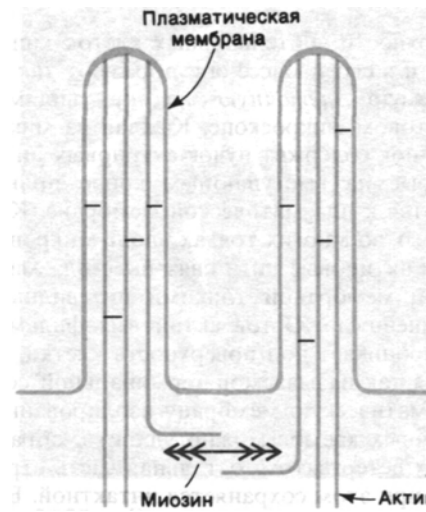


Рис. 34.28. Предполагаемое расположение миозина и актина в микроворсинках щеточной каемки кишок. [Mooseker M. S., Tilney L.G., J. CellBiol., 67, 725 (1975).]

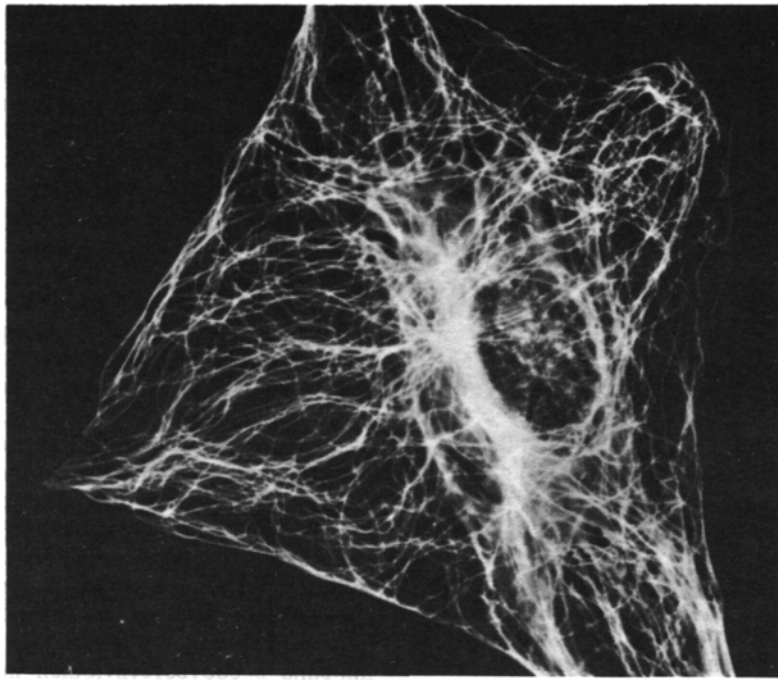


Рис. 34.29. Иммунофлуоресцентная микрофотография, демонстрирующая распределение микротрубочек в фибробласте. (Печатается с любезного разрешения д-ра Klaus Weber.)

α- и β-тубулиновых субъединиц (рис. 34.30). Повторяющейся единицей структуры является αβ-димер, и в целом структура образована из 13 протофиламентов, идущих параллельно длинной оси микротрубочки.

Сборка и дезагрегация микротрубочек происходят с противоположных концов. Алкалоид из осенних крокусов *колхицин* блокирует сборку и тем самым тормозит клеточные процессы, протекающие с участием микротрубочек. Например, колхицин останавливает клеточное деление на стадии метафазы, так как микротрубочки имеют существенное значение для расхождения хромосом. Колхицин ингибирует также направленное движение разного рода частиц в клетках, что лежит в основе торможения процессов их секреции. На протяжении нескольких веков колхицин используют для лечения острых приступов подагры.

Колхицин

34.18. Биение ресничек и движение жгутиков обусловлено скольжением микротрубочек, индуцированным динеином

Микротрубочки являются основными компонентами ресничек и жгутиков у эукариот. Эти органеллы имеются во многих клетках. Подвижные реснички, подобно веслам, вызывают ток жидкости параллельно поверхности клетки. Так, координированное движение ресничек, выстилающих дыхательные пути, способствует удалению чужеродных частиц. Жгутики необходимы для продвижения свободных клеток, таких, как спермии или простейшие. Как показали электронно-микроскопические исследования, структура ресничек и жгутиков практически у всех эукариот в основе своей одинакова. Это пучок волокон, называемый *аксонемой,* который окружен мембраной, составляющей продолжение плазматической мембраны. Волокна в аксонеме - это микротрубочки. По перифе-

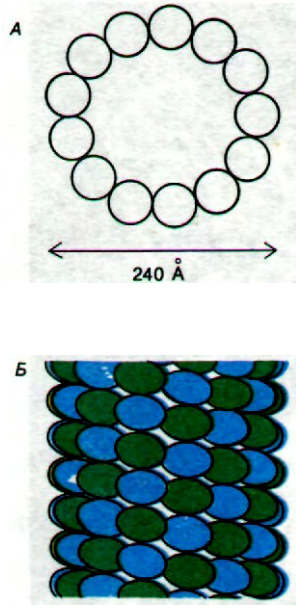


Рис. 34.30. Спиральное расположение тубулиновых субъединиц в микротрубочке. *А* - схематическое изображение поперечного среза; видно, что микротрубочка образована 13 протофиламентами. *Б* - поверхностная решетка из α- и β-субъединиц. [Snyder J. A., McIntosh J. R., Ann. Rev. Biochem., 45, 706 (1976).]

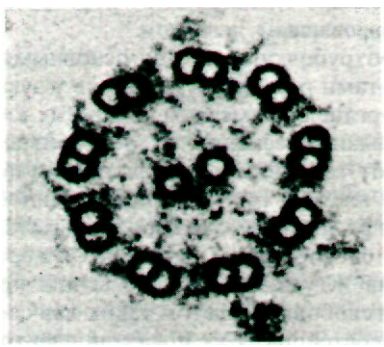


Рис. 34.31. Электронная микрофотография поперечного среза аксонемы жгутика. Девять наружных двойных микротрубочек окружают две одинарные. (Печатается с любезного разрешения д-ра Joel Rosenbaum.)

рии расположены девять двойных микротрубочек, в центре - две одинарные микротрубочки (рис. 34.31). Такой часто встречающийся структурный мотив известен как *расположение 9 + 2.* Диаметр двух центральных микротрубочек равен 240 А. Каждая из девяти периферических пар на поперечном срезе имеет вид цифры 8 и размер 370 х 250 А (рис. 34.32). Одна из микротрубочек в паре - *субфибрилла А* - меньше по размеру и присоединяется к центральной капсуле реснички с помощью радиального мостика. От каждой субфибриллы А отходят две ручки. В отдельной ресничке все ручки направлены в одну сторону. Обработка ресничек детергентом и далее раствором солей высокой концентрации приводит к удалению наружной мембраны и солюбилизации АТРазы, называемой *динеином.* В результате этой обработки расположенные на периферии волокна сохраняют свою цилиндрическую попарную организацию, но утрачивают ручки. При добавлении динеина в соответствующей ионной среде ручки восстанавливаются. Следовательно, *состоящие из динеина ручки субфибриллы А обладают АТРазной активностью.*

Каким образом расщепление АТР динеином вызывает движение ресничек и жгутиков? Как показали Питер Сатир и Ян Гиббонс (Peter Satir, Jan Gibbons), *периферические двойные микротрубочки аксонемы скользят относительно друг друга и тем самым вызывают изгиб реснички.* Само скольжение обусловлено образованием *динеиновых поперечных мостиков.* По-видимому, динеиновые ручки одной пары микротрубочек по мере гидролиза АТР продвигаются вдоль прилегающей пары совершенно аналогично тому, как в скелетной мышце миозиновые поперечные мостики движутся вдоль актиновой нити. В интактной ресничке радиальные мостики противодействуют скольжению, и благодаря им происходит не сокращение реснички, а локальный изгиб.

При обследовании группы больных хроническими легочными заболеваниями были обнаружены аксонемы, лишенные динеина. В этом случае, как показал Бьёрн Афзелиус (Bjorn Afzelius), реснички эпителия дыхательных путей оказались неподвижными. Более того, мужчины с этим генетическим дефектом были стерильны вследствие неподвижности их сперматозоидов. В другом, недавно обнаруженном случае неподвижность ресничек и жгутиков оказалась обусловленной дефектом радиальных мостиков.

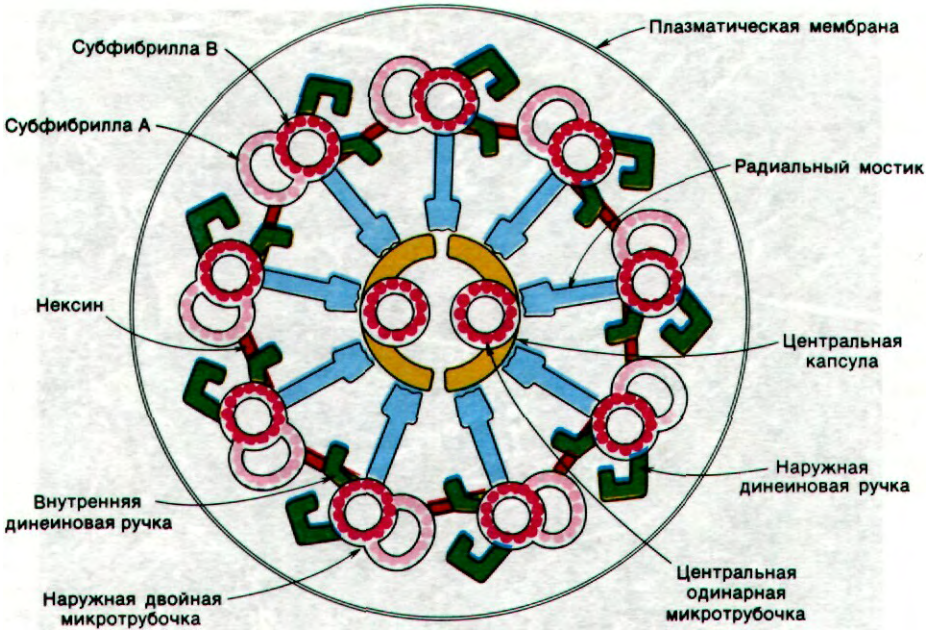


Рис. 34.32. Схематическое изображение структуры аксонемы.

Эти клинические наблюдения подтверждают существующие представления о механизме движения рассматриваемых органелл.

Заключение

Поперечнополосатая мышца позвоночных состоит из белковых нитей двух типов, которые взаимодействуют друг с другом. Толстые нити содержат миозин, а тонкие - актин, тропомиозин и тропонин. Гидролиз АТР актомиозином вызывает скольжение указанных нитей относительно друг друга. Миозин представляет собой очень большой по массе белок (500 кДа), состоящий из двух основных цепей и четырех легких цепей. Конформация основных цепей такова, что они содержат две глобулярные области (головки S1) и присоединенный к ним длинный α-спирализованный стержень. Головки S1 и часть стержня образуют поперечные мостики, которые взаимодействуют с актином, генерируя силу сокращения. Остальная часть молекулы миозина создает скелет толстой нити. Актин - основной компонент тонких нитей - представляет собой глобулярный белок (42 кДа), который полимеризуется с образованием нитей диаметром 70 А. Толстые и тонкие нити определенным образом направлены, причем посередине между двумя Z-пластинками это направление меняется на противоположное. Циклическое образование и диссоциация комплексов между миозиновыми поперечными мостиками, выступающими из толстых нитей, и единицами актина тонких нитей происходят за счет энергии АТР;

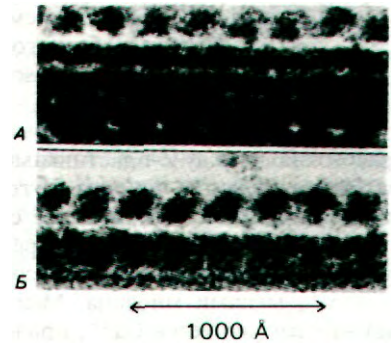


Рис. 34.33. Динеиновые ручки расположены вдоль микротрубочек с правильной периодичностью. Электронные микрофотографии интактной аксонемы (*А*) и микротрубочки, реконструированной из тубулина и динеина (*Б*). [Haimo L. T., Telzer B. R., Rosenbaum J. L., Proc Nat. Acad. Sci., 76, 5760 (1979).]

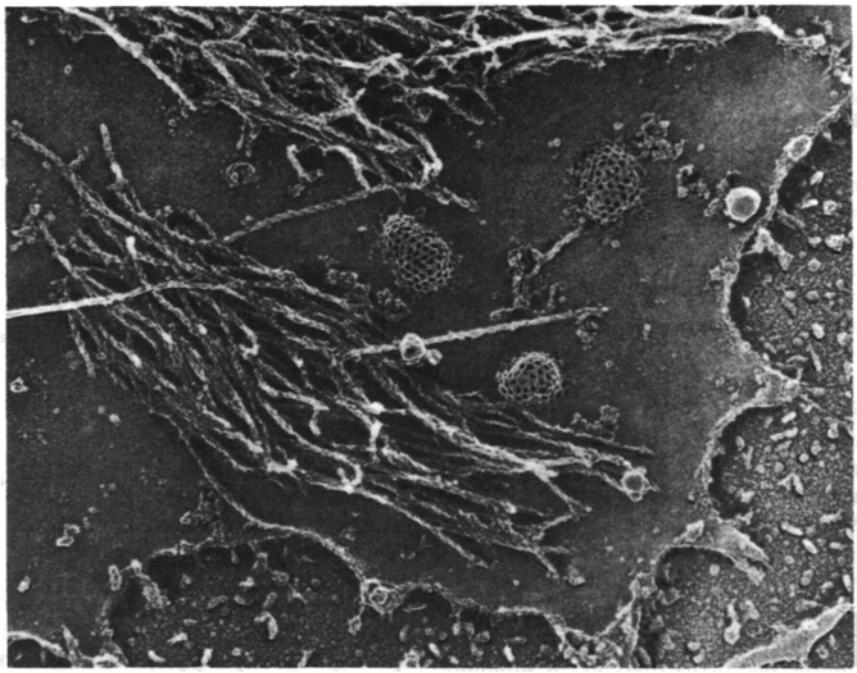


Рис. 34.34. Внутренняя поверхность плазматической мембраны фибробласта под электронным микроскопом. Ясно видны нити актина (декорированные S1-головками миозина) и окаймленные ямки на мембране. (Печатается с любезного разрешения д-ра John Heuser.)

образование комплексов ведет к уменьшению расстояния между Z-пластинками. «Рабочим ходом» является поворот S1-головки миозина, находящейся в комплексе с актином. В генерировании силы сокращения важную роль играют шарнирные соединения между доменами миозина. Мышечное сокращение регулируется Ca^{2+}, причем эффект Ca^{2+} опосредован тропонином и тропомиозином. При низкой концентрации Ca^{2+} эти белки ингибируют взаимодействие актина и миозина. Нервный импульс запускает высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума. Далее ионы кальция связываются с тропонином, что инициирует серию конформационных сдвигов, разрешающих в итоге взаимодействие актина и миозина.

Актин и миозин - эволюционно древние белки, о чем свидетельствует тот факт, что они содержатся уже в слизистых грибах. В сущности, эти белки участвуют в сократительной активности практически всех эукариотических клеток. Особенно распространен актин, образующий микрофиламенты диаметром около 70 А. Микрофиламенты участвуют в разных видах клеточной подвижности, например в миграции клеток в ходе развития, ретракции кровяного сгустка тромбоцитами, передвижении макрофагов к поврежденным тканям. Сокращение ворсинок щеточной каемки кишечного эпителия опосредовано взаимодействием нитей актина с биполярными нитями миозина; последние в эпителиальных клетках кишечника меньше по размеру и содержатся в меньшем относительном количестве по сравнению с мышцами. Цитохалазин и фаллоидин тормозят те виды клеточной подвижности, которые связаны с агрегацией и диссоциацией нитей актина. Цитохалазин ингибирует сборку, а фаллоидин - распад микрофиламентов.

В клетках эукариот имеются микротрубочки, которые поддерживают архитектуру клетки, а также участвуют в сократительной активности. Микротрубочки представляют собой полые фибриллы диаметром 240 А; они построены из тубулина. Реснички и жгутики клеток эукариот содержат девять двойных микротрубочек, окружающих две

одинарные. Между внешними парами микротрубочек имеются поперечные мостики из динеина - белка, обладающего АТРазной активностью. Индуцированное динеином скольжение прилегающих пар микротрубочек относительно друг друга вызывает изгиб реснички или жгутика; этот механизм лежит в основе биения ресничек и движения жгутиков. Ингибитором подвижности, опосредованной микротрубочками, служит колхицин, который блокирует их полимеризацию.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Huxley H.E., 1965. The mechanism of muscular comtraction, Sci. Amer., 213(6), 18-27.

Cohen C., 1975. The protein switch of muscle contraction, Sci. Amer., 233(5), 36-45.

Murray J.M., Weber A., 1974. The cooperative action of muscle proteins, Sci. Amer., 230(2), 59-69.

Lazarides E., Revel J.P., 1979. The molecular basis of cell movement, Sci. Amer., 240(5), 100-113.

Satir P., 1974. How cilia move, Sci. Amer., 231(4), 44-52.

Dustin P., 1980. Microtubules, Sci. Amer., 243(2), 66-76.

Книги

Cold Spring Harbor Laboratory, 1972. The Mechanism of Muscle Contraction, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. 37. (Выдающийся сборник статей, посвященных структуре мышечных белков, механизму возникновения силы сокращения, системам регуляции, саркоплазматическому ретикулуму, миогенезу, а также сократительным белкам немышечных тканей.)

Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J. (eds.), 1976. Cell Motility, Cold Spring Harbor Laboratory. (Содержит много прекрасных статей, посвященных микрофиламентам и микротрубочкам и их роли в клеточной подвижности.)

Inoue S., Stephens R.E. (eds.), 1975. Molecules and Cell Movement, Raven Press.

Hatano S., Ishikawa H., Sato H. (eds.), 1979. Cell Motility: Molekulas and Organization, University Park Press.

Sugi H., Pollack G.H. (eds.), 1979. Cross-bridge Mechanism in Muscle Contraction, University Park Press.

Мышечное сокращение

Huxley H.E., 1971. The structural basis of muscle contraction, Proc. Roy. Soc. London (B), 178, 131-149.

Haxley A.F., 1975. The origin of force in skeletal muscle, Ciba Found. Symp., 31, 271-290.

Harrington W.F., 1979. Contractile proteins of muscle. In: Neurath H. and Hill R. L. (eds.), The Proteins (3rd ed.), vol. 4, pp. 245-409, Academic Press.

Adelstein R.S., Eisenberg E., 1980. Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction, Ann. Rev. Biochem., 49, 921-956.

Hill T.L, 1977. Free Energy Transduction in Biology, Academic Press. (В гл. 5 дано ясное описание термодинамики мышечного сокращения.)

Huxley H.E., Farugi A.R., Bordas J., Koch M.H.J., Milch J.R., 1980. The use of synchrotron radiation in time-resolved x-ray diffraction studies of myosin layer-line reflections during muscle contraction, Nature, 284, 140-143.

Adelstein R.S. (ed.), 1980. Symposium on phosphorylation of muscle contractile proteins, Fed. Proc., 39, 1544-1573. *McCubbin W.D., Kay C. M.,* 1980. Calciuminduced conformational changes in the troponin-tropomyosin complexes of skeletal and cardiac muscle and their roles in the regulation of contraction-relaxation, Ace. Chem. Res., 13, 185-192.

Роль актина и миозина в клеточной подвижности

Korn E.D., 1978. Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility (a review), Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 588-599.

Clarke M., Spudich J.A., 1977. Nonmuscle contractile proteins: the role of action and myosin in cell motility and shape determination, Ann. Rev. Biochem., 46, 797-822.

Tilney L.G., 1979. Actin, motility, and membranes. In: Cone R.A. and Dowling J.E. (eds.), Membrane Transduction Mechanisms, pp. 163-186, Raven Press.

Lin S., Lin D.C., Flanagan M.D., 1978. Specificity of the effects of cytochalasin B on transport and motile processes, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 329-333.

Brown S.S., Spudich J.A., 1979. Cytochalasin inhibits the rate of elongation of actin filament fragments, J. Cell Biol., 83, 657-662.

Микротрубочки

Kirschner M.W., 1978. Microtubules: assembly and nucleation, Int. Rev. Cytol., 54, 1-71.

Margolis R.L, Wilson L., 1978. Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steadystate in vitro, Cell, 13,1-8.

Amos L.A., Baker T.S., 1979. The three-dimensional structure of tubulin protofilaments, Nature, 279, 607-612.

Summers K.E., Gibbons I.R., 1971. ATP-induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of seaurchin sperm, Proc. Nat. Sci., 68, 3092-3096. (Описаны остроумные опыты, показавшие, что волнообразное движение обычного жгутика возникает как результат индуцированного ATP взаимодействия между прилегающими парными трубочками.)

Haimo L.T., Telzer B.R., Rosenbaum J.L., 1979. Dynein binds to and crossbridges cytoplasmic microtubules, Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 5759-5763.

Sturgess J.M., Chao J., Wong J., Aspin N., Turner J.A.P., 1979. Cilia with defective radial spokes: a cause of human respiratory disease, New Engl. J. Med., 300, 53-56.

Промежуточные нити

Lazarides E., 1980, Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space, Nature, 283, 249-256.

ГЛАВА 35
Действие гормонов

Гормоны - это химические посредники, координирующие активность различных клеток многоклеточного организма. Термин «гормон» был впервые использован в 1904 г. Уильямом Бэйлиссом и Эрнстом Старлингом (William Bayliss, Ernest Starling) при описании действия секретина - вещества, секретируемого двенадцатиперстной кишкой и стимулирующего выделение сока поджелудочной железы. Из этой работы вытекала очень плодотворная концепция, а именно, что 1) гормоны - это молекулы, синтезируемые специфическими тканями (*железами*); 2) гормоны секретируются непосредственно в кровь, которая и доставляет их к месту действия; 3) гормоны специфическим образом меняют активность определенных чувствительных тканей (*органов-мишеней* или *клеток-мишеней*). По своей химической природе гормоны очень разнообразны. Некоторые, например адреналин и тироксин, представляют собой *небольшие молекулы, производные аминокислот*. Другие, в частности окситоцин, инсулин и тиреотропин (тиреотропный гормон),- *полипептиды* или *белки*. Третья группа гормонов - стероиды, производные холестерола. В настоящее время выяснен молекулярный механизм действия ряда гормонов. Установлено, что *гормоны оказывают специфическое действие тремя путями:* 1) *воздействуя на скорость синтеза ферментов и других белков*; 2) *изменяя скорость ферментативного катализа;* 3) *изменяя проницаемость клеточных мембран*. Любопытно отметить, что ни один гормон не является ферментом или коферментом. Напротив, действие гормонов сводится к *регуляции уже существующих процессов*.

35.1. Открытие циклического AMP - посредника в действии многих гормонов

Важнейшее достижение в изучении механизма действия гормонов связано с именем Эрла Сазерленда (Earl Sutherland). Первоначальная цель его работ, начатых в 50-х годах, состояла в том, чтобы выяснить механизм действия адреналина и глюкагона на распад гликогена и образование глюкозы в печени. Сазерленд избрал эту систему, во-первых, потому, что указанные гормоны оказывают очень значительное и воспроизводимое действие на распад гликогена. Во-вторых, этот эффект развивается в течение нескольких минут. В-третьих, срезы печени нетрудно получить в большом количестве. В-четвертых, биохимия распада гликогена уже была достаточно хорошо изучена (гл. 16). Фактически Сазерленд начал свои исследования механизма действия адреналина и глюкагона в лаборатории Карла и Герти Кори (Carl Cori, Gerty Cori).

На начальном этапе работы он стремился выявить ту ферментативную реакцию в процессе превращения гликогена в глюкозу, которую усиливали эти гормоны. Для этого срезы печени инкубировали в присутствии $^{32}P_i$ и определяли, в какие промежуточные соединения включалась метка. Оказалось, что ферментом, лимитирующим скорость процесса расщепления гликогена, была фосфорилаза, а не фосфоглюкомутаза или глюкозо-6-фосфатаза. Более того, адреналин и глюкагон увеличивали активность фосфорилазы. Однако механизм активации был неясен. Далее Сазерленд обнаружил фермент, катализировавший инактивацию активной фосфорилазы. Этот инактивирующий фермент оказался фосфатазой; напрашивалось предположение, что активация фосфорилазы обусловлена ее фосфорилированием. Действительно, при инкубации срезов печени с $^{32}P_i$ обнаружилось, что скорость включения

Рис. 35.1. Электронная микрофотография соматотропной клетки гипофиза. Гормон роста (соматотропин) накапливается в электронноплотных гранулах, четко видных на микрофотографии. (С любезного разрешения Lynne Mercer.)

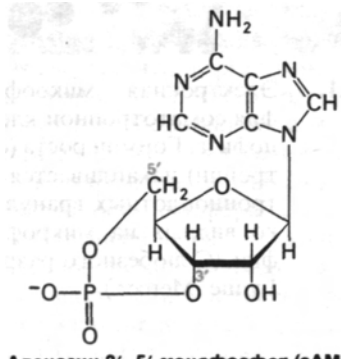
метки в фосфорилазу возрастала в присутствии адреналина и глюкагона, причем это возрастание было прямо пропорционально действию гормонов на распад гликогена. Таким образом, в результате этих исследований и было установлено, что *фосфорилаза активируется при фосфорилировании и инактивируется при дефосфорилировании. Это был первый пример регуляции активности фермента с помощью механизма ковалентной модификации.*

Далее приступили к анализу активации фосфорилазы гормонами в препарате разрушенных клеток печени. Поразительным образом добавление адреналина и глюкагона приводило, как и в опытах со срезами

Рис. 35.2. Примеры трех химически различных классов гормонов: *А* - адреналин, производное аминокислоты; *Б* - глюкагон, полипептид; *В* - кортизол, стероид.

печени, к активации фосфорилазы. *Обнаружение того факта, что гормональный эффект проявляется и в бесклеточном гомогенате, явилось новой вехой в развитии биохимии.* Дело в том, что ранее не удавалось наблюдать специфического действия гормонов в бесклеточных системах, и многие биологи полагали, что гормоны способны воздействовать только на интактную клетку-мишень. Любопытно вспомнить, как за полвека до этого Бухнеры (Buchner) опровергли совершенно аналогичные воззрения, доказав, что процесс брожения может идти и в бесклеточном экстракте дрожжей. Однако в отличие от гликолитических ферментов не все компоненты системы, обеспечивающей ответ на адреналин и глюкагон, оказались растворимыми. Так, после центрифугирования гомогената клеток печени ответная реакция на добавление гормонов исчезала. Следовательно, какая-то существенная часть системы гормонального ответа была локализована во фракции мембран. Действительно, гормональный ответ можно было восстановить, добавив к надосадочной жидкости фракцию субклеточных частиц.

Роль субклеточных частиц была выявлена следующим образом. При инкубации этой фракции с адреналином и глюкагоном образовывался некий термостабильный фактор. Добавление этого фактора к надосадочной фракции приводило к активации фосфорилазы. Другими словами, *гормональный ответ удалось разделить на два этапа: взаимодействие гормона с мембранной фракцией, приводящее к образованию термостабильного фактора, и действие этого фактора на надосадочную фракцию, выражающееся в активации фосфорилазы.* Следующая задача состояла в том, чтобы идентифицировать термостабильный фактор, полученный в очень малом количестве. По данным химического анализа это был аденинрибонуклеотид, но с необычными свойствами. Сазерленд описал его в письме Леону Хеппелю (Leon Heppel), к которому обратился в надежде на помощь в изучении структуры этого вещества. В это же время Хеппель получил письмо от Дэвида Липкина (David Lipkin) с описанием нового нуклеотида, полученного путем обработки ATP гидрооксидом бария. Хеппель пришел к выводу, что Липкин и Сазерленд изучают одно и то же вещество, и помог им связаться друг с другом. Действительно, оба ученых исследовали одно и то же соединение, оказавшееся аденозин-3',5'-монофосфатом, или, как его обычно называют теперь, *циклическим*



Аденозин-3′, 5′-монофосфат (cAMP)

AMP (*cAMP*). Эта случайная встреча двух ученых принесла еще одну пользу: сразу возникла возможность получения больших количеств cAMP для биохимических иссле-

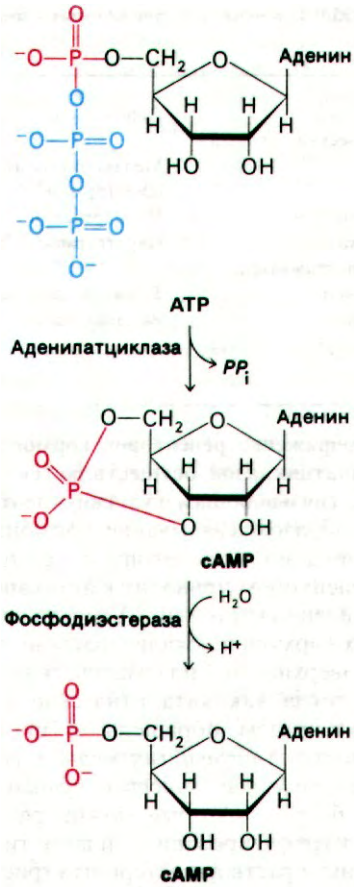


Рис. 35.3. Ферментативный синтез и распад cAMP.

дований. Более того, в результате лабораторного синтеза cAMP из ATP и гидроксида, бария появилась возможность выдвинуть предположение о вероятном пути биосинтеза этого соединения.

35.2. Циклический AMP синтезируется аденилатциклазой и расщепляется фосфодиэстеразой

cAMP образуется из ATP под действием мембранного фермента *аденилатциклазы:*

$$\text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{cAMP} + PP_i + H^+.$$

Эта реакция в небольшой степени эндергонична; ее $\Delta G^{\circ\prime}$ составляет около 1,6 ккал/моль. Источником энергии для синтеза cAMP служит последующий гидролиз пирофосфата. Специфическая *фосфодиэстераза* разрушает cAMP путем гидролиза до AMP:

$$\text{cAMP} + H_2O \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{AMP} + H^+.$$

Это высокоэкзергоническая реакция с $\Delta G^{\circ\prime}$ около −12 ккал/моль. В отсутствие фосфодиэстеразы cAMP - очень стабильное соединение.

35.3. cAMP служит вторым посредником при действии многих гормонов

Работа Сазерленда привела к созданию концепции о роли cAMP как *второго посредника* в механизме действия некоторых гормонов. Первым посредником является сам гормон. Сущность этой концепции заключается в следующем.

1. Плазматические мембраны клеток содержат рецепторы гормонов.

2. Взаимодействие гормона с его специфическим рецептором на плазматической мембране ведет к стимуляции аденилатциклазы, также связанной с плазматической мембраной.

3. В результате активации аденилатциклазы в клетке увеличивается содержание cAMP.

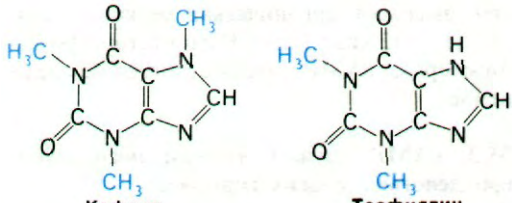
4. Действие cAMP проявляется внутри клетки и состоит в изменении скорости одного или более процессов.

Важная особенность этой гипотезы второго посредника состоит в том, что она не предполагает проникновения гормона в клетку. Действие самого гормона ограничивается клеточной мембраной. Биологический эффект гормона опосредован действием cAMP внутри клетки; непосредственного действия сам гормон не оказывает. Обоснованность этой концепции была проверена с использованием целого ряда экспериментальных критериев, а именно:

1. Аденилатциклазу клетки должны стимулировать те гормоны, которые действуют на эту клетку как на мишень. Гормоны, не вызывающие специфического биологического ответа данной клетки, не должны повышать в ней активности этого фермента.

2. Концентрация cAMP в клетках-мишенях должна изменяться пропорционально биологическому ответу этих клеток на гормональную стимуляцию, т.е. она должна проявлять временную и количественную зависимость от концентрации гормона.

3. Ингибиторы фосфодиэстеразы, например теофиллин или кофеин, должны действовать синергично с теми гормонами, эф-



фект которых опосредован cAMP как вторым посредником.

4. Добавление cAMP или родственного ему соединения к клеткам-мишеням должно имитировать биологическое действие гормона. (На практике cAMP в таких опытах не используется, так как он плохо проникает в клетки; однако менее полярные производные cAMP, в частности дибутирил-cAMP, проникают в клетки и оказывают свое действие.)

Проведенные опыты показали, что *циклический AMP является вторым посредником при действии не только адреналина и глюкагона, но и многих других гормонов* (табл. 35.1). cAMP оказывает влияние на исключительно большое число клеточных процессов. Так, под действием этого соединения увеличивается распад накопленных запасов топливных веществ, повышается выделение соляной кислоты слизистой желудка, происходит дисперсия пигментных гранул меланина, уменьшается агрегация тромбоцитов.

Рис. 35.4. Разделение аденилатциклазы и β-адренергического рецептора центрифугированием солюбилизированной (в растворе детергента) плазматической мембраны в градиенте плотности сахарозы. [Haga T., Haga K., Gilman A.G., J. Biol. Chem., 252, 5776 (1977).]

Таблица 35.1. **Гормоны, действие которых опосредовано cAMP**

Кальцитонин	Липотропин
Хорионический гонадотропин	Меланоцитстимулирующий гормон
Кортикотропин	Норадреналии
Адреналин	Паратгормон
Фолликулостимулирующий гормон	Тиреотропный гормон
Глюкагон	Вазопрессин
Лютеинизирующий гормон	

35.4. Сопряжение рецепторов гормонов с аденилатциклазой осуществляется белком, связывающим гуаниннуклеотиды

Каким образом связывание гормона типа адреналина или глюкагона со специфическим рецептором приводит к активации молекулы аденилатциклазы? Участки связывания этих гормонов локализованы на наружной поверхности плазматической мембраны, тогда как каталитические участки аденилатциклазы обращены к цитозолю. В сущности, *участки связывания гормона и каталитические участки принадлежат разным белкам,* которые можно разделить при центрифугировании плазматической мембраны в растворе детергента (рис. 35.4). Аденилатциклаза (185 кДа) и рецептор адреналина (75 кДа) представляют собой большие интегральные белки мембраны. Рецептор адреналина называют также β-*адренергическим рецептором,* поскольку он связывает целый ряд фармакологически активных соединений.

Связывание гормона со специфическим рецептором оказывает активирующее действие на аденилатциклазу не прямо, а опосредованно - через третий белок, называемый *G-белком*[1] (от англ. guanyl, поскольку этот белок связывает гуаниннуклеотиды). Этот регуляторный белок (42 кДа) существует в двух формах. Комплекс G-белка с GTP активирует аденилатциклазу, тогда как комплекс G-белка с GDP такого действия не оказывает. G-белок превращается из неактивной GDP-формы в активную GTP-форму в результате обмена связанного GDP на GTP. Этот GTP—GDP-обмен катализируется гормон-рецепторным комплексом, но не свободным рецептором. Та-

[1] В отечественной литературе чаще используется обозначение N-белок.- *Прим. перев.*

ким образом, путь передачи информации идет от рецептора гормона на G-белок и далее на аденилатциклазу (рис. 35.5).

Как происходит выключение аденилатциклазы? G-белок обладает еще одним свойством, благодаря которому он может передавать информацию от рецепторов гормона на аденилатциклазу. Дело в том, что связанный с G-белком GTP медленно гидролизуется до ADP. Другими словами, *G-белок является GTPазой. Следовательно, этот регуляторный белок содержит встроенное в него устройство для инактивации аденилатциклазы.* Доля G-белка, находящегося в комплексе с GTP, а соответственно и степень активации аденилатциклазы зависят от отношения скорости обмена GDP на GTP к скорости гидролиза GTP. Скорость GTP-GDP-обмена значительно возрастает при связывании G-белка с *комплексом гормон—рецептор.* Следовательно, при низком содержании гормона почти весь G-белок находится в GDP-форме и соответственно почти вся аденилатциклаза неактивна. В некоторых клетках активация аденилатциклазы зависит также от концентрации Ca^{2+}. Для активации аденилатциклазы в этих клетках необходим не только G-белок в GTP-форме, но и комплекс Ca^{2+} с *кальмодулином* (белок массой 17 кДа). Таким образом, в настоящее время начал проясняться вопрос о том, какие регуляторные циклы определяют активность аденилатциклазы.

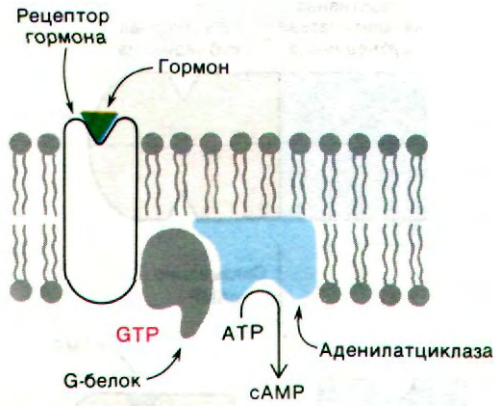


Рис. 35.5. Путь передачи информации при активации аденилатциклазы, вызванной связыванием гормона со специфическим рецептором. G-белок играет решающую роль как в активации, так и в инактивации аденилатциклазы.

35.5. Циклический AMP активирует протеинкиназы

Каким образом cAMP воздействует на столь большое число различных клеточных процессов? Есть ли в этих воздействиях что-либо общее? Действительно, такая общность имеется, и обнаружена она была опять-таки при изучении регуляции обмена гликогена - участка метаболизма, где «родился» cAMP. Эдвин Кребс и Донал Уолш (Edwin Krebs, Donal Walsh) установили, что *cAMP активирует протеинкиназу* в скелетных мышцах. Протеинкиназа фосфорилирует как гликоген-синтазу (переводя ее в неактивное состояние), так и киназу фосфорилазы (переводя ее в активное состояние). Таким путем cAMP стимулирует распад гликогена и ингибирует его синтез в мышцах (разд. 16.15). Аналогичный механизм действует в печени. По существу, *все известные эффекты cAMP обусловлены активацией протеинкиназ.* Все исследованные до сих пор клетки содержат протеинкиназы, которые активируются под действием cAMP в концентрации порядка 10^{-8} М. Эти киназы модулируют активность различных белков путем их фосфорилирования.

Интересен механизм активации протеинкиназы мышц циклическим AMP. Этот фермент состоит из субъединиц двух типов: регуляторной (R) субъединицы (49 кДа), связывающей cAMP, и каталитической (C) субъединицы (38 кДа). В отсутствие cAMP регуляторная и каталитическая субъединицы образуют комплекс R_2C_2, лишенный ферментативной активности. Присоединение cAMP к каждой из регуляторных субъединиц приводит к диссоциации комплекса R_2C_2 на одну R_2-субъединицу и две C-субъединицы. Свободные каталитические субъединицы обладают ферментативной активностью. Следовательно, *присоединение cAMP к регуляторной субъединице снимает ингибирование каталитической субъединицы. cAMP при этом функционирует как аллостерический эффектор.* Своей субъединичной структурой (наличием отдельных регуляторных и каталитических субъединиц) протеинкиназа напоминает аспартат-транскарбамоилазу (разд. 22.14).

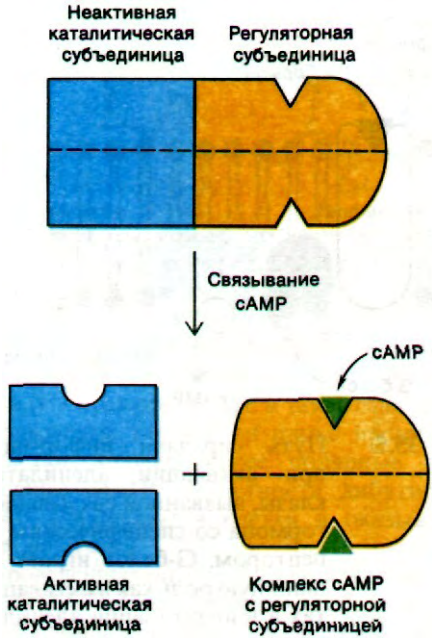


Рис. 35.6. cAMP активирует протеинкиназу, вызывая диссоциацию комплекса регуляторных и каталитических субъединиц фермента.

35.6. Циклический AMP - эволюционно древний сигнал голодания

Как было описано выше (разд. 28.6), cAMP оказывает регуляторное действие на клетки бактерий, у которых он стимулирует транскрипцию определенных генов. Очевидно, что *cAMP как вещество-регулятор имеет длинную эволюционную историю.* У бактерий cAMP служит сигналом голодания. Появление cAMP свидетельствует об отсутствии глюкозы и ведет к синтезу ферментов, необходимых для использования других источников энергии. В некоторых клетках млекопитающих, таких, как клетки печени и мышц, cAMP сохраняет свою древнюю функцию сигнала голодания, но при этом действие cAMP направлено на стимуляцию протеинкиназы, а не на усиление транскрипции определенных генов. Еще одно важное различие состоит в том, что у высших организмов cAMP стал вторым посредником, участвуя во внутриклеточных, а не внеклеточных коммуникативных связях.

Почему в ходе эволюции cAMP превратился во второго посредника? Представляется, что здесь сыграли роль три фактора.

1. cAMP образуется из повсеместно присутствующего ATP в ходе несложной реакции, протекающей за счет энергии последующего гидролиза пирофосфата.

2. Будучи производным вещества, занимающего центральное положение в метаболических превращениях, сам cAMP стоит в стороне от основных путей метаболизма. cAMP используется только как интегратор обмена веществ и не является ни предшественником в процессах биосинтеза, ни промежуточным продуктом в энергетическом обмене. Вследствие этого концентрация cAMP может регулироваться однозначно. Более того, cAMP стабилен, если не подвергается действию специфической фосфодиэстеразы.

3. cAMP обладает достаточным количеством функциональных групп, которые обеспечивают прочное и специфическое связывание с рецепторными белками (например, с регуляторной субъединицей протеинкиназы мышц) и развитие соответствующих аллостерических эффектов.

Важно отметить, что *использование cAMP как второго посредника приводит к значительному усилению гормонального сигнала.* Так, многие гормоны в крови присутствуют в концентрациях порядка 10^{-10} М. В стимулированных клетках-мишенях концентрация cAMP намного выше, так как каждая активированная молекула аденилатциклазы синтезирует много молекул cAMP. Фосфорилирование множества молекул белка молекулой протеинкиназы, активированной cAMP, представляет собой еще один этап усиления гормонального сигнала. Каскад

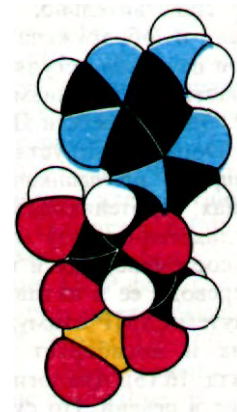


Рис. 35.7. Пространственная модель cAMP.

ферментативных реакций, регулирующих обмен гликогена, служит примером того, как малые стимулы могут вызвать значительные изменения метаболизма клетки.

35.7. Холерный токсин стимулирует аденилаткиназу, ингибируя GTP-азную активность G-белка

Непосредственное участие cAMP в патологических процессах было четко установлено при холере. Возбудителем этого потенциально смертельного заболевания является *Vibrio cholerae* - грам-отрицательная бактерия с одним жгутиком, с помощью которого она движется. Основное клиническое проявление холеры - сильнейший понос (диарея). В течение нескольких часов организм может потерять несколько литров жидкости, и если потерю жидкости не возместить, то развивается шок и наступает смерть. Диарея обусловлена не прямым действием бактерии, а бактериальным токсином. *Холерный токсин (называемый также холерагеном) повышает активность аденилатциклазы в слизистой тонких кишок, которая в свою очередь повышает содержание cAMP в клетках, причем до исключительно высокого уровня.* Последнее стимулирует активный транспорт ионов в кишечном эпителии, вследствие чего резко возрастает выход Na^+ и воды в полость кишечника.

Холерный токсин - белок массой 87 кДа; он состоит из A_1 и A_2-пептидов, соединенных дисульфидным мостиком, и пяти B-пептидов. Токсин проникает в клетку путем взаимодействия с ганглиозидом G_{M1} (разд. 20.7) на ее поверхности. Этот богатый углеводами сфинголипид узнают B-цепи токсина. Попав в клетку, A_1-субъединица (23 кДа) ковалентно модифицирует G-белок, регулирующий активность аденилатциклазы. В частности, A_1-субъединица токсина катализирует перенос ADP-рибозы от NAD на боковую цепь аргинина G-белка (рис. 35.8). Это ADP-рибозилирование блокирует GTP-азную активность G-белка. Другими словами, модифицированный G-белок лишается встроенного в него устройства для инактивации аденилатциклазы (см. рис. 35.5). *По существу, G-белок оказывается стабилизированным в GTP-форме, а аденилатциклаза - в непрерывно активированном состоянии, несмотря на отсутствие гормона.* Аналогичный эффект можно получить *in vitro* путем добавления к немодифицированному G-белку гуанилилимидодифосфата - негидролизуемого аналога GTP.

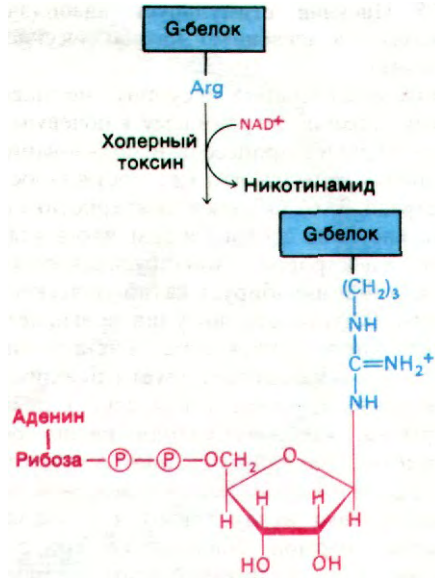


Рис. 35.8. Холерный токсин катализирует ADP-рибозилирование G-белка - регулятора активности аденилатциклазы.

Этот аналог, подобно GTP, активирует G-белок, но не способен превращаться в GDP. Связывание гуанилилимидодифосфата с немодифицированным G-белком так же активирует аденилатциклазу, как связывание GTP G-белком, утратившим GTPазную активность. Действие холерного токсина еще раз доказывает значение GTPазной активности G-белка. Вспомним, что вредоносное действие дифтерийного токсина также обусловлено ADP-рибозилированием белка с GTPазной активностью (разд. 29.28).

35.8. Инсулин стимулирует анаболические процессы и ингибирует катаболические процессы

Обратимся теперь к инсулину - полипептидному гормону, играющему ключевую роль в интеграции процессов использования топливных веществ, что уже обсуждалось выше (разд. 23.6). Общая характеристика функции инсулина состоит в том, что в мышцах печени и жировой ткани он усиливает анаболические и ингибирует катаболические процессы. В частности, инсулин повышает скорость синтеза гликогена, жирных кислот, белков, а также стимулирует гликолиз. Важное значение имеет такой аспект действия гормона, как *стимуляция проникновения глюкозы, ряда других сахаров, а также аминокислот в клетки мышц и жировой ткани*. Способствуя входу глюкозы в указанные клетки, гормон снижает ее содержание в крови (так называемый *гипогликемический эффект*). Инсулин ингибирует такие катаболические процессы, как распад гликогена и нейтрального жира. Он тормозит также гликонеогенез путем снижения уровня ферментативной активности пируват-карбоксилазы и фруктозо-1,6-бисфосфатазы. Действие инсулина во многом противоположно действию адреналина и глюкагона. По существу, *адреналин и глюкагон служат сигналами недостаточности глюкозы, тогда как инсулин - сигнал избытка глюкозы*.

35.9. Препроинсулин и проинсулин - предшественники активного гормона

Как показал Фредерик Сангер (Frederik Sanger), бычий инсулин состоит из двух цепей: А-цепи из 21 аминокислотного остатка

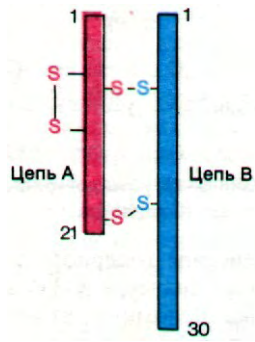


Рис. 35.9. Полипептидные цепи и дисульфидные мостики в инсулине.

Рис. 35.10. Изучение белка с высокой радиоактивностью, выявляемой после импульсного введения метки в аденому островковой ткани поджелудочной железы, привело к открытию проинсулина (непрерывной линией показана радиоактивность, прерывистой - оптическая плотность при 280 нм).

и В-цепи из 30 остатков; цепи инсулина ковалентно связаны между собой двумя дисульфидными мостиками (рис. 35.9). Аналогичное строение имеют инсулины других видов животных, в том числе человека. Как синтезируется этот двухцепочечный белок? *A priori* можно предположить, что А- и В-цепи синтезируются по отдельности, затем они специфически связываются в результате нековалентных взаимодействий и далее между ними формируются правильно расположенные дисульфидные мостики. Такое предположение было проверено экспериментально; для этого определяли, можно ли из восстановленных А- и В-цепей получить *in vitro* активный гормон с правильным расположением дисульфидных мостиков. Стимулом для этого исследования послужили данные Анфинсена (Anfinsen), посвященные рибонуклеазе - одноцепочечному белку, способному к полной ренатурации после химического восстановления и развертывания структуры (разд. 2.12). Однако в случае инсулина был получен совершенно иной результат: менее 4% образованных *in vitro* молекул содержали правильные дисульфидные пары. Такой же низкий выход ренатурированного белка имел место и в случае с химотрипсином - трехцепочечным ферментом, имеющем две межцепочечные дисульфидные связи (разд. 8.2). С другой стороны, химотрипсиноген - одноцепочечный пред-

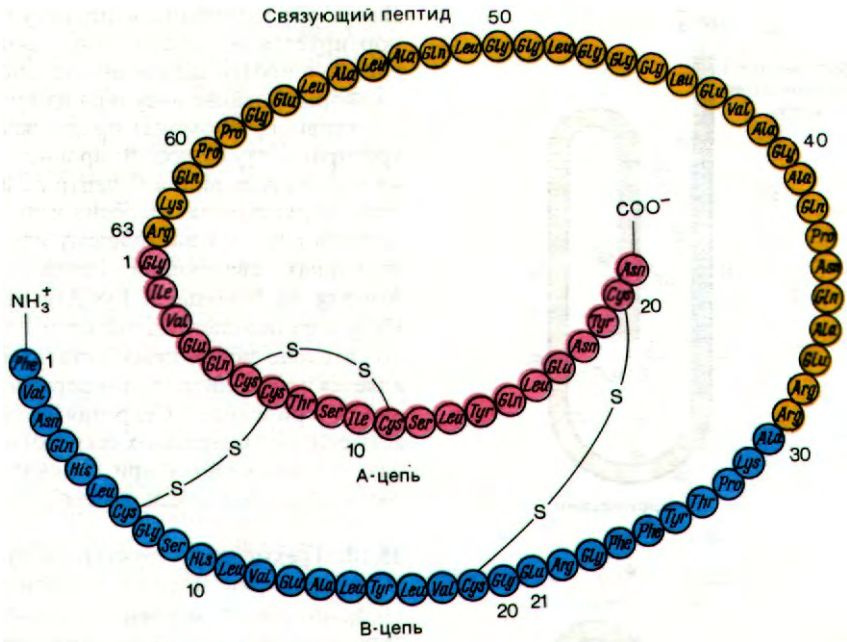


Рис. 35.11. Последовательность аминокислот в проинсулине свиньи; А-цепь инсулина показана красным цветом, В-цепь - синим, связующий пептид (С-пептид) - желтым. [Chance R.E., Ellis R.M., Bromer W.W.. Science, 161, 165 (1968).]

шественник химотрипсина - восстанавливал свою структуру в значительно большей мере. Различие в поведении химотрипсина и химотрипсиногена наводило на мысль о том, что и инсулин не восстанавливал структуры должным образом из-за частичного отсутствия необходимой для этого информации. Возник вопрос, не является ли инсулин, подобно химотрипсину, производным одной полипептидной цепи?

Решающую роль в изучении этой проблемы сыграла работа Доналда Стайнера (Donald Steiner), проведенная на аденоме островковой ткани поджелудочной железы. Эта редко встречающаяся опухоль человека продуцирует большие количества инсулина. Стайнер инкубировал срезы опухоли с меченным тритием лейцином и далее проводил анализ. Таким путем был обнаружен новый включавший большое количество метки белок (рис. 35.10). Последующие исследования показали, что этот белок, названный *проинсулином,* служит *предшественником инсулина.*

Проинсулин представляет собой единую полипептидную цепь, в которой есть последовательность примерно из 30 аминокислот, отсутствующая в инсулине (рис. 35.11). Это *связующий пептид* (*С-пептид* от англ. connecting - связующий); он расположен между карбоксильным концом В-цепи и аминоконцом А-цепи будущего инсулина. Как и предполагалось, *проинсулин обладает способностью к формированию правильно расположенных дисульфидных связей после обработки восстанавливающими агентами и последующего повторного окисления.*

Недавно проведенные исследования биосинтеза инсулина выявили, что проинсулин - это еще не исходная форма синтезированного гормона. Новообразованная полипептидная цепь, попадающая в просвет шероховатого эндоплазматичсского ретикулума, представляет собой так называемый *препроинсулин,* который содержит N-концевую последовательность из 16 остатков, отсутствующую в проинсулине. По-видимому, этот N-концевой гидрофобный участок служит сигнальной последовательностью, направляющей новообразованную цепь в эндоплазматический ретикулум (разд. 29.30). Превращение препроинсулина в проинсулин происходит в просвете трубочек эндоплазматического ретикулума вскоре после прохождения препроинсулина через мембрану.

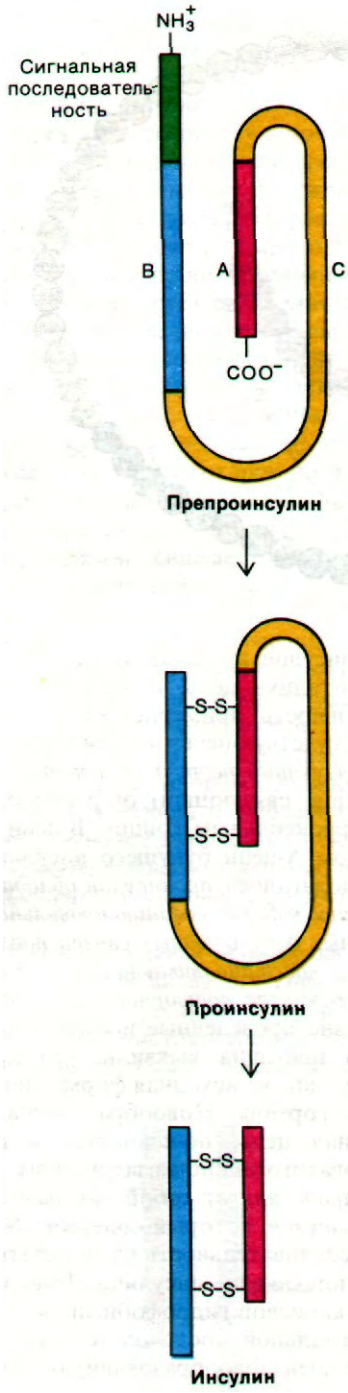


Рис. 35.12. Ферментативное превращение препроинсулина в проинсулин и далее в инсулин.

Далее образовавшийся проинсулин транспортируется в аппарат Гольджи, где начинается протеолиз соединительного пептида. Формирование инсулина из проинсулина (неактивного гормона) продолжается в секреторных гранулах. В проинсулинах животных разных видов С-пептиды имеют общие структурные особенности. Так, во всех изученных к настоящему времени проинсулинах связующий пептид содержит Arg-Arg на N-конце и Lys-Arg на С-конце. Гидролиз полипептидной цепи по этим положительно заряженным остаткам осуществляется протеолитическим ферментом, сходным с трипсином. Секреция инсулина, накопленного в созревших секреторных гранулах, осуществляется при слиянии мембран гранул с плазматической мембраной клетки.

35.10. Трехмерная структура инсулина

В лаборатории Дороти Ходжкин (Dorothy Hodgkin) было проведено рентгеноструктурное исследование инсулина свиньи и раскрыта его трехмерная пространственная структура при разрешении 1,9 А. Эта работа была завершена почти через 36 лет после того, как Ходжкин получила первые рентгенограммы кристалла белка (пепсина), будучи студенткой-дипломницей в лаборатории Джона Бернала (John Bernal). За прошедшие годы Ходжкин расшифровала структуры та-

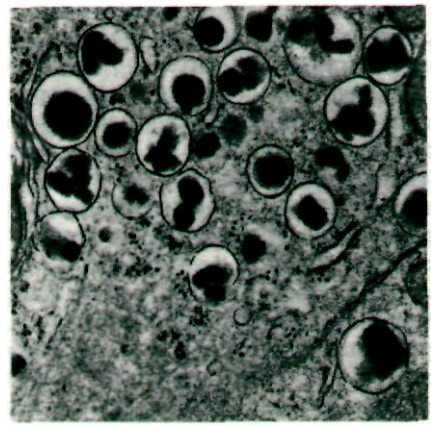


Рис. 35.13. Электрононограмма содержащих инсулин секреторных гранул в β-клетках поджелудочной железы. Инсулин образует в гранулах мелкие кристаллы, что обусловлено его высокой концентрацией в этих структурах. (Печатается с любезного разрешения д-ра Arthur Like.)

ких биологически важных веществ, как холестерол, пенициллин и витамин B_{12}. *Инсулин оказался компактным трехмерным образованием* (рис. 35.14), из которого «торчат» только N- и С-концы В-цепи. Между этими двумя вытянутыми ветвями В-цепи располагается А-цепь. Структура имеет неполярную сердцевину, образованную обращенными внутрь алифатическими боковыми цепями остатков аминокислот, принадлежащих А- и В-цепям. Помимо дисульфидных мостиков, инсулин стабилизирован несколькими солевыми связями, а также водородными связями между определенными группами А- и В-цепей. Конформация проинсулина еще не исследована, но, судя по данным спектроскопии, она очень сходна с конформацией инсулина. Об этом же свидетельствует способность проинсулина кристаллизоваться вместе с инсулином.

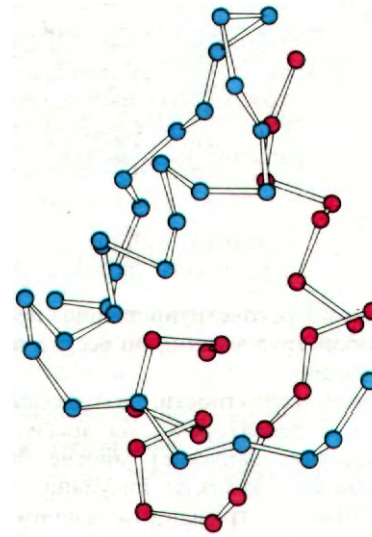


Рис. 35.14. Схематическое изображение структуры инсулина; показаны только α-углеродные атомы. Красным обозначена А-цепь. синим - В-цепь.

35.11. Рецепторы инсулина локализованы в плазматической мембране клеток-мишеней

Инсулин прочно связывается со специфическими рецепторами на плазматической мембране клеток-мишеней. Это выявляется в опытах с использованием радиоактивного инсулина, содержащего ковалентно связанный ^{125}I. Константа диссоциации инсулин-рецепторного комплекса составляет около 10^{-10} М. Необходимость в столь прочном связывании объясняется низкой концентрацией инсулина в крови (порядка 10^{-10} М). Константа скорости образования комплекса очень велика (около 10^7 $M^{-1} \cdot c^{-1}$) и приближается к величине, характеризующей реакции, скорость которых регулируется только скоростью диффузии. Клетка жировой ткани содержит всего лишь $1 \cdot 10^4$ рецепторов инсулина, что соответствует плотности *один рецептор на квадратный микрометр плазматической мембраны.* Иными словами, один рецептор инсулина приходится на $1 \cdot 10^6$ фосфолипидов мембраны.

Параметры связывания инсулина с солюбилизированным рецептором и с рецептором в интактной плазматической мембране одинаковы. Солюбилизированные рецепторы были очищены методом аффинной хроматографии, т. е. методом, основанным на использовании специфических связывающих свойств рецептора. Для очистки препарат солюбилизированных мембран пропускали через колонку агарозы с ковалентно присоединенным инсулином; рецепторы инсулина прочно связывались с колонкой, тогда как остальные компоненты смеси проходили сквозь колонку. Далее рецепторы инсулина элюировали подкисленным раствором мочевины, который вызывал денатурацию рецепторов и их отделение от связанного с агарозой инсулина. По счастью, очищенные рецепторы удавалось затем ренатурировать путем удаления мочевины и повышения pH раствора. Используя этот метод, Педро Кватрсказас (Pedro Cuatrecasas) очистил рецепторы инсулина в 250000 раз. Субъединица рецептора, связывающего инсулин, представляет собой гликопротеин массой 135 кДа (рис. 35.15).

На долю рецепторов инсулина приходится всего лишь $4 \cdot 10^{-3}$% общего количества мембранных белков в гомогенате печени. Следовательно, чтобы получить в чистом виде 1 мг белка-рецептора, необходимо подвергнуть обработке количество гомогената, эквивалентное 500 г белка, а для этого нужно взять печень от 200 крыс. Этот расчет показывает, что выделение рецепторов в количестве, достаточном для определения последовательности аминокислот, рентгеноструктурного анализа

Диабет - название указывает на повышенное мочеиспускание. Аретей, каппадокийский врач второго столетия н.э., писал: «Эпитет «диабет» относится к состоянию, похожему на прохождение воды по сифону». Он с тонкой наблюдательностью охарактеризовал диабет как «растворение плоти и конечностей и превращение их в мочу».

Сахарный - (по латыни mellitus, т.е. «подслащенный медом») указывает на присутствие сахара в моче больных диабетом.

и опытов по реконструированию, представляет собой трудоемкую, но все же выполнимую задачу.

По всей вероятности, взаимодействие инсулина с рецепторами на плазматической мембране запускает многие быстро развивающиеся эффекты инсулина, например активацию транспорта аминокислот и глюкозы через мембрану. К числу быстро развивающихся эффектов инсулина относится также фосфорилирование белка, принадлежащего рибосомной 40S-субчастице. Все эти эффекты гормона не связаны с изменением содержания cAMP. Какие вещества опосредуют действие инсулина в клетке, пока еще не установлено.

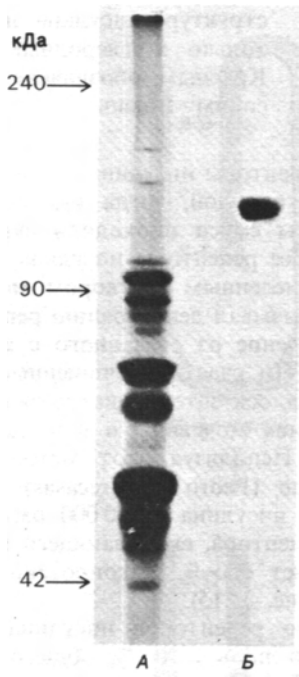


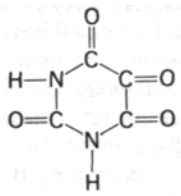
Рис. 35.15. Гель-электрофорез экстракта плазматических мембран клеток печени (*А*) и очищенного рецептора инсулина (*Б*). Электрофорез проводился в денатурирующих условиях. [Jacobs S., Hazum E., Schechter Y., Cuatrecasas P., Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 4919 (1979).]

35.12. Недостаточность инсулина вызывает диабет

Сахарный диабет - это сложное заболевание, которым страдают несколько сот миллионов людей. Диабет характеризуется повышенным уровнем глюкозы в крови и в моче. Выделение глюкозы с мочой наступает в условиях, когда содержание глюкозы в крови превышает способность почечных канальцев к реабсорбции. Вместе с глюкозой выделяется много воды, так что нелеченый больной в острой стадии заболевания испытывает голод и жажду. Потеря глюкозы приводит к израсходованию запасов углеводов, а затем и к расщеплению жиров и белков. В результате мобилизации жиров образуется большое количество ацетил-CoA. Если ацетил-CoA не может полностью использоваться в цикле трикарбоновых кислот из-за недостаточного количества оксалоацетата, то образуются кетоновые тела (ацетоацетат, ацетон и гидроксимасляная кислота). Вспомним, что в организме животных синтеза оксалоацетата из ацетил-CoA не происходит; у животных оксалоацетат образуется из глюкозы и некоторых аминокислот (разд. 23.4). Выделение кетоновых тел нарушает кислотно-щелочное равновесие и усиливает обезвоживание организма. В итоге в острой стадии диабета у нелеченого больного может развиваться кома и наступить смерть.

Сахарный диабет обусловлен недостаточностью инсулина. Причины же недостаточности инсулина в большинстве случаев неизвестны. Диабет удается воспроизвести

у экспериментальных животных путем хирургического удаления значительной части поджелудочной железы либо путем химического разрушения β-клеток. Эти продуцирующие инсулин клетки избирательно разрушаются при введении аллоксана. Диабет можно также вызвать введением антител против инсулина. Еще одно доказательство той важной роли, которую играет инсулиновая недостаточность в развитии диабета, состоит в том, что введение инсулина быстро снимает острые симптомы диабета.



Аллоксан
(2,4,5,6-тетраоксипиримидин)

Почему у больного диабетом количество инсулина оказывается ниже потребностей в нем тканей? *В настоящее время установлено, что в основе клинического состояния, называемого сахарным диабетом, может лежать множество различных молекулярных дефектов.* Рассмотрим некоторые из причин диабета.

1. *Нарушение превращения проинсулина в инсулин.* В результате мутаций, затрагивающих остатки аминокислот в участке соединения А-цепи (или В-цепи) с С-пептидом в проинсулине, может нарушиться его превращение в инсулин. У таких больных в плазме крови обнаруживается высокий уровень содержания проинсулина (не обладающего гормональной активностью).

2. *Нарушение молекулярной структуры инсулина.* Еще один тип мутаций приводит к замене аминокислотного остатка в критически важном участке молекулы инсулина. Так, если произошла замена фенилаланина на лейцин вблизи карбоксильного конца В-цепи, то гормональная активность такого инсулина оказывается сниженной в 10 раз. Любопытно, что этот участок молекулы инсулина сохраняется неизменным в эволюции, начиная с примитивных миксин и до человека.

3. *Дефект рецепторов инсулина.* У некоторых больных секретируется нормальный инсулин, но нарушается его связывание с клетками-мишенями. Следовательно, в этом случае имеет место дефект рецепторов инсулина в плазматических мембранах.

4. *Нарушение сопряжения рецепторов инсулина.* Бывают случаи, когда у больных секретируется нормальный инсулин, клетки-мишени содержат обычное число рецепторов инсулина и параметры связывания гормона рецептором также соответствуют норме. По-видимому, у этих больных нарушения локализованы внутри клетки. Возможно, в частности, что отсутствует сопряжение между инсулин-рецепторным комплексом и следующим компонентом в цепи передачи гормонального сигнала.

35.13. Эндорфины - пептиды мозга, действующие подобно опиатам

На протяжении веков опиаты, в частности морфин, использовались как болеутоляющие средства. В 1680 г. Томас Сиденхем (Thomas Sydenham) писал: «Среди всех лекарств, которые всевышний даровал человеку, дабы облегчить его страдания, нет более универсального и более действенного, чем опий». Но почему в мозгу позвоночных содержатся рецепторы к алкалоидам из семян мака? Нейрофармакологи предположили, что опиатные рецепторы предназначены не для взаимодействия с растительными алкалоидами, а для восприятия эндогенных регуляторов ощущения боли. Согласно этой точке зрения, морфин оказывает фармакологический эффект только потому, что он имитирует вещества, существующие в организме животного. Вопрос этот был окончательно разрешен в 1975 г., когда Джон Хьюз (John Hughes) выделил из мозга свиньи два пептида с опиатоподобной активностью. Эти сходные между собой пентапептиды, названные *метионин-энкефалином и лейцин-энкефалином,* присутствуют в большом количестве в некоторых нервных окончаниях. По-видимому, они участвуют в интеграции сенсорной информации, имеющей отношение к боли.

Спустя год Роджер Гилемин (Roger Guillemin) выделил из промежуточной доли гипофиза более длинные пептиды — *эндорфины.* Эндорфины обладают почти такой же способностью снимать ощущение боли, как морфин (при той же концентрации). Введение эндорфинов в желудочки мозга лабораторным животным оказывает

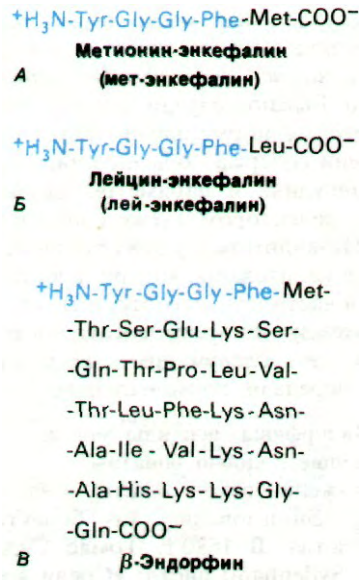


Рис. 35.16. Последовательности аминокислот метионин-энкефалина (*А*), лейцин-энкефалина (*Б*) и β-эндорфина (*В*). Синим цветом показана общая для них тетрапептидная последовательность.

примечательное действие. Так, β-эндорфин на несколько часов индуцирует глубокую анальгезию всего тела, причем в этот период понижается температура тела. Более того, у животных возникает ступор, и они лежат распластавшись. Спустя несколько часов действие эндорфинов исчезает, и животные вновь ведут себя нормально. Выяснился также удивительный факт, что действие эндорфинов исчезает через несколько секунд после введения *налоксона* (рис. 35.17), известного антагониста морфина. Судя по поведенческим реакциям, индуцированным эндорфинами, эти пептиды в нормальных условиях участвуют в регуляции эмоциональных ответов. Многие методы, необходимые для проверки этой гипотезы, уже разработаны. Так, для определения крайне малых количеств пептидов, например эндорфинов, используется *радиоиммунологический анализ,* который сочетает чувствительность радиоизотопных методов со специфичностью иммунной реакции. Здесь мы сталкиваемся с зарождением новой и многообещающей области нейробиологии и нейропсихиатрии.

35.14. При расщеплении проопиокортина образуется несколько пептидных гормонов

Хотя β-эндорфин был открыт недавно, однако последовательность аминокислот в нем оказалась знакомой. В самом деле, β-эндорфин имеет такую же последовательность, как С-концевая область β-*липотропина* - гормона, который Чо Ли (Chou Li) выделил из гипофиза. *In vivo* β-эндорфин образуется путем протеолитического расщепления β-*липотропина,* накопленного в секреторных гранулах. В последующем был обнаружен еще более крупный белок, включающий последовательности β-липотропина и кортикотропина. Этот прогормон (массой 29 кДа) был назван *про-опиокортином,* так как он служит предшественником опиатного гормона и кортикотропина (рис. 35.18). *Кортикотропин* (называемый также адренокортикотропным гормоном или АКТГ) способствует разрастанию коры надпочечников и стимулирует синтез целого набора стероидных гормонов в этой ткани. Из про-опиокортина образуется два меланоцитстимулирующих гормона (МСГ). Один из них - α-МСГ - является фрагментом кортикотропина, а второй - β-МСГ - формируется из β-липотропина (рис. 35.18). Не исключено, что N-концевая половина про-опиокортина служит источником и других гормонов. Из изложенного ясно, что *пептидные гормоны образуются из про-опиокортина, как из рога изобилия.* Этот прогормон состоит из четырех гомологичных областей, которые,

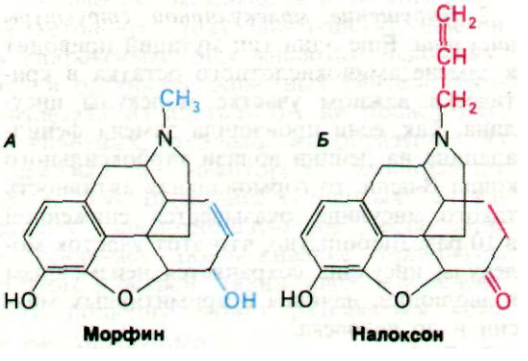


Рис. 35.17. Структура морфина - опиата (*А*) и налоксона - антагониста морфина (*Б*).

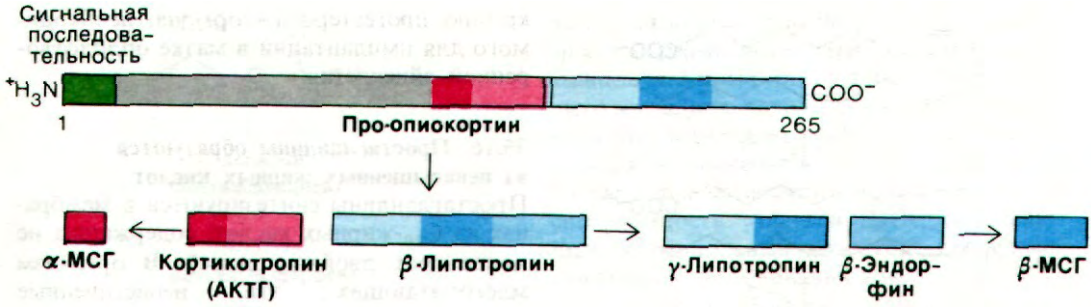


Рис. 35.18. Про-опиокортин - биосинтетический предшественник нескольких пептидных гормонов.

видимо, возникли путем последовательных удвоений гена.

Участки соединения между будущими активными гормонами в про-опиокортине содержат *пары основных остатков* (Lys-Arg, Arg-Arg или Lys-Lys). Следует подчеркнуть, что границы С-пептида в проинсулине (см. рис. 35.11) и в пропаратгормоне также представлены парами основных остатков. Видимо, именно пары основных остатков в различных прогормонах служат теми отметинами, которые указывают, в каких участках должно произойти последующее расщепление.

35.15. Простагландины - модуляторы действия гормонов

Обратимся теперь к простагландинам - группе жирных кислот, оказывающих влияние на разнообразнейшие физиологические процессы. Эти соединения были открыты в 30-х годах, но внимание привлекли только недавно, главным образом благодаря работам Суне Бергстрома (Sune Bergstrom). Простагландины - это *20-углеродные жирные кислоты, содержащие 5-углеродное кольцо.* Основные классы простагландинов обозначаются как ПГ-А, ПГ-В, ПГ-Е и ПГ-F, причем внизу дополнительно ставится цифра, указывающая на число углерод-углеродных двойных связей в углеводородной цепи (вне кольца). *Простагландины, по-видимому, не являются гормонами, но модулируют действие гормонов.* Обычно они изменяют активность тех клеток, в которых синтезировались. Характер действия простагландинов зависит от типа клетки, и этим они отличаются от гормонов с их однозначно определенным эффектом.

Подробно исследован механизм действия ПГ-E_1 на расщепление жиров в жировой ткани. Такие гормоны, как адреналин, глюкагон, кортикотропин и тиреотропин, стимулируют липолиз в клетках. ПГ-Е, в концентрации 10^{-8} М является сильным ингибитором их липолитического эффекта. Непосредственное отношение к этому имеет тот факт, что ПГ-E_1 предот-

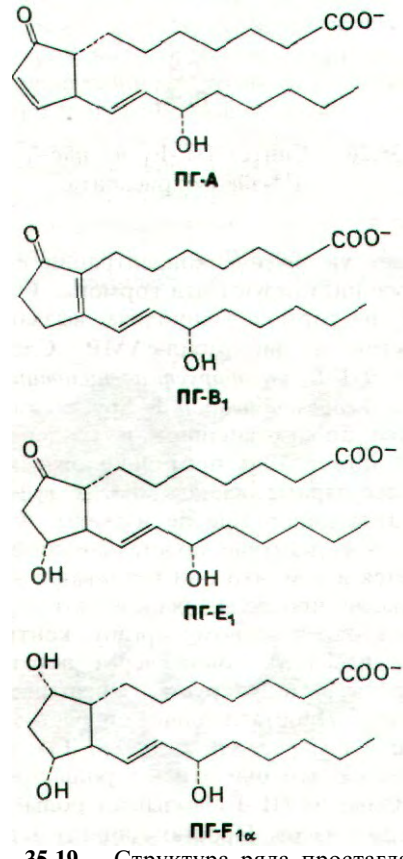


Рис. 35.19. Структура ряда простагландинов.

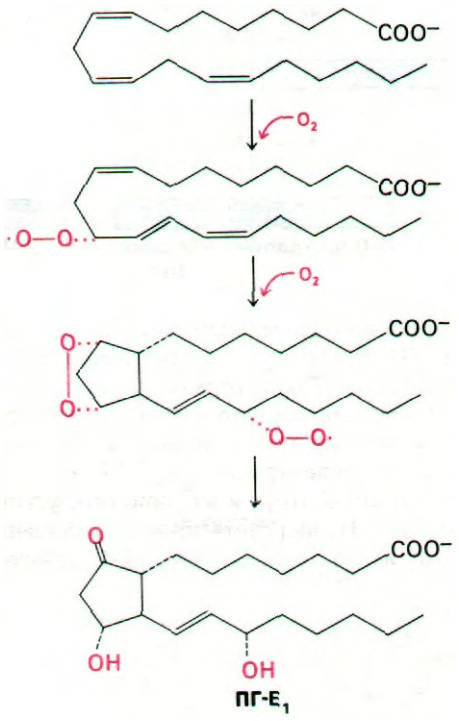


Рис. 35.20. Синтез ПГ-E_1 из *цис*-Δ^8, Δ^{11}, Δ^{14}-эйкозотриеноата.

вращает увеличение концентрации cAMP, которое индуцируют эти гормоны. Однако ПГ-E_1 не тормозит липолиза, вызванного добавлением дибутирил-cAMP. Следовательно, ПГ-E_1 *ингибирует аденилатциклазу клеток жировой ткани.* В других клетках влияние простагландинов на содержание cAMP может быть противоположным.

Молекулярные основы многих эффектов простагландинов еще не изучены. Физиологическое действие простагландинов выражается в том, что они усиливают воспалительные процессы, регулируют приток крови к определенному органу, контролируют транспорт ионов через некоторые мембраны, модулируют синаптическую передачу. Простагландины представляют большой интерес для клиники. Так, предполагается, что они играют роль при родах. Вливание ПГ-E_2 вызывает роды через несколько часов. Простагландины в принципе могут быть использованы как контрацептивы; показано, что ПГ-$F_{2\alpha}$ снижает секрецию прогестерона - гормона, необходимого для имплантации в матке оплодотворенной яйцеклетки.

35.16. Простагландины образуются из ненасыщенных жирных кислот

Простагландины синтезируются в мембранах из C_{20}-жирных кислот, содержащих не менее трех двойных связей. В организм млекопитающих эти ненасыщенные жирные кислоты поступают с пищей (разд. 17.23). Предшественники простагландинов высвобождаются из фосфолипидов мембран под действием фосфолипаз. Биосинтез ПГ-E_1, например, начинается с цис-Δ^8,Δ^{11},Δ^{14}-эйкозотриеноата. Образование циклопентанового кольца и включение трех атомов кислорода осуществляются *простагландин-синтазой* (называемой также *простагландин-циклооксигеназой*). Как и предполагалось *a priori*, источником всех трех атомов кислорода служит молекулярный кислород (рис. 35.20). Гемсодержащий фермент диоксигеназа, катализирующий эти реакции, связан с гладким эндоплазматическим ретикулумом.

Как показал Джон Вейн (John Vane), *аспирин тормозит биосинтез простагландинов путем инактивирования простагландин-синтаз.* Причина угнетения активности этого фермента аспирином (ацетилсалицилатом) заключается в том, что он ацетилирует концевую аминогруппу одной из субъединиц простагландин-синтазы (рис. 35.21). Простагландины усиливают воспалительные процессы, тогда как аспирин подавляет их. По-видимому, такое фармакологическое действие аспирина обусловлено тем, что он ингибирует биосинтез простагландинов.

35.17. Стероидные гормоны активируют специфические гены

Первичный эффект стероидных гормонов, в частности эстрадиола, прогестерона и кортизона, состоит в воздействии на *выражение генов,* а не непосредственно на активность фементов или процессы транспорта. В отличие от адреналина эти стероидные гормоны оказывают свое действие, только проникнув в клетку-мишень. Кроме того, местом их первичного действия служит не плазматическая мембрана, а *клеточное ядро.* Для полного проявления биологического эффекта стероидных гормонов требуются часы, а не минуты, поскольку он зависит от *синтеза новых белков.* Актиномицин D тормозит

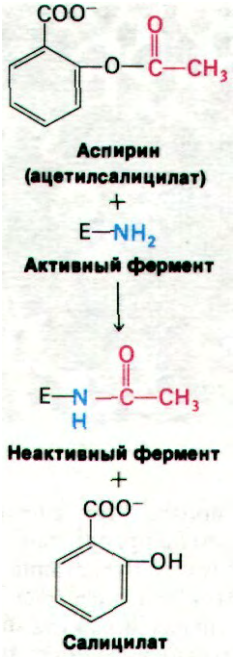
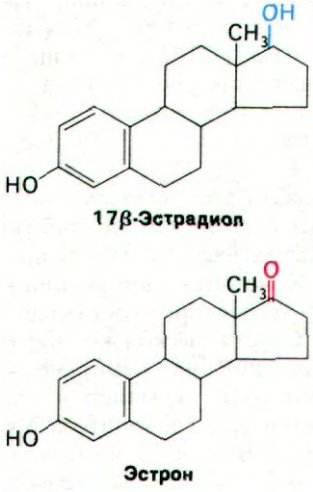


Рис. 35.21. Инактивация простагландинсинтазы аспирином.

действие указанных стероидов, из чего следует, что оно *связано с синтезом новой мРНК.*

17β-эстрадиол стимулирует увеличение матки. Первый этап этого воздействия состоит в том, что гормон связывается со специфическим рецептором в цитоплазме клеток матки. Связывание характеризуется высокой прочностью ($K \simeq 10^{-9}$ М). Образовавшийся гормон-рецепторный комплекс мигрирует далее в клеточное ядро. *В результате связывания рецептора с эстрадиолом сродство рецептора к ДНК значительно повышается.* Кроме того, у рецептора, связавшего эстрадиол, появляется вторая субъединица. Последнее находит отражение в увеличении коэффициента седиментации с 4S до 5S. Остается неизвестным, чем определяется специфичность участков ДНК, связывающих эстрадиольный рецептор: последовательностью ли оснований или белками хромосом. Взаимодействие гормон-рецепторного комплекса с ДНК высокоспецифично. Кроме того, строго специфична и активация рецептора путем связывания гормона. К рецептору эстрадиола может присоединиться эстрон, но этот комплекс не взаимодействует с ДНК. Неспособность эстрон-рецепторного комплекса к связыванию с ДНК вполне согласуется с тем, что эстрон не стимулирует увеличения матки.



По-видимому, описанный механизм развития гормонального эффекта характерен не только для эстрадиола, но и в целом для всех стероидных гормонов. Так, в опытах с культурой ткани гепатомы было показано, что глюкокортикоидный стероидный гормон дексаметазон тоже связывается со специфическим цитоплазматическим рецептором; рецептор, связавший гормон, претерпевает конформационные изменения и затем мигрирует в клеточное ядро, где образует комплекс со специфическими

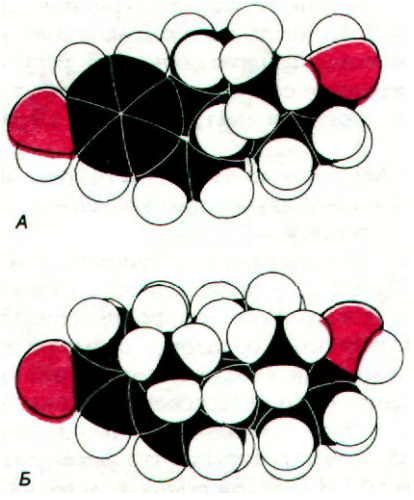


Рис. 35.22. Пространственные модели 17β-эстрадиола (*А*) и тестостерона (*Б*).

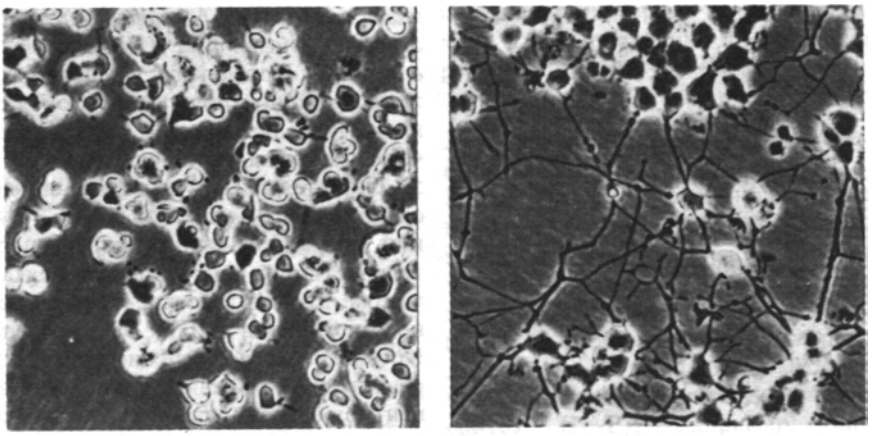


Рис. 35.23. Фактор роста нервов (ФРН) индуцирует отрастание аксонов от культивируемых нервных клеток. *А* -без ФРН; *Б* - в присутствии ФРН. (Печатается с любезного разрешения Bruce Yankner, Christiana Richter-Landsberg и д-ра Erick Shooter.)

участками в ДНК. Число участков ДНК, связывающих этот рецептор, определено равным 1 на 10^6 пар оснований. Полученное число согласуется с данными о том, что дексаметазон влияет на транскрипцию лишь небольшого числа генов. Каков механизм этой высокой избирательности в регуляции транскрипции со стороны стероидных гормонов, остается интригующей загадкой.

35.18. Белковые факторы роста типа ФРН и ЭФР стимулируют пролиферацию клеток-мишеней

Как регулируется рост эукариотических клеток? Проведенное в последние годы выделение белковых факторов роста, способных специфическим образом стимулировать клетки-мишени, внесло существенный вклад в решение этого интересного и важного вопроса. Рита Леви-Монтальчини (Rita Levi-Montalcini) открыла, что *фактор роста нервов (ФРН) играет решающую роль в развитии симпатических нейронов и определенных сенсорных нейронов у позвоночных.* Под влиянием ФРН начинается деление и дифференцировка этих клеток. Чувствительным тестом на присутствие фактора роста нервов служит отрастание аксонов от культивируемых ганглиев (рис. 35.23). Биологически активная молекула ФРН состоит из двух идентичных полипептидных цепей массой по 13 кДа. Этот димер (называемый β-субъединицей) накапливается в месте своего синтеза - поджелудочной железе - в виде комплекса, имеющего субъединичную структуру $\alpha_2\gamma_2\beta$ и массу 130 кДа. γ-Субъединица является протеолитическим ферментом, а α-субъединица - ингибитором этой протеиназы. ФРН синтезируется в виде состоящего из α- и β-субъединиц прогормона, который в последующем расщепляется γ-протеиназой. По последовательности аминокислот ФРН напоминает инсулин. Следует отметить, что инсулин не только сильно активирует анаболические процессы в мышцах, печени и жировой ткани, но и оказывает стимулирующий эффект на рост большинства клеток. Можно предположить, что гены ФРН и инсулина произошли от общего предшественника.

Был выделен и изучен также *эпидермальный фактор роста* (ЭФР). Это полипептид массой 6 кДа (рис. 35.24), способный стимулировать рост эпидермальных и эпителиальных клеток. ЭФР прочно связывается на плазматической мембране клеток-мишеней. Константа диссоциации комплекса ЭФР—рецептор составляет около 10^{-10} М. Спустя несколько минут после связывания ЭФР на мембране кластеры ЭФР-рецепторных комплексов попадают внутрь клетки путем эндоцитоза. Участками эндоцитоза являются так называемые окаймленные ямки (вдавления мембраны), со-

держащие клатрин (разд. 29.32). Далее пузырьки с ЭФР сливаются с лизосомами. Аналогичным образом попадают внутрь клеток и ФРН-рецепторные комплексы (рис. 35.25). Остается неизвестным, насколько необходим собственно процесс проникновения этих комплексов в клетку для передачи стимулирующего сигнала клеточному ядру.

Заключение

Гормоны - это группа химически разнородных соединений, которые интегрируют активность различных клеток в многоклеточном организме. Решающую роль в действии многих гормонов (например, адреналина или глюкагона) играет cAMP, который служит вторым посредником внутри клетки-мишени. Гормоны, действие которых опосредовано cAMP, связываются со специфическими рецепторами на плазматической мембране клетки-мишени и активируют аденилатциклазу. Последняя представляет собой связанный с мембраной фермент, катализирующий синтез cAMP и ATP. Сопряжение между рецепторами гормонов и аденилатциклазой осуществляет белок, связывающий гуаниннуклеотиды (G-белок). Активация аденилатциклазы приводит к увеличению содержания cAMP в клетке. Образовавшийся cAMP активирует в свою очередь протеинкиназу, которая фосфорилирует один или несколько белков. Так, фосфорилирование гликоген-синтазы и киназы фосфорилазы в мышцах и печени ведет к ингибированию синтеза и активации распада гликогена. Этот каскад реакций многократно усиливает первоначальный гормональный стимул. cAMP появился на ранних этапах эволюции, первоначально как сигнал голодания. Холерный токсин катализирует ADP-рибозилирование G-белка, что приводит к стойкой активации аденилатциклазы в клетках кишечного эпителия. В результате при холере происходит массивный выход Na^+ и воды в полость кишечника.

Инсулин активирует анаболические процессы (синтез гликогена, жирных кислот и белков) и тормозит катаболизм (в частности распад гликогена и жиров). Инсулин оказывает сильнейшее воздействие на процессы мембранного транспорта; в частности, он стимулирует вход глюкозы и аминокислот в клетки мышечной и жировой ткани. Биосинтетическими предшественниками активного гормона служат препроин-

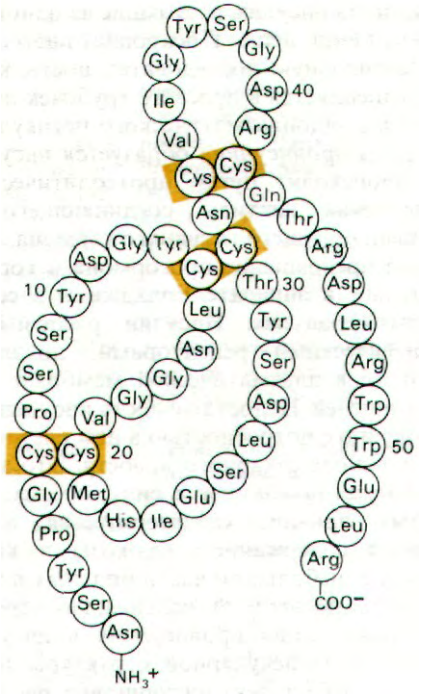


Рис. 35.24. Последовательность аминокислот в эпидермальном факторе роста (ЭФР). [Savage C. R., Hash J.H., Cohen S., J. Biol. Chem., 248, 7669 (1973).]

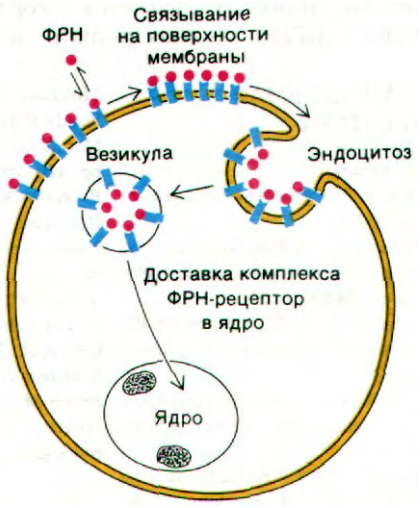


Рис. 35.25. Проникновение в клетку комплекса ФРН-рецептор. (По рисунку, любезно предоставленному д-ром Erick Shooter.)

сулин и проинсулин, состоящие из одной полипептидной цепи. Препроинсулин содержит сигнальную последовательность, которая отщепляется в просвете трубочек шероховатого эндоплазматического ретикулума. Далее из проинсулина образуется инсулин; это происходит путем протеолитического отщепления пептида, соединяющего А- и В-цепи будущего активного гормона. Указанное превращение прогормона в гормон протекает в аппарате Гольджи и в секреторных гранулах. Инсулин распознается специфическими рецепторами, локализованными в плазматической мембране клеток-мишеней. Недостаточность инсулина по сравнению с потребностью в нем клеток лежит в основе сахарного диабета. Это заболевание, возникающее в силу многих различных причин, характеризуется повышенным содержанием глюкозы в крови и моче. У небольшой части больных диабетом обнаружены такие явления, как нарушение превращения проинсулина в инсулин, изменение молекулярной структуры инсулина, а также дефект инсулиновых рецепторов клеточных мембран.

Эндорфины и энкефалины - это пептиды мозга, оказывающие такой же эффект, как опиаты, в частности морфин. β-Эндорфин образуется из про-опиокортина - прогормона, являющегося источником и других биологически активных пептидов: кортикотропина (АКТГ), β-липотропина и меланоцитстимулирующего гормонов (α- и β-МСГ). Участки соединения между будущими гормонами в про-опиокортине, как и в проинсулине, содержат пары основных аминокислотных остатков. Небольшие по молекулярной массе белки служат также гормонами роста, что видно на примере фактора роста нервов или эпидермального фактора роста. Эти белки стимулируют деление и дифференцировку клеток-мишеней, Время проявления их действия - часы и дни. Аналогично и эффект стероидных гормонов (например, эстрадиола, прогестерона и кортизона) развертывается на протяжении нескольких часов или дней. Действие стероидов направлено главным образом на регуляцию выражения генов. Показано, что эстрадиол проникает в клетку-мишень и связывается со специфическим рецептором в цитозоле. К образовавшемуся комплексу присоединяется вторая субъединица белка, после чего весь комплекс попадает в ядро, где происходит его связывание со специфическими участками ДНК. Простагландины, которые синтезируются из полиеновых C_{20}-жирных кислот, модулируют действие различных гормонов, но сами не являются гормонами. Аспирин подавляет синтез простагландинов путем ковалентной модификации фермента, катализирующего включение атомов кислорода в ходе биосинтеза простагландинов.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Pastan I., 1972. Cyclic AMP, Sci. Amer., 227(2), 97-105.

Rubenstein E., 1980. Diseases caused by impaired communication among cells, Sci. Amer., 242(3), 102-121.

Sutherland E.W., 1972. Studies on the mechanism of hormone action, Science, 177, 401-408.

Synder S.H., 1977. Opiate receptors and internal opiates, Sci. Amer., 236(3), 44-56.

Guillemin R., 1978. Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron, Science, 202, 390-402.

Рецепторы гормонов

Baxter J.D., MacLeod K.M., 1980. Molecular basis for hormone action. In: Bondy P. K. and Rosenberg L. E. (eds.), Metabolic Control and Disease, pp. 104-160, Saunders.

Bradshaw R.A., Frazier W.A., 1977. Hormone receptors as regulators of hormone action, Curr. Top. Cell Regul., **12,** 1-35.

Kahn C.R., 1976, Membrane receptors for hormones and neurotransmitters, J. Cell Biol., 70, 261-286.

Goldstein J.L., Anderson R.G.W., Brown M.S., 1979. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis, Nature, 279, 679-685.

cAMP и аденилатциклаза

Ross E.M., Oilman A.G., 1980. Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase, Ann. Rev. Biochem., 49, 533-564.

Rodbell M., 1980. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction, Nature, 284, 17-22.

Helmreich E.J.M., Zenner H.P., Pfeuffer T., Cori C.F., 1976. Signal transfer from hormone receptor to adenylate cyclase, Curr. Top. Cell Regul., **10,** 41-87.

Greengard P., 1978. Phosphorylated proteins as physiological effectors, Science, 199, 146-152.

Means A.R., Dedham J.R., 1980. Calmodulin: an intracellular calcium receptor, Nature, 285, 73-77.

Холерный токсин

Moss J., Vaughan M., 1979. Activation of adenylate cyclase by choleragen, Ann. Rev. Biochem., 48, 581-600.

Hirschorn N., Greenough W.B., III, 1971. Cholera, Sci. Amer, 225(2), 15-21.

Инсулин и диабет

Czech M.P., 1977. Molecular basis of

insulin action, Ann. Rev. Biochem., 46, 359-384.
Steiner D.F., 1977. Insulin today, Diabetes, 26, 322-340.
Renold A.E., *Mintz D.H.*, *Muller W.A.*, *Cahill G.F., Jr.*, 1978. Diabetes mellitus. In: Stanbury J.B., Wyngaarden J.B. and Fredrickson D.S. (eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease (4th ed.), McGraw-Hill.
Tager H., *Given B.*, *Baldwin D.*, *Mako M.*, *Markese J.*, *Rubenstein A.*, *Olefsky J.*, *Kobayashi M.*, *Kolterman O.*, *Poucher R.*, 1979. A structurally abnormal insulin causing human diabetes, Nature, 281, 122-125.

Эндорфины и опиаты
Guillemin R., 1977. Endorphins: brain peptides that act like opiates, New Engl. J. Med., 296, 226-228.
Nakanishi S., *Inoue A.*, *Kita T.*, *Nakamura M.*, *Chang A.C.Y.*, *Cohen S.N.*, *Numa S.*, 1979. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-*b*-lipotropin precursor, Nature, 278, 423-427.
Synder S.H., 1977. Opiate receptors in the brain, New Engl. J. Med., 296, 266-271.

Факторы роста
Haigler H.T., *Cohen S.*, 1979. Epidermal growth factor: interactions with cellular receptors. Trends Biochem. Sci, 4, 132-134.
Greene L.A., *Shooter E.M.*, 1980. The nerve growth factor: biochemistry, synthesis, and mechanism of action, Ann. Rev. Neurosci., 3, 353-402.
Levi-Montalcini R., *Calissano P.*, 1979. The nerve-growth factor, Sci. Amer., **240(6),** 68-77.

Стероидные гормоны и витамин D
Yamamoto K.R., *Alberts B.M.*, 1976. Steroid receptors: elements for modulation of eukaryotic transcription, Ann. Rev, Biochem., 45, 721-746.
DeLuca H.F., 1974. Vitamin D: the vitamin and the hormone, Fed. Proc., **33,** 2211-2219.
Haussler M.R., *McCain T.A.*, 1977. Basic and clinical concepts related to vitamin D metabolism and action, New Engl. J. Med., 297, 974-984, 1041-1049.

Простагландины
Samuelsson B., *Granstrom E.*, *Green K.*, *Hamberg M.*, *Hammarstrom S.*, 1975. Prostaglandins, Ann. Rev. Biochem., 44, 669-695.
Roth G.J., *Siok C.J.*, 1978. Acetylation of the NH_2-terminal serine of prostaglandin synthetase by aspirin, J. Biol. Chem., 253, 3782-3784.
Vane J.R., 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs, Nat. New Biol., 231, 232-235.

Радиоиммунологический метод определения гормонов
Yalow R.S., 1978. Radioimmunoassay: a probe for the fine structure of biologic systems, Science, 200, 1236-1246.

Общее представление о проблеме
Hood L.E., *Wilson J.H.*, *Wood W.B.*, 1975. Molecular Biology of Eucaryotic Cells, ch. 6, Benjamin.

ГЛАВА 36
Мембранный транспорт

Биологические мембраны представляют собой высокоизбирательные барьеры проницаемости. Поток молекул и ионов между клеткой и окружающей средой строго регулируется специфическими системами транспорта. Транспортные процессы выполняют несколько важных функций.

1. *Регулируют объем клетки и поддерживают внутриклеточное значение pH и ионный состав в узких пределах колебаний,* что создает благоприятные условия для проявления активности ферментов.

2. Экстрагируют из среды и *концентрируют субстраты энергетического и пластического обмена (топливо и строительные блоки),* а также *выведение токсических веществ.*

3. Создают ионные градиенты, что необходимо для поддержания *возбудимости* нервов и мышц.

В настоящее время начинают выясняться молекулярные механизмы, лежащие в основе многих процессов транспорта. В этой главе мы рассмотрим ряд транспортных систем, обеспечивающих перенос ионов, сахаров и аминокислот через биологические мембраны бактериальных и животных клеток. Мы обсудим также продуцируемые микроорганизмами транспортные антибиотики, поскольку именно анализ их структуры позволил выяснить, каким образом системы транспорта различают такие ионы, как, например, Na^+ и K^+. Последняя часть этой главы содержит описание каналов, соединяющих содержимое прилежащих друг к другу клеток. Эти протоки (рис. 36.1) играют важную роль в межклеточной коммуникации.

36.1. Различие между пассивным и активным транспортом

Является ли процесс транспорта активным или пассивным, зависит от изменения свободной энергии транспортируемых компонентов. Рассмотрим случай, когда транспортируется незаряженное растворенное вещество (рис. 36.2). Свободная энергия его переноса из отсека 1, где оно находится в концентрации c_1, в отсек 2, где его концентрация равна c_2, составляет

$$\Delta G = RT \ln \frac{c_2}{c_1} = 2{,}303RT \lg \frac{c_2}{c_1}.$$

Для заряженного компонента следует учитывать также электрический потенциал мембраны. Сумма концентрационной и электрической составляющих дает *электрохимический потенциал.* Изменение свободной энергии в этом случае составит

$$\Delta G = RT \lg \frac{c_2}{c_1} + ZF\Delta V,$$

где Z - электрический заряд транспортируемого компонента, ΔV - мембранная разность потенциалов в вольтах и F - число Фарадея (23,062 ккал • $В^{-1}$ • $моль^{-1}$).

Если ΔG положительно, то процесс транспорта должен быть активным; если же ΔG отрицательно, то транспорт может осуществляться пассивно. *Активный транспорт требует сопряжения с притоком свободной энергии, тогда как пассивный транспорт может идти спонтанно.* Рассмотрим для примера транспорт незаряженного вещества из $c_1 = 10^{-3}$ мМ в $c_2 = 10^{-1}$ мМ: $\Delta G = 2{,}3RT\lg(10^{-1}/10^{-3}) = 2{,}3 \cdot 1{,}98 \cdot 298 \cdot 2 = +2{,}7$ ккал/моль. При 25°С (298 К) $\Delta G = +2{,}7$ ккал/моль, что указывает на активный транспорт, нуждающийся в притоке свободной энергии. Такой транспортный процесс может протекать за счет, например, гидролиза ATP, энергия которого составляет —7,3 ккал/моль в стандартных условиях.

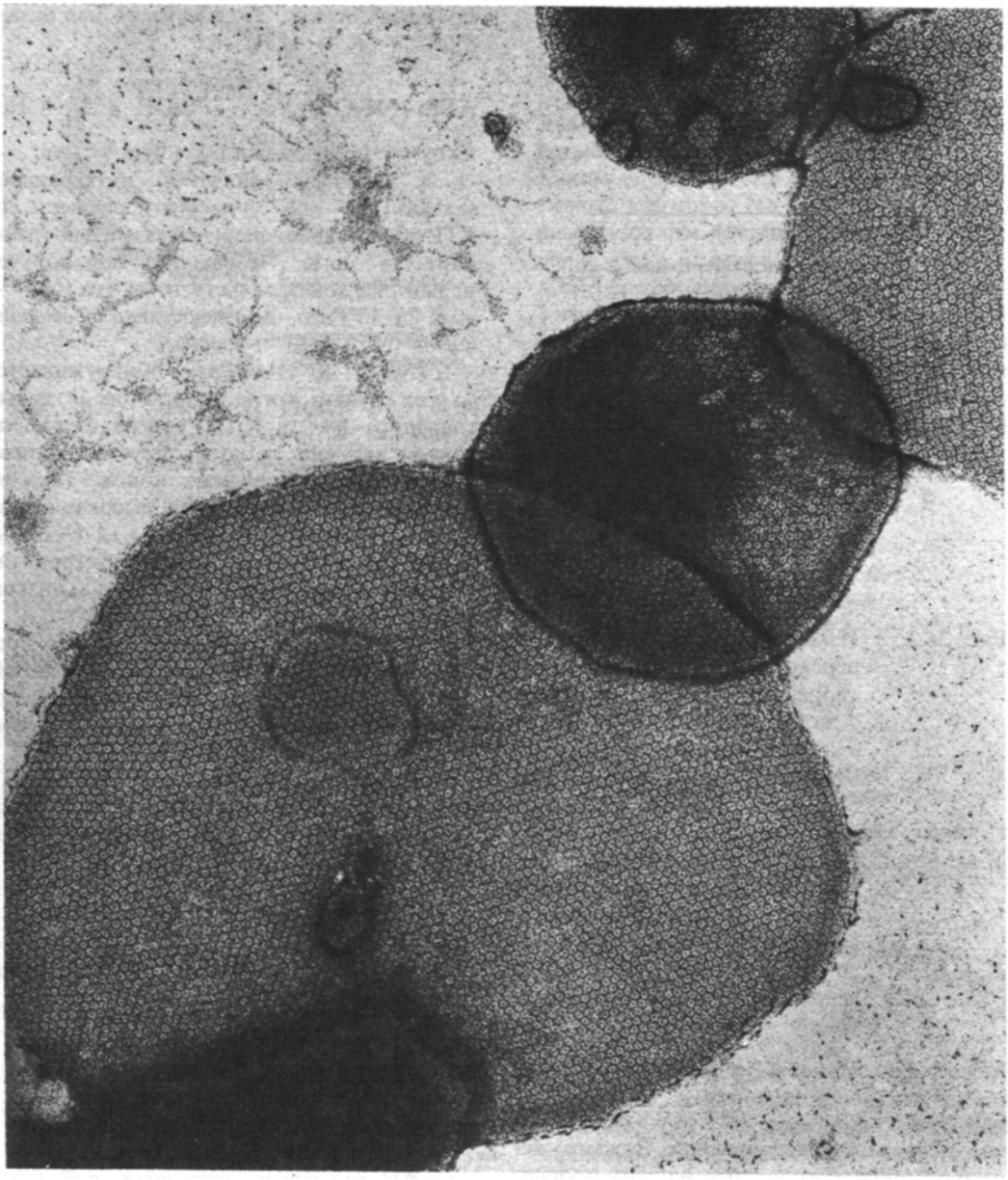


Рис. 36.1. Электронная микрофотография негативно окрашенных межклеточных соединений, выделенных из клеток печени. По таким каналам диаметром 15 А ионы и небольшие молекулы могут перетекать из одной клетки в другую. [Hertzberg E. L, Gilula N. B., J. Biol. Chem., **254,** 2143 (1979).]

36.2. Открытие системы активного транспорта ионов натрия и калия

Большинство животных клеток имеет высокую концентрацию K^+ и низкую концентрацию Na^+ по сравнению с окружающей клетку средой. Градиенты этих ионов создаются специфической транспортной системой, называемой (Na^+ + K^+)-*насосом,* поскольку движение этих ионов взаимосвязано. Активный транспорт Na^+ и K^+ имеет огром-

Рис. 36.2. Изменение свободной энергии переноса незаряженного растворенного вещества из отсека с концентрацией c_1 в отсек с концентрацией c_2 (*А*) и одновалентных ионов через мембрану на сторону, имеющую одноименный с ионом заряд (*Б*). Обратите внимание, что мембранный потенциал 59 мВ требует для транспорта одновалентного иона при 25°С такого же изменения свободной энергии, как и градиент концентрации, равный 10.

ное физиологическое значение. В самом деле, в организме животного на этот процесс затрачивается более трети АТР, расходуемой в состоянии покоя. Градиенты концентрации Na^+ и K^+ регулируют объем клетки, обеспечивают электрическую возбудимость нервных и мышечных клеток и служат движущей силой для активного транспорта Сахаров и аминокислот (разд. 36.10).

В 1957 г. Йенс Скоу (Jens Skou) открыл фермент, гидролизующий АТР только при условии добавления Na^+ и K^+ в содержащую Mg^{2+} среду. Этот фермент был назван *(Na^+ + K^+)-АТРазой:*

$$ATP + H_2O \xrightarrow{Na^+, K^+, Mg^{2+}} ADP + P_i + H^+$$

Скоу предположил, что (Na^+ + + K^+)-АТРаза является интегральной частью (Na^+ + K^+)-насоса и расщепление АТР обеспечивает энергией активный транспорт Na^+ и K^+. С тех пор был получен целый ряд доказательств того, что *(Na^+ + + K^+)-АТРаза - действительно составная часть (Na^+ + K^+)-насоса.*

1. (Na^+ + K^+)-АТРаза обнаруживается во всех случаях, когда происходит активный транспорт Na^+ и K^+. Уровень ферментативной активности коррелирует с количеством транспортируемых ионов. Так, нервным клеткам свойственна высокая активность и (Na^+ + K^+)-АТРазы, и (Na^+ + + K^+)-насоса, тогда как в эритроцитах оба этих показателя находятся на низком уровне.

2. И (Na^+ + K^+)-АТРаза, и насос прочно связаны с плазматической мембраной.

3. (Na^+ + K^+)-АТРаза и насос одинаково ориентированы в плазматической мембране.

4. Изменения концентраций Na^+ и K^+ оказывают одинаковое действие на АТРазную активность и скорость транспорта этих ионов.

5. Кардиотонические стероиды являются специфическими ингибиторами и (Na^+ + + K^+)-АТРазы, и (Na^+ + K^+)-насоса. Концентрация ингибитора, оказывающая

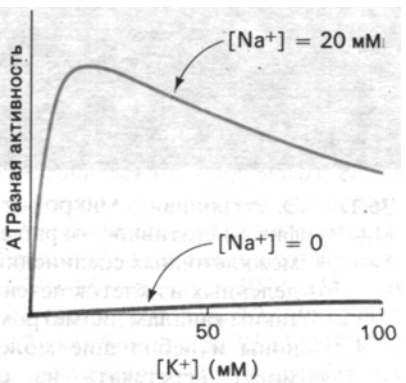


Рис. 36.3. (Na^++K^+)-АТРаза [компонент (Na^+ + K^+)-насоса] гидролизует АТР только в том случае, если в среде, содержащей Mg^{2+}, одновременно присутствуют Na^+ и K^+.

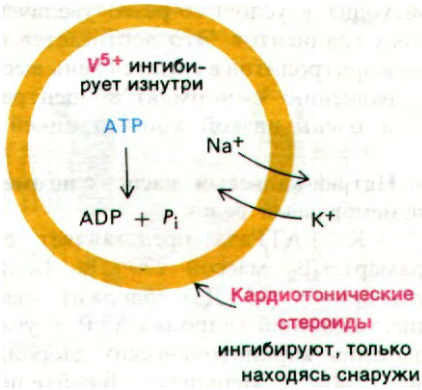


Рис. 36.4. (Na^+ + K^+)-насос строго ориентирован в плазматической мембране.

полумаксимальный эффект, для обоих процессов одинакова.

6. При обращении работы насоса в определенной ионной среде происходит синтез ATP из ADP и P_i;.

36.3. И фермент, и насос ориентированы в мембране

Исследование (Na^+ + K^+)-насоса в тенях эритроцитов позволило установить, как ориентированы (Na^+ + K^+)-ATPаза и (Na^+ + K^+)-насос. В гипотонической солевой среде эритроцит набухает, и в его мембране появляются дырки. Из него выходит гемоглобин и остается светлая мембрана (тень). Содержимое набухшего эритроцита можно уравновесить с наружной средой. Если наружный раствор сделать изотоничным. то мембрана вновь становится барьером проницаемости. Следовательно, молекулярный и ионный состав среды внутри теней можно отрегулировать путем запечатывания их в соответствующей среде. Исследования процессов транспорта и ферментативной активности в тенях эритроцитов показало, что (Na^+ + K^+)-насос ориентирован следующим образом (рис. 36.4).

1. Для активации ATPазы и переноса через мембрану ионы Na^+ должны быть внутри, а ионы K^+ - снаружи.

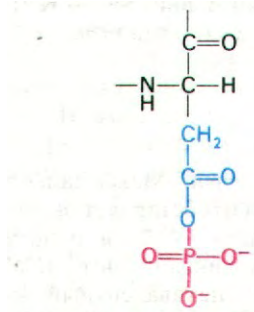
2. Только находящийся внутри клетки ATP служит эффективным субстратом ATPазы и используется для работы насоса.

3. Кардиотонические стероиды ингибируют насос и ATPазу только в том случае, если они находятся вне клетки (снаружи).

4. Ванадат-ионы ингибируют насос и ATPазу только при условии, что они находятся внутри клетки.

36.4. ATP транзиторно фосфорилирует натрий-калиевый насос

Каким образом ATP обеспечивает активный транспорт Na^+ и K^+? Ключом к решению этого вопроса оказалось наблюдение, что в присутствии Na^+ и Mg^{2+} ATP фосфорилирует (Na^+ + K^+)-ATPазу. Участком фосфорилирования служит боковая цепь специфического остатка аспартата. Далее в присутствии K^+ происходит гидролиз фосфорилированного промежуточного продукта (E—P). Для реакции фосфорили-



β-Аспартилфосфат
(промежуточное соединение E—P)

рования не требуется K^+, а для реакции дефосфорилирования не требуются ни Na^+, ни Mg^{2+}:

$$E + ATP \overset{Na^+, Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} E{-}P + ADP,$$

$$E{-}P + H_2O \xrightarrow{K^+} E + P_i.$$

Na^+-зависимое фосфорилирование и K^+-зависимое дефосфорилирование - не единственные реакции, имеющие критическое значение. В процессе функционирования насос принимает по крайней мере две разные конформации, обозначаемые как E_1 и E_2. Всего же в транспорте Na^+ и K^+ и сопряженном с ним гидролизе ATP участвует не менее четырех конформационных форм фермента: E_1, E_1—P, E_2—P и E_2 (рис. 36.5). *При гидролизе одной молекулы ATP происходит перенос трех ионов Na^+ и двух ионов K^+.* Следовательно, работа насоса генерирует электрический ток через мембрану. Другими словами, (Na^+ + K^+)-ATPазный

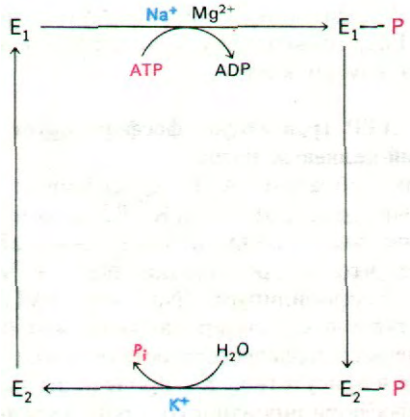


Рис. 36.5. Циклическое изменение конформации ($Na^+ + K^+$)-АТРазы в ходе катализа.

насос *электрогенен*. Максимальное число оборотов АТРазы составляет около 100 $с^{-1}$.

Ионы ванадата (V^{5+}) в наномолярных концентрациях ингибируют ($Na^+ + K^+$)-АТРазу. Этот пятивалентный ион фиксирует белок в форме E_2. Ванадат является аналогом переходного состояния, образующегося при гидролитическом отщеплении фосфорильной группы, так как он способен принять бипирамидальную структуру, подобную той. какую дает фосфат (рис. 36.6).

36.5. Транспорт ионов и гидролиз АТР тесно сопряжены

Важная характеристика насоса состоит в том, что *в отсутствие транспорта Na^+ и K^+ не происходит гидролиза АТР*. Другими словами, система так сопряжена, что энергия АТР не растрачивается впустую. Прочное сопряжение - общая особенность биологических систем, опосредующих превращение энергии. Вспомним, что и в митохондриях условием нормального потока электронов в дыхательной цепи служит одновременное генерирование АТР (разд. 14.13). Другой пример сформулированного принципа - обязательное сопряжение гидролиза АТР и мышечного сокращения.

Действие ($Na^+ + K^+$)-насоса можно обратить так, чтобы он приводил к синтезу АТР. Суммарный синтез АТР из ADP и P_i происходит в условиях резко увеличенных ионных градиентов. Это достигается инкубацией эритроцитов в среде с очень высокой (по сравнению с нормой) концентрацией Na^+ и очень низкой концентрацией K^+.

36.6. Натрий-калиевый насос - олигомерный трансмембранный белок

($Na^+ + K^+$)-АТРаза представляет собой тетрамер $\alpha_2\beta_2$ массой 270 кДа. Большая α-субъединица (95 кДа) содержит участок, осуществляющий гидролиз АТР, и участок связывания кардиотонических стероидных ингибиторов. Меньшая β-субъединица (40 кДа) содержит углеводные группы. Между двумя α-субъединицами или между α- и β-субъединицами (но не между двумя β-субъединицами) легко образуются поперечные мостики. Исходя из этого факта, можно было предположить, что α-субъединицы контактируют друг с другом, тогда как β-субъединицы пространственно разделены. Как уже упоминалось, гидролиз АТР протекает на той стороне мембраны, которая обращена к цитозолю, а участок связывания стероидных ингибиторов находится на наружной стороне мембраны. Следовательно, каждая α-субъединица пронизывает мембрану насквозь (рис. 36.7). Углеводные цепи β-субъединиц расположены на наружной стороне плазматической мембраны, как это вообще свойственно мембранным гликопротеинам (разд. 10.12).

Любопытно отметить, что рассматриваемый ферментный комплекс обладает одним участком связывания стероидных ингибиторов, одним участком фосфорилирования и тремя участками связывания Na^+. Как

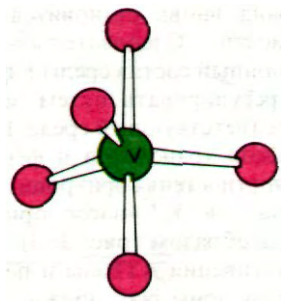


Рис. 36.6. Строение ванадат-иона (V^{5+}). Лиганды вокруг этого иона располагаются в виде двойной пирамиды, т.е. так же, как вокруг атома фосфора при гидролитическом отщеплении фосфорильной группы.

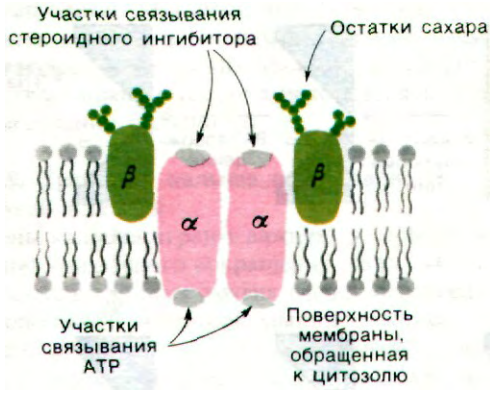


Рис. 36.7. Схематическое изображение субъединичной структуры и расположения в мембране ($Na^+ + K^+$)-насоса.

же получается, что тетрамер с субъединичной структурой $\alpha_2\beta_2$ содержит *нечетное* число связывающих участков? Одна из возможностей состоит в том, что участки связывания расположены между субъединицами, в месте их контактов. Вспомним, что $\alpha_2\beta_2$-тетрамер гемоглобина содержит единственный участок связывания бисфосфоглицерата, находящийся в полости, расположенной в центре молекулы (разд. 4.14). Однако существует и иная возможность, а именно такое взаимодействие двух $\alpha\beta$-половин фермента, при котором связывание в одном из двух участков препятствует связыванию в другом. В самом деле, целый ряд олигомерных ферментов проявляет такую половинную реакционноспособность.

36.7. Модель механизма действия натрий-калиевого насоса

Почему фосфорилирование и дефосфорилирование АТРазы приводят к переносу Na^+ и K^+ через мембрану? Структура этого насоса еще не настолько изучена, чтобы можно было детально описать механизм его действия. Все же полезно рассмотреть простую модель работы насоса, предложенную Олегом Ярдецким (Oleg Jardetzky). Согласно этой модели, структура белка, функционирующего в качестве насоса, должна отвечать трем условиям.

1. В белке должна быть полость такой величины, чтобы в ней умещались небольшая молекула или ион.

2. Белок должен существовать в двух конформациях, причем при одной из них полость должна быть открыта со стороны, обращенной внутрь, а при другой - со стороны, обращенной наружу.

3. Указанные конформации должны иметь разное сродство к транспортируемым компонентам.

Рассмотрим эту модель применительно к транспорту Na^+ и K^+ (рис. 36.8). Две конформации белка - это формы E_1 и E_2, уже описанные ранее. Постулировано, что 1) связывающая ионы полость на E_1 обращена внутрь клетки, а на E_2 - наружу и 2) E_1 обладает высоким сродством к Na^+, а E_2 - к K^+. Модель исходит также из двух установленных фактов, а именно 1) Na^+ запускает фосфорилирование, а K^+ - дефосфорилирование, 2) фосфорилирование стабилизирует форму E_2, а дефосфорилирование - форму E_1. На рис. 36.8 E_1 и E_2 изображены совершенно разными по конформации. Нужно, однако, подчеркнуть, что структурные различия между этими двумя формами вовсе необязательно должны быть большими. Сдвига нескольких атомов на расстояние 2 А может оказаться достаточно, чтобы изменить ориентацию полости и сродство к Na^+ или K^+. Существует множество прецедентов, позволяющих считать, что фосфорилирование способно вызвать изменения такого масштаба. Вспомним влияние фосфорилирования на свойства гликоген-фосфорилазы и гликоген-синтазы или на изменение сродства гемоглобина к кислороду при нековалентном связывании бисфосфоглицерата.

36.8. Кардиотонические стероиды - специфические ингибиторы ($Na^+ + K^+$)-АТРазы и ($Na^+ + K^+$)-насоса

Некоторые стероиды растительного происхождения являются мощными ингибиторами ($Na^+ + K^+$)-АТРазы и насоса. Полумаксимальное ингибирование обоих процессов наблюдается при концентрации ингибитора порядка 10^{-8} М. Представители этого класса ингибиторов, в частности дигитоксигенин и уабаин, называются *кардиотоническими стероидами в* связи с их выраженным действием на сердечную деятельность (рис. 36.9). Активность кардиотонических стероидов определяется наличием в их структуре 5- или 6-членного ненасыщенного лактонного кольца с β-конфигурацией при

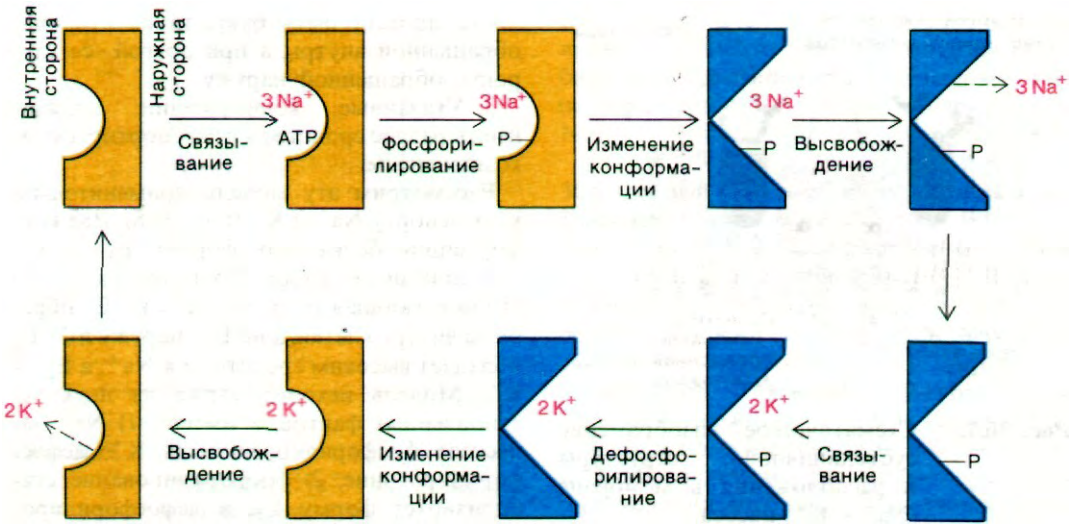
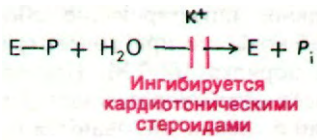


Рис. 36.8. Схематическое изображение предполагаемого механизма действия $(Na^+ + K^+)$-насоса. На верхней половине рисунка последовательность реакций, направленных на выведение трех ионов Na^+; ниже — последовательность реакций, обеспечивающих вход двух ионов K^+. Формы E_1 (желтый цвет) и E_2 (синий цвет) на рисунке сильно различаются по конформации. На самом деле конформационные различия могут быть очень небольшими.

С-17. Существенное значение имеют также гидроксильная группа при С-14 и *цис*-конфигурация сочленения колец С и D. В молекуле уабаина и ряда других кардиотонических стероидов при С-3 находится остаток сахара, однако этот сахар не имеет значения для ингибирования АТРазы.



Как уже упоминалось, кардиотонические стероиды ингибируют реакцию дефосфорилирования $(Na^+ + K^+)$-АТРазы. Ингибирование присходит только в том случае, если кардиотонические стероиды локализованы на *наружной* стороне мембраны. Таким образом, подавление дефосфорилирования этими стероидами пространственно так же асимметрично, как и активация дефосфорилирования ионами калия.

Кардиотонические стероиды, например *дигиталис,* имеют огромное значение в медицине. Дигиталис повышает силу сокращения сердечной мышцы и потому служит основным средством лечения острой сердечной, недостаточности. Ингибирование дигиталисом $(Na^+ + K^+)$-насоса приводит к повышению содержания Na^+ в клетках сердечной мышцы. Это сопровождается увеличением внутриклеточной концентрации Ca^{2+}, что в свою очередь повышает сократительную активность миокарда. Любопытно отметить, что дигиталис (алкалоид наперстянки) успешно использовался задолго до открытия $(Na^+ + K^+)$-АТРазы. В 1785 г. врач и ботаник Уильям Уитеринг (William Withering) опубликовал «Описание наперстянки и некоторые способы ее применения в медицине», где рассказывает, каким образом он впервые узнал об использовании дигиталиса для лечения острой сердечной недостаточности.

«В 1775 г. меня спросили, каково мое мнение о домашнем способе лечения водянки. При этом сообщили, что этот способ был известен одной старухе в Шропшире и она долго держала его в секрете. Старуха иногда вылечивала больных, которым не могли помочь врачи... Ее снадобье состояло из 20 или более различных трав, однако разбирающемуся в этом предмете нетрудно было заметить, что активным началом могла быть только на-

перстянка... Наперстянка влияет на биение сердца в большей степени, чем какое-либо из других лекарств, и это действие можно с успехом использовать для исцеления больного».

36.9. Транспорт кальция осуществляется другой АТРазой

Ионы кальция играют важную роль в регуляции мышечного сокращения (разд. 34.10), а также во многих других физиологических процессах. В скелетной мышце содержится сложная сеть связанных с мембраной трубочек и везикул. Эта мембранная система, называемая *саркоплазматическим ретикулумом,* регулирует концентрацию Ca^{2+} в среде, окружающей сократительные мышечные волокна. В состоянии покоя Ca^{2+} насасывается в саркоплазматический ретикулум, так что непосредственно вокруг миофибрил концентрация Ca^{2+} бывает очень

Рис. 36.9. Кардиотонические стероиды, например дигитоксигенин и уабаин, ингибируют (Na^+ + + K^+)-насос.

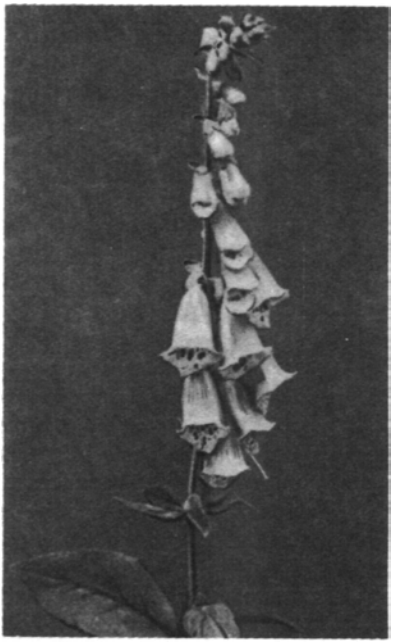


Рис. 36.10. Наперстянка. (Krochmal A., Krochmal C., A Guide to the Medicinal Plants of the United States, Quadrangle Books, 1973, p. 243.)

низкой. Возбуждение мембраны саркоплазматического ретикулума под влиянием нервного импульса ведет к мгновенному высвобождению больших количеств Ca^{2+}, и это запускает мышечное сокращение. Другими словами, *Ca^{2+} служит промежуточным звеном между нервным импульсом и сокращением мышечного волокна.*

Транспорт Ca^{2+} через мембрану саркоплазматического ретикулума происходит за счет энергии АТР. В саркоплазматическом ретикулуме имеется АТРаза, которую активирует Ca^{2+}. Эта Ca^{2+}-АТРаза является составной частью Ca^{2+}-насоса подобно тому, как (Na^+ + K^+)-АТРаза - часть (Na^+ + + K^+)-насоса. Ca^{2+}-АТРаза также подвергается фосфорилированию в ходе гидролиза АТР:

$$E + ATP \overset{Ca^{2+},\,Mg^{2+}}{\rightleftarrows} E{-}P + ADP,$$

$$E{-}P + H_2O \overset{Mg^{2+}}{\longrightarrow} E + P_i.$$

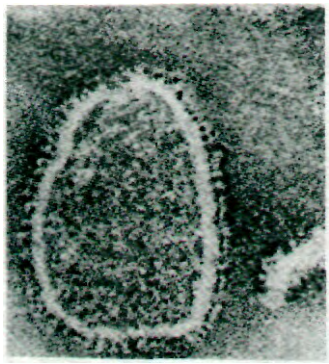


Рис. 36.11. Мембранные везикулы, образованные из очищенной Ca^{2+}-АТРазы. Глобулярные частицы на поверхности мембраны - участки молекулы АТРазы, пронизывающей мембрану. [Stewart P. S., MacLennan D. H., J. Bioi.Chem., 249, 987 (1974).]

Цикл конформационных изменений, обусловленных фосфорилированием и дефосфорилированием, обеспечивает перенос двух ионов Ca^{2+} при расщеплении одной молекулы АТР. Благодаря очень высокому сродству этой АТРазы к Ca^{2+} ($K \simeq 10^{-7}$ М) фермент эффективно транспортирует Ca^{2+} из цитозоля (где $[Ca^{2+}] < 10^{-5}$ М) в саркоплазматический рстикулум (где $[Ca^{2+}] \simeq 10^{-2}$ М).

Плотность молекул Ca^{2+}-насоса в мембране саркоплазматического ретикулума очень велика, а именно около 20 000 в расчете на 1 мкм^2. В сущности, Ca^{2+}-АТРаза составляет более 80% общего количества интегральных белков мембраны и занимает треть ее поверхности. Большая субъединица (100 кДа) Са-насоса пронизывет мембрану и содержит участок фосфорилирования; как и в (Na^+ + K^+)-насосе, таким участком является специфическая боковая цепь, представленная остатком аспартата. Еще одна общая черта обоих насосов - это наличие гликопротеина: в Ca^{2+}-насосе гликопротеин массой 55 кДа связан с большой субъединицей.

Из очищенной Ca^{2+}-АТРазы и фосфолипидов удалось реконструировать функционально активный Ca^{2+}-насос. В этом эксперименте Ca^{2+}-АТРазу выделяли из мембран саркоплазматического ретикулума после их солюбилизации детергентом холатом. Очищенный солюбилизированный фермент добавляли к фосфолипидам из соевых бобов. После удаления детергента путем диализа образовывались мембранные везикулы. Эти *реконструированные везикулы с высокой скоростью накапливали* Ca^{2+} *в присутствии АТР и* Mg^{2+}.

36.10. Поток Na^+ обеспечивает энергией активный транспорт сахаров и аминокислот в животных клетках

Многие транспортные процессы не зависят непосредственно от гидролиза АТР, а сопряжены с потоком ионов по электрохимическому градиенту. Так, во многих животных клетках насасывание глюкозы обеспечивается одновременным входом Na^+. При этом ионы натрия и глюкоза связываются со специфическим транспортным белком и проникают в клетку одновременно. Согласованный перенос двух компонентов называют *котранспортом;* при *симпорте* имеет место перенос обоих компонентов в одном направлении, а при *антипорте* - *в*

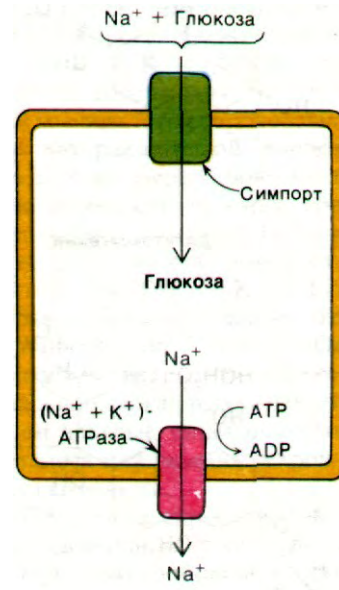


Рис. 36.12. Источником энергии для активного транспорта глюкозы служит градиент концентрации Na^+. Эта система симпорта свойственна плазматическим мембранам клеток кишечника и почек.

противоположных направлениях. Ионы натрия, которые входят в клетку вместе с молекулами глюкозы посредством симпорта, выводятся из клетки (Na^+ + K^+)-АТРазой (рис. 36.12). Количество транспортируемой глюкозы и скорость ее транспорта зависят от трансмембранного градиента концентрации Na^+.

Зависящий от Na^+ симпорт широко используется в животных клетках для накопления аминокислот. В некоторых клетках, например в микроворсинках щеточной каемки кишечника (рис. 36.13), посредством симпорта осуществляется активный транспорт сахаров. Кроме того, в тонком кишечнике существует специализированный Na^+-зависимый симпорт, обеспечивающий перенос ионов Cl^- против градиента концентрации. Во многих клетках ионы натрия служат также движущей силой в процессах антипорта, направленных на выведение ионов кальция. Таким образом, *градиент концентрации ионов натрия, создаваемый (Na^+ + K^+)-АТРазой, обеспечивает энергией большинство симпортов и антипортов в животных клетках.*

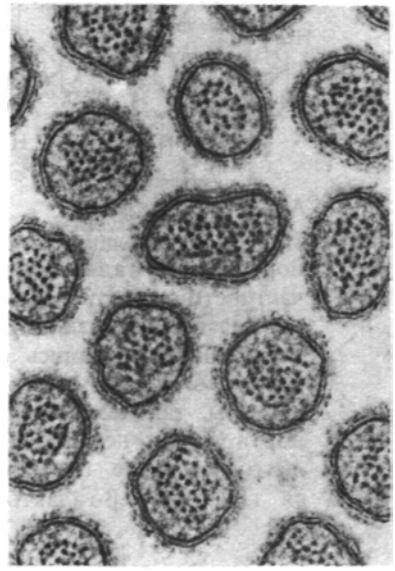


Рис. 36.13. Электронная микрофотография поперечного среза микроворсинок кишечника. Наличие микроворсинок во много раз увеличивает площадь поверхности, через которую происходит транспорт питательных веществ. (Печатается с любезного разрешения д-ра G. Pallade.)

36.11. Поток протонов служит движущей силой во многих процессах транспорта у бактерий

Симпорты и антипорты - эволюционно очень древние механизмы молекулярного транспорта. Так, движущей силой многих транспортных систем у бактерий служит поток протонов через плазматическую мембрану. Наиболее изученная бактериальная система симпорта - перенос лактозы у *E.coli* (рис. 36.14). У этой обитательницы нижних отделов кишечника млекопитающих выработался высокоэффективный механизм концентрирования лактозы. Насос для этого дисахарида, выделенный Юджином Кеннеди (Eugene Kennedy), представляет собой одиночную полипептидную цепь массой 30 кДа и называется *пермеазой для лактозы* (или М-белком). Это интегральный мембранный белок, который кодируется геном *y,* входящим в *lac*-оперон (разд. 28.3). В индуцированных клетках на его долю приходится около 4% белков мембраны.

Раскрытию механиза функционирования лактозного насоса способствовало изучение мутантов по гену *y,* а также исследования везикул (пузырьков), полученных из бактериальных мембран. Везикулы очень удобны для изучения процессов транспорта, поскольку они значительно проще устроены, чем целая бактерия. В везикулах есть система окислительного фосфорилирования и другие связанные с мембраной белки, но отсутствуют цитоплазматические компоненты интактной клетки. Сами по себе везикулы не накапливают лактозы, но если добавить субстрат окисления, обеспечивающий поток обладающих высоким потенциалом электронов по дыхательной цепи, то накопление лактозы имеет место. Этот же эффект можно получить и иным способом, а именно созданием градиента pH с помощью образуемой вне клеток кислоты. Создание мембранного потенциала градиентом концентрации K^+ также приводит к насасыванию лактозы. *Все эти данные показывают, что активный транспорт лактозы обеспечивается протонодвижущей силой в плазматической мембране.* Транспорт молекул лактозы сопряжен с движением протона в клетку. При физиологических условиях протонный

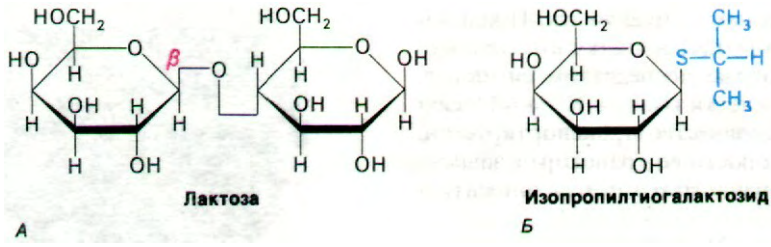


Рис. 36.14. Пермеаза для лактозы транспортирует β-галактозиды. в частности лактозу (*А*) и изопропилтиогалактозид (*Б*). Тиогалактозиды оказались очень удобными для изучения этой системы, так как они транспортируются пермеазой для лактозы, но не подвергаются гидролизу β-галактозидазой.

градиент, необходимый для этого активного транспорта, возникает за счет потока электронов от донора, обладающего высоким потенциалом (например, NADH), по дыхательной цепи. *Симпорт протонов и лактозы* иллюстрирует обобщающую концепцию Питера Митчелла (Peter Mitchell) о «преобразовании энергии посредством протонного градиента» (разд. 14.18).

36,12. Активный транспорт ряда сахаров сопряжен с их фосфорилированием

Симпорт - не единственный тип насосов, осуществляющих транспорт сахаров. У некоторых бактерий накопление углеводов происходит путем сопряжения их входа в клетку с фосфорилированием. Например, у многих бактерий поступающая в клетки глюкоза превращается в глюкозо-6-фосфат. Особенность транспорта этого типа, называемого *транслокацией группы,* состоит в том, что в ходе транспорта происходит *модификация растворенного вещества.* Клеточная мембрана непроницаема по отношению к фосфорилированным сахарам, и потому они накапливаются внутри бактериальной клетки.

Таблица 36.1. **Углеводы, транспортируемые фосфотрансферазной системой *E. coli***

Глюкоза	Маннитол
Фруктоза	Сорбитол
Манноза	Галактитол
N-ацетилглюкозамин	Лактоза

Наиболее хорошо изучен процесс транслокации групп, осуществляемый *фосфотрансферазной системой (ФТС)* которую открыл Сол Роузман (Saul Roseman). Особенность этой системы состоит в том, что *донором фосфорильной группы служит фосфоенолпируват,* а не ATP или какой-либо иной нуклеозидтрифосфат. Суммарная реакция, катализируемая фосфотрансферазной системой, следующая:

$$\text{Сахар}_{\text{вне клетки}} + \text{Фосфоенолпируват} \xrightarrow[Mg^{2+}]{\text{ФТС}} \text{Фосфорилированный сахар}_{\text{в клетке}} + \text{Пируват}.$$

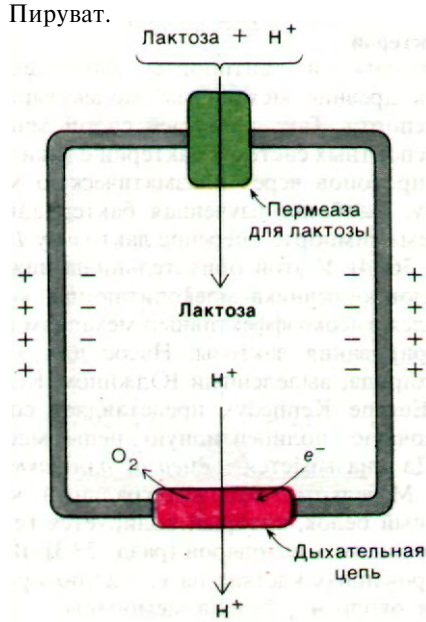
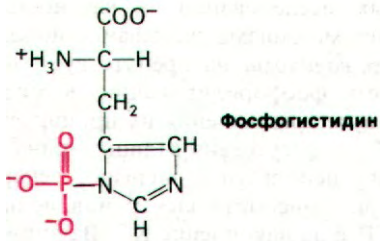


Рис. 36.15. Протонный градиент служит источником энергии для транспорта ряда сахаров и аминокислот в бактериальные клетки. Протонный градиент генерируется током электронов в дыхательной цепи.

В этой транслокации участвуют 4 белка: HPr, фермент I, фермент II и фермент III. Фермент II, будучи интегральным белком мембраны, образует трансмембранный канал и катализирует фосфорилирование сахара. При этом фосфорильная группа фосфоенолпирувата переносится на сахар не прямо, а сначала на фермент I и после на специфический остаток гистидина небольшого термостабильного белка HPr (рис. 36.16). Образующийся в качестве промежуточного соединения фосфогистидин имеет высокий потенциал переноса фосфатной группы. промежуточный по величине между соответствующими значениями для ATP и фосфоенолпирувата. Далее происходит перенос фосфорильной группы от фосфорилированного HPr на фермент III - периферический мембранный белок, который уже взаимодействует с собственно каналом, т. е. ферментом II:



Конечный этап - перенос фосфорильной группы от фермента III на транспортируемый сахар (рис. 36.17). Из указанных четырех очищенных белков удалось реконструировать функционально активный ферментный комплекс.

Некоторые белки, входящие в состав фосфотрансферазной системы, обладают специфичностью, другие - нет. Так, HPr и фермент I, которые являются растворимыми белками цитозоля, участвуют в транспорте всех сахаров, переносимых этой системой. С другой стороны, ферменты II и III проявляют специфичность в отношении определенных сахаров. Например, в транспорте глюкозы, лактозы и фруктозы участвуют разные ферменты II и III. Такой же результат был получен и при генетических исследованиях. У мутантов, дефектных по HPr или ферменту I, не происходит транспорта большого числа разных сахаров, тогда как мутанты, дефектные по синтезу ферментов II и III, не способны транспортировать только какой-либо определенный сахар. Фермент III не участвует в транслокации гекситолов, в частности галактитола; в этом

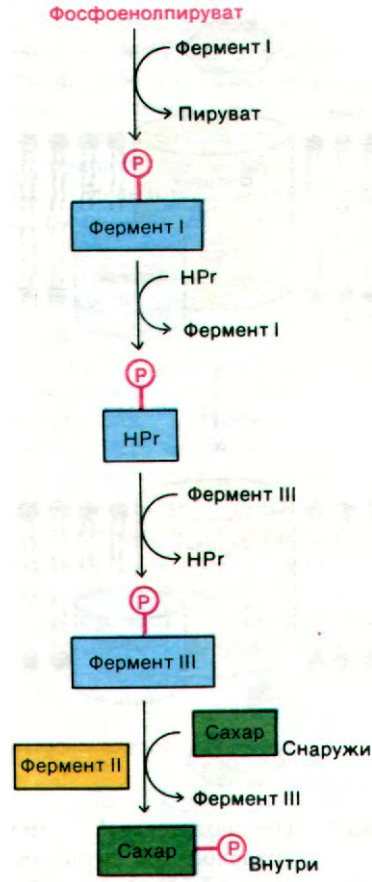


Рис. 36.16. Поток фосфорильных групп от фосфоенолпирувата на сахар, транспортируемый через мембрану фосфотрансферазной системой.

случае фосфорильная группа переносится непосредственно от HPr на углевод.

Чем объяснить, что фосфотрансферазная система устроена значительно сложнее других переносчиков, например пермеазы для лактозы? Представляется вероятным, что фосфотрансферазная система не только осуществляет транспорт сахаров, но и выполняет регуляторные функции. Избыточное поступление какого-то одного углевода под действием фосфотрансферазной системы сильно подавляет активный транспорт сахаров другими переносчиками. Это ингибирование опосредуется, по-видимому, изменением содержания cAMP, а именно повыше-

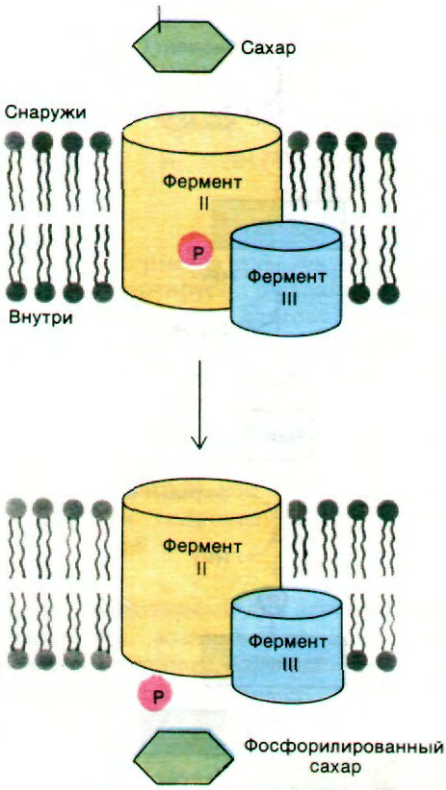


Рис. 36.17. Предполагаемый механизм транслокации групп, осуществляемой фосфотрансферазной системой.

Рис. 36.18. Транспортируемый фосфотрансферазной системой сахар α-метилглюкозид ингибирует образование cAMP.

ние концентрации сахара, накопленного фосфотрансферазной системой, ведет к снижению выработки cAMP (рис. 36.18). В результате прекращается транскрипция ряда индуцируемых оперонов. Вспомним, что экспрессия таких индуцируемых оперонов, как *lac* и *gal,* значительно возрастает при связывании комплекса cAMP с белком БАК в соответствующих участках промотора (разд. 28.6). Следовательно, *фосфотрансферазная система регулирует использование источников углерода.*

36.13. Транспортные антибиотики повышают ионную проницаемость мембран

Ряд микроорганизмов синтезирует низкомолекулярные соединения, в присутствии которых мембраны становятся проницаемыми для определенных ионов. Эти небольшие молекулы, называемые *транспортными антибиотиками,* оказались ценным инструментом для экспериментальных исследований, в частности для изучения механизма связывания ионов. Например, *валиномицин* препятствует окислительному фосфорилированию в митохондриях путем повышения их проницаемости для K^+: в присутствии валиномицина митохондрии используют энергию, генерируемую при транспорте электронов, не на синтез ATP, а на накопление K^+. Валиномицин имеет циклическую структуру, образованную из повторяющейся три раза последовательности четырех разных остатков (А, Б, В и Г) (рис. 36.19). Эти остатки четырех типов соединены чередующимися эфирными и пептидными связями.

Еще один хорошо изученный транспортный антибиотик - *грамицидин А* (рис. 36.20). Это полипептид с открытой цепью, состоящий из 15 аминокислотных остатков. Примечательна структура грамицидина А: в нем чередуются D- и L-аминокислоты. Кроме того, N- и C-концы полипептида модифицированы. Как будет показано несколько ниже, транспорт ионов грамицидином А и валиномицином осуществляется совершенно по-разному.

Механизм переноса ионов этими антибиотиками удобно исследовать на таких хорошо охарактеризованных модельных системах, как двуслойные липидные пузырьки (разд. 10.6) и плоские двуслойные мембраны (разд. 10.6). В опытах используют пузырьки, содержащие радиоактивный ион, например $^{42}K^+$; их получают путем обработки мембран ультразвуком в присутствии

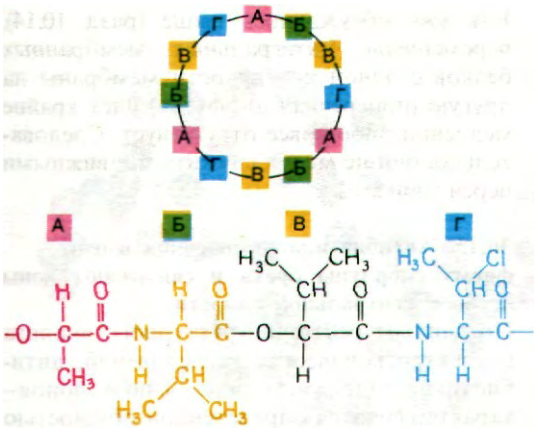


Рис. 36.19. Валиномицин имеет периодическую циклическую структуру, состоящую из остатков L-лактата (А), L-валина (Б), D-гидроксиизовалерианата (В) и D-валина (Г).

этого иона и последующего удаления $^{42}K^+$, не попавшего внутрь пузырьков, методом гель-фильтрации. Далее сравнивают скорость выхода радиоактивного иона из пузырьков в присутствии и в отсутствие антибиотика. Другой способ получения информации относительно ионной проницаемости двуслойных мембран состоит в измерении таких электрических параметров, как сопротивление мембраны и мембранный потенциал. Например, сопротивление двуслойной мембраны по отношению к K^+ в присутствии 10^{-7} М валиномицина или 10^{-9} М грамицидина падает более чем в 10000 раз при градиенте концентраций KCl на мембране 0,02 М.

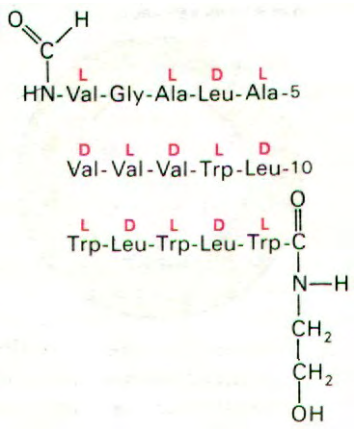


Рис. 36.20. Структура грамицидина А.

36.14. Транспортные антибиотики функционируют либо как подвижные переносчики, либо как каналообразователи

Существует два совершенно разных механизма действия транспортных антибиотиков на проницаемость мембран для ионов (рис. 36.21). Некоторые антибиотики (например, грамицидин А) формируют канал, пронизывающий мембрану. Ионы входят в такой канал на одной стороне мембраны, диффундируют по нему и выходят на другой стороне мембраны. Стимуляция транспорта ионов по этому механизму не сопряжена с движением самого антибиотика-каналообразователя. Антибиотики другой группы (например, валиномицин) функционируют как переносчики ионов через углеводородную область мембраны. Активность этих транспортных антибиотиков сопряжена с их собственной диффузией.

В эксперименте *подвижные переносчики и каналообразователи* можно различить следующим образом. Измеряют температурную зависимость ионной проводимости искусственной липидной двуслойной мем-

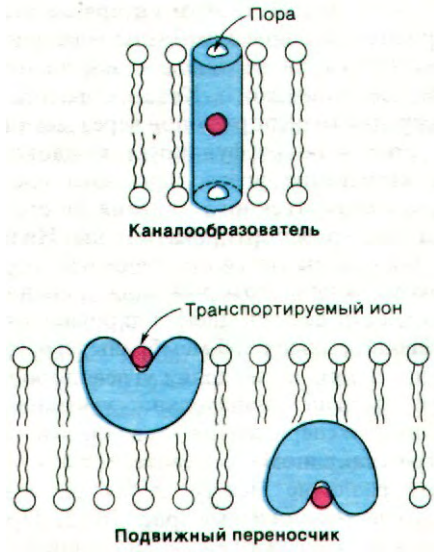


Рис. 36.21. Схематическое изображение различий между транспортными антибиотиками-каналообразователями и подвижными переносчиками. Все известные транспортные белки принадлежат к категории каналообразователей.

Рис. 36.22. Влияние температуры на проводимость липидных двуслойных мембран, одна из которых содержит транспортный антибиотик-каналообразователь, другая - транспортный антибиотик, являющийся подвижным переносчиком.

браны, содержащей транспортный антибиотик. При этом берут температурный интервал, включающий температуру фазового перехода липида; в этом интервале углеводородная середина мембраны переходит от практически затвердевшего состояния до совершенно жидкого. Каналообразователь, опосредуя транспорт ионов через мембрану, сам по себе не диффундирует. Следовательно, застывание углеводородного слоя не окажет существенного влияния на его способность транспортировать ионы. Иная ситуация складывается с подвижным переносчиком ионов, который для проявления активности должен диффундировать сквозь углеводородный слой мембраны: его эффективность при затвердении углеводородного слоя должна значительно уменьшиться. Данные экспериментов с валиномицином и грамицидином А действительно выявляют различие между двумя рассматриваемыми механизмами (рис. 36.22). Проницаемость содержащей валиномицин двуслойной мембраны возрастает при ее разжижении более чем в 1000 раз. В то же время на транспортную активность грамицидина А переход мембраны в жидкое состояние почти не оказывает влияния.

Важно подчеркнуть, что *все известные в настоящее время природные системы транспорта представляют собой каналы.* Как уже обсуждалось выше (разд. 10.14), перемещение интегральных мембранных белков с одной поверхности мембраны на другую (поперечная диффузия) идет крайне медленно либо вовсе отсутствует. Следовательно, они не могут служить подвижными переносчиками.

36.15. Антибиотики-переносчики имеют форму скорлупы ореха и связывают ионы в своей центральной полости

По данным рентгеноструктурного анализа и спектроскопических исследований, антибиотики - подвижные переносчики ионов - характеризуются определенной общностью структуры. Все исследованные к настоящему времени переносчики по форме напоминают скорлупу ореха. *Единственный связываемый ион металла образует координационные связи с несколькими атомами кислорода, окружающими центральную полость.* Число таких атомов кислорода (связывающих ион металла) обычно равно 6 или 8. *Периферическая часть структуры подвижного переносчика состоит из углеводородных групп* (рис. 36.23).

Функция центрально расположенных атомов кислорода, окруженных углеводородным наружным слоем, вполне очевидна. В самом деле, в водной среде ион металла, например K^+, связывает через кислород несколько молекул воды. Антибиотик-переносчик конкурирует с молекулой воды за связывание иона, образуя с ним хелатное соединение через несколько соответствующим образом расположенных атомов кислорода в центральной полости. Благодаря углеводородной периферической части переносчи-

Рис. 36.23. Схематическое изображение хелатирования K^+ атомами кислорода в транспортном антибиотике - подвижном переносчике.

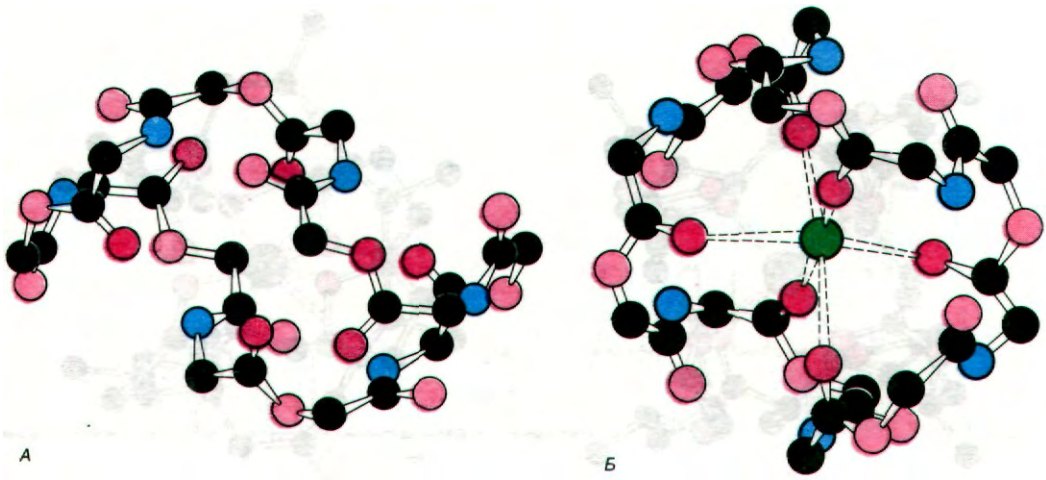


Рис. 36.24. Модели валиномицина (*А*) и его комплекса с K^+ (*Б*). При связывании K^+ происходит изменение конформации антибиотика. [Изображено в соответствии с атомными координатами, любезно предоставленными д-ром W. Duax (для валиномицина) и д-ром L. Steinrauf (для комплекса валиномицин—K^+).]

ка его комплекс с ионом растворим в липидах мембран. По существу, *каталитическое действие рассматриваемых антибиотиков на транспорт ионов через мембраны и состоит в том, что они переводят ионы в растворимую в липидах форму.*

На рис. 36.24 показаны структуры валиномицина и его комплекса с K^+. Ион K^+ координирован с шестью атомами кислорода, описывающими октаэдр вокруг центральной полости молекулы. Эти атомы кислорода принадлежат карбонильным группам шести остатков валина в антибиотике. Метильные и изопропильные боковые цепи формируют углеводородную наружную часть молекулы валиномицина.

Интересна также структура комплекса с K^+ другого переносящего ионы антибиотика, а именно *нонактина* (рис. 36.25). В этом комплексе K^+ связан с восемью атомами кислорода в центре молекулы. Четыре атома кислорода из восьми принадлежат карбоксильным группам, а остальные четыре - эфирным связям.

36.16. Валиномицин связывает K^+ в 1000 раз прочнее, чем Na^+

Каким образом соединения, транспортирующие ионы, различают такие сходные ионы, как Na^+ и K^+? Валиномицин связывает K^+ в 1000 раз прочнее, чем Na^+, т.е. избирательность этого переносчика выше, чем у (Na^+ + K^+)-АТРазы. Рассмотрим основу столь высокой избирательности. Как показали спектроскопические исследования, комплексы валиномицина с Na^+ и K^+ очень сходны по структуре. В частности, в обоих комплексах одинаковы длины координационных связей между катионом в центре молекулы и атомами кислорода. Почему же тогда K^+ связывается намного прочнее, чем Na^+? Причина этой избирательности в том, что K^+ слабее, чем Na^+, притягивает воду. Свободная энергия образования гидратной оболочки для Na^+ на 17 ккал/моль ниже, чем для K^+ (табл. 36.2). Следовательно, *валиномицин связывает K^+ прочнее потому, что отделение воды от K^+ требует меньше*

Таблица 36.2. **Свойства щелочных катионов**

Ион	Порядковый номер элемента	Радиус иона, А	Свободная энергия гидратации, ккал/моль
Li^+	3	0,60	-98
Na^+	11	0,95	-72
K^+	19	1,33	-55
Rb^+	37	1,48	-51
Cs^+	55	1,69	-47

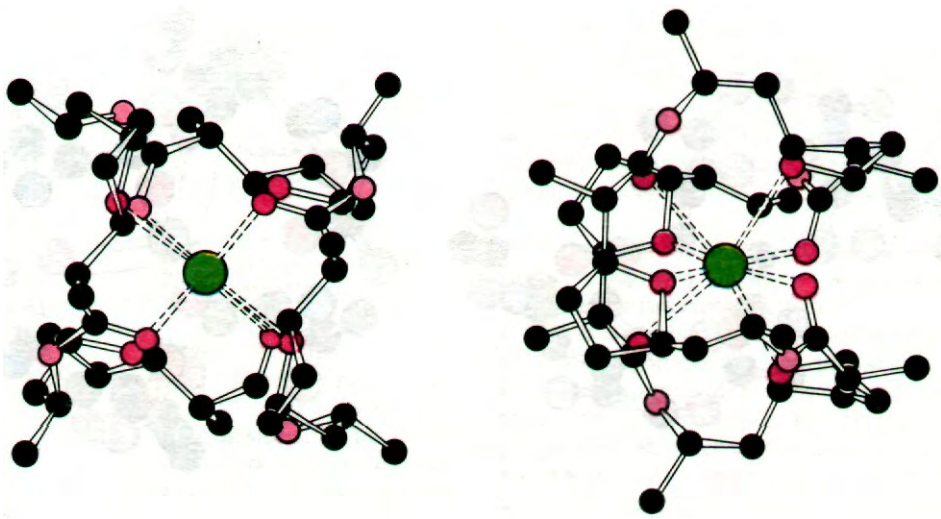


Рис. 36.25. Вид с двух сторон модели комплекса нонактина с K^+.

шей затраты энергии, чем отделение Na^+.

Пока еще не проводилось исследования атомарной структуры какого-либо ионтранспортирующего соединения, предпочтительно связывающего Na^+, однако можно представить себе, каким должна быть ключевая особенность такой структуры. По-видимому, в ней должно отражаться использование того факта, что Na^+ имеет меньший ионный радиус (r = 0,95 А), чем K^+ (r = 1,33 А), благодаря чему отрицательно заряженные атомы кислорода могут в большей степени приблизиться к Na^+, чем к K^+; таким путем может быть преодолен более высокий энергетический барьер дегидратирования Na^+ по сравнению с K^+. *Следовательно, можно предсказать, что участки специфического связывания Na^+ должны обладать высокой плотностью отрицательного заряда и такой геометрией, которая позволяла бы Na^+ плотно входить в них. В отличие от этого участки специфического связывания K^+ должны, по-видимому, обладать отрицательным зарядом меньшей плотности и их геометрия должна меньше подходить для образования очень коротких связей между катионом и координирующими группами.*

Примечательна также гибкость молекулы валиномицина (рис. 36.24). Хелатирование K^+ представляет собой ступенчатый процесс, в ходе которого молекулы воды гидратной оболочки иона последовательно вытесняются кислородными атомами антибиотика. Новые связи формируются по мере разрыва старых, и потому активационный барьер для связывания иона оказывается низким. Аналогичным образом и энергия активации противоположного процесса - высвобождения иона - также низка. В итоге валиномицин присоединяет и высвобождает K^+ множество раз на протяжении секунды. Важная роль гибкости структуры в этом случае так же очевидна, как и при действии ферментов.

36.17. Можно выявить поток ионов через единичный канал в мембране

Проводимость планарной двуслойной мембраны, содержащей небольшое количество грамицидина А, не является постоянной. Как показал Денис Хейдон (Denis Haydon), проводимость этой мембраны для Na^+ изменяется во времени ступенчато (рис. 36.26). Эти ступени проведения иона определяются спонтанным открыванием и закрыванием образованных грамицидином А каналов. Единичный канал остается открытым в течение примерно секунды. По такому каналу легко проходят одновалентные катионы, но не анионы или двухвалентные катионы. *Оказалось, что по одному каналу в течение секунды мажет, пройти более 10^7 ионов.* Такая скорость транспорта только на один порядок величины ниже скорости диффузии в чистой воде. В отличие от этого максимальная скорость транспорта, осуществляемого подвижным переносчиком, составляет менее

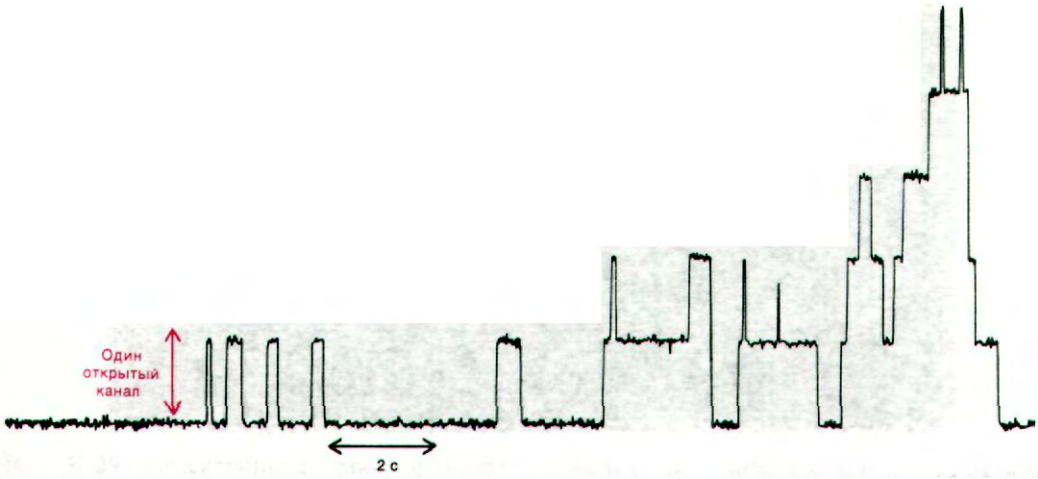


Рис. 36.26. Ступенчатое изменение проводимости липидной двуслойной мембраны, содержащей несколько молекул грамицидина А. Минимальное увеличение проводимости обусловлено появлением одного открытого канала. (Печатается с любезного разрешения д-ра O. Andersen.)

10^3 ионов в 1 с, так как повороты и перемещение подвижного переносчика в мембране занимают не менее 1 мс.

Методами спектроскопии и дифракции рентгеновских лучей было показано, что трансмембранный канал образуется из двух молекул грамицидина А (рис. 36.27). Внутри мембраны обладающий свойством проводника спирализованный димер находится в равновесии с непроводящими мономерами. По существу, ступенчатое изменение проводимости на рис. 36.26 соответствует процессу образования и диссоциации димеров. Димер формирует обводненный канал диаметром 4 А, окруженный полярными группами пептидов. Гидрофобные боковые цепи располагаются на периферии канала и контактируют с углеводородными цепями фосфолипидов мембраны. Окружающие водную пору карбоксильные группы в канале образуют кратковременные координационные связи с катионом в момент его прохождения по каналу. Как показал рентгеноструктурный анализ, связавший катионы канал становится короче и шире; это еще раз подчеркивает динамическую природу молекул, обладающих транспортной функцией.

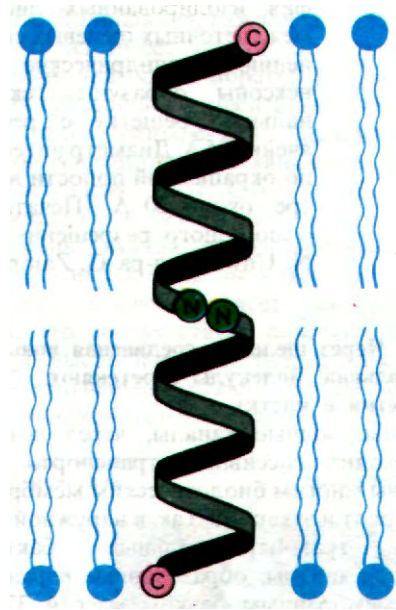


Рис. 36.27. Схематическое изображение канала из грамицидина А. Канал образуется путем связывания N-формильных концов двух полипептидов. Каждая цепь скручивается в β-спираль, похожую на свернутый в рулон β-складчатый слой. Изображенная модель была предложена Деном Ури (Dan Urry). [Weinstein S., Wallace B. A., Blout E. R., Morrow J. S., Veatch W., Proc. Nat. Acad. Sci., **76,** 4230 (1979).]

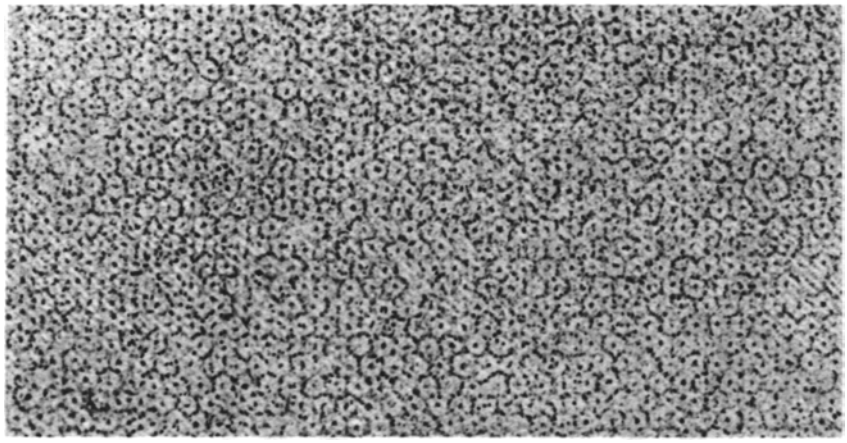


Рис. 36.28. Электронная микрофотография изолированных листков межклеточных щелевых соединений. Цилиндрические коннексоны образуют гексагональную решетку с ребром ячейки 85 А. Диаметр интенсивно окрашенной полости в центре - около 20 А. (Печатается с любезного разрешения д-ра N. Unwin и д-ра G. Zampighi.)

36.18. Через щелевые соединения ионы и небольшие молекулы перетекают из клетки в клетку

Большие водные каналы, через которые происходит пассивный транспорт, свойственны многим биологическим мембранам прокариот и эукариот. Так, в наружной мембране грам-отрицательных бактерий имеются каналы, образованные *порином* — трансмембранным белком массой 37 кДа (разд. 32.14). По этим каналам диаметром 10 А легко проникают в периплазматическое пространство полярные молекулы массой, не превышающей примерно 600 Да. Далее эти молекулы транспортируются в цитозоль посредством симпорта, транслокации групп или иных пермеаз. Подобным же образом в наружных мембранах митохондрий и хлоропластов имеются большие водные каналы, образованные из аналогичных порину молекул.

Наиболее хорошо изученным типом водного канала у эукариот является *щелевое соединение (щелевой контакт),* называемое также *межклеточным каналом,* поскольку он служит протоком между внутренним содержимым многих смежных клеток. Щелевые соединения, открытые Жан-Полем Ревелем и Морисом Карновским (Jean-Paul, Revel, Morris Karnovsky), располагаются скопом (кластерами) в определенных участках плазматических мембран прилежащих друг к другу клеток. На электронных микрофотографиях листков щелевых соединений (рис. 36.28) можно видеть, что каждое соединение образовано шестью субъединицами, окружающими пору диаметром 15-20 А. На тангенциальном срезе (рис. 36.29) видно, что эти гексамеры пронизывают промежуток (щель) между соприкасающимися клетками (отсюда и название - щелевое соединение). Для определения внутреннего размера щелевых соединений производили микроинъекцию ряда флуоресцирующих веществ в одни клетки и затем наблюдали, как распространяется флуоресценция по соседним клеткам. По данным Вернера Лёвенштейна (Werner Loewenstein), все полярные вещества массой до 1 кДа легко проходят по межклеточным каналам. Другими словами, *по щелевым соединениям из одной клетки в другую могут поступать неорганические ионы и большинство метаболитов (сахара, аминокислоты, нуклеотиды).* Что касается белков, нуклеиновых кислот и полисахаридов, то из-за своих больших размеров они не проходят по этим каналам.

Щелевые соединения играют важную роль в межклеточной коммуникации. В ряде возбудимых тканей, например в сердечной мышце, клетки объединены в единую систему быстрым потоком ионов через эти соединения; таким путем достигается быстрый и синхронный ответ на стимуляцию. Через

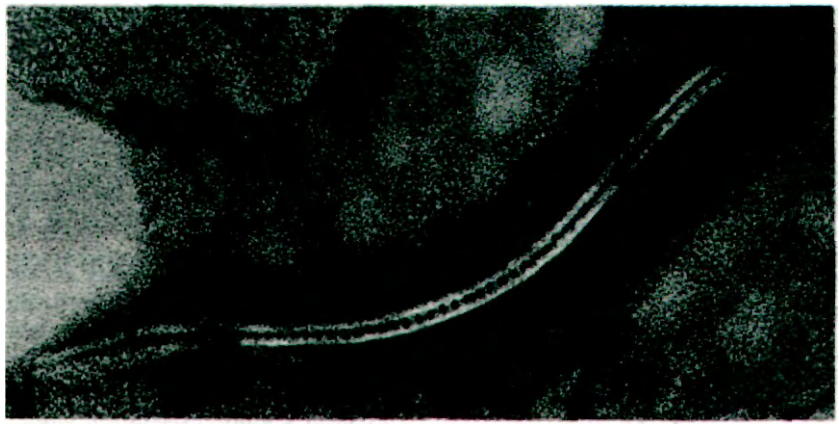


Рис. 36.29. Электронная микрофотография тангенциального среза щелевых соединений между прилежащими клеточными мембранами. [Hertzberg E. L., Gilula N. B., J. Biol. Chem., 254. 2143 (1979).]

щелевые контакты происходит также питание клеток, удаленных от кровеносных сосудов, например в костях или хрусталике глаза. Представляется вероятным, что рассматриваемые каналы коммуникации имеют важное значение в регуляции процессов развития и дифференцировки.

Проницаемость щелевых контактов регулируется ионами кальция. *Повышение внутриклеточного содержания Ca^{2+} приводит к тому, что щелевой контакт в той или иной мере закрывается.* Межклеточные каналы полностью открыты при концентрации Ca^{2+} ниже 10^{-7} М и полностью закрываются при концентрации Ca^{2+}, превышающей $5 \cdot 10^{-5}$ М. Увеличение содержания Ca^{2+} в указанном диапазоне приводит к сужению просвета межклеточных каналов, причем в первую очередь снижается проницаемость для более крупных молекул. Структурная основа таких изменений просвета каналов была выявлена при анализе реконструированных трехмерных изображений полей щелевых контактов, взятых в двух различающихся по четвертичной структуре состояниях. Эти структурные исследования показали, что щелевой контакт состоит из двух смыкающихся цилиндрических единиц, названных *коннексонами.* Каждый коннексон образован шестью субъединицами, имеет длину 75 А и насквозь пронизывает плазматическую мембрану. Сегмент коннексока длиной 20 А выступает во внеклеточное пространство и соединяется с коннексоном прилежащей клетки. Длинная ось каждой из субъединиц коннексона имеет наклон по отношению к поперечной оси мембраны. Путем скольжения субъединиц относительно друг друга происходит уменьшение их наклона к поперечной оси мембраны, и канал при этом закрывается (рис. 36.31). Самые большие конформационные изменения имеют место в середине канала, где субъединицы двух стыкующихся коннексонов скользят относительно друг друга на расстояние примерно 11 А, что соответствует повороту на 28°. Анализ высокой степени разрешения позволит в дальнейшем выявить, каким образом Ca^{2+} индуцирует скольжение и поворот.

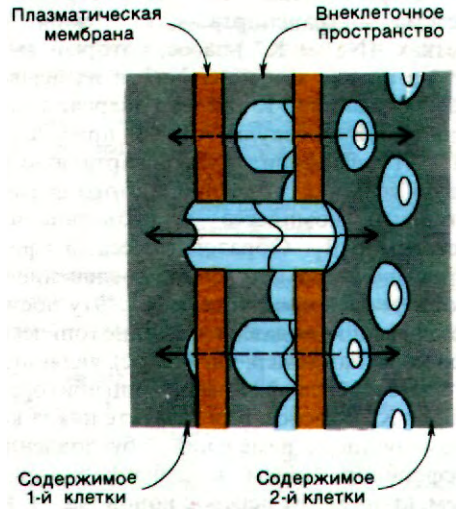


Рис. 36.30. Схематическое изображение щелевого контакта.

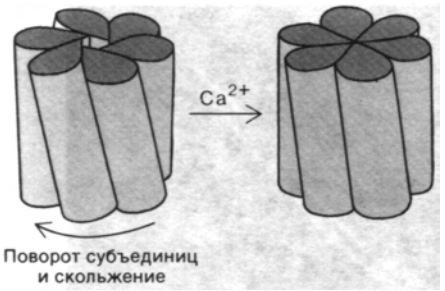


Рис. 36.31. Модель регуляции ионами Ca^{2+} степени закрывания щелевого соединения. (По рисунку, любезно предоставленному д-ром N. Unwin и д-ром G. Zampighi.)

Заключение

Транспорт молекул и ионов через биологические мембраны осуществляется трансмембранно ориентированными белками, которые формируют каналы. Транспорт является пассивным, если ΔG для транспортируемого компонента отрицательно; в случае активного транспорта величина ΔG положительна. Изменения свободной энергии зависят от соотношения концентраций транспортируемого компонента по двум сторонам мембраны и от мембранного потенциала, если мембрана заряжена. Активный транспорт требует вклада свободной энергии. Наиболее распространенная система транспорта в животных клетках - $(Na^+ + K^+)$-насос, который выводит из клетки три иона Na^+ и насасывает в клетку два иона K^+ за счет энергии гидролиза одной молекулы ATP. В присутствии Na^+ ATP фосфорилирует аспартатную боковую цепь в α-субъединице этого ферментативного комплекса с субъединичным составом $\alpha_2\beta_2$. Образовавшееся фосфорилированное промежуточное соединение гидролизуется в присутствии K^+. Эту последнюю реакцию подавляют кардиотонические стероиды (например, дигиталис), являющиеся высокоспецифичными ингибиторами $(Na^+ + K^+)$-насоса. В результате цикла конформационных изменений, обусловленных фосфорилированием и дефосфорилированием, происходит перенос ионов Na^+ и K^+. Транспорт ионов кальция, играющих важную роль в регуляции мышечного сокращения, осуществляется иной ATPазной системой, локализованной в мембране саркоплазматического ретикулума. Однако и в этом случае процесс транспорта сопряжен с фосфорилированием остатка аспартата. Обе системы транспорта - как Ca^{2+}, так и $(Na^+ + K^+)$ - удалось реконструировать из соответствующих очищенных ATPаз и фосфолипидов.

Для ряда транспортных систем непосредственным источником энергии служит не гидролиз ATP, а градиент концентрации ионов. Так, активный транспорт глюкозы и аминокислот в ряде животных клеток сопряжен с одновременным входом Na^+; такой процесс называется котранспортом. Одновременный вход Na^+ и глюкозы обеспечивается специфическим симпортом. $(Na^+ + K^+)$-насос создает тот градиент концентрации ионов Na^+, который необходим для сопряженного входа Na^+ и глюкозы. У бактерий, как правило, непосредственным источником энергии для симпортов и антипортов служит градиент концентрации H^+, а не Na^+. Например, активный транспорт лактозы, осуществляемый пермеазой для лактозы, сопряжен с входом протона в бактериальную клетку. Этот транспортный процесс протекает за счет протонодвижущей силы, генерируемой переносом электронов по дыхательной цепи. Бактериям свойствен и иной тип транспорта, а именно так называемая транслокация групп; в этом случае происходит модификация растворенного вещества в процессе переноса. Так, фосфотрансферазная система, переносящая сахара, фосфорилирует их (например, глюкозу в глюкозо-6-фосфат) по мере поступления в клетку. Донором фосфорильной группы в этом процессе служит фосфоенолпируват. Фосфорилирование опосредовано тремя разными ферментами и небольшим белком (HPr) - переносчиком фосфорильной группы.

Клетки прокариот и эукариот содержат также наполненные водой каналы, по которым ионы и небольшие полярные молекулы могут пассивно диффундировать сквозь мембраны. Например, в наружных мембранах грам-отрицательных бактерий имеются пориновые каналы диаметром около 10 А. Между соприкасающимися клетками высших организмов во многих случаях имеются щелевые соединения. По этим каналам диаметром 20 А ионы и большинство метаболитов (например, моносахариды, аминокислоты и нуклеотиды) могут

перетекать из одной клетки в другую. Щелевые соединения закрываются под действием Ca^{2+}. Эти протоки между соприкасающимися клетками играют важную роль в межклеточной коммуникации.

Транспортные антибиотики повышают проницаемость мембран для определенных ионов, функционируя в качестве подвижных переносчиков (например, валиномицин) либо каналообразователей (например, грамицидин А). Молекула антибиотика подвижного переносчика, имеющая форму скорлупы ореха, связывает в центральной полости один ион металла. Благодаря углеводородной периферической части весь комплекс способен проходить сквозь внутренний углеводородный слой мембраны. Каналообразующие антибиотики формируют пронизывающие мембрану водные поры.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Hobbs A.S., Alberts R.W., 1980. The structure of proteins involved in active membrane transport, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9, 259-291.

Wilson D.B., 1978. Cellular transport mechanisms, Ann. Rev. Biochem., 47, 933-965.

Harold F.M., 1978. Vectorial metabolism. In: Ornston L.N. and Sokatch J.R. (eds.), The Bacteria, vol. 6, pp. 463-521, Academic Press.

Saier M.H., Jr., 1979. The role of the cell surface in regulating the internal environment. In: Sokatch J.R. Ornston L.N. (eds.), The Bacteria, vol. 7, pp. 167-227, Academic Press.

Estes J.W., White P.D., 1965. William Withering and the purple foxglove, Sci. Amer., 212(6), 110-117. (Любопытное описание истории открытия и использования дигиталиса.)

Книги

Andreoli T.E., Hoffman J.F., Fanestil D.D. (*eds.*), 1978. Physiology of Membrane Disorders, Plenum. (Содержит прекрасные статьи, касающиеся многих аспектов мембранного транспорта.)

Rosen B.P. (*ed.*), 1978. Bacterial Transport, Dekker.

Транспорт ионов Na^+ и K^+

Skou J.C., Norby J.G., (*eds.*), 1979. Na, K-ATPase: Structure and Kinetics, Academic Press,

Fishman M.C., 1979. Endogenous digitalis-like activity in mammalian brain, Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 4661-4663.

Sweadner K.J., Goldin S.M., 1980. Active transport of sodium and potassium ions: mechanism, function, and regulation, New Engl. J. Med., 302, 777-783.

Cantley L.C., Jr., Resh M.D., Guidotti G., 1978. Vanadate inhibits the red cell (Na^+, K^+)-ATPase from the cytoplasmic side, Nature, 272, 552-554.

Akera T., 1977. Membrane adenosinetriphosphatase: a digitalis receptor? Science, 198, 569-574. (Обзор данных, показывающих, что (Na^+ + K^+)-АТРаза является мишенью фармакологического действия дигиталиса.)

Jardetzky O., 1966. Simple allosteric model for membrane pumps, Nature, 211, 969.

Транспорт ионов кальция

DeMeis L., Vianna A.L., 1979. Energy interconversion by the Ca^{2+}-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum, Ann. Rev. Biochem., 48, 275-292.

MacLennan D.H., Campbell K.P., 1979. Structure, function, and biosynthesis of sarcoplasmic reticulum proteins, Trends Biochem. Sci., 4, 148-151.

Tada M., Yamamoto T., Tonomura Y., 1978. Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum, Physiol. Rev., 58, 1-79.

Racker E., 1972. Reconstitution of a calcium pump with phospholipids and a purified Ca^{2+}-adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum, J. Biol. Chem., 247, 8198-8200.

Wasserman R.H., Fullmer C.S., Taylor A.N., 1978. The vitamin D-dependent calcium binding proteins. In: Lawson D. E. M. (ed.), Vitamin D, Academic Press.

Kretsinger R.H., 1976. Calcium-binding proteins, Ann. Rev. Biochem., 45, 239-266.

Система транспорта у бактерий

Kaback H.R., Ramos S., Robertson D.E., Stroobant P., Tokuda H., 1977. Energetics and molecular biology of active transport in bacterial membrane vesicles, J. Supramol. Struc., 7, 443-461.

Saier M.H., Jr., 1977. Bacterial phosphoenolpyruvate sugar phosphotransferase systems: structural, functional, and evolutionary interrelationships, Bacteriol. Rev, 41, 856-871.

Simoni R.D., Postma P.W., 1975. The energetics of bacterial active transport, Ann. Rev. Biochem., 44, 523-554.

Каналы между клетками

Loewenstein W.R., Kanno Y., Socolar S.J., 1978. The cell-to-cell channel, Fed. Proc., 37, 2645-2650.

Unwin P.N.T., Zampighi G., 1980. Structure of the junction between communicating cells, Nature, 283, 545-549.

Hertzberg E.L., Gilula N.B., 1979. Isolation and characterization of gap junctions from rat liver, J. Biol. Chem, 254, 2138-2147.

Staehelin L.A., Hull B.E., 1978. Junctions between living cells, Sci. Amer, 238(5), 140-152.

Транспортные антибиотики

Urban B.W., Hladky S.B., Haydon D.A., 1978. The kinetics of ion movements in the gramicidin channel, Fed. Proc., 37, 2628-2632.

Ovchinnikov Y.A., 1979. Physico-chemical basis of ion transport through biological membranes: ionophores and ion channels, Eur. J. Biochem., 94, 321-336.

Lauger P., 1972. Carrier-mediated ion transport, Science, 178, 24-30.

Krasne S., Eisenman G., Szabo G., 1971. Freezing and melting of lipid bilayers and the mode of action of nonactin, valinomycin, and gramicidin, Science, 174, 412-415.

Koeppe R.E., Berg J.M., Hodgson K.O., Stryer L., 1979. Gramicidin A crystals contain two cation binding sites per channel, Nature, 279, 723-725.

ГЛАВА 37

Возбудимые мембраны и сенсорные системы

Мембраны многих клеток способны возбуждаться под действием специфических химических или физических стимулов. Ответы мембраны аксона нервной клетки на электрический стимул, синапса на выделение медиатора, палочек сетчатки на свет, подвижных клеток на молекулы аттрактантов - все это реакции, опосредованные возбудимыми комплексами, присутствующими в мембранах. Эти и другие процессы, опосредованные возбудимыми комплексами, имеют следующие общие особенности.

1. Стимул воспринимается высокоспецифичным белком-рецептором, который является *интегральным компонентом возбудимой мембраны.*

2. Специфический стимул вызывает *изменение конформации* рецептора, что в свою очередь приводит к изменению проницаемости мембраны или активности связанного с мембраной фермента. При этом во многих случаях происходит *многократное усиление* ответа на специфические стимулы.

3. Как конформационный сдвиг, так и возникающие в результате функциональные изменения рецептора *обратимы.* Существуют специальные механизмы, возвращающие рецептор в состояние покоя и восстанавливающие его возбудимость.

В этой главе мы рассмотрим четыре типа возбудимых комплексов, начав с натриевого канала в мембранах аксонов нервных клеток; этот зависимый от потенциала канал участвует в возникновении потенциала действия в нервах. Далее мы обратимся к химически регулируемому каналу и рассмотрим, как рецепторы ацетилхолина обеспечивают проведение нервного импульса в определенных синапсах. Затем перейдем к палочкам сетчатки глаза - исключительно чувствительному детектору света. При этом мы познакомимся с ролью фоторецепторного белка родопсина в преобразовании света в нервный сигнал. Последняя тема данной главы - хемотаксис, т. е. движение клеток по направлению к веществам-аттрактантам и от веществ-репеллентов. В последние годы получено много новых сведений относительно сопряжения хеморецепторов с двигательным аппаратом у бактерий.

37.1. Потенциалы действия опосредованы кратковременными изменениями проницаемости для Na^+ и K^+

Нервные импульсы представляют собой электрические сигналы, создаваемые током ионов через плазматическую мембрану нейронов. В нейроне, как и в большинстве клеток, K^+ содержится в высокой концентрации, а Na^+ - в низкой. Градиенты концентрации этих ионов генерируются (Na^+ +

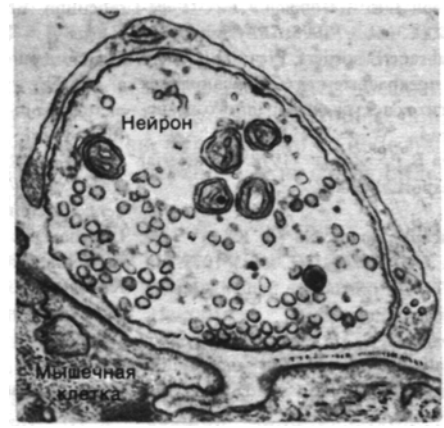


Рис. 37.1. Электронная микрофотография синапса. (Печатается с любезного разрешения д-ра U. Jack McMahan.)

+ K^+)-насосом (разд. 36.2). В состоянии покоя проницаемость мембраны нервной клетки для K^+ гораздо выше, чем проницаемость для Na^+, и поэтому мембранный потенциал определяется главным образом отношением внутриклеточной концентрации K^+ к внеклеточной (рис. 37.2, *А*). В нестимулированных аксонах мембранный потенциал составляет -60 мВ; это близко к величине -75 мВ (равновесный K^+-потенциал), которая соответствует проницаемости мембраны для одних только ионов K^+. Нервный импульс, или *потенциал действия,* возникает при деполяризации мембраны, выходящей за пределы выше порогового уровня (а именно с —60 до —40 мВ). За несколько миллисекунд мембранный потенциал становится положительным и достигает примерно +30 мВ, после чего вновь делается отрицательным. Эта усиленная в несколько раз деполяризация распространяется по нерву, достигая нервного окончания. В раскрытии природы потенциала действия важную роль сыграло изучение гигантского аксона кальмара. Поскольку в этот необычайно крупный аксон (диаметром около миллиметра) нетрудно ввести электроды, он стал излюбленным объектом исследователей.

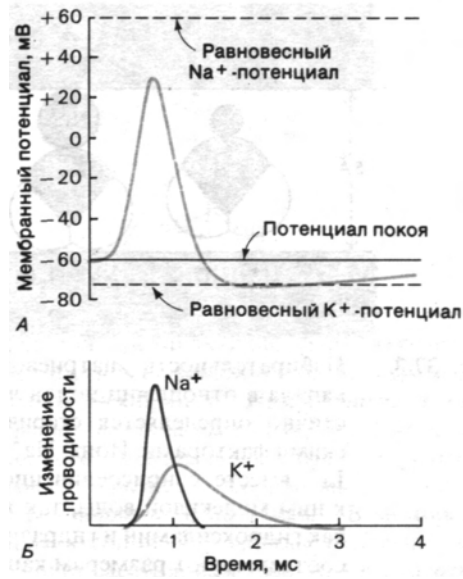


Рис. 37.2. Потенциал действия возникает в результате деполяризации мембраны аксона нервной клетки. Показано изменение во времени мембранного потенциала (*А*) и проводимости ионов натрия и калия (*Б*).

Каков механизм возникновения потенциала действия? Ален Ходжкин и Эндрью Хаксли (Alan Hodgkin, Andrew Huxley) провели остроумные исследования, показавшие, что *потенциал действия возникает в результате сильных кратковременных изменений проницаемости мембраны аксона для ионов Na^+ и K^+* (рис. 37.2, *Б*). Сначала меняется проницаемость мембраны для Na^+. Деполяризация мембраны выше порогового уровня приводит к открытию Na^+-каналов. В силу существования высокого трансмембранного электрохимического градиента концентрации Na^+ ионы натрия начинают входить в клетку. Вход Na^+ усиливает деполяризацию мембраны и способствует тому, что открывается еще большее число Na^+-каналов. Эта положительная обратная связь между деполяризацией и входом Na^+ приводит к очень быстрым и очень большим по величине изменениям мембранного потенциала: от —60 до +30 мВ за одну миллисекунду. Вход прекращается при достижении примерно +30 мВ, так как это значение соответствует равновесному Na^+-потенциалу. Другими словами, по достижении этого потенциала исчезает та термодинамическая движущая сила, за счет которой происходил вход Na^+. Na^+-каналы спонтанно закрываются, и к этому времени начинают открываться K^+-каналы (рис. 37.2, *Б*). В результате ионы калия входят в клетку, и мембранный потенциал вновь становится отрицательным. Примерно через две миллисекунды мембранный потенциал становится равным —75 мВ, т. е. равновесному K^+-потенциалу. Уровень покоя —60 мВ восстанавливается еще через несколько миллисекунд, когда проводимость K^+ снижается до величины, характеризующей нестимулированное состояние. Необходимо подчеркнуть, что во время потенциала действия через плазматическую мембрану проходит очень малое количество ионов Na^+ и K^+ - примерно одна миллионная часть от содержания этих ионов в нервной клетке. Другими словами, при одном нервном импульсе расходуется лишь ничтожно малая часть (Na^+-K^+)-градиента. Из этого явствует, насколько эффективен потенциал

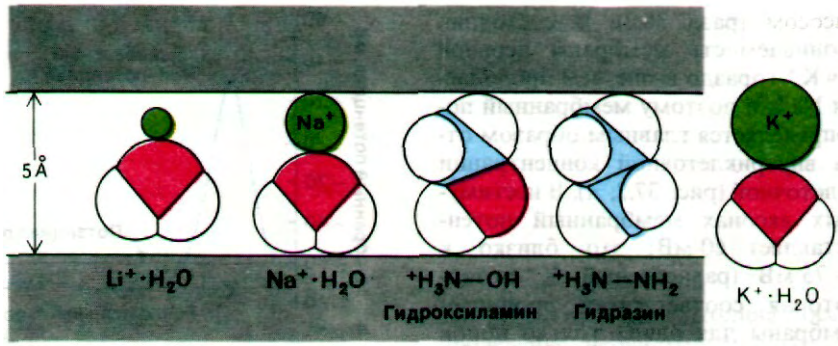


Рис. 37.3. Избирательность натриевого канала в отношении ионов частично определяется стерическими факторами. Ионы Na^+ и Li^+ вместе с присоединенной к ним молекулой воды, так же как гидроксиламин и гидразин, соответствуют размерам канала. В отличие от этого K^+ с присоединенной молекулой воды оказывается слишком большим для канала. (Keynes R. D., Ion-channels in the nerve-cell membrane, Scientific American, Inc., 1979.)

действия как средство сигнализации на большие расстояния.

Na^+-канал проводит Na^+ в 11 раз лучше, чем K^+. Как достигается такая избирательность? Окончательный ответ на этот вопрос будет получен только после анализа структуры канала при высоком разрешении. Однако электрофизиологические исследования относительной проницаемости канала для различных щелочных катионов и органических катионов все же дают определенный ключ к решению данного вопроса. Зависимость проницаемости от размера иона (табл. 37.1) указывает на то, что канал узок: через него не проходят ионы, диаметр которых превышает 5 А. Однако проводимость определяется не только размерами. Так, метиламин ($H_3CNH_3^+$) имеет почти такие же размеры, как гидразин ($H_2NNH_3^+$) и гидроксиламин ($HONH_3^+$), но при этом несравненно хуже проходит через канал. Причина, по всей вероятности, кроется в том, что метильная группа метиламина в отличие от аминогруппы гидразина или гидроксильной группы гидроксиламина не образует водородной связи с кислородным атомом канала. В результате метиламин не проходит по каналу. Обнаружен еще один важный факт: проводимость Na^+-канала в отношении всех проникающих катионов значительно уменьшается при снижении pH. По существу, относительная проницаемость соответствует кривой титрования кислоты с pK 5,2, что указывает на присутствие отрицательно заряженного карбоксилат-иона в активной форме канала. Таким образом, *избирательность Na^+-канала в отношении Na^+ обусловлена наличием отрицательно заряженного участка с малым радиусом.* Ион K^+, будучи крупнее, чем Na^+, практически не может пройти через эту область (рис. 37.3).

37.2. Тетродотоксин и сакситоксин блокируют натриевые каналы в мембранах аксонов нервных клеток

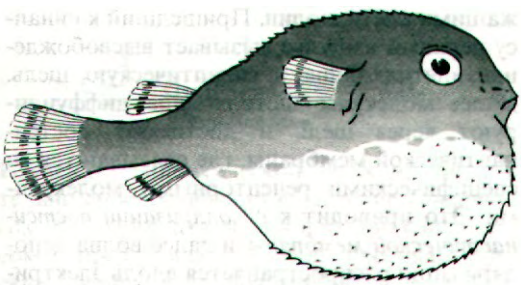
Тетродотоксин - сильнодействующий яд рыбы иглобрюха - блокирует проведение нервных импульсов вдоль аксона и в возбудимых мембранах нервных волокон, что вызывает паралич дыхания. Летальная доза для мыши составляет около 0,01 мкг. В свя-

Таблица 37.1. **Относительная проницаемость натриевого и калиевого каналов в мембранах аксонов**

Ион	Na^+-канал	K^+-канал
Li^+	0,93	<0,01
Na^+	1,00	<0,01
K^+	0,09	1,00
Rb^+	<0,01	0,91
Cs^+	<0,01	<0,08
NH_4^+	0,16	0,13
$HONH_3^+$	0,94	<0,03
$H_2NNH_3^+$	0,59	<0,03
$H_3CNH_3^+$	<0,01	<0,02

Рис. 37.4. Блокаторы Na^+-канала.

зи с высокой специфичностью действия тетродотоксин с успехом используется при экспериментальных исследованиях. Он



Иглобрюх, считающийся в Японии деликатесом.

очень прочно ($K \simeq 10^{-9}$ М) связывается с Na^+-каналом и блокирует поток ионов натрия, не влияя при этом на K^+-канал. Таким же действием обладает и *сакситоксин,* вырабатываемый одним из морских динофлагеллят. Моллюски, питающиеся динофлагеллятами, в особенности съедобные двустворчатые моллюски и мидии, тоже становятся ядовитыми. Так, одна мелкая мидия может содержать сакситоксин в дозе, достаточной чтобы убить 50 человек! Общая структурная особенность тетродотоксина и сакситоксина - наличие гуанидиновой группы (рис. 37.4). Эта положительно заряженная группа токсина взаимодействует с отрицательно заряженным карбоксилат-ионом в устье канала на внеклеточной стороне мембраны. В сущности, эти токсины являются конкурентными ингибиторами Na^+.

Тетродотоксин и сакситоксины в силу своей специфичности и высокого сродства к Na^+-каналу оказались ценнейшими средствами анализа. Так, измерением связывания меченого тетродотоксина с высокой удельной радиоактивностью определяли плотность Na^+-каналов в различных возбудимых мембранах. *Немиелинизированные нервные волокна, которые лишены изоляционного слоя миелина, обычно характеризуются низкой плотностью Na^+-каналов - порядка 20 на 1 мкм^2.* В мембранах таких аксонов Na^+-каналы отделены друг от друга расстоянием 2000 А. *Что касается миелинизированных нервных* волокон, то в специфических участках, называемых перехватами Ранвье, плотность *Na^+-каналов, напротив, достигает очень высоких значений - порядка 10^4 на 1 мкм^2.* Перехваты Ранвье, расположенные на аксоне с интервалом 2 мм,- это единственные участки, в которых мембрана аксона миелинизированного нерва соприкасается с внеклеточной жидкостью. Участки мембраны между перехватами Ранвье содержат очень мало каналов и не участвуют в проведении. Потенциал действия перескакивает от перехвата к перехвату, вследствие чего импульс проводится быстрее и эффективнее, чем в немиелинизированном волокне. Наличие 10^4 каналов на 1 мкм^2 в перехвате Ранвье означает, что значительная часть поверхности мембраны в этой области занята Na^+-каналами.

Специфичность связывания тетродотоксина с Na^+-каналами была использована также при их выделении и очистке. Для этого интегральные мембранные белки возбудимых мембран солюбилизировали с помощью детергента, после чего разделяли на ионообменнике. Связывание тетродотоксина с солюбилизированным Na^+-каналом позволило количественно определять канал в процессе очистки. Выделенный таким путем Na^+-канал оказался белком массой 230 кДа, состоящим из субъединиц различных типов. Сложность устройства

Рис. 37.5. Электронная микрофотография миелинизированного аксона из спинного мозга. Миелиновая оболочка аксона («обертка», образованная многочисленными слоями мембран) выполняет роль изолятора. Скорость проведения в миелинизированных нервах намного выше, чем в лишенных миелиновой оболочки нервах того же диаметра. (Печатается с любезного разрешения д-ра Cedric Raine.)

Na^+-канала частично обусловлена, видимо, тем, что он является не только высокоизбирательной порой в мембране, но и содержит *структуру, воспринимающую напряжение* (сенсор напряжения). Заряженные группы этой структуры реагируют на изменение мембранного потенциала во время потенциала действия и передают информацию на ту часть канала, которая составляет пору в мембране. Действительно, до начала потока натрия через мембрану выявляется поток через канал (так называемый *воротный ток*), обусловленный движением заряженных групп в белке.

37.3. Ацетилхолин является нейромедиатором

Взаимодействие между нервными клетками осуществляется в местах их соединения, называемых *синапсами* (рис. 37.6). Нервные импульсы передаются через большинство синапсов с помощью химических нейромедиаторов - небольших легко диффундирующих веществ, например ацетилхолина или норадреналина. Ацетилхолин служит также медиатором в двигательных концевых пластинках (нервно-мышечных соединениях), являющихся участками контактов между нервом и поперечнополосатой мышцей.

Пресинаптическая мембрана холинергического синапса (т. е. синапса, в котором в качестве нейромедиатора используется ацетилхолин) отделена от *постсинаптической мембраны* так называемой *синаптической щелью* шириной около 500 А. Окончание пресинаптического аксона наполнено *синаптическими пузырьками (везикулами),* содержащими ацетилхолин. Пришедший к синапсу нервный импульс вызывает высвобождение ацетилхолина в синаптическую шель. Далее молекулы ацетилхолина диффундируют через щель и достигают постсинаптической мембраны, где связываются со специфическими рецепторными молекулами. Это приводит к *деполяризации постсинаптической мембраны,* и далее волна деполяризации распространяется вдоль электрически возбудимой мембраны второй нервной клетки. Ацетилхолин *гидролизуется ацетилхолинэстеразой,* и постсинаптическая мембрана поляризуется вновь.

Ацетилхолин синтезируется вблизи пресинаптического окончания аксона путем переноса ацетильной группы от ацетил-CoA

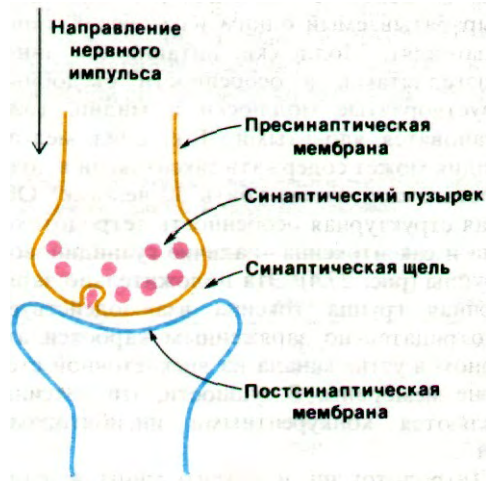
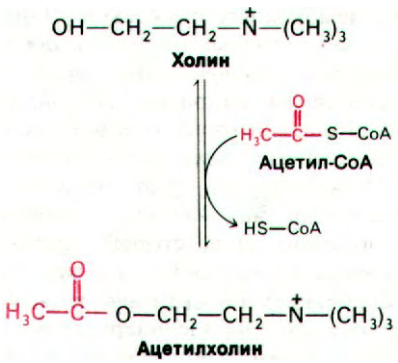


Рис. 37.6. Схематическое изображение холинергического синапса.

на холин. Фермент, катализирующий эту реакцию,- *холин-ацетилтрансфераза* (холин-ацетилаза). Далее часть образовавшегося ацетилхолина попадает в синаптические пузырьки, а часть остается в цитозоле. В одном холинергическом синаптическом пузырьке (обычно 400 А диаметром) содержится около 10000 молекул ацетилхолина.



Изучению синаптической функции значительно способствовало выделение *синаптосом* из гомогената нервной ткани. Синаптосомы представляют собой пресинаптические окончания, образующие в процессе выделения замкнутые структуры. Они представляют собой мешочки из пресинаптической мембраны, содержащей митохондрии, цитозоль и синаптические пузырьки.

37.4. Ацетилхолин открывает в постсинаптической мембране каналы для катионов

Потенциал покоя постсинаптической мембраны или мембраны двигательной концевой пластинки составляет примерно — —75 мВ. При взаимодействии ацетилхолина со специфическими рецепторами происходит резкое изменение проницаемости этих мембран (рис. 37.7). *В течение 0,1 мс значительно возрастает проводимость как Na^+, так и K^+, и возникает сильный ток Na^+ внутрь клетки и более слабый ток K^+ из клетки.* Ток Na^+ в клетку приводит к деполяризации постсинаптической мембраны и инициирует возникновение потенциала действия в соседнем (постсинаптическом) нейроне или мышечном волокне. *Ацетилхолин раскрывает катионные каналы только одного типа, характеризующиеся почти одинаковой проницаемостью для Na^+ и K^+.* Если поток Na^+ при действии ацетилхолина оказывается большим, чем поток K^+, то это обусловлено лишь большей крутизной электрохимического градиента концентрации Na^+ по сравнению с K^+.

Две молекулы ацетилхолина связываются с молекулой рецептора, вызывая при этом такие изменения конформации, которые открывают канал. Схематически кинетику процесса, согласующуюся с экспериментальными данными, можно описать уравнением

$$2A + R \rightleftarrows A_2R \rightleftarrows A_2R^*,$$

где A - молекула ацетилхолина, R - закрытый канал, R* - открытый канал. За полупериод жизни открытого канала, равный всего лишь 1 мс, по нему проходит примерно 10^4 ионов. Продолжительное воздействие ацетилхолина на рецептор приводит к его *десенсибилизации:* канал закрывается и реакция на ацетилхолин исчезает на длительный промежуток времени.

37.5. Ацетилхолин высвобождается квантами

Проведенное Бернардом Катцем (Bernard Katz) изучение передачи нервного импульса

Рис. 37.7. Ацетилхолин деполяризует постсинаптическую мембрану путем увеличения Na^+ и K^+ проводимости.

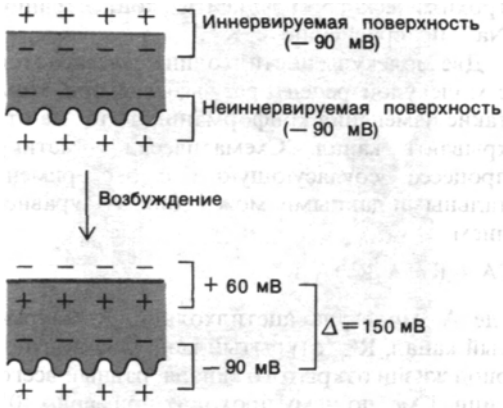
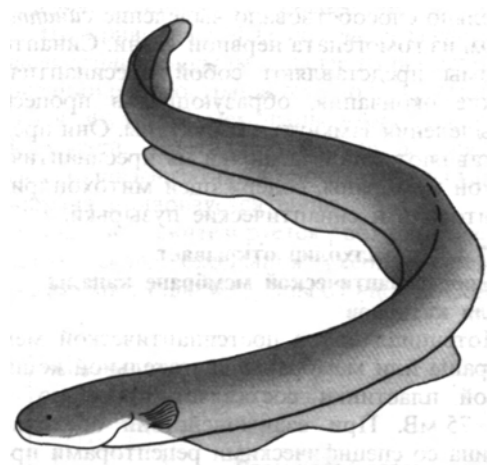


Рис. 37.8. Генерирование напряжения в электрической пластинке электрического угря.

в участках нервно-мышечного соединения показало, что ацетилхолин высвобождается из пресинаптической мембраны порциями по 10^4 молекул. Доказательство *квантового высвобождения ацетилхолина* было получено при анализе мембранного потенциала двигательных концевых пластинок, которым свойственна спонтанная электрическая активность даже в отсутствие стимуляции нерва. Деполяризующие импульсы с амплитудой 0,5 мВ и длительность около 20 мс возникают залпами. Это так называемые *миниатюрные потенциалы концевых пластинок;* они возникают случайно с вероятностью, сохраняющейся постоянной на протяжении длительного времени. Миниатюрный потенциал концевой пластинки вызывается спонтанным высвобождением одиночного синаптического пузырька. Полная деполяризация концевой пластинки, создаваемая потенциалом действия, обусловлена синхронным высвобождением примерно 100 «квантов» («пакетов») ацетилхолина за более короткое время чем 1 мс. *Число высвобождающихся квантов ацетилхолина зависит от потенциала действия пресинаптической мембраны.* Другими словами, *высвобождение ацетилхолина представляет собой электрически регулируемую форму секреции.* Высвобождение ацетилхолина зависит от присутствия Ca^{2+} во внеклеточной жидкости. При деполяризации пресинаптической мембраны происходит вход Ca^{2+}, что способствует слиянию на короткий срок мембраны синаптических пузырьков с пресинаптической мембраной.

37.6. При добавлении ацетилхолина реконструированные мембранные пузырьки становятся проницаемыми для катионов

В последние годы сделаны большие успехи в очистке ацетилхолиновых рецепторов и реконструировании функционально активных мембранных пузырьков. Наиболее подходящий исходный материал для таких исследований - *электрический орган* электрической рыбы, например *Torpedo* (электрический скат), который очень богат холинергическими постсинаптическими мембранами. Электрический орган образован из колонок клеток, называемых *электрическими пластинками.* Одна сторона клеток (иннервируемая поверхность) снабжена нервными окончаниями и электрически возбудима. Другая сторона (неиннервируемая поверхность) образует многочисленные склад-



Electrophorus electricus, американский электрический угорь.

ки и электрически невозбудима. Разность потенциалов, возникающая при стимуляции электрических пластинок, обусловлена асимметрией ответа двух поверхностей. У такой электрической рыбы, как *Electrophorus,* мембранный потенциал иннервируемой поверхности при возбуждении сдвигается с —90 до +60 мВ, тогда как на неиннервируемой поверхности сохраняется —90 мВ. Следовательно, *в пик потенциала действия разность потенциалов между наружными*

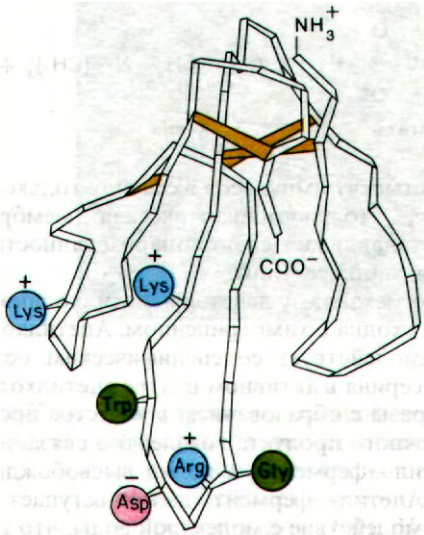
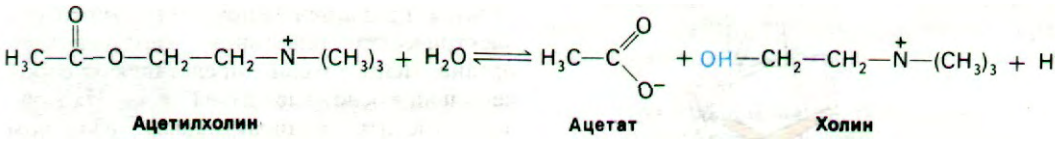


Рис. 37.9. Трехмерная структура нейротоксина, блокирующего рецептор ацетилхолина. Этот нейротоксин вырабатывается у морских змей. (Печатается с любезного разрешения д-ра Demetrius Tsernoglou и д-ра Gregory Petsko.)

поверхностями двух сторон составляет 150 мВ (рис. 37.8). Электрические пластинки электрического органа соединены параллельно, и, следовательно, их разность потенциалов складывается. Орган, состоящий из 5000 рядов электрических пластинок, может, таким образом, генерировать разряд в 750 В. Интересно отметить, что электрические пластинки электрического угря эволюционно возникли из мышечных клеток. При этом они сохранили электрически возбудимую наружную мембрану мышцы, но утратили аппарат сокращения. Электрический орган *Electrophorus* - великолепный источник Na^+-каналов.

Еще один экзотический биологический материал оказался бесценным источником ацетилхолиновых рецепторов. Для того, чтобы идентифицировать рецептор в смеси макромолекул, его необходимо *специфически пометить.* Для этого используют нейротоксины змей, в частности α-*бунгаротоксин* из яда одной змеи с о. Тайвань и *кобратоксин* (из яда кобры). Указанные нейротоксины блокируют нейромышечное проведение, связываясь с рецепторами ацетилхолина на двигательных концевых пластинках или на иннервируемой поверхности электрических пластинок электрического органа. Нейротоксины представляют собой небольшие основные белки (7 кДа). Их можно пометить радиоактивным изотопом с высокой удельной радиоактивностью. Для этого их либо иодируют иодом-125, либо превращают в шиффово основание с пиридоксальфосфатом с последующим восстановлением образованного продукта ^{3}М-боргидридом. Меченый кобратоксин прочно связывается с ацетилхолиновым рецептором (константа диссоциации - порядка 10^{-9} М) и, что особенно важно, практически не связывается с другими макромолекулами постсинаптической мембраны. Таким образом, рецептор ацетилхолина можно специфически пометить радиоактивным атомом.

Путем обработки фрагментов мембраны неионным детергентом (таким, как производное полиоксиэтилена твин-80) удалось солюбилизировать рецепторы ацетилхолина электрического органа. Полученный раствор фракционировали методами гельфильтрации и ионообменной хроматографии. Последним этапом очистки была аффинная хроматография на колонке, содержащей ковалентно связанный кобратоксин. В итоге был получен рецептор, очищенный в 10000 раз. Ацетилхолиновый рецептор представляет собой комплекс массой 270 кДа, состоящий из четырех типов субъединиц. Субъединица 40 кДа метится по сродству радиоактивными соединениями, содержащими группу триметиламмония, что указывает на наличие в ней участка связывания ацетилхолина. Удалось получить мембранные пузырьки, содержащие очищенные рецепторы ацетилхолина; для этого к раствору рецепторов добавляли фосфолипиды и затем удаляли диализом детергент. Показано, что радиоактивные ионы натрия ($^{22}Na^+$), включенные в процессе реконструирования пузырьков в их внутреннее водное пространство, высвобождаются при добавлении ацетилхолина или его аналогов, например карбамоилхолина (рис. 37.10). Высвобождение ионов натрия блокируют бунгаротоксин и обычные антагонисты ацетилхолина; следовательно, оно опосредовано специфическим взаимодействием ацетилхолина со связанным с мембраной рецептором.



37.7. Ацетилхолин быстро гидролизуется, и концевая пластинка реполяризуется

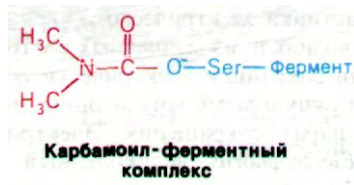
Для восстановления возбудимости постсинаптической мембраны необходимо выключение деполяризующего сигнала. Эту функцию выполняет *ацетилхолинэстераза,* открытая Дэвидом Нахманзоном (David Nachmansohn) в 1938 г. Фермент гидролизует ацетилхолин до ацетата и холина. В результате проницаемость постсинаптической мембраны возвращается к исходному уровню и мембрана реполяризуется. Ацетилхолинэстераза локализована в синаптической щели, где она связана с сетью из коллагена и гликозамингликанов, поступающих из постсинаптической клетки. Масса фермента 260 кДа, субъединичная структура - $\alpha_2\beta_2$. Ацетилхолинэстеразу можно легко отделить от ацетилхолиновых рецепторов. Фермент характеризуется поразительно высоким числом оборотов, а именно 25000 $с^{-1}$. Это означает, что одна молекула ацетилхолина расщепляется за 40 мкс. Такое высокое число оборотов фермента имеет очень важное значение для быстрого восстановления поляризованного состояния постсинаптической мембраны. Синапсы способны передавать тысячу импульсов в секунду только потому, что постсинаптическая мембрана восстанавливает свою поляризованность за доли миллисекунды.

Рис. 37.10. Ацетилхолин вызывает высвобождение Na^+ из реконструированных мембранных пузырьков, содержащих ацетилхолиновый рецептор. По оси ординат отложено содержание $^{22}Na^+$ в синаптических пузырьках.

По механизму действия ацетилхолинэстераза сходна с химотрипсином. Ацетилхолин взаимодействует со специфическим остатком серина в активном центре ацетилхолинэстеразы с образованием в качестве промежуточного продукта ковалентно связанного ацетил—фермента, а холин высвобождается. Ацетил—фермент далее вступает во взаимодействие с молекулой воды, что приводит к образованию ацетата и регенерированного свободного фермента (рис. 37.12).

37.8. Ингибиторы ацетилхолинэстеразы используются как лекарственные средства и как яды

Терапевтические и токсические свойства ингибиторов ацетилхолинэстеразы нашли широкое практическое применение. Алкалоид из калабарских бобов *физостигмин* (называемый также *эзерин*) когда-то использовался при испытании ядом в судилище над колдунами и ведьмами. Физостигмин и родственные ему ингибиторы, например неостигмин, являются *карбамоильными эфирами* (рис. 37.13). Они ингибируют ацетилхолинэстеразу путем образования ковалентного промежуточного соединения, которое очень медленно гидролизуется. Неостигмин связывается с ацетилхолинэстеразой таким образом, что его положительно заряженная триметиламмониевая группа встает в анионном участке фермента, а карбамоильная группа оказывается рядом с реакционноспособным остатком серина в участке этерификации. Далее происходит карбамоилирование фермента и высвобождается образующийся спирт. *Последующий гидро-*



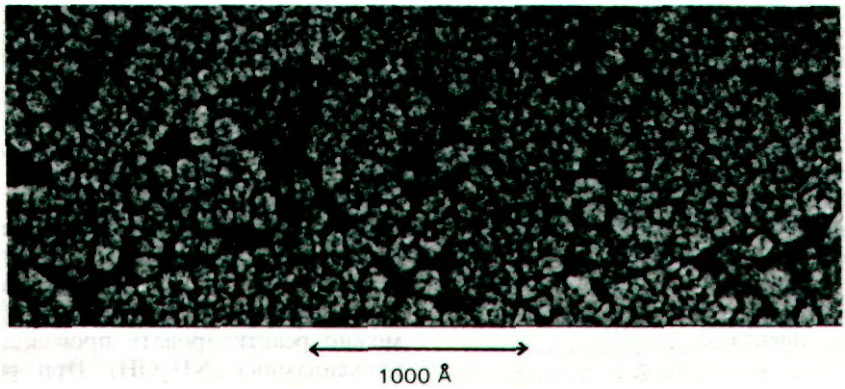


Рис. 37.11. Электронная микрофотография ацетилхолиновых рецепторов в постсинаптической мембране.(Печатается с любезного разрешения д-ра John Heuser и д-ра Steven Salpeter.)

лиз карбамоильного производного фермента в отличие от гидролиза ацетил—фермента происходит с очень низкой скоростью. В итоге активный центр ацетилхолинэстеразы оказывается прочно заблокированным. Неостигмин используется для лечения глаукомы - болезни глаз, характеризующейся повышенным внутриглазным давлением. Механизм терапевтического эффекта состоит в том, что неостигмин ингибирует ацетилхолинэстеразу и тем самым усиливает действие ацетилхолина.

Еще более мощные ингибиторы ацетилхолинэстеразы - *органические фторфосфаты, в* частности диизопропилфторфосфат (ДИФФ). Эти соединения реагируют с ацетилхолинэстеразой, образуя высокостабильные ковалентные *фосфорил-ферментные комплексы* (рис. 37.14). Как и при взаимодействии с сериновыми протеиназами, фосфорильная группа ДИФФ связывается с серином в активном центре фермента.

Множество различных органических фторфосфатов было синтезировано для использования в качестве *инсектицидов в сельском хозяйстве,* а также в качестве отравляющих веществ - *нервно-паралитических ядов* в химической войне (рис. 37.15). Эти соединения могут вызвать смерть путем остановки дыхания. Наиболее токсичны из них - *табун* и *зарин*. *Паратион* - инсектицид, нашедший широкое применение в сельском хозяйстве.

Путем использования радиоактивного ДИФФ в качестве метки было определено число молекул ацетилхолинэстеразы в концевой пластинке нерва в диафрагмальной мышце мыши. Плотность фермента составила 12000 мкм$^{-2}$, что почти равно числу рецепторов ацетилхолина, определенному с помощью радиоактивных нейротоксинов. Таким образом, *постсинаптическая мембрана очень богата и ацетилхолинэстеразой, и ацетилхолиновыми рецепторами.* При передаче нервных импульсов, поступающих с малой частотой, используется только небольшая доля общего числа молекул фермента. Однако проведение при высокой частоте импульсации требует участие множества молекул ацетилхолинэстеразы.

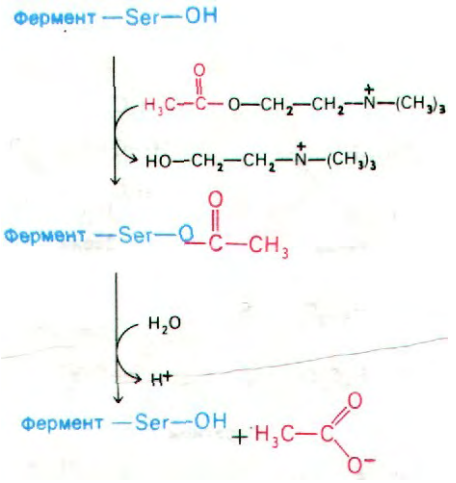


Рис. 37.12. Механизм каталитического действия ацетилхолинэстеразы.

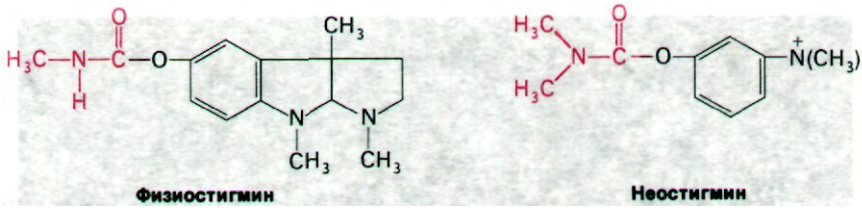


Рис. 37.13. Физостигмин и неостигмин ингибируют ацетилхолинэстеразу путем карбамоилирования серина в активном центре фермента.

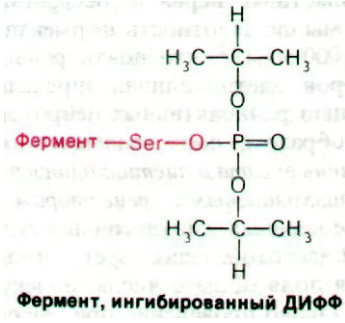


Рис. 37.14. Ингибированная диизопропилфторфосфатом ацетилхолинэстераза.

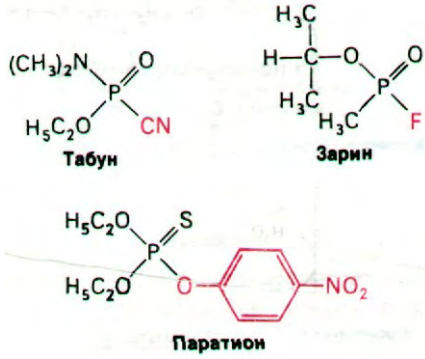
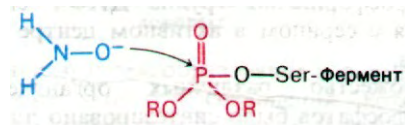


Рис. 37.15. Структурные формулы нескольких органических фосфатов - ингибиторов ацетилхолинэстеразы.

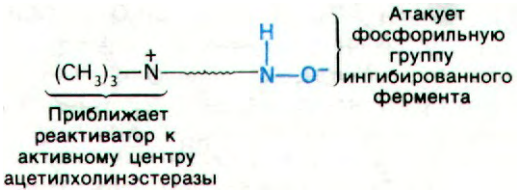
37.9. Разработка антидота для лечения отравлений органическими фосфатами

Ацетилхолинэстеразу, ингибированную органическими фторфосфатами типа ДИФФ, можно реактивировать производными гидроксиламина (NH_2OH). При разработке антидота исходили из обнаруженного Ирвином Уилсоном (Irvin Wilson) факта, что гидроксиламин высвобождает фосфорильную группу, присоединенную к сериновому остатку ингибированного фермента, и тем самым реактивирует его (рис. 37.16). Задача состояла в том, чтобы приспособить эту реакцию для клинического использования. Однако гидроксиламин нельзя использовать *in vivo*, поскольку в тех высоких концентрациях, которые необходимы для реактивации ацетилхолинэстеразы, ингибированной ДИФФ, он токсичен. Выбранный Уилсоном подход состоял в том, чтобы найти соединение, обладающее реакционной способностью гидроксиламина, но со специфичностью и очень высоким сродством к ацетилхолинэстеразе. Относительно фермента было известно, что на нем есть анионный участок для связывания положительно заряженного остатка холина в ацетилхолине, и потому представлялось целесообразным синтезировать производное гидроксиламина, содержащее четвертичную аммониевую группу. Возникал, однако, вопрос, где должен стоять заместитель: при атоме кислорода или азота гидроксиламина? Было обнаружено, что О-метилгидроксиламин лишен способности реактивировать фермент, тогда как N-метилгидроксиламин обладал такой активностью. Гидроксильная группа реактиватора не может быть замещена, поскольку именно анионная форма соединения атакует атом фосфора в ингибированном ферменте.

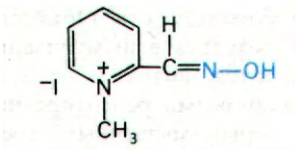


Следующий и основной этап состоял в том, чтобы поместить четвертичную ам-

мониевую группу на необходимом растоянии от нуклеофильного атома кислорода. Более того, требовалось, чтобы по своей ориентации эти группы были комплементарны анионному участку и атому фосфора в ингибированном ферменте.



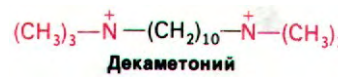
В качестве реактиваторов были испробованы многочисленные соединения, содержащие четвертичную аммониевую группу и гидроксиламинную функцию. Наиболее эффективным среди них оказался *2-пиридинальдоксимметиодид* (ПАМ). Это соединение обладает устойчивой геометрией благодаря двойной связи в оксиме, которая способствует удержанию атома кислорода в плоскости кольца.



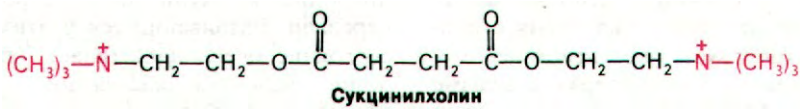
ПАМ реактивирует ингибированную ДИФФ ацетилхолинэстеразу в принципе по тому же механизму, что и гидроксиламин. Однако по эффективности 10^{-6} М ПАМ соответствует 1 М гидроксиламина. *Такое повышение эффективности в 1000000 раз позволяет использовать ПАМ для лечения отравлений органическими фосфатами.* Удивительная эффективность ПАМ обусловлена оптимальным расположением четвертичной аммониевой группы по отношению к нуклеофильному атому кислорода. Разработка этого препарата явилась вехой в развитии рационального подхода к синтезу лекарственных препаратов.

37.10. Ингибиторы ацетилхолинового рецептора

Блокаторами нервно-мышечного проведения служат также *соединения, непосредственно воздействующие на ацетилхолиновый рецептор.* К ним относится *кураре,* который на протяжении столетий использовали южноамериканские индейцы. Вскоре после возвращения Колумба из Америки д'Ангера в своем сочинении «De Orbo novo» отмечал, что «местные жители отравляли стрелы соком смертельно-ядовитой травы». Одним из активных компонентов кураре является *d-тубокурарин* (рис. 37.17). *Тубокурарин ингибирует деполяризацию концевых пластинок, конкурируя с ацетилхолином за связывание с рецептором.* Аналогичным путем действуют α-бунгаротоксин и кобротоксин. В отличие от этого вещества типа *декаметония* соединяются с рецептором ацетилхолина, вызывая устойчивую *деполяризацию* концевой пластинки.



В хирургии в качестве препарата, вызывающего расслабление мышц, используется аналог ацетилхолина - *сукцинилхолин.*



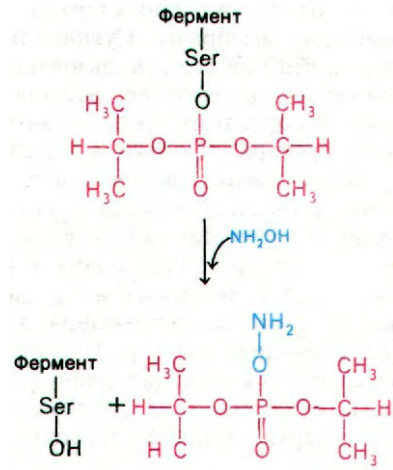


Рис. 37.16. Реактивация гидроксиламином ацетилхолинэстеразы, ингибированной диизопропилфторфосфатом.

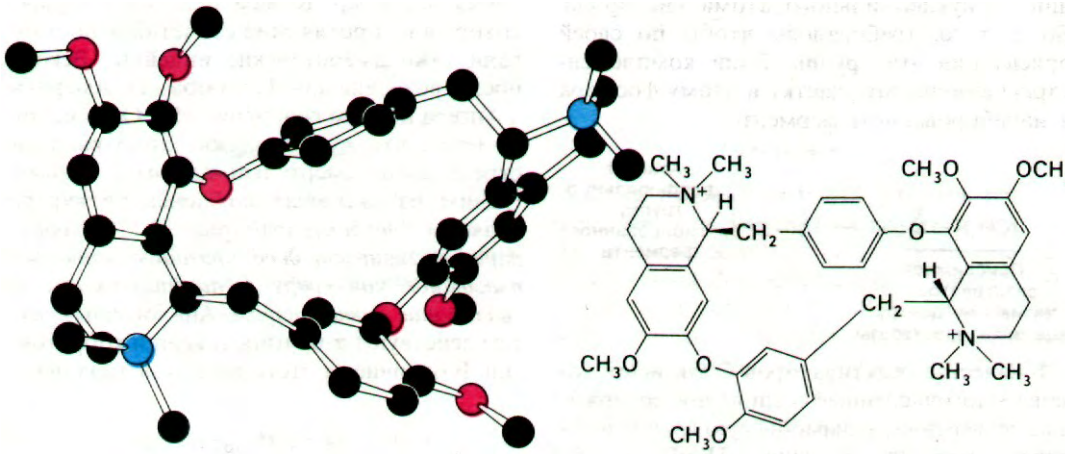


Рис. 37.17. Формула и модель *d*-тубокурарина.

Сукцинилхолин крайне медленно гидролизуется ацетилхолинэстеразой в постсинаптической мембране. Вследствие этого он вызывает устойчивую деполяризацию концевой пластинки. В то же время сукцинилхолин гидролизуется под действием менее специфических холинэстераз в плазме и в печени; эти ферменты назвали *плазменными ацетилхолинэстеразами* или *псевдохолинэстеразами* для того, чтобы отличить их от ацетилхолинэстеразы постсинаптической мембраны. Сукцинилхолин удобен тем, что при его использовании нервно-мышечное проведение восстанавливается вскоре после того, как перестают вводить этот препарат. Однако в отдельных случаях мышечное расслабление и паралич дыхательных мышц сохраняются на протяжении многих часов. Дело в том, что в таких случаях гидролиз сукцинилхолина у больных идет крайне медленно из-за сильно сниженного сродства плазменной холинэстеразы к сукцинилхолину. Повышенная чувствительность к сукцинилхолину [так же как и памахину (разд. 15.11)] - пример генетически детермированной лекарственной идиосинкразии.

Если кроликов иммунизировать очищенными ацетилхолиновыми рецепторами, то спустя несколько недель после иммунизации у них наблюдается мышечная слабость и быстрая утомляемость. Объясняется это тем, что в результате иммунизации у них вырабатываются антитела, реагирующие с ацетилхолиновыми рецепторами их собственных нервно-мышечных соединений. В итоге число функционально активных ацетилхолиновых рецепторов уменьшается, что приводит к ухудшению нейромышечной передачи. Развивающееся у этих кроликов состояние очень напоминает тяжелую болезнь человека - *миастению* (myasthenia gravis), и, действительно, в сыворотке больных миастенией содержатся антитела, направленные против собственных рецепторов ацетилхолина. Другими словами, myasthenia gravis является *аутоиммунным заболеванием,* т. е. таким заболеванием, при котором организм оказывается мишенью действия собственной иммунной системы.

37.11. К числу нейромедиаторов относятся также катехоламины и γ-аминомасляная кислота (ГАМК)

Помимо ацетилхолина, известны и другие нейромедиаторы. Вещество считается нейромедиатором, если оно удовлетворяет следующим критериям. Во-первых, микроинъекции предполагаемого нейромедиатора в синаптическую щель должны вызывать такой же ответ, как возбуждение пресинаптического нерва. Во-вторых, это вещество должно в больших количествах присутствовать в пресинаптических нервных окончаниях. В этом отношении наиболее весомым критерием служит выделение синаптических пузырьков, содержащих это вещество. В-третьих, постулированный медиатор должен высвобождаться из пресинаптиче-

ского нерва в нужное время и в количестве, достаточном для воздействия на постсинаптический нерв.

Этим критериям удовлетворяет ряд катехоламинов. Так, норадреналин является медиатором в гладкомышечных соединениях, которые иннервируются симпатическими нервами (в отличие от парасимпатических соединений, в которых нейромедиатором служит ацетилхолин). Катехоламины адреналин и дофамин - два других катехоламиновых нейромедиатора. Указанные катехоламины синтезируются из тирозина в окончаниях симпатических нервов и в надпочечниках (рис. 37.18). Первый этап синтеза (реакция, лимитирующая скорость всего процесса) - гидроксилирование тирозина с образованием 3,4-дигидроксифенилаланина (*ДОФА*). Данная реакция катализируется тирозин-гидроксилазой - ферментом, аналогичным фенилаланин-гидроксилазе. Активатором молекулярного кислорода при этом служит тетрагидробиоптерин - кофактор фермента. Второй этап синтеза - декарбоксилирование ДОФА, катализируемое ДОФА-декарбоксилазой (ферментом, содержащим пиридоксальфосфат) с образованием 3,4-дигидроксифенилэтиламина (*дофамина*). Далее дофамин гидроксилируется в *норадреналин* в присутствии медьсодержащей гидроксилазы. Наконец, из норадреналина в результате метилирования образуется *адреналин;* фермент, осуществляющий эту реакцию,- трансметилаза, использующая в качестве донора метильных групп S-аденозилметионин.

Инактивация катехоламиновых нейромедиаторов осуществляется путем метилирования 3-ОН-группы катехолового кольца. Реакцию катализирует *катехол-О-метилтрансфераза,* использующая S-аденозилметионин в качестве донора метильной группы. Другой путь инактивации этих нейромедиаторов - удаление аминогруппы в ходе окисления *моноаминоксидазой* (рис. 37.19).

Среди производных аминокислот выявлен еще один нейромедиатор. Это γ-аминобутират, называемый также *γ-аминомасляной кислотой (ГАМК).* ГАМК увеличивает проницаемость постсинаптических мембран для K^+ и тем самым отдаляет мембранный потенциал от порогового уровня, при котором возникает потенциал действия; таким образом, ГАМК - это тормозный нейромедиатор. ГАМК образуется при декарбоксилировании глутамата в реакции, катализируемой глутамат-декарбоксилазой (рис. 37.20). Нетрудно предугадать, что простетической группой этой декарбоксилазы служит пиридоксальфосфат. γ-Аминобутират инактивируется путем трансаминирования с образованием полуальдегида янтарной кислоты, который далее окисляется в сукцинат.

Рис. 37.18. Путь биосинтеза катехоламиновых нейромедиаторов.

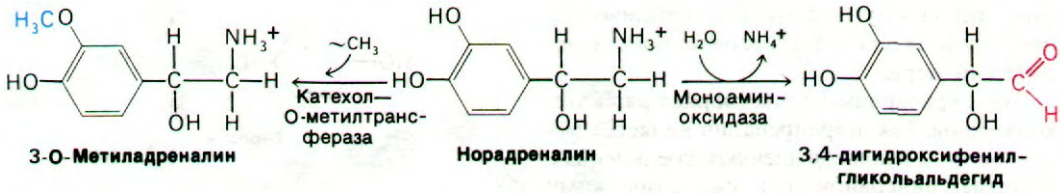


Рис. 37.19. Инактивация норадреналина.

37.12. Для возбуждения палочки сетчатки глаза достаточно одного фотона

Рассмотрим теперь возбудимые рецепторы, активируемые *светом.* У человека имеются два типа фоторецепторных клеток, называемых палочками и колбочками в соответствии с их формой. *Колбочки* функционируют на ярком свету и ответственны за цветовое зрение, тогда как *палочки* воспринимают слабый свет, но не различают цвета. В сетчатке глаза человека содержится 3 млн. колбочек и 1 млрд. палочек. Эти фоторецепторные клетки *преобразуют энергию света в движение атомов, а далее и в нервный импульс.* Палочки и колбочки образуют синапсы с биполярными клетками, которые

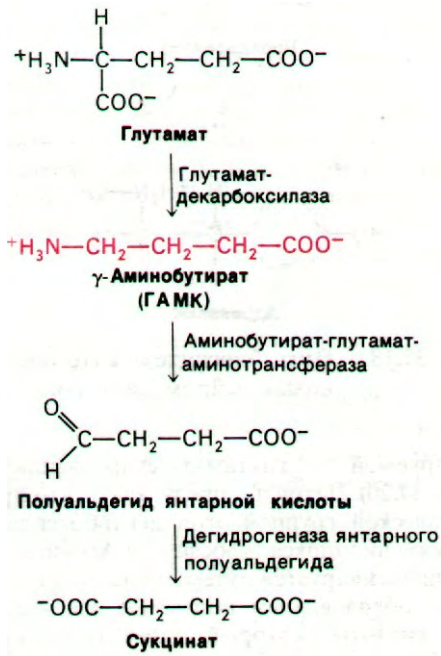


Рис. 37.20. Синтез и инактивация γ-аминобутирата.

в свою очередь взаимодействуют с другими нервными клетками в сетчатке. Электрические сигналы, генерированные фоторецепторными клетками, преобразуются, проходя по сложной сети нервных клеток в сетчатке, и затем передаются в мозг по волокнам зрительного нерва. Таким образом, сетчатка выполняет две функции, а именно трансформирует свет в нервные импульсы и интегрирует зрительную информацию.

В 1938 г. Зелиг Хехт (Selig Hecht) открыл, что *для возбуждения палочки (клетки) сетчатки человека достаточно одного фотона.* Рассмотрим молекулярную основу исключительно высокой чувствительности этих клеток. Палочки представляют собой тонкие удлиненные структуры диаметром обычно 1 мкм и длиной 40 мкм. Основные функции этой клетки четко разделены пространственно (рис. 37.22). *Наружный сегмент палочки специализирован для фоторецепции.* В нем содержится примерно 1000 *дисков,* сложенных стопкой (рис. 37.23). Диски представляют собой закрытые уплощенные мешочки толщиной около 160 А. Эти мембранные структуры насыщены фоторецепторными молекулами. Мембраны дисков и плазматическая мембрана наружного сегмента не соприкасаются. Тонкая ресничка соединяет наружный сегмент с *внутренним сегментом,* богатым митохондриями и рибосомами. Во внутреннем сегменте с очень высокой скоростью вырабатывается АТР и идет активный синтез белков. Диски наружного сегмента имеют срок жизни всего лишь 10 дней и постоянно обновляются. Внутренний сегмент соприкасается с ядром, расположенным рядом с *синаптическим тельцем.* Синаптическое тельце, в котором содержится много синаптических пузырьков, образует синапс с биполярными клетками.

37.13. Родопсин - фоторецепторный белок палочек

Для стимуляции фоторецепторных клеток необходимо поглощение света. Поглощение фотона света должно вызвать структурные изменения светопоглощающей группировки

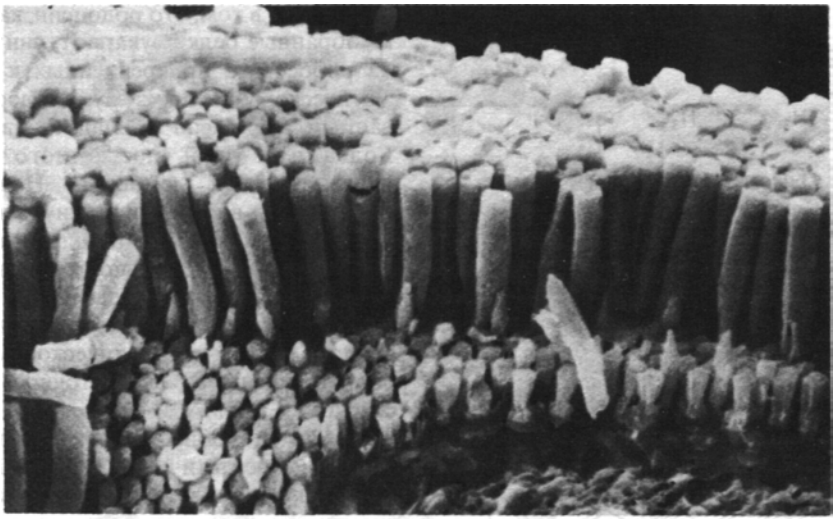


Рис. 37.21. Микрофотография клеток палочек сетчатки, полученная в сканирующем электронном микроскопе. (Печатается с любезного разрешения д-ра Deric Bownds.)

(*хромофора*). Фоточувствительным веществом палочек является *родопсин,* состоящий из белка *опсина* и простетической группы, представленной *11-цис-ретиналем* (рис. 37.24). Родопсин представляет собой трансмембранный белок массой 38 кДа. Его N-конец расположен в водной фазе внутри диска, а С-конец - на другой стороне мембраны диска, в цитозоле. N-концевая область родопсина содержит две олигосахаридные единицы, ковалентно присоединенные к аспарагиновой боковой цепи.

Рис. 37.22. Схематическое изображение палочки сетчатки.

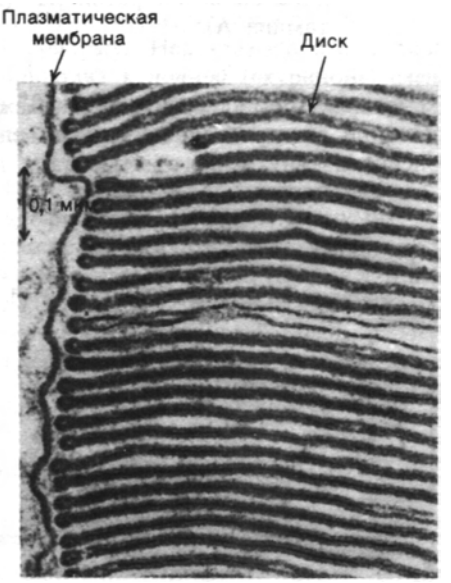


Рис. 37.23. Наружный сегмент палочки сетчатки под электронным микроскопом. Видны уложенные стопкой диски. (Allen J. M., ed., Molecular organization and biological function, Harper and Row, 1967.)

Рис. 37.24. Структура 11-*цис*-ретиналя, полностью-*транс*-ретиналя и полностью-*транс*-ретинола (витамина А).

Этим сахарам, по-видимому, принадлежит важная роль в направленном передвижении родопсина из внутреннего сегмента к дискам. Дело в том, что родопсин, как и другие мембранные белки эукариот, синтезируется на рибосомах, прикрепленных к эндоплазматическому ретикулуму. Новосинтезированный родопсин попадает в аппарат Гольджи и лишь после этого достигает плазматической мембраны. Новые диски образуются в основании внутреннего сегмента путем инвагинации плазматической мембраны, и именно поэтому углеводные единицы родопсина оказываются локализованными внутри диска, хотя первоначально, входя в состав плазматической мембраны, они обращены во внеклеточное пространство (рис. 37.25).

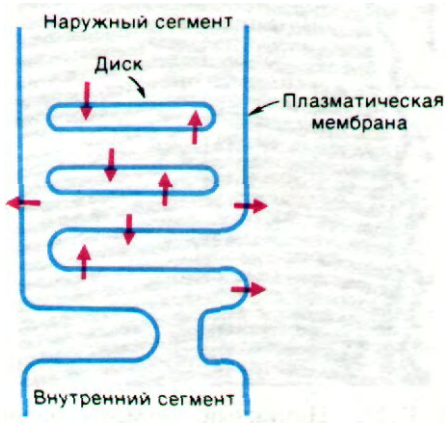


Рис. 37.25. Образование дисков путем инвагинации плазматической мембраны. Стрелками показана полярность молекул родопсина.

Опсин, подобно другим белкам, лишенным простетических групп, не поглощает видимого света. Цвет родопсина и его чувствительность к свету определяются присутствием 11-*цис*-ретиналя, являющегося высокоэффективным хромофором. Благодаря 11-*цис*-ретиналю родопсин обладает широкой полосой поглощения в видимой области спектра с максимумом при 500 нм, что прекрасно соответствует солнечному излучению. Примечательна также интенсивность поглощения видимого света родопсином. Коэффициент экстинкции родопсина при 500 нм очень высок, а именно $4 \cdot 10^4$ $см^{-1} \cdot М^{-1}$ (рис. 37.26). Суммарная сила поглощения видимого света родопсином приближается к максимальным значениям для органических соединений. Высокие хромофорные качества 11-*цис*-ретиналя обусловлены тем, что он является *полиеном*. Чередование в нем шести одинарных и двойных (ненасыщенных) связей создает длинную ненасыщенную систему для переноса электрона.

11-*цис*-ретиналь присоединен к родопсину через *шиффово основание,* которое образуется при связывании альдегидной группы

Рис. 37.26. Спектр поглощения родопсина.

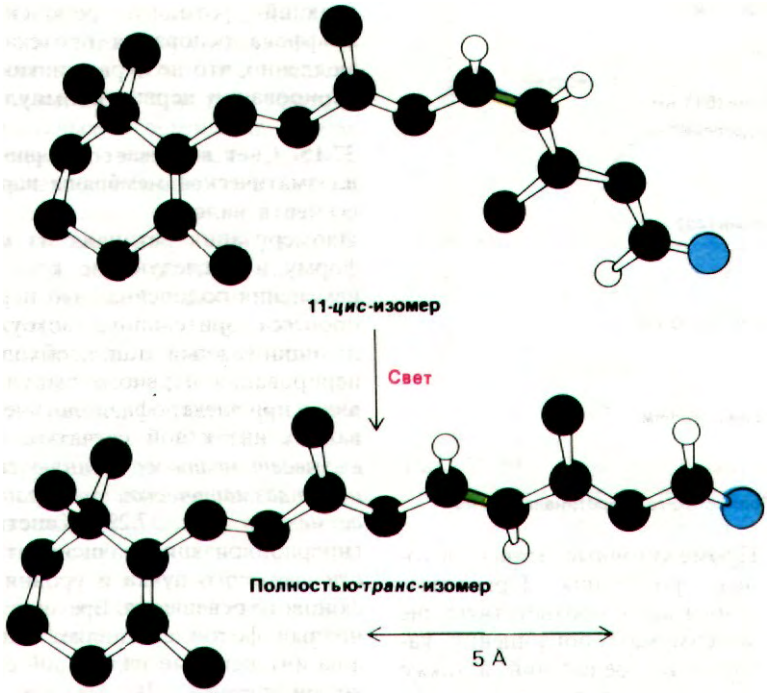
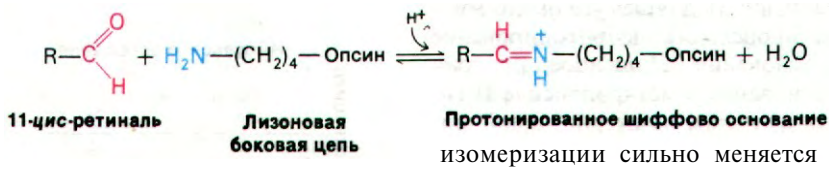


Рис. 37.27. Первичный акт при возбуждении светом - это изомеризация 11-*цис*-изомерашиффоваоснования, образуемого ретиналем. в полностью-*транс*-форму. Двойная связь между С-11 и С-12 показана зеленым цветом.

11-*цис*-ретиналя с ε-аминогруппой специфического остатка лизина в опсине. Спектральные свойства родопсина свидетельствуют о том, что шиффово основание находится в протонированной форме.



Предшественником 11-*цис*-ретиналя служит *полностью-транс-ретинол* (витамин А), который в организме млекопитающих не может синтезироваться *de novo*. Полностью-*транс*-ретинол (рис. 37.24) превращается в 11-*цис*-ретиналь в два этапа. Сначала происходит окисление спиртовой группы в альдегидную в присутствии *ретинол-дегидрогеназы* и $NADP^+$ в качестве акцептора электронов. Затем под действием *ретиналь-изомеразы* двойная связь между С-11 и С-12 изомеризуется из транс-формы в *цис*-форму. Недостаточность витамина А приводит к *ночной* («куриной») *слепоте* и в конечном итоге к повреждению наружных сегментов палочек.

37.14. Свет вызывает изомеризацию 11-*цис*-ретиналя

Первичный акт в процессе зрительного возбуждения известен. Как показал Джордж Уолд (George Wald), *свет вызывает изомеризацию 11-цис-ретинальной группы родопсина в полностью-транс-ретиналь.* В результате изомеризации сильно меняется геометрия ретиналя (рис. 37.27). Образованное ретиналем шиффово основание передвигается по отношению к области кольца хромафора примерно на 5 А. В сущности, *поглощенный фотон преобразуется в движение атомов.*

Значительная изомеризация ретиналя происходит практически в первые несколько

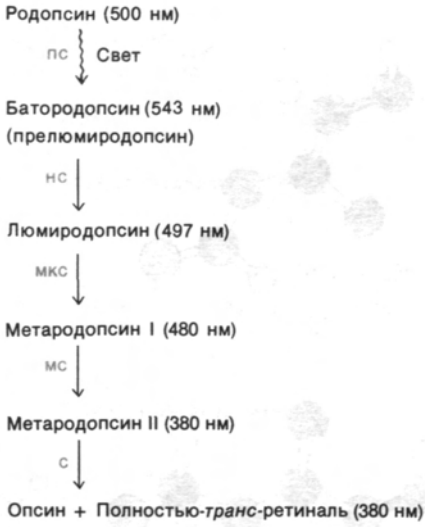


Рис. 37.28. Промежуточные этапы фотолиза родопсина. Приведены длины волн, соответствующие максимумам поглощения каждого из соединений, а также постоянная времени каждого из превращений.

пикосекунд после поглощения фотона, о чем можно судить по появлению новой полосы поглощения после сильного импульсного освещения лазером. Образующийся при этом промежуточный продукт фотолиза, называемый *батородопсином* (или *прелюмиродопсином*), содержит напряженную полностью-*транс*-форму хромофора. Далее и ретиналь, и белок продолжает изменять свою конформацию, что приводит к образованию ряда промежуточных продуктов, различающихся по спектральным свойствам (рис. 37.28). При переходе от метародопсина I к метародопсину II, длящемуся около миллисекунды, происходит депротонирование шиффова основания. Лишенное протона шиффово основание в метародопсине II гидролизуется в течение примерно одной минуты с образованием опсина и полностью-*транс*-ретиналя; последний путем диффузии отделяется от опсина, поскольку не соответствует участку связывания 11-*цис*-изомера. Полностью-*транс*-ретиналь в темноте изомеризуется снова в 11-*цис*-ретиналь, который связывается с опсином, и таким путем регенерируется родопсин. В отличие от реакций фотолиза родопсина гидролиз шиффова основания протекает настолько медленно, что не играет никакой роли в генерировании нервного импульса.

37.15. Свет вызывает гиперполяризацию плазматической мембраны наружного сегмента палочек

Изомеризация ретиналя из *цис*- в *транс-форму* и последующие конформационные изменения родопсина - это первичные акты процесса зрительного возбуждения. Следующий важный этап, необходимый для генерирования нервного импульса, был выявлен при электрофизиологических исследованиях интактной сетчатки. *Квант света вызывает кратковременную гиперполяризацию плазматической мембраны наружных сегментов* (рис. 37.29). Кинетика процесса гиперполяризации зависит от интенсивности светового пучка и уровня устойчивого фонового освещения. Время реакции на единичный фотон составляет около секунды, а на интенсивный падающий свет - несколько миллисекунд. В палочках не возникает потенциала действия. Их реакция на свет может быть различной силы. Величина сигнала, идущего от наружного сегмента к синапсу, зависит от числа поглощенных фотонов. Если взять обладающие полной чувствительностью адаптированные к темноте палочки, то полумаксимальный уровень гиперполяризации наблюдается при поглощении всего лишь 30 фотонов наружным сегментом палочки, содержащим $40 \cdot 10^6$ молекул родопсина (рис. 37.30). Поглощение единичного фотона адаптированной к темноте палочкой вызывает гиперполяризацию порядка 1 мВ, что улавливается синапсом и передается на другие нейроны сетчатки. Исключительная чувствитель-

Рис. 37.29. Под действием света происходит гиперполяризация палочек сетчатки.

ность - не единственное выдающееся свойство палочек. Их вторая поразительная особенность состоит в том, что реакция световоспринимающего аппарата фотодетектора на импульсное освещение зависит от уровня фоновой освещенности. Для возбуждения палочек, освещенных постоянным светом, требуется значительно больше фотонов, чем для палочек, находящихся в темноте (рис. 37.30). Благодаря этому свойству, называемому *адаптацией,* палочки сетчатки способны функционировать при уровнях фоновой освещенности, различающихся на много порядков величины.

Каков ионный механизм индуцированной светом гиперполяризации? Плазматическая мембрана наружного сегмента палочки в темноте высоко проницаема для Na^+. Это обстоятельство наряду с наличием высокого трансмембранного градиента концентраций Na^+ приводит к тому, что в темноте ионы натрия быстро входят внутрь наружного сегмента. Этот градиент поддерживается (Na^+ + K^+)-АТРазой, локализованной в плазматической мембране внутреннего сегмента. Таким образом, в темноте ионы натрия входят в наружный сегмент, диффундируют далее во внутренний сегмент и затем выводятся с помощью насоса, работающего за счет энергии АТР. *Свет каким-то образом блокирует Na^+-каналы в плазматической мембране наружного сегмента.* В результате ток Na^+, направленный внутрь клетки, снижается и мембрана с внутренней стороны становится более электроотрицательной. Другими словами, мембранный потенциал палочек при освещении сдвигается в сторону равновесного K^+-потенциала. Далее индуцированная светом гиперполяризация вблизи освещенных дисков пассивно передается по плазматической мембране на синаптическое тельце.

37.16. Медиаторы передают сигнал от фотолизированного родопсина на плазматическую мембрану

Изменение проницаемости плазматической мембраны для Na^+ и последующая гиперполяризация - это *многократно усиленные реакции* наружного сегмента на свет. В самом деле, поглощение всего лишь *одного* фотона адаптированной к темноте палочкой блокирует ток более чем *миллиона* ионов натрия. Как возникает усиление такого масштаба? Прежде всего следует обратить внимание на то, что мембраны дисков, содержащие основную массу молекул родопсина, не соприкасаются с плазматической мембраной палочек и не сопряжены с ней электрически. Более того, молекула родопсина, поглотившая фотон, может быть удалена от натриевого канала плазматической мембраны на несколько тысяч ангстрем. Все это исключает возможность прямого взаимодействия между дисками и плазматической мембраной. Практически не может быть сомнений в том, что сигнал от фотолизированного родопсина (Рд*) в мембранах дисков передается на плазматическую мембрану с помощью диффундирующих медиаторов. При этом для обеспечения той высокой степени усиления, которая реально наблюдается, фотолиз одной молекулы родопсина должен сопровождаться образованием (или распадом) большого числа молекул медиатора.

Рис. 37.30. Чувствительность палочек сетчатки к импульсному освещению зависит от фонового уровня освещенности.

Природа медиатора не установлена еще окончательно; проведенные исследования позволили выдвинуть на эту роль двух достаточно вероятных кандидатов: ионы Ca^{2+} (рис. 37.31) и циклический GMP (рис. 37.32). *В пользу Ca^{2+} как медиатора свидетельствуют следующие экспериментальные данные.*

1. Натриевые каналы в плазматической мембране закрываются при повышении содержания Ca^{2+} в цитозоле и открываются при его понижении.

2. При введении в цитозоль хелатирую-

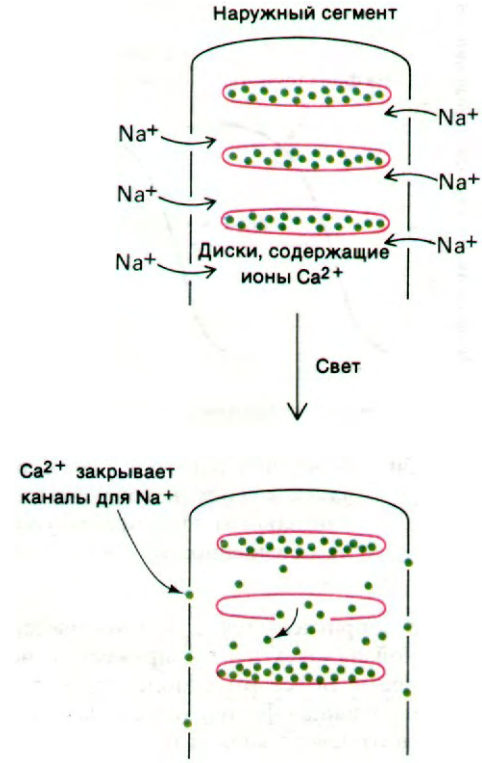


Рис. 37.31. Схематическое изображение гипотезы о роли ионов кальция как медиаторов при зрительном возбуждении.

щих агентов, специфически связывающих Ca^{2+}, чувствительность палочек к свету уменьшается. Такая десенсибилизация указывает на то, что фотолиз одной молекулы родопсина ведет к высвобождению в цитозоль нескольких сотен ионов Ca^{2+}.

3. После импульсного воздействия светом из наружных сегментов палочек выводится много Ca^{2+}.

Однако, судя по результатам других экспериментов, медиатором может быть cGMP. Решающее значение для этого заключения имеют следующие данные.

1. Натриевые каналы плазматической мембраны открываются при повышении содержания cGMP в цитозоле и закрываются при снижении содержания этого нуклеотида.

2. Содержание cGMP регулируется светом. В частности, под действием света происходит активация фосфодиэстеразы, гидролизующей cGMP, что будет описано несколько ниже.

3. Фотолиз одной молекулы родопсина ведет к быстрому гидролизу 10^5 молекул cGMP.

37.17. Свет снижает содержание циклического GMP путем активации фосфодиэстеразы

Как показывают приведенные экспериментальные данные, возбудимость палочек зависит и от Ca^{2+}, и от cGMP. Взаимодействие этих агентов может играть решающую роль в зрительном возбуждении. Что касается молекулярного механизма индуцированного светом высвобождения Ca^{2+}

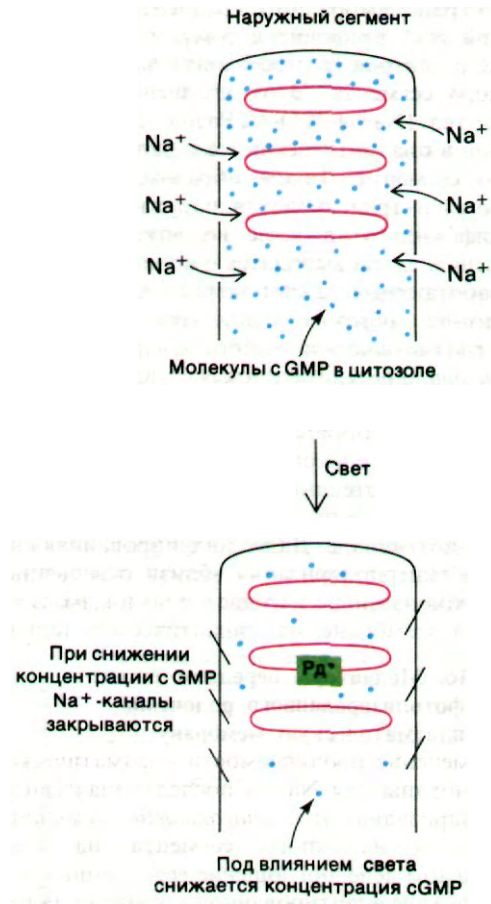


Рис. 37.32. Схематическое изображение гипотезы о роли cGMP как медиатора при зрительном возбуждении. Рд* - фотолизированный родопсин.

в цитозоль, то в этом вопросе еще много неясного. Что же касается регуляции светом содержания cGMP в наружных сегментах палочек, то в изучении этого вопроса в последние годы был достигнут значительный прогресс. На гуанилат-циклазу - фермент, катализирующий синтез **cGMP**, - свет, по-видимому, не оказывает существенного влияния:

$$GTP \xrightarrow{\text{Гуанилат-циклаза}} cGMP + PP_i.$$

Зато на фосфодиэстеразу, гидролизующую cGMP, свет оказывает поразительное по силе действие:

$$cGMP + H_2O \xrightarrow{\text{Фосфодиэстераза}} GMP + H^+.$$

В результате освещения активность фосфодиэстеразы возрастает в несколько сотен раз. Стимуляция этого фермента фотолизированным родопсином опосредована регуляторным белком, называемым *трансдуцином.* В темноте трансдуцин содержит прочно связанную молекулу GDP. При освещении фотолизированный родопсин образует комплекс с GDP-трансдуцином и катализирует обмен GDP на GTP (рис. 37.34). Возникающий комплекс GTP-трансдуцин активирует фосфодиэстеразу. *Крайне важное значение имеет то обстоятельство, что всего лишь одна фотолизированная молекула родопсина катализирует обмен GDP на GTP на нескольких сотнях молекул трансдуцина, что в свою очередь активирует сотни молекул фосфодиэстеразы.* Следовательно, если число оборотов фосфодиэстеразы составляет примерно 10^3 c^{-1}, то на свету в течение секунды гидролизуется уже более 10^5 молекул cGMP в расчете на одну молекулу фотолизированного родопсина. Система возвращается в исходное темновое состояние благодаря встроенной в нее GTP-азной активности. Присоединенный к трансдуцину GTP подвергается медленному гидролизу с образованием GDP-трансдуцина, неспособного активировать фосфодиэстеразу. Таким образом, весь этот цикл протекает за счет свободной энергии гидролиза GTP. Здесь мы видим пример того, как для усиления сигнала используется ~P. Описанный каскад реакций, регулирующих содержание cGMP (рис. 37.35), очень напоминает каскад реакций, опосредующих действие β-адренергических гормонов, в частности адреналина (разд. 35.4).

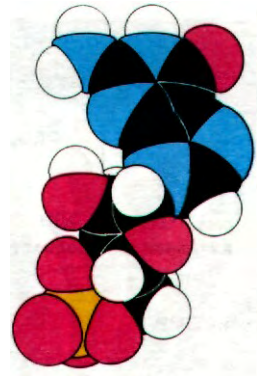


Рис. 37.33. Молекулярная модель циклического GMP.

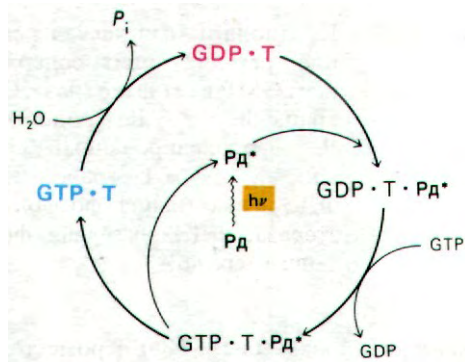


Рис. 37.34. Фотолизированный родопсин (Рд*) катализирует образование комплекса GTP с трансдуцином; этот комплекс в свою очередь активирует фосфодиэстеразу циклического GMP. [Fung B. K.-K., Stryer L., Proc. Nat. Acad, Sci., 77, 2503 (1980).]

37.18. Цветовое зрение опосредуется фоторецепторами трех типов

В 1802 г. Томас Юнг (Thomas Young) высказал предположение, что цветовое восприятие опосредовано *тремя основными рецепторами.* Как показали спектрофотометрические исследования интактной сетчатки, проведенные более 150 лет назад, в глазу *существует три типа клеток-колбочек, а именно клетки, поглощающие синий, зеленый и красный свет.* Для получения спектра поглощения этих трех фоторецепторных пигментов колбочки освещали лучом света

Рис. 37.35. Предполагаемый каскад реакций, регулирующих содержание cGMP в сетчатке глаза. Сокращения: Рд - родопсин, Рд* - фотолизированный родопсин, Т - трансдуцин, ФДЭн - неактивная фосфодиэстераза, ФДЭ - активная фосфодиэстераза.

диаметром I мкм (рис. 37.36). Кроме того, во многие колбочки вводили микроэлектроды. Спектры действия, основанные на гиперполяризации плазматических мембран, разделяются на три группы с максимумами соответственно в синей, зеленой и красной областях видимого света. У золотой рыбки максимумы поглощения трех цветовых рецепторов приходятся на 455, 530 и 625 нм, тогда как родопсин характеризуется максимумом 500 нм.

Хромофором в колбочках всех трех типов служит 11-цис-ретиналь. В отсутствие белка протонированное шиффово основание имеет максимум поглощения при 380 нм. Следовательно, различные группировки на опсине оказывают значительное действие на хромофорные свойства связанного 11-*цис*-ретиналя. Зависимость спектральных свойств этого хромофора от белкового окружения - частное проявление общего принципа, а именно *взаимодействие с белком оказывает модулирующее влияние на свойства простетической группы.* Другой пример тому - функционирование гема в качестве переносчика кислорода в гемоглобине, переносчика электронов в цитохроме *c* и катализатора в пероксидазе.

Большинство форм дальтонизма (цветовой слепоты) обусловлено сцепленной с полом рецессивной мутацией. Около 1% мужчин не видят красного цвета, около 2% - зеленого. Как показали спектральные исследования, проведенные на интактном глазе, у этих людей либо совсем отсутствуют фоторецепторные молекулы, воспринимающие красный или зеленый цвет, либо имеется измененный пигмент со сдвинутым спектром поглощения. Таким образом, *дальтонизм обусловлен отсутствием или дефектом одного из типов опсина в колбочках.*

37.19. 11-*цис*-ретиналь - хромофор всех известных органов зрения

Только у трех типов животных - моллюсков, членистоногих и позвоночных - глаза способны отображать образ предмета. Анатомически глаза этих трех типов устроены совершенно по-разному и, по-видимому, в ходе эволюции возникли независимо. Однако во всех трех случаях хромофором в фоторецепторных молекулах служит 11-*цис*-ретиналь. *Это поразительный пример конвергентной эволюции.* Что же такого особенного в 11-*цис*-ретинале? Во-первых, это соединение обладает интенсивной полосой поглощения, которая легко сдвигается в видимую область спектра. Во-вторых, под действием света 11-*цис*-ретиналь легко изомеризуется. Более того, в темноте скорость изомеризации очень низка. В-третьих, изомеризация вызывает большие изменения в структуре. В итоге поглощенный свет преобразуется в движение атомов такого масштаба, которое способно инициировать генерирование нервного импульса. Наконец, исходными предшественниками

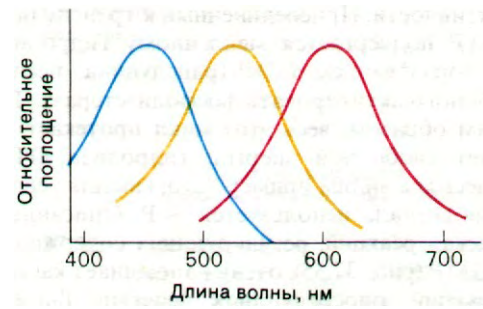


Рис. 37.36. Спектры поглощения трех цветовых рецепторов.

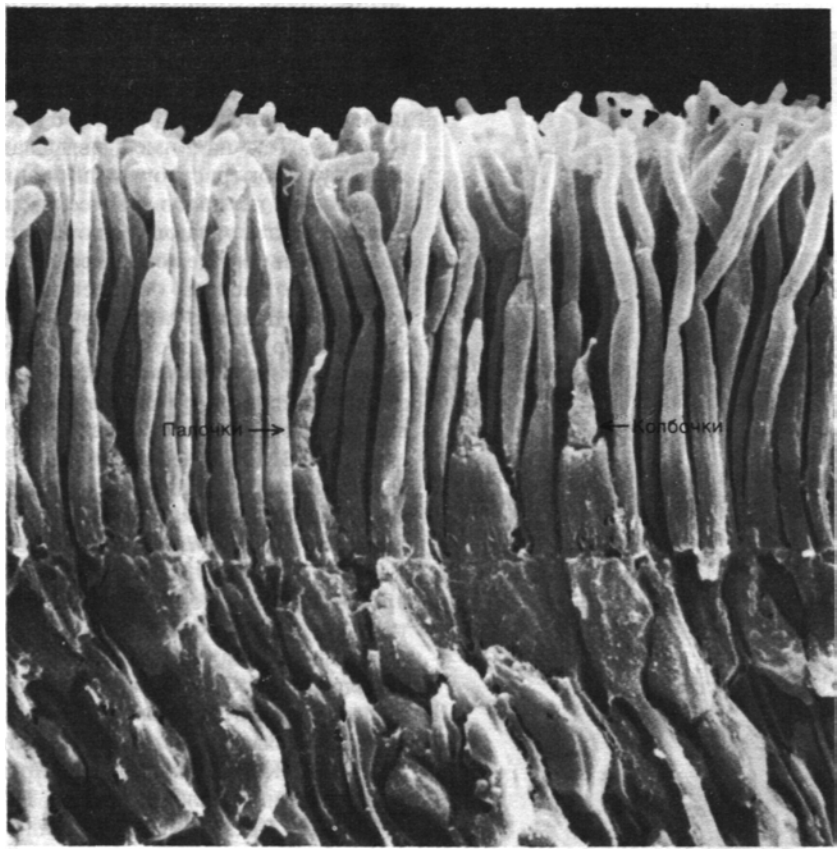


Рис. 37.37. Вид клеток - палочек и колбочек - фоторецепторного слоя сетчатки в сканирующем электронном микроскопе. (Печатается с любезного разрешения д-ра William Miller.)

11-*цис*-ретиналя являются каротины (разд. 20.27), очень широко распространенные в живой природе.

37.20. Хеморецепторы бактерий воспринимают специфические молекулы и передают сигналы на жгутики

В конце XIX в. немецкий ботаник Вильгельм Пфеффер (Wilhelm Pfeffer) продемонстрировал, что подвижные бактерии скапливаются вокруг отверстия тонкого капилляра, содержащего какой-нибудь аттрактант, например сахар (рис. 37.38). В случае же, когда капилляр содержит репеллент (обычно это вещество, повреждающее бактерии, или продукт их выделения), бактерии движутся прочь от капилляра. Такое направленное движение бактерий в сторону одних веществ и прочь от других называется *хемотаксисом*. В 60-х годах Джулиус Адлер (Julius Adler) начал изучать молекулярную основу хемотаксиса бактерий. Выполненные им, а также большим числом других ученых биохимические, генетические и структурные исследования раскрыли многие стороны этого процесса. Хемотаксис начинается с обнаружения химических соединений специфическими *хеморецепторами* на поверхности клетки. Информация от этих сенсоров передается *в систему преобразования,* где происходит анализ и интеграция большого числа стимулов. Далее сенсорная преобразующая система посылает сигналы к *моторам,* приводящим в движение *жгутики.* В зависимости от этих сигналов бактерия либо плавно передвигается по прямой, либо резко меняет направление движения.

У *E. coli* обнаружено около 20 различных хеморецепторов. Каждый из этих белков локализован или в плазматической мембране, или в периплазматическом пространстве. Хеморецептор содержит узнающий и сигна-

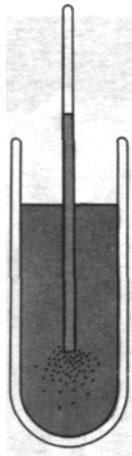


Рис. 37.38. Хемотаксис у бактерий. Бактерии движутся к капилляру, содержащему атрактант, например глюкозу.

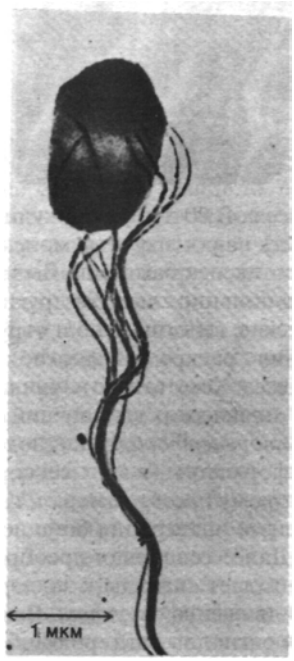


Рис. 37.39. Электронная микрофотография *S. typhimurium*. Хорошо видно, что жгутики собраны в пучок. (Печатается с любезного разрешения д-ра Daniel Koshland.)

лизирующий компоненты. В хеморецепторах, обеспечивающих положительный хемотаксис (привлечение), узнающий компонент оказался связывающим белком, участвующим в транспорте данного соединения в клетку. Так, например, связывающий галактозу белок (растворимый белок, локализованный в периплазматическом пространстве) служит и узнающим компонентом при положительном хемотаксисе на галактозу, и частью насоса, осуществляющего активный транспорт галактозы в клетку. Хеморецептор для глюкозы является также компонентом фосфотрансферазной системы, связанной с мембраной и обеспечивающей активное потребление этого сахара (разд. 36.12). На поверхности *E. coli* имеются хеморецепторы и для таких аттрактантов, как серин, цистеин, аланин, глицин. Хотя транспорт и хемотаксис тесно связаны между собой, однако хемотаксис не зависит от процессов транспорта. Так, некоторые мутанты, неспособные транспортировать определенные сахара или аминокислоты, сохраняют способность направленно двигаться к ним. Имеются также различные хеморецепторы, связанные с отрицательным хемотаксисом. Жирные кислоты, спирты, гидрофобные аминокислоты, индол, H^+ (pH < < 6,5), OH^- (pH > 7,5) и сульфиды отталкивают бактерии путем взаимодействия со специфическими хемосенсорами.

37.21. В основании бактериального жгутика находится вращающий его реверсивный «мотор»

Бактерии плывут благодаря вращению жгутиков, отходящих от поверхности клетки. Эти тонкие спиральные нити состоят из субъединиц массой 53 кДа, называемых *флагеллином*. У бактерии *E. coli* имеется около 6 жгутиков длиной 10 мкм и диаметром 150 А. Жгутики бактерий по сравнению со жгутиками и ресничками эукариот (разд. 34.18) имеют значительно меньшие размеры и проще устроены. Бактериальный жгутик сам по себе не может совершать активных волнообразных движений, так как в нем нет сократительного аппарата. Его вращает «мотор», расположенный в участке соединения жгутика с клеточной оболочкой. Выделение жгутиков, сохраняющих прикрепленную к ним базальную структуру, позволило изучить эти образования; оказалось, что они состоят из *нити, крючка* и *стержня*. У *E.coli* на стержень насажены 4 кольца. Наружное кольцо прикреплено к наруж-

ной мембране, а внутреннее - к плазматической мембране клеточной оболочки. Базальное тельце (рис. 37.40) заякоривает жгутик к клеточной оболочке и приводит его в движение. *Этот «мотор» работает за счет протонодвижущей силы, возникающей на плазматической мембране, а не за счет энергии гидролиза АТР.* Действительно, угловая скорость вращения прямо пропорциональна протонодвижущей силе. Загадочное свойство «мотора» состоит в том, что он может вращаться как по часовой стрелке, так и против нее.

Обычно отдельная бактерия *E. coli* спокойно плывет по прямой примерно одну секунду. За это время она проходит расстояние около 30 мкм, что примерно в 15 раз превышает ее собственную длину. Затем бактерия как бы кувыркается и резко меняет направление движения (рис. 37.41). Угол поворота в среднем обычно составляет 60°. От чего зависит, движется ли бактерия плавно или кувыркаясь? Оказалось, что при вращении жгутиков против часовой стрелки их спиральные нити организуются в стройный пучок, который и обеспечивает плавное передвижение клетки. Если же жгутики вращаются по часовой стрелке, то весь пучок рассыпается, каждая нить тянет в свою сторону и бактерия начинает кувыркаться.

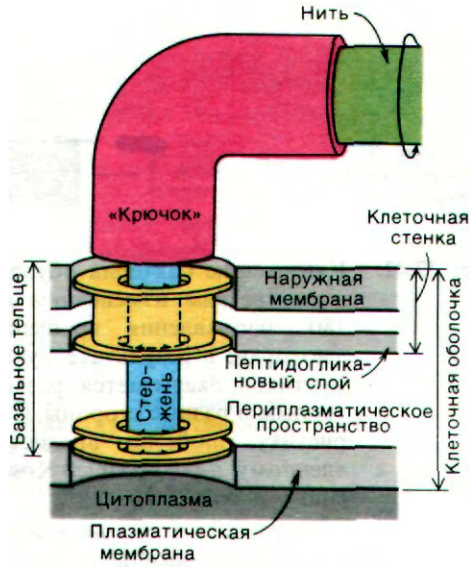


Рис. 37.40. Базальное тельце жгутика у *E. coli.* (Adler J., The sensing of chemicals by bacteria, 1976.)

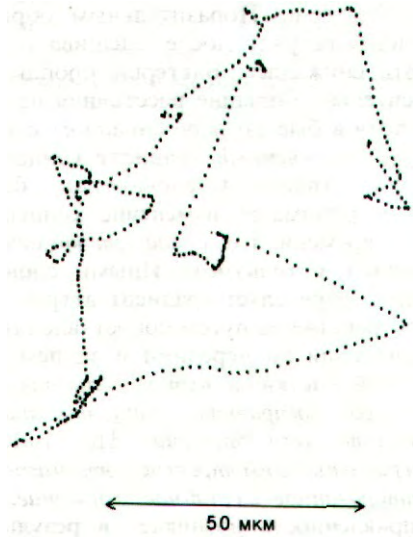


Рис. 37.41. Проекция пути *E. coli,* полученная в электронном микроскопе путем автоматическою слежения за перемещением бактерии в трех измерениях. Точки отделены друг от друга промежутком 80 мс. [Berg H.C., Nature, 254, 390 (1975).]

37.22. Бактерии различают временной градиент, а не одномоментный пространственный градиент концентраций

Регуляция частоты кувыркания занимает центральное место в хемотаксисе. Когда бактерия движется в направлении увеличения концентрации аттрактанта, кувыркание становится реже. Наоборот, при движении от аттрактанта бактерия кувыркается чаще. Репелленты оказывают противоположный эффект на частоту кувыркания бактерий. В результате при движении в сторону аттрактанта или прочь от репеллента бактерия плывет прямолинейно в течение большего промежутка времени, чем при движении в противоположном направлении. Кувыркание способствует выбору правильного направления.

Сравнивает ли бактерия концентрации аттрактанта на двух концах своей клетки, или же она сравнивает концентрации аттрактанта в два отдельных момента времени? Другими словами, является ли ее сенсорный механизм пространственным или временным? Дэниел Кошланд и Роберт Макнаб (Daniel Koshland, Robert

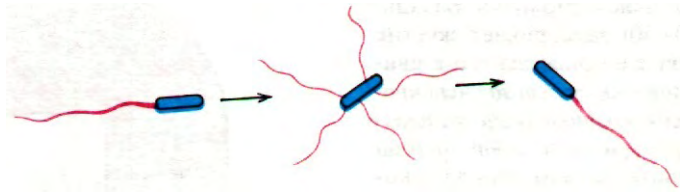


Рис. 37.42. Кувыркание бактерии обусловлено резким изменением на 180° направления вращения «мотора»; в результате пучок жгутиков оказывается разметанным в разные стороны. (По рисунку, любезно предоставленному д-ром Daniel Koshland.)

Macnab) нашли ответ на этот важный вопрос, поставив очень простой и остроумный опыт. Суспензию бактерий в среде, лишенной аттрактанта, быстро смешивали с раствором, содержащим аттрактант, и подсчитывали частоту кувырканий бактерий. Поразительным образом уже через секунду после смешивания эта частота снижалась. Бактерии проплывали относительно большие расстояния по прямой, хотя в быстро перемешанном растворе пространственный градиент концентрации отсутствовал. Следовательно, бактерии воспринимают изменение концентрации во времени, т.е. *обладают временным сенсорным механизмом*. Иными словами, бактерия определяет градиент аттрактанта в пространстве не путем сопоставления его концентрации на переднем и заднем концах своей клетки, а *путем сопоставления отдельных восприятий концентрации во времени по мере движения*. По существу, *бактериальный хемотраксис - это частично ориентированное случайное движение*. Целенаправленность возникает в результате *отбора* случайных направлений движения.

37.23. При бактериальном хемотаксисе передача информации обеспечивается метилированными белками

Реакция бактерии на тот или иной градиент концентрации аттрактанта не является строго определенной. Торможение кувыркания, обусловленное повышением концентрации аттрактанта, является временным. После определенного лаг-периода частота кувырканий возвращается к исходному уровню. По существу, при постоянном наличии аттрактанта бактерия теряет чувствительность к нему. Благодаря такой десенсибилизации, называемой *адаптацией*, бактерии способны воспринимать градиенты в широком диапазоне концентраций аттрактанта. Как указывалось ранее, аналогичным свойством обладает реакция палочек сетчатки на свет (рис. 37.30).

Генетические исследования хемотаксиса бактерий показали, что информация по крайней мере от 12 хеморецепторов передается через 3 белка-продукта генов *tsr, tar* и *trg* (рис. 37.43). Например, сигналы от рецепторов рибозы и галактозы поступают на белок trg. Указанные три белка подвергаются обратимому метилированию, и потому их называют *метил-акцепторные хемотаксические белки (МХБ)*. Несколько глутаматных боковых цепей в каждом из этих белков подвергается метилированию под действием метилтрансферазы, использующей S-аденозилметионин в качестве активированного донора метильных групп (рис. 37.44). Эти ковалентные модификации могут быть обращены специфической эстеразой. Уровень метилирования МХБ возрастает при воздействии аттрактантом и снижается при воздействии репеллентом. *По-видимому, адаптация опосредована степенью метилирования этих белков*.

Информация от указанных трех метил-акцепторных белков попадает далее на продукты генов *che*. Каким образом эти молекулы определяют направление вращения жгутиков, остается неизвестным. Однако теперь уже совершенно ясно, что у бактерий имеется примитивная сенсорная система, образованная продуктами примерно 30 генов, в которой обрабатывается и интегрируется информация относительно питательных веществ и ядов в окружающей бактерию среде. В сущности, основной вопрос для бактерии: «кувыркаться или не кувыркаться»?

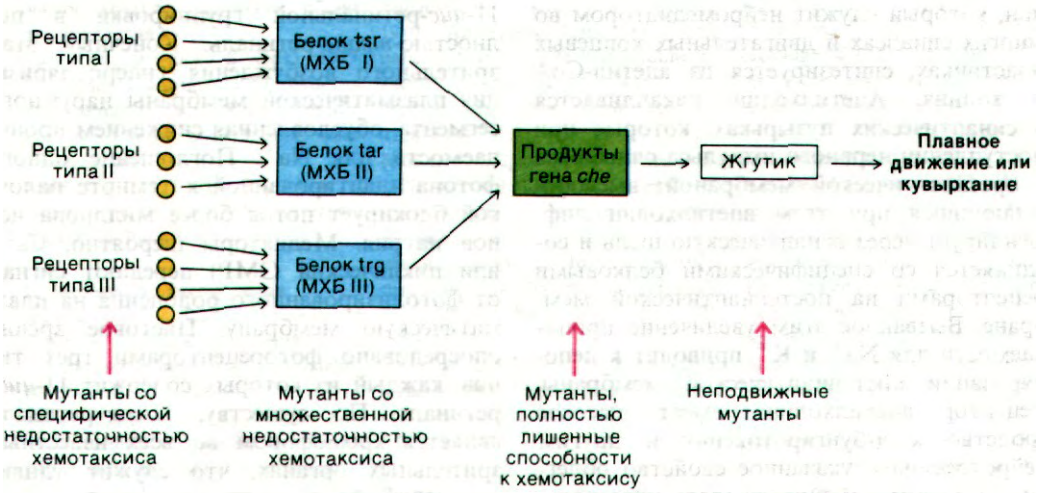
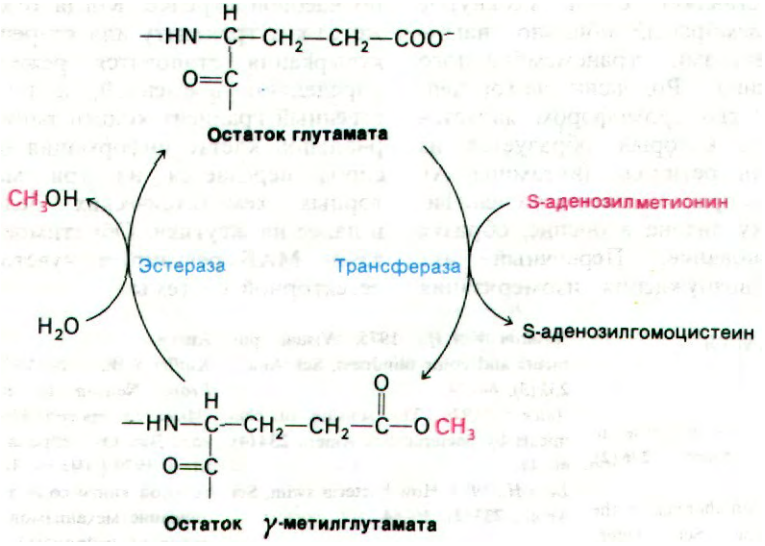


Рис. 37.43. Путь передачи информации при хемотаксисе бактерий. В нижней части схемы показаны выявленные типы мутантов. МХБ - акцептирующий метильную группу хемотаксический белок. [Springer R. S., Coy M.F., Adler J., Nature, 280, 280 (1979).]

Заключение

Потенциалы действия в мембранах аксонов нервных клеток опосредованы кратковременным изменением проницаемости для Na^+ и K^+. И Na^+-, и K^+-каналы регулируются трансмембранной разностью потенциалов. Тетродотоксин и сакситоксин - специфические блокаторы Na^+-каналов. Передача нервных импульсов через синапсы в большинстве случаев опосредована химическими медиаторами. Ацетилхо-



Рнс. 37.44. Обратимое метилирование метил-акцепторных хемотаксических белков.

лин, который служит нейромедиатором во многих синапсах и двигательных концевых пластинках, синтезируется из ацетил-CoA и холина. Ацетилхолин накапливается в синаптических пузырьках, которые при поступлении нервного импульса сливаются с пресинаптической мембраной; высвобождающийся при этом ацетилхолин диффундирует через синаптическую щель и соединяется со специфическими белковыми рецепторами на постсинаптической мембране. Вызванное этим увеличение проницаемости для Na^+ и K^+ приводит к деполяризации постсинаптической мембраны. Рецептор ацетилхолина имеет высокое сродство к α-бунгаротоксину и другим нейротоксинам; указанное свойство облегчило выделение и очистку этого интегрального мембранного белка. После гидролиза ацетилхолина под действием ацетилхолинэстеразы происходит реполяризация постсинаптической мембраны. Ингибиторами ацетилхолинэстеразы служат органические фосфаты, в частности ДИФФ, который может вызвать смерть вследствие паралича дыхания. К числу нейромедиаторов относятся также катехоламины (адреналин, норадреналин и дофамин) и γ-аминобутират (ГАМК).

Возбуждение палочек сетчаткой глаза может быть вызвано одним фотоном. В наружном сегменте палочки имеется около тысячи уложенных пачкой дисков, которые представляют собой замкнутые двуслойные мембраны, обильно нагруженные молекулами трансмембранного белка родопсина. Родопсин - фоторецепторный белок; его хромофором является 11-*цис*-ретиналь, который образуется из полностью-*транс*-ретинола (витамина А). 11-*цис*-ретиналъ присоединяется к специфическому остатку лизина в опсине, образуя шиффово основание. Первичный акт зрительного возбуждения - изомеризация 11-*цис*-ретинальной группировки в полностью-*транс*-ретиналь. Конечный этап зрительного возбуждения - гиперполяризация плазматической мембраны наружного сегмента, обусловленная снижением проницаемости для Na^+. Поглощение одного фотона адаптированной к темноте палочкой блокирует поток более миллиона ионов натрия. Медиаторы (вероятно, Ca^{2+} или циклический GMP) передают сигнал от фотолизированного родопсина на плазматическую мембрану. Цветовое зрение опосредовано фоторецепторами трех типов, каждый из которых содержит 11-*цис*-ретиналь. По существу, 11-*цис*-ретиналь является хромофором во всех известных зрительных органах, что служит удивительным примером конвергентной эволюции.

Подвижные бактерии способны к направленному движению в сторону аттрактанта (например, глюкозы) или от репеллента (например, жирных кислот). Сенсоры для хемотаксиса локализованы в периплазматическом пространстве или на плазматической мембране. Бактериальные жгутики вращаются с помощью «моторов», использующих энергию протонного градиента на плазматической мембране. Бактерии спокойно плывут в течение примерно секунды, затем кувыркаются вследствие перемены направления вращения жгутиков от движения против часовой стрелки к движению по часовой стрелке. Когда бактерия движется к аттрактанту или от репеллента, ее кувыркания становятся реже. Бактерии определяют временной, а не пространственный градиент концентрации. В бактериальной клетке информация от хемосенсоров передается на три метил-акцепторных хемотаксических белка (МХБ) и далее на жгутики. Обратимое метилирование МХБ регулирует чувствительность детекторной системы.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Lester H.A., 1977. The response to acetylcholine, Sci. Amer, 236 (2), 106-118.

Keynes R.D., 1979. Ion channels in the nerve-cell membrane, Sci. Amer., 240(3), 126-135.

Rushton W.A.H., 1975. Visual pigments and color blindness, Sci. Amer., 232(3), 64-74.

Adler J., 1976. The sensing of chemicals by bacteria, Sci. Amer., 234(4), 40-47.

Berg H., 1975. How bacteria swim, Sci. Amer., 233(2), 36-44.

Книги

Kuffler S.W., Nicholls J.G., 1976. From Neuron to Brain, Sinauer. [Имеется перевод: Куффлер С., Николе Дж. От нейрона к мозгу.- М.: Мир, 1979.] (Часть II этой замечательной книги содержит прекрасное описание механизмов передачи сигналов по нейронам.)

Katz B., 1966. Nerve, Muscle, and Synapse, McGraw-Hill. [Имеется перевод: Катц Б. Нерв, мышца и синапс.- М.: Мир, 1968.] (Велико-

лепное краткое изложение общих представлений.)
Cone R.A., Dowling J.E. (eds.), 1979. Membrane Transduction Mechanisms, Raven Press. (Сжатые и ясные описания различных возбудимых мембранных систем.)
Aidley D.J., 1977. The Physiology of Excitable Cells (2nd ed.), Liverpool University Press.

Проведение по аксону нерва

Hille B., 1978. Ionic channels in excitable membranes: current problems and biophysical approaches, Biophys. J., 22, 283-294.
Barchi R.L., Cohen S.A., Murphy L.E., 1980. Purification from rat sarcolemma of the saxitoxin-binding component of the excitable membrane sodium channel, Proc. Nat. Acad. Sci., 77, 1306-1310.
Morell P., Norton W.T., 1980. Myelin. Sci. Amer., 242(5), 88-118.
Ritchie J.M., Rogart R.B., 1977. Density of sodium channels in mammalian myelinated nerve fibers and nature of the axonal membrane under the myelin sheath, Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 211-215.

Синаптическая передача

Axelrod J., 1974. Neurotransmitters, Sci. Amer. 230(6), 59-71.
Heidmann T., Changeux J.-P., 1978. Structural and functional properties of the acetylcholine receptor protein in its purified and membrane-bound states, Ann. Rev. Biochem., 47, 317-357.
Raftery M.A., Hunkapiller M.W., Strader C.D., Hood L.E., 1980. Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits, Science, 208, 1454-1457.
Klymkowsky M.W., Stroud R.M., 1979. Immunospecific identification and three-dimensional structure of a membrane-bound acetylcholine receptor from *Torpedo California,* J. Mol. Biol, 128, 319-334.
Moore H.H., Hartig P.R., Raftery M. A., 1979, Correlation of polypeptide composition with functional events in acetylcholine receptor-enriched membranes from *Torpedo California,* Proc. Nat Acad. Sci., 76, 6265-6269.
Fulpius B.W., Miskin R., Reich E., 1980. Antibodies from myasthenic patients that compete with cholinergic agents for binding to nicotinic receptors, Proc. Nat. Acad. Sci., 77, 4326-4330.
Hess G.P., Lipkowitz S., Struve G.E., 1978. Acetylcholine-receptor mediated ion flux in electroplax membrane microsacs (vesicles): change in mechanism produced by asymmetrical distribution of sodium and potassium ions, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 1703-1707.
Anglister L., Silman L., 1978. Molecular structure of elongated forms of electric eel acetylcholinesterase, J. Mol. Biol 125, 293-311.

Зрение

Miller W.H., (ed.), 1981. Molecular Mechanisms of Photoreceptor Transduction, Academic Press.
Hagins W.A., 1979. Excitation in vertebrate photoreceptors. In: Schmitt F.O. and Worden F.G. (eds.), The Neurosciences: Fourth Study Program, pp. 183-191, MIT Press.
Hubbell W.L., Bownds M.D., 1979.Visual transduction in vertebrate photoreceptors, Ann. Rev. Neurosci., 2, 17-34.
Wald G., 1968. The molecular basis of visual excitation, Nature, 219, 800-807. (Нобелевская лекция; содержит интересное описание того, как был открыт первичный акт зрительного возбуждения.)
Young R.W., 1970. Visual cells, Sci. Amer., 223(4), 80-91.
Dawling J.E., 1966. Night blindness, Sci. Amer., 215(4), 78-84.
MacNichol E.F., Jr., 1964. Three-pigment color vision, Sci. Amer., 211(6), 48-56.
Yoshikami S., George J.S., Hagins W.-A., 1980. Light-induced calcium fluxes from outer segment layer of vertebrate retinas, Nature, 286, 395-398.
Pober J.S., Bitensky M.W., 1979. Light-regulated enzymes of vertebrate retinal rods, Advan. Cyclic Nucleotide Res., 11, 265-301.
Liebman P.A., Pugh E.N., Jr., 1979. The control of phosphodiesterase in rod disk membranes: kinetics, possible mechanisms, and significance for vision, Vision Res., 19, 375-380.
Fung B.K.-K., Stryer L., 1980. Photolyzed rhodopsin catalyzes the exchange of GTP for bound GDP in retinal rod outer segments, Proc. Nat. Acad. Sci., 77, 2500-2504.

Хемотаксис

Koshland D.E., Jr., 1979. A model regulatory system: bacterial chemotaxis, Physiol. Rev., 59, 811-862.
Macnab R., Koshland D.E., Jr., 1972. The gradient-sensing mchanism in bacterial chemotaxis, Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 2509-2512. (Эти опыты показали, что бактерии определяют временной, а не пространственный градиент.)
Springer M.S., Goy M.F., Adler J., 1979. Protein methylation in behavioural control mechanisms and in signal transduction, Nature, 280, 279-284.
Silverman M.R., Simon M.I., 1974. Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility, Nature, 249, 73-74.
Manson M.D., Tedesco P., Berg C., Harold F.M., van der Drift C., 1977. A protomotive force drives bacterial flagella, Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 3060-3064.
Manson M.D., Tedesco P.M., Berg H.C., 1980. Energetics of flagellar rotation in bacteria, J. Mol. Biol., 138, 541-561.
Khan S., Macnab R.M., 1980. Proton chemical potential, proton electrical potential and bacterial motility, J. Mol. Biol, 138, 599-614.
Stock J.B., Koshland D.E., Jr., 1978. A protein methylesterase involved in bacterial sensing, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 3659-3663.
Kondoh H., Ball C.B., Adler J., 1979. Identification of a methyl-accepting chemotaxis protein for the ribose and galactose chemoreceptors of *Escherichia coli,* Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 260-264,
Berg H.C, Purcell E.M., 1977. Physics of chemoreception, Biophys. J., 20, 193-219.

Ответы на вопросы и задачи

Глава 24

1. а) TTGATC; б) GTTCGA; в) ACGCGT; г) ATGGTA.
2. а) [T] + [C] = 0,46.
   б) [T] = 0,30; [C] = 0,24; [A] + [G] = 0,46.
3. $5{,}88 \cdot 10^3$ пар оснований.
4. Через 1,0 генерацию половина молекул будет $^{15}N—^{15}N$, а другая половина $^{14}N—^{14}N$. Через 2,0 поколения четверть всех молекул будет $^{15}N—^{15}N$, остальные три четверти $^{14}N—^{14}N$. Гибридные молекулы $^{14}N—^{15}N$ при консервативной репликации обнаруживаться не будут.
5. FAD, CoA, $NADP^+$.
6. ДНК-лигаза релаксирует сверхспирализованную ДНК, катализируя расщепление фосфодиэфирной связи в одной из цепей ДНК. Атакующая группа - AMP; она присоединяется к 5'-фосфорильной группе в месте расщепления. AMP необходим потому, что эта реакция представляет собой обращение заключительной стадии соединения различных кусков ДНК (см. рис. 24.32 в разд. 24.15).
7. 5'-GGCATAC-3'.

Глава 25

1. а) ДНК-полимераза I представляет собой одну-единственную полипептидную цепь, а РНК-полимераза имеет субъединичную структуру $\alpha_2\beta\beta'\sigma$.
   б) Предшественниками служат дезоксинуклеозидтрифосфаты, а не рибонуклеозидтрифосфаты.
   в) Направление синтеза для обоих ферментов 5'—>3'.
   г) ДНК-полимераза I обладает 5'—>3'- и 3'—> —>5'-экзонуклеазнымиактивностями, а РНК-полимераза - ни одной из них.
   д) ДНК-полимераза I осуществляет полуконсервативный синтез, а РНК-полимераза - консервативный.
   е) ДНК-полимеразе I необходима затравка, а РНК-полимеразе нет.
   ж) Движущей силой обеих реакций является гидролиз пирофосфата.
2. 5'-UAACGGUACGAU-3'.
3. 2'-OH группа в составе РНК действует в качестве внутримолекулярного катализатора. При щелочном гидролизе РНК образуется 2'3'-циклический промежуточный продукт.
4. Кордицепин обрывает синтез РНК. В цепи РНК, содержащей кордицепин, нет 3'-OH-группы.
5. а) pGCp, AGUp, ACp, Up, GUp и C.
   б) pGp, CAGp, UACUGp и UC
   в) pGp, CAp, Gp, UAp, CUGp и UC.
   г) **pGp**, CAp, Gp, Up, Ap, CUp и C.
6. UAGCCUGAAUp.

Глава 26

1. Leu-Pro-Ser-Asp-Trp-Met-.
2. Poly (Leu-Leu-Thr-Tyr).
3. а) Pro (CCC), Ser (UCC), Leu (CUC) и Phe (UUC). В другом случае последнее основание каждого из этих кодонов может быть U.
   б) Эти C —> U- мутации были вызваны азотистой кислотой.
4. а) Для этого понадобились бы две замены оснований.
   б) **Arg**, **Asn**, Gln, **Gln**, **Ile**, Met или **Thr**.
5. а) Нет, эта последовательность возникла в результате делеции первого основания приведенной ниже последовательности и вставки другого основания в конце.
   б) —AGUCCAUCACUUAAU—.
6. Они имеют следующие последовательности: Lys-стоп; -Met-Arg-; -Asn-Gln-.

Глава 27

1. а) **Нет**; б) **нет**; в) да.
2. В градиенте будет 4 полосы: легкая; тяжелая; полоса, соответствующая гибриду легкой 30S- и тяжелой 50S-субчастиц; полоса, соответствующая гибриду тяжелой 30S- и легкой 50S-субчастиц.
3. Расходуется примерно 799 богатых энергией фосфатных связей: 400 для активирования 200 аминокислот, 1 для инициации и 398 для образования 199 пептидных связей.
4. б), в) и е) - механизм 1-го типа; а), г) и д) - механизм 2-го типа.

5. Простейшее предположение состоит в том, что антикодон ССА триптофановой тРНК мутировал в UCA-кодон, комплементарный UGA. Однако изучение этой измененной тРНК привело к неожиданному результату. Ее антикодон остался неизменным. Вместо этого произошло замещение A на G в положении 24. Таким образом, остаток, расположенный на значительном расстоянии от антикодона в линейной последовательности, может влиять на точность узнавания кодона.

6. Один из подходов состоит в том, чтобы синтезировать тРНК, к которой присоединен реакционноспособный аналог аминокислоты. Например, бромацетилфенилаланил-тРНК служит реагентом для мечения по сродству Р-участка рибосом *E.coli.* См.статью: Oen H., Pellegrini M., Eilat D., Cantor C. R., Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 2799 (1973).

7. Последовательность GAGGU комплементарна последовательности пяти оснований на 3'-конце 16S-рРНК и расположена на расстоянии нескольких оснований в 5'-сторону от кодона AUG. Поэтому этот участок служит сигналом начала синтеза белка. Замещение G на A могло бы ослаблять взаимодействие этой мРНК с 16S-рРНК и снижать таким образом эффективность этой последовательности в качестве сигнала инициации. Действительно, эта мутация приводит к 10-кратному снижению скорости синтеза белка, кодируемого мРНК. См. статью, в которой подробнее обсуждаются свойства этой интересной мутации: Dunn J. J., Buzash-Pollert E., Studier F. W., Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 2741 (1978).

8. В обоих случаях используются реакции гидролиза: 3'—>5'-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы I и гидролиз ошибочного промежуточного продукта аминоацил—AMP под действием аминоацил-тРНК—синтетазы.

Глава 28

1. а) у i^--мутанта нет *lac*-репрессора. Поэтому такой мутант конститутивен в отношении синтеза белков *lac*-оперона.
б) Этот мутант конститутивен в отношении синтеза белков *trp*-оперона, так как в нем нет *trp*-репрессора.
в) В этом мутанте арабинозный оперон не экспрессируется, так как для активирования транскрипции необходима Р2-форма araC-белка.
г) Этот мутант обладает литическим действием, но не лизогенизирующим, так как он не способен синтезировать λ-репрессор.
д) Этот мутант обладает лизогенизирующим действием, но не способен к литическому действию, так как он не может синтезировать N-белок - позитивный регуляторный фактор транскрипции.

2. Одна из возможностей состоит в том, что в i^S-мутанте образуется измененный *lac*-репрессор, который почти не имеет сродства к индуктору, но проявляет нормальное сродство к оператору. Такой *lac*-репрессор будет связываться с оператором и блокировать транскрипцию даже в присутствии индуктора.

3. У этого мутанта *lac*-оператор изменен таким образом, что он не может связывать репрессор. Такая мутация обозначается O^C (от англ. operator constitutive - конститутивный оператор).

4. У этого мутанта, видимо, белок, связывающий циклический AMP (БАК), либо имеет измененную структуру (дефектен), либо совсем отсутствует.

5. Клетка *E. coli,* несущая профаг λ, содержит молекулы λ-репрессора, которые также блокируют транскрипцию предранних генов других частиц фага λ.

6. а) Трансляция транскрипта P_{RE} происходит в 5-10 раз быстрее, чем трансляция транскрипта P_{RM}, так как он содержит полноценный сигнал инициации синтеза белка (как это обсуждается в разд. 27.14).
б) Более эффективная трансляция транскрипта P_{RE} приводит к быстрому образованию большого количества молекул λ-репрессора, необходимых для установления лизогенного состояния. Обсуждение этого процесса см. в статье: Ptashe M., Backman K., Humagun Z., Jeffrey A., Maurer R., Meyer B., Sauer R.T., Science, 194, 156 (1976).

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Физические константы и перевод единиц из одной системы в другую

Числовые значения физических констант

Величина	Символ	Значение[1]
Атомная единица массы (дальтон)	а.е.м. (Да)	$1{,}66 \cdot 10^{-24}$ г
Число Авогадро	N	$6{,}022 \cdot 10^{23}$ моль$^{-1}$
Постоянная Больцмана	k	$1{,}381 \cdot 10^{-23}$ Дж $\cdot$ К$^{-1}$ $3{,}298 \cdot 10^{-24}$ кал $\cdot$ К$^{-1}$
Электрон-вольт	эВ	$1{,}602 \cdot 10^{-19}$ Дж $3{,}828 \cdot 10^{-20}$ кал
Число Фарадея	F	$9{,}649 \cdot 10^{4}$ Кл $\cdot$ моль$^{-1}$ $2{,}306 \cdot 10^{4}$ кал $\cdot$ В$^{-1}$ $\cdot$ экв$^{-1}$
Радиоактивность	Ки	$3{,}70 \cdot 10^{10}$ расп $\cdot$ с$^{-1}$
Универсальная газовая постоянная	R	$8{,}314$ Дж $\cdot$ моль$^{-1}$ $\cdot$ К$^{-1}$ $1{,}987$ кал $\cdot$ моль$^{-1}$ $\cdot$ К$^{-1}$
Постоянная Планка	h	$6{,}626 \cdot 10^{-34}$ Дж $\cdot$ с $1{,}584 \cdot 10^{-34}$ кал $\cdot$ с
Скорость света в вакууме	c	$2{,}998 \cdot 10^{10}$ см $\cdot$ с$^{-1}$

[1] Использованные сокращения: В - вольт; г - грамм; Дж - джоуль; К - кельвин; кал - калория; Кл - кулон; с - секунда; см - сантиметр; экв - эквивалент.

Математические постоянные

$n = 3{,}14159$
$e = 2{,}71828$
$\ln x = 2{,}303 \lg x$

Соотношение единиц измерения

Физические величины	Единицы измерения
Длина	1 см $= 10^{-2}$ м $= 10$ мм $= 10^{4}$ мкм $= 10^{7}$ нм $= 10^{8}$ А $= 0{,}3937$ дюйма
Масса	1 г $= 10^{-3}$ кг $= 10^{3}$ мг $= 10^{6}$ мкг $= 3{,}527 \cdot 10^{-2}$ унций
Объем	1 см^3 $= 10^{-6}$ м^3 $= 10^{3}$ мм^3 1 мл $=$ 1 см^3 $= 10^{-3}$ л $= 10^{3}$ мкл 1 см^3 $= 6{,}1 \cdot 10^{-2}$ дюйм^3 $= 3{,}53 \cdot 10^{-5}$ фут^3
Температура	К $=$ °С $+ 273{,}15$ °С $= 5/9$(°F - 32)
Энергия	1 Дж $= 10^{7}$ эрг $= 0{,}239$ кал $=$ 1 Вт $\cdot$ с
Давление	1 торр $=$ 1 мм рт. ст. (0°С) $= 1{,}333 \cdot 10^{2}$ Н/м^2 $= 1{,}333 \cdot 10^{2}$ Па $= 1{,}316 \cdot 10^{-3}$ атм

Приставки для образования кратных и дольных единиц измерений

Приставка	Обозначение		Численный эквивалент приставки
	русскими буквами	латинскими или греческими буквами	
Кило	к	k	10^{3}
Гекто	г	h	10^{2}
Дека	да	da	10^{1}
Деци	д	d	10^{-1}
Санти	с	c	10^{-2}
Милли	М	m	10^{-3}
Микро	мк	μ	10^{-6}
Нано	н	n	10^{-9}
Пико	п	p	10^{-12}

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Порядковые номера и атомные массы элементов

Название	Знак	Порядковый номер	Атомная масса
Азот	N	7	14,01
Актиний	Ac	89	227,03
Алюминий	Al	13	26,98
Америций	Am	95	243,06
Аргон	Ar	18	39,95
Астат	At	85	210,99
Барий	Ba	56	137,34
Бериллий	Be	4	9,01
Берклий	Bk	97	247,07
Бор	B	5	10,81
Бром	Br	35	79,90
Ванадий	V	23	50,94
Висмут	Bi	83	208,97
Водород	H	1	1,01
Вольфрам	W	74	183,85
Гадолиний	Gd	64	157,25
Галлий	Ga	31	69,72
Гафний	Hf	72	178,49
Гелий	He	2	4,00
Германий	Ge	32	72,59
Гольмий	Ho	67	164,93
Диспрозий	Dy	66	162,50
Европий	Eu	63	151,96
Железо	Fe	26	55,85
Золото	Au	79	196,97
Индий	In	49	114,82
Иод	I	53	126,90
Иридий	Ir	77	192,22
Иттербий	Yb	70	173,04
Иттрий	Y	39	88,91
Кадмий	Cd	48	112,40
Калий	K	19	39,10
Калифорний	Cf	98	249,07
Кальций	Ca	20	40,08
Кислород	O	8	16,00
Кобальт	Co	27	58,93
Кремний	Si	14	28,09
Криптон	Kr	36	83,80
Ксенон	Xe	54	131,30
Курчатовий	Kh	104	260
Кюрий	Cm	96	245,07
Лантан	La	57	138,91
Литий	Li	3	6,94
Лоуренсий	Lr	103	256
Лютеций	Lu	71	174,97
Магний	Mg	12	24,31
Марганец	Mn	25	54,94
Медь	Cu	29	63,55
Менделевий	Md	101	255,09
Молибден	Mo	42	95,94
Мышьяк	As	33	74,92
Натрий	Na	11	22,99
Неодим	Nd	60	144,24
Неон	Ne	10	20,18
Нептуний	Np	93	237,05
Никель	Ni	28	58,71
Ниобий	Nb	41	92,91
Нобелий	No	102	255
Олово	Sn	50	118,69
Осмий	Os	76	190,20
Палладий	Pd	46	106,40
Платина	Pt	78	195,09
Плутоний	Pu	94	242,06
Полоний	Po	84	208,98
Празеодим	Pr	59	140,91
Прометий	Pm	61	145
Протактиний	Pa	91	231,04
Радий	Ra	88	226,03
Радон	Rn	86	222,02
Рений	Re	75	186,20

Название	Знак	Порядковый номер	Атомная масса	Название	Знак	Порядковый номер	Атомная масса
Родий	Rh	45	102,91	Титан	Ti	22	47,90
Ртуть	Hg	80	200,59	Торий	Th	90	232,04
Рубидий	Rb	37	85,47	Туллий	Tm	69	168,93
Рутений	Ru	44	101,07	Углерод	C	6	12,01
Самарий	Sm	62	150,40	Уран	U	92	238,03
Свинец	Pb	82	207,20	Фермий	Fm	100	257,08
Селен	Se	34	78,96	Фосфор	P	15	30,97
Сера	S	16	32,06	Франций	Fr	87	223,02
Серебро	Ag	47	107,87	Фтор	F	9	18,99
Скандий	Sc	21	44,96	Хлор	Cl	17	35,45
Стронций	Sr	38	87,62	Хром	Cr	24	52,00
Сурьма	Sb	51	121,75	Цезий	Cs	55	132,91
Таллий	Tl	81	204,37	Церий	Ce	58	140,12
Тантал	Ta	73	180,95	Цинк	Zn	30	65,37
Теллур	Te	52	127,60	Цирконий	Zr	40	91,22
Тербий	Tb	65	158,93	Эйнштейний	Es	99	254,09
Технеций	Tc	43	98.91	Эрбий	Er	68	167,26

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Значение pK' для ряда кислот

Кислота	pK' (при 25°C)	Кислота	pK' (при 25°C)
Аммония ион	9,25		
Аскорбиновая,			
pK_1'	4,10		
pK_2'	11,79		
Ацетоуксусная	3,58		
Бензойная	4,20	Пиридиния ион	5,25
Вода	14,0	Пирофосфорная, pK_1'	0,85
Глицин, pK_1'	2,35	pK_2'	1,49
pK_2'	9,78	pK_3'	5,77
Имидазолия ион	6,95	pK_4'	8,22
Какодиловая	6,19	Триметиламмония ион	9,79
Лимонная, pK_1'	3,14	Трис(гидроксиметил)-аминометан	8,08
pK_2'	4,77		
pK_3'	6,39	Угольная, pK_1'	6,35
Малеиновая, pK_1'	1,83	pK_2'	10,33
pK_2'	6,07	Уксусная	4,76
n-Масляная	4,81	Фенол	9,89
Молочная	3,86	Фосфорная, pK_1'	2,12
Муравьиная	3,75	pK_2'	7,21
		pK_3'	12,67
		Этиламмония ион	10,81
		Яблочная, pK_1'	3,40
		pK_2'	5,11
		Янтарная, pK_1'	4,21
		pK_2'	5,64

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Стандартные длины связей

Связь	Структура	Длина, А
C—H	R_2CH_2	1,07
	Ароматическая	1,08
	RCH_3	1,10
C—C	Углеводородная	1,54
	Ароматическая	1,40
C=C	Этилен	1,33
C≡C	Ацетилен	1,20
C—N	RNH_2	1,47
	O=C—N	1,34
C—O	Спирт	1,43
	Эфир	1,36
C=O	Альдегид	1,22
	Амид	1,24
C—S	R_2S	1,82
N—H	Амид	0,99
O—H	Спирт	0,97
O—O	O_2	1,21
P—O	Эфир	1,56
S—H	Тиол	1,33
S—S	Дисульфид	2,05

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Стандартные сокращения, принятые в биохимии

АКТГ (ACTH)	адренокортикотропный гормон
АПБ(ACP)	ацилпереносящий белок
АТРаза	аденозинтрифосфатаза
ДИФФ (DIPF)	диизопропилфторфосфат
ДНК (DNA)	дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	комплементарная ДНК
ДНКаза (DNase)	дезоксирибонуклеаза
ДНФ(DNP)	динитрофенол
РНК (RNA)	рибонуклеиновая кислота
мРНК (mRNA)	информационная (матричная) РНК
рРНК (rRNA)	рибосомная РНК
тРНК (tRNA)	транспортная РНК
РНКаза (RNase)	рибонуклеаза
A	аденин
ACP (АПБ)	ацилпереносящий белок
ACTH (АКТГ)	адренокортикотропный гормон
ADP	а денозиндифосфат
Ala	аланин
AMP	аденозинмонофосфат
cAMP	циклический AMP
Arg	аргинин
Asn	аспарагин
Asp	аспартат
ATP	аденозинтрифосфат
ATPase	аденозинтрифосфатаза
C	цитозин
CDP	цитидиндифосфат
CMP	цитидинмонофосфат
CTP	цитидинтрифосфат
CoA	кофермент A
CoQ	кофермент Q (убихинон)
Cys	цистеин
d	2'-дезоксирибо
DIPF (ДИФФ)	диизопропилфторфосфат
DNA (ДНК)	дезоксирибонуклеиновая кислота
cDNA(кДНК)	комплементарная ДНК
DNase (ДНКаза)	дезоксирибонуклеаза
DNP(ДНФ)	динитрофенол
DPN^+	*см.* NAD^+
DPNH	*см.* NADH
FAD	флавинадениндинуклеотид (окисленная форма)
$FADH_2$	флавинадениндинуклеотид (восстановленная форма)
fMet	формилметионин
FMN	флавинмононуклеотид (окисленная форма)
$FMNH_2$	флавинмононуклеотид (восстановленная форма)
G	гуанин
GDP	гуанозиндифосфат
Gln	глутамин
Glu	глутамат
Gly	глицин
GMP	гуанозинмонофосфат
GTP	гуанозинтрифосфат
Hb	гемоглобин
HbCO	карбоксигемоглобин
HbO_2	оксигемоглобин
His	гистидин
Hyp	гидроксипролин
IgG	иммуноглобин G
Ile	изолейцин
ITP	инозинтрифосфат
Leu	лейцин
Lys	лизин
Mb	миоглобин
MbO_2	оксимиоглобин
Met	метионин
MetHb	метгемоглобин
NAD^+	никотинамидадениндинуклеотид (окисленная форма)
NADH	никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма)

$NADP^+$	никотинамидадениндинуклеотидфосфат (окисленная форма)
NADPH	никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленная форма)
Phe	фенилаланин
P_i	неорганический ортофосфат
PP_i	неорганический пирофосфат
Pro	пролин
RNA (РНК)	рибонуклеиновая кислота
mRNA (мРНК)	информационная (матричная) РНК
rRNA (рРНК)	рибосомная РНК
tRNA (тРНК)	транспортная РНК
RNase (РНКаза)	рибонуклеаза
Ser	серин
T	тимин
Thr	треонин
TPN^+	*см.* $NADP^+$
TPNH	*см.* NADPH
Trp	триптофан
TTP	тимидинтрифосфат
Tyr	тирозин
U	урацил
UDP	уридиндифосфат
UMP	уридинмонофосфат
UTP	уридинтрифосфат
Val	валин

Именной указатель

Ануин Н. (Unwin N.) I: 222
Анфинсен Х. (Anfinsen C.) I: 38, 40; III: 240
Арбер В. (Arber W.) III: 38, 240
Арнольд У. (Arnold W.) II: 185
Арнон Д. (Arnon D.) II: 188
Аткинсон Д. (Atkinson D.) II: 20
Аттер М. (Utter M.) II: 107
Афзелиус Б. (Afzelius B.) III: 278

Балтимор Д. (Baltimore D.) III: 180
Баркрофт Дж. (Barcroft J.) I: 73
Бенеш Р. и Рут (Benesch R., Ruth) I: 73
Бензер С (Benzer S.) III: 77
Беннет К. (Bennett C.) III: 249
Бенс-Джонс Г. (Bence-Jones H.) III: 242
Берг П. (Berg P.) II: 141
Бергстром С. (Bergstrom S.) III: 297
Бернал Дж. (Bernal J.) I: 63; III: 292
Бернет М. (Burnet M.) III: 240, 255, 257
Бернстил М. (Birnstiel M.) III: 141
Блобел М. (Blobel G.) III: 158
Блоу Д. (Blow D.) I: 154
Блох К. (Bloch K.) II: 212
Бор К. (Bohr Ch.) I: 72
Браун Д. (Brown D.) III: 141
Браун М, (Brown M.) II: 218
Браунли Дж. (Brownlee G.) III: 158
Брауншгейн А. (Braunstein A.) II: 162
Браше Ж. (Brachet J.) III: 46
Бреннер С. (Brenner S.) III: 49, 68
Бриттен Р. (Britten R.) III: 138
Брэгг Л. (Bragg L.) I: 64
Бухнер Г (Buchner H.) II: 23
Бухнер Э. (Buchner E.) II: 23
Бьюкенен Дж. (Buchanan J.) II: 257
Бэйлисс У. (Bayliss W.) III: 282

Вагелос П. (Vagelos P.) II: 151
Валентайн Р. (Valentine R.) III: 239
Ван-Нил К. (Van Niel C.) II: 186
Варбург О. (Warburg O.) II: 24, 96
Вейн Дж. (Vane J.) III: 298
Вейсс С. (Weiss S.) III: 52
Веннесланд Б. (Vennesland B.) II: 62
Вестхеймер Ф. (Westheimer F.) II: 62
Виноград Дж. (Vinograd J.) III: 20
Вуд В. (Wood W.) III: 173

Габер Ф. (Haber F.) II: 230
Гарден А. (Harden A.) II: 23
Гатано С. (Hatano S.) III: 272
Гауровиц Ф. (Haurowitz F.) I: 76
Гаффрон Г. (Gaffron H.) II: 185
Геллерт М. (Gellert M.) III: 33
Генземяйт К. (Henseleit K.) II: 164
Герарт Дж. (Gerhart J.) II: 264
Гиббонс Я. (Gibbons J.) III: 278
Гиббс Дж. (Gibbs J.W.) II: 7
Гилберт У. (Gilbert W.) III: 39, 115
Гирке Э. фон (von Gierke E.) II: 129
Голдстайн Дж. (Goldstein J.) II: 218
Голл Дж. (Gall J.) III: 140
Грин Д. (Green D.) II: 143
Грин М. (Green M.) III: 239
Гринберг Дж. (Greenberg G.) II: 257
Гриффит Ф. (Griffith F.) III: 7
Гросс Э. (Gross E.) I: 30
Грюнберг-Манаго М. (Grunberg-Manago M.) III: 70
Гулемин Р. (Guillemin R.) III: 295
Гэррод А. (Garrod A.) II: 176

Дальтон Дж. (Dalton J.) I: 25
Де-Ланж Р. (De-Lange R.) III: 129
Де Лусия Паула (DeLucia Paula) III: 27
Диккенс Ф. (Dickens F.) II: 96
Диккерсон Р. (Dickerson R.) II: 88
Динцис Г (Dintzis H.) III: 98
Доти П. (Doty P.) III: 50
Дрейер У. (DreyerW.) III: 249
Дэвис Д. (Davies D.) III: 244

Ерне Н. (Jerne N.) III: 240, 255

Жакоб Ф. (Jacob F.) III: 48, 49, 113, 114

Зимм Б. (Zimm B.) III: 18

Ингенхауз Я. (Ingenhousz J.) II: 182
Ингольд К. (Ingold C.) II: 69
Ингрем В. (Ingram V.) I: 92
Йонг У. (Young W.) II: 23; III: 347

Кабат Э. (Kabat E.) III: 243
Кальвин М. (Calvin M.) II: 193
Кан Р. (Cahn R.) II: 69
Капоши М. (Kaposi M.) III: 36
Карновский М. (Karnovsky M.) III: 322
Картье Ж. (Cartier J.) I: 186
Каспар Д. (Caspar D.) III: 168
Касперсон Т. (Caspersson T.) III: 46
Катц Б. (Katz B.) III: 331
Кватрекасас П. (Cuatrecasas P.) III: 293
Кейзер А. (Kaiser A.) III: 122
Кейлин Д. (Keilin D.) II: 76
Кельвин (Kelvin) II: 62
Кендрью Дж. (Kendrew J.) I: 50
Кеннеди Ю. (Kennedy E.) II: 141; III: 313
Келлер Дж. (Koller G.) III: 241
Клуг А. (Klug A.) III: 91, 168
Кнооп Ф. (Knoop F.) II: 66, 141
Коллман Дж. (Collman J.) I: 59
Корана Г. (Khorana H.) III: 72, 74
Кори Г. (Cori G.) II: 24, 115, 129; III: 282
Кори К. (Cori C.) II: 24, 115, 128; III: 282
Кори Р. (Corey R.) III: 33
Корнберг А. (Kornberg A.) III: 21, 22
Корнберг Р. (Kornberg R.) I: 223; III: 129
Кошланд Д. (Koshland D.) I: 121, 148; II: 38; III: 351
Краут Дж. (Kraut J.) I: 160
Кребс Г. (Krebs H.) II: 18, 66, 164
Кребс Э. (Krebs E.) III: 287
Крик Ф. (Crick F.) III: 11, 67, 68, 168
Кэмпбелл А. (Campbell A.) III: 185
Кэрнс Дж. (Cairns J.) III: 27
Кюне Ф. (Kuhne W.) II: 24

Леви А. (Loewy A.) III: 272
Леви-Монтальчини Рита (Levi-Montalcini R.) III: 300
Ледер Ф. (Leder P.) III: 251
Ледерберг Дж. (Lederberg J.) III: 202, 224, 225
Лелуа Л. (Leloir L.) II: 120
Леман Р. (Lehman R.) III: 26
Ленинджер А. (Lehninger A.) II: 141
Лёвенштейн В. (Loewenstein W.) III: 322
Ли Ч. (Li C.) III: 296
Линд Дж. (Lind J.) I: 186
Линен Ф. (Lynen F.) II: 143, 174
Липкин Д. (Lipkin D.) III: 284

Липман Ф. (Lipmann F.) II: 17; III: 109
Липском У. (Lipscomb W.) I: 145; II: 266
Листер Дж. (Lister J.) I: 167
Локк (Lock) III: 257
Любимова М.Н. III: 263

Майер Ю. (Mayer J.) II: 183
Мак-Карти М. (McCarty M.) III: 8, 10
Мак-Коннелл Г. (McConnell H. M.) I: 224
Мак-Леод К. (Mac Leod C.) III: 8. 10
Макнаб Р. (Macnab R.) III: 351, 352
Марголиаш Э. (Margoliash E.) II: 90
Мармур Дж. (Marmur J.) III: 50
Мартиус К. (Martius C) II: 66
Мейергоф О. (Meyerhof O.) II: 24
Ментен М. (Menten M.) I: 111
Мерфи В. (Murphy W.) II: 170
Меселсон М. (Meselson M.) III: 15, 49
Миллер О. (Miller O.) III: 141
Милстайн Ц. (Milstein C) III: 158, 241
Мино F. (Minot G.) II: 170
Митчелл П. (Mitchell P.) II: 79, 91; III: 314
Михаэлис Л. (Michaelis L.) I: 109, 111
Моно Ж. (Monod J.) I: 118; III: 48, 49, 113, 114
Мюллер П. (Mueller P.) I: 207
Мюллер-Хилл Б. (Muller-Hill B.) III: 115
Мэксэм А. (Maxam A.) III: 39

Натанс Д. (Nathans D.) III: 38
Нахмансон Д. (Nachmansohn D.) III: 334
Нидергерке Р. (Niedergerke R.) III: 261
Николсон Г. (Nicolson G.) I: 218
Ниренберг М. (Nirenberg M.) III: 69, 70, 72, 75
Нойберг К. (Neuberg C.) II: 24
Номура М. (Nomura M.) III: 98

Огстон А. (Ogston A.) II: 61
Оказаки Р. (Okazaki R.) III: 31
Осава Ф. (Osawa F.) III: 272
Отто Дж. (Otto J.) I: 173
Очоа С. (Ochoa S.) II: 143; III: 70

Палад Г. (Palade G.) II: 72
Пардью М. (Pardue M.) III: 140
Парк Дж. (Park J.) III: 225
Парнас Я. (Parnus J.) II: 24
Пастер Л. (Pasteur L.) II: 23, 284
Перутц М. (Perutz M.) I: 50, 63
Полинг Л. (Pauling L.) I: 33, 90, 101, 142; II: 240
Поляк Р. (Poljak R.) III: 244
Портер Р. (Porter R.) III: 237, 239
Прелог В. (Prelog V.) II: 69

Пристли Дж. (Priestley J.) II: 181
Пташне М. (Ptashne M.) III: 122
Пфеффер В. (Pfeffer W.) III: 349

Раус П. (Rous P.) III: 186
Ревель Ж.-П. (Revel J.-P.) III: 322
Рейхард П. (Reichard P.) II: 267
Рич А. (Rich A.) III: 12, 91
Роузман С. (Roseman S.) III: 314
Рудин Д. (Rudin D.) I: 107
Рэкер Э. (Racker E.) И: 83, 96, 201

Сабатини Д. (Sabatini D.) III: 158
Сазерленд Э. (Sutherland E.) III: 282
Сайденем Т. (Sydenham T.) II: 274
Сатир П. (Satir P.) III: 278
Сведберг Т. (Svedberg T.) III: 48
Сент-Дьёрдьи А. (Szent-Gyorgyi Albert) II: 66; III: 265
Сент-Дьёрдьи Э. (Szent-Gyorgyi Andrew) III: 264
Сиденхем Т. (Sydenham T.) III: 295
Сингер Дж. (Singer J.) I: 218
Синсхеймер Р. (Sinsheimer R.) III: 16
Скоу Й. (Skou J.) III: 306
Слэк Х. (Slack C.R.) II: 198
Смит Г. (Smith H.) III: 38
Снелл Э. (Snell E.) II: 162
Соссюр Т. де (de Sassure T.) II: 182
Спигелман С. (Spiegelman S.) III: 50, 183
Стайнер Д. (Steiner D.) III: 291
Сталь Ф. (Stahl F.) III: 15
Старлинг Э. (Starling E.) III: 282
Стеккениус В. (Stoeckenius W.) II: 200, 201
Стромингер Дж. (Strominger J.) III: 225
Строуд Р. (Stroud R.) I: 162
Сэнгер Ф. (Sanger R.) I: 26, 29; III: 41, 290

Татум Э. (Tatum) III: 202
Тейлор Э. (Taylor E.) III: 265
Темин Х. (Temin H.) III: 189, 190
Тонегава С. (Tonegawa S.) III: 249, 251
Торричелли Э. (Torricelli E.) I: 70
Тэлмедж Д. (Talmage D.) III: 255

Уайман Дж. (Wyman J.) I: 118
Уилкинс М. (Wilkins M.) III: 11
Уилсон И. (Wilson I.) III: 336
Уильяме Р. (Williams R.) III: 169
Уитеринг У. (Withering W.) III: 310
Уиткоп Б. (Witkop B.) I: 30
Уолд Дж. (Wald G.) III: 343
Уолш Д. (Walsh D.) III: 287

Уотсон Дж. (Watson J.) III: 11, 32, 81, 168
Уэбстер Д. (Webster D.) II: 225-226
Уэйкил С. (Wakil S.) II: 149

Филлипс Д. (Phillips D.) I: 133
Фишер Э. (Fischer E.) I: 110; II: 123
Флеминг А. (Fleming A.) I: 132; III: 224
Флори Х. (Florey H.) III: 224
Франклин Розалинда (Franklin Rosalind) III: 11
Френкел-Конрат Х. (Fraenkel-Conrat H.) III: 169
Фуллер Б. (Fuller B.) III: 168

Хайяши О. (Hayaishi O.) II: 175
Хаксли Э. (Huxley A.) III: 261, 266, 327
Холдейн Дж. (Haldane J.B.S.) I: 173
Харрисон С. (Harrison S.) III: 176
Хендерсон Р. (Henderson R.) I: 222
Хенсон Дж. (Hanson J.) III: 261
Хеппель Л. (Heppel L.) III: 284
Херик Дж. (Herrick J.) I: 88
Херриот Р. (Herriott R.) III: 9
Херши А. (Hershey A.) III: 9, 10
Хехт З. (Hecht S.) III: 340
Хёрвиц Дж. (Hurwitz J.) III: 52
Хилл Р. (Hill R.) II: 187
Ходжкин А. (Hodgkin A.) III: 327
Ходжкин Д. (Hodgkin D.) I: 63; II: 170; III: 292
Холдейн Дж. (Haldane J. B. S.) I: 173
Холли Р. (Holley R.) III: 90
Холлидей Р. (Holliday R.) III: 201
Хорекер Б. (Horecker B.) II: 96
Худ Л. (Hood L.) III: 251
Хьюбер Р. (Huber R.) I: 162
Хэч М. (Hatch M.D.) II: 198

Цвет М. (Tswett M.) I: 93
Цукеркандл Э. (Zuckerkandl E.) I: 101

ЧансБ. (Chance B.) II: 81
Чаргафф Э. (Chargaff E.) III: 14
Чейз Марта (Chase Martha) III: 9, 10
Чейн Э. (Chain E.) III: 224

Шанже Ж.-П. (Changeux J.-P.) I: 118
Шахман Х. (Schachman H.) II: 264
Шемин Д. (Shemin D.) II: 248
Шестранд Ф. (Sjostrand F.) II: 72

Эбаши С. (Ebashi S.) III: 269
Эдгар Р. (Edgar R.) III: 173
Эдельман Дж. (Edelman G.) III: 238, 244
Эдман П. (Edman P.) I: 30
Эдмундсон А. (Edmundson A.) III: 248
Эйвери О. (Avery O.) III: 8, 10

Эймс Б. (Ames B.) III: 82
Эмбден Г. (Embden G.) II: 24
Эмерсон Р. (Emerson R.) II: 185, 187
Энгельгардт В. А, III: 263
Эфрусси Б. (Ephrussi B.) III: 137
Ягендорф А. (Jagendorf A.) II: 191
Янофски Ч. (Janofsky C) III: 77, 118
Ярдецкий О. (Jardetzky O.) III: 309

Указатель латинских названий

Amantia phalloides III: 146, 147
Bacillus brevis III: 107
Bombix mori III: 144
Clostridium histolyticum I: 191
Corynebacterium diphteriae III: 155
Dichapetalum cymosum II: 63
Drosophila melanogaster III: 80, 128, 143, 144
- *virilis* III: 140
Electrophorus III: 332
Escherichia coli III: 19, 22, 34, 51-55, 60, 116
- ДНК III: 28-31
- конъюгация III: 197
- мРНК III: 47
- оболочка III: 226
- рибосомы III: 97
- тРНК III: 48
- хеморецепторы HI: 349
- электрофорез белков I: 26
-pol-мутанты III: 27, 28
Haemophilus influenzae III: 38, 178
Halobacterium halobium I: 221
Micrococcus lysodeikticus I: 132
Penicillum III: 224
Physarum polycephalum III: 64, 272
Rhizobium III: 230
Rhizopus I: 166
Salmonella III: 82-84
- *typhimurium* III: 226, 227, 229
-- жгутики III: 350
Streptomyces III: 61
Strongylocentrotus purpuratus III: 144
Torpedo III: 332
Vibrio cholerae III: 289
Xenopus III: 151
- *laevis* III: 143

Предметный указатель

Абеквоза III: 228
Авидин II: 114
Агглютинин I: 214
Адаптация при зрении III: 345
-- хемотаксисе III: 352
Адапторная молекула III: 67-68
Аденилат *см.* Аденозин-5'-монофосфат
Аденилатдезаминаза II: 273
Аденилаткиназа II: 10, 264; III: 271
Аденилаттрансфераза II: 247; III: 285-287
Аденилатциклаза в жировой ткани II: 140
- и обмен гликогена II: 123
- стимуляция холерным токсином III: 289
Аденилилтрансфераза II: 246-247
Аденилирование II: 246-247, 283
Аденилосукцинат II: 260
Аденин II: 255-257; III: 6, 13, 14
- таутомерные формы III: 81, 82
Аденин-фосфорибозилтрансфераза II: 261
S-Аденозилгомоцистеин II: 238
S-Аденозилметионин II: 204, 207, 237-239; III: 60, 150, 171, 352
Аденозин II: 255-257
Аденозиндифосфат (ADP) II: 10, II, 256
Аденозиндифосфат, рибозилирование III: 156, 289
Аденозин-3',5'-монофосфат (циклический AMP, cAMP) III: 116-117
- в жировых клетках II: 140
- и действие гормонов III: 282-289
-- обмен гликогена II: 122-123, 125-128
Аденозин-5'-монофосфат (AMP) II: 10, 256, 259-260
Аденозинтрифосфат (ATP) II: 10-13, 141, 255, 256, 280-281
- в мышцах III: 270-271
-- ресничках III: 278, 279
- образование при гликолизе II: 31-33
--- окислении жирных кислот II: 144-145
--- окислительном фосфорилировании II: 71, 78-81, 83-84
--- фотосинтезе II: 190-194, 200
- при генетической рекомбинации III: 200
-- репликации ДНК III: 32-33
-- транспорте ионов III: 270-271, 304, 306-308, 311-312
Аденозинтрифосфатаза *см.* ATPаза
Адреналин II: 122-123, 248, 292; III: 282, 284, 339
Адреногенитальный синдром *см.* Вирилизм
Адренодоксин II: 222
Адренокортикотропный гормон (АКТГ) I: 47; II: 222
β-Адренэргические рецепторы III: 286
Азасерин II: 279
Азид II: 81
Азотистая кислота III: 81-82
Азотистые основания. *См. также* Пиримидины, Пурины
-- номенклатура II: 255-257; III: 6, 24
-- пары III: 11-15, 19-20
Азотистый баланс II: 233
Азотфиксация II: 230-232
Аконитаза II: 50, 63-64
Аконитат II: 50, 51
Акридины III: 82
Аксонема III: 277-279
Аксоны III: 300, 327
АКТГ *см.* Адренокортикотропный гормон
Активный транспорт III: 304-306
- центр I: 109-110
-- карбоксипептидазы A I: 146
-- лизоцима I: 134, 140
-- рибонуклеазы S I: 17
-- химотрипсина I: 157-159
Актин III: 261, 263, 265-266, 269-276
Актиномицин III: 61-64, 116
Актомиозин III: 265
Акцелерин I: 175
Алании I: 20; II: 167, 233-234
Аланин-аминотрансфераза II: 160
Аланиновая тРНК III: 94-95
Алкаптонурия II: 176
Алкенильный эфир глицерола II: 208
Алкогольдегидрогеназа II: 36
Аллантоиказа II: 275
Аллантоин II: 273, 275
Аллантоиновая кислота (аллантоат) II: 273, 275
Аллантоиназа II: 275
Аллельное исключение III: 252
D-Аллоза II: 46
Аллоксан III: 295
Аллолактоза III: 112
Аллопуринол II: 276
Аллостерические белки I: 69, 75, 77, 84

-взаимодействия I: 106, 118-122; II: 282-283
- свойства гемоглобинов I: 69-87
- ферменты I: 118-122; II: 34-35, 123-125, 264-268
Аллостерический активатор II: 120
Аллостерическое ингибирование I: 116, 120
- различие III: 242
Альдимины II: 162, 163
Альдозы II: 24, 29, 46
Альдолаза II: 30, 38-39
- при фотосинтезе II: 195-196
Альдоль-гистидиновый комплекс I: 190
Альдольная конденсация I: 190
Альдольное расщепление II: 27
D-Альтроза II: 46
α-Аманитин III: 146-147
Аметоптерин II: 270; III: 189
Амидная связь I: 23
Амилозы II: 131
Амилопектин II: 131
Аминоакрилат II: 163
Аминоациладенилат III: 88
Аминоацил-AMP III: 89
Аминоацил-тРНК III: 87-89, 103
- гибридная III: 93
Аминоацил-тРНК-синтетаза III: 88-90, 100
Аминоацильный участок (А-участок) III: 102-104
γ-Аминобутират *см.* γ-Аминомасляная кислота
Аминобутират-глутамат-аминотрансфераза III: 340
5-Аминоимидазолрибонуклеотид II: 259
Аминокислотные остатки I: 81-83
-- в гемоглобине I: 65-66
- последовательности в адренокортикотропном гормоне I: 47
--- белках I: 26-27, 37-39, 63; III: 7
--- гемоглобине I: 63-65
--- гликофорине I: 216
--- иммуноглобулинах III: 240-244
--- инсулине I: 27
--- лизоциме I: 35
--- миоглобине I: 56, 63
--- рибонуклеазе I: 39
--- эпидермальном факторе роста III: 301
-- гомологичные участки I: 63; III: 244
Аминокислоты I; 19-23, 32; II: 160-179, 247-248; III: 68-69, 75, 87-89
- в гистонах III: 129
- D-изомеры I: 20; III: 219
- N-концевые I: 28-30
- незаменимые II: 230, 233-234, 239
- способность к образованию водородных связей I: 123-124
- транспорт III: 312-313
- *pK* I: 45, 46
δ-Аминолевулинат II: 249
δ-Аминолевулинат-синтетаза II: 249
γ-Аминомасляная кислота (ГАМК) II: 274; III: 338-340
Аминопептидаза III: 105
β-Аминопропионитрил I: 190
Аминоптерин II: 270
2-Аминопурин III: 81
Аминосахара I: 193
Амитал II: 81
Аммоний (NH_4^+) II: 160-166, 230-232
Аммоникс I: 210
Аммонотелические организмы II: 164
Амниоцентез II: 212
Амплификация II: 128; III: 141, 145
Амфипатические соединения 1: 204
Анаболизм II: 205
Анаболические пути II: 21
Аналоги оснований III: 24, 81, 83
Анаплеротические реакции II: 64, 108
Ангстрем I: 34
Андерсена болезнь II: 130
Андрогены II: 221-224
Андростендион II: 223, 224
Анемия I: 88-90; II: 103, 170, 172
Анионный канал I: 213
Антибиотики III: 304, 316-320. *См. также* по названиям
- как ингибиторы транскрипции III: 61-62
- устойчивость к ним III: 205-206
Антибиотики-каналообразователи III: 317
Антибиотики-переносчики III: 316, 318
Антигемофильный фактор I: 173
Антиген (иммуноген) III: 234
Т-Антиген III: 151
Антиген-антитело, комплексы III: 238, 256
Антигенная детерминанта III: 234
Антиген-связывающие участки антител III: 236-237, 240, 245-246
Антидот III: 336-337
Антикоагулянты I: 170, 176
Антикодон III: 68, 91-95
Антикодоновая петля III: 91, 93
Антимицин А II: 80, 81
Антипараллельный слой II: 37
Антипорт III: 312-313
Антисыворотка III: 236
Антитела *см.* Иммуноглобулины
Антитромбин I: 175
Антранилат II: 241, 242
АПБ *см.* Ацилпереносящий белок
Апомиоглобин I: 62-63
Апопротеин I: 48
Арабиноза II: 46; III: 117
Арабинозный оперон III: 117-119
Арабино-изомераза III: 116, 117
Арахидат II: 139
Аргиназа II: 164
Аргинин I: 21, 22; II: 169
- в цикле мочевины II: 164—165
Аргининосукциназа II: 165
Аргининосукцинат II: 164—165
Аргининосукцинат-синтетаза II: 164
Арсенат II: 41
1-Арсено-3-фосфоглицерат II: 41
Асимметрия биологических мембран I: 200, 214, 219
- системы транспорта Na^+ и K^+ I: 219

Аскорбиновая кислота (витамин С) I: 181, 186, 187
Аспарагин I: 21, 22; II: 168, 234
Аспартат I: 21, 22; II: 233-234
- в биосинтезе пиримидинов II: 262
-- цикле мочевины II: 164—165
- трансаминирование II: 168-169
Аспартат-карбомоилтрансфераза II: 262
Аспартат-транскарбамоилаза (АТКаза) II: 264-266
β-Аспартилфосфат III: 307
Аспирин (ацетилсалицилат) III: 298, 299
Атеросклероз II: 220
Атрактилозид II: 86
Аттенуация III: 59, 119-120
Аутоиммунное заболевание III: 338
Афинная метка I: 157-158; III: 243
- хроматография I: 25-26; III: 236
Ацетальдегид II: 36
Ацетат I: 10; III: 334
N-Ацетилгалактозамин I: 214
N-Ацетилглюкозамин (NAG) I: 133, 137, 138, 214
- в клеточной стенке бактерий III: 219, 221
N-Ацетилглюкозамин-1-фосфат III: 221
Ацетилкоэнзим А *см.* Ацетил-СоА
Ацетиллипоамид II: 57
N-Ацетилмурамовая кислота (NAM) I: 133
- в клеточной стенке бактерий III: 219-223
N-Ацетилнейраминат II: 209, 210
Ацетил-трансацетилаза II: 151, 152
Ацетилфосфат II: 12
Ацетилхолин III: 330-334
Ацетилхолиновый рецептор III: 332-338
Ацетилхолинэстераза I: 114, 157; III: 330, 334-336, 338
Ацетильные группы II: 16
Ацетил-СоА II: 5, 16, 49, 287-288
- и жирные кислоты II: 143-144, 149
-- синтез ацетилхолина III: 330
- образование из лейцина II: 174
--- пирувата II: 49
-- при диабете III: 294
Ацетил-СоА—карбоксилаза II: 149-151, 286
Ацетоацетат II: 147-148, 174, 294
- при диабете III: 294
Ацетоацетил-АПБ II: 152
Ацетоацетил-СоА II: 147, 166
Ацетон II: 147; III: 194
Ациладенилат I: 141-142, 161
Ацилирование I: 156, 159
Ацилкарнитин II: 143
Ацил-кофермент А *см.* Ацил-СоА
Ацилпереносящий белок (АПБ) II: 151
N-Ацилсфингозин II: 208
Ацил-АМР II: 142
Ацил-СоА I: 35-36; II: 142-145
Ацил-СоА-дегидрогеназа II: 144
Ацил-СоА: карнитин-ацилтрансфераза II: 143
Ацил-СоА-синтетаза II: 141
Ацил-СоА-холестерол-ацилтрансфераза II: 220
АМР *см.* Аденозин-5'-монофосфат
АТ-пары III: 13, 20
АТР *см.* Аденозинтрифосфат
АТР-ADP-транслоказа II: 86
АТРаза в митохондриях II: 84
-- мышцах III: 264-266
- и транспорт ионов III: 306-313

БАК *см.* Белковый активатор катаболизма
Бактерии, ДНК в них III: 19, 20, 100, 218-232
- конъюгация III: 197, 201-205
- пространственный градиент III: 351-352
- хеморецепторы III: 349-353
- экспрессия эукариотических генов III: 212-213
Бактериородопсин I: 221-222; II: 200-201
Бактериофаги *см.* Фаги
Бактериохлорофилл II: 189
Бацитрацин III: 161
Белки I: 18-47; III: 154-159. *См. также* по названиям
- вирусов III: 179-180, 183
- вспомогательные (морфопоэтические) III: 173-174
- дестабилизирующие спираль ДНК III: 33
- ковалентная модификация I: 105-106; II: 283
- кодируемые вирусом SV-40 III: 188
- конформация I: 32-34, 38, 40-42, 120
- мембран I: 208-218; III: 156-158, 326
- митохондрий III: 159
- при талассемии III: 154
- рекомбинации (*recA, recB, recC, recBC*) III: 200
- рибосом III: 158
- секреторные III: 156-158
- синтез III: 76, 87-110. *См. также* Трансляция, Рибосомы
-- в бактериях III: 100-102
- содержащие негемовое железо II: 32, 75. *См. также* Железопротеины
Белки соединительной ткани I: 179-198
- фагов III: 124, 183
- хлоропластов III: 159
Белки-антидетерминаторы III: 59
Белковый активатор катаболизма (БАК) III: 116, 117
Cro-белок III: 124
Fe-S-белок *см.* Железосеропротеины
G-белок III: 286-287
HPr-белок III: 315
Mo-Fe-белок II: 231
recA-белок III: .200
rep-белок (хеликаза) III: 33
ρ-белок (ρ-фактор) III: 58-60
Белые мышцы III: 271
Бензилпенициллин III: 224, 226
Бензойная кислота II: 141
Бенс-Джонса белок III: 242
Бери-бери II: 60
Бесклеточная система III: 70, 151, 155
Бетаин II: 238
Бехангат II: 139
Библиотека ДНК III: 211-212
Бикарбонат *см.* Диоксид углерода

Биливердин II: 251
Билирубин II: 251-252
Бимолекулярный слой (бислой) I: 205-208
Биологические процессы, их скорость I: 12
Биотин II: 107-108, 114, 149-150
Биотинкарбоксилаза II: 150
Биполярные ионы (цвиттерионы) I: 19
1,3-Бисфосфоглицерат (1,3-БФГ) I: 15; II: 41-44
2,3-Бисфосфоглицерат (2,3-БФГ) I: 73-75, 80-82; II: 41-44
Бисфосфоглицератмутаза I: 115; II: 42
Болезнь накопления гликогена II: 131
Бонгкрековая кислота II: 86
Бора эффект I: 72-73, 81-84
Борсодержащие кислоты I: 178
Брожение II: 23
5-Бромдезоксиуридин III: 135
Бромистый циан I: 30, 32
5-Бромурацил III: 81
α-Бунгаротоксин III: 333
Бутирил-АПБ II: 152, 153
Буферная емкость раствора I: 46
БФГ *см.* Бифосфоглицерат

Варфарин I: 170, 171
Ведущая нить III: 31
Векторы для клонирования ДНК III: 207, 210-211
Вернике - Корсакова синдром II: 102
«Ветвящий» фермент II: 121
Вирилизм II: 224-225
Вирус бешенства III: 181
- везикулярного стоматита III: 180-181
- кустистой карликовости томата III: 176
- папилломы III: 188
- полиомиелита III: 179-182
- полиомы III: 186-189
- саркомы *Рауса* III: 179, 186
- табачной мозаики (ВТМ) III: 167-173
--- мутации III: 77
- ящура III: 179
- Qβ III: 182, 183
- R17 III: 182, 183
- SV-40 III: 55, 186-189
-- генетическая карта III: 189
Вирусы, оболочка III: 167-168
- перекрывающиеся гены III: 78, 183
- РНК-содержащие III: 178-179, 189-190
- самосборка III: 167-194
Витамин А (полностью-*транс*-ретинол) II: 17, 18; III: 342
- B_1 (тиамин) II: 60
- B_2 II: 17
- B_6 (пиридоксин) II: 17, 124, 161
- B_{12} (кобаламин) II: 170-172, 238
- D II: 223-224
- D_2 II: 18
Витамин D_3 II: 223-224
- E II: 18
- K I: 170; III: 248
- K_1 II: 17, 18; III: 248
- K_2 I: 170; II: 226
Витамины II: 17-18. *См. также* по названиям
Вода I: 10, 125-127
Водород, стереоспецифический перенос II: 62-63
Водородные связи I: 122-124
-- необычные III: 92
Водоросли II: 193
Воротный ток III: 330
Времена биологических процессов I: 11-12
Временной градиент III: 351-352
Вставочные последовательности (вставки, интроны, IS-элементы) III: 78-83, 150-151, 196, 202, 206-207
ВТМ *см.* Вирус табачной мозаики
Вторичная структура I: 37
Вырожденность кода III: 69, 76
-- гипотеза качания III: 94—95
Высокий потенциал переноса фосфатной группы II: 11
Высокоэнергетические связи II: 11-12

Газовая гангрена I: 191
Галактиол II: 135
Галактоза I: 106; II: 46, 134-135; III: 112
Галактоземия II: 135
β-Галактозидаза III: 112-113
Галактозидпермеаза III: 112
Галактозилтрансфераза II: 132
Галактозо-1-фосфат II: 134
Галактозо-1-фосфат-уридилтрансфераза II: 134, 135
Галактокиназа II: 134
Галактолипиды II: 184
Галобактерии II: 200-201
Галотан II: 111
Ганглиозиды I: 204; II: 208-211
Гаптен III: 234-236, 240
Гаптен-антитело, комплекс III: 236-237
Гаптенная детерминанта III: 234
Гексадеканоат II: 139
Гекса-NAG III: 137-138
Гексозомонофосфатный путь *см.* Пентозофосфатный путь
Гексозы I: 25, 46, 47
Гексокиназа I: 18; II: 28, 29, 38, 43
Геликаза III: 33
Гель-фильтрация I: 25
Гель-электрофорез *см.* Электрофорез в полиакриламидном геле
Гем I: 48-50; II: 249, 250
- в миоглобине I: 56-60
- связывание с CO_2 I: 60-61
Гем а II: 77
Гем-гем, взаимодействие I: 72
Гемоглобин I: 48-87
- гены III: 154-155
- мутации I: 98-100; III: 77. *См. также* Серповидноклеточная анемия, Талассемия
- плода I: 75; III: 154

Гемоглобин A, A_2 I: 63
- F I: 63
- M I: 99
- S I: 90-98
- α- и β-цепи I: 63-65, 75
Гем-оксигеназа II: 251
Геморрагия I: 170, 175
Гемофилия I: 172-173
Ген. *См. также* Гены
- овальальбумина III: 79, 81
- фиброина III: 144-145
- *cro* III: 123, 124
- *i* III: 113-114
- *ilv* III: 29
- *J* III: 251-252
- *src* III: 191-192
- *trp* III: 30
Генетическая рекомбинация III: 196-216
Генетический код III: 68-69, 75-77
Геномы, конструирование III: 196, 207-215
- области гомологии III: 191, 200
Гены. *См. также* по названиям
- антител III: 248-250
- вирусов III: 120, 121
- влияние стероидных гормонов III: 298-299
- гемоглобинов III: 154—155. *См. также* Молекулярные болезни
- гистонов III: 143, 144
- клонирование III: 196, 207-209, 214
- коллинеарность III: 77-80
- лимфоцитов III: 249-250
- перекрывающиеся III: 77-79, 182-183
- перестройки III: 196-216
- разорванное строение III: 78-80, 145-146, 150, 151
- рибосомных РНК III: 140-142
- уникальные III: 144—145
- фага Т4 III: 172-173
- экспрессия III: 112-125
- эукариот III: 78, 211-213
Гепарансульфат I: 193
Гепарин I: 176, 195
Гептануклеотиды III: 140
Гептозы II: 25; III: 228
Геранилпирофосфат II: 214-216, 227
Гетерогенная ядерная РНК (гяРНК) III: 148-149
Гетерокарион I: 215-217
Гетеротропные эффекты I: 120
Гиалуроновая кислота I: 194, 195
Гибридизация (гибриды) ДНК и РНК III: 29, 30, 50-52
- in situ III: 140
Гибридомы III: 240-241
Гидразин I: 47; III: 40
Гидрид-ион II: 39-40
Гидроксиапатит (фосфат кальция) I: 189; III: 138
3-Гидроксиацил-АПБ-дегидратаза II: 152
L-Гидроксиацил-СоА II: 144
D-3-Гидроксибутират II: 147
Гидроксикобаламин II: 171
21-Гидроксилаза I: 181; II: 224-225
Гидроксиламин I: 32; III: 82, 336
Гидроксилизин I: 180, 182, 192
3-Гидрокси-3-метилглутарил-СоА II: 147, 174, 213
3-Гидрокси-3-метилглутарил-СоА - редуктаза II: 213, 217
Гидроксиметилирование III: 173
5-Гидроксиметилцитозин III: 173
17α-Гидроксипрогестерон II: 224
4-Гидроксипролин I: 22, 180-181, 192
5-Гидрокситриптамин II: 248
Гидроксифенилпируват II: 175, 176, 240
n-Гидроксифенилпируват-гидроксилаза II: 175
Гидроксиэтиламинопирофосфат II: 56
Гидролиз I: 104
Гидрофильные группы I: 204
Гидрофобные взаимодействия I: 127, 205-206
- группы I: 204
Гипераммонемия II: 166
Гипервариабельные участки III: 243, 246
Гипертермия II: 111
Гиперхолестеролемия II: 219-220
Гиперхромизм III: 19
Гипогликемия III: 290
Гипоксантин II: 259, 273, 276; III: 24, 82
Гипоксантин-гуанин - фосфорибозилтрансфераза II: 261, 275-276
Гипохромизм III: 138
Гирке болезнь II: 129-130
Гистамин I: 60; II: 248
Гистидин I: 21, 22, 56; II: 242, 244
- превращение в глутамат II: 168-169
- участие в катализе I: 157-159
Гистидиновые кодоны III: 120
- опероны III: 122
Гистидинол II: 244
Гистидинолфосфат II: 244
Гистоны III: 79, 127-130, 132-133, 136-137, 143
Гладкий эндоплазматический ретикулум II: 282
Гликоген II: 115-137
Гликоген-синтаза II: 121, 126
Гликоген-фосфорилаза (фосфорилазы α и β) II: 116, 117, 123-125
Гликозаминогликаны I: 193, 195; III: 163
Гликозидные связи I: 133; II: 117-118, 255
Гликозилирование III: 163
Гликолат II: 199
Гликолиз (гликолитический путь) II: 23, 29-45, 283
- наследственные нарушения II: 43-44
N-Гликолилнейраминат II: 209
Гликолипиды I: 203-205, 214, 216; III: 163
Гликопептид-транспептидаза III: 223
Гликопротеины I: 214-216; III: 159-163. *См. также* Коллаген
Гликофорин А I: 213-214
Гликохолат II: 215
Глиоксилат II: 199, 274
D-Глицеральдегид II: 25, 46
Глицеральдегид-3-фосфат II: 30-32, 97, 98
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа II: 31,

39-41, 195
Глицерол I: 201-203
- как предшественник тейхоевой кислоты III: 223
- образование из триацилглицеролов II: 140
Глицерол-3-фосфат I: 201; II: 11, 12, 84-85
- как предшественник фосфатидных кислот II: 205
- образование из глицерола II: 140-141
Глицерол-фосфатацилтрансфераза II: 205
Глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа II: 84—85
Глицеролфосфатный челночный механизм II: 85
Глицилтирозин I: 146-148
Глицил-тРНК III: 222
Глицин I: 20; II: 235, 257; III: 71, 72, 97
- в коллагене I: 180, 184
- превращения II: 167
- при синтезе порфирина II: 248
Глицинамидрибонуклеотид II: 258
Глицин-синтаза II: 235
β-Глобин III: 78, 79, 151, 154
Глобиновые гены III: 78, 79, 154
Глутамат (глутаминовая кислота) I: 21, 22; II: 167-169, 232-234
превращение в ГАМК III: 340
- распад II: 160-161
Глутаматаминотрансфераза II: 160
Глутаматдегидрогеназа II: 160-161, 169, 232-233
Глутамат-декарбоксилаза III: 339, 340
Глутамат-синтетаза II: 233
Глутамин I: 21, 22; II: 169, 232-233
- в фиброине I: 169
- как донор азота II; 245
Глутаминаза II: 169
Глутамин-синтетаза II: 232-233, 245-247
Глутатион II: 103-104, 268
Глутатионредуктаза II: 103, 105, 268
Глюкогенные аминокислоты II: 167
Глюкагон II: 122-123, 291-293; III: 282, 284, 286
Глюкоза I: 10; II: 24-27, 46, 105-106, 285; III: 112, 113
- в крови II: 292-293
- ингибирование синтеза циклического AMP III: 116
- и образование ATP II: 86
- транспорт III: 312-313
Глюкозилирование III: 173
Глюкозо-1,6-бисфосфат II: 119
Глюкозо-1-фосфат II: 12, 116-122, 285
Глюкозо-6-фосфат II: 12, 28-30, 286
-- в глюконеогенезе II: 107
-- обмене гликогена II: 118-120, 122
-- пентозо-фосфатном пути II: 95-100
Глюкозо-6-фосфатаза II: 119-120, 129, 130
Глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназа II: 96, 103-105, 285
Глюкокортикоиды II: 221-222; III: 299
Глюконеогенез II: 105-110, 112, 287
- влияние инсулина III: 290
α-D-Глюкопираноза II: 25
Глюкуронат II: 252; III: 7
Глюкуронид билирубина II: 252
Голодание II: 293; III: 288
Голофермент III: 54, 55
Гольджи аппарат III: 161-163
Гомогентизат II: 175
Гомогентизатоксидаза II: 175
Гомополипептиды III: 74
Гомотропные эффекты I: 120
Гомоцистеин II: 238-239
Гомоцистеин-метилтрансфераза II: 238
Гормональные регуляторы метаболизма II: 291
Гормон-рецепторный комплекс III: 299-300
Гормоны III: 282-309. *См. также* по названиям
- влияние на синтез гликогена I: 122-123
---- лактозы II: 133
- и активность ферментов I: 106
-- циклический AMP III: 282-289
Гош-конформация I: 219
Грама метод окрашивания III: 218
Грамицидин A III: 316, 320, 321
- S III: 107-109
Грам-отрицательные бактерии III: 218, 226-232
Грам-положительные бактерии III: 218-226
Граны II: 180
Грибной яд III: 146-147, 276
Гуанин I: 91; II: 255; III: 6, 13, 14
Гуанингидрохлорид I: 39
Гуаниннуклеозидсвязывающий белок *см.* G-белок
Гуанинтрифосфат III: 149
Гуанозин I: 255, 256; III: 289
Гуанозинмонофосфат (GMP) II: 256-260
Гуанозин-5'(β,γ-имидо)-трифосфат (Gpp[NH]p) III: 289
Гуанозинмонофосфат (GMP) II: 256-260
Гуанозинтрифосфат (GTP) II: 52, 109; III: 102, 103, 289, 347
D-Гулоза II: 46
гяРНК *см.* Гетерогенная ядерная ДНК
GMP *см.* Гуанозинмонофосфат
GTP *см.* Гуанозинтрифосфат

Дальтон I: 25
ε-Дансиллизин III: 237
Дансилхлорид I: 29-30
Дауэкс-50 I: 28
Двигательные концевые пластинки III: 330
Двойная спираль ДНК (двухцепочечная, двухспиральная ДНК) III: 11-21
Двойные связи I: 219-220
Двуокись углерода *см.* Диоксид углерода
Двухцепочечная ДНК *см.* Двойная спираль ДНК
- РНК III: 47, 179, 192-193
Деацилирование I: 155, 156, 159-161
«Деветвящий» фермент II: 118
Дегидратазы II: 163
Дегидратация II: 27, 50
Дегидроаскорбиновая кислота I: 186
Дегидрогеназы в пентозо-фосфатном цикле *см.* Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, 6-

Фосфоглюконат-дегидрогеназа
- в цикле трикарбоновых кислот *см.* Изоцитрат-дегидрогеназа
- при гликолизе *см.* Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа
-- окислении жирных кислот II: 145
-- синтезе аминокислот *см.* Глутаматдегидрогеназа
--- жирных кислот *см.* Малатдегидрогеназа
-- фосфорилировании окислительном *см.* NADH-дегидрогеназа, Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа
- янтарного полуальдегида III: 340
7-Дегидрохолестерол II: 225
5-Дегидрохолинат II: 240
5-Дегидрошикимовая кислота (5-дегидрошикимат) II: 240
Дезамидо-NAD^+ II: 271, 272
Дезаминирование аминокислот II: 160-163
5'-Дезоксиаденозилкобаламин II: 171, 172
Дезоксиаденозин II: 255, 256
3-Дезоксиарабиногептулозонат-7-фосфат II: 240
Дезоксигемоглобин I: 75-78, 80-81, 95-96
Дезоксинуклеотидил-трансфераза (терминальная трансфераза) III: 209
Дезоксирибоза II: 255, 256
Дезоксирибонуклеаза III: 173
Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) I: 15; III: 6-44, 128-147, 196-208. *См. также* Библиотека ДНК, Двойная спираль ДНК, Одноцепочечная ДНК, Рекомбинация ДНК, Репликация ДНК
-- клонирование III: 207-214
-- кольцевая III: 20-21, 29, 184
-- липкие концы III: 209, 210
- нетранскрибируемые и нетранслируемые участки III: 141, 143
- связывание гормон-рецепторного комплекса III: 299-300
- эукариотическая III: 133-136, 138
Дезоксирибонуклеозиды II: 255
Дезоксирибонуклеотидтрифосфаты III: 21-24
Дезоксирибонуклеотиды II: 266
Дезокситимидилат (dTMP) II: 268-269
Дезокситимидин II: 255, 256
Дезоксиуридилат (dUMP) II: 268, 269
Дезоксицитидин II: 255, 256
Декаметоний III: 337
Декарбоксилирование II: 49, 51, 96, 109, 152
Дексаметазон III: 299-300
Декстран II: 131; III: 236-237
α-Декстрин II: 131
α-Декстриназа II: 131
Делеции III: 80, 82, 83
Денатурация I: 39
Деполяризация III: 330
Дерматансульфат I: 195
Дерматоспараксис I: 188
Десенсибилизация II: 343; III: 331
Десмозин I: 193, 194
Деформилаза III: 105
Дефосфокофермент А II: 272, 273
Диабет III: 294
Диазосоединения III: 243
Диализ I: 24, 25
Дибутирил-cAMP III: 286
Дигидробиоптеринредуктаза II: 175
Дигидроксиацетон (кетоза) II: 25, 47, 102
Дигидроксиацетонфосфат II: 30-31, 140-141, 196
3,4-Дигидроксифенилаланин (ДОФА) III: 339
3,4-Дигидроксифенилгликольальдегид III: 340
Дигидроксифенилэтиламин (дофамин) III: 339
Дигидроксихолестерол II: 223
Дигидролипоамид II: 57, 58
Дигидролипоиддегидрогеназа II: 57
Дигидролипоилтрансацетилаза II: 56, 57
Дигидрооротаза II: 263
Дигидрооротат II: 263
Дигидросфингозин II: 209
Дигидротимин II: 275
Дигидрофолят II: 269
Дигидрофолят-редуктаза II: 269
Дигитоксигенин III: 311
Диизопропилфторфосфат (ДИФФ) I: 115, 157, 161; III: 335-337
Дикумарол I: 170
6-Диметиладенин III: 60
Диметилаллилпирофосфат II: 214
Диметилксантин III: 286
Динеин III: 277-278
Динитрофенильное производное бычьего сывороточного альбумина (ДНФ-БСА) III: 235
Динитрофенол (ДНФ) III: 235, 237
Диоксигеназа II: 175
Диоксид углерода (двуокись углерода, CO_2) в цикле трикарбоновых кислот II: 53
-- при глюконеогенезе II: 106-108
--- при пентозофосфатном пути II: 95, 100
--- синтезе жирных кислот II: 149
---- пуринов II: 257
--- фотосинтезе II: 193-195, 197, 199
-- связывание с кислородом I: 72, 73, 81
-- транспорт в тропических растениях II: 198
Дипептиды I: 23, 37
Дисахарид-дипептидное звено III: 221-223
Дисахариды II: 132
Дистальный гистидин I: 56
Дисульфидные связи I: 23-24, 38-39; III: 105, 244
-- окисление I: 32, 38
Дифосфатидилглицерол I: 203
Дифосфопиридиннуклеотид *см.* Никотинамид-адениндинуклеотид
Дифракция рентгеновских лучей I: 52, 54
Дифтерийный токсин III: 155-156
Диффузия I: 114, 217-224
- облегченная II: 86
Диэлектрическая постоянная I: 126
Ди-NAG I: 142
ДНК *см.* Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНК-гираза III: 33
ДНК-зависимая РНК-полимераза III: 53
ДНК-лигаза III: 26-27, 35
ДНК-полимераза РНК-зависимая (обратная

транскриптаза) III: 178, 190
ДНК-полимеразы I: 105; III: 21-28, 32-35
- дефектные III: 81
- эукариотические III: 136
ДНК-топоизомераза III: 27-28, 32, 33
ДНФ-аминокислоты I: 29
Додекановая кислота (додеканоат) II: 139
Додецилдиметиламиноксид (ДДАО) I: 210
Додецилсульфат натрия (ДСН) I: 209-211, 213
Додецилтриметиламмонийбромид I: 210
Докозаноат II: 139
Домены I: 38, 162
- антител III: 244-245, 248, 253
Долихол III: 159
Долихолпирофосфат III: 161
Долихолфосфат III: 160-161, 221
ДОФА III: 339
ДОФА-декарбоксилаза III: 339
Дофамин III: 339
Дрожжи II: 23-24, 35
ДСН *см.* Додецилсульфат натрия
Дупликации генов III: 248-249
Дыхание II: 71
Дыхательный контроль II: 87-88
- коэффициент II: 86

Еноил-АПБ-редуктаза II: 152
Еноил-СоА II: 144, 146
Еноил-СоА-гидратаза II: 144
Енол I: 32
3-Енолпируватшикимат-5-фосфат II: 240
Енолфосфаты II: 41
Енолят-анион II: 39
ES-комплекс *см.* Фермент-субстратные комплексы

Жгутики III: 277, 350, 351
Железо I: 49, 78-79
- в белках см. Железопротеины, Железосеропротеины
Железопорфирин I: 59-60
Железопротеины II: 32, 75
Железо-серные комплексы II: 75
Железосеропротеины (Fe-S-белки) II: 52, 188, 230
Желчные кислоты II: 215
Жидкостно-мозаичная модель мембран I: 218-219
Жир, накопление у перелетных птиц II: 295-296
Жирные кислоты I: 220-221; II: 138-159, 286-289, 291
-- в крови II: 294
-- незаменимые II: 156; III: 297
Жировая ткань II: 100-101, 140, 289-290; III: 298

Замена оснований III: 80, 83
Заменимые аминокислоты II: 233
Замораживание-скалывание I: 211
Замораживание - травление I: 211, 212
Зарин III: 335, 336
Зеленые серные бактерии II: 186
Зимаза II: 24
Зимняя спячка II: 88, 91
Зимогеновые гранулы I: 152, 153
Зимогены I: 105, 152, 160. *См, также* Проферменты
Зингиберин II: 226
Змеиные яды III: 333
Зрительные рецепторы *см.* Колбочки, Палочки

Иглобрюх III: 328, 329
D-Идоза II: 46
β-Изгиб I: 37
Изовалерил-СоА II: 174
Изовалерил-СоА—дегидрогеназа II: 174
Изозимы *см.* Изоферменты
Изолейцин I: 20; II: 170, 174, 243; III: 89
Изомеризация II: 28-30
Изомерия *цис-транс* (*цис-транс*-конфигурация) I: 219-220; III: 343-344
Изопентенилпирофосфат II: 212-214, 226
Изопрен II: 212
Изопреновые единицы III: 211
Изопропилтиогалактозид III: 112, 113, 115
Изоферменты II: 112
Изоциановая кислота I: 98
Изоцитраза II: 159
Изоцитрат II: 50-51
Изоцитратдегидрогеназа II: 51
Изоэлектрическая точка I: 68, 91
Икосаэдрическая симметрия III: 168-169, 177
Имидазолацетолфосфат II: 244
Имидазолглицеролфосфат II: 244
4-Имидазол-5-пропионат II: 168
Иминокислоты I: 20
Иммуноген *см.* Антиген
Иммуноглобулин A (IGA) III: 246, 248
- D (IgD) III: 246
- E (IgE) III: 246, 248
- G (IgG) III: 235-240, 243-244, 246, 247
- M (IgM) III: 235, 236, 246
Иммуноглобулиновые складки III: 244, 246
Иммуноглобулины III: 160, 234-258. *См. также* Антиген-связывающие участки
- классы II: 246, 248, 253-254
- мРНК III: 151
- трехмерная структура III: 244-245, 247
Иммунный ответ III: 235, 255
Иммунологическая память III: 256
Иммунофлуоресцентная микроскопия III: 272-275
Ингибирование (ферментативных реакций) I: 114-118
- по принципу обратной связи I: 106; II: 243
Индол-3-глицеролфосфат II: 247
Индукторы III: 112-114
Индуцированное соответствие III: 110, 111, 144, 148
Инициаторная РНК III: 100-103
Инициаторный комплекс III: 102
Инициация синтеза белков III: 76, 101-102, 153

-- ДНК III: 134
-- РНК III: 55-56. *См. также* Промоторы
- факторы III: 102, 155, 209
Инозин I: 74; III: 95
Инозинат II: 259
Инозитол I: 202
Инсектициды I: 157; III: 335
Инсерционная инактивация III: 210
Инструктивная теория III: 240
Инсулин I: 27; II: 291; III: 290-295
- синтез у *E. coli* III: 212, 214
Инсулинома III: 213
Интегральные мембранные белки I: 210, 213; III: 326
Интеграция (в геном эукариотической клетки) вирусов III: 192
- фагов III; 120, 184-185
Интеркаляция III: 62, 64, 82
Интерферон III: 192-193
Интроны (прерывающие последовательности) III: 79-80, 145, 252
Информационные РНК (мРНК) III: 46-86, 148-154
-- антител III: 252, 253
-- синтетические III: 69-71
-- трансляция III: 99-100
Иодацетамид I: 115
Ионная пара I: 122
Ионные связи I: 122. См. *также* Солевые связи
Ионный радиус III: 319, 320
Ионообменная хроматография I: 25, 28
Ионофоры *см.* Антибиотики-переносчики
Ионы металлов III: 52. *См. также* Калий, Кальций, Натрий
IS-элементы *см.* Вставочные последовательности
IgA, IgD, IgE, IgG, IgM *см.* Иммуноглобулин A, D, E, G, M

Калиевые каналы III: 327, 328
Калиевый потенциал III: 345
Калий (ион K^+) и возбудимость мембран III: 326-328, 331
- связывание с антибиотиками III: 318-320
Калликреин I: 175
Кальвина цикл II: 196-199
Кальмедулин III: 287
Кальсеквестрин III: 270
Кальциевый насос III: 270
Кальций (ион Ca^{2+}), влияние на киназу фосфорилазы II: 126
--- межклеточные контакты III: 323, 324
--- подвижность клеток III: 274
--- свертывание крови I: 171-172
- как медиатор для родопсина III: 345-346
- при зрении III: 332
-- освобождении ацетилхолина III: 332
- регуляция мышечного сокращения III: 269-270
- транспорт III: 270-271, 311-312
Кальциферол II: 18
Кальцификация I: 189
Канцерогены III: 82-84
Капсид III: 167, 173
N-Карбамоиласпартат II: 262
N-Карбамоилизобутират II: 275
Карбамоиловые эфиры III: 334-335
Карбомоил-производное гемоглобина I: 83
Карбамоилфосфат II: 165
- в синтезе пиримидинов II: 262
-- цикле трикарбоновых кислот II: 164
- свободная энергия гидролиза I: 12
Карбамоилфосфатсинтаза II: 165, 263-264
Карбанион II: 101, 103
Карбоангидраза I: 81, 104, 114
Карбоксибиотин II: 108
Карбоксибиотин-переносящий белок II: 150
γ-Карбоксиглутамат I: 22, 23, 170, 171
Карбоксильная группа II: 108
Карбоксипептидаза A I: 132
Карбоксипротеиназы I: 166
1-(*о*-Карбоксифениламино)-1-дезоксирибулозо-5-фосфат II: 242
Карбоний (ион) I: 140, 141
Карбонилцианид-*п*-трифторметоксифенилгидразон II: 88
Кардиотонические стероиды III: 309-311
Карнитин II: 142-143, 290-291
β-Каротин II: 226-227
Каротиноиды II: 226
Каскадный механизм в обмене гликогена II: 128
-- при действии гормонов III: 288-289
--- свертывании крови I: 166-167
-- регуляторный II: 247
Катаболизм II: 205
Катаболитная репрессия III: 116
Катаболические опероны III: 116-117
- пути II: 21
Каталаза II: 273
Катализ I: 104, 140
Каталитическая субъединица II: 265-266
Каталитические группы I: 109
Катехоламины II: 292; III: 338-339
Катехол-О-метилтрансфераза III: 339, 340
Катионные каналы III: 331
Каучук II: 226
«Качания» гипотеза III: 94-95
Квазиэквивалентность III: 176
Кератансульфат I; 193, 194
Кетимины II: 162, 163
Кетогенные аминокислоты II: 166-167
2-Кето-3-дезоксиоктонат III: 228
Кетозо-альдозные изомеризации II: 96
Кетозы II: 25, 47, 294
Кетоновые тела II: 147-148, 194; III: 294
β-Кетотиолаза II: 144
Килобазы III: 19
Килодальтон I: 25
Киназа фосфорилазы II: 123, 125-127
Киназы II: 28; III: 191-192, 287, 288
Кинин I: 174

Кислород I: 69-72, 79-81
- при гидролизе коллагена I: 181
-- фотосинтезе II: 186-187, 190
- транспорт I: 48
Кислота I: 45
Клатрин II: 219; III: 161
«Кленового сиропа» болезнь II: 174-175
Клетки, зародышевые линии III: 250
- метаболизм II: 281-282
- обкладки сосудистого пучка II: 198-200
- образование антител III: 250-252, 254, 255
- печени II: 28, 280, 290
I-клеточная болезнь III: 163
Клеточная подвижность III: 271-272, 276. *См. также* Микротрубочки
- стенка (оболочка) бактерий I: 132-133; III: 218-232
Клеточные мембраны I: 199-224; III: 304. *См. также* Белки мембран, Постсинаптическая мембрана
-- асимметрия III: 163
-- возбудимые III: 326-355
-- проницаемость для Na^+ и K^+ III: 326-329
-- реконструкция II: 201
-- текучесть I: 219-221
-- эндоплазматического ретикулума II: 156
Клеточный цикл III: 136
Клональная селекция III: 255-257
Клонированная ДНК, библиотека III: 211-212
Клонированные гены III: 196, 207-209, 214
Клострипаин I: 32
«Ключ-замок», модель ферментативного катализа I: 110
Кобаламин II: 170-172
Кобальт II: 170-171
Кобратоксин III: 343
Ковалентная модификация I: 105-106, 283
Кодоны III: 68, 75
- не кодирующие аминокислот III: 75
- синонимические III: 76
- узнавание антикодона III: 94-95
Козимаза II: 24
Колбочки III: 340, 347-348
Колицин III: 202
Колициногенные факторы III: 202
Коллаген I: 19, 179-192
Коллагеназы I: 191-192
Колхицин III: 277
Компартменты I: 199, 222; II: 283-284
Комплемент I: 173; III: 238
Комплементарная ДНК (кДНК) III: 213
Кональбумин III: 146
Конвергентная эволюция III: 348
Конденсирующий фермент II: 50
Конканавалин А I: 26, 214
Конкатамеры III: 174-175
Конкурентное ингибирование I: 115-118
Коннексоны III: 323
Константа диссоциации I: 86, 113
- *Михаэлиса* ($K_м$) I: 111-114
Константные участки (С-области) III: 241-244, 249, 253-254
Конститутивные мутанты III: 113
Конформационная гипотеза сопряжения II: 79
Конформационное равновесие I: 120
Конфармационное равновесие I: 120
Конформация кресла I: 32-34, 137; II: 26
- миоглобина I: 55, 57
- полипептидных цепей I: 32-34, 37, 38, 40-42
- связей С—С в мембранах I: 219-221
Концевые пластинки III: 332
Кооперативное связывание I: 119-121
- взаимодействие в гемоглобине I: 72, 79-80
--- коллагене I: 184-185
--- липидных бислоях I: 205-206
Копропорфириноген II: 249
Корепрессор III: 118
Кори болезнь II: 130
- цикл II: 112
Корриновое кольцо (ядро) II: 170, 171
Кортизол II: 223; III: 284
Кортикостерон II: 223
Кортикотропин II: 222; III: 296, 297
Кор-фермент III: 55, 56
Кость I: 189
Котранспорт III: 312
Кофакторы цикла трикарбоновых кислот II: 55
Кофеин III: 286
Кофермент А II: 16, 17, 272
- Q II: 75-76, 81
«Красное падение» II: 187
Красные мышцы III: 271
Крахмал II: 131-132
Крахмальный гель I: 92
Креатин III: 270
Креатинкиназа III: 270
Креатинфосфат II: 12, 13
Кребса цикл *см.* Цикл трикарбоновых кислот
«Кривые Cot» III: 139
Криоэнзимология I: 136
Кристаллизация I: 50
Кристмас-фактор I: 173-175
Кристы II: 72
Кротонил-АПБ II: 152, 153
Крысиные яды I: 170; II: 63
Ксантин II: 273
Ксантиноксидаза II: 273
Ксантиолат II: 290
Ксантобиотические соединения II: 222
Ксенопус III: 141
D-Ксилоза II: 46
D-Ксилулоза II: 47
Ксилулозо-5-фосфат II: 97-98, 196
Ксилулозо-6-фосфат III: 117
Кулона закон I: 122
Кумулятивная регуляция по типу обратной связи II: 245
K_i I: 116-117
$K_м$ *см.* Константа *Михаэлиса*
CoQ *см.* Кофермент Q

α-Лактальбумин II: 132
β-Лактамное кольцо III: 224, 225
Лактат II: 36, 111-112
Лактат-дегидрогеназа II: 36, 111-112
Лактоза I; 106; II: 132-133; III: 112-114
Лактозный аналог тетра-NAG I: 142
- оператор (lac-оператор) III: 115-117
- оперон (lac-оперон) III: 114-117
- репрессор (lac-репрессор) III: 115-117
Лактозо-синтаза I: 106; II: 132-133
Лактоназа II: 96
Ламеллиподии III: 271
Ланостерол II: 214
Латеральная диффузия I: 218
Латиризм I: 190
Лаурат II: 139
Леггемоглобин II: 232
Легкие цепи (L-цепи) III: 238-244
Лед I: 126
Лейкемия II: 270
Лейкины I: 214
Лейкоциты I: 49
Лейцин I: 20; II: 173-174; III: 71
Лейцин-энкефалин III: 296
Лекарственная идиосинкразия III: 338
Летальный синтез II: 63
Леша-Нихана синдром II: 276-277
Лиазы II: 155
Лигноцерат II: 139
Лидерная мРНК III: 119-120
Лизилгидроксилаза I: 181
Лизилоксидаза I: 190
Лизин I: 21, 22
Лизинонорлейцин I: 193
Лизогенизация III: 120
Лизогенизирующие фаги III: 202, 204
Лизогенный цикл III: 122
Лизосомы I: 166; II: 210-211, 219; III: 163
Лизофосфатидат II: 205
Лизоцим I: 132-144; III: 173
Ликопин II: 226, 227
D-Ликсоза II: 46
Лимонен II: 226
Лимфоциты III: 249-250
- B и T III: 235, 256, 257
Линкер III: 210
Линолеат II: 139, 156
Липазы I: 165; II: 140
Липид A III: 226-227
Липидные бислои I: 205-208, 218
Липидный переносчик III: 220-223
Липиды I: 201, 215
- мембран I: 200-207; III: 318
«Липкие» концы III: 184
Липоамид II: 56-59
Липоевая кислота II: 57
Липолиз II: 140; III: 297
Липополисахариды III: 226-229
Липопротеины II: 218-220, 290
Липосомы I: 206-207
β-Липотропин III: 296
Люмиродопсин III: 344
Lac *см.* Лактоза
Lac-оператор *см.* Лактозный оператор
Lac-оперон *см.* Лактозный оперон
Lac-репрессор *см.* Лактозный репрессор

Магний (ион Mg^{2+}) II: 28, 29
Мак-Ардля болезнь II: 130
Макрофаги II: 207; III: 271
Макроэргические соединения *см.* Высокоэнергетическая связь, Высокоэнергетические фосфаты
Малат II: 52, 53, 155, 198
Малат-аспартатный шунт II: 85
Малат-дегидрогеназа II: 53, 155
Малат-синтетаза II: 159
4-Малеилацетоацетат II: 175
Малонат I: 115, II: 67
Малонил-АПБ II: 151-152
Малонил-трансацилаза II: 151, 152
Малонил-CoA II: 151, 152
Мальтаза II: 132; III: 229
Малярия I: 97; II: 104
D-Манноза II: 46
Маннозо-6-фосфат III: 163
Марганец II: 188
Масла II: 226
Матрикс II: 71, 72
Матричная РНК (мРНК) *см.* Информационные РНК
Мевалонат II: 212-214
Медиаторы III: 345
Медь I: 192; II: 191
Межгенная супрессия III: 96
Межклеточное соединение III: 305
- узнавание I: 215
Межклеточные каналы III: 321, 322
Меланин II: 177
Мембранные везикулы II: 201; III: 312
- липиды I: 201-207
Мембранный потенциал II: 79-80; III: 304, 313, 327, 332
- транспорт I: 219; III: 304-325
Мембраны. *См. также* Клеточные мембраны
- митохондрий II: 72, 83-84, 86
- тилакоидов II: 180, 184
β-Меркаптоэтанол I: 38-39
β-Меркаптоэтиламин II: 16
Меромиозин легкий (ЛММ) и тяжелый (ТММ) III: 264, 266, 267
Метаболизм II: 6-25, 280, 284-286
- адаптация к голоданию II: 293
Метаболическая активация II: 222
- специализация органов II: 283
Метаморфоз головастика I: 191
Метанольное отравление I: 118
Метародопсины III: 344
Метгемоглобин I: 49, 99
N^5N^{10}-Метенилтетрагидрофолят II: 236, 237
Метил-акцепторные белки III: 352, 353
L-Метилвалин III: 63

Метилглутамат III: 353
β-Метилглутаконил-CoA II: 174
7-Метилгуанилат III: 149, 150
N^5N^{10}-Метилентетрагидрофолят II: 236, 237, 268-269
Метилирование при хемотаксисе III: 352
- роль кобаламина II: 172
Метилированная ДНК III: 177-178
Метилированный нуклеотид («колпачок», «кеп») III: 60, 149-151
Метилкобаламин II: 238
β-Метилкротонил-CoA II: 174
β-Метилкротонил-CoA-карбоксилаза II: 174
Метилмалонил II: 169-173
Метилмалонил-CoA II: 170
2'-*O*-Метилрибоза III: 60
N^5-Метилтетрагидрофолят II: 236-238
Метальные группы II: 16, 207, 238-239
Метионил-тРНК (Met-тРНК) III: 101
Метионин I: 21, 154; II: 169-179, 238; III: 75, 76, 100-101
Метионин-энкефалин III: 295, 296
Метотрексат II: 270
Миастения III: 338
Миелинизированные нервные волокна III: 329, 330
Миелома III: 240-242
Микоплазма III: 19
Микроворсинки III:. 275, 276, 313
Микросомы II: 156
Микротрубочки III: 276-279
Микрофиламенты III: 261, 272-274, 276
Минералокортикоиды II: 222, 224
Минимальный фермент III: 55
Миоглобин I: 48-62, 69-72
- сравнение с гемоглобином I: 63-64, 69
Миозин III: 261-264, 266-273
- в немышечных клетках III: 271-273
Миокиназа II: 10, 264, 293; III: 271. *См. также* Аденилаткиназа
Миофибриллы III: 260, 262
Миристат II: 139
Мирицин II: 226
Миссенс-супрессоры III: 97
Митохондриальная АТРаза II: 79
Митохондрии II: 71-72
- ДНК в них III: 21, 136-138
- рибосомы в них III: 153
Михаэлиса константа I: 111-114
Михаэлиса-Ментен уравнение I: 112, 118
Мицелла I: 205
Мобильные (подвижные) генетические элементы III: 201-202, 205, 206. *См. также* Вставочные последовательности, Плазмиды
Модель из шаров и палочек I: 10-11
Модифицирующая субъединица I: 106; II: 133
Мозг II: 288
Молекулярные болезни I: 88-103
- модели I: 10
Молекулярный шарнир III: 33, 176, 239, 268, 269
Молибден II: 231, 276
Моноаминооксидаза III: 339
Моноклональные антитела III: 241
Монооксигеназы II: 175, 222
Моносахариды II: 24-27
Морской еж III: 143
Морфин III: 296
Мочевая кислота II: 274-276
Мочевина I: 39; II: 164-166, 273
$мРНК_i^{Met}$ III: 153
Муколипидоз III: 163
Мутагенез III: 82
Мутагены химические III: 81, 83
Мутанты температурочувствительные III: 191-192
- *pol* III: 27, 28
- *rif-r* III: 61
Мутации III: 80-84. *См. также* Делеции, Дупликации, Транслокации
- и вырожденность кода III: 76
-- образование антител III: 250, 254-255
- нонсенс III: 82, 96
- со сдвигом рамки считывания III: 69, 97
- супрессия III: 96-97
- у бактерий III: 353
Мышечное сокращение III: 260-281
Мышечные клетки III: 141
Мышцы I: 18, 19; II: 289; III: 260-261, 304
Мюллера-Рудина способ получения мембран I: 207
$Met\text{-}тРНК_f$ *см.* Метионил-тРНК

Надмуравьиная кислота I: 32, 38
Надпочечники II: 225
Налоксон III: 296
Наперстянка III: 310-311
Натриевые каналы III: 327-330, 345-346
Натрий (ион Na^+) III: 319-320, 327-328
- и транспорт сахаров III: 312-313
- транспорт *см.* Натриевые каналы, Натрий-калиевый насос
Натрий-калиевый насос III: 305-310, 327
Негемовое железо II: 52, 75
Незаменимые аминокислоты II: 230, 233-234, 239
- жирные кислоты II: 156
Нейромедиаторы III: 330, 338-340
Нейротоксины III: 333, 335
Неконкурентное ингибирование I: 116-117
Немиелинизированные нервные волокна III: 329
Ненасыщенные жирные кислоты II: 146
Неостигмин III: 334, 336
Непермиссивные клетки-хозяева III: 187
Неполярные взаимодействия I: 61-62
Нервно-мышечное соединение III: 330
Нервный импульс III: 326-327
Нециклическое фотофосфорилирование II: 192
Ниацин II: 17, 270. *См. также* Никотиновая кислота
Никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+, NADH) II: 14, 36-38, 255, 285
Никотинамидадениндинуклеотидфосфат ($NADP^+$, NADH) II: 15, 16, 95-100, 281

- в биосинтезе холестерола II: 214
--- дезоксирибонуклеотидов II: 266-268
-- гидроксилировании стероидов II: 222
-- малат-дегидрогеназной реакции II: 155-156
- образование в цикле трикарбоновых кислот II: 53
-- при окислении жирных кислот II: 143-144
--- гликолизе II: 32
--- фотосинтезе II: 189, 191
- окисление II: 84-85
- стереоспецифичность II: 62
Никотиновая кислота II: 17, 270-272
Нингидрин I: 28
Нитрогеназный комплекс II: 230-232
2-Нитро-5-тиоцианат I: 32
n-Нитрофенилацетат I: 155, 156
n-Нитрофенилдиазоний III: 243
n-Нитрофенол I: 155, 156
Нонактин III: 319, 320
Норадреналин II: 291, 292; III: 339, 340
5'—>3'-Нуклеаза III: 25-26, 35
Нуклеиновые кислоты. *См. также* Дезоксирибонуклеиновая кислота, Рибонуклеиновая кислота
-- конформация III: 11-15, 47
-- области гомологии III: 55
Нуклеозиддифосфаткиназа II: 264
Нуклеозиддифосфаты II: 132
Нуклеозидмонофосфаткиназы II: 264
Нуклеозидтрифосфаты II: 256
Нуклеозид-фосфорилазы II: 273
Нуклеозиды II: 255-279
Нуклеосомное «ядро» (минимальная нуклеосома) III: 131-132
Нуклеосомы III: 129-133, 136-137
Нуклеотидазы II: 273
Нуклеотиддифосфаты III: 23
Нуклеотиды II: 255-279; III: 6, 11-15, 19, 24
Нуклеофильная атака I: 158
NAD, NADH *см.* Никотинамидадениндинуклеотид
NAD-связывающий участок дегидрогеназы II: 37-38
NADH-дегидрогеназа II: 74
NADH-Q-редуктаза II: 74-75, 82
$NADP^+$, NADH *см.* Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
NAG *см.* N-Ацетилглюкозамин
NAM *см.* N-Ацетилмурамовая кислота
NGF *см.* Фактор роста нервов

Обратимое ингибирование I: 115
Обратная связь I: 106; II: 243-245
- транскриптаза III: 178, 190
- транскрипция III: 178-179, 190
Овальальбумин III: 151-153
Одноуглеродные фрагменты II: 235-239
Одноцепочечная ДНК III: 16, 19, 52, 138, 167, 200
Оказаки фрагменты III: 31
Окаймленные пузырьки III: 161-162
β-Окисление II: 143
Окислительно-восстановительная пара II: 72-73
Окислительно-восстановительный потенциал II: 73-74, 190
Окислительное дезаминирование II: 160
- фосфорилирование II: 14, 71, 78, 83, 87-88
Оксалоацетат II: 49-50, 52-54, 108-109, 168, 198
Оксалосукцинат II: 61
Оксианион I: 159, 160
Оксигемоглобин I: 75-76, 86
Оксигеназы II: 195, 199, 222
Оксигенирование I: 56-60
Оксид азота I: 224
- углерода (CO) I: 60, 61, 86-87; II: 81
β-Оксоацил-АПБ-редуктаза II: 152
Оксоацил-СоА II: 143, 144
α-Оксобутират II: 163, 239, 243
α-Оксоглутарат I: 181; II: 51, 160, 161, 168-169
α-Оксоглутаратдегидрогеназный комплекс II: 51, 59
α-Оксоизокапроат II: 174
Оксокислоты II: 160, 162, 174, 235
Октадекадиеновая кислота II: 138
Олеинат I: 201, 220; II: 139, 156
Олигоаденилат III: 192
Олигомицин II: 84
Олигонуклеотид-синтетаза III: 192
Олигосахариды III: 159-163
Онкогенные вирусы III: 186-192
Ооциты ящериц III: 156, 157
trp-Оператор III: 118
Операторный ген III: 114
λ-Операторы III: 122-124
trp-Оперон III: 118, 119, 121
Опероны III: 114-120
Опий и опиаты III: 295
Опсины III: 341, 348
Опухолеродные (онкогенные) вирусы III: 186-192
Органические фосфаты I: 156; III: 334-337
Органоспецифичность метаболизма II: 288
Орнитин II: 164
Орнитин-карбамоилтрансфераза II: 164
Оротидилат II: 262, 263
Ортофосфат II: 12
Основания как акцепторы протонов I: 45
Остемаляция II: 226
Отжиг ДНК III: 20
«Отпечатки пальцев» I: 93

Палиндром III: 38
Палочки сетчатки II: 281; III: 217, 340-349
Пальмитат I: 201; II: 139, 145, 156, 159
Пальмитоил СоА II: 208
Памахин II: 103
Панкреатит I: 165
Панкреатический ингибитор I: 162-164

Пантотенат (пантотеновая кислота) II: 16, 17, 272-273
Папаин I: 166; II: 239
Паповавирусы III: 188
Паратион III: 335, 336
Пастера эффект II: 284
Пенициллин III: 218, 224-227
Пенициллиназа III: 225-226
Пенициллиновая кислота III: 225
Пентаглициновый мостик III: 219
Пентозофосфатный путь II: 95-114, 284-285
Пепсин I: 152, 166
Пепсиноген I: 152, 166
Пепстатин I: 166
Пептидазы I: 188-189
Пептидилтрансфераза III: 104
Пептидильный участок III: 102
Пептидная единица I: 33-34
- связь I: 23, 29-30, 32, 104; III: 103-104, 223, 226
Пептидные карты I: 92-93
- мостики III: 223
Пептиды I: 27, 30. *См. также* Полипептиды
Пептозогликаны III: 219, 220, 223-224
Первичная структура I: 37
Первичные транскрипты III: 148, 149
$C_н$-Переключение III: 253, 256
Перенос заряда I: 158, 176
- фосфатных групп II; 11-12, 72
- электронов II: 72, 74, 82, 222
Перехваты *Ранвье* III: 329
Переходное соединение I: 166
Периплазматическое пространство III: 226
Пермеаза III: 113, 114, 313
Пермиссивные клетки-хозяева III: 187
Перниционная анемия II: 170, 172
Пероксисомы II: 199
D-Петля III: 200, 202
Печень II: 172, 290-291. См. *также* Клетки печени
Пикорнавирусы III: 179
Пили III: 197
Пиперидин III: 40
Пираноза II: 26-27
2-Пиридинальдоксимметиодид (ПАМ) III: 337
Пиридоксальфосфат I: 108, 109; II: 161-162
- в фосфорилазе II: 124
Пиридоксин II: 17, 161
Пиримидиновые димеры III: 35-37
Пиримидины II: 255-256; III: 6, 7
- биосинтез II: 262-264, 276
- спаривание с пуринами III: 11-15
Пирофосфат, гидролиз II: 121, 142, 273; III: 23, 88
-- свободная энергия I: 12
Пирофосфатная связь III: 149, 150
5-Пирофосфомевалонат II: 213, 214
Пиррол I: 48
Пирролидоновое кольцо I: 55, 183, 185
Δ-Пирролин-5-карбоксилат II: 169, 235
Пируват II: 27, 54-58, 106, 108, 286-287
- в C_4-пути II: 198
- образование и выход энергии II: 32-33, 163, 167-168
- превращение в ацетил-CoA II: 49, 54
--- лактат II: 36
--- этанол 35-36
Пируватдегидрогеназный комплекс II: 54-59, 64-65
Пируват-P_i-дикиназа II: 198
Пируват-карбоксилаза II: 107, 108
Пищеварительные ферменты I: 152-178
Плавление ДНК III: 19
- коллагена I: 185
- мембран I: 220
Плазмагены II: 208
Плазматическая мембрана I: 199; III: 344-345. *См. также* Клеточные мембраны
Плазматические клетки III: 235, 256
Плазмиды III: 201-206
- для пенициллиназы III: 226
- как векторы III: 210-211
- колициногенные III: 210
- ColE1 III: 210, 211
- pBR322 III: 210
- pSC101 III: 205
Z-Пластинки III: 271
Пластохинон II: 190-191
Пластоцианин II: 191
Пневмококки III: 7-10
Подагра II: 274-276
Поджелудочная железа III: 290
Полиены II: 184, 227; III: 342
Полилизин III: 71
Полинуклеотидкиназа III: 64
Полинуклеотид-фосфорилаза III: 70
Полинуклеотиды синтетические III: 99
Полиоксиэтилен I; 210
Полипептид гигантский III: 180, 181
Полипептидные цепи I: 23-24
-- конформация I: 32-34, 38, 40-42
Полипептиды I: 23-32
Полипиррилметан II: 250
Полипролин I: 182, 183; III: 71
Полирибонуклеотиды III: 73
Полирибосомы III: 100
Полисахарид III: 7-10
Полисома III: 100, 101
Политенные хромосомы III: 147, 148
Полиуридилат [poly(U)] III: 70
Полифенилаланин III: 70
Полицистронный (полигенный) транскрипт III: 115
Полицистроны III: 149
Полуальдегид янтарной кислоты III: 340
Полуацеталь II: 25
Полукеталь II: 25-26
Полуконсервативная репликация III: 15-16, 133-134
Помпе болезнь II: 130
Поперечная диффузия I: 218, 224
Поперечнополосатые мышцы III: 260-262
Поперечные мостики III: 261, 266
- связи I: 190, 192-193

Порин III: 229-230, 232
Порфирины II: 248, 250-251
Порфирия II: 251
Порфобилиноген II: 249, 250
Последовательности ДНК повторяющиеся III: 72-75, 138-140. *См. также* Вставочные последовательности
- *Прибнова* III: 55
- сигнальные III: 74-75, 157-159, 231, 252
- poly(A) III: 149-150
Постсинаптическая мембрана III: 330, 331
Потенциал переноса II: 11-12, 16, 72, 74
- фосфорилирования II: 20
Потенциалы действия III: 326-328
Праймаза III: 31, 32
Превитамин D_3 II: 225-226
Прегненолон II: 222-223
Предзатравочный комплекс III: 32
Прелюмиродопсин III: 344
Препроинсулин III: 290-292
Префенат II: 240-241
Прибнова последовательности III: 55
Провитамин D_3 II: 225
Прогестагены II: 221, 222
Прогестерон II: 221, 223
Проинсулин III: 290-292
- синтез в *E. coli* III: 214
Прокарбоксипептидаза I: 152
Проколлаген I: 187-189
Проконвертин I: 175
Пролилгидроксилаза I: 181
Пролин I: 20, 21, 55
Пролипопротеин III: 230, 231
Промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот II: 64, 65
Промоторы III: 55-56, 118, 123
Проницаемость, коэффициент I: 208-209
- липидных бислоев I: 206-208
Про-опиокортин III: 296-297
Пропионил-CoA II: 146-147, 169-170
Пропионил-CoA-карбоксилаза II: 169
Проростки пшеницы III: 151
Простагландин-синтазы III: 298, 299
Простагландин-циклооксигеназа III: 298
Простагландины III: 297-298
Простетические группы I: 48; III: 105
Протеазы I: 166; III: 174-175
Протеиназы I: 32, 166
Протеинкиназы III: 155, 287-288
Протеогликаны I: 193-194
Протеолитические ферменты I: 104-105
Протонный градиент II: 79, 81-82, 91-92, 190-193; III: 313-314
Протоны, ток (поток) И: 84, 91-92
Протопласты III: 224-225
Протопорфирин I: 47; II: 249-250
Протромбин I: 170-172
Профаги III: 120-121, 185
Проферменты (зимогены) I: 105-106, 152-153, 160-161, 165
Профосфолипаза A_2 I: 165
Прохиральная молекула II: 62
Процессинг РНК III: 60-61, 148-152, 252
Проэластаза I: 152
Псевдоуридин III: 61
Псевдохолинэстераза III: 338
D-Псикоза II: 47
Пурины II: 255; III: 6, 7, 14
- биосинтез II: 257-262
- распад II: 273-274
- спаривание с пиримидинами III: 11-15
Пуромицин III: 102, 107
Пурпурная мембрана II: 200-201
Пустые циклы II: 110
Пуфы III: 147-148
Пятиуглеродные единицы III: 226
pK I: 45, 46, 81-83
pH I: 45, 143
PAS-полосы I: 211
PAS-реакция *см.* Периодат-иод-Шифф

Рабдовирусы III: 181
Равновесная седиментация III: 15, 16
Радиоактивные изотопы II: 61; III: 22
Радиоиммунологический анализ III: 296
Разобщители II: 87-88
Рак, вирусная этиология III: 167, 186-189
- кожи III: 35-36
- химиотерапия II: 269
Рамка считывания, сдвиг III: 69, 82, 83, 97
Рамноза III: 228
Растения, C_4-путь II: 198-199
Рацемазы III: 220
Рахит II: 225-226
Реакционный центр II: 185
Ревертанты III: 83
Регуляторная субъединица II: 266
Регуляторный ген III: 113-114
Редуктаза *см.* Сукцинат-Q-редуктаза, NADH-Q-редуктаза
Рекомбинация ДНК III: 196-216
- фага λ III: 185
Релаксация ДНК III: 20, 21, 33
Ренатурация антитела III: 240, 241
- миоглобина I: 62-63
- РНКазы III: 240
Рентгеноструктурный анализ I: 50-52
-- гемоглобина I: 63-64, 76, 83
-- ДНК III: 11
-- миоглобина I: 50-58
Реовирус III: 181-182
Репарация ДНК III: 35-37
Репликазы III: 183. *См. также* тРНК-репликаза
Репликационная вилка III: 28-34, 134-137
Репликация ДНК III: 14-19, 28-44, 133-136
-- ошибки III: 24-26
- РНК III: 180
- фага T4 III: 174-175
- ферментативная III: 41-42
Репрессор III: 113-119, 122-124. *См. также* Лак-

тозный репрессор, Триптофановый репрессор
Реснички III: 277-278
Рестрикция III: 177, 208-209
- фермента III: 38-39, 176-178
Ретикулоциты III: 98-99, 155
Ретинали в пурпурной мембране II: 200
- *транс*- и *цис*-изомеры III: 341-344, 348-349
Ретинол II: 17, 18
Ретинол-дегидрогеназа III: 343
Ретровирусы III: 179, 189-190
Рецепторные ямки II: 219
Рецепторы антигенов III: 256-257, 293-294
- эстрадиола III: 299-300
Рибоза II: 255; III: 46
Рибонуклеаза S I: 17
Рибонуклеазы I: 39-41, 123, 124; III: 64
- ренатурация III: 240
Рибонуклеиновая кислота (РНК) III: 46-48, 52-61. *См. также* Гибридизация ДНК-РНК, Двухцепочечная РНК
-- положительная (+РНК) и отрицательная (—РНК) III: 179-182
Рибонуклеозиддифосфаты III: 70
Рибонуклеозидтрифосфаты III: 52, 73
Рибонуклеотид 5-аминоимидазола II: 259
- 5-аминоимидазол-4-карбоксамида II: 244, 259
- 5-аминоимидазол-4-карбоксилата II: 259
- 5-аминоимидазол-4-N-сукцинкарбоксиламида II: 259
- никотиновой кислоты II: 270-271
- 5-формиламидоимидазол-4-карбоксамида II: 259
- N'-5'-фосфорибозилформимино-5-аминоимидазол-4-карбоксамида II: 244
Рибонуклеотид-редуктаза II: 267-268
Рибонуклеотиды II: 255; III: 34-35
Рибосомная РНК (рРНК) III: 47-48, 149
Рибосомы III: 46, 49-50, 72, 97-99, 101-103, 157-158
- митохондрий III: 153
- реконструирование III: 98, 99
- эукариотические (80S) III: 152-153
Риботимидин III: 61
Рибофлавин II: 17
Рибофлавин-5'-фосфат II: 271
Рибофорины III: 157
D-Рибулоза I: 47
Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза II: 195-197, 203
Рибулозо-5-фосфат II: 96-100, 196, 197, 257
Рибулозо-5-фосфат-эпимераза III: 117
Рибулокиназа III: 117
Рилизинг-факторы II: 172
Риновирус III: 179
Рифампицин III: 61-62
РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза) III: 178, 190
- РНК-полимераза III: 178
РНК-затравка III: 31-32
РНК-матрица III: 46, 52
РНК-полимеразы III: 52-56, 146-147
РНК-репликаза III: 52, 178, 179
РНК-синтетаза III: 178
РНК-содержащие вирусы III: 178-179
-- опухолеродные III: 189-190
РНК-транскрипты III: 148-152
Родопсин III: 340-348
Ротенон II: 80, 81
рРНК *см.* Рибосомная РНК

Сакситоксин III: 328-330
Самосборка вирусов III: 168-176
- липидных бислоев I: 205
- рибосом III: 98
Саркозин III: 63
Сарколемма III: 260
Саркомер III: 261
Саркомы III: 186
Саркоплазма III: 260
Саркоплазматический ретикулум I: 209; III: 271
-- и транспорт Ca^{2+} III: 270, 311
Сателлитная ДНК III: 139, 140
Сахара II: 24-27, 132
- абсолютная конфигурация II: 25, 46, 47
- номенклатура III: 159
- транспорт III: 312-316
Сахароза II: 132
Свертывание крови I: 152, 166-176
-- каскад реакций I: 166-167
Свет, спектр поглощения I: 68. *См. также* Экстинкция
--- миоглобина и гемоглобина I: 59
--- родопсина III: 342
--- хлорофиллов II: 184
--- цветовых рецепторов III: 348
Световые реакции (фотосинтеза) II: 185, 187
Связь С—С I: 219-220
Седиментация III: 48
Седогептулозо-1,7-дифосфат II: 196
Седогептулозо-7-фосфат II: 97-98
Секвенатор I: 32
Селекционная теория III: 240
Серин I: 21, 22, 156-157, 202; II: 163, 168, 235
- связывание с сахарами I: 214, 216
Сериндегидратаза II: 163
Сериновые протеазы I: 157, 163, 165-166
Серотонин II: 248
Серповидноклеточная анемия I: 88-90, 94, 97-98
Сефадекс I: 25
Сиаловые кислоты II: 209
Симметрия вирусов III: 168
- во взаимодействии белков с нуклеиновыми кислотами III: 62, 125
--- репрессора с оператором III: 115-116
- рестрикции III: 178
Симпорт III: 312-314
Синапсы III: 330-331
- электронная микрофотография III: 326
Синаптическое тельце III: 340
Синаптосомы III: 331
Синтетазы II: 154; III: 87-90

Сквален II: 212, 214, 215, 217
Скваленоксид II: 217
Скелетные мышцы III: 260-262
β-Складчатыйслой I: 34-37
Скольжение филаментов III: 261-262, 267-269
Скорость ферментативной реакции максимальная (V_{max}) I: 112-113
Слепота ночная («куриная») III: 343
Слизевик III: 272, 273
Согласованная регуляция по типу обратной связи II: 245
Соединительная ткань I: 179
Солевые мостики I: 122
- (ионные) связи I: 77, 122
Соматическая рекомбинация III; 250, 252, 254-255
Соматические гипермутации III: 250
Соматостатин III: 213-214
Соматотропин (гормон роста) III: 283
Сопрягающий фактор (F_1) II: 83-84
Сопряжение, сопряженные реакции II: 9, 13, 79, 86-88, 92; III: 308-309
Сопряженная пара кислота-основание I: 45
D-Сорбоза II: 47
Спаривание оснований или гомологичных цепей ДНК III: 11-15, 19-20, 196, 198-200
Спектрин I: 213
α-Спирали I: 34-36, 55; III: 269. *См. также* Двойная спираль ДНК
- суперспирализованные I: 30, 36, 178, 183; III: 264
Спиртовое брожение II: 36
Сплайсинг III: 26, 61, 79, 81, 150-151, 249-253
Стеарат I: 220; II: 139
Стероидные гормоны II: 221-222; III: 298-300
-- врожденные нарушения II: 224
Стероиды кардиотонические III: 282, 309-310
Стоп-кодоны III: 76
Стрептомицин III: 105-107
Структурные гены III: 114
Стюарта фактор I: 175
Субмитохондриальные частицы II: 83
Субстрат *см.* Фермент-субстратные комплексы
Субстратные циклы II: 110-111
Субтилизин I: 105, 163-164
Субъединица I: 38
Сукцинат II: 116; III: 340
Сукцинат-дегидрогеназа I: 115; II: 32
Сукцинат-Q-редуктаза II: 75, 82
Сукцинилхолин III: 337-338
Сукцинил-CoA II: 31-32, 169, 248-250
Сукцинил-CoA—синтетаза II: 32
Сульфаниламид II: 279
Сульфгидрильный буфер II; 104
Сульфолипиды II: 184
Суперспирализация ДНК I: 183; III: 20-21
Сфингозин I: 203; II: 208, 209
Сфингомиелин I: 203, 204
Сшивки *см.* Поперечные связи
Сэнгера реактив I: 29
Табун III: 335, 336
D-Тагатоза II: 47
Талассемия III: 154-155
D-Талоза II: 46
Таурин II: 215
Таурохолат II: 215
Таутомеры III: 81
Твин III: 333
Тейхоевая кислота III: 223-224
Текучесть мембран I: 219-221
Темновые реакции (фотосинтеза) II: 185, 193, 195-196
Температура плавления ($T_{пл}$) I: 185
- сжатия (T_s) I: 185
- тела I: 88
Температурный переход мембраны I: 219-220
Теофиллин III: 286
Терминальная трансфераза III: 209
Терминация синтеза белка III: 104, 105
- транскрипции III: 55, 58-60, 74-76, 119, 154
Термодинамика II: 6
Термодинамическая стабильность I: 41
Терпены II: 226
Тестостерон II: 220, 223, 224; III: 299
Тетрагидробиоптерин II: 175
Тетрагидроптероилглутамат *см.* Тетрагидрофолят
Тетрагидрофолят II: 235-237, 257, 269
Тетраглициновый мостик III: 221
Тетрадеканат II: 139
Тетраиодтиронин II: 248
Тетракозаноат II: 139
Тетраоксипиримидин III: 295
Тетрапептид III: 219
Тетрапиррольное кольцо I: 48
Тетрациклин III: 107
Тетраэдрическое переходное состояние I: 159, 160
Тетродотоксин III: 328-330
Тетрозы II: 25, 46, 47
Тея-Сакса болезнь II: 210-211
Тиазолидиновое кольцо III: 224, 226
Тиамин *см.* Витамин B_1
Тиаминпирофосфат II: 55-56, 101-102
Тилакоиды II: 180, 184, 190, 194
Тимидилатсинтетаза II: 271
Тимидин (T) II: 255, 275; III: 6, 13, 14
- димеры III: 35, 37
Тимидин-5'-фосфат (TMP) (дезокситимидилат) II: 256, 257
Тиогалактозид-трансацетилаза III: 112
Тиоловые протеиназы I: 166
Тиоредоксин II: 267
Тиоредоксин-редуктаза II: 268
Тиоэфиры II: 40; III: 108
Тироглобулин III: 160
Тирозин I: 21, 22, 175, 176; II: 241; III: 152
- как предшественник нейромедиаторов III: 339
Тирозингидроксилаза III: 339
Тирозин-*О*-сульфат I: 168
Тироксин II: 248
Титрование I: 46
Тканевой фактор I: 174
Тозил-L-фенилаланинхлорметилкетон I: 157-158

α-Токоферол II: 18
Толстые нити III: 261-264, 266-267
-- реконструкция III: 266
Топоизомеразы III: 21
Торр I: 70
Транзиции III: 80-81
Трансальдолаза II: 96-98, 102-103
Трансамидаза I: 169
Трансамидирование I: 169
Трансаминазы II: 160
Трансаминирование II: 160-162
Трансверсии III: 80-81
Трансгликозилирование I: 144
Транскарбоксилаза II: 150
Транскетолаза II: 96-98, 101-102, 196
транс-КонформацияI: 219-220
Транскрипты *см.* РНК-транскрипты
Транскрипция III: 46-86, 112
- выбор цепи III: 53-56, 58-62
- с РНК III: 180-181
Транслоказы II: 86; III: 104, 156
Транслокация в белках III: 156-157
- в мРНК III: 103-104
- группы III: 314-316
- иммуноглобулиновых генов III: 249-250
Трансляция III: 46. *См. также* Белки, синтез
- лидерной мРНК III: 119-120
- направление III: 99-100
Трансмембранные каналы III: 320-322
Транспептидаза III: 225
Транспептидирование III: 223, 225
Транспозиция (перенос) генов III: 119, 206
Транспозоны III: 206
Транспорт *см.* Мембранный транспорт, Симпорт, Транслокация группы
- пассивный III: 304
- CO_2 у тропических растений II: 198
Транспортные антибиотики III: 316-320
- РНК (тРНК) III: 47-48, 61, 67-68, 90-95, 151-152
-- мутантные III: 95-97
-- связывание с рибосомами III: 72
Транссукцинилаза II: 59
Трансфераза II: 118
Трансферрин I: 18
Трансформация ДНК III: 7-10
- клеток III: 186-187, 192
D-Треоза II: 46
Треонин I: 21, 22; II: 169
- дезаминирование II: 163
- превращение в изолейцин I: 106; II: 243
- связывание с сахарами I: 214, 216
Треониндегидратаза II: 163
Треониндезаминаза I: 106; II: 243
Третичная структура I: 32
Три-N-ацетилглюкозамин I: 136-137
Триацилглицерол-синтетазный комплекс II: 205-206
Триацилглицеролы II: 138-140, 205
Трикарбоновые кислоты *см.* Цикл трикарбоновых кислот
1,3,7-Триметилксантин III: 286
Тринуклеотиды III: 72
Триозы II: 24, 46, 47
Триокиназа II: 133
Триоксикопростановая кислота (тригидроксикопростаноат) II: 215, 217
Трипсин I: 30, 105, 152, 161-165
Трипсиноген I: 165
Триптофан I: 21, 22; II: 241, 242; III: 71, 72, 75, 118, 121
Триптофанил-мРНК III: 119
Триптофановая мРНК (trp-мРНК) III: 118, 121
Триптофановый оперон III: 53, 59, 118-119, 121
-- клонирование III: 212
- репрессор III: 118, 119
Триптофансинтаза I: 108, 109, 114; II: 241; III: 77, 78
Тритон X I: 210
Трифосфатизомераза I: 114; II: 30
Трифосфопиридиннуклеотид (TNP) *см.* Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
Три-NAG *см.* Три-N-глюкозамин
тРНК *см.* Транспортные РНК
$тРНК_f$ *см.* Инициаторная РНК
$тРНК_m$ III: 100
Тромбин I: 105, 168-170
Тромбопластин I: 175
Тромбоциты I: 166; III: 271
Тропические растения II: 198-200
Тропоколлаген I: 179, 182
Тропомиозин III: 261, 269-270
Тропонин III: 261, 269-270
Тропониновые комплексы III: 269, 270
Т-трубочки (поперечные трубочки) III: 270, 271
d-Тубокурарин III: 337, 338
α-, β-Тубулин III: 276
Туникамицин III: 161
Тяжелые (H) цепи III: 238-239, 241-243, 253
Тяжелый меромиозин III: 264, 266, 267

Уабаин III: 311
Убихинон II: 75
Углекислый газ *см.* Диоксид углерода
Углеродные атомы II: 166-167, 212
Ультрафиолетовый свет III: 35
Умеренные фаги III: 120-125
Уникальные гены III: 144-145
Уотсона-Крика модель III: 11-14
Уравнение фотосинтеза II: 180-183, 186
Урацил II: 255, 257
- димеры III: 35-36
Урацил-ДНК-гликозидаза III: 37
Уреаза II: 275
Уреотелические организмы II: 164
Уридилат (уридинмонофосфат, UMP) II: 256, 257, 262-265
Уридилтрансфераза II: 247
Уридин (U) II: 255-257
Уридинтрифосфат (UTP) II: 264, 265
Уридинфосфат-N-ацетилглюкозамин (UDP-NAG) III: 220-223

Уридинфосфат-N-ацетилмуаровая кислота (UDP-NAM) III: 220-223
Уриказа II: 275
Урикотелические организмы II: 164
Уроканат II: 168
Уропорфириноген-синтаза II: 251
Уропорфириногены I и III II: 249-251
Усиление сигнала при фоторецепции III: 345
UDP-галактоза II: 134
UDP-галактозо-4-эпимераза II: 134
UDP-глюкоза II: 120-121, 134, 206
UDP-глюкозо-пирофосфорилаза II: 120-121
UDP-глюкуронат II: 252
UMP *см.* Уридилат (уридинмонофосфат)
UTP *см.* Уридинтрифосфат

Фаги III: 9
- кольцевая ДНК III: 184
- лизогенные III: 184-185
- трансдуцирующие III: 205
- умеренные III: 184
- F2 III: 182
- G4 III: 78
- Mu III: 202
- P22 III: 229
- T2 III: 9, 10, 19, 48-51
- T4 III: 171-176
- T7 III: 20, 55
- λ III: 18-20, 55, 120-124, 183-185, 202
-- генетическая карта III: 123
— как вектор III: 210-212
- φX174 III: 16-24, 53, 183
Фаговая конверсия III: 229
Факторы инициации III: 102, 155
- освобождения III: 104
- роста нервов (NGF) I: 19; III: 300-301
- свертывания крови I: 167, 175; II: 172; III: 152
- устойчивости III: 205
- F II: 83, 84; III: 201-206
- R III: 202, 205-206
- RTF III: 205
Фаллоидин III: 276
Фарадея число II: 74
Фарнезилпирофосфат II: 214
Фенилаланин I: 21; II: 175, 240, 241; III: 71
- при фенилкетонурии II: 176-178
Фенилаланингидроксилаза II: 175, 177-178
Фенилаланиновая тРНК III: 93
Фенилаланиновый оперон III: 122
Фенилизотиоцианат I: 30
Фенилкетонурия II: 177-178
Фенилпропионат II: 142
Фенилтиогидантоин (ФТГ-аминокислоты) I: 30-32
Фенилуксусная кислота II: 142
Феноксозановое кольцо III: 62, 64
Ферментативный катализ I: 104, 108-109, 136-144, 154-156
-- кинетика I: 114
Фермент-субстратные комплексы I: 102, 108-110, 148, 154-156
Ферменты I: 104-133; II: 283. *См. также* Активный центр и по названиям
- аденилированные II: 246
- взаимодействие с субстратом I: 108-110, 122-123, 148, 154-156. *См. также* Фермент-субстратные комплексы
- ковалентный комплекс с AMP II: 263; III: 26
- множественность II: 245
- рестрикции III: 38, 208-209
Ферредоксин II: 188-189, 231
Ферредоксин-$NADP^+$-редуктаза II: 189
Ферригемоглобин I: 45
Ферритин I: 18, 214
Феррицианид II: 187
Феррогемоглобин I: 49
Феррохелатаза II: 250
Ферроцианид II: 187
Фертильность *см.* Фактор F
Фибрин II: 167-169
Фибриновый сгусток I: 167
Фибриноген I: 167-168, 175
Фибринопептиды I: 168
Фибробласты III: 273
Фиброин шелка III: 144
Физостигмин III: 334, 336
Филаменты мышц III: 261-268
Фитоин II: 227
Фитольная боковая цепь II: 226
Флавикаденинди нуклеотид (FAD, $FADH_2$) II: 14-15, 52-53, 73, 84-85, 143, 275
Флавинмононуклеотид (FMN) II: 75, 271
Флагеллин III: 350
Флуорескамин I: 28
Фолиевая кислота II: 270
Формамид I: 10
Формилглицинамидинрибонуклеотид II: 258, 259
Формилметионил-тРНК (fMet-тРНК) III: 76, 87, 100-105
Формилметионин (fMet) III: 76, 100
N^{10}-формилтетрагидрофолят II: 236
Формил-L-триптофан I: 158, 159
N-Формилиминоглутамат II: 169
N^5-Формиминотетрафолят II: 236
Фосфагены III: 271
Фосфатаза II: 127
Фосфатидальхолин II: 208
Фосфатидат (фосфотидная кислота) II: 205, 206
Фосфатидилинозитол I: 203
Фосфатидилсерин I: 203; II: 206
Фосфатидилхолин I: 203, 204, 224; II: 207-209
Фосфатидилэтаноламин I: 203; II: 207-208
Фосфатидат I: 202
Фосфатные группы II: 11, 12, 72
Фосфаты высокоэнергетические II: 12
Фосфоангидридные связи II: 10
Фосфоаргинин III: 270, 271
Фосфоацилглицеролы I: 201-203; II: 206-207
3-Фосфогидроксипируват II: 235
Фосфогистидин III: 315
Фосфогликолат II: 199
2-Фосфоглицерат II: 32

3-Фосфоглицерат II: 31-32, 194-196, 235
Фосфоглицераткиназа II: 31-32
Фосфоглицеромутаза II: 32, 119
Фосфоглюкомутаза II: 118, 362
6-Фосфоглюконатдегидрогеназа II: 96, 97
6-Фосфоглюконо-δ-лактон II: 96
Фосфодиэстеразы II: 127; III: 285, 346-347
- змеиного яда III: 64
Фосфодиэфирная связь III: 6, 7, 23, 26-27
Фосфоенолпируват I: 32; II: 106-107, 239, 240
- в C_4-пути II: 198
- и активный транспорт III: 314-315
- при гликолизе II: 32
-- синтезе UDP-N-ацетилмурамовой кислоты III: 221
- свободная энергия гидролиза II: 12
Фосфоенопируват-карбоксикиназа II: 107
Фосфокреатин III: 270, 271
Фосфолипаза A_2 I: 165
Фосфолипазы II: 208, 210
Фосфолипиды I: 201-203
- влияние на свертывание крови I: 171-172
5-Фосфомевалонат II: 214
4'-Фосфопантетеин II: 272, 273
4'-Фосфопантотенат II: 272, 273
4'-Фосфопантотенилцистеин II: 272
Фосфопентозоизомераза II: 96-98, 196
3-Фосфо-5-пирофосфовалонат II: 213, 214
5'-Фосфорибозил-1-амин II: 258
N-5'-Фосфорибозилантранилат II: 241, 242
5-Фосфорибозил-1-пирофосфат (ФРПФ) II: 240, 242, 258, 261
Фосфорибомутаза II: 273
Фосфорибулозокиназа II: 196
Фосфорилаза II: 123-125, 130
Фосфорилирование II: 283
- и активный транспорт III: 307-308, 311, 314-316
-- регуляция активности ферментов II: 65, 123-127
- субстратное II: 32
Фосфорил-ферментные комплексы III: 335
Фосфорилхолин II: 207-208
Фосфорильная группа II: 27
Фосфорная кислота I: 202
Фосфоролиз II: 116
Фосфосерин I: 22, 23; II: 235
Фосфотрансферазная система III: 314-316
Фосфофруктокиназа II: 30, 33-35, 284
Фотодыхание II: 199, 200
Фотореактивирующий фермент III: 35
Фоторецепторы III: 340-349
Фотосинтез II: 180-203
Фотосинтезирующие бактерии II: 186, 200
Фотосинтетическая единица II: 184-185
Фотосистемы I и II II: 187-193
Фототрофы II: 10
Фотофосфорилирование II: 188, 192, 200-201
- циклическое II: 191, 193
Фрагменты иммуноглобулинов (F_{ab}, F_c) III: 237-239
Фруктоза II: 25-26, 47, 133
Фруктозо-1,6-бисфосфат II: 28, 30, 106, 107, 196
Фруктозо-6-фосфат II: 28-29, 106, 195-197
Фруктозо-1-фосфатный путь II: 133
α-D-Фруктофураноза II: 26
Фторацетат II: 63
Фторацетил-CoA II: 63
Фтордезоксиуридилат II: 269
5-Фтордезоксиуридин III: 189
Фтординитробензол I: 29
Фторурацил II: 269
Фторцитрат II: 63-64
Фумараза II: 53
Фумарат (фумаровая кислота) II: 52-53, 165, 169, 175, 176
4-фумарилацетоацетат II: 175
Фураноза II: 26
Фурье разностный метод I: 135
FAD, $FADH_2$ *см.* Флавинадениндинуклеотид
fMet *см.* Формилметионин
fMet-тРНК *см.* Формилметионил-тРНК
FMN *см.* Флавинмононуклеотид

Хаворта проекционные формулы II: 26
Хагемана фактор I; 175
Хеликаза *см.* Геликаза
Хемиосмотическая гипотеза II: 79
Хеморецепторы III: 349-350, 352
Хемотаксис у бактерий III: 349-353
Хемотрофы II: 10
Хендерсона-Хассельбалъха уравнение I: 45
Хилла коэффициент I: 72
- реакция II: 187
Хиломикроны II: 218
Химерная ДНК III: 208
Химическое сопряжение II: 79
Химотрипсин I: 153-159, 161-164
Химотрипсиноген I: 152-154, 160
Хиральность (RS) II: 62, 69
Хитин I: 133; II: 131
Хлорамфеникол III: 107
Хлоропласты II: 180, 181, 184
- ДНК в них III: 137-139
- рибосомы в них III: 153
Хлорофиллы II: 183-184
Холат натрия I: 210
Холекальциферол II: 223
Холерный токсин III: 156, 289
Холестерол II: 212-227. *См. также* Гиперхолестеролемия
- в клеточных мембранах II: 204, 221
Холил-CoA II: 215
Холин I: 202; II: 207-209; III: 331, 334
Холлидэя модель III: 201
Хондроитинсульфат I: 193, 195
Хоризмат II: 239-241
Хориокарциномы II: 270
Хроматин III: 128-133
Хроматография аффинная I: 25
- гель-фильтрация I: 25
- ионообменная I: 25

- на бумаге I: 92-93
Хромосомы (эукариотические) III: 127-165. *См. также* Политенные хромосомы
- типа ламповых щеток III: 127
Хромофор III: 341
Хрящ I: 194
Хэча-Слэка путь (C_4-путь) II: 198

Цветовая слепота III: 348
Цветовое зрение III: 347-348
Цвиттерионы I: 19
Целлюлаза II: 131
Целлюлоза II: 131
Центромеры III: 140
χ-Цепи III: 242, 249, 251
λ-Цепи III: 242, 251
Цепь переноса электронов II: 82, 222
Церамид II: 208-209
Цереброзиды I: 203, 204; II: 208
Цианид (CN^-) II: 80, 81, 171
Цианкобаламин II: 171
Цикл *Кальвина* II: 196-199
- мочевины II: 164-166
- трикарбоновых кислот II: 49-70, 284
--- связь с циклом мочевины II: 165
Циклический AMP *см.* Аденозин-3',5'-монофосфат
- GMP (cGMP) III: 345-347
Циклическое фотофосфорилирование II: 191
Циклогексимид III: 107, 152, 153
Циклопропановые жирные кислоты I: 223
Цинга I: 186-187
Цинк I: 144-146
Цис-аконитат II: 50, 51
Цис-вакценат II: 156
Цис-конфигурация I: 220
Цистационин II: 239
Цистациониназа II: 239
Цистационин-синтетаза II: 239
Цистеин I: 10, 21-24; II: 167, 168, 239; III: 71
Цистеиновая кислота I: 32
Цистин I: 24
Цистидин II: 255-257
Цитидиндифосфодиацилглицерол (CDP-диацилглицерол) II: 206-207
Цитидинмонофосфат (цитидилат, CMP) II: 206, 256, 257
Цитидинтрифосфат (CTP) II: 206-207, 264-266
Цитозин II: 255, 257; III: 6, 13, 14
- дезаминирование III: 36, 37
- спаривание с аденином III: 81, 82
Цитозинарабинозид III: 189
Цитохалазин B III: 276
Цитохром-*c*-оксидазный комплекс II: 76-78, 80-82
Цитохром(ы) *a* II: 76-78, 81, 82
- *b* II: 76-77, 81, 191
- *c* II: 76-78, 81, 82, 88-91, 191
- *f* II: 191
- P_{450} II: 222
Цитохромоксидаза II: 77
QH_2-Цитохром *c* II: 82
QH_2-Цитохром-*c*-редуктазный комплекс II: 76, 77, 80-82
Цитрат II: 34-35, 50, 51, 60, 155
Цитрат-лиаза II: 155
Цитрат-синтетаза II: 50
Цитрил-CoA II: 50
Цитруллин II: 164, 165
cAMP *см.* Аденозин-3',5'-монофосфат
CDP-диацилглицерол *см.* Цитидиндифосфодиацилглицерол
CTP *см.* Цитидинтрифосфат

Четвертичная структура I: 64, 76-77, 81
Число оборотов (фермента) I: 113-114

Шарнир в молекуле иммуноглобулинов III: 239
--- миозина III: 268
Шелковичный червь III: 144
Шикимат II: 240
Шиффово основание I: 190, 194; II: 39, 102-103, 161-162; III: 342, 343

Щавелевая кислота I: 118
Щавелевоуксусная кислота *см.* Оксалоацетат
Щавелевояблочная кислота *см.* Оксалосукцинат
Щелевые соединения III: 322-324
Щелочная фосфатаза III: 64
Щеточная каемка III: 275

Эволюция белков I: 69, 84
- дивергентная I: 163-164
- единичный период III: 129
- иммуноглобулинов III: 248-250, 253
- конвергентная III: 348
- молекулярная I: 101
Эдмана реакция (деградация по Эдману) I: 30-32
Эзерин III: 334
Эйкозаноат II: 139
Эйкозотетраеноат II: 139
Эйкозотриеноат III: 298
Экваториальные заместители II: 26, 27
Экдизон III: 148
3'—>5'-Экзонуклеаза III: 24-26
Экзонуклеазы III: 64
Экзоны III: 79, 145
Экстинкции коэффициент I: 68
Эластаза I: 152, 161
Эластин I: 192-193
Электрический орган III: 332
- угорь III: 332
Электрогенный насос III: 307-308
Электронная микроскопия II: 211, 221-222
- плотность I: 52-53, 58
Электроны, перенос и транспорт II: 14-16, 71-78, 81, 85, 87. *См. также* Цепь переноса электронов
- смещение I: 144, 148-149
Электростатические взаимодействия I: 122

Электрофорез I: 25, 26, 90-91
- в крахмальном геле I: 92
-- полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия I: 208-210, 213
Электрохимический потенциал III: 304
Элерса-Данлоса синдром I: 188
Элонгация III: 103-104, 106
- ДНК III: 23, 24
- жирных кислот II: 149, 151-153, 156
- РНК III: 52, 53
- факторы III: 103-104
Эмбдена-Мейергофа путь *см.* Гликолиз
Эмбриональные гемоглобины I: 75
- клетки и образование антител III: 250-251, 253
Эндонуклеаза (эндонуклеазы) III: 63, 64, 192
- активатор II: 237
- расщепление чужеродных ДНК III: 176
- рестрикции III: 176-178, 196
- УФ-специфичная III: 35
Эндоплазматический ретикулум II: 282; III: 156-161
Эндорфины III: 295-296
Эндоцитоз II: 219
Энергетические ресурсы организма II: 288-289
Энергетический заряд II: 20, 35, 65
Энергия (в биологических процессах) I: 12; III: 32-33
- активации I: 106-108
- извлечение II: 16-19
- метаболические источники II: 288-289
- перенос II: 185-186
- преобразование II: 91-92
- фотосинтеза II: 197
Энзим (фермент) II: 24
Энкефалины III: 297
Энтальпия II: 7
Энтеропептидаза I: 165
Энтропия II: 6-7
Эпидермальный фактор роста III: 300-301
Эпимеразы в обмене галактозы II: 134
-- пентозофосфатном пути *см.* Фосфопентозоизомеразы
Эпинефрин *см.* Адреналин
D-Эритроза II: 46
Эритромицин III: 107, 153
Эритропоэтическая порфирия II: 250
Эритрозо-4-фосфат II: 98, 196, 240
Эритроциты I: 48, 49, 209, 211-214
- плода I: 75
- тени III: 307
D-Эритрулоза II: 47
Эстрадиол II: 224; III: 299
Эстрогены II: 222-224
Эстрон И: 224; III: 299
Этанол I: 118. *См. также* Спиртовое брожение
Этаноламин I: 202
Этидий бромистый III: 39
Этиленгликоль I: 117-118
Этиленимин I: 47
Эукариоты III: 127
Эфирная связь I: 104, 155, 178

«Яблочный» фермент II: 155
Ядерная мембрана III: 127, 188
Ядовитые грибы III: 146, 276
Ядро III: 136
Ядрышко III: 141
Яды III: 335. *См. также* Грибной яд, Змеиный яд

ОГЛАВЛЕНИЕ

Часть IV. Информация

Глава 24. ДНК: генетическая роль, структура и репликация 6
24.1. Ковалентная структура и номенклатура ДНК **6**
24.2. Трансформация пневмококков с помощью ДНК показала, что гены состоят из ДНК **7**
24.3. Гены некоторых вирусов состоят из РНК **10**
244. Двойная спираль ДНК Уотсона-Крика **11**
24.5. Комплементарные цепи служат матрицами друг для друга при репликации ДНК **14**
24.6. Репликация ДНК полуконсервативна **15**
24.7. Некоторые вирусы содержат на определенных стадиях жизненного цикла одноцепочечную ДНК **16**
24.8. Молекулы ДНК очень длинные **18**
24.9. Двойная спираль может быть обратимо расплавлена **19**
24.10. Некоторые молекулы ДНК имеют кольцевую форму **20**
24.11. Кольцевые двухспиральные молекулы ДНК могут находиться в суперспирализованном состоянии **20**
24.12. Открытие ДНК-полимеразы **21**
24.13. ДНК-полимераза получает инструкции от матрицы **24**
24.14. ДНК-полимераза I исправляет ошибки в ДНК **24**
24.15. ДНК-лигаза соединяет фрагменты ДНК **26**
24.16. Открытие ДНК-полимераз II и III **27**
24.17. Расплетание родительской ДНК и синтез новой ДНК происходят в репликационной вилке **28**
24.18. Репликация ДНК начинается в строго определенном месте и продолжается последовательно в обоих направлениях **29**
24.19. Одна цепь ДНК синтезируется прерывисто **30**
24.20. Затравкой синтеза ДНК служит РНК **31**
24.21. Энергия гидролиза АТР используется для расплетания родительской ДНК в области репликационной вилки под действием белка гер **32**
24.22. ДНК-гираза вводит отрицательные супервитки в родительскую ДНК, чтобы облегчить ее расплетание **33**
24.23. Сложность аппарата репликации, по-видимому, необходима для обеспечения очень высокой надежности **33**
24.24. Повреждения ДНК постоянно репарируются **35**
24.25. Рак кожи при золотистой ксеродерме обусловлен нарушением нормальной репарации ДНК **35**
24.26. ДНК содержит тимин вместо урацила, что делает возможной репарацию дезаминированного цитозина **36**
24.27. Рестриктирующие эндонуклеазы совершили переворот в анализе ДНК **37**
24.28. Последовательность нуклеотидов в ДНК можно быстро определить с помощью специфического химического расщепления **39**
24.29. Полная последовательность оснований ДНК фага φX174 была определена с помощью метода ферментативной репликации **41**
Заключение **42**
Вопросы и задачи **45**

Глава 25. Информационная РНК и транскрипция 46
25.1. Структура РНК **46**
25.2. Клетки содержат три типа РНК: рибосомную, транспортную и информационную **47**
25.3. Формулирование концепции информационной РНК **48**
25.4. Экспериментальные данные о существовании информационной РНК-посредника в синтезе белка **49**
25.5. Опыты по гибридизации показали, что информационная РНК комплементарна кодиру-

ющей ее ДНК-матрице **50**
25.6. Рибосомные РНК и транспортные РНК также синтезируются на ДНК-матрице **51**
25.7. Все клеточные РНК синтезирует РНК-полимераза **52**
25.8. РНК-полимераза получает инструкции от ДНК-матрицы **53**
25.9. Обычно в данном участке генома транскрибируется только одна цепь ДНК **53**
25.10. РНК-полимераза *E. coli* состоит из субъединиц **54**
25.11. Транскрипция инициируется на промоторных участках матричной ДНК **55**
25.12. σ-Субъединица обеспечивает узнавание промоторных участков РНК-полимеразой **55**
25.13. Цепи РНК начинаются с pppG или pppA **56**
25.14. Цепи РНК синтезируются в направлении 5'—>3' **57**
25.15. Матричная ДНК содержит стоп-сигналы для транскрипции **58**
25.16. Белок р участвует в терминировании транскрипции **58**
25.17. Многие молекулы РНК после транскрипции расщепляются и химически модифицируются **60**
25.18. Антибиотики-ингибиторы транскрипции: рифамицин и актиномицин **61**
25.19. Разработаны совершенные методы определения последовательности нуклеотидов в РНК **62**
Заключение **63**
Вопросы и задачи **66**

Глава 26. Генетический код и зависимость между генами и белками 67
26.1. Транспортная РНК - адапторная молекула в синтезе белка **67**
26.2. Аминокислоты кодируются группами из трех оснований, начиная со строго определенной точки **68**
26.3. Расшифровка генетического кода: синтетические РНК могут служить информационными РНК **69**
26.4. Состав кодонов многих аминокислот был определен с помощью сополимеров в качестве матриц **71**
26.5. Тринуклеотиды способствуют связыванию определенных молекул тРНК с рибосомами **72**
26.6. Еще один инструмент расшифровки кода - сополимеры с определенной последовательностью **72**
26.7. Основные свойства генетического кода **75**
26.8. Сигналы инициации и терминации синтеза белка **76**
26.9. Генетический код универсален **76**
26.10. Последовательность оснований гена и последовательность аминокислот соответствующего полипептида коллинеарны **77**
26.11. Некоторые последовательности вирусных ДНК кодируют более одного белка **77**
26.12. Гены эукариот представляют собой мозаику из транслируемых и нетранслируемых последовательностей ДНК **78**
26.13. Мутации возникают в результате изменений последовательности оснований ДНК **80**
26.14. Некоторые химические мутагены весьма специфичны **81**
26.15. Многие мутагенные канцерогены можно выявить по их мутагенному действию на бактерии **82**
Заключение **84**
Вопросы и задачи **85**

Глава 27. Синтез белка 87
27.1. Аминокислоты активируются и присоединяются к транспортным РНК под действием специфических синтетаз **87**
27.2. Надежность синтеза белка определяется высокой специфичностью аминоацил-тРНК—синтетаз **89**
273. Молекулы транспортных РНК имеют общий план строения **90**
27.4. Транспортная РНК имеет L-образную форму **91**
27.5. В узнавании кодона участвует антикодон, а не активированная аминокислота **93**
27.6. Молекула транспортной РНК может узнавать более одного кодона благодаря «качаниям» **94**
27.7. Мутантные молекулы транспортных РНК могут подавлять другие мутации **95**
27.8. Рибосомы - органеллы, в которых происходит синтез белка,- состоят из большой и малой субчастиц **97**
27.9. Рибосомы можно реконструировать из составляющих их молекул белков и РНК **98**
27.10. Белки синтезируются в направлении от аминоконца к карбоксильному концу **98**
27.11. Информационная РНК транслируется в направлении 5'—>3' **99**
27.12. Одну молекулу мРНК одновременно транслирует несколько рибосом **100**
27.13. Синтез белка в бактериях инициируется формилметиониновой тРНК **100**
27.14. Сигналом инициации служит кодон AUG

(или GUG), которому предшествует несколько оснований, способных спариваться с 16S-рнк **101**
27.15. В результате образования инициирующего 70S-комплекса формилметиониновая тРНК связывается с Р-участком **102**
27.16. Фактор элонгации Tu доставляет аминоацил-тРНК в А-участок рибосомы **103**
27.17. После образования пептидной связи происходит транслокация **103**
27.18. Синтез белка терминируется факторами освобождения **104**
27.19. Многие белки модифицируются после трансляции **105**
27.20. Стрептомицин ингибирует инициацию и вызывает неправильное считывание информационной РНК **105**
27.21. Пуромицин вызывает преждевременную терминацию цепи, так как имитирует аминоацилированную транспортную РНК **107**
27.22. Некоторые короткие пептиды синтезируются без участия рибосом **107**
Заключение **109**
Вопросы и задачи **111**

Глава 28. Регуляция выражения гена в фенотипе 112
28.1. β-Галактозидаза - индуцибельный фермент **112**
28.2. Открытие регуляторного гена **113**
28.3. Оперон - единица координированной генетической экспрессии **114**
28.4. *lac*-Репрессор - тетрамерный белок **115**
28.5. Последовательность оснований в *lac*-операторе симметрична **115**
28.6. Циклический AMP стимулирует транскрипцию многих индуцибельных катаболических оперонов **116**
28.7. Различные формы одного и того же белка активируют и ингибируют транскрипцию арабинозного оперона **117**
28.8. Транскрипция триптофанового оперона регулируется и аттенюатором, и оператором **118**
28.9. Аттенюация опосредуется трансляцией лидерной мРНК **119**
28.10. Аттенюаторный участок гистидинового оперона содержит семь гистидиновых кодонов подряд **120**
28.11. Репрессоры и активаторы детерминируют развитие умеренных фагов **120**
28.12. Два оператора фага лямбда содержат ряд участков связывания репрессора **122**
28.13. λ-Репрессор регулирует собственный синтез **123**
Заключение **125**
Вопросы и задачи **126**

Глава 29. Эукариотические хромосомы и выражение генов у эукариот 127
29.1. Эукариотическая хромосома содержит одну молекулу двухспиральной ДНК **128**
29.2. Эукариотическая ДНК прочно связана с основными белками - гистонами **128**
29.3. Последовательности аминокислот в гистонах H3 и H4 почти одинаковы у всех животных и растений **129**
29.4. Нуклеосомы - повторяющиеся субъединицы хроматина **129**
29.5. Минимальная нуклеосома («ядро» нуклеосомы) состоит из ДНК длиной 140 пар оснований, намотанной на октамер гистонов **131**
29.6. Нуклеосома - первый уровень конденсации ДНК **133**
29.7. Репликация эукариотической ДНК начинается во многих местах и идет в двух направлениях **133**
29.8. Новые гистоны образуют новые нуклеосомы на отстающей дочерней нити ДНК **136**
29.9. Митохондрии и хлоропласты содержат собственную ДНК **137**
29.10. Эукариотическая ДНК содержит много повторяющихся последовательностей оснований **138**
29.11. Высокоповторяющаяся ДНК (сателлитная ДНК) локализована в центромерах **140**
29.12. Гены, кодирующие рибосомные РНК, расположены один за другим тандемно и повторяются несколько сот раз **140**
29.13. Гены гистонов собраны вместе и повторяются тандемно много раз **143**
29.14. Многие белки, синтезирующиеся в больших количествах, кодируются уникальными генами **144**
29.15. Большинство уникальных генов перемежается повторяющимися последовательностями **145**
29.16. Почти все гены высших эукариот, кодирующие белки, имеют разорванное строение **145**
29.17. РНК в эукариотических клетках синтезируется тремя различными РНК-полимеразами **146**
29.18. Грибной яд α-аманитин - мощный ингибитор РНК-полимеразы II **146**
29.19. Специфические гены могут активироваться для транскрипции **147**
29.20. Три вида рибосомных РНК образуются

в результате процессинга одного первичного транскрипта **148**
29.21. Информационные РНК избирательно образуются из больших ядерных предшественников РНК (гетерогенной ядерной РНК, гяРНК) **148**
29.22. На 5'-конце мРНК находятся «колпачки», а на 3'-конце, как правило, poly(A)-последовательности **149**
29.23. Ферменты сплайсинга с высокой точностью удаляют интроны из первичных транскриптов разорванных генов **150**
29.24. В настоящее время известны последовательности оснований многих информационных РНК 151
29.25. Эукариотическая рибосома (80S) состоит из малой (40S) и большой (60S) субчастиц **152**
29.26. Талассемия - генетически обусловленное нарушение синтеза гемоглобина **154**
29.27. Трансляция регулируется каскадом протеинкиназ, инактивирующим один из факторов инициации **155**
29.28. Дифтерийный токсин блокирует синтез белка у эукариот, ингибируя транслокацию **155**
29.29. Рибосомы, связанные с эндоплазматическим ретикулумом, синтезируют секреторные и мембранные белки **156**
29.30. Сигнальные последовательности позволяют секреторным белкам проходить через мембрану эндоплазматического ретикулума **157**
29.31. Присоединение сахарных остатков «ядра» к гликопротеинам происходит в эндоплазматическом ретикулуме при участии донора долихола **159**
29.32. Модификация и сортировка гликопротеинов происходит в аппарате Гольджи **161**
Заключение **163**

Глава 30. Вирусы 167
30.1. Оболочка мелких вирусов состоит из множества идентичных белковых субъединиц **167**
30.2. Самосборка вируса табачной мозаики (втм) **168**
30.3. При сборке вирусной частицы ВТМ белковые диски присоединяются к петле РНК **169**
30.4. Заражение фагом Т4 полностью перестраивает синтез макромолекул в клетке **171**
30.5. В упорядоченной сборке фага Т4 участвуют вспомогательные белки и протеазы **173**
30.6. В репликации фага Т4 участвует конкатемерный промежуточный продукт **174**
30.7. ДНК фага Т4 вводится в предобразованную головку **175**
30.8. Гибкость белка оболочки ВККТ позволяет ему образовывать икосаэдрический капсид **176**
30.9. Бактериальные рестрикционные эндонуклеазы расщепляют чужеродные молекулы ДНК **176**
30.10. Стратегия репликации РНК-содержащих вирусов **178**
30.11. Белки вируса полиомиелита образуются путем множественного расщепления гигантского предшественника **179**
30.12. С геномной РНК вируса везикулярного стоматита транскрибируется пять моноцистронных мРНК **180**
30.13. Геном реовируса состоит из десяти различных молекул двухцепочечной РНК **181**
30.14. Мелкие РНК-содержащие фаги содержат перекрывающиеся гены **182**
30.15. Дарвиновская эволюция фаговой РНК вне клетки **183**
30.16. Лизогенные фаги могут включать свою ДНК в состав ДНК клетки-хозяина **184**
30.17. Ретровирусы и некоторые ДНК-содержащие вирусы могут вызывать рак у чувствительных клеток-хозяев **186**
30.18. Вирусы SV-40 и полиомы могут вызывать продуктивную инфекцию или трансформацию клеток-хозяев **187**
30.19. Ретровирусы содержат обратную транскриптазу, которая синтезирует двухспиральную ДНК, используя в качестве матрицы (+)РНК **189**
30.20. Ретровирусная ДНК транскрибируется только в том случае, если она интегрирована с геном клетки-хозяина **190**
30.21. Киназа, кодируемая геном *src* вируса саркомы птиц, участвует в трансформации **191**
30.22. Двухцепочечная РНК подавляет синтез белка в клетках, обработанных интерфероном **192**
Заключение **193**

Глава 31. Перестройки генов: рекомбинация, транспозиция и клонирование 196
31.1. В основе генетической рекомбинации лежат разрыв и воссоединение цепей ДНК **196**
31.2. При генетической рекомбинации происходит спаривание гомологичных цепей ДНК с образованием двухцспочсчного промежуточного продукта **198**
31.3. Белок recA катализирует АТР-зависимый обмен цепей ДНК при генетической рекомбинации **200**
31.4. Бактерии содержат плазмиды и другие

подвижные генетические элементы **200**
31.5. Фактор F позволяет бактериям передавать гены реципиентам путем конъюгации **201**
31.6. Плазмиды факторы R придают бактериям устойчивость к антибиотикам **205**
31.7. IS-элементы могут присоединяться к неродственным генам **206**
31.8. В лаборатории можно сконструировать новые геномы и клонировать их в клетках-хозяевах **207**
31.9. Ферменты рестрикции и ДНК-лигаза - необходимые инструменты для получения рекомбинантных молекул ДНК **208**
31.10. Плазмиды и фаг лямбда - наиболее подходящие векторы для клонирования ДНК в бактериях **210**
31.11. Из суммарной геномной ДНК, расщепленной рестриктирующими эндонуклеазами, можно выделить с помощью клонирования определенные эукариотические гены **211**
31.12. Эукариотические гены могут транскрибироваться в бактериальных клетках **212**
31.13. Химически синтезированный ген пептидного гормона соматостатина экспрессируется в клетках *E. coli* **213**
31.14. Перспективы клонирования генов **214**
Заключение **215**

Часть V. Молекулярная физиология

Глава 32. Оболочки бактериальных клеток 218
32.1. Клеточная стенка - это огромная мешковидная макромолекула **219**
32.2. Стадии синтеза пептидогликана **220**
32.3. Синтез UDP-углевод-пептидного звена **220**
32.4. Перенос углевод-пептидного звена на липидный переносчик **220**
32.5. Синтез дисахарид-пептидного звена, прикрепленного к липидному переносчику **221**
32.6. Перенос дисахарид-пептидного звена на растущую полисахаридную цепь **222**
32.7. Поперечные мостики между полисахаридными цепями образуются в реакции транспептидирования **223**
32.8. У грам-положительных бактерий пептидогликан покрыт тейхоевой кислотой **223**
32.9. Пенициллин вызывает гибель растущих бактерий, ингибируя синтез клеточных стенок **224**
32.10. Пенициллин блокирует синтез клеточных стенок путем ингибирования реакции транспептидирования **225**
32.11. Некоторые бактерии резистентны к пенициллину, так как синтезируют разрушающий его фермент **225**
32.12. Грам-отрицательные бактерии окружены наружной мембраной, богатой липополисахаридами **226**
32.13. Благодаря разнообразию О-боковых цепей грам-отрицательные бактерии противостоят защитным силам организма-хозяина **228**
32.14. Порин образует в наружной мембране каналы для небольших полярных молекул **229**
32.15. Новообразованные белки наружной мембраны содержат отщепляемую сигнальную последовательность **230**
Заключение **231**

Глава 33. Иммуноглобулины 234
33.1. Основные определения **234**
33.2. Синтез специфических антител в ответ на антиген **235**
33.3. Участки антител, связывающие антиген, подобны активным центрам ферментов **236**
33.4. Препараты антител с определенной специфичностью обычно гетерогенны **237**
33.5. При ферментативном расщеплении иммуноглобулина G образуются активные фрагменты **237**
33.6. Иммуноглобулин G состоит из L- и H-цепей **238**
33.7. Иммуноглобулин G - гибкая Y-образная молекула **239**
33.8. Антитела под действием отбора или инструкции образуются **240**
33.9. Конец инструктивной теории **240**
33.10. Иммуноглобулины миеломы и гибридомы гомогенны **240**
33.11. Каждая L- и H-цепь состоит из вариабельного и константного участков **241**
33.12. Участок связывания антигена образован гипервариабельными фрагментами L- и H-цепей **243**
33.13. Вариабельная и константная области выполняют разные функции **243**
33.14. Молекулы антител уложены с образованием компактных доменов, имеющих гомологичные последовательности **244**
33.15. Рентгеноструктурный анализ связывающих участков антител показал, как происходит связывание некоторых гаптенов **245**
33.16. Разные классы иммуноглобулинов различаются по биологической активности **246**
33.17. Молекулы антител возникли в результате дупликации и последующей дивергенции генов **248**
33.18. Вариабельные и константные области ко-

дируются разными, но соединившимися генами **249**
33.19. Как возникает разнообразие специфичности антител? **250**
33.20. Вариабельные участки L- и H-цепей кодируются несколькими сотнями генов **250**
33.21. Открытие генов *J* (соединяющих) - дополнительного источника разнообразия антител **251**
33.22. Соединение генов *V* и *J* в различных рамках также способствует разнообразию антител **252**
33.23. мРНК для L- и H-цепей образуются путем сращивания (сплайсинга) первичных продуктов транскрипции **252**
33.24. Разные классы антител образуются в результате перескока генов $V_н$ **253**
33.25. Разнообразие антител обусловлено соматической рекомбинацией многих генов клеток зародышевого пути и соматической мутацией **254**
33.26. Клонально-селекционная теория образования антител **255**
33.27. На поверхности клеток, продуцирующих антитела, имеются рецепторы антигенов **256**
33.28. Биологическое значение клональной селекции **257**
Заключение **257**

Глава 34. Мышечное сокращение и подвижность клеток 260
34.1. Мышца состоит из взаимодействующих друг с другом толстых и тонких белковых нитей **260**
34.2. При мышечном сокращении происходит скольжение толстых и тонких нитей относительно друг друга **261**
34.3. Миозин образует толстые нити; он гидролизует АТР и связывает актин **262**
34.4. Миозин можно расщепить на активные фрагменты **264**
34.5. Актин образует нити, которые соединяются с миозином **265**
34.6. Актин повышает АТР-азную активность миозина **265**
34.7. Толстые и тонкие нити мышечного волокна определенным образом ориентированы **266**
34.8. Полярность толстых и тонких нитей в середине саркомера меняется на противоположную **267**
34.9. «Рабочим ходом» является поворот связанной с актином S1-головки миозина **267**
34.10. Тропонин и тропомиозин опосредуют регуляторное действие ионов кальция на мышечное сокращение **269**
34.11. Поток ионов Ca^{2+} регулируется саркоплазматическим ретикулумом **270**
34.12. Фосфокреатин - форма запасания ~P **270**
34.13. Актин и миозин служат сократительными элементами почти во всех эукариотических клетках **271**
34.14. Распределение микрофиламентов в клетке выявляется методом иммунофлуоресцентной микроскопии **272**
34.15. Прикрепленные к мембране нити актина опосредуют сокращение микроворсинок кишечника **274**
34.16. Цитохалазин и фаллоидин тормозят подвижность, сопряженную с процессами сборки и дезагрегации нитей актина **276**
34.17. Микротрубочки участвуют в различных видах клеточной подвижности и частично формируют цитоскелет **276**
34.18. Биение ресничек и движение жгутиков обусловлено скольжением микротрубочек, индуцированным динеином **277**
Заключение **279**

Глава 35. Действие гормонов 282
35.1. Открытие циклического AMP - посредника в действии многих гормонов **282**
35.2. Циклический AMP синтезируется аденилатциклазой и расщепляется фосфодиэстеразой **285**
35.3. cAMP служит вторым посредником при действии многих гормонов **285**
35.4. Сопряжение рецепторов гормонов с аденилатциклазой осуществляется белком, связывающим гуаниннуклеотиды **286**
35.5. Циклический AMP активирует протеинкиназы **287**
35.6. Циклический AMP - эволюционно древний сигнал голодания **288**
35.7. Холерный токсин стимулирует аденилаткиназу, ингибируя GTPазную активность G-белка **289**
35.8. Инсулин стимулирует анаболические процессы и ингибирует катаболические процессы **290**
35.9. Препроинсулин и проинсулин - предшественники активного гормона **290**
35.10. Трехмерная структура инсулина **292**
35.11. Рецепторы инсулина локализованы в плазматической мембране клеток-мишеней **293**
35.12. Недостаточность инсулина вызывает диабет **294**
35.13. Эндорфины - пептиды мозга, действующие

подобно опиатам **295**
35.14. При расщеплении проопиокортина образуется несколько пептидных гормонов **296**
35.15. Простагландины - модуляторы действия гормонов **297**
35.16. Простагландины образуются из ненасыщенных жирных кислот **298**
35.17. Стероидные гормоны активируют специфические гены **298**
35.18. Белковые факторы роста типа ФРН и ЭФР стимулируют пролиферацию клеток-мишеней **300**
Заключение **301**

Глава 36. Мембранный транспорт 304
36.1. Различие между пассивным и активным транспортом **304**
36.2. Открытие системы активного транспорта ионов натрия и калия **305**
36.3. И фермент, и насос ориентированы в мембране **307**
36.4. АТР преходяще фосфорилирует натрий-калиевый насос **307**
36.5. Транспорт ионов и гидролиз АТР тесно сопряжены **308**
36.6. Натрий-калиевый насос - олигомерный трансмембранный белок **308**
36.7. Модель механизма действия натрий-калиевого насоса **309**
36.8. Кардиотонические стероиды - специфические ингибиторы ($Na^+ + K^+$)-АТРазы и ($Na^+ + K^+$)-насоса **309**
36.9. Транспорт кальция осуществляется другой АТРазой **311**
36.10. Поток Na^+ обеспечивает энергией активный транспорт сахаров и аминокислот в животных клетках **312**
36.11. Поток протонов служит движущей силой во многих процессах транспорта у бактерий **313**
36.12. Активный транспорт ряда сахаров сопряжен с их фосфорилированием **314**
36.13. Транспортные антибиотики повышают ионную проницаемость мембран **316**
36.14. Транспортные антибиотики функционируют либо как подвижные переносчики, либо как каналообразователи **317**
36.15. Антибиотики-переносчики имеют форму скорлупы ореха и связывают ионы в своей центральной полости **318**
36.16. Валиномицин связывает K^+ в 1000 раз прочнее, чем Na^+ **319**
36.17. Можно выявить поток ионов через единичный канал в мембране **320**
36.18. Через щелевые соединения ионы и небольшие молекулы перетекают из клетки в клетку **322**
Заключение **324**

Глава 37. Возбудимые мембраны и сенсорные системы 326
37.1. Потенциалы действия опосредованы кратковременными изменениями проницаемости для Na^+ и K^+ **326**
37.2. Тетродотоксин и сакситоксин блокируют натриевые каналы в мембранах аксонов нервных клеток **328**
37.3. Ацетилхолин является нейромедиатором **330**
37.4. Ацетилхолин открывает в постсинаптической мембране каналы для катионов **331**
37.5. Ацетилхолин высвобождается квантами **331**
37.6. При добавлении ацетилхолина реконструированные мембранные пузырьки становятся проницаемыми для катионов **332**
37.7. Ацетилхолин быстро гидролизуется, и концевая пластинка реполяризуется **334**
37.8. Ингибиторы ацетилхолинэстеразы используются как лекарственные средства и как яды **334**
37.9. Разработка антидота для лечения отравлений органическими фосфатами **336**
37.10. Ингибиторы ацетилхолинового рецептора **337**
37.11. К числу нейромедиаторов относятся также катехоламины и γ-аминомасляная кислота (ГАМК) **338**
37.12. Для возбуждения палочки сетчатки глаза достаточно одного фотона **340**
37.13. Родопсин - фоторецепторный белок палочек **340**
37.14 Свет вызывает изомеризацию 11-*цис*-ретиналя **343**
37.15. Свет вызывает гиперполяризацию плазматической мембраны наружного сегмента палочек **344**
37.16. Медиаторы передают сигнал от фотолизированного родопсина на плазматическую мембрану **345**
37.17. Свет снижает содержание циклического GMP путем активации фосфодиэстеразы **346**
37.18. Цветовое зрение опосредуется фоторецепторами трех типов **347**
37.19. 11-*цис*-ретиналь - хромофор всех известных органов зрения **348**
37.20. Хеморецепторы бактерий воспринимают специфические молекулы и передают сигналы

на жгутики **349**
37.21. В основании бактериального жгутика находится вращающий его реверсивный «мотор» **350**
37.22. Бактерии различают временной градиент, а не одномоментный пространственный градиент концентраций **351**
37.23. При бактериальном хемотаксисе передача информации обеспечивается метилированными белками **352**
Заключение **353**
Ответы на вопросы и задачи **356**
Приложения 358
Приложение А. Физические константы и перевод единиц из одной системы в другую 358
Приложение Б. Порядковые номера и атомные массы элементов **359**
Приложение В. Значение *pK′* для ряда кислот **360**
Приложение Г. Стандартные длины связей **360**
Приложение Д. Стандартные сокращения, принятые в биохимии **361**
Предметный указатель **362**

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:
129820, Москва, И-110, ГСП
1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир».

Люберт Страйер
БИОХИМИЯ, ТОМ 3

Ст. научн. редактор Л. Г. Тер-Саркисян
Мл. научн. редактор О. А. Горгун
Художник И. Б. Кравцов
Художественный редактор Л. М. Кузнецова
Технический редактор З. И. Резник
Корректор М. А. Смирнов

ИБ № 3853

Сдано в набор 24.01.84.
Подписано к печати 6.08.85.
Формат 70 х 100/16.
Бумага офсетная № 1.
Гарнитура тайме. Печать офсетная.
Объем 12,5 бум.л. Усл. печ.л. 32,5.
Усл.кр.-отт. 130,54. УЧ.-ИЗД.Л. 37,22.
Изд. № 4/2707. Тираж 17100 экз. Зак. 97.
Цена 3 р. 70 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»
Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Можайский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
143200, г. Можайск, ул. Мира, 93.

Замеченные опечатки

Страница	Колонка	Строка	Напечатано	Следует читать
			Том I	
76 (подпись к рис. 4.11)		5 сн.	$\alpha_2\beta_1$-контактов	$\alpha_1\beta_2$-контактов
173	Левая	3 сн.	Халдейн	Холдейн
196	(подпись к рис. 9.27)	1-3 сн.	North-Holland, 1975, p. 105. Заказ 667. стр. 33-38 Голдобина С.	North-Holland, 1975, p. 105
			Том II	
72	Левая	13 сн.	Съёстранд	Шестранд
88	Правая	17 сн.	Дикерсон	Диккерсон
96	Левая	8-я св.	Дикенс	Диккенс
200	»	8 сн.	Стекениус	Стеккениус
201	»	17 св.	»	»
273	Правая	5 сн.	Аллантоевую	Аллантоиновую

Шлегель Г. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Пер. 6-го нем. изд.- М.: Мир, 1987- 38л., ил.- В пер.: 3 р.

Книга представляет собой перевод шестого издания популярного в ФРГ учебника микробиологии, в котором четко, ясно и компактно изложены современные сведения об организации и жизнедеятельности микроорганизмов. Шестое издание значительно переработано и дополнено по сравнению со вторым, выпущенным в 1972 году издательством «Мир».

Для микробиологов - научных сотрудников и работников микробиологической промышленности, преподавателей и студентов биологических факультетов.