

Molecular Biology of **THE CELL** Fifth Edition

REFERENCE EDITION

Bruce Alberts

Alexander Johnson

Julian Lewis

Martin Raff

Keith Roberts

Peter Walter

With problems by

John Wilson

Tim Hunt

Брюс Альбертс
Александр Джонсон
Джулиан Льюис
Мартин Рэфф
Кейт Робертс
Питер Уолтер

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

5-е издание

Том 1

С задачами

Джона Уилсона
Тима Ханта

УДК
ББК

Альбертс Б. и др.

Молекулярная биология клетки. — М.—Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, 2012. — 2000 с.

ISBN 978-0-8153-4111-6 (англ.)

ISBN 978-5-93972-???-?

© НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2012

Предисловие

Во многих отношениях мы знаем устройство Вселенной лучше, чем механизмы функционирования живых клеток. Ученые могут вычислить возраст Солнца и предсказать день, в который оно померкнет, однако до сих пор никто не сумел объяснить, почему человек может прожить восемьдесят лет, а мышь — всего лишь два года. Нам известны полные последовательности геномов этих двух и многих других биологических видов, но, несмотря на это, мы еще не научились предсказывать, как поведет себя клетка, если мы вызовем в ней мутацию того или иного еще не исследованного гена. Звезды могут быть в 10^{43} раз крупнее клеток, но клетки обладают более тонкой структурой и являют собою более сложные и более удивительные воплощения законов физики и химии. Подчиняясь законам наследственности и действию естественного отбора, царящим на Земле с момента зарождения жизни и до сего дня, то есть около 20% возраста Вселенной, живые клетки постепенно совершенствовали свои молекулярные машины, расширяли их спектр и записывали результаты своих экспериментов в генетических инструкциях, которые передавали потомству.

С каждым новым изданием этой книги мы удивляемся тому объему новой информации, которую цитологи успевают собрать всего за несколько лет. Но, пожалуй, еще более нас поражает и покоряет искусное устройство механизмов, с которыми мы встречаемся. Чем глубже мы проникаем в клетку, тем сильнее осознаем, как много нам еще предстоит узнать. Когда наивными юнцами мы только ступили на стезю клеточной биологии, мы провозглашали идентификацию отдельного белка — скажем, сигнального рецептора, — величайшим свершением науки, о чем теперь вспоминаем с улыбкой, заглядывая в первое издание этой книги. Теперь мы понимаем, что в большинстве своем белки, как правило, входят в состав комплексов и в виде единой системы работают совместно со многими другими белками, посредством тонких механизмов регулируя действия друг друга, и, благодаря наличию связи с белками цитоскелета, удерживаются в точно отведенной им позиции, что придает такого рода химическим фабрикам определенную пространственную структуру. Секвенирование генома снабдило нас практически полными молекулярными каталогами по устройству множества различных организмов; генетика и биохимия рассказали нам многое о том, на что способны все эти молекулярные комплекты в отдельности, а также об их взаимных симпатиях и антипатиях; однако же при этом мы имеем лишь самое примитивное представление о динамике таких биохимических систем со всеми хитросплетениями сети их централизованного управления. Поэтому каждый раз рассказывая читателю о крупных достижениях клеточной биологии, мы с глубочайшим трепетом относимся к тем еще выше вздымающимся вершинам, которые цитологам предстоит покорить в будущем.

В это издание мы включили новый материал по многим темам: от эпигенетики, модификации гистонов, малых РНК и сравнительной геномики до генетического шума, динамики цитоскелета, управления клеточным циклом, апоптоза, стволовых клеток и новейших методов лечения рака. Как и во всех предыдущих изданиях, мы постарались прежде всего дать читателю концептуальную основу, дабы упрочить

его положение в том море информации о клетках, в которое мы сейчас погружены. Такой посыл означает уход от тривиальной декламации фактов. Наша цель состоит в том, чтобы показать читателю возможности применения этих фактов — для уяснения, предсказания и управления поведением живых систем.

Чтобы помочь читателям на пути активного освоения предмета, мы впервые поместили в конце глав задачи, написанные Джоном Уилсоном и Тимом Хантом (John Wilson и Tim Hunt). Особое значение в них уделено количественному подходу и искусству построения умозаключений по результатам эксперимента. В сопроводительном к основному изданию² «Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition: The Problems Book» (ISBN: 978-0-8153-4110-9) тех же авторов приведены подробные ответы на эти задачи, а также содержится более 1700 дополнительных задач и решений к ним.

Следующий атрибут основной книги — вложенный в нее DVD-диск. На нем находятся сотни фильмов и анимаций, в том числе много новых, впервые представленных в этом издании; показывая клетки и клеточные процессы в действии, они назидательно скрашивают чтение этого фолианта; теперь в диск включены все рисунки и таблицы из основной книги, заранее вставленные в презентации PowerPoint®. В числе прочих вспомогательных материалов, выпущенных в дополнение к нашей книге, имеется банк тестовых вопросов и конспектов лекций, предназначенный преподавателям соответствующей квалификации для успешного проведения практических занятий, и набор из 200 многоцветных диапозитивов.

Мы предвидим, что различным категориям читателей разные части этой книги понадобятся в разной степени. Так, исследовательские центры, лаборатории и библиотеки пожелают иметь полный набор глав в едином печатном томе — как в «Reference Edition» (в «Основном издании» англоязычной версии) англоязычной версии. Тем, кто предпочтет иметь главы, образующие остов книги, в несколько более транспортабельной форме, предлагается «Student Edition», содержащее главы 1–20 в печатном виде, а главы 21–25 (по многоклеточным системам) — в электронной (PDF) форме на сопровождающем диске.

Полное описание условных обозначений, принятых в данной книге, приведено в разделе «Примечания для читателя», который следует за этим предисловием. В нем мы объяснили наш подход, которого мы придерживаемся при написании названий генов в организмах различных видов: во всех главах этой книги мы используем единый стиль, вне зависимости от вида организма, и зачастую действуем вопреки общепринятым и установленным для каждого биологического вида нормам.

Как и раньше, при каждом переиздании этой книги мы остаемся в неоплатном долгу перед многими людьми. Все благодарности за научную помощь приведены в отдельном разделе, но здесь мы должны особо отметить тех, кто внес исключительно важный вклад в это издание: Джулия Териот (Julie Theriot) взяла на себя практически полную ответственность за главы 16 («Цитоскелет») и 24 («Патогены, инфекция и врожденный иммунитет»), Дэвид Морган (David Morgan) почти всецело отвечает за главу 17-ю («Клеточный цикл»). Уоллиса Маршалл (Wallace Marshall) и Лаура Аттарди (Laura Attardi) оказали огромную помощь при написании соответственно глав 8 и 20, Мейнард Ольсон (Maynard Olson) — раздела **«Эволюция геномов»** главы 4, Сюдун Ван (Xiaodong Wang) — главы 18, а Николас Харберд

² Эта и приводимая в последующих двух абзацах информация относится только к оригинальному изданию «Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition», поэтому весь дополнительный материал к «Основному изданию» (Reference addition) здесь и далее приведен на языке оригинала.

(Nicholas Harberd) — раздела «**Передача сигналов у растений**» главы 15.

Мы многим обязаны также сотрудникам издательства Garland Publishing и всем, кто помогал воплотить усилия авторов, надеемся, в безукоризненный конечный продукт. Дэнис Шанк (Denise Schanck) руководил всем проектом и наставлял своих коллег на верный путь с присущей ему мудростью, опытом и добротой. Нигель Орме (Nigel Orme) со свойственным ему талантом придавал иллюстрациям законченную форму и приглядывал за внешним видом книги, включая и заднюю обложку переплета. Мэтью Клементс (Matthew Clements) разработал макет книги и дизайн передней обложки. Эмма Джеффкок (Emma Jeffcock) с необычайной скоростью и невозмутимой деловитостью распланировала страницы, с безукоризненной точностью внося в них неисчислимые исправления. Майкл Моралес (Michael Morales) ловко воплотил множество анимаций, видеоклипов и других материалов в удобный для пользователя DVD-диск. Элеонора Лоренс (Eleanor Lawrence) и Шерри Гранум (Sherry Granum) обновили и расширили словарь специальных терминов. Джекки Харбор (Jackie Harbor) и Сигрид Мессон (Sigrid Masson) дисциплинировали нас и не позволяли нам отлынивать от работы. Адам Сендрофф (Adam Sendroff) держал нас в курсе нужд и чаяний наших читателей, сообщая нам их пожелания и отзывы. Марджори Андерсон (Marjorie Anderson), Брюс Гютли (Bruce Goatly) и Шерри Гранум (Sherry Granum) заботливо вычесывали досадные репы ошибок из густословия нашей рукописи; их стараниями из текста были изъяты многие неясности, погрешности и помарки. Мы благодарим их всех не только за профессионализм, преданность и работоспособность, далеко превосходящую нашу собственную, но также и за неизменную предупредительность и дружелюбие: работу над книгой они превратили в настоящее удовольствие.

Наконец, но с не меньшей признательностью, мы выражаем свою благодарность нашим супругам, семьям, друзьям и коллегам. Без их терпения и неустанной поддержки мы, скорее всего, не произвели бы на свет ни одного издания этой книги.

Краткое содержание

Предисловие.....	2
Краткое содержание.....	5
Дополнительный иллюстративный материал.....	7
Содержание.....	9
Благодарности.....	72
Примечания для читателя.....	85
Часть I. Введение в мир клетки.....	91
Глава 1. Клетки и геномы.....	91
Глава 2. Химия клетки и биосинтез.....	175
Глава 3. Белки.....	334
Часть II. Основные генетические механизмы.....	429
Глава 4. ДНК, хромосомы и геномы.....	429
Глава 5. Репликация, восстановление и рекомбинация ДНК.....	530
Глава 6. Клеточные механизмы считывания генома: от ДНК к белку.....	626
Глава 7. Управление экспрессией генов.....	740
Часть III. Лабораторные методы.....	878
Глава 8. Манипулирование белками, ДНК и РНК.....	878
Глава 9. Визуализация клеток.....	1001
Часть IV. Внутренняя организация клетки.....	1057
Глава 10. Структура мембраны.....	1057
Глава 11. Перенос маленьких молекул через мембраны и электрические свойства мембран.....	1104
Глава 12. Внутриклеточные полости и сортировка белков.....	1175
Глава 13. Внутриклеточное везикулярное движение.....	1256
Глава 14. Преобразование энергии: митохондрии и хлоропласты.....	1354
Глава 15. Обмен информацией между клетками.....	1454
Глава 16. Клеточный скелет.....	1589
Глава 17. Клеточный цикл.....	1721
Глава 18. Апоптоз.....	1813

Часть V. Клетки в контексте их совокупности.....	1837
Глава 19. Межклеточные переходы, адгезия клеток и внеклеточный матрикс....	1837
Глава 20. Рак.....	1953
Глава 21. Половое размножение: мейоз, зародышевые клетки и оплодотворение.....	2061
Глава 22. Развитие многоклеточных организмов.....	2114
Глава 23. Специализированные ткани, стволовые клетки и восстановление (обновление) тканей.....	2288
Глава 24. Патогены, инфекция и врожденный иммунитет	2398
Глава 25. Система приобретенного иммунитета	2484
Словарь терминов.....	2588
Предметный указатель	2710
Приложение	2933

Дополнительный иллюстративный материал

- Таблица 1.1. Некоторые секвенированные геномы. Стр. **18**
- Таблица 1.2. Количество общих для всех трех надцарств живого мира семейств генов, сгруппированных в соответствии с выполняемыми ими функциями Стр. **24**
- Таблица 2.1. Ковалентные и нековалентные химические связи. Стр. **53**
- Таблица 2.2. Соединения, из которых образована бактериальная клетка. Стр. **55**
- Таблица 2.3. Приблизительный химический состав типичной клетки бактерии и типичной клетки млекопитающего. Стр. **63**
- Таблица 2.4. Соотношение между стандартным изменением свободной энергии ΔG° и константой равновесия. Стр. **77**
- Приложение 2.1. Химические связи и группы, часто встречающиеся в биомолекулах. Стр. **106–107**
- Приложение 2.2. Вода и ее влияние на поведение биомолекул. Стр. **108–109**
- Приложение 2.3. Основные типы слабых нековалентных связей в макромолекулах. Стр. **110–111**
- Приложение 2.4. Основные сведения о сахарах, встречающихся в клетках. Стр. **112–113**
- Приложение 2.5. Жирные кислоты и прочие липиды. Стр. **114–115**
- Приложение 2.6. Краткий обзор нуклеотидов. Стр. **116–117**
- Приложение 2.7. Свободная энергия и химические реакции в клетке. Стр. **118–119**
- Приложение 2.8. Подробно о 10-ти шагах гликолиза. Стр. **120–121**
- Приложение 2.9. Полный цикл лимонной кислоты. Стр. **122–123**
- Приложение 3.1. 20 аминокислот, образующих белки. Стр. **128–129**
- Приложение 3.2. Четыре различных способа изображения небольшого белка, домена SH2. Стр. **132–133**
- Таблица 3.1. Некоторые распространенные типы ферментов. Стр. **159**
- Приложение 3.3. Некоторые методы, применяемые для изучения ферментов. Стр. **162–163**
- Таблица 3.2. Многие витамины являются источниками важнейших коферментов для клеток человека. **стр. 340.**
- Таблица 3.3. Некоторые молекулы, ковалентно связанные с белками, регулируют функции этих белков. **стр. 370.**
- Таблица 4.1. Некоторые важные статистические данные о геноме человека. Стр. **206**
- Таблица 5.3. Три главных класса подвижных генетических элементов. Стр. **318**
- Таблица 6.1. Основные типы РНК, синтезируемые в клетках. Стр. **336**
- Приложение 8.1. Общие сведения по классической генетике. Стр. **554–555**
- Таблица 10.1. Общие сведения по классической генетике. Приблизительный липидный состав различных клеточных мембран. Стр. **624**
- Таблица 11.1. Сравнение концентраций ионов внутри и снаружи типичной клетки

млекопитающих. Стр. **652**

Приложение 11.2. Вывод уравнения Нернста. Стр. **670**

Приложение 11.3. Некоторые классические эксперименты над гигантским аксоном кальмара. Стр. **679**

Таблица 12.1. Относительные объемы, занимаемые основными внутриклеточными компартментами клетки печени (гепатоцита). Стр. **697**

Таблица 12.2. Относительное содержание разных типов мембран в двух видах эукариотических клеток. Стр. **697**

Таблица 14.1. Выходы продуктов окисления сахаров и жиров. Стр. **824**

Приложение 14.1. Окислительно-восстановительный потенциал. Стр. **830**

Таблица 15.5. Суперсемейство Ras мономерных GTPаз. Стр. **926**

Приложение 16.2. Полимеризация актина и тубулина. Стр. **978–979**

Приложение 16.3. Дополнительные белки. Стр. **994–995**

Таблица 17.2. Обзор основных регуляторных белков клеточного цикла. Стр. **1066**

Приложение 17.1. Основные стадии М-фазы. Стр. **1072–1073**

Примечания для читателя

Структура книги

Хотя главы этой книги можно читать независимо друг от друга, они выстроены в логической последовательности, разбитой на пять частей. Первые три главы **части I** охватывают элементарные законы и основы биохимии. Читателям, ранее не изучавшим биохимию, они могут служить вводным курсом в данную дисциплину, а тем, кто уже подвизался в этой области, они помогут освежить впечатления об этом предмете.

В **части II** мы рассматриваем вопросы, связанные с хранением, выражением (экспрессией) и передачей генетической информации.

В **части III** мы освещаем принципы основных экспериментальных методов исследования клеток. Читатель может пропустить эти две главы без особого ущерба для понимания следующих за ними глав, а если прочитает, то найдет в них множество полезной информации.

В **части IV** раскрыта внутренняя организация клетки.

В **части V** мы проследим за поведением клеток в многоклеточных системах, начиная с межклеточных взаимодействий и внеклеточного матрикса и заканчивая двумя главами по иммунной системе.

Задачи в конце глав

Теперь ассортимент задач, написанных Джоном Уилсоном и Тимом Хантом, помещен в тексте книги в концах глав 1–20. Полные решения к этим задачам можно найти³ в книге *«Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition: The Problems Book»*.

Ссылки на дополнительную литературу

Все главы завершаются кратким списком ссылок на дополнительную литературу. Названия библиографических источников расположены в алфавитном порядке и приведены под заголовками параграфов соответствующей главы. В числе таких источников часто встречаются оригинальные статьи, в которых впервые сообщалось о важном открытии. Глава 8 включает несколько таблиц, в которых приведены даты определяющих событий науки наряду с именами ученых, причастных к этим научным достижениям. В целом же при написании данной книги мы взяли за правило (и старались его придерживаться) избегать прямого указания имен ученых.

Медиакоды¹

На всем протяжении книги в текст вкраплены медиакоды, означающие, что соответствующие видеоролики и мультимпликации имеются на компакт-диске формата DVD-ROM. Четырехбуквенные коды заключены в угловые скобки и выделены цветом, как например, **<ATCG>**. Интерфейс для мультимедийного проигрывателя *Cell Biology Interactive* на компакт-диске DVD-ROM содержит окно, в котором

³ Приведенная информация относится только к оригинальному изданию *«Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition»*.

пользователю предложено ввести такой 4-буквенный код. После ввода кода в интерфейс в проигрыватель загружается соответствующий мультимедийный объект.

Термины, включенные в словарь

По всей книге **полуужирный шрифт** употребляется для выделения наиболее значимых терминов в том месте главы, в котором мы их раскрываем наиболее полно. *Курсивом* мы отметили прочие важные термины, на которых мы меньше акцентируем внимание. В конце книги помещен расширенный **словарь терминов**, вобравший в себя наиболее употребимые в мире клеточной биологии научные термины; в нем сможет найти успокоение и получить неотложную помощь читатель, натолкнувшийся на незнакомый термин, употребленный нами без каких-либо разъяснений.

Номенклатура, принятая для наименования генов и белков

Каждый биологический вид имеет свою собственную систему обозначений для наименования генов; единственная общая особенность заключается в том, что их всегда выделяют курсивом. У одних видов (таких как человек) названия генов полностью записываются заглавными буквами; у других видов (типа полосатого данио) все буквы в названиях генов строчные; у некоторых (большая часть генов мыши) первая буква названия стоит в верхнем регистре, а остальные — в нижнем; или (как у дрозофилы) состоят из различных комбинаций прописных и строчных букв, согласно тому, давал ли мутантный аллель, который был открыт первым, доминантный или рецессивный фенотип. Правила называния белковых продуктов столь же различны.

Такой хаос и разноречивостью в типографских соглашениях может кого угодно свести с ума. Он не только утомителен (при истолковании) и абсурден, но также еще и неустойчив и не имеет будущего. Мы не можем независимо (от всех остальных) определять новую систему обозначений для каждого из следующих нескольких миллионов видов, гены которых мы пожелаем изучить. Более того, есть много случаев, особенно в такой книге, как эта, когда нам необходимо обращаться к гену вообще, не имея в виду его конкретный вариант у мыши, у человека, у курицы или у гиппопотама, потому что все они равнозначны при обсуждении. Так какой же системы обозначений нам следует придерживаться?

В этой книге мы решили отвергнуть все правила наименования генов, принятые для отдельных видов, и следовать единообразному правилу: названия всех генов мы пишем, как имена людей и названия мест, с прописной буквы, а остальные буквы — строчными, и все буквы — курсивом, получая таким образом: *Apc*, *Bazooka*, *Cdc2*, *Dishevelled*, *Egl1*. Соответствующий белок, если он назван в честь гена, будет написан подобным же образом, но прямым шрифтом, а не курсивом: *Apc*, *Bazooka*, *Cdc2*, *Dishevelled*, *Egl1*. Когда необходимо указать конкретный организм, это можно сделать с помощью приставки к названию гена.

Полноты ради приведем еще несколько моментов тех правил «присвоения названий», которых мы будем придерживаться. В некоторых случаях традиционно используется дополнительная буква, приписанная к названию гена, чтобы отличать гены, родственные в функциональном или эволюционном отношении; для таких генов мы пишем эту букву, как общепринято, как заглавную (*LacZ*, *RecA*, *HoxA4*). Мы не используем дефис для отделения дополнительных букв или цифр от остальной части названия. Белки создают намного больше проблем. Многие тавро для их клеймения были выкованы в потаенных кузницах и наложены на них еще до того,

как рождающие их гены получили свои имена. Такие названия белков принимают множество форм, хотя большинство из них традиционно начинается со строчной буквы (актин, гемоглобин, каталаза), как и названия обычных веществ (сыр, нейлон), разве только они представляют собой акронимы (например: GFP — Green Fluorescent Protein или BMP4 — Bone Morphogenetic Protein 4). Приведение всех таких названий белков к единообразному стилю неминуемо пошло бы вразрез с устоявшимися формами употребления, и мы попросту решили писать их традиционным способом (актин, GFP и т. д.). В отношении названий соответствующих генов во всех таких случаях мы тем не менее будем следовать нашему стандартному правилу: *Actin*, *Hemoglobin*, *Catalase*, *Bmp4*, *Gfp*. На некоторых страницах книги, чтобы поставить акцент на названии белка, мы выделяли его курсивом; как правило, такая подоплека ясна из контекста.

Для тех, кто желает разобраться в этом, в нижеприведенной таблице приведены некоторые формальные правила для отдельных видов — нормы, которые мы в этой книге по большей части пренебрегаем, подавая на то пагубный пример в третьем столбце.

Вспомогательные материалы⁴

Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition: The Problems Book by John Wilson and Tim Hunt (ISBN: 978-0-8153-4110-9).

ОРГАНИЗМ	ВИДСПЕЦИФИЧЕСКАЯ НОМЕНКЛАТУРА		УНИВЕРСАЛЬНАЯ НОМЕНКЛАТУРА, ПРИНЯТАЯ В ЭТОЙ КНИГЕ	
	ГЕН	БЕЛОК	ГЕН	БЕЛОК
Мышь	<i>Hoxa4</i>	НохА4	<i>HoxA4</i>	НохА4
	<i>Bmp4</i>	BMP4	<i>Bmp4</i>	BMP4
	<i>integrin α-1, Itgα1</i>	интегрин α 1	<i>Integrin α-1, Itgα1</i>	интегрин α 1
Человек	НОХА4	НОХА4	<i>HoxA4</i>	НохА4
Полосатый данио	<i>cyclops, cys</i>	Сyclops, Сyc	<i>Cyclops, Cys</i>	Сyclops, Сyc
<i>Caenorhabditis</i>	<i>unc-6</i>	UNC-6	<i>Unc6</i>	Unc6
<i>Drosophila</i>	<i>sevenless, sev</i> (назван по рецессивному мутантному фенотипу)	Sevenless, SEV	<i>Sevenless, Sev</i>	Sevenless, Sev
	<i>Deformed, Dfd</i> (назван по доминантному мутантному фенотипу)	Deformed, DFD	<i>Deformed, Dfd</i>	Deformed, Dfd
Дрожжи	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (почкующиеся дрожжи)	Cdc28, Cdc28p	<i>Cdc28</i>	Cdc28
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (делящиеся дрожжи)	Cdc2, Cdc2p	<i>Cdc2</i>	Cdc2
<i>Arabidopsis</i>	GAI	GAI	<i>Gai</i>	GAI
<i>E. coli</i>	<i>uvrA</i>	UvrA	<i>UvrA</i>	UvrA

The Problems Book (Задачник) предназначен для того, чтобы помочь студентам познать пути, которыми правильно поставленные эксперименты и простые вычисления могут привести к пониманию принципов жизнедеятельности клеток. В нем представлены задачи, сопровождающие материал глав 1–20 книги «*Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition*». Каждая глава с задачами разбита на разделы, которые соответствуют таковым основного учебника, в ней вкратце освещены важнейшие термины, проверяется усвоение основных понятий и предлагаются задачи исследовательского характера. Книга «*Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition: The Problems Book*» будет полезна как в качестве домашних заданий, так и для работы в классе. Задачник может даже вдохновить фантазию педагога на составление экзаменационных вопросов. Решения ко всем задачам находятся на лазерном компакт-диске, сопутствующем книге. Также в **Задачнике** приведены решения задач, помещенных в конце глав основного учебника.

Мультимедийный компакт-диск MBoC5⁵

DVD-диск, вложенный в каждый экземпляр книги «*Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition*», содержит рисунки, таблицы и микрофотографии из книги, занесенные в презентации Power Point, — по одной на главу. В отдельной папке находятся оригинальные версии всех рисунков, таблиц и микрофотографий в формате JPEG. Приложения представлены в формате PDF. Кроме того, на диск записано более 125 видеofilмов, а также мультипликация, обучающие программы по структуре молекул и микрофотографии высокого разрешения. Авторы пожелали включить в него материал, который не только подкреплял бы основные концепции и понятия, но также обогащал содержание книги и расширял пределы ее дидактических возможностей. К мультимедийным источникам можно обращаться либо как к отдельным файлам, либо через мультимедийный проигрыватель Cell Biology Interactive. Как было сказано выше, мультимедийный проигрыватель был запрограммирован на работу с медиакодами, вкрапленными в текст книги. Полное оглавление и краткий обзор всех электронных ресурсов содержатся в PDF-файле MBoC5 Media Viewing Guide, расположенном в корне DVD-диска и в Приложении мультимедийного проигрывателя. DVD-диск содержит также главы 21–25, которые охватывают многоклеточные системы. Эти главы представлены в формате PDF и могут быть легко распечатаны или подвергнуты поиску с помощью программы Adobe Acrobat Reader или какого-либо иного программного средства работы с файлами PDF.

Обучающие приложения

Обучающие приложения к книге «*Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition*» («*Молекулярная биология клетки*») будут высланы квалифицированным преподавателям по запросу.

Набор диапозитивов MBoC5

Включает в себя 200 полноцветных ацетатных диапозитивов с наиболее важными иллюстрациями из книги, предназначенными для демонстрации с помощью эпидиаскопа.

⁵ Вся информация, приведенная в этом разделе, относится только к оригинальному изданию «*Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition*».

Тестовые вопросы MBoC5

При желании можно заказать набор тестовых вопросов. Написанные Кирстеном Бенджамином (Kirsten Benjamin; «Amyris Biotechnologies», Emeryville, California) и Линдой Хуан (Linda Huang; University of Massachusetts, Boston), эти вопросы, требующие работы мысли, позволят преподавателям проверить усвоение студентами материала каждой из глав.

Конспекты лекций

Конспекты лекций представляют собой краткие планы, составленные на основе выделенных в тексте книги понятий.

Garland Science Classwire™

Все обучающие приложения на DVD-диске (как то: рисунки в формате JPEG и Power Point; главы 21–25 в формате PDF; 125 видео, мультипликаций и фильмов), а также тестовые вопросы и конспекты лекций доступны преподавателям соответствующей квалификации по сети в режиме реального времени на веб-сайте Garland Science Classwire™. Garland Science Classwire™ предлагает доступ к другим учебным ресурсам изо всех учебников, изданных Garland Science, и предоставляет бесплатные диалоговые средства организации учебных курсов. Дополнительную информацию можно получить на веб-сайте <http://www.classwire.com/garlandscience> или по электронной почте science@garland.com. *Classwire* — торговая марка компании «Chalkfree, Inc.».

Примечание: Adobe и Acrobat являются или зарегистрированными торговыми марками, или торговыми марками компании Adobe Systems Incorporated в Соединенных Штатах Америки и (или) других странах.

PowerPoint является или зарегистрированной торговой маркой, или торговой маркой корпорации Microsoft Corporation в Соединенных Штатах Америки и (или) других странах.

ЧАСТЬ I

ВВЕДЕНИЕ В МИР КЛЕТКИ

Главы

1. Клетки и геномы
2. Химия клетки и биосинтез
3. Белки

1

Клетки и геномы

Поверхность нашей планеты населена живыми существами — поразительными всякое воображение необычайно сложно организованными химическими фабриками, которые вбирают в себя вещества из окружающей их среды и используют это сырье для того, чтобы производить копии самих себя. Живые организмы являют удивительное разнообразие почти во всех отношениях. Что могло бы разниться сильнее, чем тигр и морская водоросль или бактерия и дерево? Еще наши предки, ничего не зная о клетках и ДНК, осознавали, что все сущее имеет что-то общее. Это «что-то» они назвали «жизнью». Изумляясь ей, они изо всех сил старались дать ей точное определение и отчаивались в попытках объяснить в понятиях, относящихся к неживой материи, ее суть и устройство.

Открытия XX века ничуть не умалили это чудо — совсем наоборот. Однако они приоткрыли завесу тайны, окружающей природу жизни. Теперь мы знаем, что все живые существа построены из клеток и все эти единицы живой материи имеют общие механизмы реализации большинства основных своих функций. Хотя живые существа представляются нам бесконечно разными, когда рассматриваются с внешней стороны, их внутреннее устройство по сути едино. Вся биология — контрапункт между двумя темами: поразительным разнообразием в отдельных деталях и удивительным постоянством в фундаментальных механизмах. Первую главу этой книги мы начнем с особенностей, которые универсальны для всех живых существ. Затем кратко рассмотрим разнообразие клеток и увидим, что благодаря общему коду, которым написаны инструкции для всех живых организмов, мы можем читать, соизмерять и расшифровывать эти инструкции, с тем чтобы прийти к ясному пониманию основ всех форм жизни — от самой маленькой до самой большой.

1.1. Универсальные особенности клеток на Земле

По оценкам ученых, сегодня на Земле существует более 10 миллионов, а возможно, даже 100 миллионов видов организмов. Каждый вид отличен от других и каждый воспроизводит себя в точности, давая потомство, которое принадлежит к тому же самому виду: родительский организм передает следующему поколению информацию, определяющую, с точностью до малейших деталей, характеристики, которые должен иметь потомок. Это явление — *наследственность* — образует тот стержень, вокруг которого строится определение жизни: оно отличает жизнь от других процессов типа роста кристалла, или горения свечи, или формирования волн на воде, в ходе которых производятся упорядоченные структуры, но единообразного типа связи между особенностями родителей и особенностями потомка здесь нет. Подобно пламени свечи, живой организм должен потреблять свободную энергию, чтобы создавать и поддерживать свою организацию; но в организме

свободная энергия питает чрезвычайно сложную систему химических процессов, происходящих при реализации наследственной информации.

Большинство живых организмов представлено одиночными клетками; другие, такие как мы с вами, являются огромными многоклеточными сообществами, в которых отдельные группы клеток выполняют специализированные функции и связаны между собой сложными системами связи. Но во всех случаях, обсуждаем ли мы обособленную бактерию или совокупность более чем 10^{13} клеток, которые образуют тело человека, организм полностью формируется за счет многочисленных делений клеток и берет начало от одной-единственной клетки. Так что клетка исполняет роль транспортного средства для хранения и передачи наследственной информации, характеризующей вид (рис. 1.1). И, будучи хранителем и носителем этой информации, клетка включает в себя механизмы, позволяющие не только «добывать» из окружающей среды сырье, но и строить из него по своему образу и подобию новую клетку, укомплектованную свежей копией наследственной информации. И такой способностью обладает не только клетка.

1.1.1. Все клетки хранят свою наследственную информацию в единообразном линейном химическом коде (ДНК)

Компьютеры познакомили нас с понятием информации как измеряемой величины — миллион байтов (соответствующих приблизительно 200 страницам текста) умещается на дискете, 600 миллионов — на лазерном диске и так далее. Наряду с этим, они убедили нас в том, что разнообразие при записи одной и той же инфор-

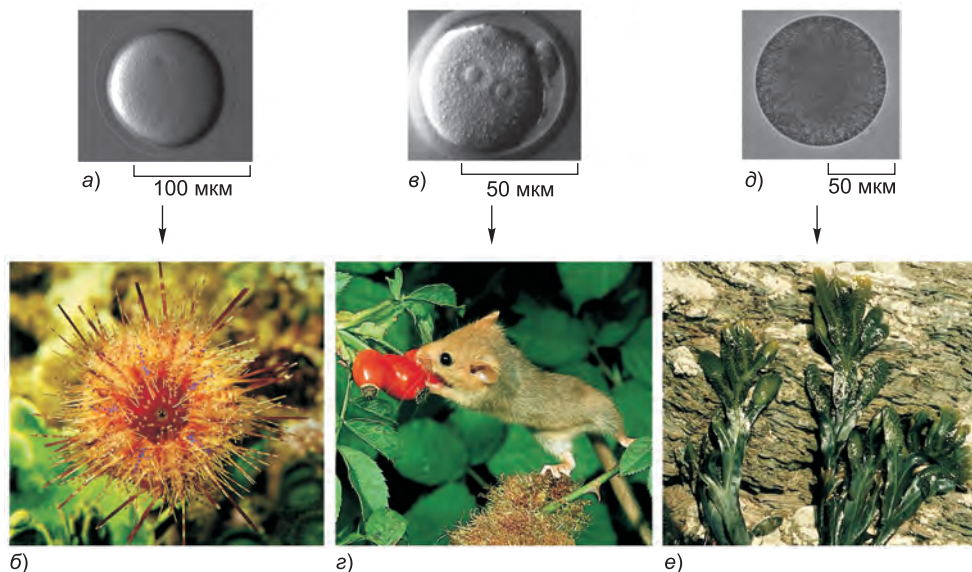


Рис. 1.1. Наследственная информация в оплодотворенной яйцеклетке определяет природу целого многоклеточного организма. *а, б*) Яйцеклетка морского ежа дает начало морскому ежу. *в, г*) Яйцеклетка мыши порождает мышью. *д, е*) Яйцеклетка морской водоросли *Fucus* дает жизнь морской водоросли *Fucus*. (Снимок *а* — предоставлен David McClay; *б* — любезность M. Gibbs, Oxford Scientific Films; *в* — с разрешения Patricia Calarco, из статьи G. Martin, *Science* 209: 768–776, 1980. © AAAS; *г* — любезность O. Newman, Oxford Scientific Films; *д* и *е* — с позволения Colin Brownlee.)

мации — далеко не идеальная форма для ее использования. Документ, который написан на компьютере одного типа, может оказаться недоступным для чтения на машине другого типа. По мере того как компьютерный мир эволюционирует, диски и ленты, которые мы применяли для создания наших электронных архивов, скажем, лет 10 назад, на современных машинах становятся нечитаемыми. Подобно компьютерам, живые клетки обмениваются информацией, не прекращая эволюционировать и дифференцироваться, по оценкам ученых, на протяжении вот уже более чем 3,5 миллиардов лет. Едва ли кто ожидал, что все клетки хранят свою информацию в одной и той же форме или что архивы клетки одного типа читаются механизмами обработки информации, присущими клетке другого типа. Но оказалось, что это действительно так. Все клетки на Земле — не известно ни одного исключения — хранят свою наследственную информацию в форме двухцепочечных (двунитевых) молекул ДНК — длинных неразветвленных спаренных полимерных цепей, всегда образованных из одних и тех же четырех мономеров: А, Т, С, G. Эти мономеры связаны в длинную линейную последовательность, которая кодирует генетическую информацию точно так же, как последовательность единиц и нулей кодирует информацию в компьютерном файле. Мы можем взять часть ДНК из клетки человека и вставить ее в бактерию или, наоборот, взять часть бактериальной ДНК и вставить ее в клетку человека — и в обоих случаях информация будет успешно читаться, интерпретироваться и копироваться. С помощью химических методов ученые могут прочесть полную последовательность мономеров в любой молекуле ДНК — вплоть до миллионов нуклеотидов — и таким образом расшифровать наследственную информацию, которую содержит любой организм.

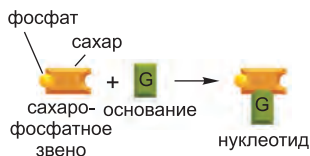
1.1.2. Все клетки воспроизводят свою наследственную информацию посредством матричной полимеризации

Чтобы постичь механизмы, которые лежат в основе жизни, необходимо понять структуру двухцепочечной молекулы ДНК. Каждый мономер в единичной цепи ДНК — то есть каждый **нуклеотид** — состоит из двух частей: сахара (дезоксирибозы) с прикрепленной к нему фосфатной группой и *азотистого основания*, которым может быть аденин (А), гуанин (G), цитозин (С) или тимин (Т) (**рис. 1.2**). Каждое сахарное звено связано со следующим через фосфатную группу, благодаря чему образуется полимерная цепь, состоящая из цепочки повторяющихся сахаро-фосфатных звеньев с выступающими из нее основаниями. Полимер ДНК наращивается путем присоединения мономеров к одному из концов. К одной отдельно взятой нити ДНК они, в принципе, могли бы добавляться в любом порядке, потому что каждый мономер связывается со следующим одним и тем же способом — через ту часть молекулы, которая одинакова для всех звеньев. Однако в живой клетке действует следующее ограничение: ДНК синтезируется не в виде свободной обо-обленной цепи, но на матрице, которой служит уже существующая нить ДНК. Основания, расположенные на существующей нити, связываются с основаниями синтезируемой нити согласно строгому правилу, определяемому взаимно комплементарной структурой оснований: А связывается с Т, а С связывается с G. Такое спаривание оснований удерживает новый мономер в соответствующем месте и тем самым обеспечивает правильный выбор следующего, одного из четырех, мономера, который должен быть добавлен к растущей цепи. Таким образом создается двухцепочечная структура, состоящая из двух в точности комплементарных друг

другу последовательностей нуклеотидов: А, С, Т и G. Обе нити закручиваются одна вокруг другой и образуют двойную спираль (см. рис. 1.2, г).

По сравнению со связями в сахаро-фосфатных мостиках, связи между парами оснований слабы, и это позволяет двум нитям ДНК расходиться без разрыва их основных цепей. Каждая нить после этого может служить матрицей (только что описанным способом) для синтеза новой цепи ДНК, комплементарной своей

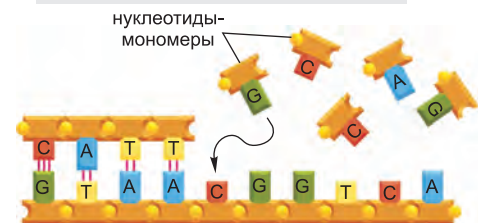
а) структурное звено ДНК



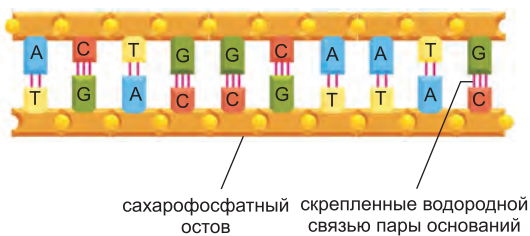
б) цепь ДНК



в) матричная полимеризация новой цепи



г) двухцепочечная ДНК



д) двойная спираль ДНК

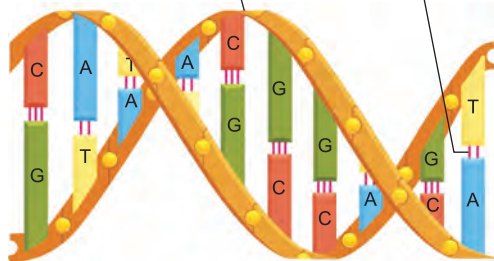


Рис. 1.2. ДНК и ее структурные звенья. а) Молекула ДНК построена из простых субъединиц, называемых нуклеотидами; каждый нуклеотид состоит из сахарофосфатного звена с прикрепленной к нему боковой группой — азотистым основанием. Основания представлены четырьмя типами (аденин, гуанин, цитозин и тимин), которые соответствуют четырем различным нуклеотидам, обозначаемым буквами А, G, С и Т. б) Одноцепочечная ДНК состоит из нуклеотидов, соединенных между собой сахаро-фосфатными мостиками. Обратите внимание, что отдельно взятое сахарофосфатное звено нуклеотида асимметрично, что придает цепи ДНК определенную направленность, или полярность. Эта полярность направляет молекулярные процессы, посредством которых заложенная в ДНК информация интерпретируется и копируется в клетках: информация всегда «считывается» в определенном порядке — так же как английский текст читается слева направо. в) При матричной полимеризации последовательность нуклеотидов в существующей (родительской) цепи ДНК управляет последовательностью присоединения нуклеотидов в новой нити ДНК: Т в одной нити спаривается с А в другой, а G в одной нити — с С в другой. Последовательность нуклеотидов новой цепи комплементарна последовательности старой, родительской, цепи, а направленность сахаро-фосфатного остова вновь синтезированной цепи ДНК противоположна родительской: например, последовательности GТAА... в исходной нити соответствует последовательность ...ТТАС в новой. г) В норме молекула ДНК состоит из двух таких комплементарных цепей. Нуклеотиды в пределах каждой цепи связаны между собой прочными (ковалентными) химическими связями; комплементарные нуклеотиды противоположных цепей удерживаются вместе слабыми водородными связями. д) Обе цепи закручены одна вокруг другой таким образом, что образуют двойную спираль — устойчивую структуру, которая может вместить в себя любую последовательность нуклеотидов, не изменяя при этом своего основного строения.

матрице, то есть новой копии наследственной информации (рис. 1.3). В клетках разных типов этот процесс — **репликации ДНК** — происходит с разной скоростью, с использованием разных средств управления, необходимых для его запуска и остановки, и с привлечением разных вспомогательных молекул, способствующих его протеканию. Но основы процесса универсальны: ДНК — хранилище информации, а *матричная полимеризация* — способ, которым эта информация копируется во всем живом мире.

1.1.3. Все клетки преобразуют часть своей наследственной информации в одинаковую промежуточную форму (РНК)

Чтобы выполнять возложенную на нее функцию хранения информации, ДНК должна делать нечто большее, чем просто копировать себя перед каждым делением клетки согласно только что описанному механизму. Помимо этого, она должна выразить, или, говоря научным языком, экспрессировать, свою информацию, чтобы направлять синтез других молекул в клетке. Этот процесс также происходит за счет действия механизма, общего для всех живых организмов, который прежде всего обеспечивает производство полимеров двух других ключевых классов: РНК и белков. Процесс начинается с матричной полимеризации, называемой **транскрипция**, в ходе которой сегменты последовательности ДНК используются в качестве матриц, направляющих синтез более коротких полимерных молекул, близких по природе к ДНК, — **рибонуклеиновой кислоты**, или **РНК**. Позже, в более сложном процессе, **трансляции**, многие из этих молекул РНК будут использованы для того, чтобы направлять синтез полимеров совершенно иного химического класса — *белков* (рис. 1.4).

В РНК основная цепь сформирована из сахара, немного отличающегося от такового в ДНК — рибоза вместо дезоксирибозы, — и одно из четырех оснований немного отличается по своей природе — урацил (U) вместо тимина (T); но другие три основания: А, С и G — те же самые, и все четыре основания спариваются с комплементарными им «парами» в ДНК: А, U, С и G РНК соответственно с Т, А, G и С ДНК. В процессе транскрипции мономеры РНК выстраиваются в очередь и отбираются для полимеризации на матричной нити ДНК по тому же принципу, что и мономеры ДНК во время репликации. Поэтому в итоге образуется полимерная молекула, последовательность нуклеотидов которой в точности воспроизводит

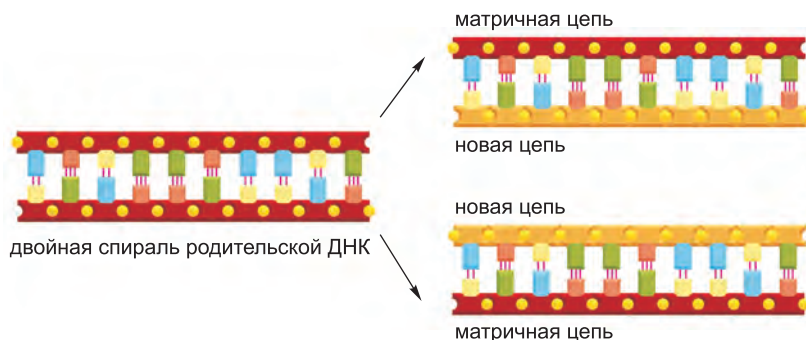


Рис. 1.3. Дублирование генетической информации путем репликации ДНК. В ходе этого процесса две цепи двойной спирали ДНК расходятся, и каждая служит матрицей для синтеза новой комплементарной цепи.

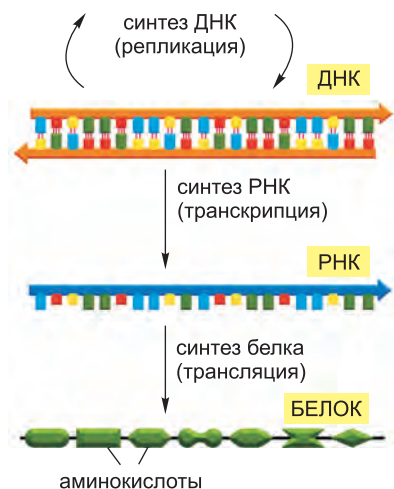


Рис. 1.4. От ДНК к белку. Генетическая информация считывается и вводится в использование посредством двухступенчатого процесса. Сначала, на этапе *транскрипции*, сегменты последовательности ДНК используются для того, чтобы направлять синтез молекул РНК. Затем, во время *трансляции*, молекулы РНК используются для того, чтобы направлять синтез молекул белка.

часть генетической информации клетки, правда, записанной немного иным алфавитом, состоящим из мономеров РНК вместо мономеров ДНК.

Один и тот же сегмент ДНК может использоваться неоднократно и направлять синтез множества идентичных друг другу РНК-транскриптов. Таким образом, если архив генетической информации клетки в форме ДНК является неизменным

и неприкосновенным, то РНК-транскрипты выпускаются серийно, в большом количестве и предназначены для одноразового использования (рис. 1.5). Как мы увидим, главная роль большинства этих транскриптов — служить промежуточным звеном в передаче генетической информации: они представляют собой **информационные**, или **матричные, РНК (мРНК)**, которым предписано направлять синтез белков согласно генетическим инструкциям, хранящимся в ДНК.

Молекулам РНК присущи характерные структуры, которые могут обуславливать индивидуальные химические свойства молекулы. Поскольку молекулы РНК одноцепочечные, их остов довольно гибкий, так что полимерная цепь может загибаться на себя, что позволяет разным участкам одной и той же молекулы образовывать между собой слабые связи. Это происходит, когда сегменты последовательности локально комплементарны: например, сегмент ...GGGG... будет стремиться примкнуться к сегменту ...CCCC.... Внутренние объединения такого типа могут

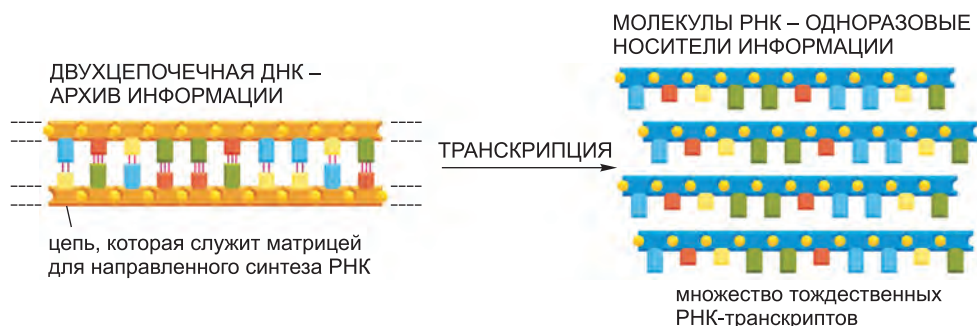


Рис. 1.5. Как реализуется генетическая информация клетки. Каждая клетка содержит постоянный набор молекул ДНК — ее архив генетической информации. Определенный сегмент этой ДНК направляет синтез большого числа идентичных РНК-транскриптов, которые служат рабочими копиями информации, хранящейся в этом архиве. Благодаря тому что транскрипция может проходить избирательно, на отдельных участках длинной последовательности ДНК может быть получено множество различных наборов молекул РНК; на клеточном уровне это означает: каждая клетка может использовать одинаковое для всех хранилище информации по-своему и, кроме того, по-разному при различных обстоятельствах.

вынуждать цепь РНК принимать определенную форму (конформацию), которая предписана ее нуклеотидной последовательностью (рис. 1.6). А присущая молекуле РНК конформация, в свою очередь, позволяет ей узнавать другие молекулы и избирательно с ними связываться — а в некоторых случаях даже катализировать химические процессы в молекулах, с которыми она связывается. Как мы увидим в дальнейшем, несколько химических реакций, катализируемых молекулами РНК, являются ключевыми в некоторых самых древних и фундаментальных процессах, происходящих в живых клетках, на основании чего высказано предположение, что осуществляемый РНК всесторонний катализ играл центральную роль на ранних этапах эволюции (обсуждается в главе 6).

1.1.4. Все клетки используют белки в качестве катализаторов

Молекулы **белка**, подобно молекулам ДНК и РНК, представляют собой длинные неразветвленные полимерные цепи, образованные за счет связывания мономерных звеньев, отобранных из стандартного ассортимента, общего для всех живых клеток. Как и ДНК и РНК, они несут в себе информацию в форме линейной последовательности символов — таким же образом, как сообщение человека, записанное с помощью букв. В каждой клетке находится много различных белковых молекул, и, без учета воды, они составляют большую часть массы клетки.

Мономеры белка, **аминокислоты**, сильно отличаются от мономеров ДНК и РНК и представлены 20-ю типами вместо 4-х. Любая аминокислота построена на основе одной и той же постоянной для всех них структуры, которая и обеспечивает единообразный способ соединения любых аминокислот друг с другом; к этому ядру прикреплена боковая группа, которая и придает каждой аминокислоте

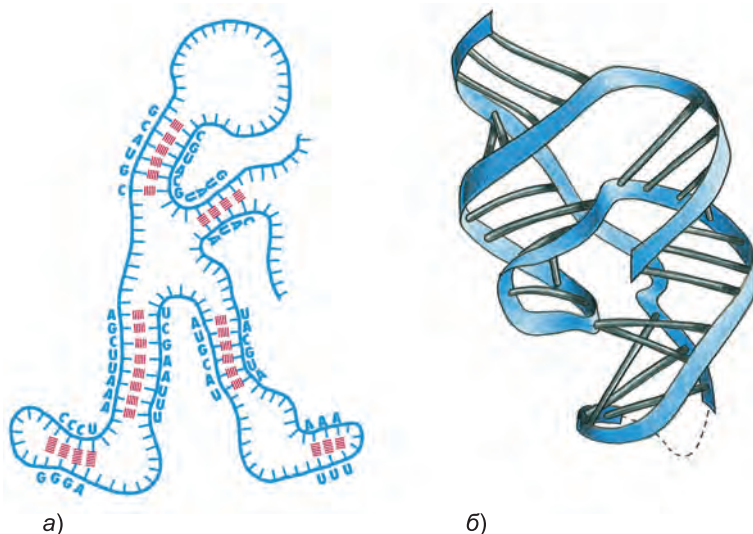


Рис. 1.6. Конформация молекулы РНК. а) Образование пар между нуклеотидами, находящимися в различных областях одной и той же полимерной цепи РНК, придает молекуле своеобразную форму. б) Трехмерная структура молекулы РНК вируса гепатита-дельта, которая катализирует расщепление цепи. Голубая лента — это сахарофосфатный остов РНК, а планки — спаренные основания. (Рисунок б выполнен на основании иллюстрации из статьи А. R. Ferré D’Amaré, К. Zhou и J. A. Doudna, *Nature* 395: 567–574, 1998. С разрешения издательства Macmillan Publishers Magazines Ltd.)

отличительные химические свойства. Все белковые молекулы, или **полипептиды**, создаются за счет соединения аминокислот в специфическую последовательность, которая сворачивается в точно предписанную трехмерную форму с реакционно-способными участками на поверхности (рис. 1.7, а). Устроенные таким образом, эти аминокислотные полимеры с высокой специфичностью связываются с другими молекулами и, выступая в роли **ферментов**, катализируют реакции, в ходе которых образуются и разрываются ковалентные связи. Тем самым они направляют подавляющее большинство химических процессов в клетке (см. рис. 1.7, б). Белки выполняют также массу других функций: поддерживают структуру, обеспечивают движение, передают сигнал и так далее; при этом каждая молекула белка выполняет определенную функцию согласно собственной, генетически заданной аминокислотной последовательности. Но прежде всего белки — это молекулы, которые вводят в действие генетическую информацию клетки.

Итак, полинуклеотиды определяют последовательность аминокислот в соответствующих белках. Белки, в свою очередь, катализируют множество химических реакций, включая и те, в ходе которых синтезируются новые молекулы ДНК,

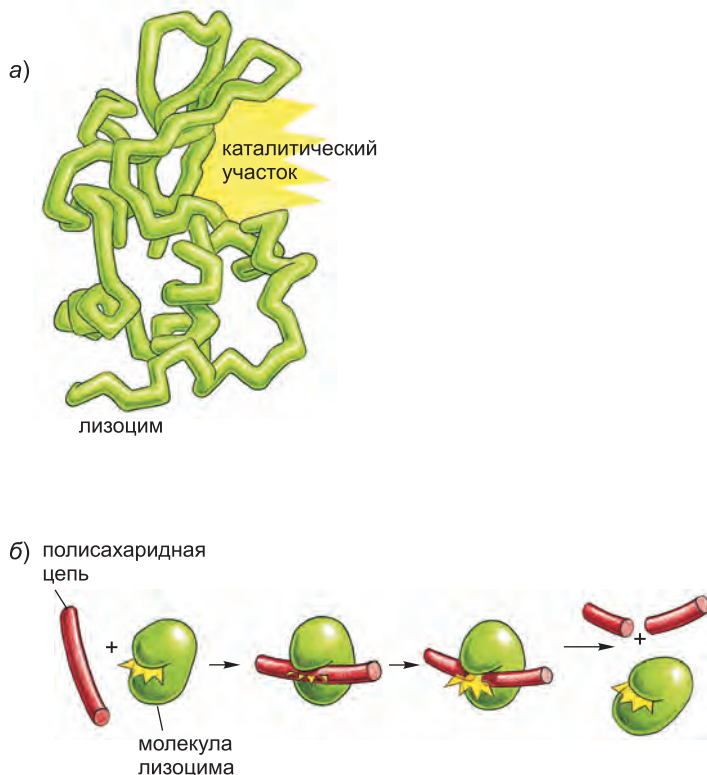


Рис. 1.7. Принцип действия молекулы белка как катализатора химической реакции. а) Полимерная цепь белковой молекулы сворачивается в специфическую форму, которая «предписана» ее аминокислотной последовательностью. Бороздка на поверхности представленной на этом рисунке свернутой молекулы, фермента лизоцима, формирует каталитический участок. б) Молекула полисахарида (красная) — полимерная цепь из мономеров сахаридов — связывается с каталитическим участком лизоцима и расщепляется в результате разрыва ковалентных связей, катализируемого аминокислотами, выступающими бороздкой.

а генетическая информация, записанная в ДНК, используется для синтеза РНК и белков. Такая петля обратной связи лежит в основе процессов автокатализа и самовоспроизводства, что присуще всем живым организмам (рис. 1.8).

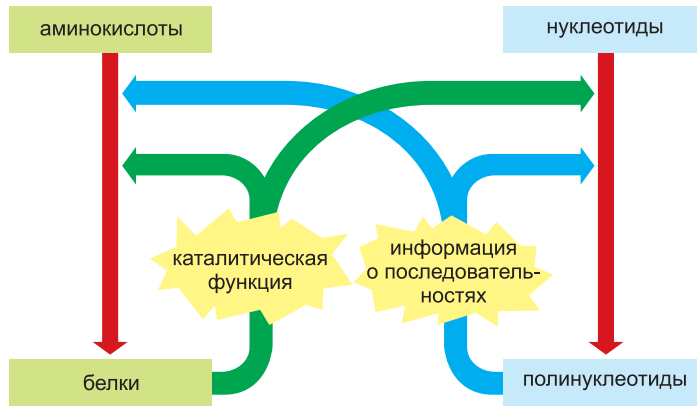


Рис. 1.8. Жизнь как автокаталитический процесс. Полинуклеотиды (полимеры нуклеотидов) и белки (полимеры аминокислот) не только обеспечивают клетку информацией о последовательностях и каталитическими функциями, которые — через сложный набор химических реакций — обуславливают синтез еще большего количества таких же полинуклеотидов и белков.

1.1.5. Все клетки транслируют РНК в белок одинаковым способом

Трансляция генетической информации из четырехбуквенного алфавита полинуклеотидов в двадцатибуквенный алфавит белков — сложный процесс. В одних отношениях правила такой трансляции кажутся четкими и рациональными, но в других — до странности произвольными, при том что они (с незначительными исключениями) идентичны у всех живых существ. Эти произвольные черты, как думают, отражают аварийные ситуации в механизмах наследования, которые возникали на ранних этапах развития жизни и были закреплены в ходе эволюции, т. е. случайно приобретенные свойства самых ранних организмов, которые, передаваясь по наследству, столь глубоко внедрились в устройство всех клеток, что уже не могут быть изменены без нарушения всей организации клетки.

Информация, закодированная в последовательности молекулы информационной РНК (мРНК), считывается кластерами: по три нуклеотида за раз. Каждый триплет нуклеотидов, или *кодон*, определяет (кодирует) одну аминокислоту в соответствующем белке. Итак, в распоряжении клетки имеется 64 ($4 \times 4 \times 4$) возможных кодона и лишь 20 аминокислот, а это значит, что обязательно будут встречаться случаи, когда одной и той же аминокислоте соответствует несколько кодонов. Код считывается маленькими молекулами РНК, которые выделены в отдельный класс — **транспортные РНК (тРНК)**. На одном конце молекул тРНК прикреплена определенная аминокислота, а на другом выставлена специфическая последовательность из трех нуклеотидов — *антикодон* — которая и обеспечивает спаривание данной тРНК со специфическим кодоном или подгруппой кодонов в последовательности мРНК (рис. 1.9).

В процессе синтеза белка очередная молекула тРНК, нагруженная соответствующей аминокислотой, должна последовательно состыковаться с молекулой мРНК и через спаривание оснований сопоставить свой антикодон с очередным

кодоном мРНК. После каждого такого сопоставления новая аминокислота должна присоединяться к наращиваемой белковой цепи, а молекула тРНК, освобожденная от своего бремени, должна быть «отпущена на волю». Весь этот комплекс процессов выполняется гигантской мультимолекулярной машиной — рибосомой, которая состоит из двух главных цепей РНК, называемых **рибосомными РНК (рРНК)**, и более чем из 50-ти различных белков. Эта эволюционно древняя молекулярная джаггернаутова колесница надвигается на конец молекулы мРНК, затем прокатывается по ней, подминая под себя нагруженные своими ношами молекулы тРНК, и сшивает отобранные у них аминокислоты друг с другом, оставляя после себя колею новой белковой цепи (**рис. 1.10**).

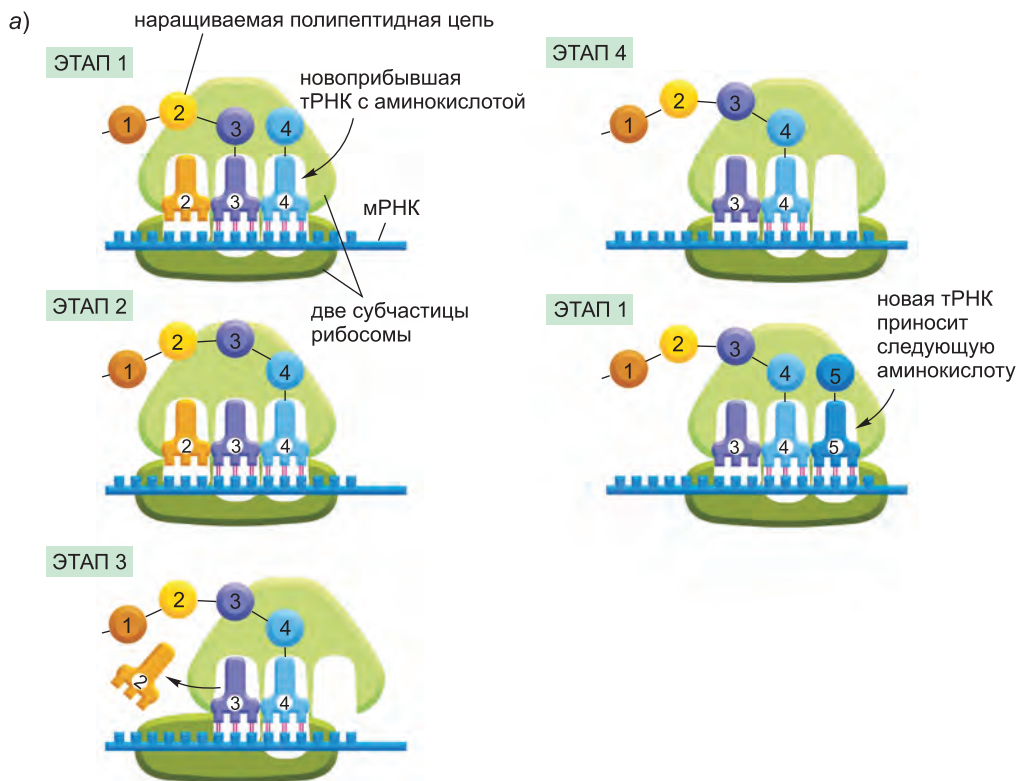
1.1.6. Фрагмент генетической информации, соответствующий одному белку, представляет собой один ген

Молекулы ДНК, как правило, очень большие и содержат инструкции для синтеза тысяч белков. Индивидуальные сегменты полной последовательности ДНК транскрибируются в отдельные молекулы мРНК, причем каждый сегмент кодирует отдельный белок. Каждый такой сегмент ДНК представляет собой один **ген**. Однако не все так просто: молекулы РНК, транскрибированные с одного и того же сегмента ДНК, нередко могут обрабатываться не одним, а несколькими разными способами и давать начало целому набору альтернативных версий соответствующего белка; в особенности это относится к сложно устроенным клеткам, как например, клеткам растений и животных. Поэтому понятие «ген» в общем и целом звучит как сегмент последовательности ДНК, соответствующий одному белку или набору альтернативных вариантов одного белка.

Во всех клетках *экспрессия* отдельных генов подчинена регуляции: вместо того чтобы производить полный ассортимент возможных белков на полной скорости в течение всего времени своей жизни, клетка подбирает интенсивность транскрипции и трансляции различных генов независимо от других — согласно исключительно своей потребности. Между сегментами, которые кодируют белки, вкраплены отрезки *регуляторной ДНК*, и такие некодирующие области связываются со специальными молекулами белка, которые локально управляют скоростью транскрипции (**рис. 1.11**). В геноме присутствуют также другие некодирующие ДНК, некоторые из них, например, служат как бы знаками пунктуации, определяющими, где информация для синтеза отдельного белка начинается, а где заканчивается. Количество и организация регуляторной и других некодирующих ДНК варьируются в широких пределах — от одного класса организмов к другому, но основная стратегия их работы универсальна. Таким образом, **геном** клетки, то есть совокупность генетической информации, заключенной в полной последовательности ее ДНК, предписывает не только природу белков клетки, но также время и место их синтеза.

1.1.7. Жизнь нуждается в свободной энергии

Живая клетка — это динамичная химическая система, далекая от химического равновесия: она обладает большой внутренней свободной энергией; это означает, что если клетке позволить умереть, то при распаде в окружающую среду высвободится огромное количество энергии. Чтобы клетка смогла произвести на свет новую клетку по своему образу и подобию, она должна вобрать из окружающей среды свободную энергию, а также сырье, которые нужны ей для осуществления необ-



б)

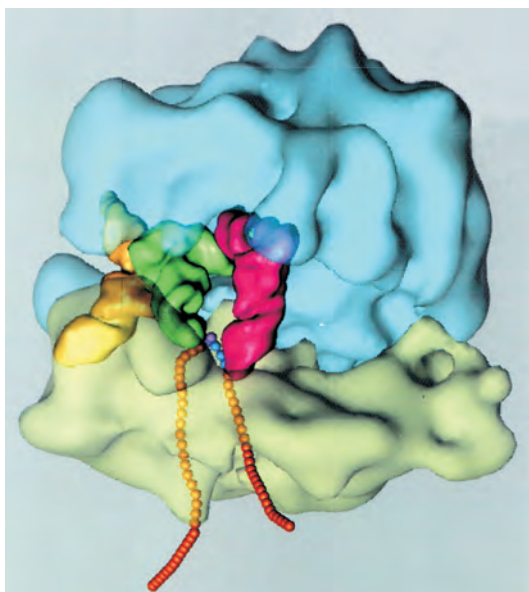


Рис. 1.10. Рибосома за работой. а) На рисунке схематично показано, как рибосома перемещается по молекуле мРНК, захватывая молекулы тРНК, соответствующие кодам в мРНК, и используя их для соединения аминокислот в белковую цепь. Таким образом, мРНК определяет последовательность аминокислот. б) Трехмерная структура бактериальной рибосомы (две субъединицы показаны бледно-зеленым и голубым цветами), перемещающейся по молекуле мРНК (оранжевые бусы), с тремя молекулами тРНК (желтая, зеленая и розовая) на различных стадиях процесса их захвата и высвобождения. Рибосома — гигантский агрегат, состоящий из молекул РНК и более чем 50 молекул индивидуальных белков. (Снимок б — с разрешения Joachim Frank, Yanhong Lee и Rajendra Agarwal.)

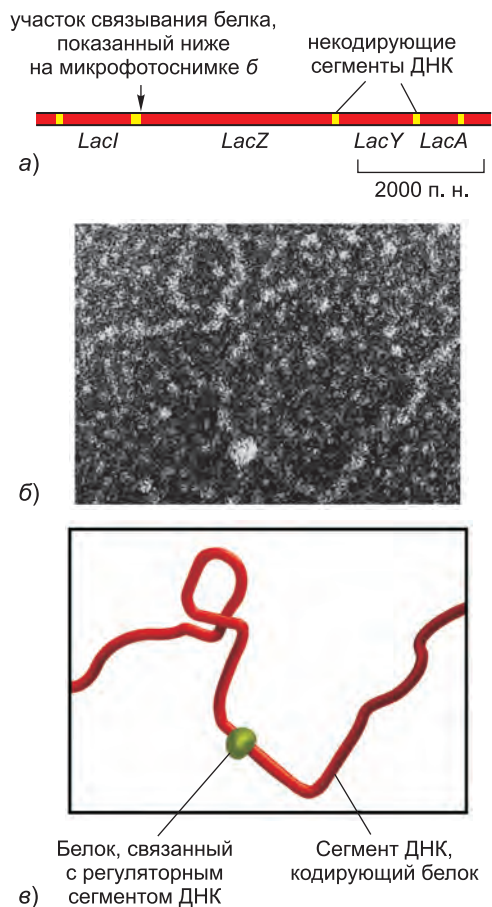


Рис. 1.11. Регуляция экспрессии генов путем связывания белков с регуляторными элементами ДНК.

а) Схема малой части генома бактерии *Escherichia coli*, содержащей гены (названные *LacI*, *LacZ*, *LacY* и *LacA*), кодирующие четыре различных белка. Между кодирующими белок сегментами ДНК (красные) расположены сегменты регуляторной и прочей некодирующей ДНК (желтые). б) Электронномикроскопическая фотография этой же области ДНК с белком (кодируется геном *LacI*), связанным с регуляторным сегментом; этот белок управляет скоростью транскрипции генов *LacZ*, *LacY* и *LacA*. в) Зарисовка структуры, показанной на снимке б. (Снимок б — любезно предоставлен Jack Griffith.)

ходимых реакций синтеза. Потребление свободной энергии лежит в основе жизни: как только оно прекращается, клетка распадается согласно законам химического равновесия и умирает.

Генетическая информация также имеет фундаментальное значения для всего живого. Проследживается ли здесь какая-либо связь? Ответ — да: свободная энергия требуется для распространения информации, и, действительно, между этими двумя величинами существует точное количественное соотношение. Чтобы определить один бит информации, то есть один раз сделать выбор типа да/нет между двумя равновероятными решениями, надо затратить определенное количество свободной энергии (измеряемой в джоулях), и эта величина зависит от температуры. Количественная оценка этой взаимосвязи включает сложные параметры причинно-следственных явлений из области статистической термодинамики и зависит от точного определения термина «свободная энергия» (обсуждается в главе 2). Основную идею, однако, нетрудно понять на интуитивном уровне.

Попробуем представить имеющиеся в клетке молекулы в виде роя обладающих тепловой энергией частиц, совершающих беспорядочные движения и соударяющихся друг с другом. Для того чтобы задать генетическую информацию — например, в форме последовательности ДНК, — молекулы должны быть выхвачены из этой буйной толчи, выстроены в особом порядке, предопределяемом уже имеющейся в распоряжении клетки матрицей, и связаны воедино в упорядоченную структуру. Связи, что удерживают молекулы в надлежащих позициях на матрице и соединяют их между собой, должны быть достаточно сильны, чтобы противостоять разупорядочивающему действию теплового движения. Этот процесс протекает за счет потребления свободной энергии, благодаря чему образуются лишь необходимые связи и, образовавшись, остаются устойчивыми. В простейшем случае молекулы можно уподобить взведенным пружинным затворам, готовым защелкнуться и перейти

в более устойчивое состояние с более низкой энергией, как только представится подходящий случай; когда молекулы «замыкаются» в единую упорядоченную структуру, запасенная в них энергия — их свободная энергия, — подобно энергии пружины в затворе, высвобождается и рассеивается в виде теплоты. Происходящие в клетке химические процессы, которые лежат в основе передачи информации, гораздо сложнее, но подчиняются тому же основополагающему принципу: для создания порядка необходимо затратить свободную энергию.

Именно поэтому для точной и безошибочной репликации своей генетической информации и синтеза всех своих сложных молекул в соответствии с точными инструкциями клетка нуждается в свободной энергии, которая тем или иным образом должна поступать в нее из окружающей среды.

1.1.8. Все клетки работают подобно биохимическим фабрикам, обрабатывающим одни и те же стандартные молекулярные компоновочные блоки

Поскольку все клетки синтезируют ДНК, РНК и белок и в каждом случае эти макромолекулы состоят из одного и того же набора субъединиц, все клетки должны обладать и управлять всей совокупностью этих маленьких молекул, к которым относятся простые сахара, нуклеотиды и аминокислоты, а также другие вещества, которые повсеместно требуются для их синтеза. Всем клеткам, например, необходим фосфорилированный нуклеотид *аденозинтрифосфат* (*adenosine triphosphate; ATP*) в роли стандартного блока для синтеза ДНК и РНК; кроме того, все клетки производят и потребляют эту молекулу в качестве носителя свободной энергии и фосфатных групп, нужного для осуществления многих других химических реакций.

Хотя все клетки функционируют как биохимические фабрики подобного в общих чертах типа, многие нюансы деятельности их маленьких молекул отличаются; и в данном случае гораздо труднее, чем для информационных макромолекул, указать особенности, которые являются безусловно универсальными. Некоторые организмы, например растения, нуждаются лишь в наиболее простых питательных веществах и используют энергию солнечного света, для того чтобы самостоятельно синтезировать из них почти все свои маленькие органические молекулы; другие организмы, вроде животных, питаются живыми существами и получают многие из необходимых им органических молекул в готовом виде. Позже мы возвратимся к этому пункту.

1.1.9. Все клетки заключены в плазматическую мембрану, через которую проникают питательные вещества и выводятся отходы метаболизма

Однако существует по крайней мере еще одна особенность клеток, которая является универсальной: все они заключены в мембрану — **плазматическую мембрану**. Этот контейнер служит избирательным барьером, который позволяет клетке концентрировать питательные вещества, полученные из окружающей среды, и сохранять продукты, которые она синтезирует для собственных нужд, и в то же время выделять отходы своего метаболизма. Без плазматической мембраны клетка не могла бы сохранять свою целостность как согласованная химическая система.

Эта мембрана образована из набора молекул, обладающих простым физико-химическим свойством *амфипатичности*, то есть состоящих из двух частей, одна

из которых является гидрофобной («не любящей воду»), а другая — гидрофильной («любящей воду»). Когда такие молекулы помещают в воду, они спонтанно объединяются, выстраивая свои гидрофобные части так, чтобы они были в возможно более тесном контакте друг с другом (чтобы укрыть их от воды), при этом их гидрофильные части остаются выставленными наружу. Амфипатические молекулы соответствующей формы, например молекулы фосфолипидов, которые составляют большую часть плазматической мембраны, спонтанно объединяются в воде и формируют *двойной слой*, который ограничивает маленькие замкнутые пузырьки (рис. 1.12). Это явление можно продемонстрировать в пробирке: для этого просто достаточно смешать фосфолипиды с водой; при соответствующих условиях образуются маленькие пузырьки, водное содержимое которых изолировано от внешней среды.

Хотя химические нюансы могут варьироваться, гидрофобные хвосты преобладающих в мембранах молекул во всех клетках образованы углеводородными полимерами ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), и их самопроизвольная сборка в двухслойный пузырек — всего лишь один из многих примеров важного общего принципа: клетки производят молекулы, химические свойства которых побуждают их самопроизвольно собираться в структуры (так называемая «самосборка»), в которых нуждается клетка.

Оболочка клетки не может быть абсолютно непроницаема. Если клетке надлежит расти и воспроизводиться, то она должна быть способна импортировать сырье и экспортировать отходы сквозь свою плазматическую мембрану. Поэтому во всех клетках имеются специализированные белки, внедренные в мембрану, которые осуществляют транспорт определенных молекул с одной ее стороны на другую (рис. 1.13). Некоторые из таких *мембранных транспортных белков*, подобно части белков, которые катализируют важнейшие реакции маленьких молекул внутри клетки, так хорошо сохранились в ходе эволюции, что по ним можно распознать семейные сходства при сравнениях даже наиболее отдаленно родственных групп живых организмов.

Транспортные белки, находящиеся в мембране, в значительной степени определяют, какие молекулы входят в клетку, а каталитические белки внутри клетки определяют те реакции, которым эти молекулы подвергаются. Таким образом, прописывая набор белков, которые клетке надлежит производить, генетическая информация, записанная в последовательности ДНК, предписывает всю химию клетки; и не только ее химию, но также форму и поведение, поскольку последние тоже выстраиваются и управляются в основном белками клетки.

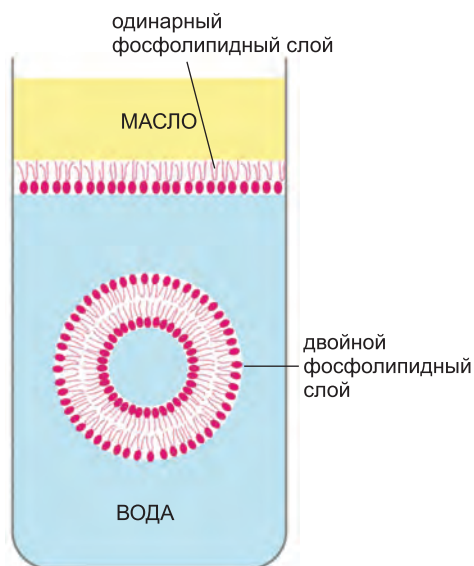
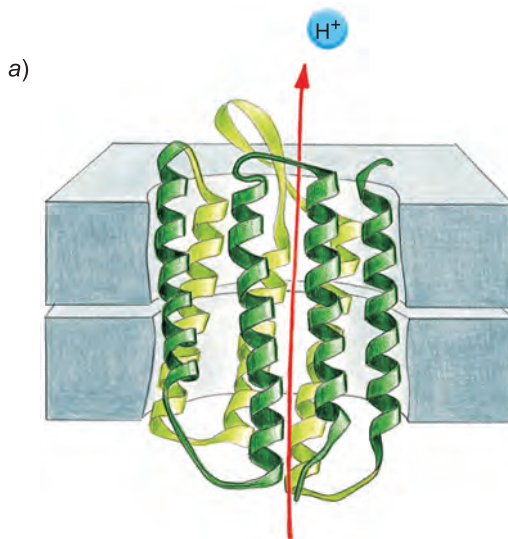


Рис. 1.12. Образование мембраны из амфипатических молекул фосфолипидов. Такие молекулы состоят из гидрофильной («любящей воду»), фосфатной группы — «головы» и гидрофобного («избегающего воды»), углеводородного хвоста. На поверхности раздела между маслом и водой они выстраиваются в виде одинарной пленки, при этом их головные группы смотрят в воду, а хвостовые — в масло. При погружении в воду такие молекулы агрегируют с образованием двойного слоя с водной полостью внутри.

Рис. 1.13. Мембранные транспортные белки.

а) Структура молекулы бактериородопсина археи (археобактерии) *Halobacterium halobium*. Этот транспортный белок использует энергию поглощенного света, чтобы перекачивать протоны (ионы H^+) из клетки. Полипептидная цепь несколько раз пронизывает мембрану туда и обратно; в нескольких областях она закручена в спиральную конформацию, и спиральные сегменты расположены так, чтобы формировать стенки канала, через который транспортируются ионы. б) Схема набора транспортных белков, обнаруженных в мембране бактерии *Thermotoga maritima*. Цифры в круглых скобках обозначают число различных мембранных транспортных белков каждого типа. Большинство белков в пределах каждого класса эволюционно связаны друг с другом и с их аналогами у других видов.



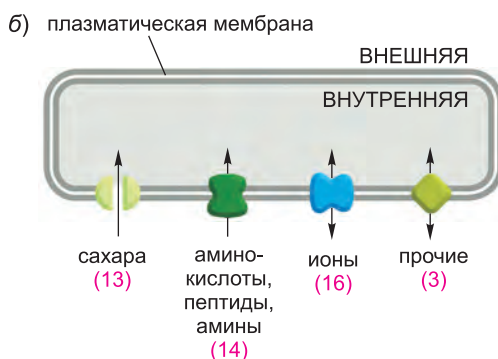
1.1.10. В живой клетке может быть меньше 500 генов

Основные принципы передачи биологической информации достаточно просты, но насколько тогда сложны реальные живые клетки? В частности, каковы их минимальные требования? Приблизительные ответы на эти вопросы мы можем получить, рассматривая вид, который имеет наименьший из известных геномов, — бактерию *Mycoplasma genitalium* (рис. 1.14). Этот организм живет как паразит в теле млекопитающих, и среда обитания обеспечивает его многими из необходимых ему маленьких молекул в готовом виде. Тем не менее ему все же приходится самому синтезировать все большие молекулы: ДНК, РНК и белки, востребованные для протекания основных процессов наследования. Эта бактерия содержит лишь 477 генов в своем геноме из 580 070 пар нуклеотидов (п.н.), соответствующих 145 018 байтам информации — приблизительно столько же места занимает запись текста одной из глав этой книги. Конечно, клеточная биология может быть трудна для объяснения, но не до такой же степени!

Минимальное число генов, необходимое для поддержания жизнеспособности клетки в современных средах обитания, по всей вероятности, должно быть не менее 200–300. Хотя, как будет показано в следующем разделе, при сравнении даже наиболее далеко разошедшихся ветвей древа жизни мы обнаружим, что все организмы содержат общий для всех базовый набор, состоящий всего лишь из 60 генов.

Заключение

Живые организмы воспроизводят себя в потомках, передавая им генетическую информацию. У всех видов живых организмов отдельная клетка пред-



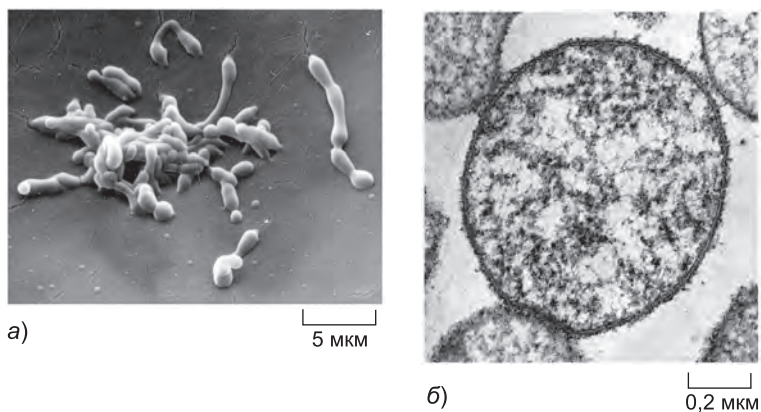


Рис. 1.14. *Mycoplasma genitalium*. а) Микрофотография, полученная на растровом электронном микроскопе; отсутствие определенной формы у этой маленькой бактерии обусловлено отсутствием какой-либо жесткой стенки. б) Поперечный срез (фотоснимок получен на трансмиссионном электронном микроскопе) клетки *Mycoplasma*. Из 477 генов *Mycoplasma genitalium* 37 кодируют транспортную, рибосомную и другие неинформационные РНК. Функции известны точно или предположительно для 297 генов, кодирующих белки: из них 153 отвечают за репликацию ДНК, транскрипцию и трансляцию, а также сопутствующие процессы, в которых участвуют ДНК, РНК и белки; 29 отвечают за мембранные и поверхностные структуры клетки; 33 регулируют транспорт питательных веществ и других молекул через мембрану; 71 радеет о преобразовании энергии, а также о синтезе и расщеплении маленьких молекул; и 11 пекутся о регулировании деления клетки и других процессах. (Снимок а — из статьи S. Razin et al., *Infect. Immun.* 30: 538–546, 1980; б — любезно предоставлен Roger Cole, из книги «Medical Microbiology, 4th ed. [S. Baron ed.]. Galveston: University of Texas Medical Branch, 1996».)

ставляет собой минимальную самовоспроизводящуюся единицу жизни и носитель для передачи генетической информации. Все клетки на нашей планете хранят свою генетическую информацию в одной и той же химической форме — в виде двухцепочечной молекулы ДНК. Клетка реплицирует содержащуюся в ней информацию путем разделения спаренных цепей ДНК и использования каждой из них в качестве матрицы в реакции полимеризации, в ходе которой синтезируется новая цепь ДНК с комплементарной последовательностью нуклеотидов. Та же самая стратегия матричной полимеризации используется и для того, чтобы транскрибировать «порции» информации из ДНК в молекулы близкого по типу полимера — РНК. Эти молекулы, в свою очередь, направляют синтез молекул белка — сложнейший процесс, происходящий по механизму трансляции, в который вовлечена огромная мультимолекулярная машина — рибосома, которая сама состоит из РНК и белка. Белки являются основными ключевыми катализаторами почти всех химических реакций, происходящих в клетке; к прочим их функциям относится избирательный импорт и экспорт маленьких молекул через плазматическую мембрану, которая формирует оболочку клетки. Специфическая функция каждого белка зависит от его аминокислотной последовательности, которая определяется последовательностью нуклеотидов соответствующего сегмента ДНК — гена, кодирующего этот белок. Таким образом, геном определяет химию клетки; и химия всех живых клеток в основе своей подобна, потому что должна обеспечить синтез ДНК, РНК и белка. Самые простые из известных клеток имеют лишь чуть меньше 500 генов.

1.2. Разнообразие геномов и древо жизни

Успех эволюции живых организмов, обусловленный выбором ДНК, РНК и белка из безмерного множества других химических форм, которые только можно себе представить, впечатляет. Они наводнили океаны, распространились на суше, заселили земную кору и, наконец, сформировали поверхность нашей планеты. Наша богатая кислородом атмосфера, залежи угля и месторождения нефти, пласты железных руд, породы мела, известняка и мрамора — все это продукты, прямые или косвенные, биологической активности, происходившей на Земле в далеком прошлом.

Места обитания живых существ не ограничены привычным для нас ареалами с умеренными температурами земли, воды и солнечного света, населенными растениями и травоядными животными. Их можно встретить в самых темных глубинах океана, в горячей вулканической лаве, в водоемах под замерзшей поверхностью Антарктики и в недрах земной коры на глубине нескольких километров. Существа, которые живут в таких экстремальных средах обитания, малоизвестны не только потому, что они недоступны, но также и потому, что большей частью микроскопически малы. Большинство организмов, из живущих в домашней и окружающих человеческое жилище средах обитания, также слишком малы, чтобы их увидеть без специального оборудования: они, как правило, остаются незамеченными, если не вызывают у нас болезни или гниения деревянных конструкций наших домов. Так что микроорганизмы составляют львиную долю общей массы живой материи на нашей планете. Лишь недавно, благодаря новым методам молекулярного анализа, а в особенности посредством анализа последовательностей ДНК, начали мы восстанавливать картину жизни на Земле, которая, в отличие от всех предыдущих, не искажена нашей несовершенной перспективой: созерцанием мира с позиции крупных животных, живущих на суше.

В этом параграфе мы рассматриваем разнообразие организмов и эволюционные отношения между ними. Поскольку генетическая информация для каждого организма написана на универсальном языке последовательностей ДНК и теперь последовательность ДНК любого отдельно взятого организма может быть получена стандартными биохимическими методами, у нас появилась возможность характеризовать, систематизировать и сравнивать любые живые организмы на основании этих последовательностей. По результатам таких сравнений мы можем оценить место каждого организма в генеалогическом древе живых видов — так называемом «древе жизни». Но прежде чем описывать новые возможности этого подхода, нам следует рассмотреть способы, которыми клетки в различных средах обитания получают материю и энергию, необходимые для продолжения своего существования и размножения, а также варианты зависимости организмов одних классов от других с точки зрения удовлетворения их основных химических потребностей.

1.2.1. Клетки способны черпать свободную энергию из множества различных источников

Живые организмы получают необходимую им свободную энергию различными способами. Одни — например, животные, грибы и бактерии, которые живут в кишечнике человека, — получают ее, питаясь другими живыми существами или же органическими химическими веществами, которые последние производят; такие организмы называют *органотрофными* (от греческого слова *trophe*, означающего «пища»). Другие извлекают требуемую энергию непосредственно из неживого мира.

Их подразделяют на два класса: поглощающие энергию солнечного света и вбирающие энергию из богатых ею систем неорганических веществ, находящихся в окружающей среде (химические системы, которые далеки от химического равновесия). Организмы первого класса называют *фототрофными* (питающимися солнечным светом); принадлежащих ко второму называют *литотрофными* (питающимися горной породой). Органотрофные организмы не могут существовать без первичных преобразователей энергии, которые составляют большую часть массы живой материи на Земле.

К фототрофным организмам относятся бактерии многих типов, а также морские водоросли и растения, от которых мы — и, в сущности, все живые существа, которых мы обычно видим вокруг себя, — зависим. Фототрофные организмы изменили всю химию окружающей нас среды: кислород в атмосфере Земли — побочный продукт их биосинтетической деятельности.

Литотрофные организмы — не столь заметная составляющая нашего мира, потому что они микроскопически малы и большей частью живут в средах обитания, крайне редко посещаемых людьми: в океанических глубинах, в недрах земной коры или в других негостеприимных местах окружающей среды. Но они представляют большую часть живого мира и особенно важны при рассмотрении истории жизни на Земле.

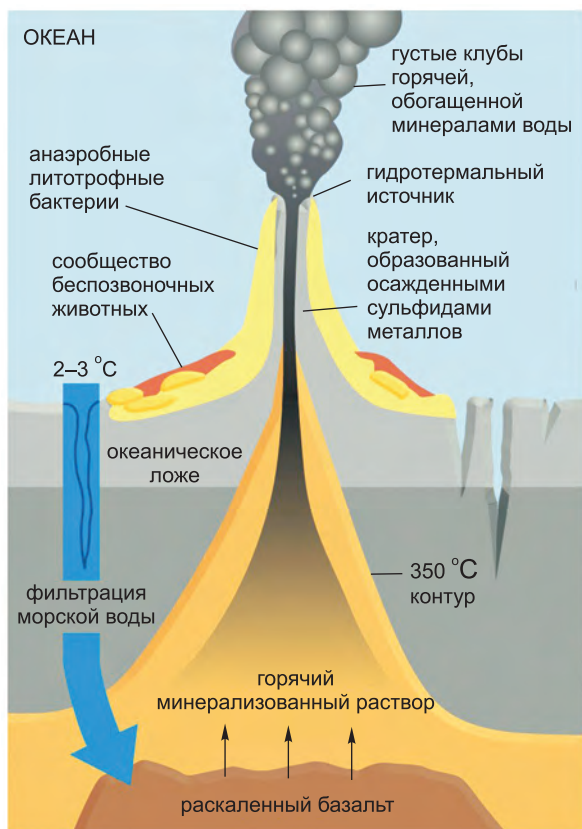
Некоторые литотрофы получают энергию из *аэробных* реакций, в ходе которых используется молекулярный кислород окружающей среды; поскольку атмосферный O_2 есть, несомненно, результат деятельности живых организмов, такие аэробные литотрофы в некотором смысле питаются продуктами прошлой жизни. Однако существуют и другие литотрофы, которые живут анаэробно, в местах с малым содержанием или даже полным отсутствием молекулярного кислорода — в условиях, подобных тем, которые, должно быть, существовали в ранние дни жизни на Земле, прежде чем в атмосфере накопилось известное количество кислорода.

Наиболее суровые из таких мест — горячие *гидротермальные источники*, находящиеся глубоко внизу на ложе Тихого и Атлантического океанов, в областях, где океаническое ложе раздвигается под напором новых расширяющихся участков земной коры, образуемых при постепенном подъеме пород из недр нашей планеты (**рис. 1.15**). Нисходящая фильтрующаяся морская вода нагревается и выбрасывается обратно вверх в виде подводного гейзера, неся с собой поток химических веществ, вымытых из нижележащих горячих пород. Обычно в этот «коктейль» входят H_2S , H_2 , CO , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , CH_4 , NH_4^+ и фосфорсодержащие соединения. В окрестности такого источника живет плотная популяция бактерий, разрастаясь на этой «строгой диете» и извлекая свободную энергию из реакций, происходящих между «имеющимися в распоряжении» химическими веществами. Другие организмы: моллюски, мидии и гигантские морские черви, в свою очередь, живут за счет обитающих в гейзере бактерий, формируя целостную экосистему, аналогичную системе растений и животных, к которой принадлежим мы с вами, но только снабжаемую геохимической энергией вместо световой (**рис. 1.16**).

1.2.2. Некоторые клетки усваивают азот и двуокись углерода для питания других клеток

Для того чтобы поддерживать свое существование, клетке нужна материя и свободная энергия. ДНК, РНК и белок состоят всего из шести химических эле-

Рис. 1.15. Геология горячего гидротермального источника в океаническом ложе. Вода фильтруется, просачиваясь вниз к горячей расплавленной горной породе, поднимающейся из недр Земли, нагревается и выталкивается обратно вверх, неся в себе минералы, выщелоченные из горячей породы. При этом устанавливается температурный градиент — от более чем 350 °С вблизи ядра источника до 2–3 °С в окружающем океане. По мере охлаждения воды из нее осаждаются минералы и образуют кратер. Организмы различных классов, процветающие при различных температурах, живут в более или менее удаленных окрестностях кратера. Типичный кратер может иметь высоту несколько метров и скорость потока 1–2 м/с.



ментов: водорода, углерода, азота, кислорода, серы и фосфора. Все они наполняют неживую окружающую среду: земные породы, воду и атмосферу, но находятся в таких химических формах, которые не позволяют клетке легко включить их в биологические молекулы. В частности, атмосферные N_2 и CO_2 являются крайне

инертными химическими соединениями, и поэтому для протекания реакций, в ходе которых из этих неорганических молекул синтезируются органические соединения, необходимые для дальнейшего биосинтеза, то есть для *усвоения* азота и углекислого газа в такой форме, в которой N и C становятся доступным сырьем для живых организмов, требуется большое количество свободной энергии. В живых клетках многих типов отсутствуют биохимические машины, способные успешно выполнять подобное усвоение, поэтому такие клетки и вынуждены рассчитывать на клетки других классов, которые сделают за них эту работу. Мы, животные, зависим от растений в плане снабжения нашего организма органическим углеродом и соединениями азота. Растения, хотя и могут усваивать углекислый газ из атмосферы, обделены способностью усваивать атмосферный азот и поэтому отчасти зависят от усваивающих азот бактерий, способных удовлетворить их потребность в соединениях азота. Например, растения семейства гороха предоставляют кров симбиотическим усваивающим азот бактериям в узелках на своих корнях.

В связи с этим живые клетки значительно отличаются друг от друга по некоторым ключевым аспектам биохимии. Неудивительно, что клетки со взаимно дополняющими потребностями и способностями развились до уровня тесных сообществ. Некоторые из таких сообществ, как мы увидим ниже, эволюционировали до такой степени, что партнеры полностью потеряли свою самобытность: они объединили усилия и образовали единую сложную клетку.



Рис. 1.16. Живые организмы в окрестности горячего гидротермального источника. Поблизости от источника, при температурах приблизительно до 150 °С, живут литотрофные бактерии и археи (археобактерии) различных видов, непосредственно поглощающие геохимическую энергию. Немного подалее, при более низких температурах, живут различные беспозвоночные животные, которые питаются этими микроорганизмами. Наиболее поразительные из них — гигантские (2-метровые) трубчатые черви, которые, вместо того чтобы питаться литотрофными клетками, живут с ними в симбиозе: специализированные органы червей предоставляют кров несметным числам симбиотических окисляющих серу бактерий. Эти бактерии используют геохимическую энергию и поставляют пищу своим хозяевам, которые не имеют ни рта, ни кишечника, ни заднего прохода. Зависимость трубчатых червей от бактерий в использовании геотермической энергии походит на зависимость растений от хлоропластов в плане использования солнечной энергии, каковую мы обсудим чуть позже в этой главе. Трубчатые черви, однако, как думают, эволюционировали из обыкновенных и прошли вторичную адаптацию к жизни вблизи гидротермальных источников. (Любезность Dudley Foster, Woods Hole Oceanographic Institution.)

1.2.3. Наибольшее биохимическое разнообразие наблюдается среди клеток прокариот

Благодаря обычной световой микроскопии уже давно стало ясно, что на основании структуры клетки живые организмы могут быть классифицированы на две группы: **эукариоты** и **прокариоты**. В клетках эукариот ДНК находится во внутриклеточной полости, ограниченной ясно различимой мембраной и называемой ядром. Слово «эукариот» буквально переводится с греческого как «истинно ядерный» (содержащий ядро) и происходит от слов *eu* — «действительно» или «истинно» — и *karyon* — «сердцевина» или «ядро». Прокариоты не имеют отчетливой ядерной полости для размещения там своей ДНК. Растения, грибы и животные относятся к эукариотам; бактерии — к прокариотам.

Доядерные клетки, как правило, малы в размерах, просты по внешнему виду и живут большей частью как независимые индивиды, а не многоклеточные организмы. Обычно их форма шаровидная или палочковидная, а линейные размеры составляют несколько микрометров (**рис. 1.17**). Часто они имеют жесткую защитную оболочку, называемую *клеточной стенкой*, под которой плазматическая мембрана охватывает единственную цитоплазматическую полость, содержащую ДНК, РНК, белки и большое количество маленьких молекул, необходимых для жизни клетки. В электронном микроскопе это внутреннее содержимое клетки выглядит как матрикс с изменяющейся текстурой без видимых признаков какой-либо организованной внутренней структуры (**рис. 1.18**).

Доядерные клетки обитают в огромном многообразии экологических ниш и удивительно разнообразны по своим биохимическим способностям — в гораздо

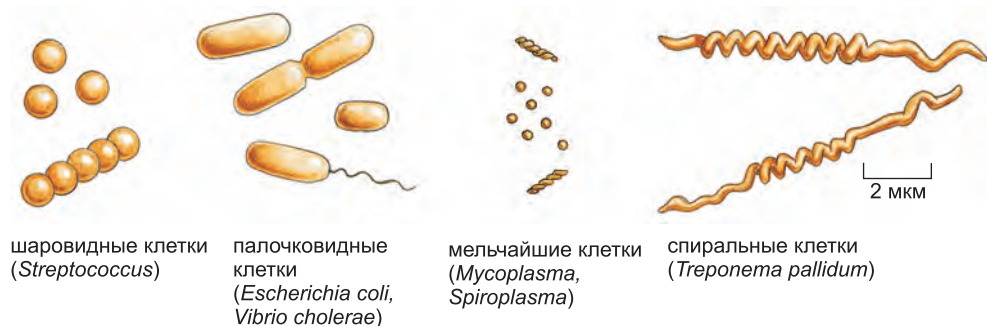


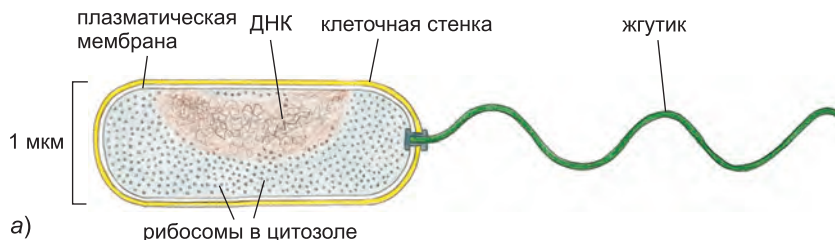
Рис. 1.17. Формы и размеры некоторых бактерий. Хотя в большинстве своем бактерии малы, как показано на рисунке, встречаются также некоторые гигантские виды. Пример такой крайности (на рисунке не показан) — имеющая форму сигары бактерия *Epyulopiscium fishelsoni*, которая живет в кишечнике рыбы-хирурга и может достигать 600 мкм в длину.

большой степени, чем ядерные клетки. Существуют органотрофные виды, которые способны использовать в качестве пищи органические молекулы практически любого типа — от сахаров и аминокислот до углеводов и болотного газа метана. Известны многие фототрофные виды (рис. 1.19), поглощающие световую энергию множеством способов, причем одни из них генерируют кислород в качестве побочного продукта, а другие этого не делают. Наконец, встречаются литотрофные виды, которые могут «сидеть» на незамысловатой диете из неорганических питательных веществ: необходимый им углерод получают из CO_2 , а при удовлетворении своих энергетических потребностей полагаются или на H_2S (рис. 1.20), или на H_2 , Fe^{2+} , элементарную серу, или на любое другое химическое вещество из имеющихся в окружающей среде.

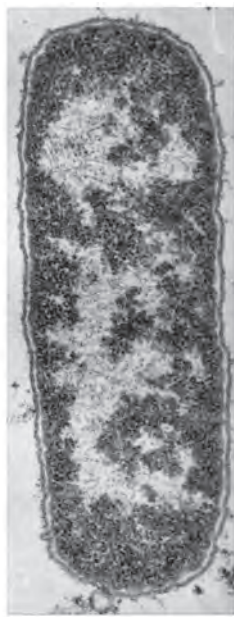
Многие уголки этого мира микроскопических организмов фактически не изведаны. Традиционные методы бактериологии дали нам четкое представление о тех видах, которые могут быть выделены и культивируемы в лаборатории. Но анализ последовательностей ДНК популяций бактерий в свежих пробах, взятых из естественных сред обитания, — таких как почва, или океаническая вода, или даже рот человека, — открыл нам глаза на тот факт, что микроорганизмы большинства видов не могут быть культивируемы стандартными лабораторными методами. Согласно одной оценке, нам еще предстоит охарактеризовать по меньшей мере 99% видов доядерных организмов.

1.2.4. Три основные ветви древа жизни: бактерии, археи и эукариоты

Традиционно классификация живых существ основана на сравнении их внешних особенностей. Так, мы видим, что рыба имеет глаза, челюсти, хребет, мозг и так далее — так же, собственно, как и мы с вами, а червь всего этого не имеет; розовый куст, скажем, может приходиться двоюродным братом яблоне, но кажется нам менее похожим на траву. Мы можем с легкостью интерпретировать такие близкие семейные сходства в плане эволюции от общих предков и можем найти останки многих из этих предков, сохранившиеся в летописи окаменелостей. Таким образом, появилась возможность начать прорисовку генеалогического древа живых организмов, по которому можно проследить как различные линии наследования,



б)



1 мкм

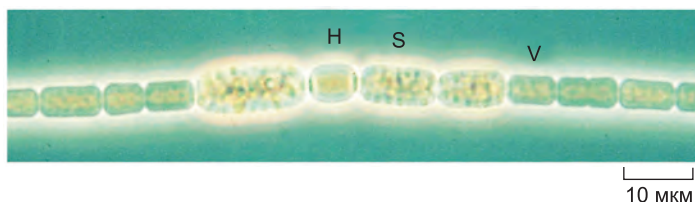
Рис. 1.18. Структура бактерии. а) Нехитрая внутренняя организация бактерии *Vibrio cholerae*. Подобно многим другим видам, *Vibrio cholerae* имеет на одном конце завитой придаток — жгутик, который вращается словно пропеллер и продвигает клетку вперед. б) Электронный микрофотоснимок продольного среза популярного объекта исследований — бактерии *Escherichia coli* (*E. coli*). Она похожа на *Vibrio cholerae*, но не имеет жгутика. ДНК клетки концентрируется в окрашенной светлой области. (Рис. б — любезность E. Kellenberger.)

так и точки «исторических» ответвлений, когда предки одной группы видов стали отличаться от таковых другой.

Однако, как только различия между организмами становятся очень большими, эти методы перестают работать. К примеру, исходя из чего мы можем решить, является ли гриб более близким родственником растению или животному? Когда дело доходит до прокариот, задача становится еще более трудной: одна микроскопическая палочка или шарик очень похожа на другую. Поэтому микробиологи стремились проводить классификацию прокариот, основываясь на присутствии им биохимических процессов и пищевых требованиях. Но этот подход также таит в себе подводные камни. Среди ошеломляющего разнообразия вариантов биохимического

поведения трудно распознать, какие отличия действительно отражают различия в эволюционной истории.

Анализ геномов преобразил эту задачу, дав нам более простой, более прямой и более действенный способ определения эволюционных отношений. Полная последовательность ДНК организма определяет его биологический вид с почти совершенной точностью и в исчерпывающих подробностях. Кроме того, эта «спецификация», как только мы ее определили, находится в цифровой форме — строки букв, — которую можно не-



10 мкм

Рис. 1.19. Фототрофная бактерия *Anabaena cylindrica* в световом микроскопе. Клетки этого вида формируют длинные многоклеточные нити. Большинство клеток (маркированы буквой V) осуществляет фотосинтез, в то время как часть их специализировалась на усвоении азота (отмечены буквой H) или развилась в устойчивые к внешним воздействиям споры (обозначены буквой S). (Любезность Dave G. Adams.)

Рис. 1.20. Литотрофная бактерия *Beggiatoa*. Эта бактерия живет в серосодержащих средах, получает свою энергию в процессе окисления H_2S и может усваивать углерод даже в темноте. Обратите внимание на желтые скопления серы внутри клеток. (Любезность Ralph W. Wolfe.)



посредственно внести в компьютер и сравнивать с соответствующей информацией о любом другом живом существе. Поскольку ДНК подвержена случайным изменениям, которые накапливаются за длительные периоды времени (как мы вскоре увидим), число различий между последовательностями ДНК двух организмов может быть использовано в качестве прямого, объективного и количественного показателя эволюционного расстояния между ними.

Этот подход показал, что некоторые организмы, которые традиционно классифицировали как «бактерии», настолько же далеко отошли от них по эволюционному происхождению, как любой прокариот от любого эукариота. Теперь ясно, что к прокариотам относятся две различные группы, которые разошлись в ранней истории жизни на Земле: или до того, как предки эукариот ответвились в отдельную группу, или приблизительно в то же самое время. Две группы прокариот называют соответственно **бактериями** (или эубактериями) и **археями** (или архебактериями). Поэтому живой мир имеет три главных подразделения, или *надцарства*: бактерии, археи и эукариоты (рис. 1.21).

Археи были первоначально открыты как обитатели сред, которых мы, люди, избегаем, — например болот, отстойников сточных вод, океанических глубин, рассолов и горячих кислотных источников, — хотя теперь известно, что они широко распространены также и в менее экстремальных и более уютных местах окружающей среды: от почв и озер до желудков крупного рогатого скота. По внешнему виду их нелегко отличить от более знакомых нам эубактерий. На молекулярном уровне археи, как оказалось, в большей степени напоминают эукариот в отношении механизмов обработки генетической информации (репликации, транскрипции и трансляции), но, судя по аппарату метаболизма и преобразования энергии, стоят ближе к эубактериям. В дальнейшем мы обсудим, чем можно объяснить этот интересный факт.

1.2.5. Одни гены эволюционируют быстро, другие весьма консервативны

Как в процессе хранения, так и при копировании генетической информации происходят случайные повреждения и ошибки, приводящие к изменению последовательности нуклеотидов, то есть к появлению **мутаций**. Поэтому образовавшиеся в результате деления две дочерние клетки часто оказываются не совсем идентичными одна другой или материнской клетке. Лишь в редких случаях ошибка может представлять изменение к лучшему; более вероятно, что она не вызовет никакой существенной перемены в дальнейшей судьбе клетки; а во многих случаях ошибка причинит серьезное повреждение, например, нарушит последовательность, коди-

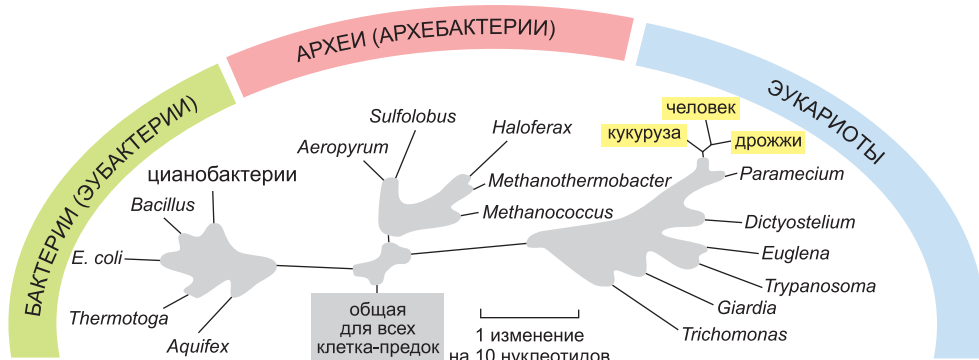


Рис. 1.21. Три главных подразделения (надцарства) живого мира. Следует иметь в виду, что традиционно слово *бактерии* использовали и по отношению ко всем прокариотам, но позже это понятие было пересмотрено и теперь относится конкретно к эубактериям. В тех случаях, когда может возникнуть неясность, лучше употреблять термин *эубактерии*, если подразумевается узкое значение. Древо жизни основано на сравнении нуклеотидных последовательностей рибосомной РНК (рРНК) организмов различных видов. Длины линий представляют числа эволюционных изменений, которые произошли в этой молекуле в каждой генеалогической ветви (см. рис. 1.22). Те области древа, что сокрыты от нас плотной завесой *серой мглы*, таят в себе неясности касательно точной схемы расхождения видов на их общем эволюционном пути: сравнения между последовательностями (нуклеотидными и аминокислотными) прочих молекул, а не рРНК, равно как и некоторые доводы иного рода, свидетельствуют в пользу других, несколько отличающихся схем. Однако ученым все же удалось прийти к соглашению, что первое и наиболее основополагающее расхождение — это разветвление на три надцарства: бактерии, археи и эукариоты.

рующую жизненно важный белок. Изменения, произошедшие в результате ошибок первого типа, как правило, сохраняются навсегда, потому что уровень воспроизводства таким образом измененной клетки повышен. Изменения, обусловленные ошибками второго типа — *селективно нейтральные* изменения, — могут либо увековечиться либо нет — в соревновании за ограниченные ресурсы лишь случаю дано решать, кто преуспеет: измененная клетка или ее сородичи. Но изменения, которые вызывают серьезные повреждения, переходят в небытие: клетка, которая их претерпевает, умирает, не оставляя потомства. Путем бесконечного повторения такого цикла, начинающегося с появления ошибки и заканчивающегося результатами испытания — *мутации* и *естественного отбора*, — организмы эволюционируют: их генетические инструкции редактируются, предоставляя им способы более эффективного использования окружающей среды, выживания в условиях конкуренции с другими организмами и, наконец, успешного воспроизводства.

Ясно, что в ходе эволюции одни части генома изменяются легче других. Сегмент ДНК, который не кодирует белок и не играет существенной регуляторной роли, может свободно изменяться с частотой, ограниченной лишь частотой появления случайных ошибок. Напротив, ген, который кодирует высоко оптимизированный важнейший белок или молекулу РНК, не может изменяться столь же легко: при возникновении таких ошибок дефектные клетки почти всегда устраняются. Поэтому такие гены *высококонсервативны*. За время эволюционной истории, насчитывающей 3,5 миллиарда лет, а возможно, даже больше, многие черты генома изменились до полной неузнаваемости; но наиболее высококонсервативные гены остались вполне распознаваемыми у всех живущих видов.

Именно эти гены и нужно исследовать, если мы желаем выяснить родственные отношения между наиболее отдаленно связанными организмами древа жизни. Исследования, которые привели к классификации живого мира на три подразделения (бактерии, археи и эукариоты), базировались в основном на анализе одной из субъединиц рибосомной РНК — так называемой 16S РНК, в состав которой входит приблизительно 1 500 нуклеотидов. Поскольку трансляция — процесс принципиально важный для всех клеток, этот компонент рибосомы надежно сохранился на всем протяжении истории жизни на Земле (рис. 1.22).

1.2.6. Большинство бактерий и архей имеет по 1 000–6 000 генов

Естественный отбор, как правило, благоволил к тем доядерным клеткам, которые могли воспроизводиться наиболее быстро, подбирая сырье из среды своего обитания и реплицируясь наиболее эффективно: с максимальной скоростью, допустимой доступными запасами пищи. Малый размер подразумевает большую величину значения: отношения площади поверхности к объему, — при таких параметрах поглощение питательных веществ через плазматическую мембрану будет максимально увеличивать скорость воспроизводства клетки.

Вполне возможно, что именно по этим причинам большинство доядерных клеток несет в себе очень мало лишнего багажа: их геномы маленькие и компактные, а гены плотно упакованы и между ними находится минимальное количество регуляторной ДНК. Малый размер генома позволяет относительно легко определить полную последовательность ДНК. В настоящее время мы имеем такую информацию для многих видов эубактерий и архей, а также для нескольких видов эукариот. Как показано в таблице 1.1, геномы почти всех эубактерий и архей содержат от 10^6 до 10^7 пар нуклеотидов и кодируют 1 000–4 000 генов.

Полная последовательность ДНК содержит как гены, которыми организм обладает, так и гены, которые у него отсутствуют. При сравнении геномов трех царств живого мира мы можем различить, какие гены являются общими для представителей всех царств, и потому должны быть в клетке-предке всех современных живых существ, а какие гены свойственны лишь какой-то одной из ветвей древа жизни. Однако, чтобы объяснить подобные наблюдения, мы должны немного ближе познакомиться с тем, как возникают новые гены и эволюционируют геномы.

```

GTTCGGGGGAGTATGGTTGCAAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGGAAGGGCACCACGAGGAGTGGAGCCTCGCGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCC человек
GCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACGGGTGGAGCCTCGCGCTTAATTTGGATTCAACCGCGGGCATTTACCA Methanococcus
ACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTTAAAGGAATTGACGGGAAGGGCACCACGAGGAGTGGAGCCTCGCGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCC E.coli
GTTCGGGGGAGTATGGTTGCAAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGGAAGGGCACCACGAGGAGTGGAGCCTCGCGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCC человек

```

Рис. 1.22. Генетическая информация, сохранявшаяся с начала зарождения жизни. Показана часть гена, кодирующего меньший из двух главных компонентов рибосомной РНК. Соответствующие отрезки нуклеотидной последовательности археи (*Methanococcus jannaschii*), эубактерии (*Escherichia coli*) и эукариота (*Homo sapiens*) выровнены параллельно друг другу. Участки, в которых нуклеотиды представленных видов идентичны, обозначены вертикальными линиями; последовательность гена рРНК человека повторно приведена у основания выравнивания — исключительно для наглядности. Точка в средней части последовательности гена *E. coli* обозначает участок, в котором нуклеотид в ходе эволюции был либо удален из последовательности поколений эубактерий, либо вставлен в две другие генеалогические ветви. Обратите внимание, что последовательности генов рРНК этих трех организмов, представителей трех надцарств живого мира, отличаются друг от друга примерно в одинаковой степени и при этом все еще сохраняют не содержащие ошибок области подобия.

Таблица 1.1. Некоторые полностью секвенированные геномы

ВИД	ХАРАКТЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ	СРЕДА ОБИТАНИЯ	РАЗМЕР ГЕНОМА (Т. П. Н. НА ГАПЛОИДНЫЙ ГЕНОМ)	ЧИСЛО ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ
Бактерии				
<i>Mycoplasma genitalium</i>	наименьший геном среди всех известных клеток	половые пути человека	580	468
<i>Synechocystis sp.</i>	фотосинтетический, вырабатывающий кислород (цианобактерия)	озера и ручьи	3 573	3 168
<i>Escherichia coli</i>	фаворит исследовательских лабораторий	кишечник человека	4 639	4 289
<i>Helicobacter pylori</i>	вызывает язвы желудка и предрасполагает к раку желудка	желудок человека	1 667	1 590
<i>Bacillus subtilis</i>	бактерия	почва	4 214	4 099
<i>Aquifex aeolicus</i>	литотроф; живет при высоких температурах	гидротермальные источники	1 551	1 544
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	вызывает туберкулез	ткани человека	4 447	4 402
<i>Treponema pallidum</i>	спирохета; вызывает сифилис	ткани человека	1 138	1 041
<i>Rickettsia prowazekii</i>	бактерия, наиболее близкородственная митохондриям; вызывает тиф	вошь и человек (внутриклеточный паразит)	1 111	834
<i>Thermotoga maritima</i>	органотроф; живет при высоких температурах	гидротермальные источники	1 860	877
Археи				
<i>Methanococcus jannaschii</i>	литотроф, анаэроб, вырабатывает метан	гидротермальные источники	1 664	1 750
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	литотроф или органотроф, анаэроб, восстанавливает сульфаты	гидротермальные источники	2 178	2 493
<i>Aeropyrum pernix</i>	аэроб, органотроф, горячие паровые гейзеры	прибрежные вулканы	669	2 620
Эукариоты				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (пекарские дрожжи)	минимальный модельный эукариот	кожица винограда, пиво	12 069	≈ 6 300
<i>Arabidopsis thaliana</i> (резушка Таля)	организм — модель цветковых растений	почва и воздух	≈ 142 000	≈ 26 000
<i>Caenorhabditis elegans</i> (червь-нематода)	простое животное с точно предсказуемым развитием	почва	≈ 97 000	≈ 20 000
<i>Drosophila melanogaster</i> (плодовая мушка)	ключ к генетике развития животных	гниющие фрукты	≈ 137 000	≈ 14 000
<i>Homo sapiens</i> (человек)	наиболее интенсивно изучаемое млекопитающее	дома	≈ 3 200 000	≈ 24 000

Примечание: размер генома и число генов отличается у разных штаммов (популяций) одного и того же вида, в особенности у бактерий и архей. В данной таблице приведены данные по секвенированию определенных штаммов. Что касается эукариот, то многие гены могут производить различные варианты белков, так что общее число белков, закодированных в геноме, намного превышает число имеющихся в нем генов.

1.2.7. Новые гены возникают из генов-предшественников

Сырьем эволюции служат уже существующие последовательности ДНК — в природе не предусмотрен механизм для создания длинных отрезков новой случайной последовательности. В этом смысле никакой ген никогда не является абсолютно новым. Однако новшество все же может появиться и притом несколькими способами (рис. 1.23).

Внутригенная мутация: существующий ген может быть изменен мутациями в последовательности ДНК.

Дублирование гена: существующий ген может быть продублирован, в результате чего образуется пара близкородственных генов в пределах одной клетки.

Перетасовка сегментов: два и более существующих гена могут быть разорваны и воссоединены, так что будет получен гибридный ген, состоящий из сегментов ДНК, которые первоначально принадлежали разным генам.

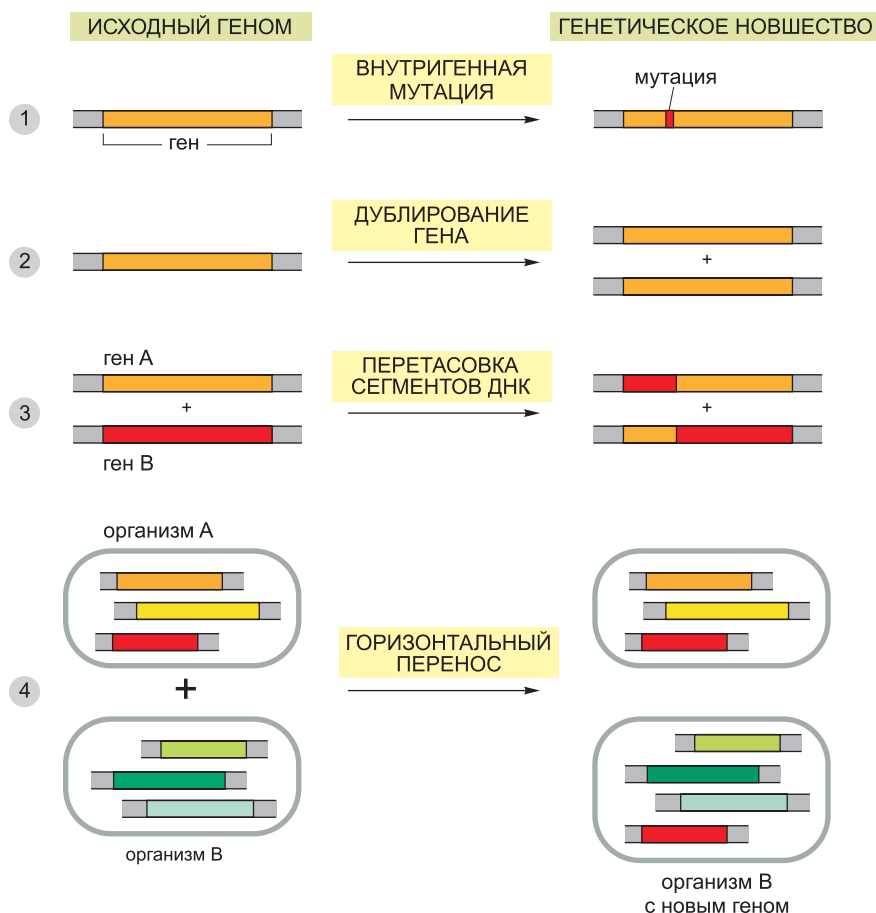


Рис. 1.23. Четыре способа появления генетических «инноваций» и их влияние на последовательность ДНК организма. Когда клетки двух разных типов вступают в нерасторжимый симбиотический союз, тогда гены одной из них могут переместиться в геном другой — что мы подробно обсудим дальше при рассмотрении митохондрий и хлоропластов.

Горизонтальный (межклеточный) перенос: часть ДНК генома одной клетки может быть передана другой клетке, даже с геномом другого вида. Этот процесс противоположен обычному *вертикальному переносу* генетической информации, направленному от родителя к потомству.

Изменения всех этих типов оставляют в последовательности ДНК организма характерный след, по которому можно судить о протекании этих четырех процессов. В последующих главах мы обсудим лежащие в их основе механизмы, но пока мы сфокусируем наше внимание на последствиях.

1.2.8. Дублирование генов дает начало семействам родственных генов в пределах одной клетки

Каждый раз, когда клетка делится на две дочерние клетки, она полностью дублирует свой геном. Однако иногда происходят «аварии», приводящие к местному дублированию какой-то части генома, при этом в одной клетке остаются и оригинал, и продублированные фрагменты. После подобного дублирования одна из двух копий гена может видоизмениться и начать специализироваться на выполнении особой функции в пределах той же самой клетки. Повторные циклы такого процесса дублирования и расхождения за многие миллионы лет привели к тому, что один ген может дать начало семейству генов, находящихся в пределах одного генома. Анализ последовательности ДНК геномов прокариот показал, что существует множество таких семейств генов: например, у *Bacillus subtilis* 47% генов имеет одного или несколько явных родственников (рис. 1.24).

Когда гены подобным образом дублируются и расходятся, особи одного вида наделяются многократными вариантами предкового гена. Этот эволюционный процесс нужно отличать от генетического расхождения, которое происходит, когда один вид разделяется на две отдельные нисходящие линии в точке разветвления в древе семейства: например, когда ветвь человека отделилась от ветви шимпанзе. В ходе эволюции гены постепенно начинают отличаться друг от друга, но, вероятно, продолжают выполнять аналогичные функции в двух сестринских видах. Гены, которые связаны происхождением, то есть гены двух отдельных видов, происходя-

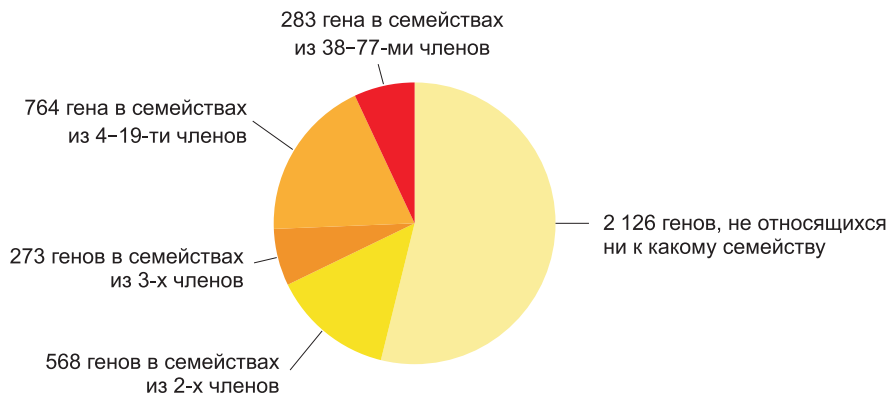


Рис. 1.24. Семейства эволюционно родственных генов в геноме *Bacillus subtilis*. Самое представительное семейство состоит из 77 генов, кодирующих разновидности АВС-переносчиков — класса мембранных транспортных белков, встречающихся во всех трех надцарствах живого мира. (Переработано из статьи F. Kunst et al., *Nature* 390: 249–256, 1997. С разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

щие от одного и того же гена-предка, который был у последнего общего предка обоих видов, — называют **ортологами**. Родственные гены, явившиеся результатом дублирования гена в пределах одного генома — и, вероятно, различающиеся по своим функциям, — называют **паралогами**. Гены, которые связаны общим происхождением, независимо от пути эволюции, называют **гомологами**, этот общий термин охватывает связи обоих типов (**рис. 1.25**).

Взаимоотношения между семействами генов могут оказаться весьма сложными (**рис. 1.26**). Например, организм, который обладает семейством генов-паралогов (скажем, 7-ю генами гемоглобина: α , β , γ , δ , ϵ , ζ и θ), может эволюционировать в два отдельных вида (такие как человек и шимпанзе), обладающих полным набором паралогов. Все 14 генов — гомологи, причем ген гемоглобина α человека приходится ортологом гемоглобину α шимпанзе, но паралогом гену гемоглобина β человека или шимпанзе, и так далее. Кроме того, гемоглобины позвоночных (белки крови, связывающие кислород) гомологичны миоглобинам позвоночных (мышечные белки, связывающие кислород), а также более отдаленным генам, кодирующим белки, связывающие кислород у беспозвоночных, растений, грибов и бактерий. Обычно по последовательностям ДНК легко распознать гомологию между двумя генами для различных видов; намного труднее, не имея дополнительной информации, решить, состоят ли они в эволюционных отношениях как ортологи.

1.2.9. Гены могут передаваться между организмами как в лаборатории, так и в природе

Прокариоты также дают примеры горизонтальной передачи генов от одних видов клеток к другим. Наиболее явный признак этого — последовательности, распознаваемые по происхождению от бактериальных вирусов, называемых также *бактериофагами* (**рис. 1.27**). Вирусы не являются самостоятельно живущими клетками, но могут выступать в роли векторов для передачи гена: они являют

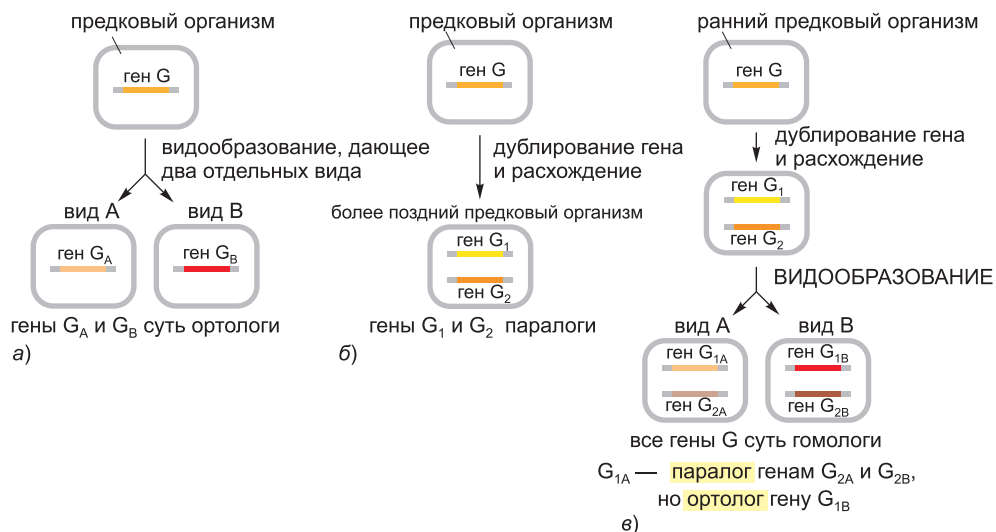


Рис. 1.25. Паралогичные и ортологичные гены — два типа гомологии генов, основанной на различии путей эволюции. а) и б) Основные варианты. в) Более сложный сценарий возможных событий.

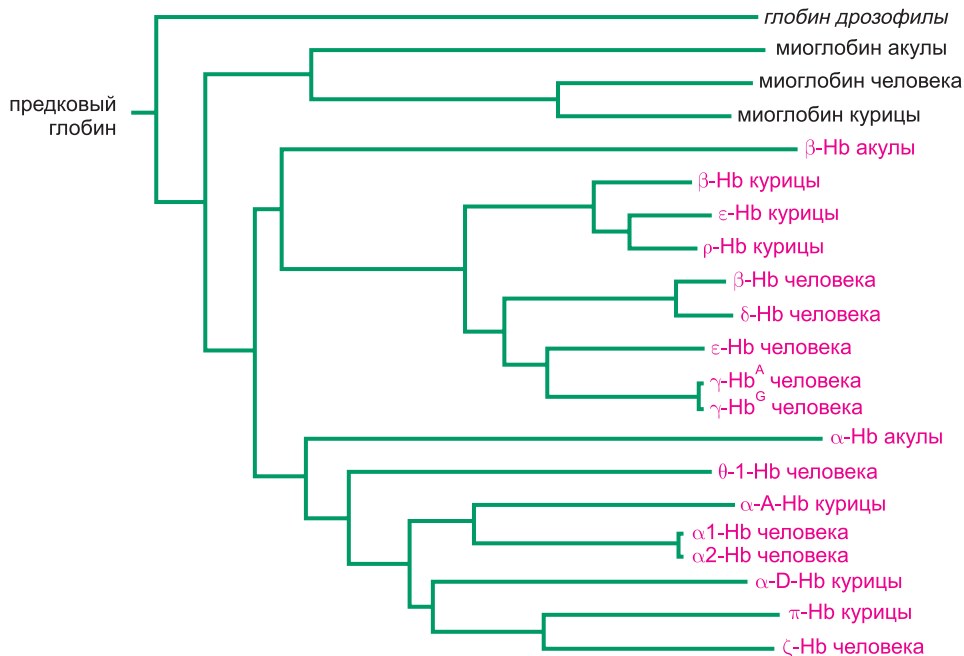
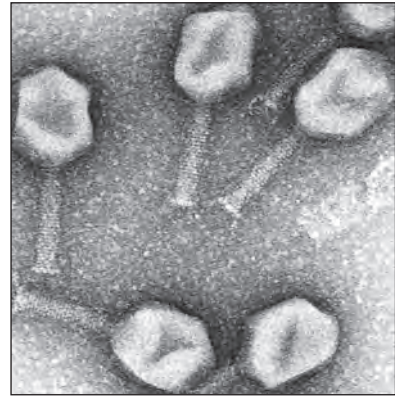


Рис. 1.26. Комплексное семейство гомологичных генов. На этой схеме показана родословная генов гемоглобина (Hb) и миоглобина человека, курицы, акулы и глобина дрозофилы. Длины горизонтальных линий отражают степень расхождения между аминокислотными последовательностями.

собою маленькие сгустки генетического материала, развившиеся как паразиты на репродуктивных и биосинтетических машинах клеток хозяина. Они копируются в клетке, после этого выходят из нее в защитной оболочке и затем заражают другую клетку, принадлежащую к этому же или другому виду. Часто зараженная клетка уничтожается быстрым и массовым размножением вирусных частиц; но иногда вирусная ДНК, вместо того чтобы непосредственно производить частицы, может сохраняться в организме хозяина на протяжении многих поколений как относительно безвредный пассажир или в виде отдельного внутриклеточного фрагмента ДНК, известного под названием *плазмида*, или в виде последовательности, вставленной в ненарушенный геном клетки. В своих путешествиях вирусы могут случайно собрать фрагменты ДНК от генома одной клетки хозяина и переправить их в другую клетку. Такая передача генетического материала часто происходит у прокариот, но также может происходить и между клетками эукариот одного и того же вида.

Горизонтальные переносы генов между клетками эукариот разных видов очень редки и, кажется, не играют существенной роли в их эволюции (хотя, как будет сказано ниже, в эволюции митохондрий и хлоропластов происходили массовые передачи бактериального генома геному эукариот). Напротив, между различными видами прокариот горизонтальный перенос генов происходит намного чаще. Многие прокариоты обладают замечательной способностью подхватывать даже невирусные молекулы ДНК из своего окружения и, таким образом, захватывать генетическую информацию, которую эти молекулы несут. Этим путем, или вирус-

Рис. 1.27. Передача вирусной ДНК от одной клетки другой.
 а) Электронная микрофотография частиц вируса бактерий — бактериофага Т4. Головка этого вируса содержит вирусную ДНК; хвост содержит аппарат для впрыскивания ДНК в бактерию-хозяина. б) Поперечный разрез бактерии, к поверхности которой прикрепился бактериофаг Т4. Большие темные пятна внутри бактерии — головки новых частиц Т4 в процессе сборки. Когда они созреют, бактерия разорвется, высвобождая их. (Снимок а перепечатан с любезного разрешения James Paulson; б — Jonathan King и Erika Hartwig из G. Karp, *Cell and Molecular Biology*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1999, и с разрешения издательства John Wiley & Sons.)



а)

100 нм

опосредованным переносом, бактерии и археи в природе могут относительно легко приобретать гены соседних клеток. Гены устойчивости к антибиотикам или продуцирующие токсины, например, могут быть переданы от одного вида другому и обеспечить преимущество бактерии-получателя в ходе селекции. Этим способом в бактериальных экосистемах эволюционируют новые и иногда опасные штаммы бактерий, которые населяют больницы или различные ниши человеческого организма. Например, горизонтальный перенос генов вызвал распространение в течение последних 40 лет стойких к пенициллину штаммов *Neisseria gonorrhoeae* — бактерии, которая вызывает гонорею. На более продолжительной шкале времени результаты могут быть еще более впечатляющими: по оценкам ученых, по крайней мере 18% всех генов современной *E. coli* приобретено за последние 100 миллионов лет путем горизонтального переноса от других видов.



б)

100 нм

1.2.10. Половое размножение обеспечивает горизонтальный обмен генетической информацией в пределах вида

Горизонтальный обмен генетической информацией чрезвычайно важен в эволюции бактерий и архей современного мира, и, возможно, в первые дни жизни на Земле этот процесс происходил еще чаще. Существование горизонтального обмена между генами на ранних этапах развития жизни позволило объяснить факты, которые в противном случае озадачили бы любого наблюдателя: эукариоты более близки археям по генам, ответственным за основные процессы обработки информации в ходе репликации ДНК, транскрипции и трансляции, но по генам, ответственным за метаболические процессы, более схожи с бактериями. В любом случае, происходил ли горизонтальный перенос генов свободнее в первые дни жизни на Земле или продолжался с постоянной низкой скоростью на протяжении всей истории эволюции, он здорово усложняет для нас такое понятие, как родословная клетки, так как благодаря ему геном каждой клетки становится соединением частей, полученных из отдельных источников.

Горизонтальный перенос генов среди прокариот может казаться удивительным, но в нем прослеживается аналогия со знакомым нам всем явлением — половым размножением. В дополнение к обычному вертикальному переносу генетического материала — от родителя к потомству — половое воспроизводство становится причиной крупномасштабного горизонтального переноса генетической информации между разными по происхождению клетками, как то: отцовской и материнской. Ключевая особенность полового размножения, конечно, заключается в том, что генетический обмен обычно происходит только между индивидами одного и того же вида. Но, независимо от того, происходят ли они в пределах вида или между видами, горизонтальный перенос генов оставляет характерный отпечаток: он приводит к появлению особей, которые по одним генам ближе к первой группе родственников, а по другим — ко второй. Сравнивая последовательности ДНК индивидуальных геномов людей, разумный космический пришелец, даже ничего не зная о поведении людей, мог бы сделать заключение, что люди воспроизводятся половым размножением.

Особенно широко половое воспроизводство распространено (хотя и не универсально) среди эукариот. Даже бактерии время от времени позволяют себе управляемый половой обмен ДНК между членами одного и того же вида. Хотя эволюционисты и подвергают сомнению вопрос о преимуществе полового процесса в естественном отборе, но он явно благоприятствовал организмам, способным воспроизводиться половым путем.

1.2.11. Зачастую функция гена может быть установлена по его последовательности

Взаимосвязи генов в пределах семейства важны не только для их исторического значения, но и потому, что они упрощают задачу расшифровки функций гена. После определения последовательности недавно открытого гена ученому достаточно ввести в компьютер всего несколько ключевых последовательностей, для того чтобы в сетевой базе данных провести поиск известных последовательностей генов, родственных «только что обретенному». Во многих случаях функция одного или нескольких таких гомологов уже будет установлена экспериментально, а из этого, так как последовательность гена определяет его функцию, во многих случаях можно предположить функцию нового гена: по всей вероятности, она будет подобна таковой для известных гомологов.

Благодаря этому можно многое разгадать в биологии организма, просто анализируя последовательность ДНК его генома и используя уже известную информацию о функциях генов в других организмах, изученных более детально.

1.2.12. Более 200 семейств генов являются общими для всех трех основных ветвей древа жизни

Располагая полными последовательностями геномов организмов — представителей всех трех надцарств: архей, бактерий и эукариот, — мы можем провести системный анализ гомологичных последовательностей, которые будут перекрывать огромные эволюционные пропасти между ними. Так мы сможем приступить к оценке наследственного материала, общего для всех живых существ. Большие трудности подстерегают исследователя в этом рискованном предприятии. Например, отдельные виды зачастую теряли некоторые предковые гены; другие гены почти наверняка приобретены посредством горизонтального переноса от других видов и поэтому не могут считаться истинно предковыми для этих видов, хотя и при-

надлежат им. Фактически, сравнение геномов настоятельно наводит на мысль, что и обусловленная происхождением потеря генов, и горизонтальный перенос генов между эволюционно отдаленными видами в каких-то случаях становились главными факторами эволюции, по крайней мере среди прокариот. Наконец, на протяжении 2 или 3 миллиардов лет эволюции некоторые гены, которые были первоначально общими, изменились до неузнаваемости по описанным выше причинам.

Из-за всех этих превратностей эволюционного процесса создается впечатление, что только малая доля предковых семейств генов сохранилась у всех видов в легко узнаваемой форме. Таким образом, из 4873 кодирующих белок семейств генов, которые идентифицированы при сопоставлении геномов 50 видов бактерий, 13 архей и 3 одноклеточных эукариот, только 63 оказались действительно вездесущими (то есть представленными во всех проанализированных геномах). Значительное большинство этих универсальных семейств относится к компонентам систем транскрипции и трансляции. Вряд ли их можно считать реальным приближением к предковому набору генов. Лучшее — хотя все еще незрелое — представление о последнем может быть получено при регистрации таких семейств генов, которые есть у представителей многих, но не обязательно всех видов из всех трех надцарств. Таким анализом выявлено 264 древних консервативных семейства. Каждому семейству может быть приписана функция (по меньшей мере в плане общей биохимической активности, но, как правило, с большей точностью), при этом наибольшее число генов из этих общих семейств участвует в трансляции, а также в метаболизме и транспорте аминокислот (**таблица 1.2**). Такой набор высококонсервативных семейств генов представляет собою лишь предварительный набросок наследственного материала, единого для всей современной жизни; дальнейшие успехи в секвенировании геномов и совершенствование методов проведения более тонкого сравнительного анализа, возможно, позволят провести более точную реконструкцию набора генов у последнего общего предка всех живых существ.

1.2.13. Мутации раскрывают функции генов

Не располагая дополнительной информацией, можно сколь угодно долго вглядываться в последовательности геномов, но так и не углядеть функции генов. Конечно, мы можем опознать ген В, подобный гену А, но как распознать функцию гена А изначально? И даже зная функцию гена А, как мы можем проверить, действительно ли функция гена В тождественна ей, как это предполагает подобие их последовательностей? Как совместить мир абстрактной генетической информации с миром реальных живых организмов?

Анализ функций генов зависит от двух взаимодополняющих подходов: генетического и биохимического. Генетика отталкивается от изучения мутантов: мы находим или создаем организм, у которого интересующий нас ген видоизменен, и исследуем влияние измененного гена на строение и жизнедеятельность организма (**рис. 1.28**). Биохимия исследует функции молекул: мы извлекаем молекулы из организма и затем изучаем их химические свойства. Объединяя генетику с биохимией и исследуя химические отклонения в организме мутанта, можно найти именно те молекулы, производство которых зависит от данного гена. В то же время изучение жизнедеятельности организма мутанта показывает нам, какую роль эти молекулы играют в функционировании организма в целом. Таким образом, объединенные усилия генетики и биохимии позволяют связать воедино гены, молекулы, а также строение и функционирование организма.

Таблица 1.2. Количество обших для всех трех надцарств живого мира семейств генов, сгруппированных в соответствии с выполняемыми ими функциями

ФУНКЦИЯ СЕМЕЙСТВА ГЕНОВ	КОЛИЧЕСТВО «УНИВЕРСАЛЬНЫХ» СЕМЕЙСТВ
Обработка информации	
Трансляция	63
Танскрипция	7
Репликация, рекомбинация и репарация	13
Внутриклеточные процессы и передача сигнала	
Управление клеточным циклом, митоз и мейоз	2
Защитные механизмы	3
Механизмы передачи сигналов	1
Биогенез между клеточной стенкой и мембраной	2
Внутриклеточный транспорт и выделение	4
Посттрансляционная модификация, белковый обмен, шапероны	8
Метаболизм	
Образование и превращение энергии	19
Транспорт и метаболизм углеводов	16
Транспорт и метаболизм аминокислот	43
Транспорт и метаболизм нуклеотидов	15
Транспорт и метаболизм коферментов	22
Транспорт и метаболизм жиров	9
Транспорт и метаболизм неорганических ионов	8
Биосинтез, транспорт и катаболизм вторичных метаболитов	5
Недостаточно охарактеризованные	
Предсказаны основные биохимические функции; не известна конкретная биологическая роль	24

При проведении данного анализа семейства генов относили к «универсальным», если они были представлены в геномах, по крайней мере, двух различных архей (*Archaeoglobus fulgidus* и *Aeropyrum pernix*), двух эволюционно далеких бактерий (*Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*) и одного эукариота (дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*). (Данные от R. L. Tatusov, E. V. Koonin и D. J. Lipman, *Science* 278: 631–637, 1997, с разрешения AAAS; R. L. Tatusov et al., *BMC Bioinformatics* 4: 41, 2003, с разрешения BioMed Central; и база данных COGs Национальной Медицинской Библиотеки США).

В последние годы информация, полученная о последовательностях ДНК, и мощное совершенствование инструментария молекулярной биологии сделали возможным стремительный прорыв в этой области. На основании сравнительного анализа последовательностей в пределах одного гена часто можно идентифицировать специфические подобласти, которые остались почти неизменными в ходе эволюции. Такие консервативные подобласти, скорее всего, являются самыми важными частями гена с точки зрения его функции. Мы можем проверить вклад каждой из них в активность продукта гена, вызывая в лабораторных условиях искусственные мутации определенных участков в пределах гена или конструируя искусственные гибридные гены, в которых сочетаются части разных генов. Дабы облегчить биохимический анализ, можно конструировать организмы, в больших количествах синтезирующие как РНК, так и белки, предписываемые этим геном. Специалисты

Рис. 1.28. Мутантный фенотип, отражающий функцию гена. Нормальные дрожжи (вида *Schizosaccharomyces pombe*) по сравнению с мутантами, у которых изменение одного гена привело к преобразованию формы клетки из палочковидной (слева) в Т-образную (справа). Следовательно, мутантный ген контролирует форму клетки. Но как именно на уровне молекул продукт этого гена выполняет такую функцию? Это более чем сложный вопрос, и для ответа на него необходим биохимический анализ. (Фотография любезно предоставлена Kenneth Sawin и Paul Nurse.)



в области структуры молекул могут определить трехмерную конформацию продукта гена, показывающую точное положение каждого атома в нем. Биохимики могут определить, какой вклад каждая из частей генетически предписанной молекулы вносит в ее химическое поведение. Цитологи могут анализировать поведение клеток, сконструированных для экспрессии мутантного гена.

Однако нет ни простого рецепта открытия функции гена, ни простой стандартной универсальной формы для ее описания. Например, мы можем обнаружить, что продукт данного гена катализирует некоторую химическую реакцию, но при этом не иметь ни малейшего представления о том, как или почему данная реакция важна для организма. Функциональная характеристика каждого нового семейства продуктов гена, в отличие от описания последовательностей генов, представляет собой новоявленное испытание находчивости биолога. Кроме того, мы никогда полностью не постигнем функции гена до тех пор, пока не изучим его роль в жизни организма как единого целого. Для того чтобы получить полное представление о функциях гена, нам следует изучать организмы в целом, а не только молекулы или клетки.

1.2.14. Молекулярные биологи сфокусировали свое внимание на *Escherichia coli*

Живые организмы настолько сложны, что чем больше мы узнаем о каких-либо отдельных видах, тем более привлекательными они становятся в качестве объекта дальнейшего изучения. Каждое открытие поднимает новые вопросы и предоставляет новый инструментарий для работы над общими вопросами в контексте выбранного организма. По этой причине большие коллективы биологов посвящают свою жизнь изучению одного и того же **модельного организма** во всех его проявлениях.

В чрезвычайно многообразном мире бактерий внимание молекулярных биологов в течение долгого времени концентрировалось только на одном виде: *Escherichia coli*, или *E. coli* (см. рис. 1.17 и 1.18). Эта маленькая, имеющая форму прута одноклеточная бактерия обычно живет в кишечнике человека и других позвоночных животных, но может быть и легко выращена — в простом питательном бульоне в культуральном сосуде. Она приспосабливается к изменяющимся химическим условиям, быстро размножается и может эволюционировать посредством мутаций и отбора с поразительной скоростью. Как и у других бактерий, различные штаммы *E. coli*, хотя их и классифицируют как представителей одного вида, отличаются генетически в большей степени, чем различные разновидности воспроизводящегося половым путем организма типа растения или животного. Один штамм *E. coli* может обладать многими сотнями генов, которые отсутствуют у другого, а у двух штаммов может быть не более 50% общих генов. Стандартный искусственный штамм *E. coli* K-12 имеет геном приблизительно

из 4,6 млн. п. н., содержащихся в единственной кольцевой молекуле ДНК, кодирующей приблизительно 4300 различных видов белков (рис. 1.29).

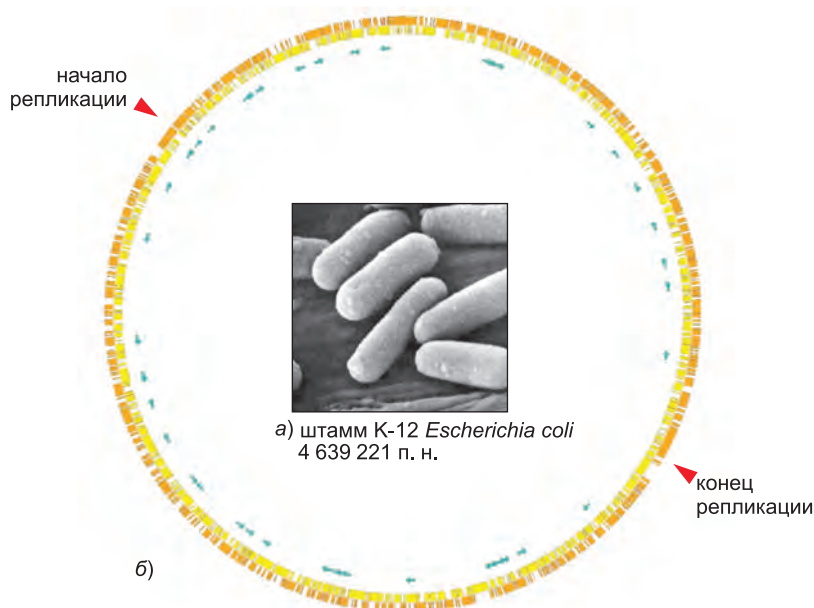


Рис. 1.29. Геном *E. coli*. а) Скопление клеток *E. coli*. б) Схема генома штамма K-12 *E. coli*. Схема является круговой, потому что ДНК *E. coli*, подобно таковой остальных прокариот, образует единичную замкнутую петлю. Кодированные белком гены показаны желтыми или оранжевыми полосками в зависимости от нити ДНК, с которой они транскрибируются; гены, кодирующие только молекулы РНК, обозначены зелеными стрелками. Одни гены транскрибируются с одной цепи двойной спирали ДНК (в направлении часовой стрелки на этой схеме), другие — с другой нити (против часовой стрелки). (Снимок а любезно предоставлен доктором Tony Brain и David Parker (фотолаборанты); изображение б переработано из статьи F. R. Blattner et al., *Science* 277: 1453–1462, 1997. С разрешения издательства AAAS.)

На молекулярном уровне мы знаем об *E. coli* больше, чем о любом другом живом организме. Большая часть из достигнутого нами о фундаментальных механизмах жизни, таких как реплицирование клетками содержащейся в них ДНК или расшифровка инструкций, заложенных в ДНК, для направленного синтеза определенных белков, получена в ходе изучения *E. coli*. Основные генетические механизмы оказались сильно консервативными на протяжении всей эволюции, поэтому в наших клетках эти механизмы по существу те же, что и у *E. coli*.

Заключение

Прокариоты (клетки без обособленного ядра) — это самые разнообразные в биохимическом отношении организмы и включают виды, которые могут получать всю свою энергию и питательные вещества из неорганических химических источников, таких как реакционно-способные смеси минеральных веществ, выбрасываемые гидротермальными источниками океанического ложа, — такой «диетой», возможно, придерживались первые живые клетки 3,5 миллиарда лет тому назад. Сравнительный анализ последовательностей ДНК выявляет «семейные

отношения» между живыми организмами и показывает, что прокариоты подразделяются на две группы, которые образовались на заре эволюции: бактерии (или зубактерии) и археи. Вместе с эукариотами (клетки с окруженным мембраной ядром) они составляют три первичные ветви древа жизни. Большинство бактерий и архей — это маленькие одноклеточные организмы с компактными геномами, включающими 1 000–6 000 генов. Многие гены в пределах одного организма имеют значительное сходство по последовательностям ДНК, а это говорит о том, что они произошли от общего предкового гена в результате его дупликации (дублирования) и дивергенции (расхождения). Подобие (гомологичность) семейств оценивается также в ходе сравнительного анализа последовательностей генов различных видов; в результате более 200 семейств генов оказались настолько высококонсервативными, что могут быть признаны общими для большинства видов всех трех надцарств живого мира. Таким образом, зная последовательность ДНК недавно обнаруженного гена, зачастую возможно определить и его функцию, исходя из известной функции гомологичного гена в досконально изученном модельном организме, таком как бактерия *E. coli*.

1.3. Генетическая информация эукариот

В основном, клетки эукариот более крупные и замысловатые, чем клетки прокариот, и геномы их также более крупные и сложные. Бóльший размер предполагает коренные отличия в структуре и функциях клетки. Кроме того, ядерные клетки многих классов формируют многоклеточные организмы, которые достигают уровней сложности, не превзойденных ни одним прокариотом.

Будучи столь сложно организованы, эукариоты встречают молекулярных биологов с заготовленным набором испытаний, повествование о преодолении которых поглотит нас в последующих главах этой книги. Раз за разом биологи сталкиваются с такого рода испытаниями во время анализа и манипулирования генетической информацией на уровне клеток и организмов. Поэтому так важно в самом начале знать хотя бы кое-что о характерных особенностях генома эукариот. Мы начнем с краткого обсуждения организации клеток эукариот и того, как она отражается на их образе жизни, а также рассмотрим отличия их геномов от таковых у прокариот. В ходе обсуждения у нас сложится общее представление о той стратегии, вооружившись которой, молекулярные биологи с помощью генетической информации пытаются постигнуть принципы жизнедеятельности организмов эукариот.

1.3.1. Вполне возможно, что ядерные клетки изначально возникли как хищники

По определению, клетки эукариот содержат свою ДНК во внутренней полости, названной ядром. *Ядерная оболочка* — двуслойная мембрана — окружает ядро и отделяет ДНК от цитоплазмы. Эукариоты имеют и другие особенности, которые отличает их от прокариот (рис. 1.30). Их клетки, как правило, в 10 раз больше в линейном измерении и в 1 000 раз крупнее в объеме. Они имеют *цитоскелет* — систему белковых тяжей (так называемые филаменты), пронизывающих цитоплазму и формирующих совместно с многочисленными прикрепленными к ним белками систему балок, канатов и моторов, которая придает клетке механическую силу, управляет ее формой, а также осуществляет и направляет ее движения. Ядерная

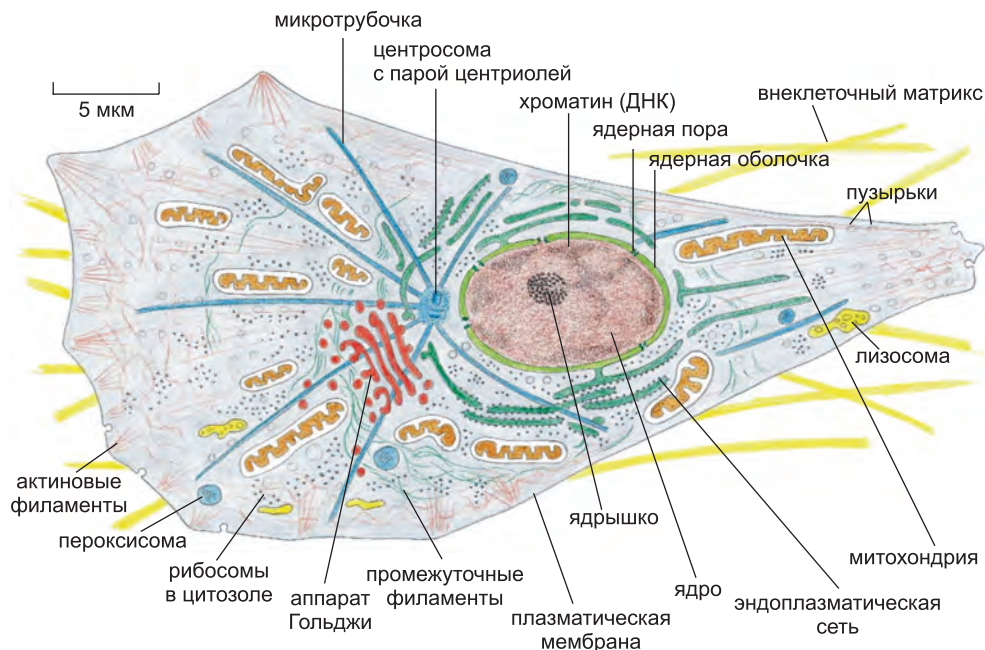


Рис. 1.30. Основные особенности ядерных клеток. На рисунке представлена типичная клетка животных, однако почти все те же компоненты имеются у растений, грибов и одноклеточных эукариот, таких как дрожжи и протисты. Вдобавок к отмеченным здесь компонентам растительные клетки содержат хлоропласты, и их плазматическая мембрана окружена жесткой внешней стенкой, образованной из целлюлозы.

оболочка представляет собой лишь одну часть системы *внутренних мембран*, каждая из которых по своей структуре подобна плазматической мембране и окружает разнородные области пространства внутри клетки; многие из них участвуют в процессе переваривания пищи и выделения. Не имея жесткой клеточной стенки, свойственной большинству бактерий, клетки животных и свободно живущие клетки эукариот, названных *протистами*, могут быстро изменять свою форму, охватывать и поглощать другие клетки и маленькие объекты путем *фагоцитоза* (рис. 1.31).

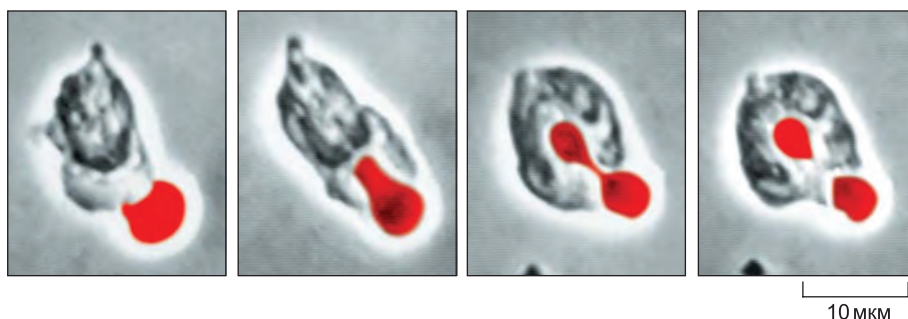


Рис. 1.31. Фагоцитоз. Эта серия стоп-кадров из кинофильма показывает белую клетку крови (нейтрофил) человека, поглощающую красную клетку крови (искусственно окрашенную красным), обработанную антителами. (Любезность Stephen E. Malawista и Anne de Boisfleury Chevance.)

До сих пор остается загадкой, каким образом и в какой последовательности все эти свойства развились в ходе эволюции. Однако существует довольно правдоподобное представление о том, что все они отражают образ жизни первичной клетки-эукариота, которая была хищником, живущим за счет захвата и поедания других клеток (рис. 1.32). Такой образ жизни предполагает крупную клетку с гибкой плазматической мембраной и сложным цитоскелетом, необходимым для поддержания и перемещения этой мембраны. Для такой клетки может также потребоваться, чтобы длинные, хрупкие молекулы ДНК были изолированы в отдельной ядерной полости — для защиты генома от возможного повреждения при движении цитоскелета.

1.3.2. Ныне существующие ядерные клетки эволюционировали в результате симбиоза

Хищнический образ жизни эукариот позволяет объяснить и другую особенность этих клеток. Почти все они содержат *митохондрии* (рис. 1.33). Эти маленькие тельца в цитоплазме, окруженные двойным слоем мембраны, поглощают кислород и используют энергию окисления молекул питательных веществ, таких как сахара, для производства большей части АТФ, обеспечивающего энергией все жизненно важ-

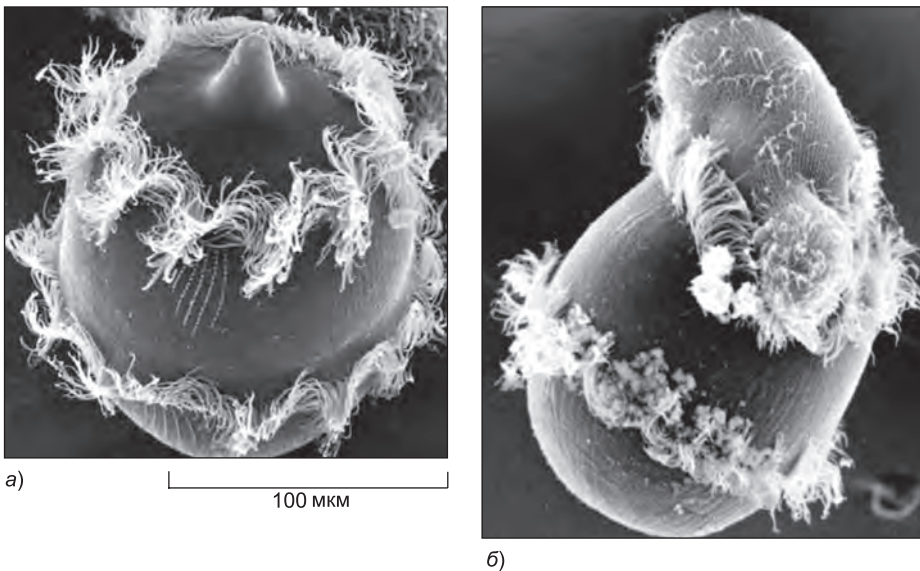


Рис. 1.32. Одноклеточный эукариот, который пожирает другие клетки. *а) Didinium* — хищная протиста, принадлежащая к группе так называемых *ресничных*. Их шаровидное тело (около 150 мкм в диаметре) окружено двумя бахромчатыми кольцами ресничек — извивающихся, подобно кнуту, придатков, непрерывно совершающих ритмичные колебания (колышутся в такт); их передний конец приплюснут — за исключением одного выпячивания, скорее напоминающего заостренное рыло. *б) Didinium* неустанно снует в толще воды благодаря синхронным движениям своих ресничек. Наткнувшись на подходящую добычу (обычно это простейшее другого типа), эта протиста выпускает многочисленные маленькие парализующие стрелки (стрекательные клетки) из области «рыла». После этого *Didinium* сближается с пораженной клеткой и пожирает ее фагоцитозом, выворачиваясь внутрь и принимая форму наподобие полого шара, чтобы захватить свою жертву, которая почти такого же размера, как он сам. (Любезность D. Barlow.)

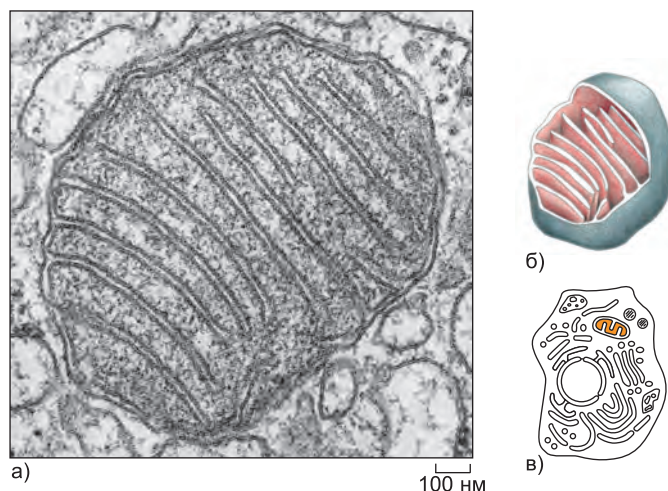


Рис. 1.33. Митохондрия. а) Поперечный разрез, как он выглядит в электронном микроскопе. б) Рисунок митохондрии со срезанной частью — чтобы показать трехмерную структуру. в) Схематичное изображение ядерной клетки; внутри митохондрии (внутренняя полость окрашена) находится митохондриальная ДНК и рибосомы. Обратите внимание на гладкую внешнюю мембрану и извилистую (волнистую) внутреннюю мембрану, на которой размещаются белки, которые производят АТФ за счет окисления молекул пищевых веществ. (Снимок а — любезность Daniel S. Friend.)

ные клеточные процессы. Митохондрии по размерам подобны маленьким бактериям и, подобно бактериям, имеют свой собственный геном в виде молекулы кольцевой ДНК, свои собственные рибосомы, которые отличаются от тех, которые присутствуют во всех остальных частях клетки-эукариота, и свои собственные транспортные РНК. Теперь принято считать, что митохондрии произошли от свободно живущих усваивающих кислород (*аэробных*) бактерий, которые были поглощены предковой клеткой-эукариотом, которая иначе никак не могла использовать кислород (то есть была *анаэробной*). Избежав «переваривания», эти бактерии эволюционировали в симбиозе с поглотившей их клеткой и ее потомством, получая кров и пищу в обмен на энергию, производимую для своих хозяев (**рис. 1.34**). Такое партнерство между примитивной анаэробной хищной клеткой-эукариотом и аэробной бактериальной клеткой, как думают, утвердилось около 1,5 миллиардов лет назад, когда атмосфера Земли впервые обогатилась кислородом.

Клетки многих эукариот, а именно растений и водорослей, содержат и другую группу маленьких, окруженных мембраной органелл, отчасти подобных митохондриям, — *хлоропласты* (**рис. 1.35**). Хлоропласты осуществляют фотосинтез, используя энергию солнечного света для синтеза углеводов из атмосферного углекислого газа и воды, и поставляют полученные продукты клетке-хозяину в качестве пищи. Подобно митохондриям, хлоропласты имеют свой собственный геном и, почти наверняка, возникли как симбиотическая фотосинтезирующая бактерия, приобретенная клетками, которые уже обладали митохондриями (**рис. 1.36**).

Укомплектованная хлоропластами клетка-эукариот не имеет никакой нужды преследовать другие клетки в качестве добычи: ее кормят «когда-то взятые в плен» хлоропласты, которые она унаследовала от своих предков. Соответственно, хотя клетки растений и обладают цитоскелетным «оборудованием» для движения, они

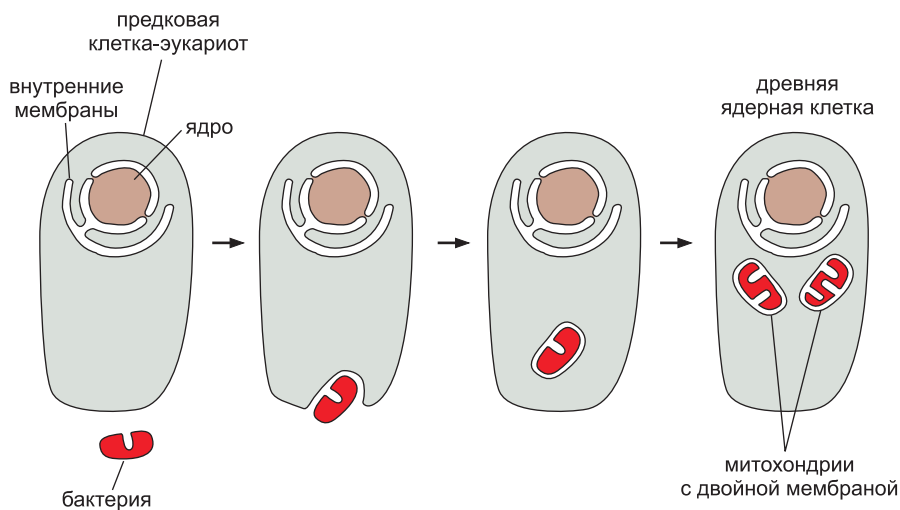


Рис. 1.34. Происхождение митохондрий. Предковая ядерная клетка, как думают, поглотила бактерию — предка митохондрии — и установила с ней симбиотические отношения.

потеряли способность к быстрому изменению своей формы, а также к охватыванию и поглощению других клеток фагоцитозом. Вместо этого, они создают вокруг себя жесткую защитную клеточную стенку. Если эукариот-предок действительно был хищником для других организмов, то клетки растений мы можем рассматривать как эукариот, которые перешли от охоты к сельскому хозяйству.

Грибы представляют собой еще один устоявшийся образ жизни эукариот. Клетки грибов, подобно клеткам животных, обладают митохондриями, но в них отсутствуют хлоропласты; и, в отличие от клеток животных и протист, они имеют жесткую внешнюю стенку, которая ограничивает их способность к быстрому движению или поглощению других клеток. Грибы, по-видимому, превратились из охотников в мусорщиков:

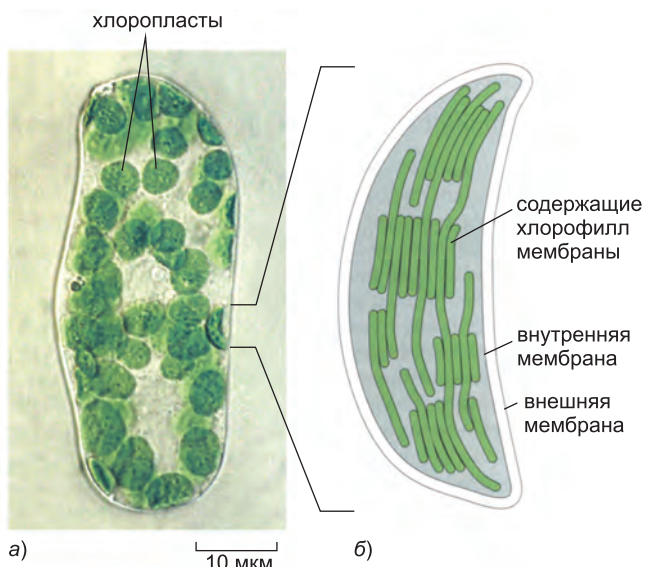


Рис. 1.35. Хлоропласты. Эти органеллы захватывают (поглощают) энергию солнечного света в растительных клетках и некоторых одноклеточных эукариотах. а) При рассмотрении в световом микроскопе отдельной клетки, выделенной из листа цветкового растения, видны зеленые хлоропласты. б) На рисунке показан один хлоропласт, на котором видна складчатая форма системы внутренних мембран, содержащих молекулы хлорофилла, которыми и поглощается свет. (Снимок а любезно предоставлен Preeti Dahiya.)

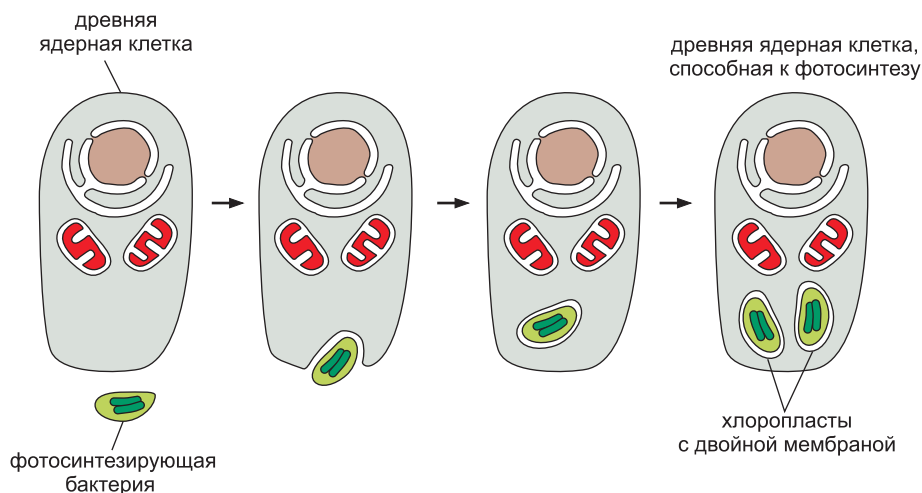


Рис. 1.36. Происхождение хлоропластов. Ранняя ядерная клетка, уже обладающая митохондриями, поглотила фотосинтезирующую бактерию (цианобактерию) и удержала ее в симбиозе. Все нынешние хлоропласты, как думают, ведут свою родословную от одного-единственного вида цианобактерии, которая была «усыновлена» как внутренний симбионт (эндосимбионт) более миллиарда лет назад.

другие клетки выделяют питательные вещества или высвобождают их, умирая, а грибы питаются этими остатками, осуществляя все необходимые для переваривания процессы внеклеточно — с помощью выделяемых вовне пищеварительных ферментов.

1.3.3. Эукариоты обладают гибридными геномами

Генетическая информация ядерных клеток имеет гибридное происхождение: от предкового анаэробного эукариота и от бактерий, которых он приютил как своих симбионтов. Большая часть этой информации заключена в ядре, но малое ее количество остается в митохондриях и — у клеток растений и водорослей — в хлоропластах. Митохондриальная ДНК и ДНК хлоропластов могут быть отделены от ядерной ДНК и отдельно проанализированы и секвенированы. Как было обнаружено, геномы митохондрий и хлоропластов являются вырожденными: они представляют собой урезанные версии соответствующих бактериальных геномов и не имеют генов, кодирующих многие важнейшие функции. В клетке человека, например, геном митохондрий состоит всего лишь из 16 569 пар нуклеотидов и кодирует всего 13 белков, два компонента рибосомной РНК и 22 транспортные РНК.

Не все гены, которые отсутствуют в митохондриях и хлоропластах, были потеряны; вместо полного исчезновения многие из них так или иначе переместились из генома симбионта в ДНК ядра клетки-хозяина. Ядерная ДНК людей содержит большое число генов, кодирующих белки, которые обслуживают основные функции митохондрий; у растений ядерная ДНК также содержит много генов, кодирующих белки, необходимые хлоропластам.

1.3.4. Геномы эукариот огромны

Естественный отбор, очевидно, благоприятствовал митохондриям с малыми геномами точно так же, как он благоволил к бактериям с их малыми геномами.

В противоположность этой картине большинство эукариот, кажется, обладало полной свободой в плане увеличения своих ядерных геномов. Возможно, образ жизни эукариот обратил большой размер в преимущество: хищники обычно бывают крупнее своей добычи, а размер клетки, как правило, увеличивается пропорционально размеру генома. Возможно и то, что увеличение генома было вызвано накоплением паразитирующих на ДНК подвижных элементов генома (поговорим о них в главе 5) — «эгоистичных» фрагментов ДНК, которые способны вставлять свои копии в многочисленные участки генома. Как бы мы это ни объясняли, геномы большинства эукариот на несколько порядков крупнее, чем у бактерий и архей (рис. 1.37). А свобода безмерного расточительства ДНК имела глубокие последствия.

Эукариоты не только превосходят прокариот по числу генов; они также имеют значительно больше ДНК, которая не кодирует ни белок, ни какие-либо другие функционально активные продукты. По сравнению с геномом типичной бактерии, геном человека содержит в 1000 раз больше пар нуклеотидов, в 20 раз больше генов и приблизительно в 10000 раз больше некодирующей ДНК ($\approx 98,5\%$ генома человека являются некодирующими, в отличие от 11% генома бактерии *E. coli*).

1.3.5. Геномы эукариот богаты регуляторной ДНК

Значительная доля нашей некодирующей ДНК, почти несомненно, представляет собой ничего не значащий хлам, сохранившийся, подобно кипе старых бумаг, потому, что пока стенки архива не начнут трещать по швам, проще сохранять

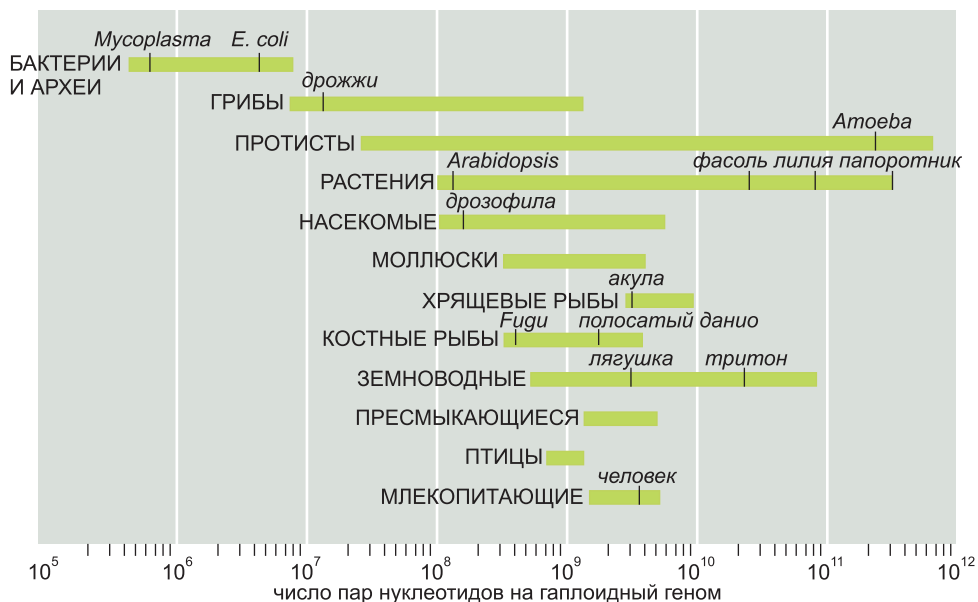


Рис. 1.37. Сравнение размеров геномов. Размер генома измеряют в парах нуклеотидов ДНК на гаплоидный геном, то есть на одну копию генома. (Клетки организмов, воспроизводящихся половым путем, как мы с вами, как правило, являются диплоидными: они содержат две копии своего генома, одна из которых унаследована от матери, а другая — от отца.) Количество ДНК в геномах близкородственных организмов может изменяться в широких пределах, даже если такие геномы содержат одинаковое число различных в функциональном отношении генов. (Данные заимствованы из W. H. Li, *Molecular Evolution*, pp. 380–383. Sunderland, MA: Sinauer, 1997.)

в нем все, чем отбирать ценную информацию и избавляться от всего остального. Некоторые исключительные в своем роде виды эукариот, такие как рыбы-собаки (рис. 1.38), обличают мотовство своих сородичей; они так или иначе сумели избавиться от больших количеств некодирующей ДНК. И, несмотря на это, по своему строению, поведению и приспособленности они остались во многом подобными родственным им видам, которые имеют значительно больше такой ДНК.

Даже в компактных геномах эукариот, таких как геном северной рыбы-собаки, содержится больше некодирующей, чем кодирующей ДНК, и по крайней мере часть некодирующей ДНК определенно выполняет важные функции. В частности, она регулирует экспрессию смежных с ней генов. Посредством регуляторной ДНК эукариоты в ходе эволюции приобрели характерные способы управления временем и местом ввода генов в игру. Столь замысловатая регуляция генов лежит в основе формирования сложных многоклеточных организмов.

1.3.6. Геном определяет программу многоклеточного развития

Клетки отдельно взятого животного или растения на удивление разнообразны. Жировые клетки, клетки кожи, костные клетки, нервные клетки — все они кажутся настолько разными, насколько вообще могут отличаться клетки. И все же клетки всех этих типов являются потомками одной-единственной оплодотворенной яйцеклетки и все они (за незначительными исключениями) содержат идентичные копии генома, присущего данному биологическому виду.

Все видимые и невидимые различия между клетками обусловлены различиями в способе избирательного прочтения каждой клеткой своих генетических инструкций сообразно с сигналом, получаемым в ходе эмбрионального развития из окружающей среды. Однако ДНК — это не просто список, в точности предписывающий набор необходимых клетке молекул, а клетка — вовсе не результат выполнения всех пунктов данного списка. Напротив, клетку можно уподобить многоцелевой машине, снабженной датчиками, улавливающими воздействия факторов окружающей среды, и обладающей хорошо развитыми способностями вызывать к действию различные наборы генов, руководствуясь последовательностями принятых сигналов. Имеющийся в каждой клетке геном достаточно объемный и вмещает всю информацию, необходимую для описания целого многоклеточного организма, хотя в любой отдельной клетке используется только определенная часть этой информации.

Немалая доля генов в геноме эукариот кодирует белки, которые регулируют действия других генов. Большая часть таких белков, предназначенных для регулирования генов, действует путем связывания — непосредственного или опосредованного — с регуляторной ДНК, примыкающей к генам, которыми надлежит управлять (рис. 1.39), или же путем вмешательства в работу других белков, причастных к управлению этими же генами. Поэтому расширенный геном эукариот описывает не только аппаратные средства клетки,



Рис. 1.38. Северная рыба-собака (*Fugu rubripes*). Этот организм имеет геном размером 400 миллионов пар нуклеотидов, что составляет около четверти генома полосатого данио, — и это притом, что рыбы этих двух видов имеют одинаковое число генов. (Перерисовка с гравюры на дереве сиге (Hiroshige) любезно предоставлена Arts and Designs of Japan.)

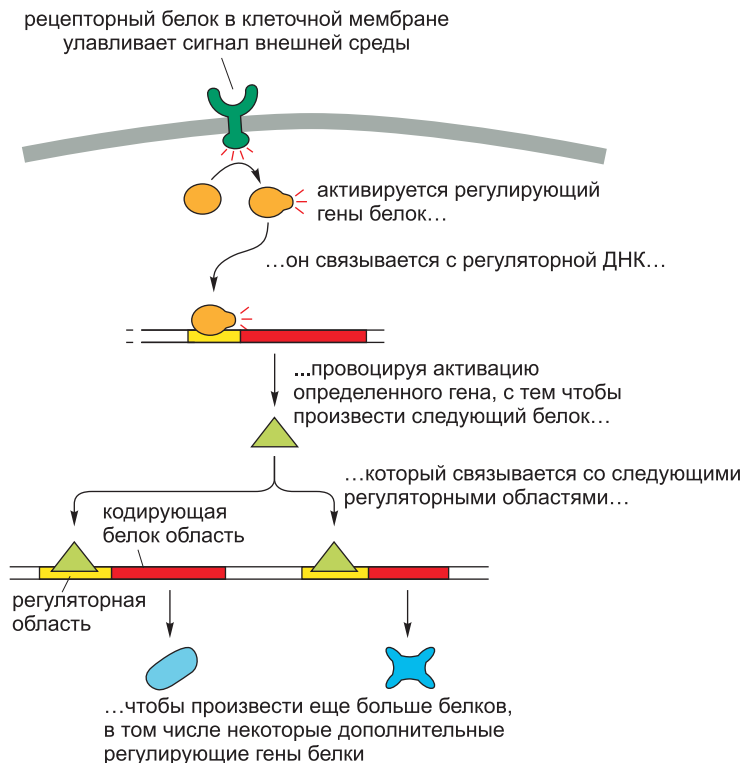


Рис. 1.39. Считывание генов управляется сигналами внешней среды. Регуляторная ДНК позволяет регуляторным белкам управлять экспрессией гена, а эти регуляторные белки, в свою очередь, являются продуктами экспрессии других генов. На этой схеме показано, как экспрессия гена клетки регулируется по сигналу, поступающему в клетку из внешней среды. Первоначальное действие сигнала — активировать регуляторный белок, уже имеющийся в клетке; такой сигнал может, например, запустить присоединение фосфатной группы к регуляторному белку, что приведет к изменению его химических свойств.

но также хранит программные средства, используемые для управления этой аппаратурой (рис. 1.40).

Клетки не только пассивно получают сигналы, но и активно обмениваются ими со своими соседями. Таким образом, всеми клетками развивающегося многоклеточного организма руководит одна и та же система управления, но с различными для каждой отдельно взятой клетки последствиями, зависящими от сообщений между этой клеткой, системой управления и более или менее удаленными соседними клетками. Как это ни удивительно, результатом такого взаимодействия является упорядоченное множество находящихся в разных состояниях клеток, каждая из которых проявляет свойство, которое соответствует ее назначению в многоклеточной структуре организма.

1.3.7. Многие эукариоты живут в виде обособленных клеток — протист

Многие виды клеток эукариот ведут жизнь одиночек: одни как охотники (*простейшие*), другие как фотосинтезирующие (одноклеточные *водоросли*), не-



Рис. 1.40. Генетическое управление программой развития многоклеточного организма. Роль регуляторного гена ярко проявляется у львиного зева *Antirrhinum*. В этом примере мутация в одном-единственном гене, кодирующем регуляторный белок, приводит к развитию листовых побегов вместо цветков: поскольку регуляторный белок был изменен, клетки приобретают признаки, которые не характерны для растения в состоянии нормы. Мутант — слева, нормальное растение — справа. (Любезность Enrico Coen и Rosemary Carpenter.)

которые как мусорщики (одноклеточные грибы или *дрожжи*). **Рис. 1.41** лишь отчасти передает удивительное многообразие форм таких одноклеточных эукариот, или *протист*. Анатомия простейших часто оказывается очень тонкой и включает

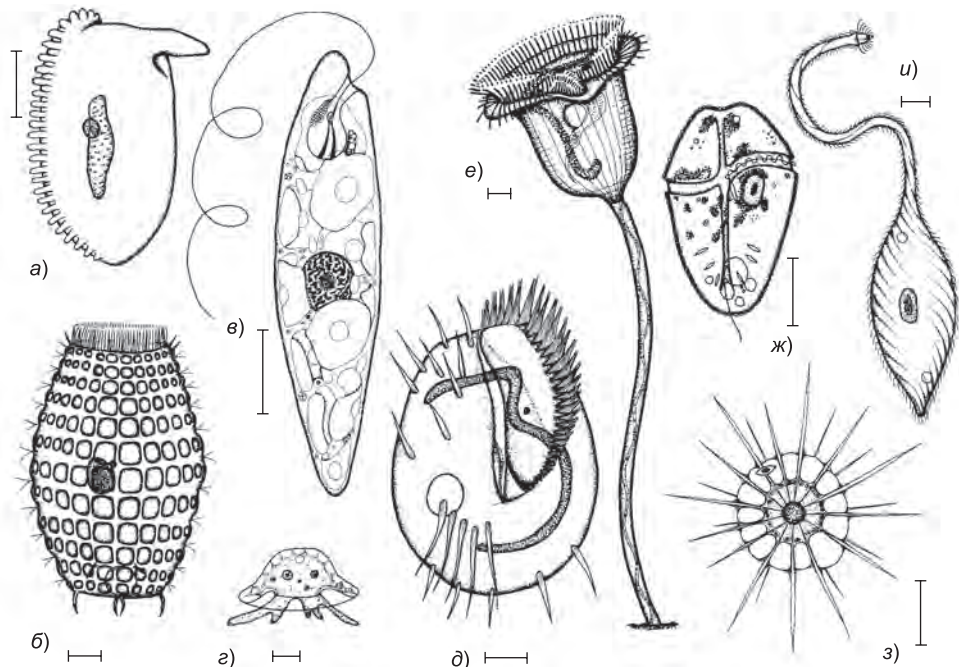


Рис. 1.41. Пестрая подборка протист: скромная выборка из чрезвычайно разнообразного класса организмов. Рисунки сделаны в различных масштабах, но в каждом случае масштабная линия представляет 10 мкм. Организмы на видах *a*, *б*, *в*, *е* и *и* — ресничники; *в* — эвгленообразное; *г* — амеба; *ж* — динофлагеллят; *з* — солнечник. (Из М. А. Sleigh, *Biology of Protozoa*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1973.)

в себя такие структуры, как чувствительные щетинки, фоторецепторы, волнообразно колеблющиеся реснички, ложноножки, части ротового аппарата, жалящие стрелки и подобные мускулы сокращающиеся пучки. Хотя простейшие и являются отдельными клетками, они могут быть столь же замысловатыми, столь же вездесущими и обладать столь же сложным поведением, как многие многоклеточные организмы (см. рис. 1.32).

В отношении родословной и последовательностей ДНК протисты намного более разнообразны, чем многоклеточные животные, растения и грибы, которые возникли как три сравнительно поздние ветви на генеалогическом древе эукариот (см. рис. 1.21). Что касается прокариот, то люди пренебрегали протистами из-за их микроскопических размеров. Только теперь, анализируя геномы, мы начинаем осознавать их положение на древе жизни и оценивать их в контексте нашего отдаленного прошлого согласно тем критериям, которые эти странные существа предлагают нам.

1.3.8. Дрожжи как минимальная модель эукариот

Молекулярная и генетическая сложность эукариот обескураживает. Так что в этом случае еще в большей степени, чем при изучении прокариот, биологам приходится сосредоточивать свои силы и внимание на нескольких отобранных для исследования модельных организмах.

При исследовании внутренней «деятельности» ядерной клетки, чтобы исключить факторы, имеющие отношение к вопросам многоклеточного развития, имеет смысл использовать такой вид, который является не только одноклеточным, но и настолько простым, насколько это возможно. На роль такой минимальной модели эукариот выбрали дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 1.42) — тот же вид, что используется пивоварами для приготовления пива, а пекарями — для выпечки хлеба.

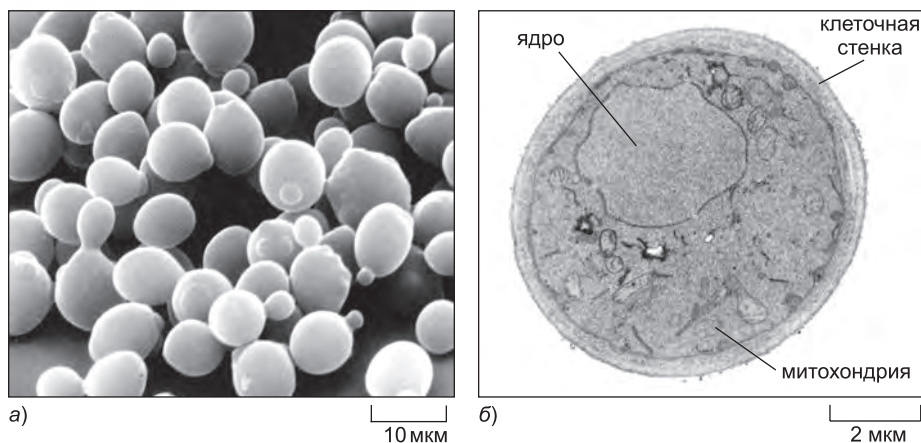
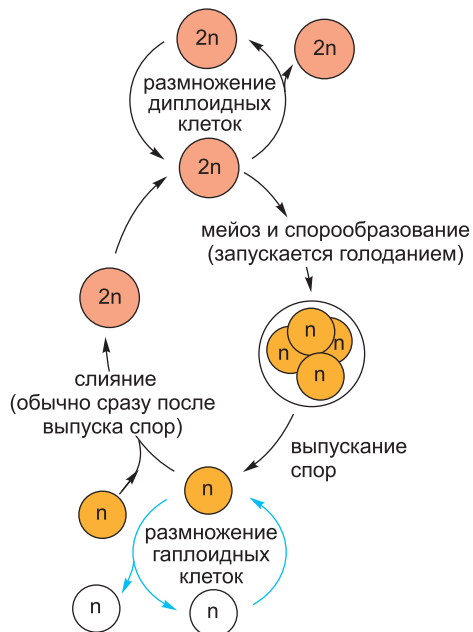


Рис. 1.42. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. а) Полученная на растровом электронном микроскопе фотография скопления клеток. Этот вид клеток известен также как пекарские дрожжи; они размножаются, формируя выпячивание, или почку, которая увеличивается в размере и затем отделяется от материнской клетки. На микрофотоснимке видны почкующиеся клетки. б) На полученной на трансмиссионном электронном микроскопе фотографии поперечного разреза клетки дрожжей показано ее ядро, митохондрия и толстая клеточная стенка. (а — любезность Ira Herskowitz и Eric Schabatach.)

Итак, *S. cerevisiae* — это маленький, одноклеточный представитель царства грибов и, согласно современным представлениям, столь же тесно связан с животными, сколь и с растениями; вынослив и легко растет в простой питательной среде. Подобно другим грибам, имеет жесткую клеточную стенку, относительно неподвижен, обладает митохондриями, но не содержит хлоропластов. Когда питательных веществ много, он растет и делится почти так же быстро, как бактерии. Может размножаться вегетативным путем (то есть простым делением клетки) или половым: две гаплоидные (обладают единственной копией генома) клетки дрожжей могут соединиться, чтобы создать клетку, которая будет диплоидной (содержит удвоенный геном); а диплоидная клетка может подвергнуться мейозу (редукционное деление), чтобы произвести клетки, которые снова окажутся гаплоидом (рис. 1.43). В отличие от высших растений и животных, дрожжи могут делиться безотносительно своего состояния, переходя то в гаплоидное, то в диплоидное, а процесс, ведущий из одного состояния в другое, может быть вызван изменением условий роста.

В дополнение к этим особенностям дрожжи обладают одним свойством, благодаря которому они стали удобным для генетических исследований организмом-моделью: их геном по эукариотическим меркам очень маленький. Однако он удовлетворяет всем основным требованиям, которым должна соответствовать любая эукариотическая клетка. Как мы увидим позже, исследования, проведенные с использованием дрожжей (*S. cerevisiae* и других видов), позволили подобрать ключ к открытию многих важнейших клеточных процессов, включая цикл деления эукариотической клетки — это важнейшая цепь событий, в результате которых ядро и все другие компоненты клетки удваиваются и разделяются, чтобы создать две дочерние клетки из одной. Система управления этим процессом была настолько хорошо сохранена в ходе эволюции, что многие из ее компонентов могут функционировать взаимозаменяемо, например, в дрожжах и клетках человека: если у дрожжей-мутантов отсутствует какой-нибудь ген, существенный для цикла деления клетки, то им вводят копию соответствующего гена цикла деления из клетки человека, и дрожжи избавляются от своего «порока» и становятся способными к нормальному делению.



ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ

Рис. 1.43. Циклы воспроизводства дрожжей *S. cerevisiae*. В зависимости от условий окружающей среды и от особенностей гено типа, клетки этого вида могут существовать или в диплоидном (2n) состоянии с двойным набором хромосом, или в гаплоидном (n) состоянии с одинарным набором хромосом. Диплоидная форма может размножаться обычными циклами деления клетки или предаться мейозу, с тем чтобы произвести гаплоидные клетки. Гаплоидная форма может или размножаться обычными циклами деления клетки, или претерпеть половое слияние с другой гаплоидной клеткой и стать диплоидной. Мейоз вызывается голоданием и порождает споры — гаплоидные клетки в состоянии покоя, устойчивые к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Рис. 1.43. Циклы воспроизводства дрожжей *S. cerevisiae*. В зависимости от условий окружающей среды и от особенностей гено типа, клетки этого вида могут существовать или в диплоидном (2n) состоянии с двойным набором хромосом, или в гаплоидном (n) состоянии с одинарным набором хромосом. Диплоидная форма может размножаться обычными циклами деления клетки или предаться мейозу, с тем чтобы произвести гаплоидные клетки. Гаплоидная форма может или размножаться обычными циклами деления клетки, или претерпеть половое слияние с другой гаплоидной клеткой и стать диплоидной. Мейоз вызывается голоданием и порождает споры — гаплоидные клетки в состоянии покоя, устойчивые к неблагоприятным условиям окружающей среды.

1.3.9. Уровни экспрессии всех генов организма можно отслеживать одновременно

Полная последовательность генома *S. cerevisiae*, определенная в 1997 г., состоит приблизительно из 13 117 000 пар нуклеотидов, включая маленький вклад (78 520 пар нуклеотидов) митохондриальной ДНК. Это общее количество ДНК приблизительно лишь в 2,5 раза больше того, которое имеется у *E. coli*, а кодирует всего лишь в 1,5 раза больше различных белков (в целом — около 6300). Образ жизни *S. cerevisiae* подобен таковому для многих бактерий, и кажется, что эти клетки также испытали на себе давление естественного отбора, что удержало их геном в компактном состоянии.

Знание полной последовательности генома любого организма, будь то дрожжи или человек, открывает новые перспективы для работы с клеткой: то, что когда-то казалось до невозможности сложным, сейчас кажется нам вполне понятным. Теперь есть реальная возможность использовать те методы, которые описаны в главе 8: например, одновременно контролировать количество транскрипта информационной РНК, продуцированной каждым из генов в геноме дрожжей при любых выбранных условиях, и наблюдать, как изменяется эта общая картина активности генов при изменении условий. Анализ можно повторить с информационной РНК, приготовленной из мутантов, не имеющих выбранного нами гена — любого гена, который мы хотим исследовать. В принципе, этот подход позволяет показать полную взаимосвязанную систему управляющих воздействий, которая руководит экспрессией генов не только в клетках дрожжей, но и в любом организме, последовательность генома которого нам известна.

1.3.10. Для постижения устройства клеток нам нужна математика, компьютеры и количественные данные

Пользуясь методами, подобными вышеописанным, и опираясь на нашу информацию о полных последовательностях генома, мы можем составить список генов и белков клетки и приступить к изображению сети взаимодействий между ними (рис. 1.44). Но как мы преобразим всю эту информацию в понятные параметры, описывающие работу клетки? Ведь даже для клеток одного-единственного типа, принадлежащих одному виду организма, современный поток данных кажется непомерным. Неформальная аргументация, на которую обычно опираются в своих рассуждениях биологи, кажется совершенно неадекватной тому объему информации, который надо осмыслить. Фактически дело заключается не только в информационной перегрузке. Биологические системы, например, испещрены контурами обратной связи, и поведение даже наиболее простой из систем с обратной связью чрезвычайно трудно предсказать с помощью одной лишь интуиции (рис. 1.45): небольшие изменения в параметрах могут повлечь за собой коренные изменения всей системы. Для того чтобы перейти от принципиальной схемы, составленной для данной системы, к предсказанию поведения этой системы, нам необходима подробная количественная информация, а для того чтобы на основании полученной информации прийти к адекватным умозаключениям, нам необходимы математика и компьютеры.

Использование таких инструментов для интерпретации результатов на количественном уровне — существенно необходимый, но далеко не всесильный фактор. Может показаться, что, зная, как белки влияют друг на друга и как экспрессия каждого гена регулируется продуктами других генов, нам в скором времени удастся рассчитать, как клетка будет вести себя в целом, подобно тому, как астроном может

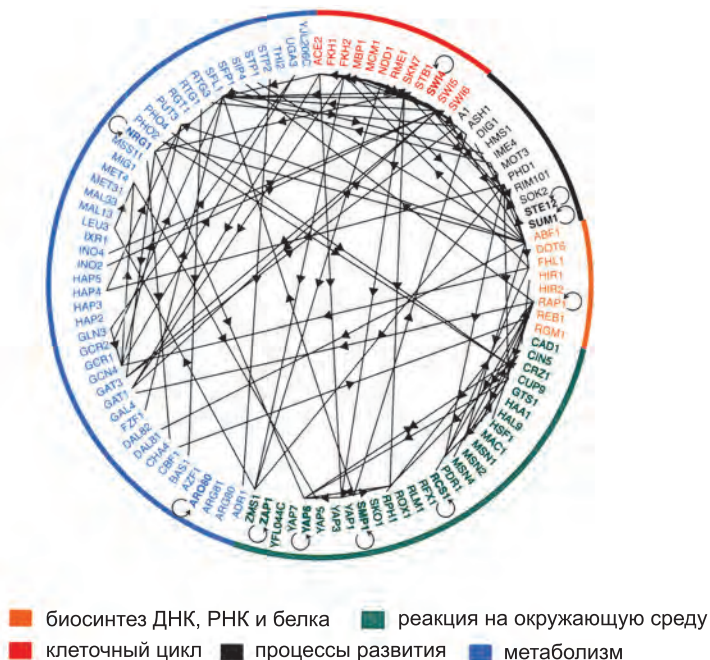
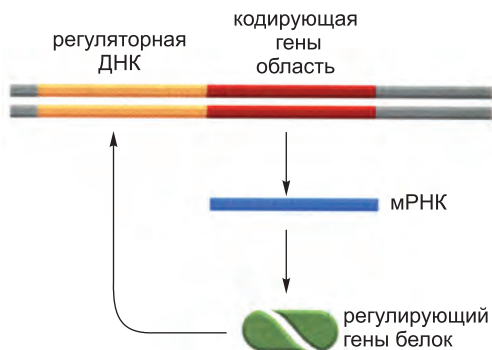


Рис. 1.44. Сеть взаимодействий между регулирующими генами белками и кодирующими их генами в клетке дрожжей. Результаты показаны для 106 из общего количества 141 регулирующих генов белков *Saccharomyces cerevisiae*. Каждый из включенных в набор белков был проверен на способность связываться с регуляторной ДНК каждого из генов, кодирующих этот набор белков. На схеме гены расположены по кругу, и стрелка, направленная от гена А к гену В, означает, что белок, кодируемый геном А, связывается с регуляторной ДНК гена В и поэтому, предположительно, регулирует экспрессию гена В. Маленькие кружки со стрелками указывают гены, продукты которых непосредственно регулируют их собственную экспрессию. Гены, управляющие разными моментами поведения клетки, показаны разными цветами. У многоклеточного растения или животного число регулирующих генов белков приблизительно в 10 раз больше, а количество регуляторной ДНК, возможно, в 100 раз больше, так что соответствующая схема была бы гораздо сложнее. (Из T.I. Lee et al., *Science* 298: 799–804, 2002. С разрешения издательства AAAS.)

вычислить орбиты планет, а инженер-химик рассчитать технологические потоки в химической установке. Но любая попытка совершить этот «подвиг» на уровне живой клетки быстро раскрывает ограниченность наших знаний на сегодняшний день. Информация, которой мы обладаем, обильна как таковая, но изобилует пробелами и неясностями. Более того, она в значительной степени носит качественный, а не количественный характер. Наиболее часто цитологи, изучающие системы управления клетки, обобщают свои знания в простых схематических диаграммах — эта книга полна ими, — а не в числах, графиках и дифференциальных уравнениях. Переход от качественных описаний и интуитивных умозаключений к количественным характеристикам и математической дедукции становится одним из самых больших испытаний для современной цитобиологии. Пока что такое испытание прошло успешно только для нескольких очень простых фрагментов аппарата живых клеток — подсистем, включающих в себя лишь «горстку» различных белков и два-три взаимно регулируемых гена, где теория и эксперимент могут идти рука об руку. Некоторые из таких примеров мы обсудим в книге позднее.

Рис. 1.45. Довольно простая цепь регулирования гена — единственный ген, регулирующий свою же экспрессию посредством прикрепления своего белкового продукта к своей регуляторной ДНК. Простые схематические представления, такие как это, часто используются, чтобы подытожить все то, что мы знаем (как на рис. 1.44), но оставляют много вопросов без ответа. Когда белок связывается, он ингибирует или стимулирует транскрипцию? Насколько скорость транскрипции зависит от концентрации белка? Как долго в среднем молекула белка остается связанной с ДНК? Сколько времени уходит на производство каждой молекулы мРНК или белка и как быстро деградируют эти молекулы?



Математическое моделирование показывает, что, прежде чем мы сможем предсказать поведение даже такой системы с единственным геном, нам нужно дать «количественные» ответы на все эти и многие другие вопросы. При различных значениях параметров эта система может перейти в уникальное состояние устойчивого равновесия, или может вести себя как переключатель, способный существовать в том или ином наборе альтернативных состояний, или же она может колебаться, или может давать большие случайные колебания.

1.3.11. Из 300 000 видов растений в качестве модели выбран *Arabidopsis thaliana*

Большие многоклеточные организмы, которые мы видим вокруг нас: цветы, деревья и животные, кажутся фантастически разными, но они намного ближе друг к другу по своим эволюционным истокам и более схожи по основам биологии клетки, чем к великому и удивительному хозяйину микроскопических одноклеточных организмов. Так, если бактерии и эукариоты отделены друг от друга более чем на 3000 миллионов лет расходящейся (дивергентной) эволюцией, то позвоночные животные и насекомые отделены друг от друга примерно 700 миллионами лет, рыбы и млекопитающие — примерно 450 миллионами лет, а различные виды цветковых растений — лишь приблизительно 150 миллионами лет.

Ввиду близости эволюционных отношений между всеми цветковыми растениями мы можем еще раз проникнуть в суть клеточной и молекулярной биологии всего этого класса организмов, сосредоточиваясь для детального анализа лишь на одном или нескольких видах. Из нескольких сотен тысяч цветковых растений, населяющих Землю в наши дни, молекулярные биологи сконцентрировали свои усилия на маленьком сорняке, обычной резушке Таля *Arabidopsis thaliana* (рис. 1.46), который можно выращивать в закрытом помещении в больших количествах и получать тысячи потомков от одного растения через каждые 8–10 недель. Геном арабидопсиса состоит приблизительно из 140 миллионов пар нуклеотидов, что примерно в 11 раз больше, чем у дрожжей, и его полная последовательность уже известна.

1.3.12. Червь, муха, мышь и человек как представители мира животных клеток

Многоклеточные животные составляют большинство всех описанных видов живых организмов, на их изучение приходится большая часть усилий всех прово-



Рис. 1.46. *Arabidopsis thaliana* — растение, выбранное в качестве основной модели для изучения молекулярной генетики растений. (Любезность Tony Hayden и John Innes.)

димых биологических исследований. В качестве главных модельных организмов для проведения молекулярных генетических исследований выбрано четыре вида. В порядке увеличения размера их располагают в следующий ряд: круглый червь *Caenorhabditis elegans*, муха *Drosophila melanogaster*, мышь *Mus musculus* и человек *Homo sapiens*. Геномы всех этих видов уже секвенированы.

Caenorhabditis elegans (рис. 1.47) — это маленький безобидный родственник нематоды, которая повреждает сельскохозяйственные культуры. Представляет собой идеальный модельный организм: с циклом жизни всего лишь из нескольких дней, со способностью выживать в морозильнике неограниченно долго в состоянии глубокого оцепенения, с простым строением тела и необычным циклом жизни, — который хорошо подходит для генетических исследований (описаны в главе 23). *C. elegans* с исправностью часового механизма развивается из оплодотворенной яйцеклетки во взрослого червя в точности с 959 соматическими клетками (плюс изменчивое число яйцеклеток и клеток спермы) — необычная степень регулярности для животного. В настоящее время мы имеем поминутное детальное описание последовательности происходящих событий, таких как деление клеток, их перемещение и изменение характеристик согласно строгим и предсказуемым правилам. Геном из 97 млн. п. н. кодирует приблизительно 19 000 белков, и в распоряжении ученых имеется множество мутантов и других инструментов, используемых для установ-

ления функций различных генов. Хотя общее строение тела червя очень сильно отличается от нашего, сохранение биологических механизмов оказалось для червя достаточным условием, чтобы стать моделью многих процессов, связанных с биологией клетки. Исследования червя помогают нам понять, например, программы деления и некроза клеток, которые определяют число клеток организма, — вопрос большой важности в биологии развития и изучения рака.

1.3.13. Изучение дрозофилы дает ключ к пониманию развития позвоночных

Плодовая мушка *Drosophila melanogaster* (рис. 1.48) используется в качестве модельного генетического организма дольше, чем какой-либо другой; фактически основы классической генетики были заложены в основном исследованиями этого насекомого. Более 80 лет назад дрозофила обеспечила, например, неопровержимое

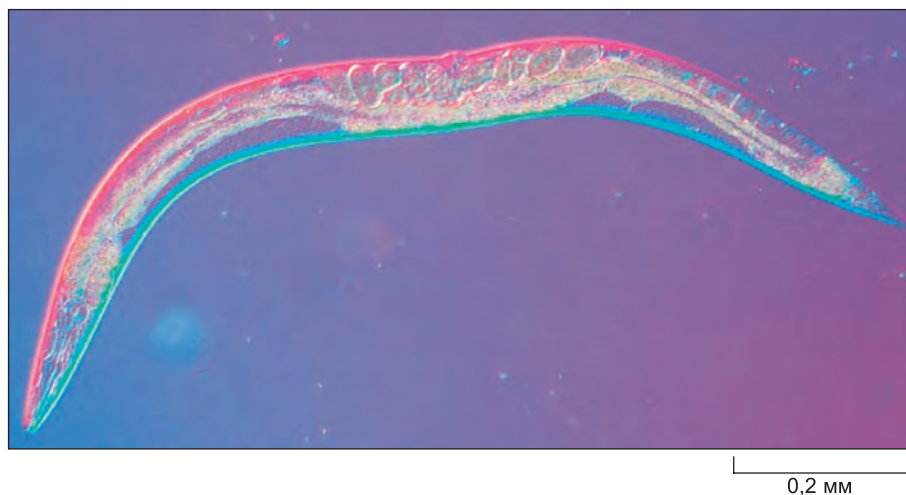


Рис. 1.47. *Caenorhabditis elegans*, первый многоклеточный организм, для которого полностью определена последовательность генома. Эта маленькая нематода, около 1 мм в длину, живет в почве. Большинство индивидов — гермафродиты, производящие и яйцеклетки, и сперматозоиды. Приведенное здесь изображение получено с использованием оптического метода интерференционного контраста, благодаря чему яркими цветами четко вырисованы границы тканей животного; при обычном освещении животное не окрашено. (Любезность Ian Hore.)

доказательство того, что гены — абстрактные единицы наследственной информации — содержатся в хромосомах, конкретных физических объектах, поведение которых точно прослеживалось в эукариотической клетке с помощью светового микроскопа, хотя функция их сначала была неизвестна. Доказательство получили благодаря одной из многих особенностей, которые делают дрозофилу особенно удобным объектом для генетики: в некоторых ее клетках видны гигантские хромосомы с характерными полосами (рис. 1.49). Определенные изменения в наследственной информации проявляются в семействах мутантных мух, благодаря чему удалось точно установить корреляцию каждой мутации с потерей или изменением определенных полос хромосомы-гиганта.

Позже на дрозофиле, больше чем на любом другом организме, было показано, как можно проследить причинно-следственную цепь, ведущую от генетических инструкций, закодированных в хромосомной ДНК, к структуре взрослого многоклеточного организма. Мутанты дрозофилы с расположенными необычным образом частями тела или с неверным рисунком дали ключ для идентификации и характеристики генов, необходимых для создания должным образом структурированного тела: с кишечником, конечностями, глазами и всеми другими частями, расставленными по надлежащим им местам. Как только нуклеотидные последовательности этих генов дрозофилы были определены, появилась возможность провести поиск их гомологов в геномах позвоночных животных. Такие гомологи были найдены, а их функции у позвоночных проверены в ходе анализа мышей, у которых эти гены были видоизменены. Результаты, как мы увидим позднее, показывают удивительную степень подобия молекулярных механизмов развития насекомого и позвоночного.

Большинство всех известных человеку видов живых организмов представлено насекомыми. Так что, даже если бы дрозофила не имела ничего общего с позвоноч-



Рис. 1.48. *Drosophila melanogaster*. Проведенные на этой мухе исследования дали главный ключ к пониманию того, как все животные развиваются из оплодотворенной яйцеклетки во взрослую особь. (Из E. V. Lewis, *Science* 221: cover, 1983. С разрешения издательства AAAS.)

ными животными, а только с насекомыми, она все равно оставалась бы важнейшим модельным организмом. Но если целью является изучение молекулярной генетики позвоночных животных, то почему не заняться этой проблемой прямо? Почему к ней подбираются косвенно, через исследования дрозофилы?

Для развития дрозофилы из оплодотворенного яйца во взрослое насекомое требуется всего лишь 9 дней; размножать ее значительно легче и дешевле, чем любое позвоночное живот-



20 мкм

Рис. 1.49. Гигантские хромосомы из клеток слюнных желез дрозофилы. Поскольку много раундов репликации ДНК прошло без промежуточного деления клетки, каждая из хромосом в этих необычных клетках содержит более 1 000 идентичных молекул ДНК, выстроенных в цепочку. Благодаря этому в световом микроскопе видна характерная для хромосом и воспроизводимая картина полос. Определенные полосы могут быть идентифицированы как местоположения определенных генов: мутантная муха с пропущенной областью в картине полос дает представление о фенотипе, обусловленном потерей генов в этой области. Гены, которые транскрибируются с высокой скоростью, соответствуют полосам, которые выглядят «одутловатыми». Полосы, окрашенные на микрофотографии темно-коричневым цветом, представляют собой участки, где с ДНК связан специфический регуляторный белок. (Любезность В. Zink и R. Paro, из R. Paro, *Trends Genet.* 6: 416–421, 1990. С разрешения издательства Elsevier.)

ное, а также ее геном намного меньше — около 170 миллионов пар нуклеотидов по сравнению с 3200 миллионами у человека. Ее геном кодирует приблизительно 14000 белков, и теперь мутанты могут быть получены, по существу, для любого гена. Но есть также и другая, более глубокая причина, по которой генетические механизмы, которые трудно обнаружить у позвоночного животного, часто легко выказываются у мухи. И эта причина кроется, как мы теперь объясняем, в частоте дублирования генов, которая в геномах позвоночных существенно выше, чем в геноме мухи, и, вероятно, была решающим фактором сложного и хитроумного устройства позвоночных.

1.3.14. Геном позвоночных представляет собой продукт повторной дубликации

Почти у каждого гена в геноме позвоночного есть паралоги — другие гены в том же самом геноме, которые, несомненно, родственны и, должно быть, возникли в результате дубликации генов. Во многих случаях целый кластер генов оказывается близкородственным таким же кластерам, присутствующим в каком-либо другом месте генома, что наводит на мысль о том, что гены дублировались не в индивидуальном виде, а связными группами. Согласно одной гипотезе, на раннем этапе эволюции позвоночных полный геном подвергся двум последовательным дубликациям, что положило начало четырем копиям каждого гена. В некоторых группах позвоночных, таких как рыбы семейств лососевых и карповых (в том числе полосатый данио — популярный объект исследований), как предполагают ученые, произошла еще одна дубликация, результатом чего стала восьмикратная представленность генов.

Точный путь эволюции генома позвоночных остается неизвестным, потому что со времени этих стародавних событий произошло много эволюционных изменений. Гены, которые когда-то были идентичными, разошлись; множество копий этих генов было потеряно из-за разрушающих мутаций; некоторые подверглись последующим раундам локальной дубликации; и геном в каждой ветви генеалогического древа позвоночных претерпел повторные перестройки, почти полностью нарушавшие изначальный порядок генов. Сравнение порядка генов двух эволюционно родственных организмов, таких как человек и мышь, показывает, что часто — во временном масштабе эволюции позвоночных — хромосомы сливаются и фрагментируются, в результате чего происходит неоднократное перемещение больших блоков последовательности ДНК. Действительно, вполне возможно, как мы покажем в главе 7, что существующее состояние дел — это результат многих отдельных дубликаций фрагментов генома, а не генома целиком.

Однако не вызывает сомнений и тот факт, что дубликация целого генома, на самом деле, время от времени происходит в ходе эволюции, и за такими примерами далеко ходить не надо, так как дублированные наборы хромосом все еще явно опознаются в качестве таковых. Род лягушек *Xenopus*, например, включает набор близкородственных видов, связанных друг с другом через повторные дубликации или трипликации целого генома. Среди этих лягушек мы можем видеть *X. tropicalis* с обычным диплоидным геномом; завсегдаемая исследовательских лабораторий *X. laevis* с дублированным геномом и удвоенным количеством ДНК на клетку; и *X. ruwenzoriensis* с шестикратным дублированием исходного генома и в шесть раз увеличенным количеством ДНК в клетке (108 хромосом по сравнению, напри-

мер, с 36 у *X. laevis*). Эти виды, согласно оценкам специалистов, разошлись около 120 миллионов лет назад (рис. 1.50).

1.3.15. Генетическая избыточность создает лишние проблемы генетикам, но зато дает дополнительные возможности эволюционирующим организмам

Какие бы события ни происходили в эволюционной истории, ясно, что большинство генов в геноме позвоночных существует в нескольких вариантах, когда-то идентичных. Родственные гены зачастую остаются функционально взаимозаменяемыми. Это явление называют **генетической избыточностью**. Для ученого, изо всех сил пытающегося обнаружить все гены, участвующие в том или ином процессе, она усложняет задачу. Если ген А мутировал и никакого эффекта не наблюдается, то из этого нельзя заключать, что ген А в функциональном отношении не связан с данным эффектом — просто может оказаться, что этот ген обычно работает параллельно со своими родственниками и их усилий достаточно для практически нормального выполнения функции, даже когда ген А дефектен. В геноме дрозофилы, где дублирование генов происходит реже и повторов в геноме меньше, анализ значительно упрощен: функции отдельных генов проявляются напрямую — по последствиям от мутаций единичных генов (одномоторный самолет падает, когда его двигатель ломается).

Дублирование генома определенно привело к развитию более сложных форм жизни; оно, подобно рогу изобилия, обеспечивает организмы запасными копиями генов, которые могут свободно мутировать и выполнять все более разнящиеся задачи. Пока одна копия оптимизируется, скажем, для использования в печени, другая может оптимизироваться для использования в мозге или приспособливаться к выполнению новой задачи. Вот почему дополнительные гены усиливают сложность и замысловатость генома в целом. По мере того как гены все больше расходятся в функциональном отношении, они перестают быть избыточными. Часто, однако, бывает так, что, несмотря на исполнение уже индивидуальных партий, гены продолжают участвовать также и в некоторых эпизодах, выполняя ранее присущую им роль в массовке, то есть участвовать



Рис. 1.50. Два вида лягушки рода *Xenopus*. *X. tropicalis*, представленный сверху, имеет обычный диплоидный геном; *X. laevis*, помещенный ниже, имеет вдвое большее количество ДНК на клетку. По картинам распределения полос их хромосом и расположению генов на них, а также на основании сравнения последовательностей генов ясно, что вид с большим геномом эволюционировал за счет дубликации целого генома. Эти дубликации, как полагают, произошли в результате спаривания между лягушками слегка разошедшихся видов *Xenopus*. (Любезность Е. Amaya, М. Offield и R. Grainger, *Trends Genet.* 14: 253–255, 1998. С разрешения издательства Elsevier.)

избыточно. В таком случае мутация единственного гена вызывает относительно небольшое нарушение, которое показывает, что дает информацию лишь об одной из функций этого гена (рис. 1.51). Семейства генов с разошедшимися, но частично накладывающимися функциями — распространенная особенность молекулярной биологии позвоночных, и с ними мы будем неоднократно встречаться в этой книге.

1.3.16. Мышь как модель млекопитающих

По сравнению с дрозофилой у млекопитающих обычно в три или четыре раза больше генов, геном больше в 20 раз, а в телах их взрослых особей в миллионы или даже в миллиарды раз больше клеток. В отношении размера и функции генома, биологии клетки и молекулярных механизмов млекопитающие, тем не менее, чрезвычайно однородная группа организмов. Даже в анатомическом плане различия между млекопитающими, в основном, касаются размера и пропорций; трудно представить какую-либо часть тела человека, которая не имела бы своего аналога у слона и мыши, и наоборот. Эволюция свободно играет с количественными признаками, но не так легко изменяет закономерности, лежащие в основе строения.

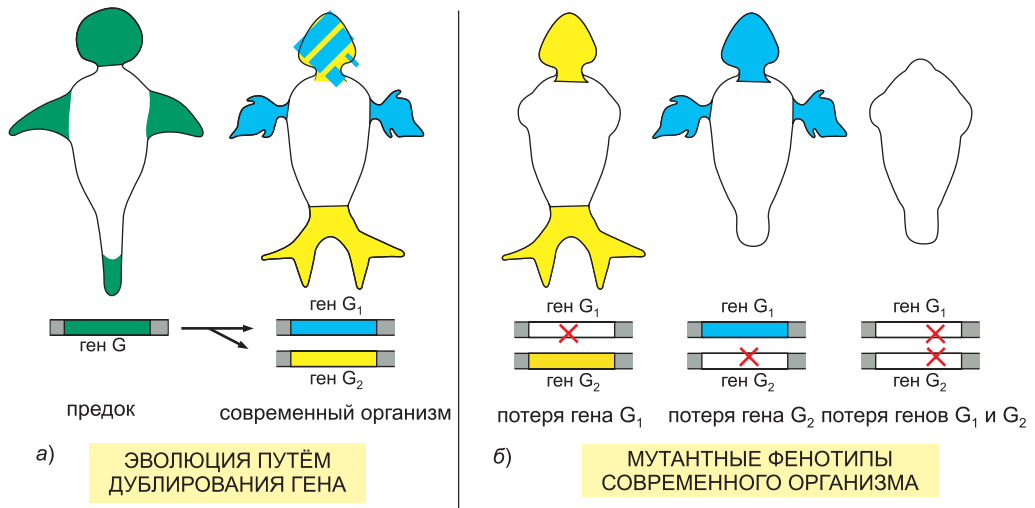


Рис. 1.51. Дупликация гена как инструмент мутационного анализа для выяснения функций генов. В этом гипотетическом примере предковый многоклеточный организм имеет геном, содержащий единственную копию гена G , который выполняет свою функцию на нескольких участках тела, обозначенных зеленым. а) За счет дупликации гена современный потомок предкового организма имеет две копии гена G , названные G_1 и G_2 . Они в некоторой степени разошлись по профилям экспрессии и по уровням их активности на участках экспрессии, но по-прежнему сохраняют важные черты сходства. В некоторых участках они экспрессируются совместно и независимо друг от друга выполняют ту же самую старую функцию, что и предковый ген G (чередующиеся голубые и желтые полосы); на других участках они экспрессируются индивидуально и могут выполнять новые задачи. б) Из-за наложения функций потеря одного из этих двух генов вследствие мутации (красный крестик) выявляет только часть его роли; и лишь при потере обоих генов в двойном мутанте раскрывается полный репертуар процессов, за которые эти гены ответственны. Аналогичные принципы применимы и к дуплицированным генам, которые работают в одном и том же месте (например, в одноклеточном организме), но приводятся в действие — вместе или индивидуально — в ответ на изменяющиеся условия. Таким образом, наличие дуплицированных генов сильно усложняет их генетический анализ.

Для более точной оценки того, насколько близко виды млекопитающих схожи друг с другом генетически, мы можем сравнивать последовательности нуклеотидов соответствующих (ортологичных) генов или же аминокислотные последовательности белков, кодируемых этими генами. Результаты для отдельных генов и белков имеют широкий диапазон значений. Но обычно, если мы выравниваем аминокислотную последовательность какого-либо белка человека с таковой ортологичного ему белка, принадлежащего, скажем, слону, то около 85% аминокислот окажутся идентичными. Подобное сравнение между человеком и птицей показывает идентичность аминокислот приблизительно на уровне 70% — вдвое больше различий, потому что линии родословной птиц и млекопитающих разошлись вдвое раньше, чем отошли друг от друга предки слона и человека (рис. 1.52).

Рис. 1.52. Временная шкала дивергенции различных позвоночных. На шкале слева указан оцениваемый период времени и геологическая эра жизни последнего общего предка каждой указанной пары животных. Все временные оценки основаны на сравнении аминокислотных последовательностей ортологичных белков; чем дольше два животных эволюционировали независимо друг от друга, тем меньшая доля аминокислот остается идентичной. Данные по многим различным классам белков пришлось усреднить, чтобы прийти к заключительным оценкам, а временная шкала откалибрована с учетом палеонтологических данных, согласно которым последний



общий предок млекопитающих и птиц жил 310 миллионов лет назад. Цифрами справа представлены данные о дивергенции последовательностей одного определенного белка (выбранного наугад) — α-цепи гемоглобина. Обратите внимание, что для этого белка, хотя и наблюдается явная общая тенденция увеличения расхождения с течением времени, имеется также и несколько нарушений. Они отражают хаотичность эволюционного процесса и, вероятно, действие естественного отбора, вызвавшего особенно быстрые изменения последовательности гемоглобина у некоторых организмов, которые испытывали особые физиологические потребности. В среднем, в пределах любой отдельно взятой эволюционной линии, гемоглобины накапливают изменения со скоростью около 6-ти аминокислотных замен на 100 аминокислот за каждые 100 миллионов лет. Некоторые белки, подвергнутые более строгим функциональным ограничениям, эволюционируют намного медленнее, а иные в 5 раз быстрее. Все это порождает серьезные сомнения в достоверности временной оценки дивергенции, и некоторые эксперты полагают, что основные ветви млекопитающих отошли друг от друга на целых 60 миллионов лет позже, чем показано здесь. (Переработано из S. Kumar and S. V. Hedges, *Nature* 392: 917–920, 1998. С разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

Мышь в силу малого размера, выносливости и быстрого размножения стала лучшим модельным организмом для экспериментальных исследований в молекулярной генетике позвоночных. Известно много происходящих в природе мутаций, которые являются зеркальным отражением эффектов, наблюдаемых при соответствующих мутациях у людей (рис. 1.53). Кроме того, разработаны методы, позволяющие проверить функцию любого выбранного нами гена мыши или любой некодирующей части генома мыши путем искусственного внесения мутаций в них; подробно мы объясним это позже.

Одна «сделанная под заказ» мышь-мутант может дать цитобиологу море информации. Можно установить эффекты заданной мутации в легионе различных контекстов, одновременно проверяя действие гена в различных видах клеток тела, которое, в принципе, может пострадать от этой мутации.

1.3.17. Человек сам являет миру свои особенности

Будучи людьми, мы проявляем особый интерес к геному человека. Мы хотим знать полный набор деталей, из которых мы собраны, и открыть механизм их работы. Но даже если бы мы были мышами, озабоченными молекулярной биологией мышей, люди были бы привлекательны для нас в качестве модельных генетических организмов благодаря лишь одной характерной особенности: в ходе медосмотров и жалобных исповедей перед врачами мы создаем каталог своих собственных генетических (и иных) расстройств. Человеческое население огромно, насчитывает на сегодняшний день приблизительно 6 миллиардов индивидов, а самодокументация, накопленная человечеством, означает, что собрана огромная база данных с информацией о мутациях у человека. Полная последовательность генома человека из более чем 3 миллиардов пар нуклеотидов уже определена, облегчая, как никогда прежде, опознание на молекулярном уровне именно того гена, который отвечает за интересующий нас мутантный признак у человека.

Сводя воедино данные исследований, проведенных на людях, мышах, мухах, червях, дрожжах, растениях и бактериях — используя подобия последовательностей генов, чтобы отобразить соответствия между тем или иным модельным организмом, — мы обогащаем свои знания по всем этим организмам.



Рис. 1.53. Человек и мышь: подобные гены и подобное развитие. Младенец человека и мышь, показанные на этом рисунке, имеют подобные белые пятна на лбу, потому что оба имеют мутации в одном и том же гене (названном *Kit*), необходимым для развития и поддержания пигментных клеток. (Любезность R. A. Fleischman.)

1.3.18. В деталях все мы различны

Что в точности мы имеем в виду, когда говорим о геноме *человека*? О чем геноме идет речь? В среднем любые два человека, взятые наугад, отличаются примерно одной или двумя из 1 000 пар нуклеотидов в последовательности ДНК. В проекте «Геном человека» ДНК для секвенирования была произвольно выбрана из небольшой группы анонимных индивидов. Геном человека — геном биологического вида «человек», — строго говоря, это более сложная вещь, охватывающая полную совокупность различных вариантов генов, которые встречаются в человеческом населении и непрерывно обмениваются и перераспределяются в ходе полового размножения. В конечном счете мы можем надеяться задокументировать также и это разнообразие. Это поможет нам понять, например, почему некоторые люди предрасположены к одной болезни, а другие — к другой; почему одни хорошо переносят тот или иной лекарственный препарат, а другие — плохо. Оно также дает нам новые ключи к приоткрытию многих тайн нашей истории: переселению людей и смешению наших предков, инфекциям, которыми они страдали, рационам питания, которых они придерживались. Все эти моменты оставляют «следы» в различных формах генов, которые выжили в человеческих общинах.

Знание и понимание дают власть, позволяющую вмешиваться в биологию человека — чтобы избежать или предупредить болезнь, в биологию растений — чтобы получать более обильные урожаи, в биологию бактерий — чтобы использовать их для наших собственных нужд. Все эти биологические предприятия взаимосвязаны, потому что генетическая информация всех живых организмов написана на одном и том же языке. Недавно обретенная молекулярными биологами способность читать и расшифровывать этот язык уже начала преобразовывать наши отношения с живым миром. Сведения по биологии клетки, приведенные в последующих главах, мы надеемся, подготовят читателя к ее пониманию, а возможно, и к тому, чтобы внести свой вклад в это невероятное по своим масштабам научное приключение XXI века.

Заключение

*Эукариотические клетки, по определению, хранят свою ДНК в отдельной, окруженной мембраной полости — ядре. Кроме этого, у них есть цитоскелет для опоры и движения, замысловатые внутриклеточные полости для переваривания и выделения, способность (у многих видов) поглощать другие клетки и метаболизм, который зависит от окисления органических молекул митохондриями. Эти свойства предполагают, что эукариоты, возможно, зародились как хищники по отношению к другим клеткам. Митохондрии — как и хлоропласты у растений — имеют свой собственный генетический материал и, очевидно, эволюционировали от бактерий, которые были захвачены в цитоплазму клетки-эукариота и выжили как симбионты. В эукариотических клетках, как правило, в 3–30 раз больше генов, чем в прокариотических, и часто в тысячи раз больше некодирующей ДНК. Некодирующая ДНК позволяет осуществлять сложное регулирование экспрессии генов, что необходимо для построения многоклеточных организмов. Многие эукариоты, однако, являются одноклеточными — среди них дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, которые служат простым модельным организмом для изучения цитобиологии эукариот, обеспечивая молекулярную базу кон-*

сервативных фундаментальных процессов, таких как цикл клеточного деления эукариот. Несколько других организмов выбраны в качестве основных моделей многоклеточных растений и животных, а секвенирование их полных геномов открыло путь к систематическому и всестороннему анализу функций генов, механизмов регулирования генов и генетического разнообразия. В результате дублирования генов в ходе эволюции позвоночных их геномы содержат многочисленные близкородственные гомологи большинства генов. Такая генетическая избыточность обусловила разнообразие и специализацию генов, приспособив их к выполнению новых задач, но вместе с тем она непомерно затрудняет расшифровку функций генов. В геномах нематоды *Caenorhabditis elegans* и мухи *Drosophila melanogaster* генетическая избыточность меньше, благодаря чему эти два вида сыграли ключевую роль в раскрытии универсальных генетических механизмов развития животных.

Задачи

Какие утверждения являются правильными? Обоснуйте свой ответ

1.1. Гены гемоглобина человека, которые расположены двумя кластерами на двух хромосомах, представляют хороший пример набора ортологичных генов.

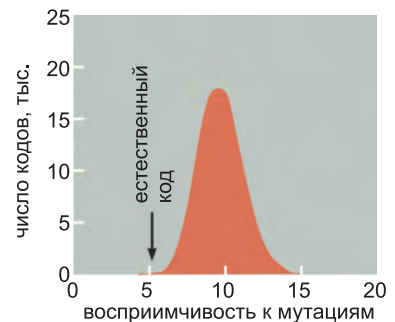
1.2. Горизонтальный перенос генов более распространен среди одноклеточных организмов, чем у многоклеточных.

1.3. Большая часть последовательностей ДНК в бактериальном геноме кодирует белки, тогда как большая часть последовательностей в геноме человека является некодирующей.

Обсудите следующие проблемы

1.4. С тех пор как генетический код был расшифрован четыре десятилетия назад, одни утверждают, что он, должно быть, представляет собой «замороженный случай», тогда как другие возражают, что он сформировался путем естественного отбора. Поразительная особенность генетического кода — это свойственное ему сопротивление воздействиям мутаций. Например, кодон с изменением в третьей позиции часто определяет ту же самую аминокислоту или другую, но с подобными химическими свойствами. Естественный код сопротивляется мутации более эффективно (то есть менее восприимчив к ошибкам), чем большинство других возможных кодов, как показано на рис. Q1.1. Только один из миллиона машинно-генерируемых «случайных» кодов более устойчив к ошибкам, чем естественный генетический код. Говорит ли столь необычайная устойчивость генетического кода к мутациям в пользу его происхождения как «замороженного случая» или как результата естественного отбора? Объясните ход ваших рассуждений.

Рис. Q1.1. Восприимчивость естественного (природного) кода относительно миллионов машинно-генерируемых кодов (задача 1.4). Восприимчивость является мерой среднего числа изменений в свойствах аминокислот, вызванных случайными мутациями. Низкое значение указывает, что мутации, как правило, вызывают незначительные изменения. (Данные любезно предоставлены Steve Freeland.)



1.5. Вы начали характеризовать образец, добытый из глубин океанов Европы — одной из лун Юпитера. К вашему большому удивлению, образец содержит форму жизни, которая хорошо растет в питательном бульоне. Ваш предварительный анализ показывает, что это — клеточный организм, состоящий из ДНК, РНК и белка. Когда Вы показываете свои результаты коллеге, он заявляет, что ваш образец, скорее всего, был загрязнен организмом с Земли. Какие подходы Вы могли бы перепробовать, чтобы отличить загрязнение от новой клеточной формы жизни, основанной на ДНК, РНК и белке?

1.6. Не так трудно представить, что значит питаться органическими молекулами, которые производят живые организмы. То есть, в конечном счете, делать именно то, что делаем мы. Но что означает «питаться» солнечным светом, как это делают фототрофы? Или, что еще более странно, «питаться» камнями, чем занимаются литотрофы? Что является «пищей», например, в смеси химикатов (H_2S , H_2 , CO , Mn^+ , Fe^{2+} , Ni^{2+} , CH_4 и NH_4^+), исторгающейся из гидротермального источника?

1.7. Сколько различных возможных деревьев (схем ветвления) с ветвями зубактерий, архей и эукариот получится вырастить на почве допущений о том, что все они произошли от некоторого общего предка?

1.8. Гены рибосомной РНК высококонсервативны (обладают относительно малой изменчивостью последовательности) у всех живущих на Земле организмов; таким образом, они эволюционировали очень медленно с течением времени. Говорит ли это о том, что гены рибосомной РНК были «рождены» совершенными?

1.9. Гены, участвующие в таких информационных процессах, как репликация, транскрипция и трансляция, переносятся между видами намного реже, чем гены, вовлеченные в метаболизм. В настоящее время причина такого неравенства еще не ясна, но есть одно предположение, согласно которому это связано с различным уровнем сложности информационных и метаболических процессов. Информационные процессы, как правило, вовлекают крупные ансамбли различных генных продуктов, тогда как метаболические реакции обычно катализируются ферментами, состоящими из единственного белка. Почему уровень сложности, заложенный в этих процессах — информационных или метаболических, — так или иначе влияет на скорость горизонтального переноса генов?

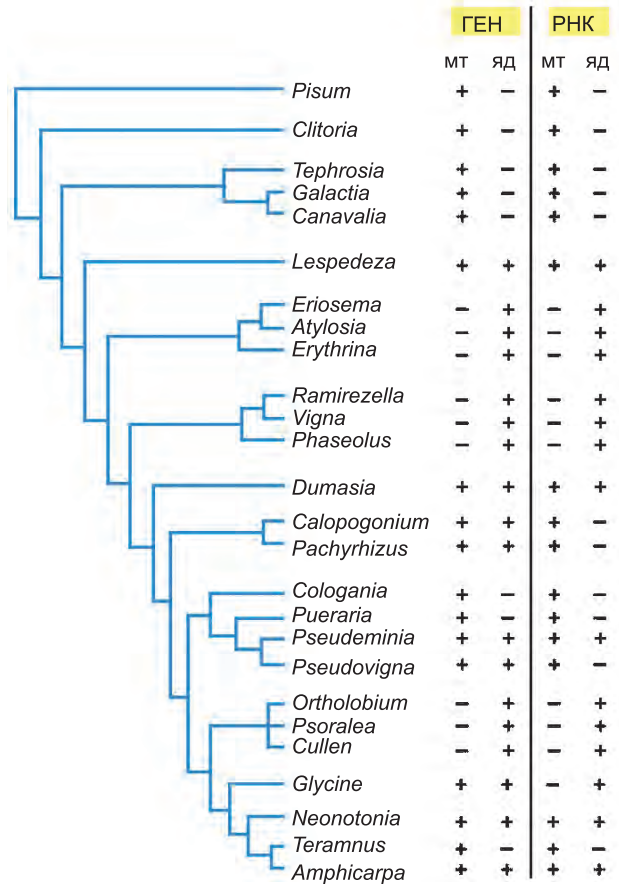
1.10. Процесс переноса генов из митохондриального генома в ядерный может быть проанализирован на растениях. Ген дыхательной цепи *Cox2*, который кодирует субъединицу 2 цитохромоксидазы, был функционально перенесен в ядро в ходе эволюции цветковых растений. Широкомасштабный анализ родов растений позволил точно установить время появления ядерной формы этого гена и определить несколько вероятных промежуточных продуктов на пути безвозвратного ухода из митохондриального генома. Сводные данные о распределении гена *Cox2* между митохондриями и ядрами, наряду с данными об их транскрипции, представлены в филогенетическом контексте на **рис. Q1.2**.

А. Предполагая, что перенос митохондриального гена в ядро произошел только однажды (это предположение подтверждается структурами ядерных генов), укажите на филогенетическом дереве точку, в которой произошел этот перенос.

В. Известны ли какие-либо примеры родов, в которых как перенесенный ген, так и митохондриальный ген оказываются функционально активными? Приведите такие примеры.

С. Каково минимальное число событий инактивации или потери митохондриального гена? Укажите эти события на филогенетическом дереве.

Рис. Q1.2. Сводные данные по распределению гена *Cox2* и сведения о соответствующих транскриптах в филогенетическом контексте (задача 1.10). Присутствие неповрежденного гена или функционально активного транскрипта обозначено (+); отсутствие неповрежденного гена или функционально активного транскрипта обозначено (-). Сокращения: мт — митохондрии; яд — ядра.



Д. Каково минимальное число событий инактивации или потери ядерного гена? Укажите эти события на филогенетическом дереве.

Е. На основании этих данных предложите общую схему передачи митохондриальных генов в ядерный геном.

1.11. Когда кодирующие гемоглобин гены были открыты в бобах, это было настолько удивительно — обнаружить в растении ген, типичный для крови животного, — что была выдвинута гипотеза, согласно которой этот ген растения возник в результате горизонтального переноса от животного. К настоящему времени секвенировано множество генов гемоглобина, и филогенетическое дерево, основанное на некоторых из этих последовательностей, показано на **рис. Q1.3**.

А. Подтверждает ли это дерево или опровергает гипотезу о том, что гемоглобины растений возникли вследствие горизонтального переноса генов?

В. Если предположить, что кодирующие гемоглобин гены растений были первоначально получены, например, от паразитической нематоды, то как, по-вашему, будет выглядеть филогенетическое дерево?

1.12. Как известно, в различных ветвях генеалогического дерева скорость эволюции разная. Например, скорость эволюции в линии крыс значительно больше, чем в линии человека. Такая разница в скорости становится заметной, когда мы смотрим на изменения в белковых последовательностях, подвергающихся давлению естественного отбора, или на изменения в некодирующих последовательностях нуклеотидов, которые избавлены от заметного воздействия естественного отбора. Можете ли Вы предложить одно или несколько возможных объяснений более медленной скорости эволюционных изменений в ветви человека по сравнению с ветвью крыс?



Рис. Q1.3. Филогенетическое дерево генов гемоглобина различных видов (к задаче 1.11). Бобовые выделены розовым цветом.

Литература

Общая

- Alberts B., Bray D., Hopkin K. et al. (2004) *Essential Cell Biology*, 2nd ed. New York: Garland Science.
- Barton N. H., Briggs D. E. G., Eisen J. A. et al. (2007) *Evolution*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Darwin C. (1859) *On the Origin of Species*. London: Murray.
- Graur D. & Li W.-H. (1999) *Fundamentals of Molecular Evolution*, 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Madigan M. T. & Martinko J. M. (2005) *Brock's Biology of Microorganisms*, 11th ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.
- Margulis L. & Schwartz K. V. (1998) *Five Kingdoms: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth*, 3rd ed. New York: Freeman.
- Watson J. D., Baker T. A., Bell S. P. et al. (2007) *Molecular Biology of the Gene*, 6th ed. Menlo Park, C. A: Benjamin-Cummings.

Клетки на Земле: характерные черты

- Andersson S. G. E. (2006) The bacterial world gets smaller. *Science* 314: 259–260.
- Brenner S., Jacob F. & Meselson M. (1961) An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190: 576–581.
- Fraser C. M., Gocayne J. D., White O. et al. (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270: 397–403.

Harris J.K., Kelley S.T., Spiegelman et al. (2003) The genetic core of the universal ancestor. *Genome Res.* 13: 407–413.

Koonin E. V. (2005) Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu. Rev. Genet.* 39: 309–338.

Watson J.D. & Crick F.H.C. (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737–738.

Yusupov M.M., Yusupova G.Z., Baucom A. et al. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292: 883–896.

Разнообразие геномов и древо жизни

Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A. et al. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453–1474.

Boucher Y., Douady C.J., Papke R.T. et al. (2003) Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups. *Annu. Rev. Genet.* 37: 283–328.

Cole S.T., Brosch R., Parkhill J. et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537–544.

Dixon B. (1994) *Power Unseen: How Microbes Rule the World*. Oxford: Freeman.

Kerr R.A. (1997) Life goes to extremes in the deep earth – and elsewhere? *Science* 276: 703–704.

Lee T.I., Rinaldi N.J., Robert F. et al. (2002) Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 298: 799–804.

Olsen G.J. & Woese C.R. (1997) Archaeal genomics: an overview. *Cell* 89: 991–994.

Pace N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734–740.

Woese C. (1998) The universal ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6854–6859.

Генетическая информация эукариот

Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A. et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185–2195.

Andersson S.G., Zomorodipour A., Andersson J.O. et al. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396: 133–140.

The *Arabidopsis* Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815.

Carroll S.B., Grenier J.K. & Weatherbee S.D. (2005) *From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design*, 2nd ed. Maldon, MA: Blackwell Science.

de Duve C. (2007) The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nature Rev. Genet.* 8: 395–403.

Delsuc F., Brinkmann H. & Philippe H. (2005) Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nature Rev. Genet.* 6: 361–375.

DeRisi J.L., Iyer V.R. & Brown P.O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278: 680–686.

Gabriel S.B., Schaffner S.F., Nguyen H. et al. (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296: 2225–2229.

Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H. et al. (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274: 546–567.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921.

Kellis M., Birren B.W. & Lander E.S. (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428: 617–624.

Lynch M. & Conery J.S. (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290: 1151–1155.

Mulley J. & Holland P. (2004) Comparative genomics: Small genome, big insights. *Nature* 431: 916–917.

National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Owens K. & King M.C. (1999) Genomic views of human history. *Science* 286: 451–453.

Palmer J.D. & Delwiche C.F. (1996) Second-hand chloroplasts and the case of the disappearing nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7432–7435.

Pennisi E. (2004) The birth of the nucleus. *Science* 305: 766–768.

Plasterk R.H. (1999) The year of the worm. *BioEssays* 21: 105–109.

Reed F.A. & Tishkoff S.A. (2006) African human diversity, origins and migrations. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16: 597–605.

Rubin G.M., Yandell M.D., Wortman J.R. et al. (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287: 2204–2215.

Stillman B. & Stewart D. (2003) The genome of *Homo sapiens* (Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. LXVIII). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282: 2012–2018.

Tinsley R.C. & Kobel H.R. (eds.) (1996) The Biology of *Xenopus*. Oxford: Clarendon Press.

Tyson J.J., Chen K.C. & Novak B. (2003) Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 221–231.

Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W. et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304–1351.

2

Химия клетки и биосинтез

На первый взгляд, трудно согласиться с представлением о том, что все живые существа, описанные в главе 1, являются не более чем химической системой. Невероятное разнообразие живых форм, целеустремленная направленность их действий и способность расти и воспроизводиться, кажется, выделяют их из мира твердых тел, жидкостей и газов, которые, как правило, находятся в ведении химии. Действительно, до девятнадцатого столетия полагали, что животные содержат жизненную силу (жизненное начало) — «дух²», который и определяет их отличительные свойства.

Теперь мы знаем, что в живых организмах нет ничего, что не подчинялось бы законам химии и физики. И все же химия жизни особенная. Во-первых, она основывается преимущественно на соединениях углерода, учение о которых поэтому известно как *органическая химия*. Во-вторых, клетки на 70% состоят из воды, и жизнь в значительной степени зависит от химических реакций, протекающих в водном растворе. В-третьих, что наиболее важно, химия клетки чрезвычайно сложна: даже самая простая клетка с точки зрения химии безмерно сложнее, чем какая-либо иная известная химическая система. Хотя клетки содержат огромное разнообразие маленьких углеродсодержащих молекул, большинство атомов углерода в клетках включено в огромные *полимерные молекулы* — цепи химических субъединиц, связанных между собой по принципу «голова к хвосту». Именно уникальные свойства таких макромолекул и позволяют клеткам и организмам расти и воспроизводиться, а также осуществлять все прочие присущие жизни атрибуты.

2.1. Химические компоненты клетки

Вещество состоит из комбинаций *элементов* — простых веществ типа водорода или углерода, которые не могут быть разделены на части или превращены в другие вещества химическими средствами. Наименьшая частица элемента, которая все еще сохраняет его отличительные химические свойства, — *атом* (рис. 2.1). Однако свойства всех остальных веществ, помимо простых элементов — в том числе материалов, из которых построены живые клетки, — зависят от способа, которым входящие в их состав атомы соединяются друг с другом с образованием *молекул*. Поэтому, для того чтобы понять, каким образом живые организмы построены из неживого вещества, очень важно знать, как образуются всевозможные химические связи, посредством которых атомы объединяются в молекулы.

² Латинское слово *animal* (животное) образовано от основы *anima*, означающей «дыхание», «душа». Согласно верованиям древних, при рождении всякой твари в нее вдыхалась душа (женское начало) или дух (*animus*) — мужское начало. При этом дух определял не только способность дышать, но также природные качества и характер его обладателя. — *Прим. пер.*

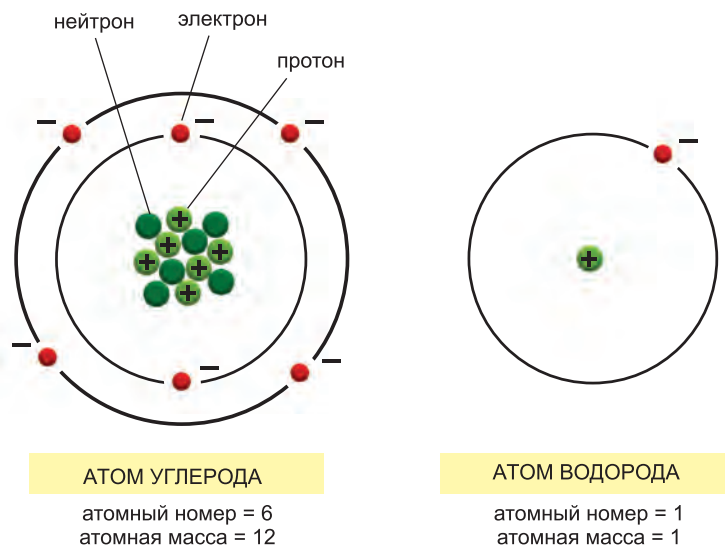


Рис. 2.1. Очень схематичное представление атома углерода и атома водорода. Ядро каждого атома, кроме водорода¹, состоит из положительно заряженных протонов и электрически нейтральных нейтронов. Число электронов в атоме равно числу его протонов (атомный номер), так что атом не имеет результирующего заряда (в целом электрически нейтрален). Поскольку именно электроны определяют химическое поведение атома, все атомы данного элемента имеют один и тот же атомный номер. Нейтроны суть незаряженные субатомные частицы почти той же массы, что и протоны. Они вносят вклад в структурную устойчивость ядра: если их слишком много или слишком мало, ядро может разрушиться (радиоактивный распад), но не влияют на химические свойства атома. Благодаря нейтронам элемент может существовать в нескольких физически отличающихся, но химически идентичных формах, названных *изотопами*; все изотопы имеют разное число нейтронов, но одинаковое число протонов. В природе встречаются многочисленные изотопы почти всех элементов, в том числе неустойчивые. Например, тогда как основная масса углерода на Земле существует в виде устойчивого изотопа углерода-12 с шестью протонами и шестью нейтронами, есть также небольшое количество неустойчивого изотопа, радиоактивного углерода-14, в атоме которого шесть протонов и восемь нейтронов. Углерод-14 подвергается радиоактивному распаду с небольшой, но постоянной скоростью. Это создает основу метода, известного как датирование радиоактивным углеродом, который используется в археологии для определения времени происхождения органических материалов.

В действительности нейтроны, протоны и электроны бесконечно малы относительно атома в целом; здесь их размеры очень преувеличены. Кроме того, диаметр ядра составляет лишь около 10^{-4} диаметра электронного облака. Наконец, хотя электроны показаны здесь в виде отдельных частиц, в действительности их поведение подчиняется законам квантовой механики, и никаким методом невозможно точно предсказать местоположение электрона в конкретный момент времени.

2.1.1. Клетки построены из атомов всего лишь нескольких типов

Под **атомной массой** атома или **молекулярной массой** молекулы понимается их масса относительно таковой для атома водорода³. Она, по существу, равна совокупной массе протонов и нейтронов, которые атом или молекула содержат, так

¹ Изотопа водорода-1 — Прим. ред.

² Атомная единица массы (а.е.м.), она же дальтон (Да), — единица измерения масс атомов, молекул и элементарных частиц. За атомную единицу массы принята $1/12$ массы изотопа углерода 12С. Рекомендована к применению IUPAC в 1961 году. — Прим. ред.

как электроны намного легче и практически ничего не приносят в общую массу атома или молекулы. Таким образом, главный изотоп углерода имеет атомную массу 12 и обозначается как ^{12}C , тогда как неустойчивый изотоп углерода имеет атомную массу 14 и записывается символом ^{14}C . Масса атома или молекулы часто выражается в *дальтонах*, один дальтон соответствует атомной единице массы, приблизительно равной массе атома водорода (см. **сноску 2**).

Атомы настолько малы, что трудно представить себе их размер. Отдельный атом углерода имеет примерно 0,2 нм в диаметре, так что потребуется около 5 миллионов таких атомов, уложенных по прямой, чтобы отмерить один миллиметр. Масса протона или нейтрона приблизительно $1/(6 \cdot 10^{23})$ граммов, так что один грамм водорода содержит $6 \cdot 10^{23}$ атомов. Это огромное число $6 \cdot 10^{23}$, названное **числом Авогадро**, представляет собой ключевой коэффициент масштабирования, описывающий соотношения между количествами, измеряемыми вошедшими в повседневный быт величинами, и количествами, выражаемыми в мерах отдельных атомов или молекул. Если некоторое вещество имеет молекулярную массу X , это значит, что $6 \cdot 10^{23}$ молекул этого вещества имеют массу X граммов. Это количество называют одним **молем** вещества (**рис. 2.2**).

Известно 89 природных элементов, каждый из которых отличается от всех остальных числом протонов и электронов в атомах. Живые организмы, однако, построены лишь из небольшой выборки этой совокупности элементов, причём четыре из них: углерод (C), водород (H), азот (N) и кислород (O) — составляют 96,5% массы организма. Такой состав живых организмов разительно отличается от неживой неорганической окружающей среды (**рис. 2.3**), и это служит свидетельством отличительного характера химии жизни.

2.1.2. Характер взаимодействия атомов определяют электроны внешней оболочки

Чтобы понять, как атомы соединяются друг с другом с образованием молекул, из которых, в свою очередь, состоят живые организмы, мы сосредоточим внимание на электронах. Протоны и нейтроны прочно связаны друг с другом в ядре и меняют партнеров только в экстремальных условиях, например: в процессе радиоактивного распада, или в недрах солнца, или же во чре-

Моль¹ — это X граммов вещества, где X — его относительная молекулярная масса (молекулярный вес). В одном моле содержится $6 \cdot 10^{23}$ молекул вещества.

1 моль углерода составляет 12 г;
1 моль глюкозы составляет 180 г;
1 моль хлорида натрия составляет 58 г.

Молярные растворы² имеют концентрацию 1 моль вещества в 1 литре раствора. Молярный раствор (обозначаемый как 1 М) глюкозы, например, имеет концентрацию 180 г/л, тогда как миллимолярный раствор (1 мМ) — 180 мг/л.

Стандартное сокращение для грамма — г;
сокращение для литра — л.

Рис. 2.2. Моль и молярные растворы

¹ Моль — это количество вещества, содержащее $6,022 \cdot 10^{23}$ структурных единиц (атомов, молекул, ионов, радикалов) данного вещества. Число $6,022 \cdot 10^{23}$ называется числом Авогадро. Молярная масса численно равна относительной молекулярной массе и измеряется в граммах на моль (г/моль). — *Прим. ред.*

² Молярная концентрация — количество вещества (в молях), содержащееся в 1 л раствора. В одномолярном растворе (1 М) содержится 180 г глюкозы в литре раствора, тогда как в одномиллимолярном (1 мМ) — 180 мг/л. — *Прим. ред.*

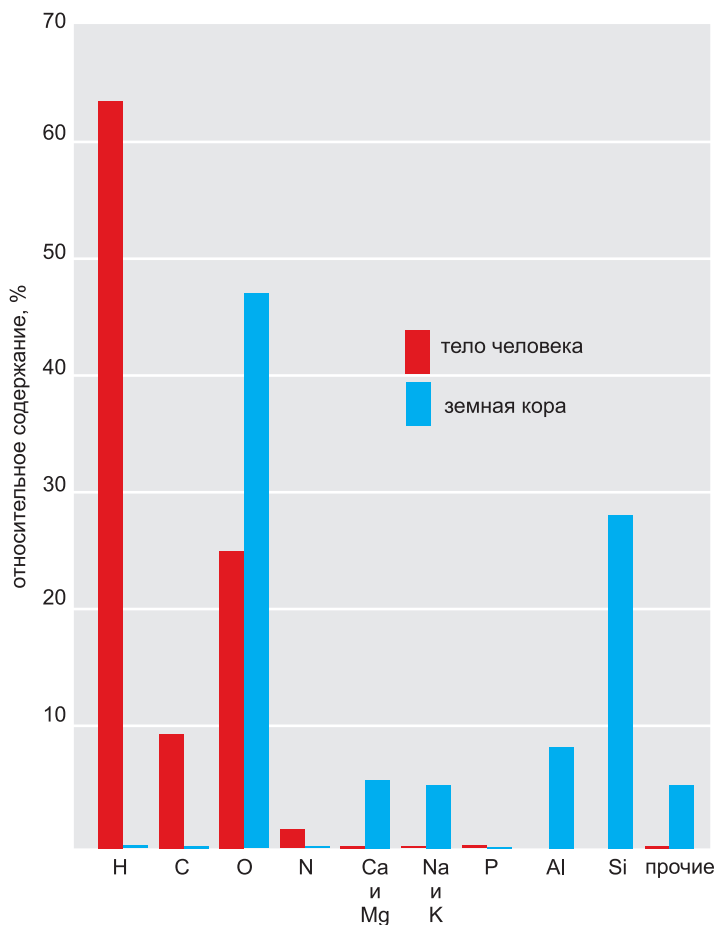


Рис. 2.3. Распространенность некоторых химических элементов в неживой природе (земная кора) в сравнении с их относительным содержанием в тканях человека. Относительное содержание каждого элемента выражено как процент от общего числа атомов вещества, включая воду. Таким образом, из-за обилия воды более чем 60% атомов в живом организме — атомы водорода. Относительное содержание элементов схоже для всех живых существ.

ве ядерного реактора. В живых тканях перегруппировкам подвергаются только электроны атомов. Они формируют оболочку атома и определяют химические закономерности, согласно которым атомы объединяются с образованием молекул.

Электроны находятся в непрерывном движении вокруг ядра,

но движения в таком субмикроскопическом масштабе повинуются совершенно иным законам, сильно отличающимся от известных в повседневной жизни. Согласно этим законам, электроны в атоме могут находиться лишь в определенных дискретных состояниях, названных орбиталями, а числу электронов, которые могут быть размещены на орбитали данного типа — так называемой *электронной оболочке*, — положен строгий предел. Электроны, находящиеся наиболее близко к положительному ядру, притягиваются к нему наиболее сильно и занимают самую внутреннюю, наиболее сильно связанную с ядром оболочку. На этой оболочке находится максимум два электрона. Вторая оболочка более отдалена от ядра, и ее электроны связаны слабее. Эта вторая оболочка удерживает до восьми электронов. Третья оболочка содержит электроны, которые связаны еще слабее; она также содержит до восьми электронов. Четвертая и пятая оболочки могут содержать по 18 электронов каждая. Атомы, окруженные более чем четырьмя оболочками, встречаются в биологических молекулах крайне редко.

Самое устойчивое положение в атоме занимают те электроны, которые находятся в состоянии максимальной связи с ядром, то есть когда они занимают самые близкие к ядру оболочки. Поэтому в случае больших атомов электроны заполняют

орбитали по порядку: первую оболочку перед второй, вторую перед третьей и так далее. Атом, внешняя оболочка которого полностью заполнена электронами, особенно устойчив и поэтому химически инертен. Например, гелий с 2 электронами, неон с 2 + 8 электронами и аргон с 2 + 8 + 8 электронами — это инертные газы. Водород, напротив, имеет лишь один электрон и только наполовину заполненную оболочку, поэтому представляет собой весьма реакционноспособный атом. Аналогично другие атомы, встречающиеся в живых тканях, имеют незаполненные внешние электронные оболочки и могут отдавать, принимать или обобществлять электроны при взаимодействии друг с другом и образовывать в результате этого взаимодействия как молекулы, так и ионы (рис. 2.4).

Поскольку незаполненная электронная оболочка менее устойчива, чем заполненная, атомы с неполными внешними оболочками стремятся к взаимодействию с другими атомами, чтобы приобрести или потерять столько электронов, сколько требуется для достижения полного заполнения внешней оболочки. Такой обмен электронами происходит либо путем передачи электронов от одного атома другому, либо посредством обобществления электронов двух атомов. Эти два способа обуславливают два типа **химических связей** между атомами: *ионная связь* образуется, когда один атом отдает электроны другому, тогда как *ковалентная связь*

элемент	электронная оболочка			
	I	II	III	IV
1 Водород	●			
2 Гелий	●●			
6 Углерод	●●	●●●●		
7 Азот	●●	●●●●●		
8 Кислород	●●	●●●●●●		
10 Неон	●●	●●●●●●●●		
11 Натрий	●●	●●●●●●●●	●	
12 Магний	●●	●●●●●●●●	●●	
15 Фосфор	●●	●●●●●●●●	●●●●●	
16 Сера	●●	●●●●●●●●	●●●●●●●	
17 Хлор	●●	●●●●●●●●	●●●●●●●●	
18 Аргон	●●	●●●●●●●●	●●●●●●●●	
19 Калий	●●	●●●●●●●●	●●●●●●●●	●
20 Кальций	●●	●●●●●●●●	●●●●●●●●	●●

Рис. 2.4. Завершенные и незавершенные электронные оболочки некоторых распространенных элементов. Все элементы, распространенные в живых организмах, имеют незаполненные внешние оболочки (красные) и могут, таким образом, участвовать в химических реакциях с другими атомами. Сравнения ради показаны некоторые элементы, электронные оболочки которых полностью заполнены (выделены желтым); они являются химически инертными.

образуется, когда два атома обобществляют пару электронов (рис. 2.5). Часто такая пара электронов распределена неравнозначно, если частично переданные электроны находятся между двумя атомами, которые притягивают их по-разному — один из них более *электроотрицателен*, нежели другой; в результате такого способа взаимодействия — промежуточного между полярным и ковалентным — образуется *полярная ковалентная связь*, которую мы обсудим позже.

Атом водорода, которому недостает лишь одного электрона для заполнения своей электронной оболочки, обычно заимствует его путем обобществления электронов, образуя одну ковалентную связь с другим атомом; часто эта связь полярная, что означает неравномерное распределение электронов. Другие распространенные в живых клетках элементы: С, N и O с незавершенной второй оболочкой, а также P и S с не до конца заполненной третьей оболочкой (см. рис. 2.4), — как правило, обобществляют электроны, образуя несколько ковалентных связей, и достигают заполнения внешней оболочки до восьми электронов. Число электронов, которые атом должен получить или отдать (путем обобществления либо передачи), чтобы заполнить свою внешнюю оболочку, называют его *валентностью*.

Определяющая роль внешней электронной оболочки в проявлении элементом тех или иных химических свойств означает следующее: если элементы разместить в порядке возрастания их атомного номера, то мы заметим периодическое повторение элементов с подобными свойствами. Так, элемент, скажем, с незавершенной второй оболочкой с одним электроном будет вести себя почти так же, как элемент, у которого заполнена вторая оболочка, а на незавершенной третьей — один электрон. У металлов, например, на незавершенных внешних оболочках только один или

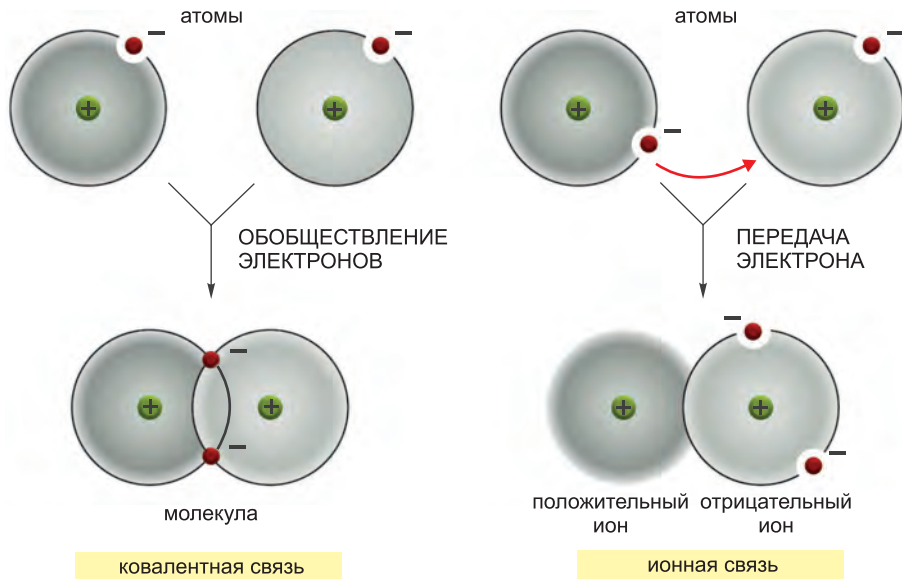


Рис. 2.5. Сравнение ковалентной и ионной связей. Атомы могут достигнуть более устойчивого расположения электронов в своей внешней оболочке за счет взаимодействия друг с другом. Ионная связь образуется, когда электроны передаются от одного атома другому. Ковалентная связь образуется, когда электроны обобществляются атомами. На рисунке представлены два крайних случая; часто ковалентные связи образуются с частичной передачей (неравномерным обобществлением) электронов, что дает полярную ковалентную связь (см. рис. 2.43).

несколько электронов, тогда как инертные газы, как мы только что видели, имеют заполненные внешние оболочки. Эта закономерность лежит в основе знаменитой *периодической системы* элементов, представленной на **рис. 2.6**, при этом элементы, входящие в состав живых организмов, выделены цветом.

атомный номер

атомная масса

1 H 1																	He
Li	Be											5 B 11	6 C 12	7 N 14	8 O 16	9 F 19	Ne
11 Na 23	12 Mg 24											Al	14 Si 28	15 P 31	16 S 32	17 Cl 35	Ar
19 K 39	20 Ca 40	Sc	Ti	23 V 51	24 Cr 52	25 Mn 55	26 Fe 56	27 Co 59	28 Ni 59	29 Cu 64	30 Zn 65	Ga	Ge	As	34 Se 79	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	42 Mo 96	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	53 I 127	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Rf	Ha													

Рис. 2.6. Элементы, упорядоченные согласно своему атомному номеру, составляют периодическую таблицу Менделеева. Элементы, которые проявляют подобные свойства, распределены по группам на основании числа электронов во внешней оболочке. Например, Mg и Ca стремятся отдать два электрона со своих внешних оболочек; C, N и O завершают (заполняют до конца) свои вторые электронные оболочки за счет обобществления электронов. Четыре элемента, выделенные *красным*, составляют 99% общего числа атомов элементов, имеющих в теле человека. Еще семь элементов, выделенных *синим*, вместе составляют приблизительно 0,9% от общего количества. Остальные элементы, показанные *зеленым*, нужны человеку в ничтожных количествах (микроколичествах). Остается неясным, нужны нам элементы, показанные *желтым*, или нет. Химия жизни, по-видимому, представлена преимущественно химией легких элементов.

Атомные массы, представляющие собой суммарную массу протонов и нейтронов в атомном ядре, отличаются для разных изотопов элемента. Атомные массы, показанные здесь, представляют массы наиболее распространенных изотопов каждого элемента.

2.1.3. Ковалентные связи образуются за счет обобществления электронов

Все характеристики клетки зависят от молекул, из которых она состоит. Согласно определению, под **молекулой**⁴ понимают группу атомов, которые удерживаются вместе **ковалентными связями**; здесь для дополнения своих внешних оболочек атомы обобществили электроны, а не обменялись ими между собой. В самой простой из возможных молекул — молекуле водорода (H₂) — два атома водорода, каждый с единственным электроном, делят между собой два общих электрона — именно столько их необходимо для заполнения первой оболочки. Такие обобществленные электроны формируют электронное облако с отрицательным зарядом, которое имеет наибольшую плотность в области между двумя положительно заряженными

⁴ В классической химии это понятие трактуется шире. Молекула — это наименьшая частица вещества, определяющая его свойства. Состоит из атомов одного или различных химических элементов и существует как единая система атомных ядер и электронов. Атомы удерживаются в молекуле с помощью химических связей. — *Прим. ред.*

ядрами и помогает удерживать их вместе — в противовес взаимному отталкиванию между одноименными зарядами, которое в противном случае отдалило бы их друг от друга. Силы притяжения и отталкивания находятся в равновесии, когда ядра разнесены на характеристическое расстояние, названное *длиной связи*.

Следующее свойство всякой связи — ковалентной или нековалентной — это *сила связи*, которая измеряется количеством энергии, которое необходимо затратить для разрыва этой связи. Она часто выражается в единицах килокалорий на моль (ккал/моль), где одна килокалория равна количеству энергии, необходимому для повышения температуры одного литра воды на один градус Цельсия (по стоградусной шкале Цельсия). Таким образом, если 1 килокалория должна быть потрачена на разрушение $6 \cdot 10^{23}$ связей определенного типа (то есть 1 моля этих связей), то сила такой связи составляет 1 ккал/моль. Равносильной, широко применяемой мерой энергии является килоджоуль (кДж), который равен 0,239 ккал.

Чтобы понять значение силы связей, полезно сравнить их со средними энергиями ударов, которые молекулы постоянно испытывают от столкновений с другими молекулами в окружающей их среде (их тепловой энергией), равно как и с другими источниками биологической энергии, например светом и окислением глюкозы (рис. 2.7). Энергия ковалентной связи, как правило, выше тепловой энергии колебаний атомов в молекуле в 100 раз, так что ковалентные связи в молекуле сопротивляются растяжению, производимому тепловыми колебаниями, и обычно разрываются только в ходе определенных химических реакций с другими атомами и молекулами. Образование и разрушение ковалентных связей суть бурные события, и в живых клетках они с большой точностью управляются весьма специфичными катализаторами, названными *ферментами*. Нековалентные связи, как правило, намного слабее; позже мы увидим, что они важны в клетке в тех случаях, когда молекулам для осуществления своих функций необходимо легко объединяться и расходиться.

Если атом водорода способен образовывать только единственную ковалентную связь, то другие обычные для клеток атомы, которые образуют в них ковалентные связи: O, N, S и P, равно как и важнейший во всех отношениях атом углерода, — могут образовывать сразу несколько таких связей. Внешняя оболочка этих атомов, как мы узнали, может разместить до восьми электронов, и они образуют ковалентные связи с таким количеством других атомов, которое необходимо для достижения этого числа. Кислород, с шестью электронами на внешней оболочке, переходит в наиболее устойчивое состояние, когда приобретает два дополнительных электрона, которые делит с другими атомами, и поэтому образует до двух ковалентных связей. Азот, с пятью внешними электронами, образует самое большее три

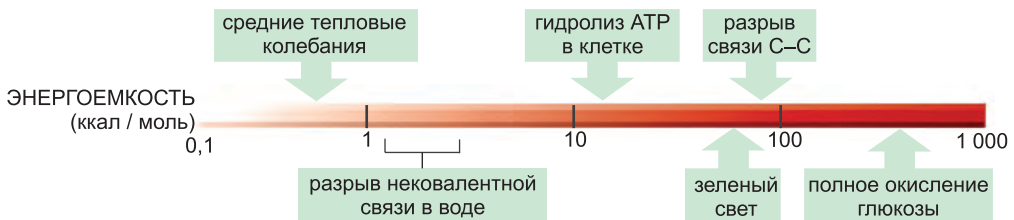


Рис. 2.7. Некоторые виды энергии, важные для клеток. Обратите внимание, что сравнение приведено на логарифмической шкале.

ковалентные связи, тогда как углерод, с четырьмя внешними электронами, образует до четырех ковалентных связей и, таким образом, делит с другими атомами четыре пары электронов (см. рис. 2.4).

Когда один атом образует ковалентные связи с несколькими другими, эти связи определенным образом ориентированы друг относительно друга в пространстве, что отражает ориентацию орбит обобществленных электронов. Поэтому ковалентные связи такого атома, помимо длины связи и энергии связи, характеризуются определенным углом связи (рис. 2.8). Четыре ковалентные связи, которые может образовывать атом углерода, например, расположены так, будто указывают на четыре угла правильного четырехгранника. Точная ориентация ковалентных связей составляет основу трехмерной геометрии органических молекул.

2.1.4. Существуют различные типы ковалентных связей

Большей частью ковалентные связи основаны на обобществлении двух электронов — по одному от каждого из участвующих атомов; такие связи называют *одинарными связями*. Некоторые ковалентные связи, однако, образуются за счет обобществления более одной пары электронов. Например, могут быть обобществлены четыре электрона, по два от каждого участвующего атома; такая связь называется *двойной связью*. Двойные связи короче и прочнее, чем одинарные, и оказывают характерное влияние на трехмерную геометрию молекул, их содержащих. Одинарная ковалентная связь между двумя атомами, как правило, допускает вращение одной части молекулы относительно другой вокруг оси связи. Двойная связь препятствует такому вращению, обуславливая более жесткую и менее гибкую структуру (рис. 2.9 и приложение 2.1, стр. 106–107).

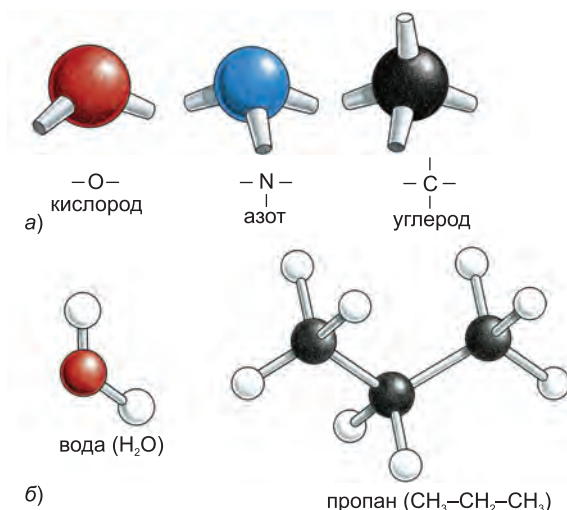


Рис. 2.8. Геометрия ковалентных связей. а) Пространственное расположение ковалентных связей, которые могут быть образованы кислородом, азотом и углеродом. б) Молекулы, образованные из этих атомов, имеют точную трехмерную структуру, представленную здесь в виде моделей из шариков и палочек на примере воды и пропана.

Структура молекулы воды может задаваться углами и длинами всех ее ковалентных связей. Атомы окрашены согласно следующей общепринятой системе обозначений: Н — белый; С — черный; О — красный; N — синий.

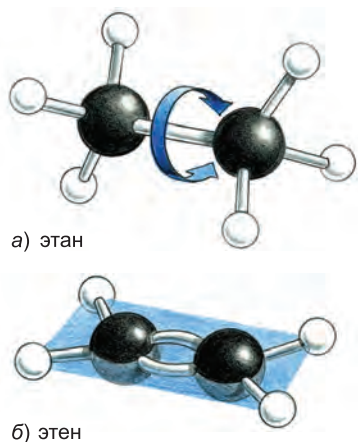


Рис. 2.9. Сравнение двойной и одинарной углеродной-углеродной связи. а) Молекула этана с одинарной ковалентной связью между двумя атомами углерода иллюстрирует четырехгранное расположение одинарных ковалентных связей, образованных углеродом. Каждая из двух CH_3 -групп, соединенных ковалентной связью, может поворачиваться относительно другой вокруг оси связи. б) Двойная связь между двумя атомами углерода в молекуле этена (этилена) видоизменяет геометрию связей между атомами углерода, выстраивая все атомы в одной плоскости (*синий*); двойная связь препятствует вращению одной группы CH_2 относительно другой.

В некоторых молекулах электроны подлежат делению между тремя и более атомами, в результате чего образуются связи, которые имеют гибридный характер — промежуточный между одинарными и двойными связями. Например, очень устойчивая молекула бензола состоит из кольца, образованного шестью атомами углерода, в котором электроны распределены равномерно (хотя обычно их изображают в виде чередующейся последовательности одинарных и двойных связей, как показано в приложении 2.1).

Когда атомы, соединенные одинарной ковалентной связью, принадлежат разным элементам, эти два атома обычно притягивают поделенные электроны с разной силой. По сравнению с атомом углерода, например, атомы О и N притягивают электроны сильнее, тогда как атом Н — немного слабее. По определению, **полярная** (в электрическом смысле) структура — это структура, в которой на одном конце сосредоточен положительный заряд (положительный полюс), а на другом конце — отрицательный заряд (отрицательный полюс). Поэтому ковалентные связи, в которых электроны распределены подобным образом, называют **полярными ковалентными связями** (рис. 2.10). Например, ковалентная связь между кислородом и водородом, О—Н, или между азотом и водородом, N—H, является полярной, тогда как в связи между углеродом и водородом, С—H, электроны притягиваются обоими атомами почти одинаково и связь почти неполярна.

Полярные ковалентные связи чрезвычайно важны в биологии, потому что они создают *постоянные диполи*, которые позволяют молекулам взаимодействовать посредством электрических сил. Любая крупная молекула со множеством полярных групп будет давать на поверхности картину распределения частичных положительных и частичных отрицательных зарядов. Когда одна такая молекула сближается с другой — с комплементарным набором зарядов, — эти две молекулы привлекаются друг к другу электростатическими взаимодействиями, которые сродни (хотя и слабее их) ионным связям, рассмотренным нами ранее.

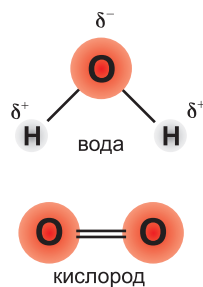


Рис. 2.10. Полярные и неполярные ковалентные связи. Сравнение картин распределения электронов в полярной молекуле воды (H_2O) и неполярной молекуле кислорода (O_2) (δ^+ — частично положительный заряд; δ^- — частично отрицательный заряд).

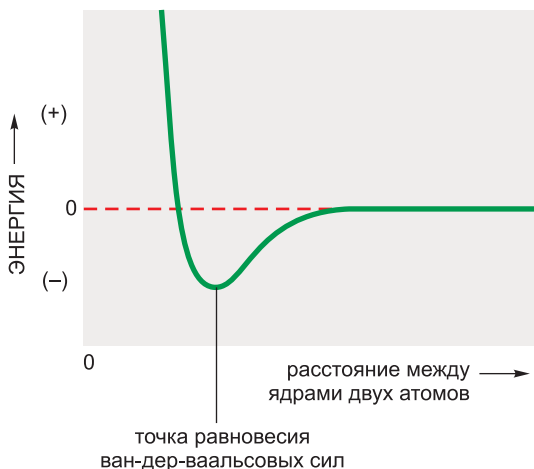
2.1.5. Зачастую атом ведет себя так, как будто он имеет постоянный радиус

Когда между двумя атомами образуется ковалентная связь, ядра этих атомов, в силу обобществления электронов, оказываются необычайно близко друг к другу. Но большинство атомов, которые стремительно сталкиваются друг с другом в клетке, расположены в разных молекулах. Что происходит, когда два таких атома вступают в контакт?

Простоты и ясности ради атомы и молекулы обычно представляют схематично — либо в виде линейной структурной формулы, либо в виде шарнирной модели. Однако *заполняющие пространство полусферические, или объемные, модели* гораздо точнее отражают структуру молекулы. В этих моделях твердая оболочка представляет радиус электронного облака, при котором мощные силы отталкивания препятствуют дальнейшему приближению какого-либо второго, несвязанного атома — так называемый *ван-дер-ваальсов радиус* атома. Это обусловлено тем, что степень отталкивания увеличивается очень резко, по мере того как два таких атома сближаются друг с другом на малое расстояние. На расстоянии, немного большем, чем ван-дер-ваальсов радиус, любые два атома испытывают слабую силу притяжения, известную как *ван-дер-ваальсово притяжение*⁵. В результате существует некое расстояние, на котором силы отталкивания и притяжения находятся в точном равновесии и обуславливают минимум энергии взаимодействия атома первого элемента с атомом второго элемента, не связанных друг с другом химической связью (рис. 2.11).

В зависимости от намеченной цели мы будем представлять маленькие молекулы в виде линейных схем, шаростержневых или полусферических (объемных) моделей. Для сравнения молекула воды представлена всеми тремя способами на рис. 2.12. При описании очень больших молекул, таких как белки, нам зачастую придется еще более упрощать выбираемую модель для их представления (см., например, приложение 3.2, стр. 132–133).

Рис. 2.11. Зависимость ван-дер-ваальсовых сил от расстояния. Когда два атома сближаются, они сначала слабо притягиваются друг к другу, что обусловлено флуктуациями их электрических зарядов. Однако те же атомы начнут сильно отталкивать друг друга, если сойдутся слишком близко. Равновесие сил притяжения и отталкивания между ними возникает в обозначенном минимуме энергии. Этот минимум определяет расстояние между ядрами двух атомов, при котором взаимодействие между двумя нековалентно связанными атомами максимально; это расстояние есть сумма их ван-дер-ваальсовых радиусов. По определению, нулевая энергия (обозначена штриховой



⁵ В российской научной литературе ван-дер-ваальсово притяжение и ван-дер-ваальсово отталкивание чаще встречаются под общим названием ван-дер-ваальсовых сил. — Прим. пер.

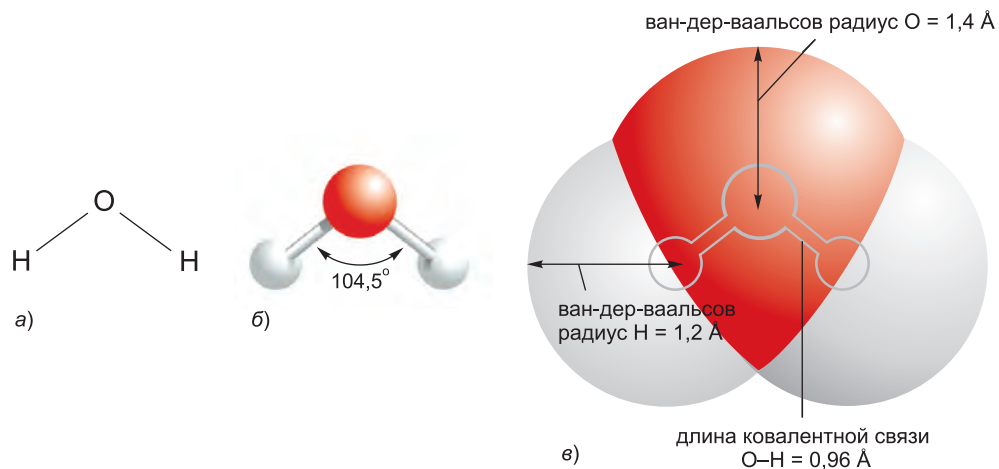


Рис. 2.12. Три способа изображения молекулы воды. а) Обычная линейная структурная формула, в которой каждый атом обозначен стандартным символом, а каждая линия представляет ковалентную связь, соединяющую два атома. б) Шаростержневая модель, в которой атомы представлены шариками произвольного диаметра, соединенными стержнями, имитирующими ковалентные связи. В отличие от формулы а, в модели такого типа углы связей представлены точно (см. также рис. 2.8). в) Полусферическая (объемная) модель, в которой точно представлены и геометрия связей, и ван-дер-ваальсовы радиусы.

2.1.6. Больше всего в клетках воды

Вода составляет около 70% массы клетки, и большинство внутриклеточных реакций протекает в водной среде. Жизнь на Земле началась в океане, и условия той первозданной окружающей среды оставили неизгладимый след в химии живых существ. Поэтому жизнь во многом зависит от свойств воды.

В каждой молекуле воды (H_2O) два атома Н связаны с атомом О ковалентными связями (см. рис. 2.12). Эти две связи очень полярны, потому что электроны сильно притягиваются атомом кислорода, тогда как водородный атом довольно слабо удерживает их. Вследствие этого в молекуле воды имеет место неравномерное распределение электронов с преобладанием положительного заряда на двух атомах водорода и отрицательного заряда на атоме кислорода (см. рис. 2.10). Когда положительно заряженная область одной молекулы воды (то есть один из ее атомов Н) приближается к отрицательно заряженной области (то есть атому О) второй молекулы воды, электростатическое притяжение между ними может приводить к образованию слабой связи, названной *водородной связью* (см. рис. 2.15). Эти связи намного слабее ковалентных и легко разрываются из-за беспорядочного теплового движения, обусловленного тепловой энергией молекул, так что каждая такая связь существует лишь короткий момент времени. Но суммарное действие множества слабых связей может вызывать далеко идущие последствия. Два водорода каждой молекулы воды могут образовать водородные связи с кислородом двух других молекул воды, в результате чего образуется сеть, в которой водородные связи непрерывно разрываются и вновь образуются (приложение 2.2, **стр. 108–109**). Именно благодаря водородным связям, которыми молекулы воды соединены друг с другом, вода при комнатной температуре является жидкостью, — причем с высокой точкой кипения и сильным поверхностным натяжением, — а не газом.

Молекулы, которые содержат полярные связи и способны образовывать водородные связи с водой (например, молекулы спиртов), легко растворяются в воде. Молекулы, несущие положительные или отрицательные заряды (ионы), также хорошо взаимодействуют с водой. Такие молекулы называют **гидрофильными**, что означает «любовь к воде». Большая доля молекул в водной среде клетки неизбежно подпадает под эту категорию, в том числе сахара, ДНК, РНК и большинство белков. **Гидрофобные** («не любящие воды») молекулы, напротив, являются незаряженными и образуют мало или вообще не образуют водородных связей, поэтому не растворяются или плохо растворяются в воде. Важный пример — углеводороды (см. приложение 2.1, **стр. 106–107**). В этих молекулах атомы Н ковалентно связаны с атомами С практически неполярными связями. В этом случае атомы Н не несут почти никакого результирующего положительного заряда, они не могут образовывать эффективные водородные связи с другими молекулами. В силу этого углеводороды в основном гидрофобны — свойство, выгодно используемое в клетках: их мембраны построены из молекул, которые имеют длинные углеводородные хвосты (подробно мы это обсудим в главе 10).

2.1.7. Некоторые полярные молекулы образуют в воде кислоты и основания

Одна из химических реакций, простейших по типу, но важнейших для клетки по значению, происходит именно в тот момент, когда молекула, содержащая сильно полярную ковалентную связь между водородом и каким-либо другим атомом, растворяется в воде. В такой молекуле атом водорода почти полностью уступил свой электрон составившему ему пару атому и, таким образом, стал напоминать почти обнаженное положительно заряженное ядро водорода — другими словами, **протон (H^+)**. Когда молекулы воды окружают полярную молекулу, протон притягивается к частично отрицательному заряду на атоме О ближайшей молекулы воды и может отделиться от своего изначального партнера, чтобы связаться вместо него с атомами кислорода молекулы воды с образованием **иона гидроксония (H_3O^+)** (**рис. 2.13, а**). Обратная реакция также происходит очень легко, так что состояние равновесия выглядит так, как будто миллиарды протонов постоянно мелькают в растворе туда и сюда, взад и вперед, от одной молекулы к другой.

Реакция того же самого типа происходит в растворе самой чистой воды. Как показано на **рис. 2.13, б**, молекулы воды постоянно обмениваются друг с другом протонами. В результате чистая вода содержит равные и очень низкие концентрации ионов H_3O^+ и OH^- , составляющие 10^{-7} моль/литр. (Концентрация H_2O в чистой воде равна 55,5 моль/литр.)

Вещества, которые высвобождают протоны с образованием ионов H_3O^+ при растворении в воде, называют **кислотами**. Чем выше концентрация H_3O^+ , тем более кислым получается раствор. По мере повышения концентрации H_3O^+ , концентрация OH^- падает согласно уравнению равновесия для воды: $[\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-] = 1,0 \cdot 10^{-14}$, где квадратные скобки обозначают перемножаемые молярные концентрации. По традиции концентрация H_3O^+ обычно упоминается как концентрация H^+ , несмотря на то что почти весь арсенал H^+ в водном растворе присутствует в виде H_3O^+ . Чтобы избежать употребления громоздких чисел, концентрацию H^+ выражают при помощи логарифмического масштаба, называемого **шкалой рН**, как показано в приложении 2.2 (**стр. 108–109**). Чистая вода имеет рН 7,0 и является нейтральной, то есть ни кислой (рН < 7,0), ни основной (рН > 7,0).

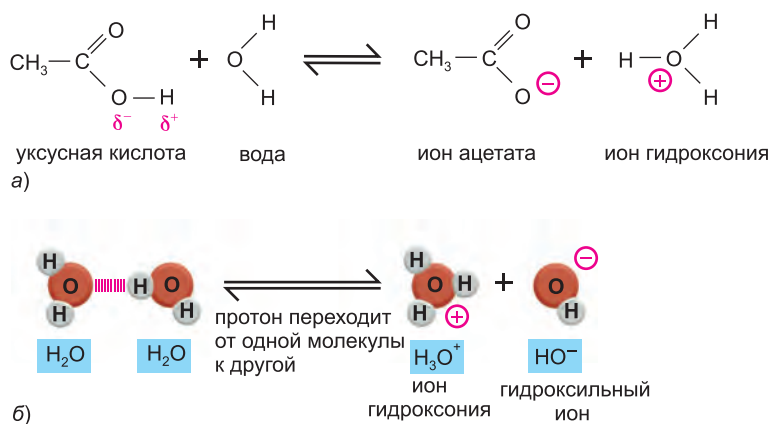


Рис. 2.13. Кислоты в воде. а) Реакция, которая имеет место, когда молекула уксусной кислоты диссоциирует в воде. б) Молекулы воды непрерывно обмениваются протонами друг с другом и образуют ион гидроксония и гидроксильный ион. Эти ионы, в свою очередь, быстро перекомпоновываются и вновь образуют молекулы воды.

Поскольку протон иона гидроксония может легко быть передан многим типам молекул и тем самым изменить их характер, потом концентрация H_3O^+ в клетке (кислотность) должна регулироваться очень точно. Внутренняя среда клетки поддерживается на уровне, близком к нейтральному, и она буферизуется за счет присутствия множества химических групп, которые могут поглощать и высвобождать протоны при нейтральных значениях pH (около 7).

Антипод кислоты — **основание**. Если определяющее свойство кислоты состоит в том, что она отдает протоны молекуле воды, с тем чтобы повысить концентрацию ионов H_3O^+ , определяющее свойство основания заключается в том, что оно принимает протоны, с тем чтобы понизить концентрацию ионов H_3O^+ и таким образом повысить концентрацию гидроксильных ионов (OH^-). Основание может либо присоединять протоны непосредственно, либо образовывать гидроксильные ионы, которые незамедлительно взаимодействуют с протонами с образованием H_2O . Таким образом, гидроксид натрия (NaOH) является основным (или *щелочным*), потому что диссоциирует в водном растворе с образованием ионов Na^+ и OH^- . Другие основания, особенно важные в живых клетках, содержат группы NH_2 , которые и забирают протон у молекулы воды: $-\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow -\text{NH}_3^+ + \text{OH}^-$.

Все молекулы, которые принимают протоны воды, будут делать это наиболее легко, когда концентрация H_3O^+ высока (кислые растворы). Аналогично молекулы, которые могут уступить протоны, делают это с большей готовностью, если концентрация H_3O^+ в растворе низка (основные растворы), и стремятся вернуть их обратно, если эта концентрация высока.

2.1.8. Четыре типа нековалентных взаимодействий удерживают молекулы как единое целое в клетке

В водных растворах ковалентные связи в 10–100 раз сильнее, чем другие силы притяжения между атомами, за счет чего связи первого типа определяют границы одной молекулы и обособляют ее от всех остальных. Но по большей части биоло-

гия зависит от специфичного связывания различных молекул друг с другом. Такое связывание опосредуется группой сил нековалентного притяжения, которые по отдельности довольно слабы, но энергии которых могут суммироваться и воплощаться в эффективной силе сцепления между двумя отдельными молекулами. Ранее мы представляли читателю троицу таких сил притяжения: электростатическое притяжение (ионные связи), водородные связи и ван-дер-ваальсовы силы. В **таблице 2.1** представлены сравнительные характеристики этих трех типов *нековалентных связей* и типичной ковалентной связи как в присутствии, так и в отсутствие воды. Ввиду их фундаментального значения во всех биологических системах, мы еще раз подытожим их свойства.

- **Силы электростатического притяжения.** Это силы притяжения между противоположно заряженными атомами. Электростатическое притяжение весьма сильно в отсутствие воды. Эти силы легко образуются между постоянными диполями, но наиболее сильны, когда два участвующих атома полностью заряжены (*ионные связи*). Однако полярные молекулы воды группируются вокруг полностью заряженных ионов и полярных молекул, которые содержат постоянные диполи (**рис. 2.14**). Это значительно снижает притяжение между такими заряженными частицами в большинстве биологических сред.
- **Водородные связи.** Структура типичной водородной связи представлена на **рис. 2.15**. Такая связь представляет собой особую форму полярного взаимодействия, где электроположительный атом водорода частично обобществлен двумя электроотрицательными атомами. Участвующий в ней водород можно рассматривать как протон, который несколько отделился от атома-донора, позволив себе частично перейти ко второму атому-акцептору. В отличие от типичного электростатического взаимодействия, такая связь имеет четко выраженную направленность в том случае, когда ядра всех трех участвующих атомов будут лежать на одной прямой линии. Как мы уже говорили, вода ослабляет эти связи за счет конкурирующих взаимодействий — образования водородных связей — с растворяемыми молекулами.
- **Силы ван-дер-ваальсова притяжения.** Электронное облако вокруг любого неполярного атома будет колебаться, образуя мерцающий диполь. Такие диполи будут кратковременно наводить противоположно поляризованный мерцающий диполь в близлежащем атоме. Такое взаимодействие вызывает очень слабое притяжение между атомами. Но в том случае, когда две поверхности точно пригнаны одна к другой, в контакте одновременно может находиться много

Таблица 2.1. Ковалентные и нековалентные химические связи

ТИП СВЯЗИ	ДЛИНА СВЯЗИ, нм	СИЛА СВЯЗИ, ккал / моль	
		В ВАКУУМЕ	В ВОДЕ
Ковалентная	0,15	90	90
Нековалентная: ионная*	0,25	80	3
водородная	0,30	4	1
ван-дер-ваальсово притяжение (на атом)	0,35	0,1	0,1

* Под ионной связью понимается электростатическое притяжение между двумя заряженными атомами.

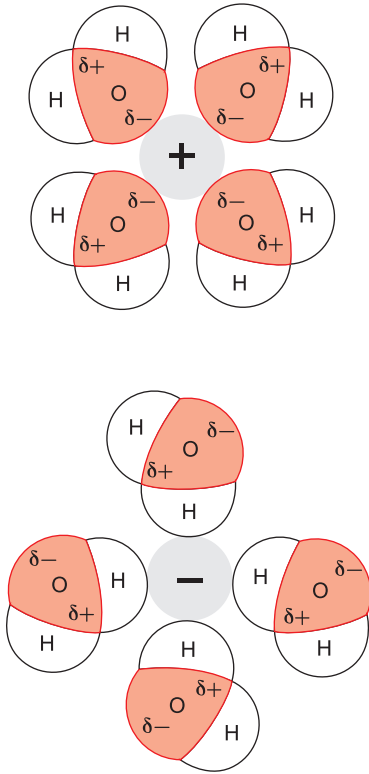


Рис. 2.14. Диполи молекул воды ориентированы таким образом, что уменьшают взаимное притяжение противоположно заряженных ионов или полярных групп.

атомов, и их общий вклад часто оказывается весьма значительным. Вода не ослабляет эти так называемые силы ван-дер-ваальсова притяжения.

Четвертый эффект, за счет которого растворенные в воде молекулы часто собираются воедино, строго говоря, вообще не является связью. Однако очень важная **сила гидрофобного взаимодействия** обусловлена выталкиванием неполярных поверхностей из испещренной водородными связями водной сети, в которой они иначе физически препятствовали бы взаимодействиям между молекулами воды. Сведение любых двух неполярных поверхностей воедино уменьшает их контакт с водой; в этом смысле данная сила является неспецифичной. Тем не менее, как мы увидим в главе 3, гидрофобные силы имеют определяющее значение для надлежащего сворачивания белковых молекул.

В приложении 2.3 приведен краткий обзор всех только что описанных сил притяжения четырех типов. На **рис. 2.16** схематично показано, как такого рода взаимодействия могут складываться и за счет

этого скреплять взаимно соответствующие поверхности двух макромолекул, при том что само по себе каждое отдельно взятое взаимодействие было бы слишком слабым даже при сопоставлении с тепловым движением молекул.

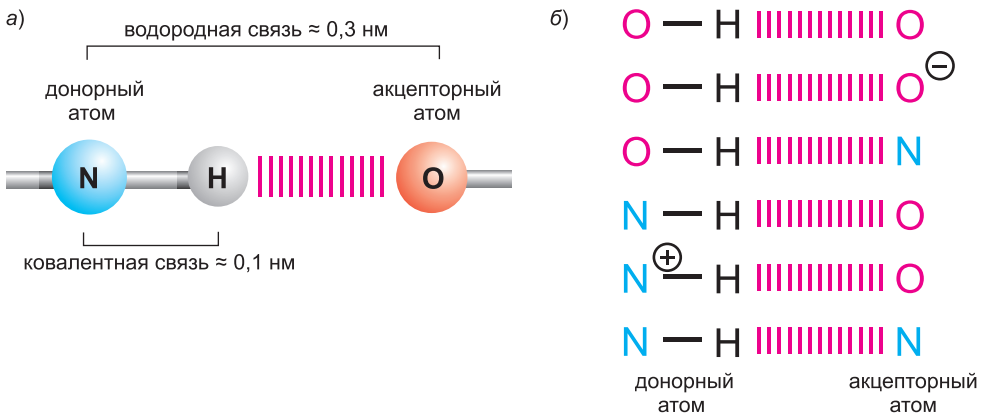


Рис. 2.15. Водородные связи. а) шаростержневая модель типичной водородной связи. Расстояние между атомами водорода и кислорода здесь меньше, чем сумма их ван-дер-ваальсовых радиусов, что указывает на частичное обобществление электронов. б) Наиболее распространенные водородные связи в клетках.

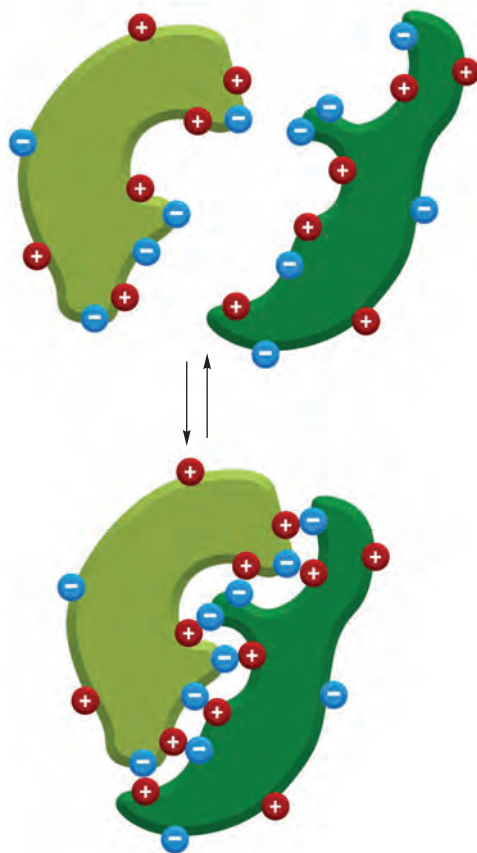
Рис. 2.16. Схематичное представление принципа, согласно которому две макромолекулы с комплементарными поверхностями могут прочно связаться друг с другом посредством нековалентных взаимодействий.

2.1.9. Клетка образована из соединений углерода

Охватив мысленным взором возможные способы объединения атомов в маленькие молекулы и поговорив о манерах поведения этих молекул в водной среде, мы теперь рассмотрим главные классы маленьких молекул, находящихся в клетках, и обсудим их индивидуальные биологические роли. Нам предстоит увидеть, что все необычайное богатство форм и характеров поведения, являемое нам живыми существами, порождается молекулами лишь нескольких основных категорий, образованными из горстки различных элементов.

Если не учитывать воду и неорганические ионы типа калия, то можно сказать, что почти все молекулы клетки образованы на основе углерода. Углерод сильно выделяется из ряда всех элементов благодаря своей способности образовывать большие молекулы; кремний в этом отношении стоит далеко позади. Благодаря малому размеру и наличию четырех электронов и четырех вакансий на внешней оболочке, атом углерода способен образовывать четыре ковалентные связи с другими атомами. Что более важно, один атом углерода может соединяться с другими атомами углерода через очень устойчивые ковалентные связи С—С с образованием цепей и колец и, следовательно, больших и сложных молекул — без обозримого верхнего предела в размере (см. приложение 2.1, [стр. 106–107](#)). Маленькие и большие соединения углерода, синтезированные клетками, называют *органическими молекулами*.

Некоторые сочетания атомов, такие как метильная ($-\text{CH}_3$), гидроксильная ($-\text{OH}$), карбоксильная ($-\text{COOH}$), карбонильная ($-\text{C}=\text{O}$), фосфатная ($-\text{PO}_3^{2-}$), сульфгидрильная ($-\text{SH}$) и амино- ($-\text{NH}_2$) группы, часто встречаются в составе органических молекул. Каждая такая **химическая группа** обладает отличительными химическими и физическими свойствами, которые влияют на поведение молекулы, в состав которой она входит. Наиболее распространенные химические группы и некоторые из их свойств подытожены в приложении 2.1, [стр. 106–107](#).



2.1.10. Клетка содержит четыре основных класса маленьких органических молекул

Маленькие органические молекулы клетки представлены соединениями на основе углерода, обладающими молекулярной массой в диапазоне 100–1000 дальтон и содержащими до 30 или около того атомов углерода. Обычно они встречаются в свободном виде в растворе и у них различные предназначения. Одни используются в качестве *мономерных* субъединиц для построения гигантских полимерных *макромолекул* клетки — белков, нуклеиновых кислот и крупных полисахаридов. Другие служат источниками энергии и подвергаются расщеплению и преобразованию в другие маленькие молекулы в лабиринте внутриклеточных метаболических путей. Многие маленькие молекулы играют не одну, а несколько ролей в клетке, например, выступая и как потенциальная субъединица для макромолекулы, и как источник энергии. Малые органические молекулы намного менее многочисленны, чем органические макромолекулы, и составляют лишь около одной десятой от общей массы органического вещества клетки (**таблица 2.2**). Судя по приближенным оценкам, в типичной клетке может находиться до тысячи разных видов таких малых молекул.

Все органические молекулы синтезируются из набора простых соединений и расщепляются в такой же набор. Как синтез, так и расщепление органических молекул проходит последовательный ряд ограниченных химических изменений, которые подчиняются определенным правилам. Вследствие этого находящиеся в клетке соединения родственны в химическом отношении и в большинстве своем могут быть выделены в несколько классов. Если размахнуться широко, то можно говорить в общих чертах, что клетки содержат четыре основных класса малых органических молекул: *сахара, жирные кислоты, аминокислоты и нуклеотиды* (**рис. 2.17**). Хотя многие соединения, имеющиеся в клетках, составляют значительную долю ее массы, они не попадают в эти категории: вышеупомянутые четыре класса малых органических молекул наряду с макромолекулами, образованными путем соединения этих малых молекул в длинные цепи (см. таблицу 2.2).

2.1.11. Сахара — источники энергии для клеток и субъединицы полисахаридов

Простейшие **сахара** — *моносахариды* — представляют собой соединения с общей формулой $(\text{CH}_2\text{O})_n$, где n обычно равно 3, 4, 5, 6, 7 или 8. Сахара, как и состоящие из них молекулы, также называют *углеводами*, что отражает их нехитрую

Таблица 2.2. Соединения, из которых образована бактериальная клетка

	ДОЛЯ В КЛЕТКЕ, % ОТ ОБЩЕЙ МАССЫ	ЧИСЛО ТИПОВ МОЛЕКУЛ ДАННОГО КЛАССА
Вода	70	1
Неорганические ионы	1	20
Сахара и предшественники	1	250
Аминокислоты и предшественники	0,4	100
Нуклеотиды и предшественники	0,4	100
Жирные кислоты и предшественники	1	50
Другие малые молекулы	0,2	≈ 300
Макромолекулы (белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды)	26	≈ 3 000

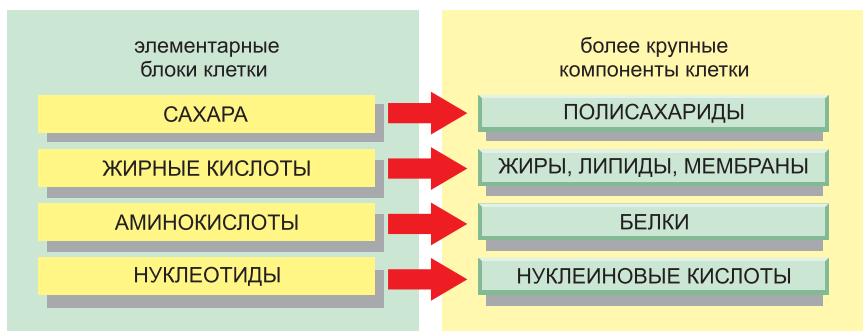


Рис. 2.17. Четыре главных класса малых органических молекул в клетках. Эти маленькие молекулы образуют мономерные компоновочные блоки, или субъединицы, для «строительства» большинства макромолекул и других компонентов клетки; причем сахара и жирные кислоты являются также источниками энергии.

общую формулу. Глюкоза, например, имеет формулу $C_6H_{12}O_6$ (рис. 2.18). Такая формула, однако, не определяет молекулу полностью: из одного и того же набора

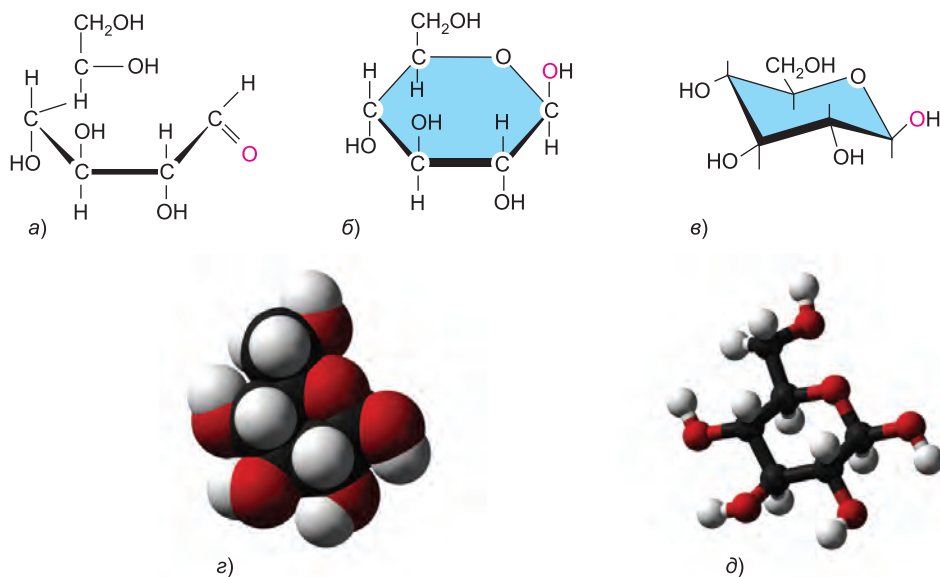
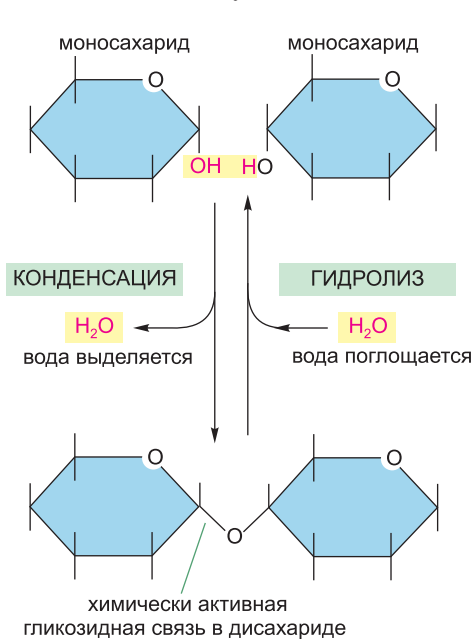


Рис. 2.18. Структура простого сахара глюкозы. Как было ранее показано для воды (см. рис. 2.12), любая молекула может быть изображена несколькими способами. В структурных формулах, представленных на видах *а*, *б* и *в*, атомы показаны в виде химических символов, соединенных линиями, изображающими ковалентные связи. Утолщенные линии здесь используются, чтобы указать плоскость сахарного кольца, в попытке подчеркнуть тот факт, что группы $-H$ и $-OH$ не находятся в той же плоскости, что и кольцо. *а*) Форма открытой цепи этого сахара, которая находится в равновесии с более устойчивой циклической, или кольцевой, формой, представленной на виде *б*. *в*) Форма кресла — альтернативный способ изображения циклической молекулы, который более точно отражает геометрию, чем структурная формула *б*. *г*) Полусферическая (объемная) модель, в которой, как и при изображении трехмерного расположения атомов, используются ван-дер-ваальсовы радиусы, чтобы показать контуры поверхности молекулы. *д*) Шаростержневая модель, в которой показано трехмерное расположение атомов в пространстве. (H — белый; C — черный; O — красный.)

атомов углерода, водорода и кислорода можно составить, соединяя их друг с другом ковалентными связями, множество разнообразных сочетаний, создавая структуры с различными формами. Как показано в приложении 2.4 (стр. 112–113), глюкоза, например, может быть преобразована в другой сахар — маннозу или галактозу — путем простой смены ориентации определенных групп OH по отношению к остальной части молекулы. Каждый из этих сахаров, более того, может существовать в одной из двух форм, названных D-формой и L-формой, которые являются зеркальным отражением друг друга. Группы молекул с одной и той же химической формулой, но разными структурами, называют *изомерами*, а подгруппу таких молекул, которые являются парами зеркальных отражений, называют *оптическими изомерами*. Изомеры широко распространены среди органических молекул в целом и играют главную роль в существовании огромного многообразия сахаров.

На вклейке 2.4 представлен краткий обзор структуры и химии сахаров. Сахара могут существовать в виде колец или в виде раскрытых цепей. В форме открытой цепи сахара содержат ряд гидроксильных групп и одну альдегидную ($\text{H}-\text{C}=\text{O}$) или кетогруппу ($=\text{C}=\text{O}$). Эта альдегидная группа или кетогруппа играет особую роль. Во-первых, она может реагировать с гидроксильной группой в той же молекуле с замыканием этой молекулы в кольцо; в циклической форме единственный углерод — исходной альдегидной или кетогруппы — связан с двумя атомами кислорода. Во-вторых, как только кольцо замкнулось, этот самый атом углерода может далее связаться через кислород с одним из атомов углерода, несущих гидроксильную группу на другой молекуле сахара. В результате этого образуются *дисахариды* типа сахарозы, которая состоит из глюкозной и фруктозной субъединиц. Более крупные сахарные полимеры выстраиваются в ряд от *олигосахаридов* (трисахариды, тетрасахариды и так далее) до гигантских *полисахаридов*, которые могут содержать тысячи моносахаридных единиц.

Способ, которым сахара соединяются друг с другом при образовании полимеров, иллюстрирует некоторые общие особенности образования биохимических связей.



Связь образуется между группой $-\text{OH}$ одного сахара и группой $-\text{H}$ другого в ходе **реакции конденсации**, в результате чего высвобождается молекула воды (рис. 2.19). Субъединицы других биологических полимеров, таких как нуклеиновые кислоты и белки, также связаны между со-

Рис. 2.19. Реакция между двумя моносахаридами, в результате которой образуется дисахарид. Эта реакция относится к так называемым *реакциям конденсации*, в которых две молекулы соединяются в результате потери молекулы воды. Обратную реакцию (в которой вода присоединяется) называют *гидролизом*. Обратите внимание, что реагирующий углерод, с которым образуется новая связь (на моносахариде *слева*), — это углерод, связанный с двумя атомами кислорода в результате формирования сахарного кольца (см. рис. 2.18). Как указано на рисунке, такая ковалентная связь между двумя молекулами сахаров известна как *гликозидная связь* (см. также рис. 2.20).

бой как продукты реакций конденсации, прошедших с выделением воды. Связи, образовавшиеся в результате таких реакций конденсации, могут быть разорваны обратным процессом, который называется **гидролиз**, в котором молекула воды расходуется (см. рис. 2.19).

Поскольку все моносахариды имеют несколько свободных гидроксильных групп, которые могут образовать связь с другим моносахаридом (или с каким-либо иным соединением), полимеры сахаров могут быть разветвленными и число возможных структур для полисахаридов необычайно велико. Даже простой дисахарид, состоящий из двух единиц глюкозы, может существовать в одиннадцати различных разновидностях (рис. 2.20), тогда как три разные гексозы ($C_6H_{12}O_6$) могут соединяться в различных сочетаниях и образовывать несколько тысяч трисахаридов. По этой причине определение взаимного пространственного расположения сахаров в полисахариде является намного более сложной задачей, чем определение по-

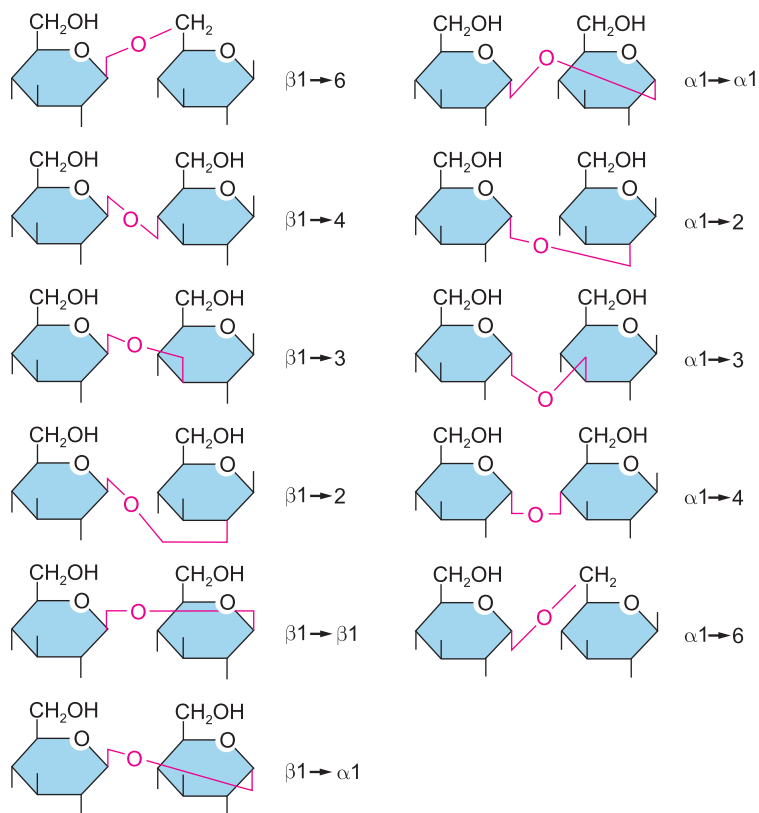


Рис. 2.20. Одиннадцать дисахаридов, состоящих из двух мономеров D-глюкозы. Отличаясь лишь типом связи между двумя звеньями глюкозы, эти дисахариды химически различны. Так как олигосахариды, связанные с белками и липидами, могут иметь шесть и более различных сахаров, соединенных как в линейном порядке, так и в разветвленном положении посредством гликозидных связей, таких, как показаны здесь, число различных типов олигосахаридов, которые могут использоваться клеткой, чрезвычайно велико. Объяснение различий между α - и β -связями дано в приложении 2.4 (стр. 112–113). Короткие черные линии, которые выглядят как «тупикивые», указывают положения групп $-OH$. (Красные линии показывают лишь ориентации дисахаридных связей и «углы» не подразумевают наличия дополнительных атомов.)

следовательности нуклеотидов в молекуле ДНК, где каждая единица соединена со следующей одним и тем же способом.

Важнейшим источником энергии для клеток служит моносахарид *глюкоза*. В последовательном ряду реакций она расщепляется на более мелкие молекулы, высвобождая энергию, которую клетка может использовать для выполнения полезной работы, что мы обсудим позже. В качестве энергетических хранилищ клетки используют простые полисахариды, состоящие только из глюкозных звеньев, — преимущественно *гликоген* у животных и *крахмал* у растений.

Круг функций сахаров отнюдь не ограничен выработкой и накоплением энергии. Помимо этого, они могут быть использованы, например, для построения механических опор и подложек. Так, наиболее распространенное на Земле органическое вещество — *целлюлоза* клеточных стенок растений — представляет собой полисахарид глюкозы. Поскольку межглюкозные связи в целлюлозе так или иначе отличаются от таковых в крахмале и гликогене, люди не способны переваривать целлюлозу и использовать составляющую ее глюкозу. Другое необычайно распространенное органическое вещество — *хитин* наружных скелетов насекомых и клеточных стенок грибов — также является «неудобоваримым» полисахаридом: в данном случае это линейный полимер производного глюкозы, называемого N-ацетилглюкозамином (см. приложение 2.4). Другие полисахариды служат основными компонентами слизи, хрящей и различных секретов.

Меньшие по размеру олигосахариды могут быть ковалентно связаны с белками, образуя гликопротеины, и с липидами с образованием *гликолипидов*, причем как первые, так и вторые входят в состав клеточных мембран. Как описано в главе 10, поверхности большинства клеток облечены и убраны гликопротеинами и гликолипидами, унизывающими клеточную мембрану. Боковые цепи сахаров в этих молекулах часто избирательно опознаются другими клетками. И различия между людьми, основанные на особенностях строения сахаров на поверхности клеток, легли в основу классификации четырех основных групп крови человека, названных А, В, АВ и О.

2.1.12. Жирные кислоты – компоненты клеточных мембран, а также источники энергии

Молекула жирной кислоты, такой как *пальмитиновая кислота*, имеет две химически различные области (рис. 2.21). Одна из них — длинная углеводородная цепь, которая является гидрофобной и не очень активна химически. Вторая — карбоксильная группа ($-\text{COOH}$), которая проявляет кислотные свойства (карбоновой кислоты): она ионизируется в растворе ($-\text{COO}^-$), чрезвычайно гидрофильна и химически активна. В клетке почти все молекулы жирных кислот своими карбоксильными группами ковалентно связаны с другими молекулами.

Углеводородный хвост пальмитиновой кислоты *насыщен*: он не имеет двойных связей между атомами углерода и содержит максимально возможное число атомов водорода. Стеариновая кислота — еще один представитель обычных жирных кислот в животном жире — также насыщена. Некоторые другие жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, имеют *ненасыщенные* хвосты с одной и более двойными связями, рассредоточенными по длине. Двойные связи создают в молекулах перегибы, нарушающие их способность формировать плотную упаковку. Именно этим и объясняется различие между твердым маргарином (насыщенным) и жидкими растительными маслами (полиненасыщенными). Множество различных жирных

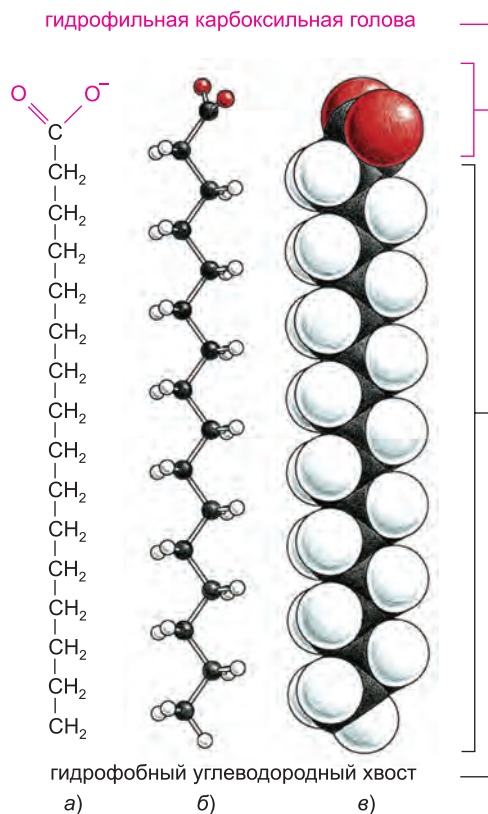
Рис. 2.21. Жирная кислота. Жирная кислота состоит из гидрофобной углеводородной цепи, к которой присоединена гидрофильная карбоксильная группа. Здесь показана пальмитиновая кислота. Различные жирные кислоты имеют разные углеводородные хвосты. а) Структурная формула. Карбоксильная группа показана в ионизированной форме. б) Шаростержневая модель. в) Полусферическая (объемная) модель.

кислот, присутствующих в клетках, различаются длиной своих углеводородных цепей, а также числом и положением углерод-углеродных двойных связей (см. приложение 2.5, **стр. 114–115**).

Жирные кислоты запасаются в цитоплазме многих клеток в форме капелек из молекул *триацилглицерина* (часто называют *триглицеридами*), которые состоят из трех цепей жирных кислот, присоединенных к молекуле глицерина (см. приложение 2.5); эти молекулы — животные жиры, присутствующие в мясе, масле и сливках, и растительные масла, такие как кукурузное и оливковое масло. Когда клетке требуется энергия, цепи жирных кислот высвобождаются из триацилглицеринов и расщепляются до двууглеродных структурных единиц. Эти двууглеродные звенья тождественны субъединицам, получаемым при расщеплении глюкозы, и они вступают в те же протекающие с выделением энергии реакции, что будут описаны позже в этой главе. Триглицериды служат концентрированным запасом пищи в клетках, потому что они могут быть расщеплены с получением приблизительно в шесть раз большего количества полезной энергии, чем можно получить из того же количества (по массе) глюкозы.

Жирные кислоты и их производные типа триацилглицеринов представляют примеры **липидов**. В число липидов входит получившая расплывчатое определение группа биологических молекул, которые нерастворимы в воде, но растворимы в жире и органических растворителях типа бензола⁶. Они, как правило, содержат либо длинные углеводородные цепи, как в жирных кислотах и терпенов, либо многочисленные связанные кольца-циклы, как в *стероидах*.

Наиболее важная функция жирных кислот в клетках состоит в построении клеточных мембран. Эти тонкие покровы (оболочки) окружают все клетки и ограждают их внутренние органеллы. Они состоят в основном из *фосфолипидов*, которые представляют собой маленькие молекулы, которые, подобно триацилглицеринам,



⁶ В таком определении вместо четкой химической характеристики класса говорится о физических свойствах липидов. На сегодня принято следующее определение липидов: «Липиды — это найденные в природе жирные кислоты, их производные и продукты метаболических превращений с преимущественным сохранением углеродного скелета.» В такой формулировке встает вопрос о принадлежности терпенов и стероидов к липидам. — *Прим. ред.*

построены главным образом из жирных кислот и глицерина. Однако в фосфолипидах к глицерину присоединены две цепи жирных кислот, а не три, как в триацилглицеринах. «Третий» участок на глицерине занимает гидрофильная фосфатная группа, которая, в свою очередь, присоединена к маленькому гидрофильному соединению, такому как холин (см. приложение 2.5). Поэтому каждая молекула фосфолипида состоит из гидрофобного хвоста двух цепей жирных кислот и гидрофильной фосфатной головки. Это придает фосфолипидам характерные физические и химические свойства, отличающие их от более гидрофобных триацилглицеринов. Такие молекулы как фосфолипиды, имеющие и гидрофобные и гидрофильные области, называют *амфифильными*.

Присущее фосфолипидам свойство образовывать мембраны обусловлено их амфифильной природой. Фосфолипиды растекаются по поверхности воды и образуют одинарный слой фосфолипидных молекул, в котором гидрофобные хвосты обращены к воздуху, а гидрофильные головки погружены в воду. Два таких молекулярных слоя могут легко объединиться в воде по принципу хвост-к-хвосту и образовать фосфолипидный «сэндвич», или **липидный бислой**. Такой бислой является структурной основой всех клеточных мембран (рис. 2.22).

2.1.13. Аминокислоты — субъединицы белков

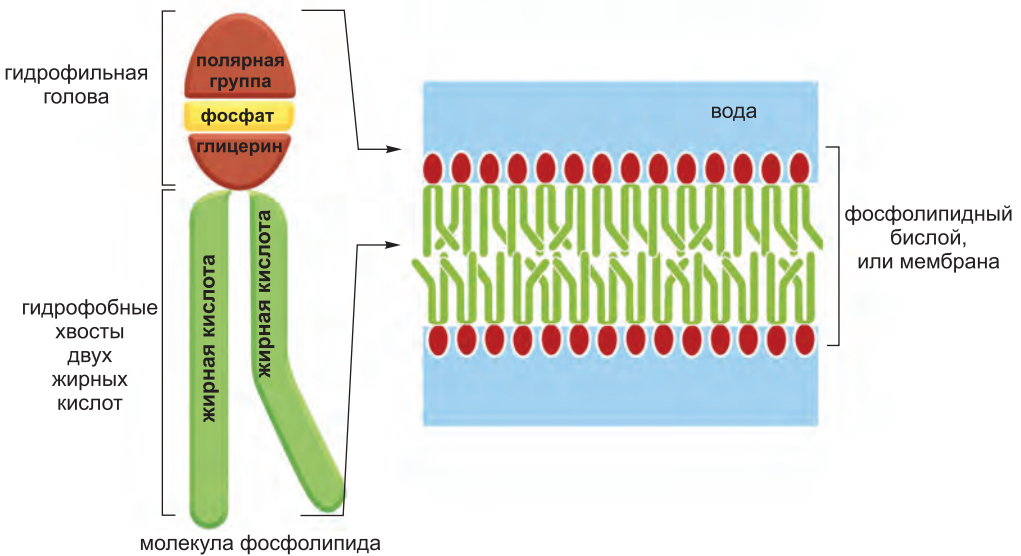


Рис. 2.22. Структура фосфолипида и ориентация в мембранах. В водной среде гидрофобные хвосты фосфолипидов собираются вместе, чтобы исключить воду. Здесь они сформировали двойной слой таким образом, что гидрофильная головка каждого фосфолипида обращена к воде. Двойные липидные слои — основа клеточных мембран, о чем мы подробно поговорим в главе 10.

Аминокислоты образуют класс разнообразных молекул с одним определяющим свойством: все они обладают карбоксильной группой и аминогруппой, которые присоединены к одному атому углерода, названному α -углеродом (рис. 2.23). Их химическое разнообразие обусловлено боковой цепью, которая также присоединена к α -углероду. Огромное значение аминокислот в клетке связано с их ролью в построении **белков**, которые являются полимерами аминокислот, соединяющихся по принципу

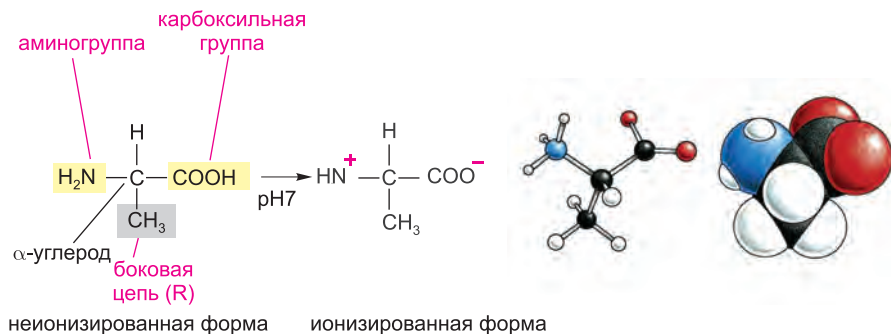


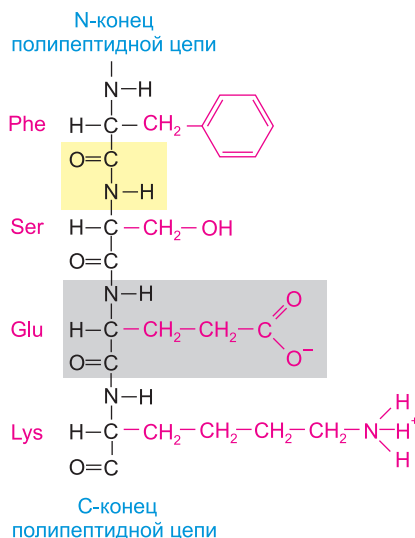
Рис. 2.23. Аминокислота аланин. а) В клетке, где значение pH близко к 7, свободная аминокислота существует в ионизированной форме; но когда она встраивается в полипептидную цепь, заряды на амино- и карбоксильной группах исчезают. б) Шаростержневая модель и в) полусферическая (объемная) модель молекулы аланина (H — белый; C — черный; O — красный; N — синий).

голова-к-хвосту в длинную цепь, которая затем свертывается в трехмерную структуру, уникальную для белка каждого типа. Ковалентные связи между двумя смежными аминокислотами в белковой цепи образуют амид (см. приложение 2.1) и зовутся **пептидными связями**; цепь аминокислот известна также под названием *полипептид* (рис. 2.24). Независимо от специфических аминокислот, из которых состоит полипептид, он имеет аминогруппу (NH₂) на одном конце (его *N-конец*) и карбоксильную группу (COOH) на другом конце (его *C-конец*). Это придает ему определенную направленность — структурную (в отличие от электрической) полярность.

Каждая из 20-ти аминокислот, обычно входящих в белки, имеет уникальную для своего типа боковую цепь, присоединенную к атому α-углерода (см. приложение 3.1, стр. 128–129). Все организмы, будь то бактерии, археи, растения или животные, имеют белки, построенные из одних и тех же 20-ти аминокислот. Каким образом этот точно установленный набор из 20-ти элементов был избран, является одной из необъяснимых тайн эволюции жизни; нет никакой очевидной с точки зрения химии причины, по которой другие аминокислоты не могли бы сослужить такую же службу. Но как только данный выбор утвердился, он уже не мог быть изменен — слишком многое от него зависело.

Подобно сахарам, все аминокислоты, кроме глицина, существуют в виде оптических изомеров в D- и L-форме (см. приложение 3.1). Но в состав

Рис. 2.24. Небольшая часть белковой молекулы. Четыре показанные аминокислоты соединены друг с другом тремя пептидными связями, одна из которых выделена желтым. Одна из аминокислот оттенена серым. Боковые цепи аминокислот показаны красным. Два конца полипептидной цепи химически различны. Один конец, N-конец, оканчивается аминогруппой, а другой, C-конец, — карбоксильной группой. Последовательность всегда читается со стороны N-конца; следовательно, в данном примере представлена последовательность Phe-Ser-Glu-Lys.



ве белков непременно встречаются только L-формы (хотя D-аминокислоты входят в состав стенок бактериальных клеток и некоторых антибиотиков). Первопричина такого исключительного использования L-аминокислот в построении белков — еще одна необъяснимая загадка эволюции.

Химическая универсальность этих 20-ти аминокислот существенна для функции белков. Пять из этих 20-ти аминокислот имеют боковые цепи, которые способны образовывать ионы в нейтральном водном растворе и, таким образом, могут нести заряд (рис. 2.25). Другие незаряжены; некоторые полярны и гидрофильны, а не-

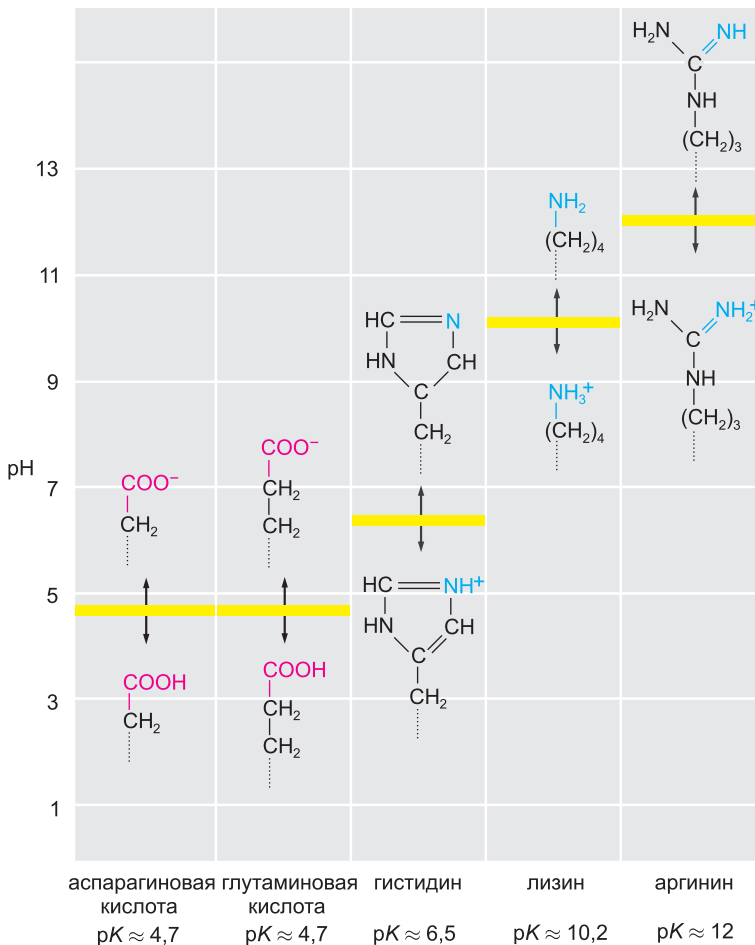


Рис. 2.25. Заряд боковых цепей аминокислот зависит от рН. Показано пять различных боковых цепей, которые могут нести заряд. Карбоновые кислоты могут легко потерять H^+ в водном растворе и образовать отрицательно заряженный ион, который обозначают суффиксом «ат», как например, в названиях аспарат или глутамат. Схожая ситуация имеет место у аминов, которые в водном растворе могут принять H^+ и образовать положительно заряженный ион (который не имеет специального названия). Эти реакции быстро обратимы, и количества двух возможных форм — заряженной и незаряженной — зависят от рН раствора. При высоком рН карбоновые кислоты имеют тенденцию быть заряженными, а амины — незаряженными. При низком рН происходит обратное: карбоновые кислоты не заряжены, а амины заряжены. Значение рН, при котором ровно половина остатков карбоновых кислот или аминов заряжена, известно как pK боковой цепи аминокислоты (обозначено желтой полосой).

В клетке рН близко к 7, так что почти все карбоновые кислоты и амины заряжены.

которые неполярны и гидрофобны. Как мы покажем в главе 3, свойства боковых цепей аминокислот лежат в основе разнообразных и сложных функций белков.

2.1.14. Нуклеотиды — субъединицы ДНК и РНК

Нуклеотид — молекула, состоящая из содержащего азот циклического соединения, связанного с сахаром-пентозой, который, в свою очередь, несет одну или несколько фосфатных групп (приложение 2.6, стр. 116–117). Пятиуглеродный сахар может быть представлен либо рибозой, либо дезоксирибозой. Нуклеотиды, содержащие рибозу, известны как рибонуклеотиды, а те, что содержат дезоксирибозу, — как дезоксирибонуклеотиды. Содержащие азот циклические соединения обычно упоминаются как *основания* по историческим причинам: в кислых условиях каждое из них может связывать H^+ (протон) и таким образом повышать концентрацию ионов OH^- в водном растворе. Между различными основаниями существует сильное «семейственное сходство». *Цитозин (C)*, *тимин (T)* и *урацил (U)* называют пиримидинами, потому что все они суть производные шестичленного пиримидинового кольца; *гуанин (G)* и *аденин (A)* — соединения *пурина*, и в их молекулах присутствует второе, пятичленное, кольцо, примыкающее к шестичленному. Каждый нуклеотид получил название по имени основания, которое он содержит (см. приложение 2.6).

Нуклеотиды могут выступать в роли краткосрочных носителей химической энергии. И в первую очередь это рибонуклеотид **аденозинтрифосфат**, или **АТФ (adenosine triphosphate)** (рис. 2.26), который переносит энергию в сотнях различных внутриклеточных реакций. АТФ образуется в результате реакций, которые подпитываются энергией, высвобождаемой в ходе окислительного расщепления пищевых продуктов. Входящие в состав молекулы АТФ три фосфата связаны последовательно в ряд двумя *фосфоангидридными связями*, при разрыве которых высвобождается большое количество полезной энергии. Концевая фосфатная группа особенно часто отщепляется путем гидролиза, при этом зачастую фосфат переносится на другие молекулы и высвобождается энергия, которая идет на энергопотребляющие реакции биосинтеза (рис. 2.27). Другие нуклеотидные производные служат носителями для переноса других химических групп, как будет описано позже.

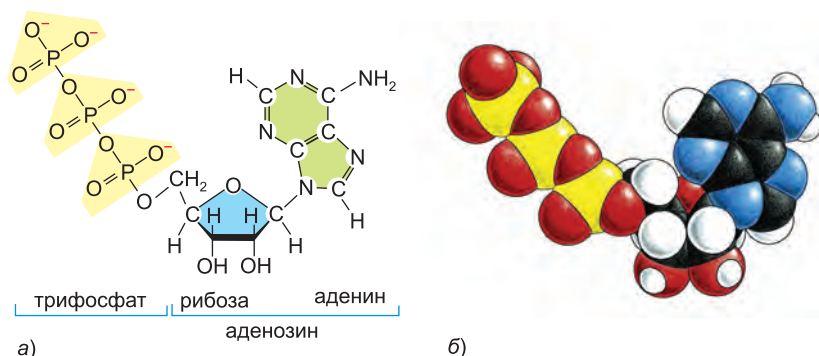


Рис. 2.26. Химическая структура аденозинтрифосфата (АТФ). а) Структурная формула. б) Полусферическая (объемная) модель. В модели б цвета атомов следующие: С — черный; N — синий; H — белый; O — красный; P — желтый.

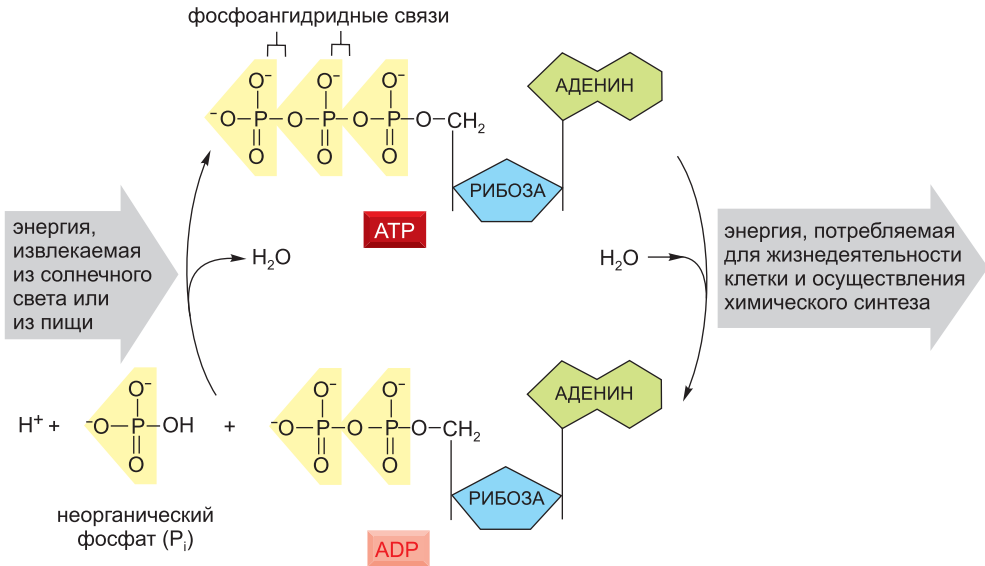
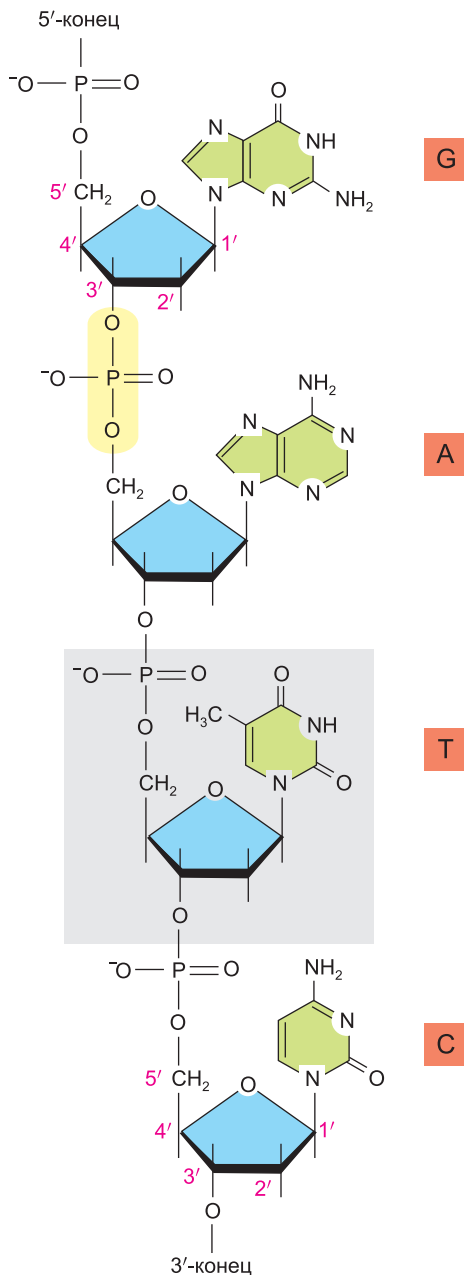


Рис. 2.27. Молекула АТФ служит переносчиком (и носителем) энергии в клетках. «Энергопотребляющая» реакция образования АТФ из АДФ (аденозиндифосфата) и неорганического фосфата сопряжена с «энерговывделяющим» окислением пищевых продуктов (в клетках животных, грибов и некоторых бактерий) или с поглощением световой энергии (в клетках растений и некоторых бактерий). Гидролиз же АТФ обратно на АДФ и неорганический фосфат, в свою очередь, обеспечивает энергией многие реакции, протекающие в клетке.

Однако самая наиважнейшая роль нуклеотидов в клетке — это хранение и привлечение биологической информации. Нуклеотиды служат как бы строительными блоками для построения *нуклеиновых кислот* — длинных полимеров, в которых нуклеотидные субъединицы ковалентно связаны друг с другом **фосфодиэфирными связями**, образующимися между фосфатной группой одного нуклеотида и гидроксильной группой сахара следующего нуклеотида (**рис. 2.28**). Цепи нуклеиновых кислот синтезируются из богатых энергией нуклеозидтрифосфатов путем реакции конденсации, в ходе которой при образовании фосфодиэфирной связи высвобождается неорганический пирофосфат.

Существует два главных типа нуклеиновых кислот, отличающихся сахаром в сахарофосфатном остове. Те, что построены на основе сахара *рибозы*, известны как **рибонуклеиновые кислоты**, или **РНК**, и обычно содержат основания А, G, C и U. Те, что синтезируются на основе *дезоксирибозы* (в которой гидроксильная группа в позиции 2' углеродного кольца рибозы заменена водородом), известны как **дезоксирибонуклеиновые кислоты**, или **ДНК**, и содержат основания А, G, C и T (T химически подобен U, входящему в состав РНК, и отличается лишь наличием дополнительной метильной группы в пиримидиновом кольце; см. приложение 2.6). РНК обычно встречается в клетках в виде одинарной полинуклеотидной цепи, но ДНК практически всегда представлена двухцепочечной молекулой — двойная спираль ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей, направленных антипараллельно друг другу и удерживаемых вместе водородными связями, образованными между основаниями двух цепей.

Рис. 2.28. Малая часть одной из цепей молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Показаны четыре нуклеотида. Одна из фосфодиэфирных связей, соединяющих соседние остатки нуклеотидов, выделена желтым, а один из нуклеотидов затушеван серым. Нуклеотиды соединены друг с другом фосфодиэфирными связями между определенными углеродными атомами рибозы, известными как 5'- и 3'-атомы. По этой причине один конец полинуклеотидной цепи, 5'-конец, всегда имеет свободную фосфатную группу, а другой, 3'-конец, — свободную гидроксильную группу. Линейная последовательность нуклеотидов в полинуклеотидной цепи обычно записывается в краткой форме однобуквенным кодом и всегда читается с 5'-конца. В данном примере представлена последовательность G–A–T–C.



Линейная последовательность нуклеотидов в ДНК или РНК кодирует генетическую информацию клетки. Способность оснований в различных молекулах нуклеиновых кислот узнавать друг друга и образовывать пары посредством водородных связей (так называемое *спаривание оснований*): G с C и A с T или с U — лежит в основе всей наследственности и эволюции, что мы подробнее поясним в главе 4.

2.1.15. В химии клеток господствуют макромолекулы с удивительными свойствами

По весу макромолекулы составляют наибольшую часть среди углерод-содержащих молекул в живой клетке (рис. 2.29 и таблица 2.3). Они служат основными строительными блоками, из которых построена клетка, а также являются компонентами, которые обуславливают наиболее характерные свойства живых существ. Макромолекулы клеток представляют собой полимеры, которые построены из ковалентно связанных маленьких органических молекул (называемых *мономерами*) в длинные цепи (рис. 2.30). И тем не менее они обладают примечательными свойствами, которые невозможно было бы предсказать по их простым составляющим.

Белки особенно многочисленны и многофункциональны. Они исполняют тысячи различных функций в клетках. Многие белки «служат» ферментами, то есть катализаторами, которые управляют множеством необходимых для жизнедеятельности клетки реакций образования и разрыва ковалентных связей. Ферменты

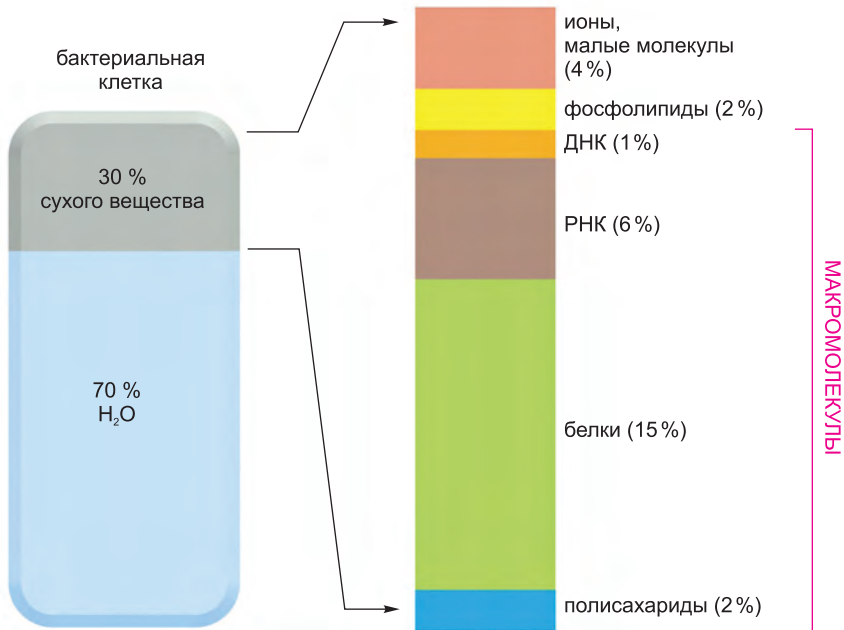


Рис. 2.29. Клетки изобилуют макромолекулами. Приблизительный состав бактериальной клетки показан в весовом соотношении; животная клетка имеет похожий состав (см. табл. 2.3).

катализируют все реакции, посредством которых клетки извлекают энергию из молекул пищи, например, фермент фотосинтезирующих организмов, названный рибулособифосфаткарбоксилазой, помогает превращать CO_2 в сахара, производя таким образом львиную долю органической материи, необходимой для жизни на Земле. Другие белки используются для построения структурных компонентов клетки, таких как тубулин (белок, который самособирается в длинные микротрубочки клетки) или гистоны (белки, которые упаковывают ДНК в хромосомах). Некоторые белки работают молекулярными двигателями по производству силы и движения — как в случае миозина в мышцах. Белки выполняют и множество других функций, и мы в дальнейшем исследуем молекулярную основу многих из них. Ну а пока мы определим некоторые общие принципы химии макромолекул, благодаря которым осуществление таких функций становится возможным.

Хотя химические реакции присоединения субъединиц к каждому из полимеров (белков, нуклеиновых кислот и полисахаридов) и отличаются при пристальном рассмотрении, все они имеют общие важные особенности. Любая полимерная цепь растет за счет присоединения мономера к концу наращиваемой полимерной цепи посредством *реакции конденсации*, в ходе которой с каждой добавляемой субъединицей происходит потеря одной молекулы воды (см. рис. 2.19). Пошаговая полимеризация мономеров в длинную цепь — простой «способ производства» крупной, сложной молекулы, так как субъединицы присоединяются в ходе одной и той же реакции, осуществляемой снова и снова одним и тем же набором ферментов. До некоторой степени данный процесс напоминает повторяющееся действие машины на фабрике — за исключением одного важного момента. Кроме

Таблица 2.3. Приблизительный химический состав типичной клетки бактерии и типичной клетки млекопитающего

КОМПОНЕНТ	ДОЛЯ ОТ ОБЩЕЙ МАССЫ КЛЕТКИ, %	
	БАКТЕРИЯ <i>E. COLI</i>	КЛЕТКА МЛЕКОПИТАЮЩЕГО
H ₂ O	70	70
Неорганические ионы (Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ и т. д.)	1	1
Разнообразные малые метаболиты	3	3
Белки	15	18
РНК	6	1,1
ДНК	1	0,25
Фосфолипиды	2	3
Прочие липиды	–	2
Полисахариды	2	2
Общий объем клетки	2·10 ⁻¹² см ³	4·10 ⁻⁹ см ³
Относительный объем клетки	1	2000

Примечание: белки, полисахариды, ДНК и РНК суть макромолекулы. Липиды обычно не классифицируют как макромолекулы, хотя они обладают некоторыми из их особенностей; например, по большей части липиды синтезируются в виде линейных полимеров меньшего размера молекулы (ацетильная группа на acetylCoA) и самособираются в более крупные структуры (мембраны). Обратите внимание, что на воду и белок приходится большая часть массы клеток, причем и у млекопитающих, и у бактерий.

некоторых полисахаридов, большинство макромолекул строится из набора мономеров, которые немного отличаются один от другого: например, 20 различных аминокислот, из которых получаются белки. Чрезвычайно важно для жизни, что полимерная цепь не собирается наугад из этих субъединиц, вместо этого необходимые субъединицы вставляются в цепь согласно заданному порядку и образуют определенную *последовательность*. Искусные механизмы, которые позволяют этому свершиться при помощи ферментов, будут подробно описаны в главах 5 и 6.

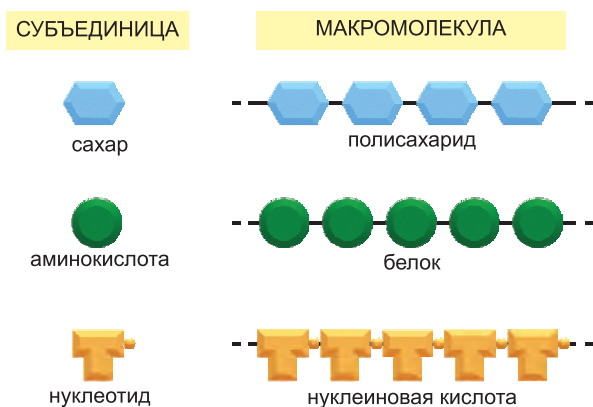


Рис. 2.30. Три класса макромолекул. Каждая молекула полимера образована из малых молекул (называемых мономерами), соединенных между собой ковалентными связями.

2.1.16. Нековалентные взаимодействия определяют как точную форму макромолекулы, так и ее способность связываться с другими молекулами

Большей частью ковалентные связи в макромолекуле допускают вращение соединяемых ею атомов, что придает полимерной цепи большую гибкость. В принципе, это позволяет макромолекуле принимать почти неограниченное число форм, или *конформаций*, так как энергия беспорядочных тепловых колебаний побуждает цепь полимера изгибаться и вращаться. Однако формы большинства биологических макромолекул строго ограничены из-за множества слабых *нековалентных связей*, которые образуются между различными частями одной и той же молекулы. Если такие нековалентные связи образуются в достаточном числе, то полимерная цепь может предпочтительно принимать одну-единственную специфическую конформацию, определяемую линейной последовательностью составляющих ее мономеров. Благодаря этому большинство белковых молекул и многие малые молекулы РНК в клетках прочно свернуты в какую-то одну предпочтительную конформацию (рис. 2.31).

Четыре известных типа нековалентных взаимодействий, значимых для биологических молекул, были описаны ранее и вкратце представлены в приложении 2.3 (стр. 110–111). Хотя сами по себе эти взаимодействия очень слабы, вкуче они способны свернуть биологические макромолекулы в уникальные формы. Кроме того, объединенными усилиями они могут также обуславливать сильное притяжение между двумя различными молекулами — когда эти молекулы очень тесно прилегают одна к другой, словно рука в перчатке. Данная форма межмолекулярного



Рис. 2.31. Большинство белков и многие молекулы РНК принимают только одну устойчивую конформацию. Если нековалентные связи, поддерживающие эту устойчивую конформацию, разрываются, то молекула превращается в гибкую цепь, которая обычно не несет никакой биологической ценности.

взаимодействия предполагает большую специфичность, ввиду того что многоточечные контакты, необходимые для сильного связывания, позволяют макромолекуле выбрать — через процедуру связывания — только одну из многих тысяч молекул других типов, присутствующих в клетке. Более того, поскольку сила связывания зависит от числа образующихся нековалентных связей, постольку возможны взаимодействия почти любой степени сродства, что допускает быструю диссоциацию в случае необходимости.

Связывание такого типа лежит в основе всего биологического катализа — осуществления ферментативных функций белками. Нековалентные взаимодействия также позволяют употреблять макромолекулы в качестве стандартных блоков при формировании более крупных структур. В клетках макромолекулы часто связываются друг с другом в громадные комплексы и образуют посредством этого искуснейшие машины, состоящие из множества перемещающихся друг относительно друга частей и выполняющие такие сложные задачи, как репликация ДНК и синтез белка (рис. 2.32).



Рис. 2.32. Малые молекулы, белки и рибосома, представленные в приближенном масштабе. Рибосомы представляют собой центральный узел аппарата, который клетка использует для «изготовления» белков: каждая рибосома состоит из комплекса приблизительно 90 макромолекул (молекулы белка и РНК).

Заключение

Живые организмы представляют собой самодостаточные и самовоспроизводящиеся химические системы. Они построены из своеобразного и ограниченного набора маленьких молекул на основе углерода, которые практически одинаковы для всех населяющих Землю видов. Каждая из таких молекул состоит из небольшого набора атомов, связанных друг с другом посредством ковалентных связей в высокоточные конфигурации. Главные же их категории представлены сахарами, жирными кислотами, аминокислотами и нуклеотидами. Сахара служат первейшим источником химической энергии для клеток и могут быть включены в полисахариды с целью запасаения энергии. Жирные кислоты также важны как хранилища энергии, но их основное предназначение — образование клеточных мембран. Полимеры, состоящие из аминокислот, — впечатляюще разнообразные и многофункциональные макромолекулы, известные как белки. Нуклеотиды играют главную роль в переносе энергии. Они являются также субъединицами для построения информационных макромолекул — РНК и ДНК.

Большая часть сухой массы клетки состоит из макромолекул, которые синтезируются в виде линейных полимеров аминокислот (белки) или нуклеотидов (ДНК и РНК), ковалентно связанных друг с другом в строгом порядке. Большинство

белковых молекул и многие молекулы РНК свернуты в уникальные конформации, которые определяются последовательностью входящих в них субъединиц. В результате процесса сворачивания (фолдинга) возникают уникальные поверхности, а зависит этот процесс от множества слабых сил притяжения, обусловленных нековалентными взаимодействиями между атомами. Это силы четырех типов: силы электростатического притяжения, водородные связи, ван-дер-ваальсовы силы и взаимодействие между неполярными гидрофобными группами. Тот же набор слабых сил управляет специфичным связыванием других молекул с макромолекулами, давая начало мириадам различных сочетаний между биологическими молекулами, что и составляет материальную основу структуры и химии клетки.

2.2. Катализ и использование энергии клетками

Благодаря одной особенности, присущей исключительно живым существам, они, на первый взгляд, почти сверхъестественно отличаются от неживой материи: они создают и поддерживают порядок во Вселенной, которая всегда стремится к всеобщему беспорядку (рис. 2.33). Чтобы создавать такой порядок, клетки в живом организме должны проводить нескончаемый поток химических реакций. В ходе некоторых из этих реакций малые органические молекулы: аминокислоты, сахара, нуклеотиды и липиды — расщепляются или видоизменяются, чтобы снабдить клетку множеством других необходимых ей маленьких молекул. В ходе других реакций эти маленькие молекулы используются для построения необычайно разнообразного множества белков, нуклеиновых кислот и других макромолекул, которые и наделяют живые системы всеми их необыкновенными, отличными от неживой материи свойствами. Каждую клетку можно рассматривать как крошечную химическую фабрику, ежесекундно выполняющую миллионы реакций.

2.2.1. Метаболизм клетки организуют ферменты

Происходящие в клетке химические реакции в обычных условиях происходили бы при гораздо более высоких температурах, чем температура внутри клеток.

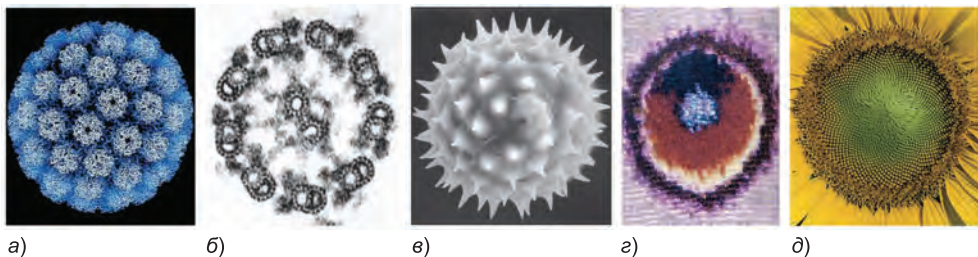


Рис. 2.33. Порядок в биологических структурах. Строго очерченные, расписные, богато украшенные и необычайно красивые пространственные структуры можно встретить на всех уровнях организации живых организмов. В порядке увеличения размера: а) белковые молекулы в оболочке вируса; б) регулярное расположение микротрубочек, видимое на поперечном срезе хвостика сперматозоида; в) очертания поверхности пыльцевого зерна (отдельная клетка); г) крупный план крыла бабочки, открывающий нашему взору узор, созданный чешуйками, где каждая чешуйка является производением одной-единственной клетки; д) спиральное расположение семян, построенных из миллионов клеток, в головке подсолнуха. (а — любезность R. A. Grant и J. M. Hogle; б — любезность L. Tilney; в — любезность C. MacFarlane и C. Jeffree; г и д — любезность K. B. Sandved.)

Вот почему для любой реакции, проходящей в клетке, необходим специфический «стимулятор» активности реагирующих компонентов. Это важнейшее требование, определяющее способность клетки управлять всеми реакциями. Такое управление осуществляется с помощью специализированных белков, называемых *ферментами*, каждый из которых ускоряет, или *катализирует*, реакции только одного из многих возможных видов реакций, которым та или иная отдельно взятая молекула могла бы подвергнуться. Катализируемые ферментами реакции обычно связаны в последовательности, так что продукт одной реакции становится исходным материалом, или *субстратом*, для следующей (рис. 2.34). Такие длинные линейные пути реакций, в свою очередь, соединяются друг с другом, образуя целый каскад взаимосвязанных реакций, которые дают клетке возможность жить, расти и воспроизводиться (рис. 2.35).

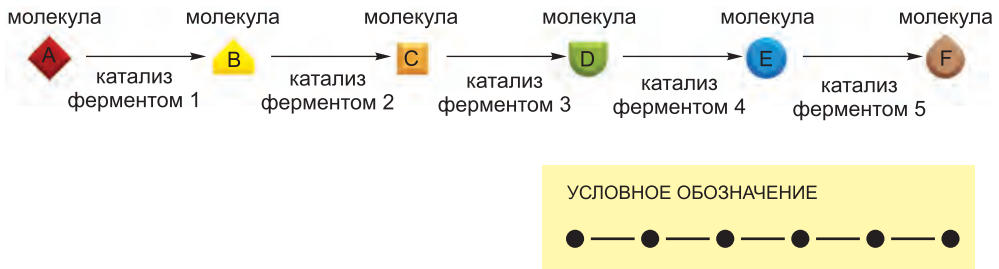


Рис. 2.34. Набор катализируемых ферментами реакций формирует метаболический путь. Каждый фермент катализирует определенную химическую реакцию, сам фермент всегда остается неизменным. В данном примере набор последовательно действующих ферментов преобразует молекулу А в молекулу F, формируя метаболический путь.

В клетках протекают два встречных друг другу потока химических реакций: 1) *катаболические* реакции расщепляют пищевые продукты на более мелкие молекулы, производя таким образом как энергию в полезной для клетки форме, так и некоторые из маленьких молекул, необходимые клетке в качестве стандартных структурных звеньев, и 2) *анаболические*, или *биосинтетические*, цепочки реакций, которые используют усвоенную в процессе катаболизма энергию для подпитки синтеза многих других молекул, образующих клетку. Вместе взятые реакции обеих категорий обеспечивают **метаболизм** клетки (рис. 2.36).

Многие моменты, связанные с метаболизмом клетки, составляют традиционный предмет *биохимии*, и нет необходимости рассматривать их здесь и сейчас. Но общие принципы, посредством которых клетки извлекают энергию из окружающей среды и используют ее для самоорганизации, занимают видное место в клеточной биологии. Мы начнем с обсуждения того, почему для поддержания жизнедеятельности живых организмов необходим постоянный приток энергии.

2.2.2. Биологический порядок возможен благодаря тому, что клетки выделяют тепловую энергию

Всеобщее стремление вещей к беспорядку выражает фундаментальный закон физики — *второе начало термодинамики*, — который гласит, что во Вселенной или в какой-либо замкнутой системе (совокупность веществ, которая полностью

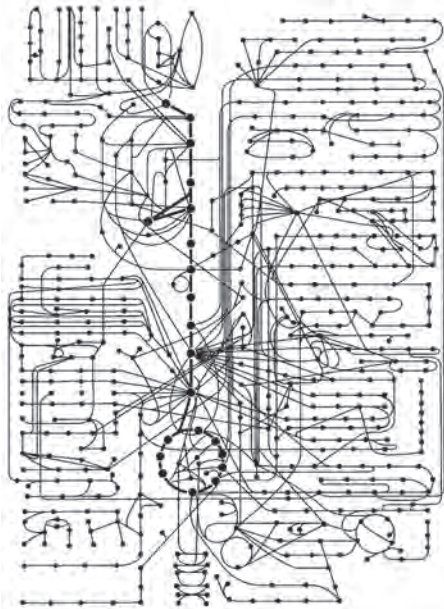


Рис. 2.35. Некоторые метаболические пути и их взаимосвязи в типичной клетке. Около 500 постоянных метаболических реакций показаны схематично, где все молекулы в метаболическом пути представлены точками, как в *желтом* прямоугольнике на рис. 2.34. Путь, который выделен на этой схеме жирными точками и соединительными линиями, — основной путь метаболизма углеводов, который будет вскоре рассмотрен.

изолирована от остальной части Вселенной) степень разупорядоченности всегда возрастает. Из этого закона вытекают столь глубокие следствия для всех живых существ, что мы позволим себе переформулировать его.

Например, мы можем представить второй закон в понятиях вероятности и провозгласить, что системы самопроизвольно изменяются в сторону таких конфигураций, которые имеют наибольшую вероятность. Если мы рассмотрим, например, ящик со 100 монетами, все из которых лежат орлами вверх, то в ходе серии событий случайных встряхиваний этого ящика первоначальное распределение монет будет неизбежно смещаться в сторону комбинации, состоящей из 50-ти орлов и 50-ти решек. Причина проста: существует бесчисленное множество возможных комбинаций монет, при которых будет достигнут результат 50/50, и только одно возможное расположение, при котором все монеты будут ориентированы орлами вверх. Поскольку смесь 50/50 представляется, таким образом, наиболее вероятной, мы говорим, что она более «разупорядоченная».

По той же самой причине мы изо дня в день наблюдаем знакомую картину — жизненное пространство (жилое помещение, рабочее место) становится все более и более беспорядочным, если не сделать волевого усилия и не навести порядок: движение к беспорядку есть *самопроизвольный процесс*, для обращения вспять которого требуется периодически затрачивать немалые усилия (рис. 2.37).

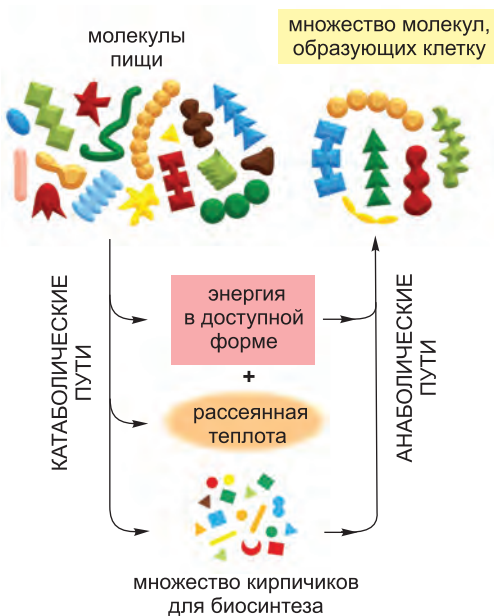


Рис. 2.36. Схематическое представление взаимосвязи между катаболическим и анаболическим путями в системе обмена веществ. Как показано на рисунке, большая часть энергии, запасенной в химических связях молекул пищи, рассеивается в виде теплоты, поэтому масса питательных веществ, необходимых любому организму, получающему всю энергию за счет катаболизма, намного больше, чем масса молекул, которые могут быть произведены в ходе анаболизма.



Рис. 2.37. Иллюстрация ежедневного самопроизвольного стремления к беспорядку. Чтобы обратить это самопроизвольное стремление к беспорядку вспять, требуется волевое усилие и вклад энергии — действия отнюдь не самопроизвольные. Фактически, согласно второму закону термодинамики, вмешательство человека высвободит во внешнюю среду известное количество теплоты, достаточное для того, чтобы компенсировать затраты энергии на перестановку предметов и наведение порядка в этой комнате.

Величина беспорядка (степень неупорядоченности) в системе может быть определена количественно и выражена через **энтропию** системы: чем сильнее беспорядок, тем больше энтропия. Таким образом, еще один способ выразить второй закон термодинамики — это сказать, что системы спонтанно изменяются в сторону конфигураций с большей энтропией.

Живые клетки — через выживание, рост и формирование сложных организмов — порождают порядок и таким образом, как может показаться, бросают вызов и противостоят второму началу термодинамики. Как же им это удается? Ответ кроется в том, что клетка не является замкнутой системой: она вбирает в себя энергию из окружающей ее среды в форме пищи или в виде фотонов, ниспосылаемых Солнцем (или даже, как у некоторых хемосинтезирующих бактерий, единственно из неорганических молекул), после чего использует эту энергию для наведения порядка внутри себя. В ходе химических реакций, которые производят порядок, клетка преобразует часть потребляемой ею энергии в теплоту. Теплота высвобождается в окружающую клетку среду и разупорядочивает ее, так что полная энтропия — энтропия клетки плюс энтропия окружающей ее среды — возрастает, как того и требуют законы термодинамики.

Чтобы понять и усвоить принципы, управляющие этими преобразованиями энергии, представим себе клетку, окруженную морем вещества, представляющего

остальную часть Вселенной. Во время своей жизни и роста клетка создает внутренний порядок. Но она постоянно выделяет тепловую энергию, по мере того как синтезирует молекулы и собирает их в клеточные структуры. Теплота представляет энергию в ее наиболее неупорядоченной форме — хаотичной толчее молекул. Когда клетка выделяет теплоту в море, она повышает в нем интенсивность движения молекул (тепловых колебаний) и увеличивает тем самым его хаотичность, или неупорядоченность. Второй закон термодинамики удовлетворен, потому что увеличение степени упорядоченности в клетке с лихвой компенсируется еще большим уменьшением упорядоченности (возрастанием энтропии) в окружающем море вещества (**рис. 2.38**).

Откуда же берется высвобождаемая клеткой теплота? Здесь мы сталкиваемся с еще одним важным законом термодинамики. *Первое начало термодинамики* гласит, что энергия может быть лишь преобразована из одной формы в другую, но никак не появиться откуда-либо и не исчезнуть куда-либо. На **рис. 2.39** представлены некоторые взаимопревращения между различными формами энергии. Количество энергии в различных формах изменяется в результате происходящих в клетке химических реакций, но первый закон говорит нам, что общее количество энергии должно всегда оставаться неизменным. Например, животная клетка впитывает питательные вещества и преобразует часть энергии, заключенной в химических связях между атомами этих молекул пищи (энергию химических связей), в беспорядочные тепловые колебания молекул (тепловую энергию). Как было описано выше, такое преобразование химической энергии в тепловую энергию является необходимым, если реакции, которые создают порядок внутри клетки, призваны привести во Вселенную в целом еще больший беспорядок.

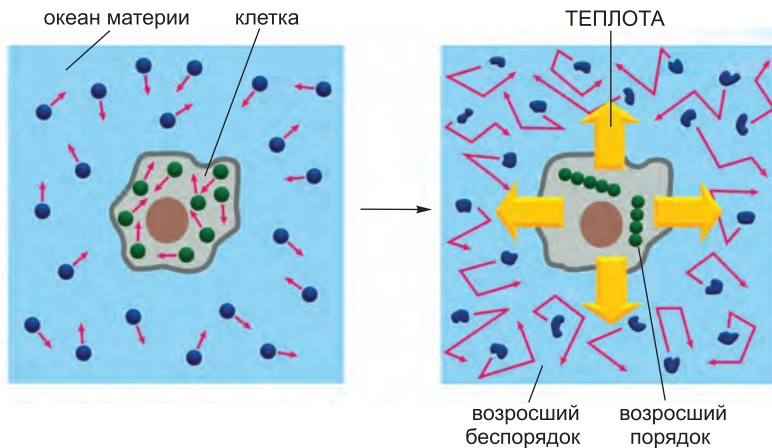


Рис. 2.38. Простейший термодинамический анализ живой клетки. На схеме слева молекулы клетки и остальной части Вселенной (океан материи) изображены в относительно неупорядоченном состоянии. На схеме справа клетка вобрала энергию из молекул пищи и высвободила теплоту в ходе реакции, которая упорядочивает молекулы, находящиеся в клетке. Поскольку теплота увеличивает беспорядок во внешней среде, окружающей клетку (ломаными стрелками и искаженными молекулами показано вызванное теплотой усилившееся движение молекул), второй закон термодинамики — который гласит, что количество беспорядка во Вселенной всегда должно возрастать, — выполняется, по мере того как клетка растет и делится. Более подробное обсуждение этого вопроса изложено в приложении 2.7 (**стр. 118–119**).

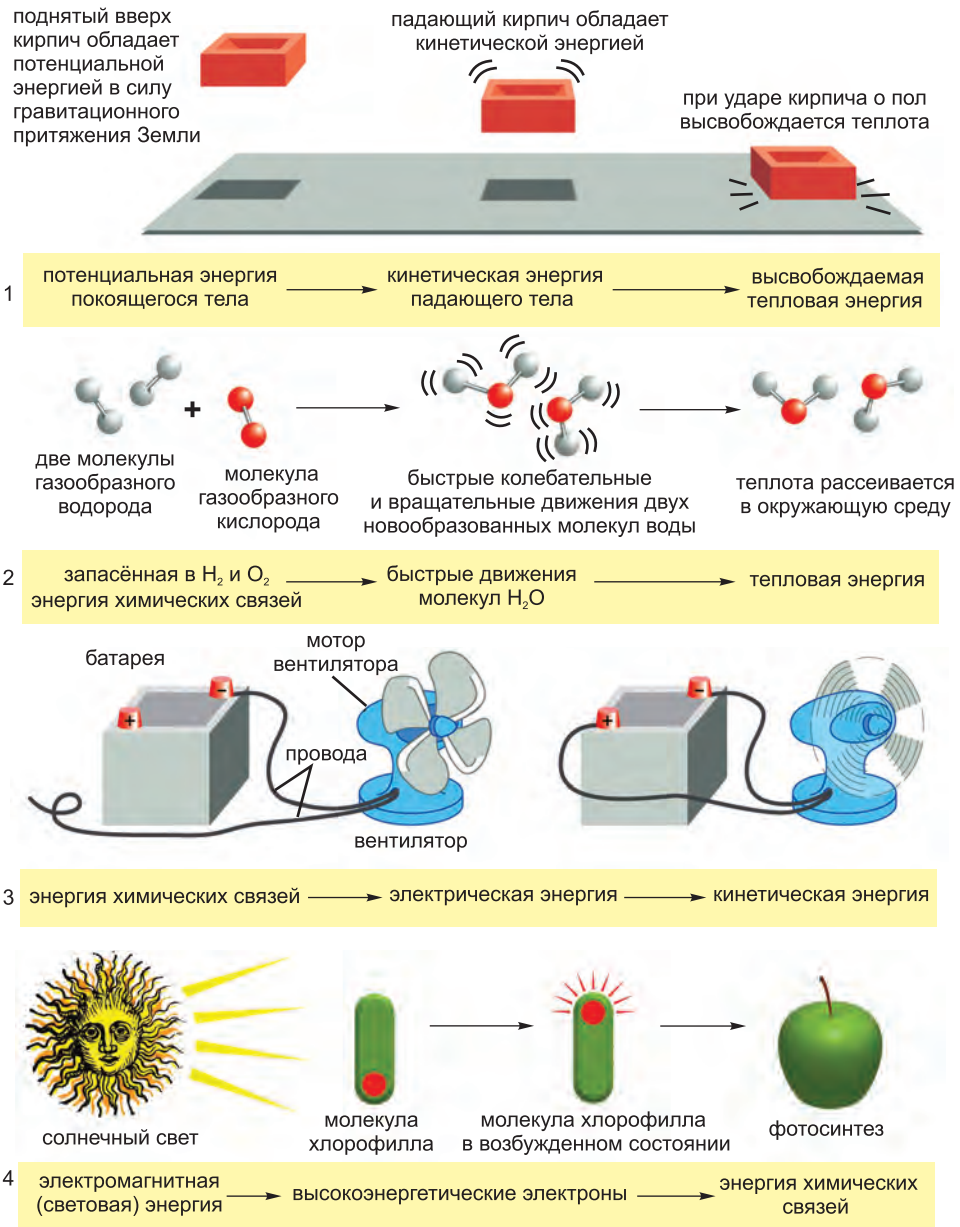


Рис. 2.39. Некоторые взаимопревращения различных форм энергии. Все формы энергии, в принципе, взаимобратимы. Во всех этих процессах общее количество энергии остается неизменным. Так, например, по высоте положения и весу кирпича на схеме 1 мы можем точно предсказать, сколько теплоты высвободится, когда кирпич ударится о пол. Обратите внимание, что на схеме 2 большое количество энергии химических связей, высвобождаемое при образовании воды, в первую очередь преобразуется в очень быстрые тепловые движения двух новообразованных молекул воды; но при столкновении с другими молекулами эта кинетическая энергия почти мгновенно равномерно распределяется в окружающей среде (теплопередача), и новые молекулы становятся неотличимыми от остальных.

Клетка не может извлечь никакой выгоды из тепловой энергии, которую она высвобождает, разве только экзотермические реакции в клетке непосредственно будут связаны с процессами, которые производят порядок на молекулярном уровне. Именно такое *сопряжение* выработки теплоты с возрастанием упорядоченности отличает метаболизм клетки от расточительного сжигания топлива. Позже мы покажем, за счет чего осуществляется такое сопряжение. На данный момент достаточно знать, что прямая связь «сжигания» молекул пищи с «рождением» биологического порядка необходима клеткам для создания и поддержания островка порядка во Вселенной, погружающейся в пучину хаоса.

2.2.3. Фотосинтезирующие организмы используют для синтеза органических молекул солнечный свет

Все животные существуют за счет энергии, запасенной в химических связях органических молекул, созданных другими организмами, которых они используют в качестве пищи. Молекулы, поступившие из пищи, поставляют также атомы, необходимые животным для строительства новой живой материи. Некоторые животные получают свою пищу, поедая других животных. Но в основании пищевой цепи животных находятся животные, которые поедают растения. Растения, в свою очередь, непосредственно улавливают энергию солнечного света. В результате первичным источником энергии, используемой животными клетками, оказывается Солнце.

Солнечная энергия поступает в живой мир благодаря **фотосинтезу**, протекающему в растениях и фототрофных бактериях. В ходе фотосинтеза электромагнитная энергия солнечного света преобразуется в энергию химических связей в клетке. Растения получают все необходимые им атомы из неорганических источников: углерод из атмосферного углекислого газа, водород и кислород из воды, азот из аммиака и нитратов почвы, а другие элементы, необходимые в меньших количествах, — из неорганических солей почвы. Энергия, которую растения получают из солнечного света, используется в клетках для построения из этих атомов сахаров, аминокислот, нуклеотидов и жирных кислот. Эти маленькие молекулы, в свою очередь, преобразуются в белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и липиды, из которых формируется растение. После того как животное съедает растение, все накопленные растением вещества становятся для животного молекулами пищи.

Реакции фотосинтеза протекают в две стадии (**рис. 2.40**). На первой стадии энергия солнечного света поглощается и временно запасается в форме энергии

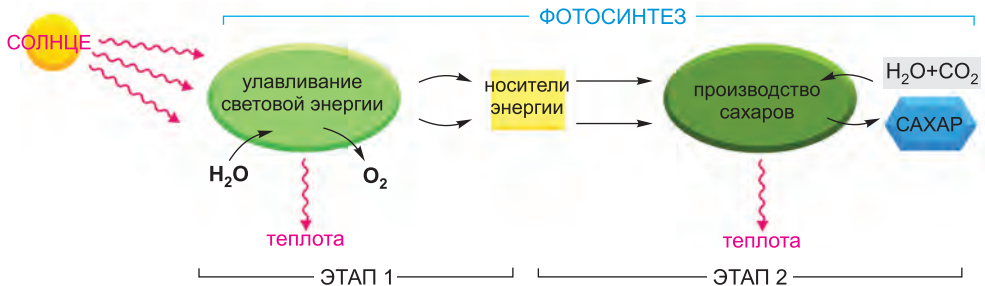
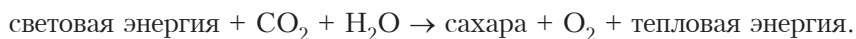


Рис. 2.40. Фотосинтез. Два этапа фотосинтеза. Носители энергии, созданные на первом этапе, представлены двумя молекулами, которым мы уделим некоторое внимание, — это ATP и NADPH.

химических связей в специализированных маленьких молекулах, которые выступают в качестве переносчиков энергии и реакционно-активных химических групп. (Такие молекулы «активированных носителей» мы обсудим позже.) Молекулярный кислород (газ O_2), образующийся в результате разложения воды на свету, высвобождается как побочный продукт этой первой стадии фотосинтеза.

На второй стадии фотосинтеза молекулы, которые служат носителями энергии, используются для осуществления энергетической подпитки процесса *усвоения углерода*, в ходе которого из углекислого газа (CO_2) и воды (H_2O) получаются сахара, тем самым пополняя доступный источник запасенной энергии химических связей и материалов как для самого растения, так и для животного, которое его съест. Изящные механизмы, лежащие в основе этих двух стадий фотосинтеза, мы опишем в главе 14.

Конечный результат всего процесса фотосинтеза, в той мере, в которой к участию в нем допущено зеленое растение, может быть подытожен в виде нехитрого уравнения:



Произведенные сахара в дальнейшем используются и как источник энергии химических связей, и как источник материалов, идущих на создание многих других маленьких и больших органических молекул, которые жизненно необходимы растительной клетке.

2.2.4. Клетки получают энергию путем окисления органических молекул

Все животные и растительные клетки питаются энергией, запасенной в химических связях органических молекул, будь то сахара, которые растение выработало путем фотосинтеза в качестве пищи для себя, или смесь больших и маленьких молекул, которую поглотило животное. Чтобы жить, расти и размножаться, организмы должны извлекать эту энергию в доступной форме. И у растений, и у животных энергия извлекается из молекул пищи в ходе процесса поэтапного окисления, или, можно сказать, управляемого сжигания.

Атмосфера Земли содержит большое количество кислорода, а в присутствии кислорода наиболее энергетически устойчивой формой углерода является CO_2 , а водорода — H_2O . Клетка поэтому может получать энергию, запасенную в сахарах или других органических молекулах, предоставляя возможность содержащимся в них атомам углерода и водорода взаимодействовать с кислородом и превращаться соответственно в CO_2 и H_2O , — этот процесс назван **дыханием**.

Фотосинтез и дыхание суть взаимно дополняющие друг друга процессы (рис. 2.41). Это означает, что далеко не все «сделки» между растениями и животными заключаются в одностороннем порядке. Растения, животные и микроорганизмы существовали на этой планете бок о бок так долго, что многие из них стали неотъемлемой частью среды обитания друг друга. Кислород, выделяемый в процессе фотосинтеза, потребляется почти всеми организмами и идет на сжигание органических молекул. А некоторые из молекул CO_2 , которые сегодня связаны в органические молекулы благодаря реакциям фотосинтеза, происходящим в зеленом листке, вчера выдохнуты в атмосферу каким-либо животным или выпущены в атмосферу в процессе дыхания гриба или бактерией, разлагающей мертвое орга-

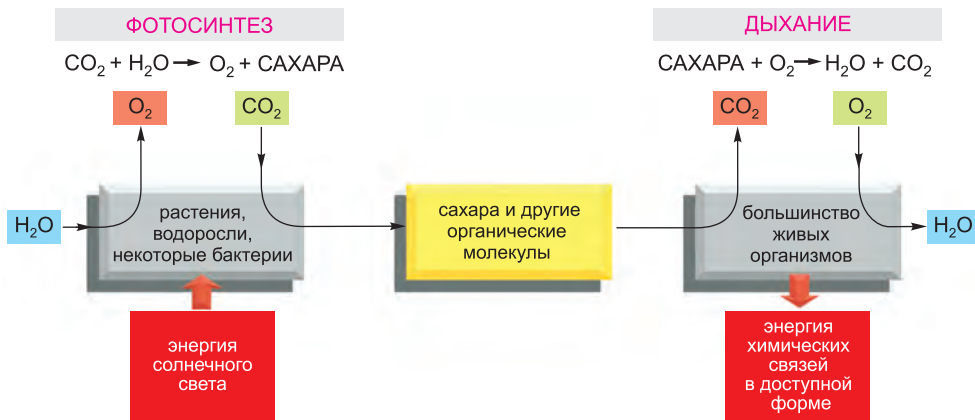


Рис. 2.41. Фотосинтез и дыхание как взаимно дополняющие друг друга процессы живого мира. При фотосинтезе энергия солнечного света используется для производства сахаров и других органических молекул. Эти молекулы, в свою очередь, служат пищей для других организмов, многие из которых осуществляют дыхание — процесс, в котором используется O_2 и образуется CO_2 из тех же атомов углерода, которые были поглощены в виде CO_2 и превращены в сахара фотосинтезом. В ходе этого процесса организмы, которые дышат, получают необходимую им для жизни энергию химических связей. Первые клетки на Земле, как думают, не могли осуществлять ни фотосинтез, ни дыхание (что нам еще предстоит обсудить в главе 14). Однако на Земле фотосинтез, должно быть, предшествовал дыханию, так как есть неопровержимые доказательства, что потребовались миллиарды лет фотосинтеза, прежде чем выделенного количества O_2 оказалось достаточно для создания атмосферы, богатой этим газом. (В настоящее время атмосфера Земли содержит 20% O_2 .)

ническое вещество. Поэтому мы видим, что усвоение углерода образует гигантский круговорот, который охватывает всю *биосферу* (все живые организмы на Земле) в целом, выходя за рамки «деловых отношений» между отдельными организмами (рис. 2.42). Подобным же образом атомы азота, фосфора и серы перемещаются между живым и неживым мирами в круговоротах, в которых участвуют растения, животные, грибы и бактерии.

2.2.5. Процессы окисления и восстановления основаны на переносе электронов

Клетка не окисляет органические молекулы за один этап, как это происходит при сгорании органического материала в огне. Благодаря ферментативным катализаторам молекулы претерпевают цепь метаболических превращений, в ходе которых лишь изредка происходят реакции прямого присоединения кислорода. Прежде чем мы рассмотрим некоторые из таких реакций и их назначение, мы поговорим о том, что понимается под процессом окисления.

Окисление не означает лишь присоединение атомов кислорода; это понятие трактуется гораздо шире — распространяется на любую реакцию, в которой электроны переносятся с одного атома на другой. Окисление в этом смысле означает отдачу электронов, а **восстановление** — обратное окислению действие приобретения электронов. Таким образом, ион Fe^{2+} окисляется, если теряет электрон и превращается в ион Fe^{3+} , а атом хлора восстанавливается, если приобретает электрон и становится ионом Cl^- . Поскольку в химической реакции число электронов остается неизменным (не убывает и не возрастает), постольку окисление и восстановление всегда

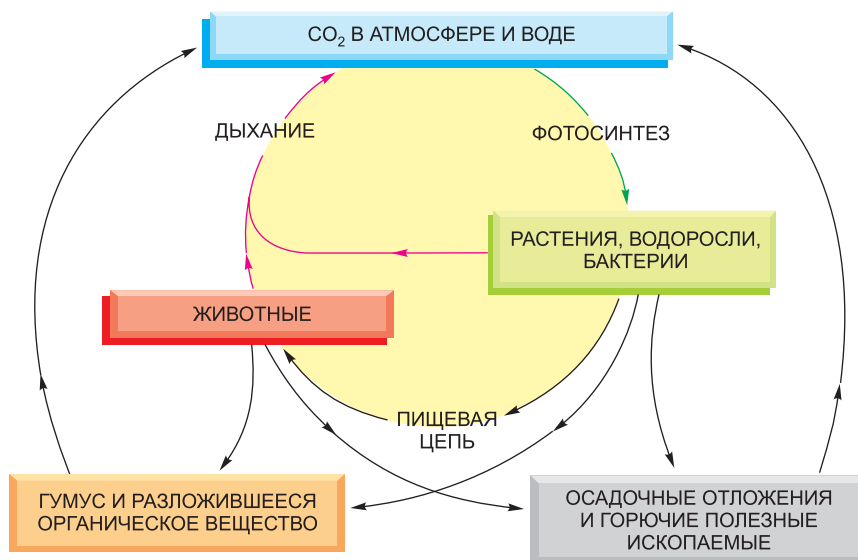


Рис. 2.42. Углеродный цикл. Отдельные атомы углерода включаются в органические молекулы живого мира благодаря фотосинтезирующей деятельности бактерий и растений (в том числе водорослей). Они переходят к животным, микроорганизмам и в органическое вещество почв и океанов замкнутыми циклическими путями. CO₂ возвращается в атмосферу, когда органические молекулы окисляются клетками или используются людьми в качестве топлива.

происходят одновременно: то есть если одна молекула получает электрон в ходе реакции (восстановление), то другая молекула теряет этот электрон (окисление). Когда молекула сахара окисляется до CO₂ и H₂O, то, например, молекулы O₂, участвующие в образовании H₂O, приобретают электроны и таким образом, как говорят, восстанавливаются.

Термины «окисление» и «восстановление» применимы даже тогда, когда имеет место лишь частичное смещение электронов между атомами, связанными ковалентной связью (рис. 2.43).

Когда атом углерода вступает во взаимодействие с некоторым атомом, обладающим сильным сродством к электронам, — таким, например, как кислород, хлор или сера, — он уступает электроны в большей степени, чем это было бы при равноправном дележе, и образует *полярную* ковалентную связь: положительный заряд ядра атома углерода теперь несколько больше, чем отрицательный заряд его электронов, атом поэтому приобретает частичный положительный заряд и, как говорят, окисляется. Наоборот, атом углерода в связке С—Н заимствует немного больше своей доли электронов и таким образом, как говорят, восстанавливается (см. рис. 2.43).

Когда молекула (А) в клетке улавливает электрон (e⁻), она зачастую прихватывает вместе с ним и протон (H⁺) (протонов в воде неограниченное количество). В данном случае конечным результатом будет присоединение атома водорода к молекуле:



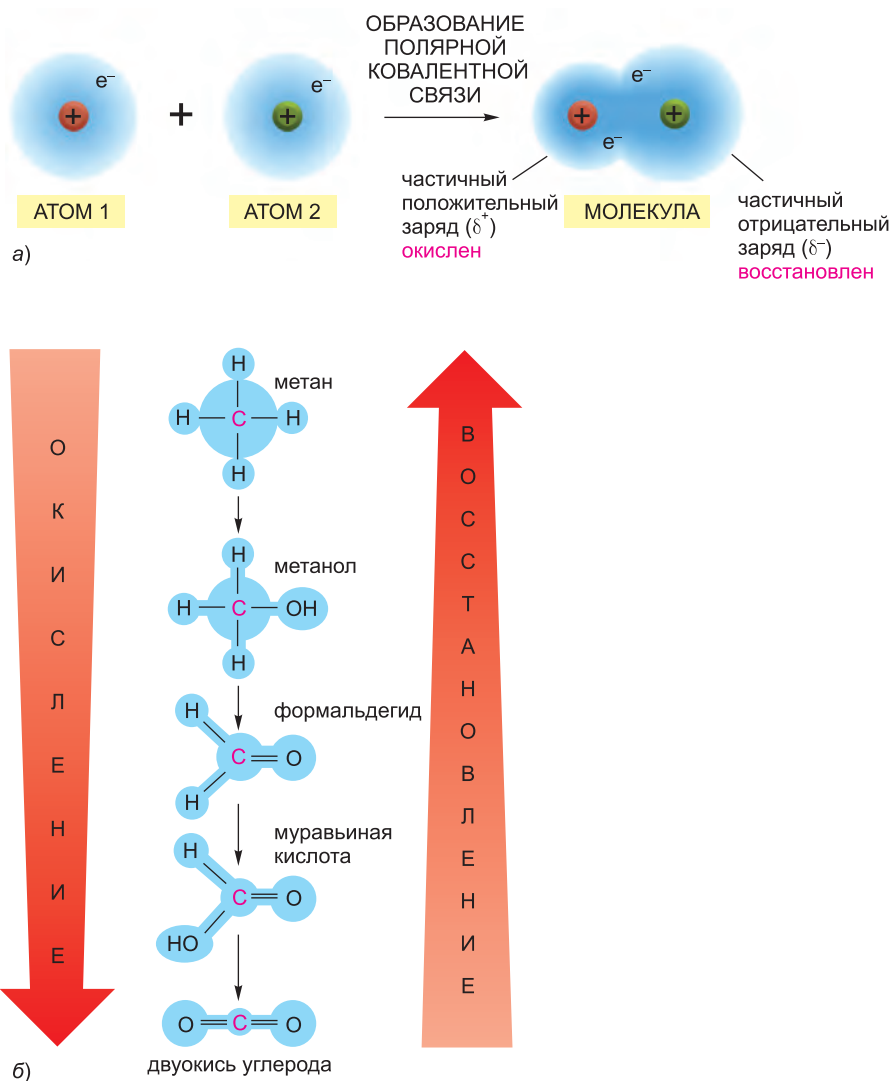


Рис. 2.43. Окисление и восстановление. а) Когда два атома образуют *полярную* ковалентную связь (см. [стр. 50](#)), то атом, получивший большую долю электронов, как говорят, восстанавливается, тогда как другой атом, оказавшийся с меньшей долей электронов, как говорят, окисляется. Восстановленный атом приобретает частичный отрицательный заряд (δ^-), поскольку положительный заряд на ядре атома теперь ниже суммарного заряда электронов, окружающих его; и наоборот, окисленный атом приобретает частичный положительный заряд (δ^+). б) Единственный атом углерода в метане может быть превращен в атом двуокиси углерода последовательной заменой ковалентно связанных с ним атомов водорода атомами кислорода. С каждым шагом электроны смещаются дальше от углерода (как обозначено *си-ней* областью) и атом углерода постепенно становится все более окисленным. Каждый из этих шагов энергетически выгоден в условиях внутри клетки.

Даже при том, что в данной реакции участвует протон и электрон (а не только один электрон), такие реакции *гидрогенизации* суть реакции восстановления, а обратные реакции *дегидрогенизации* — окисления. В случае органических молекул

особенно легко определить, окисляется она или восстанавливается: если число связей С–Н возрастает, то имеет место восстановление, тогда как окисление сопровождается сокращением числа связей С–Н (см. рис. 2.43, б).

Клетки используют ферменты для того, чтобы катализировать окисление органических молекул «маленькими шажками», пропуская их через цепочку реакций, что позволяет пожинать порции полезной энергии с химических пажитей. Теперь, думаем, нужно объяснить принцип работы ферментов и сказать о некоторых факторах, под действием которых они исполняют свои «должностные обязанности».

2.2.6. Ферменты снижают энергетические барьеры химических реакций

Рассмотрим реакцию



Бумага горит легко, выделяя в атмосферу как энергию в виде теплоты, так и воду и двуокись углерода в виде газов, но дым и пепел никогда самопроизвольно не извлекут обратно эти сущности из нагретой атмосферы и уже не станут бумагой. Когда бумага горит, содержащаяся в ней химическая энергия рассеивается в виде тепла — не теряется во Вселенной, так как энергия никогда не может появиться или исчезнуть, но безвозвратно распыляется в хаотических беспорядочных тепловых колебаниях молекул. В это время атомы и молекулы бумаги рассеиваются и «забывают» о всяком порядке. Как говорят на языке термодинамики, происходит потеря *свободной энергии*, то есть энергии, которая может быть употреблена на совершение работы или осуществление химических реакций. Эта потеря отражает потерю упорядоченной организации энергии молекул, запасенных в бумаге. Вскоре мы поговорим о свободной энергии подробнее, но общий принцип достаточно ясен по наитию: химические реакции самопроизвольно протекают только в том направлении, которое ведет к потере свободной энергии; другими словами, направление самопроизвольного протекания всякой реакции — направление, которое идет «на спуск». Реакция «на спуск» в этом смысле, как часто говорят, является *энергетически благоприятной* (выгодной).

Хотя наиболее энергетически выгодная форма углерода при нормальных условиях — это CO_2 , а для водорода — H_2O , живой организм не исчезает в клубах дыма, а эта книга в ваших руках не вспыхивает ярким пламенем. Это связано с тем, что как в любом живом организме, так и в нашей книге молекулы находятся в относительно устойчивом состоянии и не могут быть переведены в состояние с более низкой энергией без сообщения необходимой энергии извне: другими словами, молекуле необходима **энергия активации** — толчок через энергетический барьер, — прежде чем она сможет вступить в химическую реакцию, результатом которой будет более устойчивое состояние (рис. 2.44). В случае полыхающей книги энергия активации привносится с теплотой зажженной спички. Что до молекул в водном растворе внутри клетки, толчок сообщается особенно энергичным случайным столкновением с окружающими молекулами — такие столкновения становятся все более сильными по мере повышения температуры.

В живой клетке роль толчка через энергетический барьер в большинстве случаев берут на себя белки специализированного класса — **ферменты**. Каждый фермент

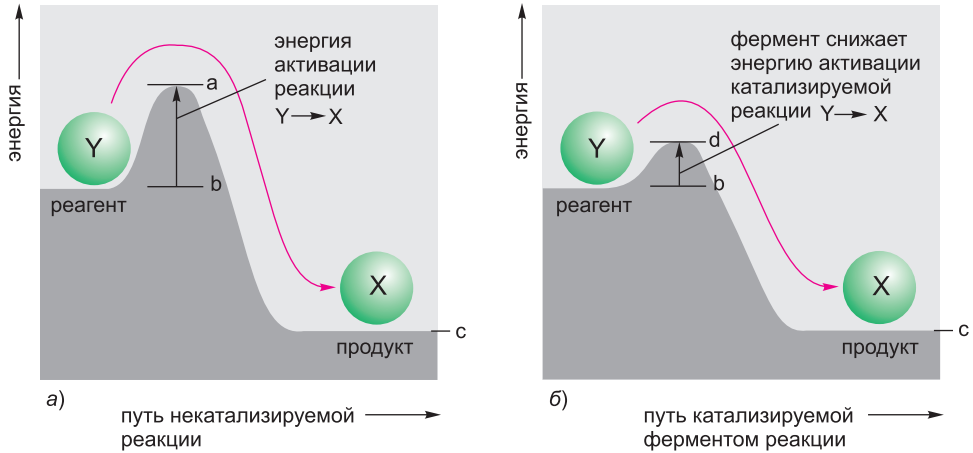


Рис. 2.44. Физический смысл энергии активации. а) Соединение Y (реагент) находится в относительно устойчивом состоянии, и, чтобы превратить его в соединение X (продукт), хотя X находится на более низком энергетическом уровне, необходима дополнительная энергия. Поэтому такое превращение будет невозможно, если соединение Y не получит достаточно энергии активации (энергия a минус энергия b) из внешней среды для реакции превращения в соединение X. Эта энергия может быть сообщена при необычайно энергичном столкновении с другими молекулами. Для обратной реакции, $X \rightarrow Y$, энергия активации будет намного больше (энергия a минус энергия c); поэтому такая реакция будет происходить намного реже. Энергии активации всегда положительны; обратите внимание, однако, что изменение полной энергии для энергетически благоприятной реакции $Y \rightarrow X$ равно энергии c минус энергия b , то есть отрицательному числу. б) Энергетические барьеры для определенных реакций могут быть снижены катализаторами, что показано линией, обозначенной d . Ферменты являются особенно эффективными катализаторами, потому что они значительно уменьшают энергию катализируемых ими реакций.

прочно связывается с одной или несколькими молекулами, называемыми **субстратами**, и удерживает их в таком состоянии, в котором значительно уменьшается энергия активации специфической химической реакции, в которую эти субстраты могут вступить. Вещество, которое может понизить энергию активации реакции, получило название **катализатор**; катализаторы увеличивают скорость химических реакций благодаря тому, что повышают долю случайных межмолекулярных столкновений, приводящих к химической реакции, как бы перетаскивая субстраты через энергетический барьер, как показано на **рис. 2.45**. Ферменты стоят в числе самых эффективных из известных катализаторов и способны ускорять реакции в 10^{14} раз и более. Таким образом, благодаря ферментам реакции, которые в ином случае вообще не могли бы произойти, идут с высокой скоростью при обычной температуре.

Кроме того, ферменты отличаются крайней избирательностью. Каждый фермент обычно катализирует только одну специфическую реакцию: иными словами, он избирательно понижает энергию активации только одной из нескольких возможных химических реакций, которым связанные им молекулы субстрата могли бы подвергнуться. Таким вот образом ферменты направляют каждую из множества различных молекул в клетке на свой совершенно определенный путь (**рис. 2.46**).

Успех живых организмов предопределен способностью клетки производить ферменты многих типов, каждый — с точно предписанными свойствами. Любой

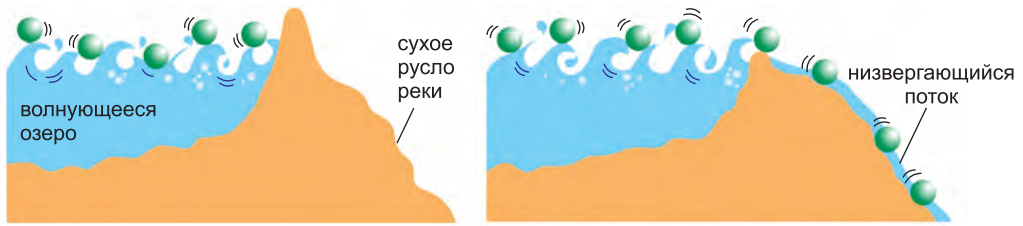


Рис. 2.45. Снижение энергии активации значительно увеличивает вероятность реакции. В любой данный момент времени распределение энергетических уровней в популяции идентичных молекул субстрата будет иметь вид кривой, показанной на графике. Различие энергий обусловлено столкновениями с окружающими молекулами, которые заставляют молекулы субстрата совершать поступательные, колебательные и вращательные движения. Для того чтобы молекула вступила в химическую реакцию, энергия этой молекулы должна превысить барьер энергии активации для данной реакции; что же до биологических реакций, то большинство из них никогда не произойдет, если не будет ферментативного катализа. Даже при ферментативном катализе молекулы субстрата должны претерпеть особенно энергичное столкновение, чтобы прореагировать (*красная закрашенная область*). Повышение температуры также может увеличить число молекул с энергией, достаточной для преодоления энергии активации, необходимой для реакции; но, в отличие от ферментативного катализа, этот эффект не избирателен и ускоряет все возможные реакции.

фермент имеет уникальную форму, содержащую *активный участок* (сайт): карман или бороздку, куда могут войти лишь специфические субстраты (**рис. 2.47**). Подобно всем другим катализаторам, молекулы фермента сами остаются неизменными после участия в реакции и поэтому могут выполнять свои функции снова и снова. В главе 3 мы продолжим рассказ о принципах работы ферментов.

2.2.7. Каким образом ферменты находят свои субстраты: огромная скорость движения молекул

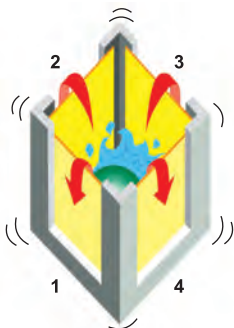
Зачастую тот или иной фермент катализирует реакцию, через которую каждую секунду проходят тысячи молекул субстрата. Это означает, что фермент должен успевать связывать новую молекулу субстрата за долю миллисекунды. Но как ферменты, так и их субстраты присутствуют в клетке в относительно малых количествах. Как же они находят друг друга столь быстро? Быстрое связывание возможно потому, что движение на молекулярном уровне происходит чрезвычайно быстро. Происходящие на молекулярном уровне движения можно подразделить на следующие три вида: 1) движение молекулы с одного места на другое (*поступательное движение*), 2) быстрое движение взад-вперед ковалентно связанных



некатализируемая реакция – волны недостаточно высоки, чтобы переклестнуть через дамбу

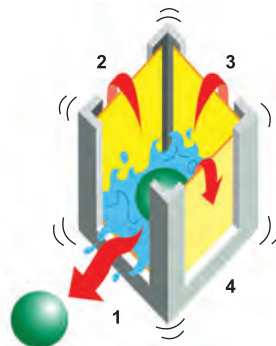
катализируемая реакция – волны часто переклестывают через дамбу

а)

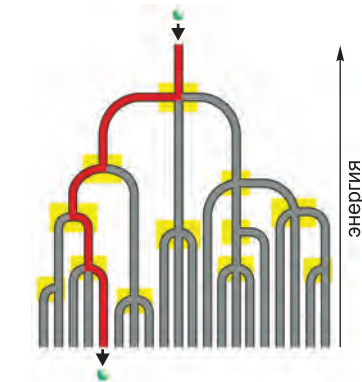


без катализатора

б)



ферментативный катализ реакции № 1



в)

Рис. 2.46. Плавающий шарик как аналог ферментативного катализа. а) Заградительная дамба снижена, чтобы наглядно проиллюстрировать ферментативный катализ. Зеленый шар представляет собой потенциальный реагент (соединение Y), который в пределах возможного энергетического уровня (водная гладь) прыгает вверх и вниз из-за постоянных столкновений с волнами (аналогия тепловой бомбардировки молекулы реагента окружающими молекулами воды). Когда барьер (энергия активации) значительно понижается, это позволяет совершить энергетически благоприятное движение шара (реагента) вниз по склону. б) Четыре стенки ящика представляют барьеры энергии активации для четырех разных химических реакций, каждая из которых энергетически выгодна в том смысле, что уровни энергии продуктов этих реакций гораздо ниже, чем для реагирующих веществ — реагентов. В левом ящике ни одна из этих реакций не протекает, потому что энергии даже самых высоких волн не достаточно для того, чтобы преодолеть какой-либо из энергетических барьеров. В правом ящике ферментативный катализ понижает энергию активации только для реакции № 1; теперь удары волн позволяют молекуле реагента пройти через этот энергетический барьер, вызывая таким образом реакцию № 1. в) Распадающаяся на множество рукавов река с набором преграждающих плотин (желтые прямоугольники) помогает понять, как цепь катализуемых ферментами реакций определяет точный путь следования каждой молекулы, находящейся в клетке.

атомов относительно друг друга (колебания) и 3) вращение. Все виды движения приводят к сближению поверхностей взаимодействующих молекул.

Скорость движения молекул может быть измерена с помощью разнообразных спектроскопических методов. Крупный глобулярный белок постоянно кувыркается, вращаясь вокруг своей оси, — приблизительно миллион раз в секунду. Молекулы находятся также в постоянном поступательном движении, которое побуждает их очень эффективно осваивать внутреннее пространство клетки, блуждая в нем туда-

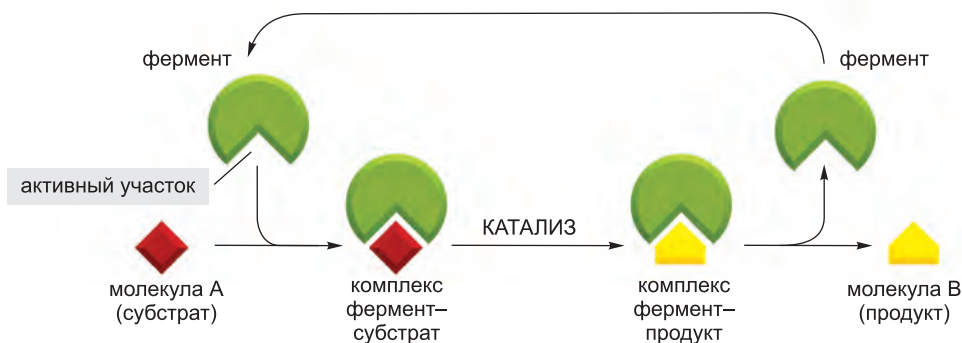


Рис. 2.47. Принцип работы ферментов. Каждый фермент имеет активный участок, с которым связывается одна или более молекул *субстрата*, образуя ферментно-субстратный комплекс. В активном участке фермента происходит реакция и образуется комплекс фермент–продукт. Наконец, *продукт* высвобождается, что позволяет ферменту связать следующую молекулу субстрата.

сюда, — этот процесс называется **диффузией**. Таким образом, каждая молекула в клетке ежесекундно сталкивается с огромным числом других молекул. Когда молекулы в жидкости сталкиваются и отскакивают друг от друга, отдельно взятая молекула перемещается сначала по одному пути, затем по другому, ее путь представляет собой *случайное блуждание* (рис. 2.48). При таком блуждании среднее результирующее расстояние, которое каждая молекула проходит (как летает ворона) от своей отправной точки, пропорционально квадратному корню затраченного времени: то есть, если молекуле требуется в среднем 1 секунда, чтобы пройти 1 мкм, то потребуется 4 секунды, чтобы пройти 2 мкм, 100 секунд, чтобы пройти 10 мкм, и так далее.

Внутреннее пространство клетки очень насыщено (рис. 2.49). Тем не менее эксперименты, в которых в клетки вводились флуоресцентные красители или иные меченые молекулы, показывают, что маленькие органические молекулы диффундируют через водный гель цитозоля почти так же быстро, как через воду. Например, маленькой органической молекуле требуется в среднем лишь около одной пятой доли секунды, чтобы продиффундировать на расстояние 10 мкм. Поэтому для маленьких молекул диффузия служит эффективным способом перемещения на ограниченные расстояния в клетке (диаметр типичной клетки животных 15 мкм).

Так как в клетках ферменты передвигаются гораздо медленнее субстратов, мы можем представить их сидящими на месте уваль-

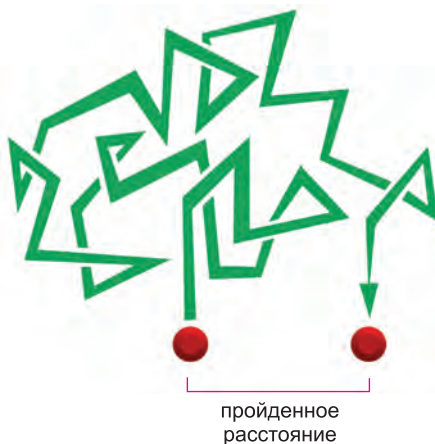
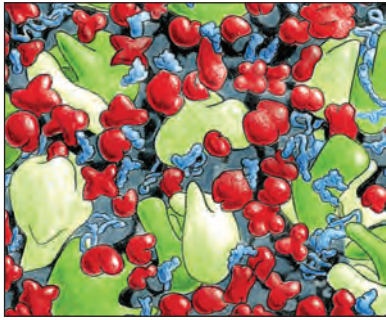


Рис. 2.48. Случайное блуждание. Молекулы в растворе движутся случайным образом — в результате непрерывных ударов, полученных при столкновении с другими молекулами. Такое движение позволяет маленьким молекулам быстро диффундировать из одной части клетки в другую, как описано в тексте.



100 нм

Рис. 2.49. Структура цитоплазмы. Рисунок представлен в приближенном масштабе и акцентирует внимание на «загруженность» цитоплазмы. Показаны только макромолекулы: РНК показаны синим, рибосомы — зеленым, а белки — красным. Ферменты и другие макромолекулы диффундируют в цитоплазме относительно медленно, отчасти потому, что они взаимодействуют со многими другими макромолекулами; маленькие молекулы, напротив, диффундируют почти так же быстро, как в воде. (Переработано из D. S. Goodsell, *Trends Biochem. Sci.* 16: 203–206, 1991. С разрешения издательства Elsevier.)

ниями. Частота столкновений молекулы фермента с ее субстратом будет зависеть от концентрации молекул субстрата. Например, некоторые субстраты, которыми изобилует клетка, присутствуют в концентрации 0,5 мМ (ммоль/литр). Поскольку чистая вода имеет концентрацию 55,5 М (моль/литр), на каждые 10^5 молекул воды в клетке приходится лишь около одной такой молекулы субстрата. Тем не менее активный участок молекулы фермента, который связывает этот субстрат, будет отбомбардирован примерно 500 000 случаев столкновений с молекулой субстрата в секунду. (При снижении концентрации субстрата в десять раз число столкновений уменьшается до 50 000 в секунду и так далее.) Случайное столкновение между поверхностью фермента и соответствующей поверхностью молекулы его субстрата часто незамедлительно ведет к образованию комплекса фермент–субстрат, готового вступить в реакцию. Теперь реакция, в ходе которой разрывается или образуется ковалентная связь, может произойти чрезвычайно быстро. Если прикинуть, сколь быстро молекулы движутся и вступают в реакции, то наблюдаемые скорости ферментативного катализа не покажутся столь удивительными.

Как только фермент и субстрат столкнулись и «прижались друг к другу» должным образом в активном участке, между ними формируются многочисленные слабые связи, которые сохраняются до тех пор, пока беспорядочное тепловое движение не вынуждает молекулы вновь разойтись. Вообще, чем прочнее связь фермента с субстратом, тем медленнее скорость их диссоциации. Однако, когда две сталкивающиеся молекулы имеют плохо подходящие друг другу поверхности, число образующихся между ними нековалентных связей невелико и их общая энергия незначительна по сравнению с энергией теплового движения. В этом случае две молекулы отделяются друг от друга столь же быстро, сколь быстро они объединились, что и предотвращает образование неправильных и нежелательных комплексов между несоответствующими друг другу молекулами, как например, между ферментом и молекулой, не являющейся его субстратом.

2.2.8. Возможность протекания реакции определяется сопряженным с ней изменением свободной энергии

Теперь мы ненадолго отступим от основной темы, дабы напомнить читателю некоторые начала химии. Клетки суть химические системы, которые должны подчиняться всем химическим и физическим законам. Хотя ферменты и ускоряют реакции, они не могут сами по себе (своими силами, без посторонней помощи) сделать так, чтобы энергетически неблагоприятные реакции произошли. Прибегнув

к аналогии с водой, можно сказать, что ферменты не могут заставить воду течь вверх по руслу. Клетки, однако, чтобы расти и делиться, должны делать именно это: строить высокоупорядоченные и богатые энергией молекулы из мелких и простых молекул. Мы увидим, что все это происходит благодаря ферментам, которые непосредственно *сопрягают* энергетически благоприятные реакции, в ходе которых высвобождается энергия и выделяется теплота, с энергетически неблагоприятными реакциями, в ходе которых создается биологический порядок.

Прежде чем мы изучим, за счет чего достигается такое сопряжение, нам следует более тщательно рассмотреть термин «энергетически благоприятный» («energetically favorable»). Согласно второму закону термодинамики, химическая реакция может самопроизвольно протекать лишь в том случае, если она ведет в итоге к возрастанию беспорядка во Вселенной (см. рис. 2.38). Критерий возрастания беспорядка во Вселенной наиболее удобно выразить в единицах величины, называемой **свободная энергия, G** , системы. Значение G представляет интерес только тогда, когда система претерпевает *изменение*, и изменение G , обозначаемое ΔG (дельта G), является определяюще важным. Предположим, что рассматриваемая нами система представляет собой сообщество молекул. Как следует из приложения 2.7 (стр. 118–119), свободная энергия была определена таким образом, что ΔG — прямая мера количества беспорядка, создаваемого во Вселенной, когда имеет место реакция, в которой участвуют данные молекулы. *Энергетически благоприятными реакциями*, по определению, считаются те, что уменьшают свободную энергию; иначе говоря, они имеют *отрицательную ΔG* и дезорганизуют Вселенную (рис. 2.50).

Примером энергетически благоприятной реакции в макроскопическом масштабе служит «реакция», в ходе которой сжатая пружина возвращается в растянутое состояние, высвобождая в окружающую среду запасенную в ней энергию упругости в виде теплоты; в качестве примера в микроскопическом масштабе приведем процесс растворения соли в воде. Наоборот, *энергетически неблагоприятные реакции с положительным ΔG* — такие как соединение двух аминокислот с образованием пептидной связи — без привлечения сил извне порождают порядок во Вселенной. Поэтому такие реакции возможны только в том случае, если будут сопряжены с какой-либо реакцией, характеризующейся столь большим отрицательным значением ΔG , что значение ΔG для всего процесса в целом будет отрицательным (рис. 2.51).

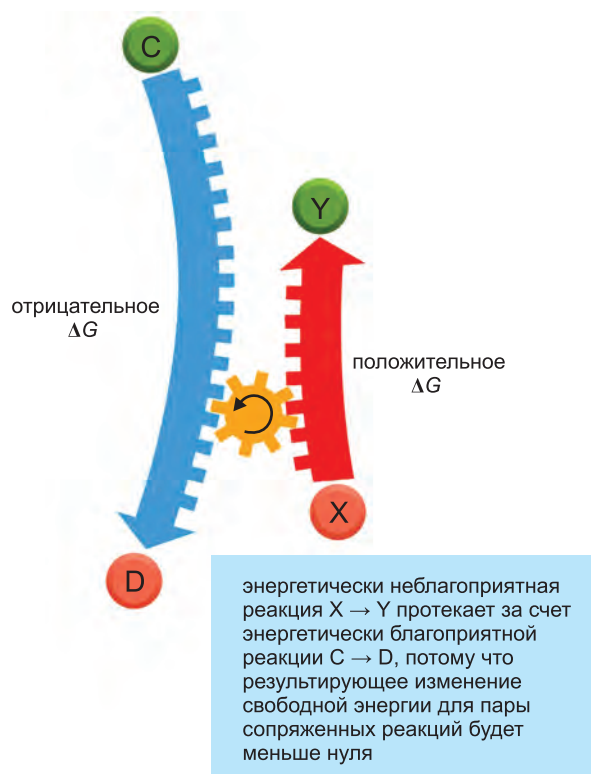


Рис. 2.50. Различие между энергетически благоприятной и энергетически неблагоприятной реакциями.

2.2.9. Концентрация реагентов влияет на изменение свободной энергии и на направление протекания реакции

Как только что было описано, реакция $Y \leftrightarrow X$ протекает в направлении $Y \rightarrow X$, когда этот процесс сопряжен с отрицательным значением изменения свободной энергии ΔG , — так же как и сжатая пружина, будучи предоставлена сама себе, разожмется и потеряет запасенную в ней энергию во внешней среде в виде выделившейся теплоты. В случае химической реакции, однако, ΔG зависит не только от энергии, запасенной в каждой отдельной молекуле, но также и от концентрации молекул в реакционной смеси. Вспомним, что ΔG отражает степень, с которой реакция создает более неупорядоченное — другими словами, более вероятное — состояние Вселенной. Если вспомнить приводимую нами ранее аналогию с монетами, то становится весьма вероятным такое событие, когда некоторая монета изменит свою ориентацию с орла на решку, если во встряхиваемом ящике находится 90 орлов и 10 решек; однако это событие станет менее вероятным, если ящик будет содержать 10 орлов и 90 решек.

То же самое верно и для химической реакции. В случае обратимой реакции $Y \leftrightarrow X$ при большом избытке Y над X реакция будет преимущественно проходить в направлении $Y \rightarrow X$; то есть система будет стремиться к такому состоянию, чтобы в ней было больше молекул, осуществляющих переход $Y \rightarrow X$, чем молекул, совершающих переход $X \rightarrow Y$. Если отношение Y к X увеличивается, то ΔG становится более отрицательным для перехода $Y \rightarrow X$ (и более положительным для перехода $X \rightarrow Y$).



Какая разность концентраций необходима, чтобы компенсировать данное уменьшение энергии химических связей (и сопутствующее высвобождение теплоты)? Ответ интуитивно не очевиден, но эта разность может быть определена из термодинамического анализа, который позволяет разделить зависимые от концентрации и независимые от концентрации части уравнения изменения свободной энергии. Выражение ΔG для данной реакции можно, таким образом, записать в виде суммы двух частей: первая, называемая *изменением стандартной свободной энергии ΔG°* , зависит от индивидуальных характеристик реа-

Рис. 2.51. Принцип использования сопряженных реакций для осуществления энергетически неблагоприятных реакций.

гирующих молекул; вторая зависит от их концентраций. Для простой реакции $Y \rightarrow X$ при 37°C

$$\Delta G = \Delta G^0 + 0,616 \ln \frac{[X]}{[Y]} = \Delta G^0 + 1,42 \lg \frac{[X]}{[Y]},$$

где ΔG выражено в килокалориях на моль, $[Y]$ и $[X]$ обозначают концентрации веществ Y и X , \ln — натуральный логарифм, а постоянный коэффициент 0,616 равен RT : произведению универсальной газовой постоянной R и абсолютной температуры T .

Обратите внимание, что в том случае, когда молярные концентрации Y и X равны ($\lg 1 = 0$), G равно величине ΔG^0 . Как и следовало ожидать, по мере уменьшения величины отношения X к Y ΔG становится более отрицательным (десятичный логарифм любого числа < 1 отрицателен).

Из вышеприведенного уравнения видно, что ΔG равно величине ΔG^0 , когда концентрации Y и X равны. Но по мере протекания благоприятной реакции $Y \rightarrow X$ концентрация продукта X возрастает, а концентрация субстрата Y снижается. В результате такого изменения относительных концентраций отношение $[X]/[Y]$ становится все больше и больше, а изначально благоприятное ΔG — все менее и менее отрицательным. В конечном счете, когда $\Delta G = 0$, будет достигнуто химическое **равновесие**; здесь концентрационный эффект в точности уравновешивает тот импульс, которым «обеспечила» реакцию величина ΔG^0 , и соотношение концентраций субстрата и продукта достигает постоянного значения (**рис. 2.52**).

Как долго будет протекать реакция, прежде чем она остановится, достигнув равновесия? Прежде чем обращаться к этому вопросу, нам следует ввести понятие **константы равновесия, K** . Для различных реакций значение K разное, и оно отражает величину отношения концентраций продукта к субстрату в точке равновесия. Для реакции $Y \rightarrow X$

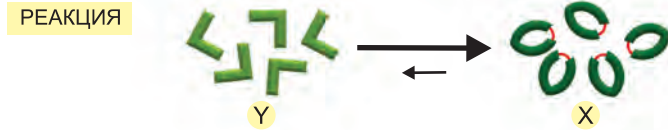
$$K = \frac{[X]}{[Y]}$$

Уравнение, которое связывает ΔG с отношением концентраций $[X]/[Y]$, позволяет нам напрямую связать ΔG^0 с K . Поскольку в состоянии равновесия $\Delta G = 0$, постольку концентрации Y и X в этой точке таковы, что

$$\Delta G^0 = -1,42 \lg \frac{[X]}{[Y]} \quad \text{или} \quad \Delta G^0 = -1,42 \lg K.$$

Из последнего уравнения мы можем проследить зависимость равновесного соотношения X к Y (выраженного в виде константы равновесия K) от природы молекул, которая выражается величиной ΔG^0 (**таблица 2.4**). Обратите внимание, что на каждые 1,4 ккал/моль (5,9 кДж/моль) разности свободной энергии при 37°C , константа равновесия изменяется в 10 раз.

Когда тот или иной фермент (или вообще любой катализатор) понижает энергию активации реакции $Y \rightarrow X$, он понижает также и энергию активации реакции $X \rightarrow Y$, причем в такой же степени (см. **рис. 2.44**). Протекающие в прямом и обратном направлениях реакции будут поэтому ускоряться ферментом в одно и то же количество раз, и точка равновесия для реакции (и ΔG^0) останется неизменной (**рис. 2.53**).

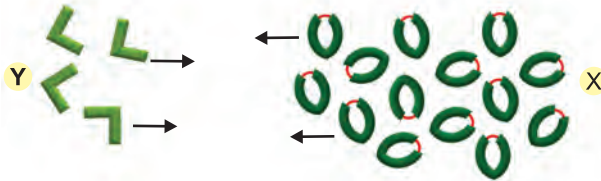


В данном примере энергетически предпочтительнее образование X. Другими словами, значение ΔG реакции $Y \rightarrow X$ отрицательно, а значение ΔG реакции $X \rightarrow Y$ положительно. Но из-за тепловых соударений некоторое количество соединения X всегда будет превращаться в соединение Y, и наоборот.

ПРЕДПОЛОЖИМ, ЧТО МЫ НАЧИНАЕМ С РАВНОГО ЧИСЛА МОЛЕКУЛ Y И X



ПОСТЕПЕННО большой избыток X по отношению к Y будет как раз компенсировать медленную скорость реакции $X \rightarrow Y$. После этого будет достигнуто равновесие.

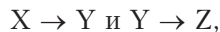


В СОСТОЯНИИ РАВНОВЕСИЯ число молекул Y, превращающихся каждую секунду в молекулы X, в точности равно числу молекул X, превращающихся каждую секунду в молекулы Y, так что отношение числа молекул Y к числу молекул X не изменяется во времени

Рис. 2.52. Химическое равновесие. Когда реакция достигает равновесия, прямой и обратный потоки реагирующих молекул равны и взаимно противоположны.

2.2.10. В случае последовательных реакций значения ΔG° попросту складываются

Мы можем количественно предсказать направление протекания большинства реакций. Собрано огромное количество термодинамических данных, на основании которых можно вычислить стандартное изменение свободной энергии ΔG° для большинства важных метаболических реакций, происходящих в клетке. Полное изменение свободной энергии в метаболическом пути в таком случае есть не что иное, как попросту сумма изменений свободной энергии на каждом из составляющих его шагов. Рассмотрим, например, две последовательные реакции:



значения ΔG° которых равны соответственно +5 и -13 ккал/моль. (Вспомним, что один моль любого вещества содержит $6 \cdot 10^{23}$ молекул этого вещества.) Если обе эти реакции происходят последовательно, то ΔG° сопряженной реакции будет со-

Таблица 2.4. Соотношение между стандартным изменением свободной энергии ΔG° и константой равновесия

КОНСТАНТА РАВНОВЕСИЯ $K = \frac{[X]}{[Y]}$	СВОБОДНАЯ ЭНЕРГИЯ X МИНУС СВОБОДНАЯ ЭНЕРГИЯ Y, ккал/моль (кДж/моль)
10^5	-7,1 (-29,7)
10^4	-5,7 (-23,8)
10^3	-4,3 (-18,0)
10^2	-2,8 (-11,7)
10^1	-1,4 (-5,9)
1	0 (0)
10	1,4 (5,9)
10^{-2}	2,8 (11,7)
10^{-3}	4,3 (18,0)
10^{-4}	5,7 (23,8)
10^{-5}	7,1 (29,7)

Примечания:

1. Значения константы равновесия вычислены для простой химической реакции $Y \leftrightarrow X$ по уравнению, приведенному в тексте.

2. Указанная здесь величина ΔG° выражена в килокалориях на моль при 37°C , а в круглых скобках — в килоджоулях на моль (1 ккал = 4,184 кДж). Как объясняется в тексте, ΔG° представляет разность свободной энергии при нормальных условиях (где все компоненты присутствуют в концентрации 1,0 моль/литр).

3. Из этой таблицы мы видим, что при благоприятном стандартном изменении свободной энергии (ΔG°), равном $-4,3$ ккал/моль ($-18,0$ кДж/моль), для перехода $Y \rightarrow X$ в точке равновесия ($K = 1000$) молекул в состоянии X будет в 1000 раз больше, чем в состоянии Y.

ставляя -8 ккал/моль. Таким образом, неблагоприятная реакция $X \rightarrow Y$, которая не произошла бы самопроизвольно, может протекать за счет благоприятной реакции $Y \rightarrow Z$ при условии, что эта вторая реакция сопровождает первую.

Поэтому в клетке энергетически неблагоприятное превращение $X \rightarrow Y$ может произойти, если фермент, катализирующий реакцию $X \rightarrow Y$, дополняется вторым

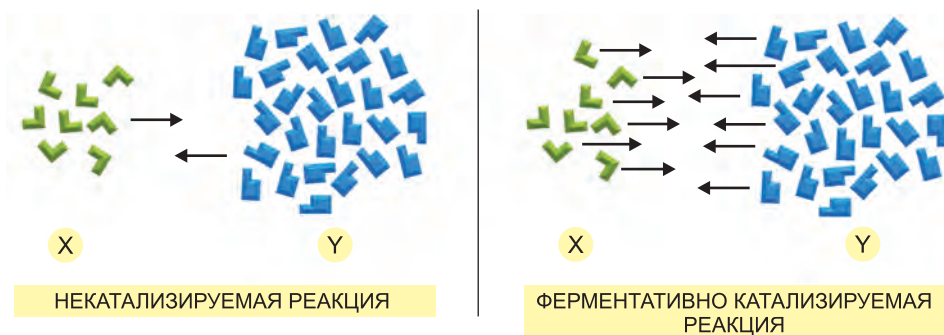


Рис. 2.53. Ферменты не могут изменить точку равновесия реакций. Ферменты, подобно всем катализаторам, в равной степени увеличивают скорость прямой и обратной реакций. Поэтому как для катализируемой, так и для некатализируемой реакций, показанных на рисунке, число молекул, претерпевающих переход $X \rightarrow Y$, равно числу молекул, участвующих в переходе $Y \rightarrow X$, когда отношение числа молекул Y к числу молекул X составляет 3,5 к 1. Другими словами, эти две реакции достигают равновесия в одной и той же точке.

ферментом, который катализирует энергетически *благоприятную* реакцию $Y \rightarrow Z$. По сути, реакция $Y \rightarrow Z$ будет в данном случае действовать как «сифон», чтобы обеспечить превращение всех молекул X в молекулы Y и далее — в молекулы Z (рис. 2.54). Например, некоторые реакции на длинном пути превращения сахаров в CO_2 и H_2O были бы энергетически неблагоприятны, будь они взяты сами по себе. Но тем не менее этот путь претворяется в жизнь, потому что значение общего ΔG° для цепочки последовательных реакций имеет большую отрицательную величину.

Но формирование последовательного пути целесообразно далеко не во всех случаях. Зачастую желательный путь — просто $X \rightarrow Y$, без дальнейшего преобразования Y в какой-либо другой продукт. К счастью, существуют иные, более общие способы использования ферментов для сопряжения реакций в едином процессе. На чем они основаны — тема, которую мы обсуждаем далее.

2.2.11. Для биосинтеза нужны активированные молекулы-носители

Энергия, высвобождаемая в ходе окисления молекул пищи, должна быть временно запасена, прежде чем будет направлена на строительство множества других молекул, необходимых клетке. В большинстве случаев энергия запасается в форме энергии химических связей в ограниченном наборе активированных «молекул-

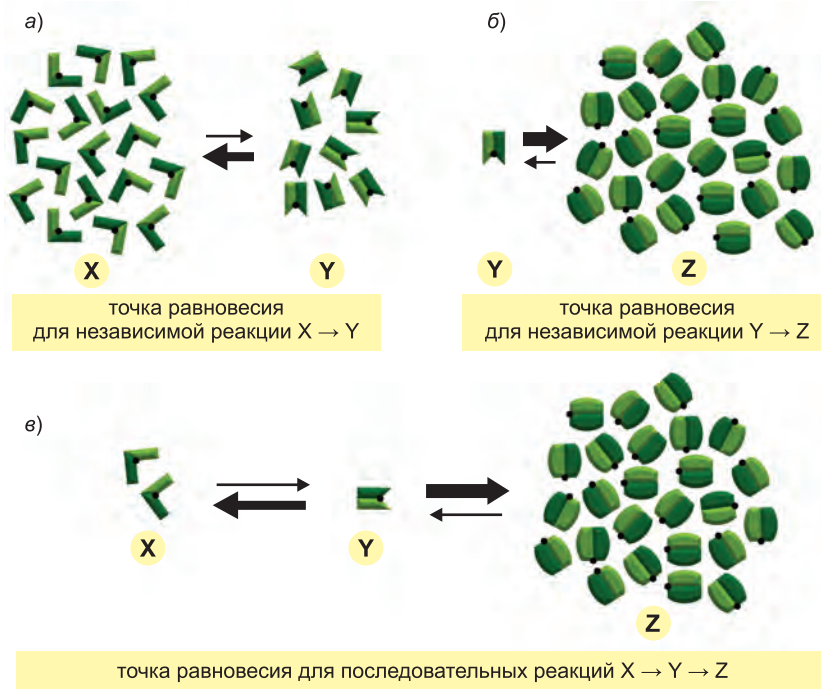


Рис. 2.54. Энергетически неблагоприятная реакция может осуществляться за счет второй, сопутствующей, реакции. а) В состоянии равновесия в системе находится вдвое больше молекул X , чем молекул Y , потому что соединение X имеет более низкую энергию, чем соединение Y . б) В состоянии равновесия в системе имеется в 25 раз больше молекул Z , чем молекул Y , потому что Z имеет намного более низкую энергию, чем Y . в) Если реакции а и б сопряжены, то почти все молекулы X будут превращены в молекулы Z , как показано на рисунке.

носителей», содержащих одну или более богатых энергией ковалентных связей. Эти молекулы быстро распространяются по всей клетке и таким образом переносят запасенную в них энергию связей из мест ее выработки к участкам, где эта энергия потребляется для биосинтеза и других процессов, протекающих в клетке (рис. 2.55). **Активированные носители** запасают энергию в легко изменяемой форме — или в виде легко переносимой химической группы, или в виде электронов высокой энергии — и могут выполнять двоякую роль в реакциях биосинтеза: источника и энергии, и химических групп. По традиции эти молекулы иногда называют также *коферментами*. Важнейшие из активированных молекул-носителей — это АТФ и еще две молекулы, состоящие в близком родстве друг с другом: NADH и NADPH, о которых мы вскоре поговорим подробнее. Мы увидим, что клетки используют активированные молекулы-носители словно деньги для оплаты реакций, которые в ином случае были бы невозможны.

2.2.12. Образование активированного носителя сопряжено с энергетически благоприятной реакцией

Когда молекула топлива, такого как глюкоза, окисляется в клетке, ферментативные реакции способствуют тому, что большая часть свободной энергии, высвобождаемой в процессе окисления, запасается в химически доступной форме, а не выделяется в виде теплоты. Это возможно благодаря **сопряженной реакции**, в которой энергетически благоприятная реакция подпитывает энергетически неблагоприятную, в ходе которой образуется молекула активированного носителя или какого-либо иного полезного накопителя энергии. Механизмы сопряжения требуют ферментов и лежат в основе всех энергетических операций клетки.



Рис. 2.55. Перенос энергии и роль активированных носителей в метаболизме. Служа маршрутными перевозчиками энергии, молекулы активированных носителей выполняют функцию посредников между происходящим с высвобождением энергии расщеплением молекул пищи (*катаболизмом*) и энергопотребляющим биосинтезом маленьких и больших органических молекул (*анаболизмом*).

Характер сопряженной реакции проиллюстрирован на аналогии из механики, как это представлено на **рис. 2.56**, где энергетически благоприятная химическая реакция представлена камнями, падающими с утеса. Энергия падающих камней обычно полностью бесполезно расходуется в форме теплоты, производимой трением при ударе камней о землю (см. схему с падающим кирпичом на рис. 2.39). Однако при помощи искусственной конструкции часть этой энергии может быть использована для приведения в действие колеса с лопастями — чтобы поднять ведро воды (рис. 2.56, б). Поскольку камни могут теперь достигнуть земли только после сообщения движения колесу с лопастями, мы говорим, что энергетически благоприятная реакция — падение камней — напрямую *сопряжена* с энергетически неблагоприятной реакцией — подъем ведра воды. Обратите внимание, что, поскольку в варианте б часть энергии идет на выполнение работы, камни падают на землю с меньшей скоростью, чем в случае варианта а, и, соответственно, меньше энергии рассеивается в виде теплоты.

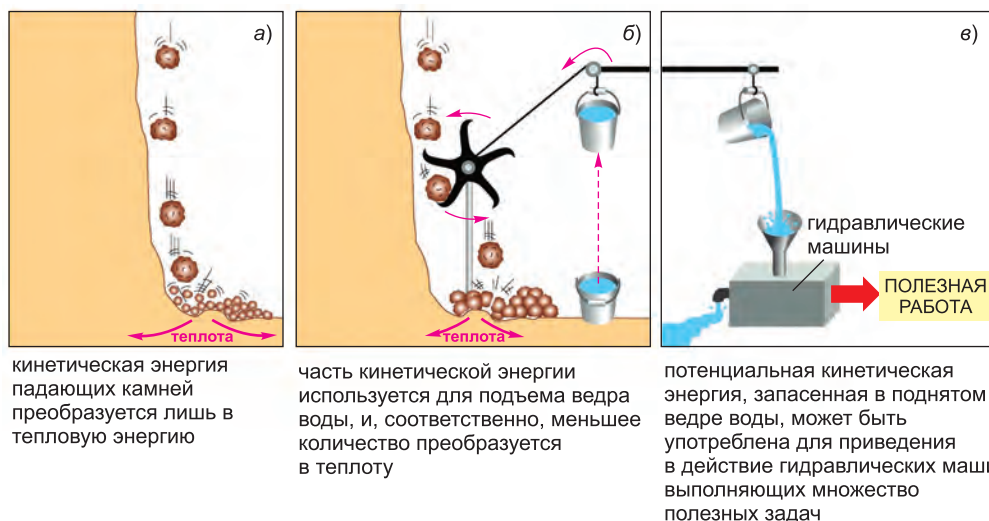


Рис. 2.56. Механическая модель, иллюстрирующая принцип сопряженных химических реакций. Самопроизвольная реакция, показанная на виде а, может служить аналогией процесса прямого окисления глюкозы в CO_2 и H_2O , результатом которого будет производство только теплоты. В б та же реакция сопряжена со второй реакцией; эта вторая реакция аналогична синтезу молекул активированных носителей. Энергия, произведенная в реакции б, находится в более доступной форме, чем выработанная в реакции а, и может быть использована для проведения многих других энергетически неблагоприятных реакций (в).

Подобные процессы происходят в клетках, где ферменты играют роль лопастного колеса из нашего примера-анalogии. С помощью механизмов, которые мы обсудим позже в этой главе, они сопрягают энергетически благоприятную реакцию, такую как окисление пищевых продуктов, с энергетически неблагоприятной реакцией, такой как синтез молекулы активированного носителя. В результате количество теплоты, высвобожденной в реакции окисления, сокращается точно на то количество энергии, которая запасается в богатых энергией ковалентных связях активированной молекулы-носителя. Активированная молекула-носитель, в свою

очередь, вбирает такую порцию энергии, которой будет достаточно для обеспечения химической реакции в каком-либо участке клетки.

2.2.13. АТФ — наиболее распространенная активированная молекула-носитель

Наиболее важный и универсальный (многоцелевой) активированный носитель в клетках — это АТФ (аденозинтрифосфат). Точно так же как энергия, запасенная в поднятом ведре воды, изображенном на рис. 2.56, б, может приводить в действие массу разнообразных гидравлических машин, АТФ служит удобным и универсальным накопителем, или «оборотным активом», энергии, употребляемой на подпитку множества различных химических реакций, происходящих в клетках. АТФ синтезируется в результате энергетически неблагоприятной реакции фосфорилирования, в ходе которой фосфатная группа присоединяется к аденозиндифосфату (adenosine diphosphate, ADP). В случае необходимости АТФ отдает свой энергетический заряд — путем энергетически благоприятного гидролиза до ADP и неорганического фосфата (рис. 2.57). После этого восстановленный ADP готов к использованию в следующем цикле реакции фосфорилирования — в результате чего вновь образуется АТФ.

Энергетически благоприятная реакция гидролиза АТФ сопряжена со множеством как таковых неблагоприятных реакций, связанных с синтезом других молекул. С несколькими из таких реакций мы встретимся далее в этой главе. Многие из них предполагают перенос конечного фосфата с АТФ на другую молекулу, как показано на примере реакции фосфорилирования на рис. 2.58.

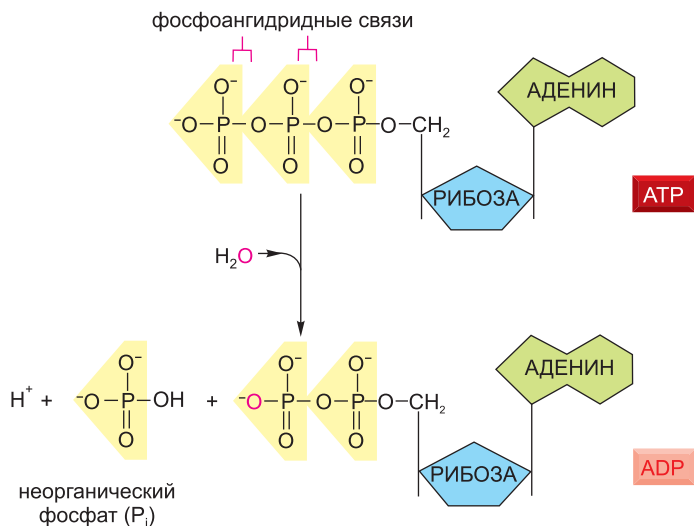


Рис. 2.57. Гидролиз АТФ до АДФ и неорганического фосфата. Два наиболее удаленных фосфата в АТФ связаны с остальной частью молекулы высокоэнергетическими фосфоангидридными связями и легко переносятся на другие молекулы. Как показано на рисунке, присоединение к АТФ молекулы воды приводит к образованию АДФ и неорганического фосфата (P_i). Такой гидролиз конечного фосфата АТФ дает от 11 до 13 ккал/моль полезной энергии в зависимости от условий внутри клетки. Большое отрицательное значение ΔG для этой реакции обусловлено несколькими факторами. Высвобождение конечной фосфатной группы устраняет неблагоприятное отталкивание между соседними отрицательными зарядами; кроме того, высвобожденный ион неорганического фосфата (P_i) стабилизируется резонансом и образованием энергетически благоприятных водородных связей с молекулами воды.

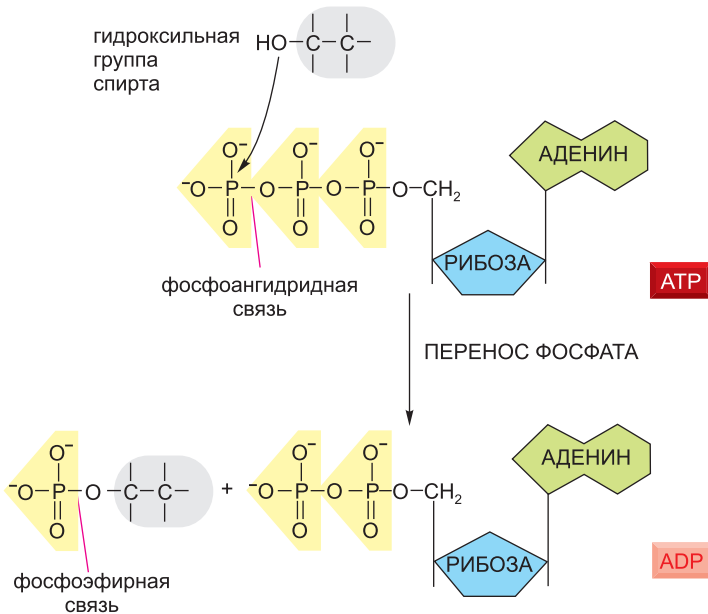


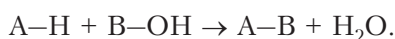
Рис. 2.58. Пример реакции переноса фосфата. Поскольку высокоэнергетическая фосфоангидридная связь в АТФ превращается в фосфоэфирную связь, эта реакция энергетически благоприятна, так как значение $\Delta G \ll 0$. Реакции такого типа задействованы в синтезе фосфолипидов и на первых этапах катаболизма сахаров.

АТФ — самый распространенный активированный носитель в клетках. Для примера скажем, что он снабжает энергией многие из тех насосов, которые переносят вещества в клетку и из клетки (обсудим их в главе 11). Кроме того, он питает энергией молекулярные двигатели, которые позволяют мышечным клеткам сокращаться, а нервным клеткам — транспортировать вещества от одного конца их длинных аксонов до другого (отложим их обсуждение до главы 16).

2.2.14. Запасенная в АТФ энергия часто используется в реакции конденсации

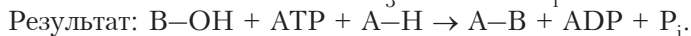
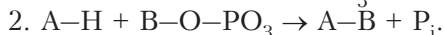
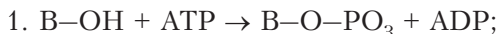
Мы уже рассматривали один из способов, которыми энергетически благоприятная реакция может быть сопряжена с энергетически неблагоприятной реакцией $X \rightarrow Y$, чтобы та осуществлялась. По той схеме второй фермент катализирует энергетически благоприятную реакцию $Y \rightarrow Z$, втягивая тем самым все молекулы X в реакцию с образованием Y (см. рис. 2.54). Но когда требуется продукт Y , а не Z , этот механизм уже неприемлем.

В ходе обычной реакции биосинтеза две молекулы, A и B , соединяются вместе с образованием соединения $A-B$ путем энергетически неблагоприятной реакции конденсации



Существует окольный путь, который позволяет образовывать из молекул $A-N$ и $B-OH$ соединение $A-B$: протекание данной реакции становится возможным

благодаря сопряжению с гидролизом АТФ. Здесь энергия от гидролиза АТФ сначала используется для превращения В–ОН в промежуточное соединение с более высокой энергией, которое затем непосредственно реагирует с А–Н с образованием А–В. Простейший из возможных механизмов основан на переносе фосфата от АТФ к В–ОН с образованием В–О–Р_О₃, и тогда реакция проходит лишь в две стадии:



Реакция конденсации, которая сама по себе энергетически неблагоприятна, происходит, будучи непосредственно сопряжена с гидролизом АТФ в ферментативно катализируемом процессе (рис. 2.59, а).

Так, аминокислота глутамин синтезируется в ходе такой реакции биосинтеза (рис. 2.59, б). Мы вскоре увидим, что подобные (но более сложные) механизмы используются и при создании почти всех больших молекул клетки.

2.2.15. NADH и NADPH — важные переносчики электронов

Другие важные активированные молекулы-носители участвуют в окислительно-восстановительных реакциях и выступают неотъемлемым компонентом сопряженных реакций в клетках. Эти активированные носители специализируются на переносе энергии и атомов водорода. Наиболее важными из таких носителей электронов являются **NAD⁺** (никотинамидадениндинуклеотид) и близкородственная ему молекула **NADP⁺** (никотинамидадениндинуклеотидфосфат). Позже мы разберем некоторые из реакций, в которых они участвуют. И **NAD⁺**, и **NADP⁺** берут по «порции энергии», соответствующей двум высокоэнергетическим электронам, и протон (H⁺), превращаясь при этом соответственно в **NADH** (восстановленный никотинамид-адениндинуклеотид) и **NADPH** (восстановленный никотинамид-адениндинуклеотидфосфат). Так что эти молекулы можно считать и носителями гидридных ионов (H⁺ плюс два электрона, или H⁻).

Подобно АТФ, **NADPH** — активированный носитель, участвующий во многих важных реакциях биосинтеза, которые в ином случае будут энергетически неблагоприятными. **NADPH** синтезируется в клетке согласно общей схеме, представленной на рис. 2.60, а. В ходе ряда специфических энерговыделяющих катаболических реакций атом водорода, наряду с двумя электронами, забирается у молекулы субстрата и присоединяется к никотинамидному кольцу **NADP⁺** с образованием **NADPH** и выделением протона (H⁺) в раствор. Это типичная окислительно-восстановительная реакция; субстрат окисляется, а **NADP⁺** восстанавливается. Структуры **NADP⁺** и **NADPH** представлены на рис. 2.60, б.

NADPH легко расстается с носимым им гидрид-ионом в последующей окислительно-восстановительной реакции, потому что без него никотинамидное кольцо может достигать более устойчивого расположения электронов. В этой реакции, в которой регенерируется **NADP⁺**, теперь уже сам **NADPH** окисляется, а субстрат восстанавливается. **NADPH** служит эффективным донором своего гидрид-иона другим молекулам по той же причине, по которой АТФ легко передает фосфат: в обоих случаях передача сопровождается большим отрицательным изменением свободной энергии. Один из вариантов использования **NADPH** в биосинтезе представлен на рис. 2.61.

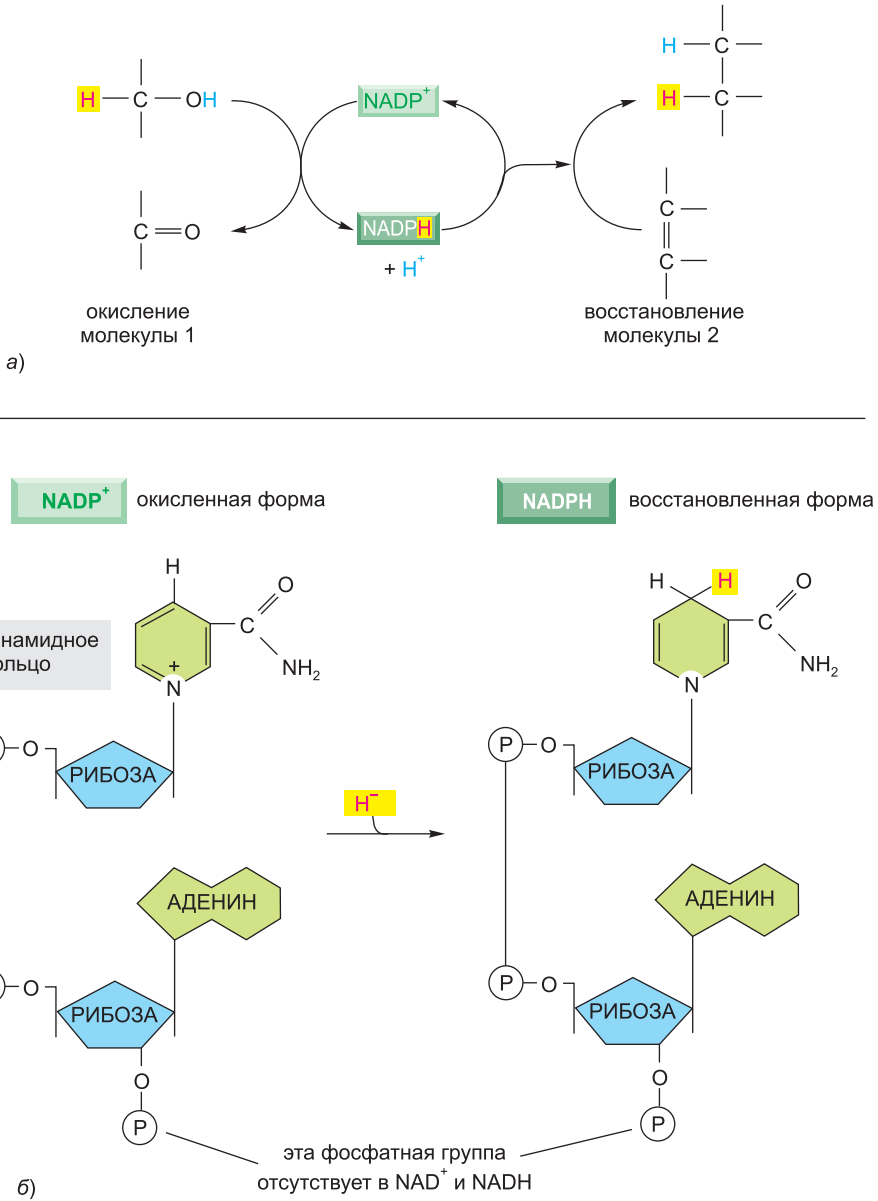


Рис. 2.60. NADPH — важнейший переносчик электронов. а) NADPH образуется в ходе реакций общего типа, показанных слева, в которых два атома водорода удаляются с субстрата. Окисленная форма молекулы-носителя, NADP⁺, приобретает один водородный атом плюс электрон (гидрид-ион); протон (H⁺) другого атома Н высвобождается в раствор. Поскольку NADPH удерживает свой гидрид-ион высокоэнергетической связью, постольку присоединенный гидрид-ион может легко быть передан другим молекулам, как показано справа. б) Структуры NADP⁺ и NADPH. Часть молекулы NADP⁺, известная как никотинамидное кольцо, принимает два электрона вместе с протоном (эквивалент гидрид-иона H⁻), образуя NADPH. Структура молекул NAD⁺ и NADH соответственно идентична NADP⁺ и NADPH, за исключением лишь того, что в составе первых указанная на рисунке фосфатная группа не числится.

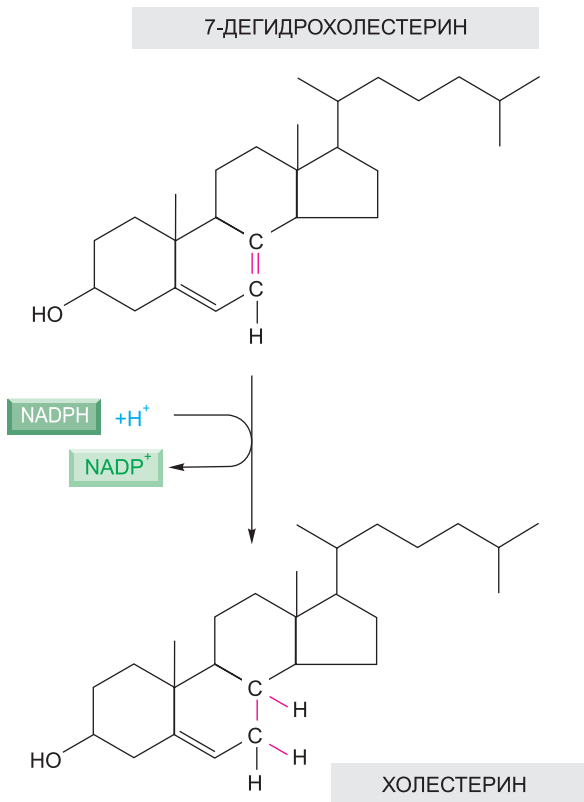
Рис. 2.61. Заключительный этап биосинтеза холестерина. Как и во многих других биосинтетических реакциях, восстановление связи C=C достигается переносом гидрид-иона от молекулы носителя NADPH и протона (H^+) из раствора.

Дополнительная фосфатная группа в составе молекулы NADPH не оказывает никакого влияния на связанные с переносом электронов свойства NADPH по сравнению с NADH, так как расположена далеко от области, задействованной в переносе электронов (см. рис. 2.60, б). Однако она придает молекуле NADPH форму, немного отличную от таковой для NADH, что позволяет NADPH и NADH связываться в качестве субстратов с совершенно разными группами ферментов. Таким образом, носители этих двух типов используются для переноса электронов (или гидрид-ионов) между молекулами из двух разных наборов.

Почему необходимо такое разделение труда? Ответ кроется в потребности независимо регулировать два набора реакций с переносом электронов. NADPH работает в основном с ферментами, которые катализируют анаболические реакции, поставляя высокоэнергетические электроны, необходимые для синтеза богатых энергией биологических молекул. NADH, напротив, играет специальную роль посредника в катаболической системе реакций, которые производят АТФ путем окисления молекул пищи, что мы вскоре обсудим. Образование NADH из NAD^+ и NADPH из $NADP^+$ происходит различными путями и регулируется независимо, так что клетка может регулировать поставку электронов для выполнения этих двух различных задач. Внутри клетки отношение NAD^+ к NADH поддерживается высоким, тогда как отношение $NADP^+$ к NADPH поддерживается низким. В силу этого имеется масса NAD^+ , служащего окислителем, и множество NADPH, выступающего восстановителем, что и требуется для выполнения их специальных задач соответственно в катаболизме и анаболизме.

2.2.16. В клетках существует множество других активированных молекул-переносчиков

Другие активированные носители также принимают и переносят химическую группу с помощью легко передаваемой макроэргической связи. Например, кофермент А несет ацетильную группу, которая может быть легко передана другой молекуле,



и в такой активированной форме известен как **acetylCoA** (ацетилкофермент А). AcetylCoA (рис. 2.62) обычно добавляет два углеродных звена в процессе биосинтеза макромолекул.

В acetylCoA, как и в других молекулах-носителях, передаваемая группа составляет лишь малую часть молекулы. Остальное — это большой органический хвост молекулы, служащий своего рода удобным «держателем», облегчающим опознавание молекулы-носителя специфичными к ней ферментами. Как и в acetylCoA, эта вспомогательная часть очень часто содержит нуклеотид (обычно аденозин) — любопытный факт, который может быть «пережитком» ранних этапов эволюции. В настоящее время думают, что главными катализаторами для первых форм жизни — до ДНК или белков — были молекулы РНК (или близкие им соединения), как описывается в главе 6. Возникает соблазн поразмышлять о заманчивом предположении, согласно которому многие из встречаемых нами сегодня молекул-носителей были родом из этого предшествующего нашему миру РНК, в котором нуклеотидные звенья, возможно, были нужны для связывания с РНК-ферментами.

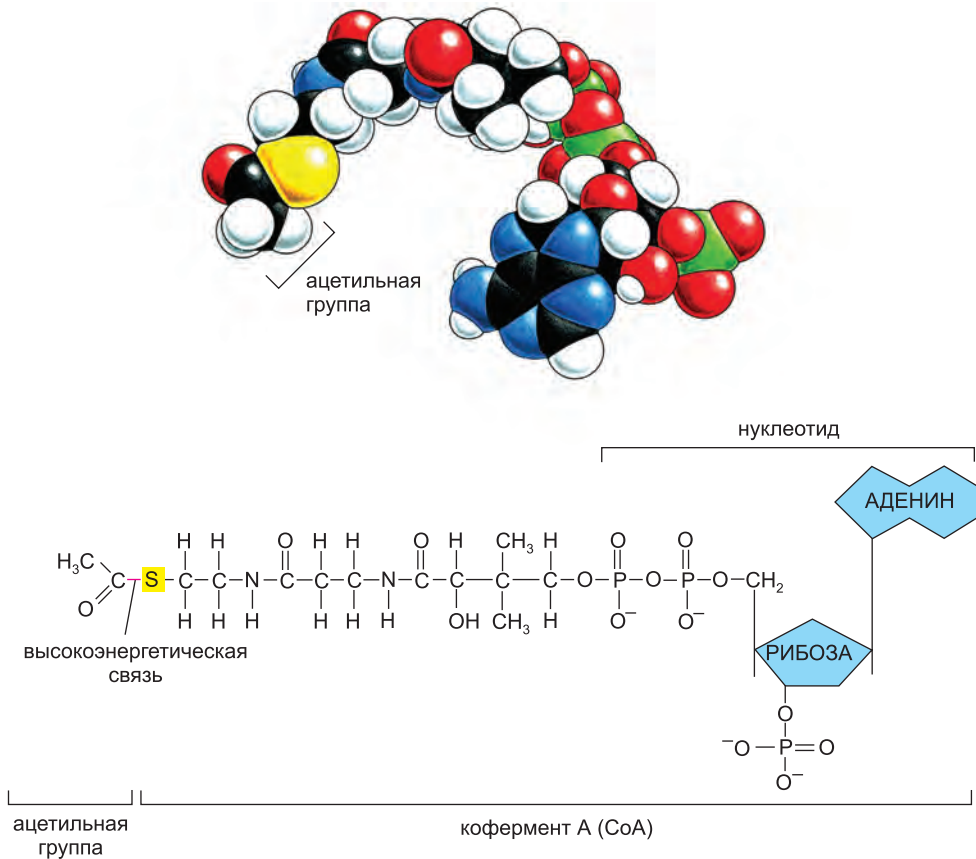


Рис. 2.62. Структура молекулы важного активированного носителя ацетилкофермента А. Объемная модель представлена над структурой вверху. Атом серы (желтый) образует тиозфирную связь с ацетатом. Поскольку это высокоэнергетическая связь, гидролиз которой сопровождается высвобождением большого количества свободной энергии, ацетильная группа может быть легко передана другим молекулам.

На рис. 2.58 и 2.61 представлены примеры определенного типа реакций переноса, энергетически обеспечиваемых активированными молекулами-переносчиками АТФ (перенос фосфата) и NADPH (перенос электронов и водорода). Реакции других активированных молекул-носителей связаны с переносом метильной, карбоксильной группы или остатка глюкозы исключительно для биосинтеза (таблица 2.5). Такие активированные носители образуются в ходе реакций, которые сопряжены с гидролизом АТФ, как в примере на рис. 2.63. Поэтому энергия, которая позволяет использовать их группы для биосинтеза, в конечном счете вырабатывается в ходе катаболических реакций, в результате которых образуется АТФ. Подобные процессы происходят при синтезе очень больших молекул клетки: нуклеиновых кислот, белков и полисахаридов, что мы обсудим далее.

Таблица 2.5. Некоторые из активированных молекул-переносчиков, широко используемых в метаболизме

АКТИВИРОВАННЫЙ ПЕРЕНОСЧИК	ПРИСОЕДИНЯЕМАЯ МАКРОЭРГИЧЕСКОЙ СВЯЗЬЮ ГРУППА
АТФ	фосфат
NADH, NADPH, FADH ₂	электроны и водород
AcetylCoA	ацетильная группа
Карбоксилированный биотин	карбоксильная группа
5-аденозилметионин	метильная группа
Уридиндифосфатглюкоза	глюкоза

2.2.17. Синтез биологических полимеров происходит благодаря гидролизу АТФ

Как обсуждалось ранее, макромолекулы клетки составляют большую часть ее сухой массы, то есть массы без учета воды (см. рис. 2.29). Эти молекулы образуются из субъединиц (или мономеров), которые соединяются друг с другом посредством реакции *конденсации*, в ходе которой у каждой пары реагентов «изымается по частям» молекула воды (ОН плюс Н). Следовательно, обратная реакция — расщепление полимеров всех трех типов — происходит за счет катализируемого ферментом присоединения воды (*гидролиза*). Если реакции гидролиза энергетически благоприятны, то реакции биосинтеза требуют дополнительной энергии (рис. 2.64).

Все эти полимеры — нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), белки и полисахариды — производятся путем многократного присоединения мономера к одному концу наращиваемой цепи. Реакции синтеза макромолекул этих трех типов схематично представлены на рис. 2.65. Как показано в каждом случае, шаг конденсации зависит от энергии, высвободившейся при гидролизе нуклеозидтрифосфата. И все же, за исключением нуклеиновых кислот, в молекулах конечного продукта не остается ни одной фосфатной группы. Каким же образом реакции, которые высвобождают энергию гидролиза АТФ, сопряжены с синтезом полимеров?

Для макромолекулы каждого из указанных типов существует путь ферментативного катализа, который напоминает ранее описанный путь синтеза аминокислоты глутамина (см. рис. 2.59). Принцип в точности тот же самый и состоит в том, что группа ОН, которая будет удалена в реакции конденсации, сначала активируется, будучи «втянутой» в макроэргическую связь со второй молекулой. Однако фак-

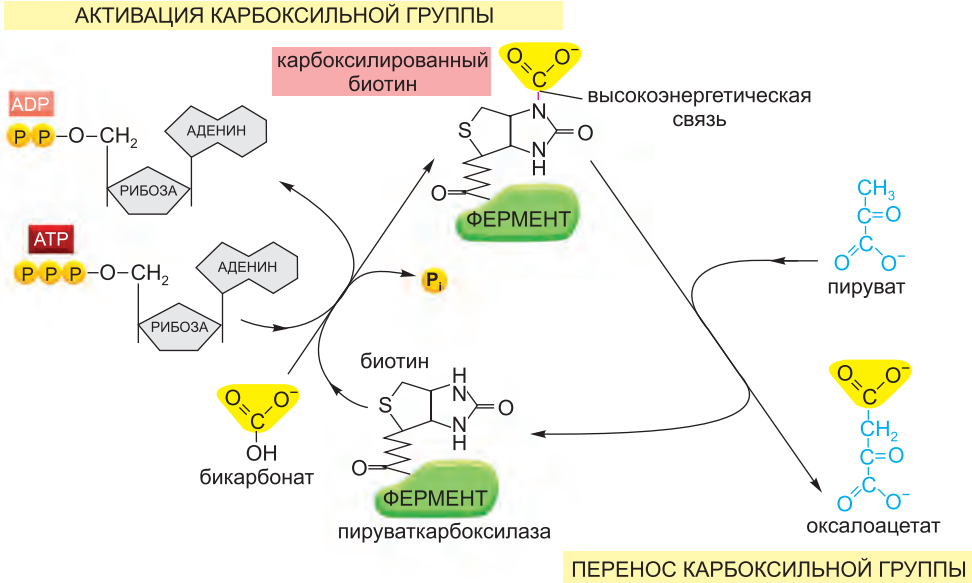


Рис. 2.63. Реакция переноса карбоксильной группы с использованием молекулы активированного носителя. Карбоксилированный биотин используется ферментом *пируваткарбоксилазой* для переноса карбоксильной группы в процессе синтеза оксалоацетата — молекулы, необходимой в цикле лимонной кислоты. В этой реакции акцепторная молекула переносимой группы — пируват. Другие ферменты используют биотин для переноса карбоксильных групп на другие акцепторные молекулы. Обратите внимание, что для синтеза карбоксилированного биотина требуется энергия, которая извлекается из АТФ, — это общая черта многих активированных носителей.

тические механизмы, обеспечивающие неразрывную связь между гидролизом АТФ и синтезом белков и полисахаридов, более сложные, чем используемые при синтезе глутамина, так как для получения конечной макроэргической связи, которая разрывается во время этапа конденсации (рассматривается в главе 6 на примере синтеза белка), необходим ряд промежуточных высокоэнергетических продуктов.

У каждого активированного носителя есть свои пределы возможностей в подпитке реакции биосинтеза. Величина ΔG для гидролиза АТФ до АДФ и неорганического фосфата (P_i) зависит от концентраций всех реагентов, но при обычных

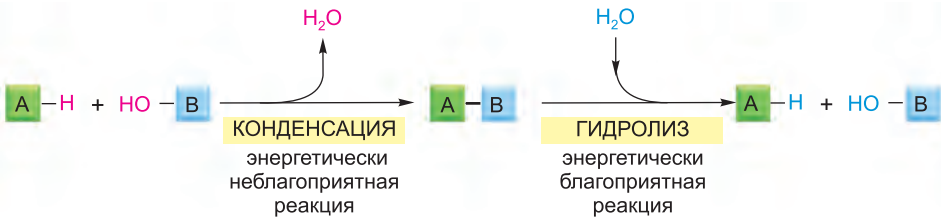


Рис. 2.64. Конденсация и гидролиз как обратные реакции. Макромолекулы клетки — полимеры, которые образуются из субъединиц (или мономеров) посредством реакции конденсации и расщепляются в ходе гидролиза. Все реакции конденсации энергетически неблагоприятны.

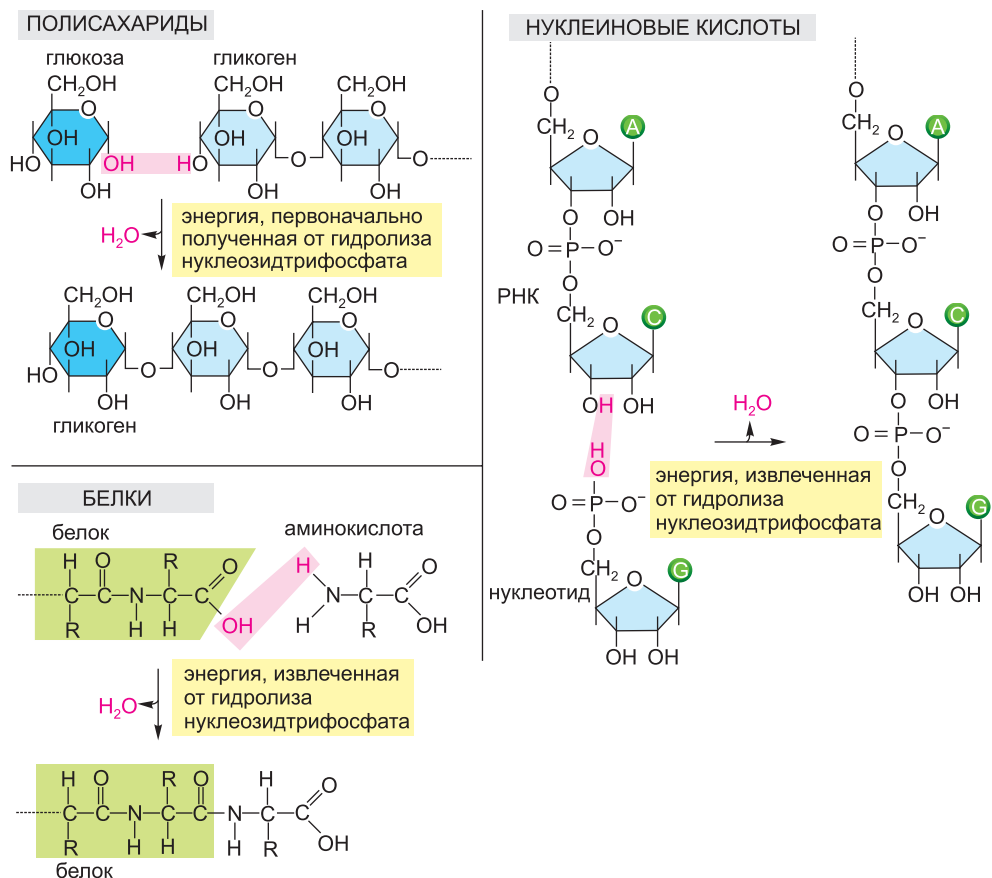


Рис. 2.65. Синтез полисахаридов, белков и нуклеиновых кислот. Синтез биологического полимера любого вида сопряжен с потерей воды в ходе реакции конденсации. На схемах не показано образование высокоэнергетических нуклеозидтрифосфатов, которые необходимы для активации каждого мономера перед его присоединением к цепи. Обратная реакция — расщепление всех трех типов полимеров, наоборот, происходит с присоединением воды (гидролиз).

условиях в клетке она лежит в интервале между -11 и -13 ккал/моль (между -46 и -54 кДж/моль). В принципе, такая реакция гидролиза может стимулировать неблагоприятную реакцию с ΔG приблизительно $+10$ ккал/моль при наличии условий, подходящих для протекания реакции. Для некоторых реакций биосинтеза, однако, даже -13 ккал/моль может оказаться недостаточно. В таких случаях путь гидролиза АТФ может изменяться таким образом, что из него первоначально производится АМР и пирофосфат (PP_i), который на следующем этапе гидролизуется (рис. 2.66). В результате этого процесса общее изменение свободной энергии составляет около -26 ккал/моль. Очень важная реакция биосинтеза, подпитываемая таким способом, — синтез нуклеиновых кислот (полинуклеотидов) из нуклеозидтрифосфатов, как показано в правой части рис. 2.67.

Обратите внимание, что многократно повторяющиеся реакции конденсации, посредством которых создаются макромолекулы, могут быть ориентированы одним из двух способов, в связи с чем полимеризация мономеров может происходить

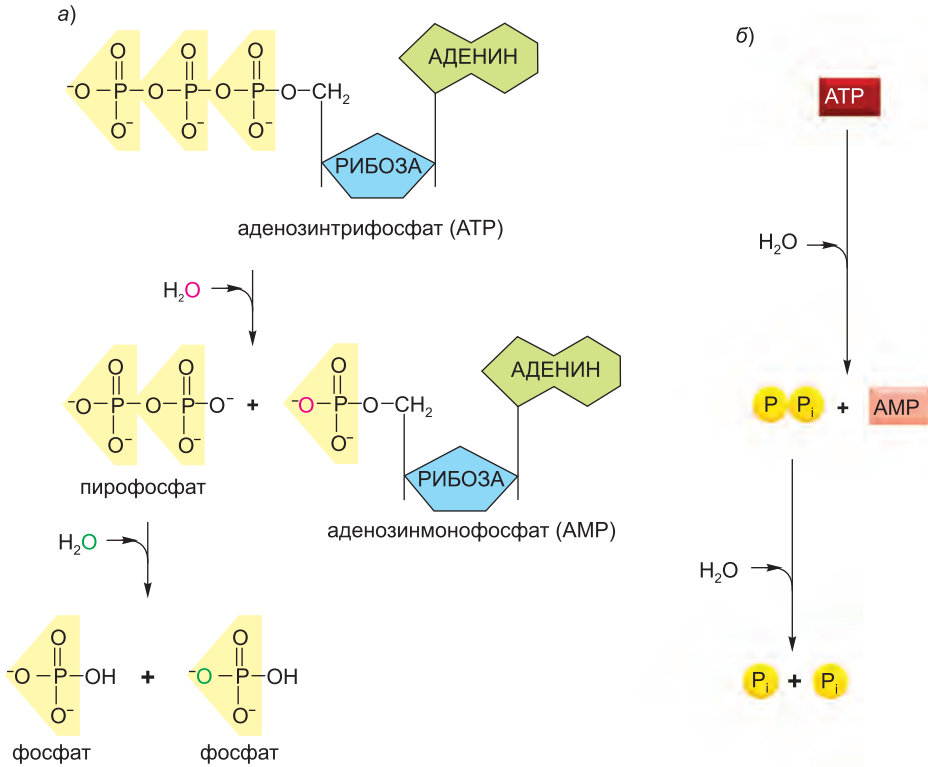


Рис. 2.66. Альтернативный путь гидролиза АТФ: сначала образуется пирофосфат, который затем гидролизуется. На этом биохимическом пути высвобождается вдвое больше свободной энергии, чем в ходе реакции, показанной ранее на рис. 2.57, и вместо ADP образуется AMP. а) В двух последовательных реакциях гидролиза атомы кислорода участвующих молекул воды удерживаются в продуктах, как показано, тогда как атомы водорода диссоциируют с образованием свободных водородных ионов (H^+ , не показаны). б) Общая схема реакции в целом.

«с головы» или «с хвоста». В так называемой *полимеризации с головы* химически активная связь, по которой и идет реакция конденсации, находится на конце наращиваемого полимера, и поэтому она должна восполняться при каждом добавлении мономера к цепи. В данном случае каждый мономер приносит с собой реакционно-способную связь, которая будет использована при добавлении *следующего* очередного мономера. При *полимеризации с хвоста* активная связь каждого мономера используется непосредственно для его же присоединения к цепи (**рис. 2.68**).

В последующих главах мы увидим, что в клетках востребована полимеризация обоих типов. Например, синтез полинуклеотидов и некоторых простых полисахаридов происходит путем полимеризации с хвоста, тогда как синтез белков основан на реакции полимеризации с головы.

Заключение

Живые клетки — это высокоупорядоченные системы, которые, чтобы жить и расти, должны создавать и поддерживать порядок внутри себя. Со-

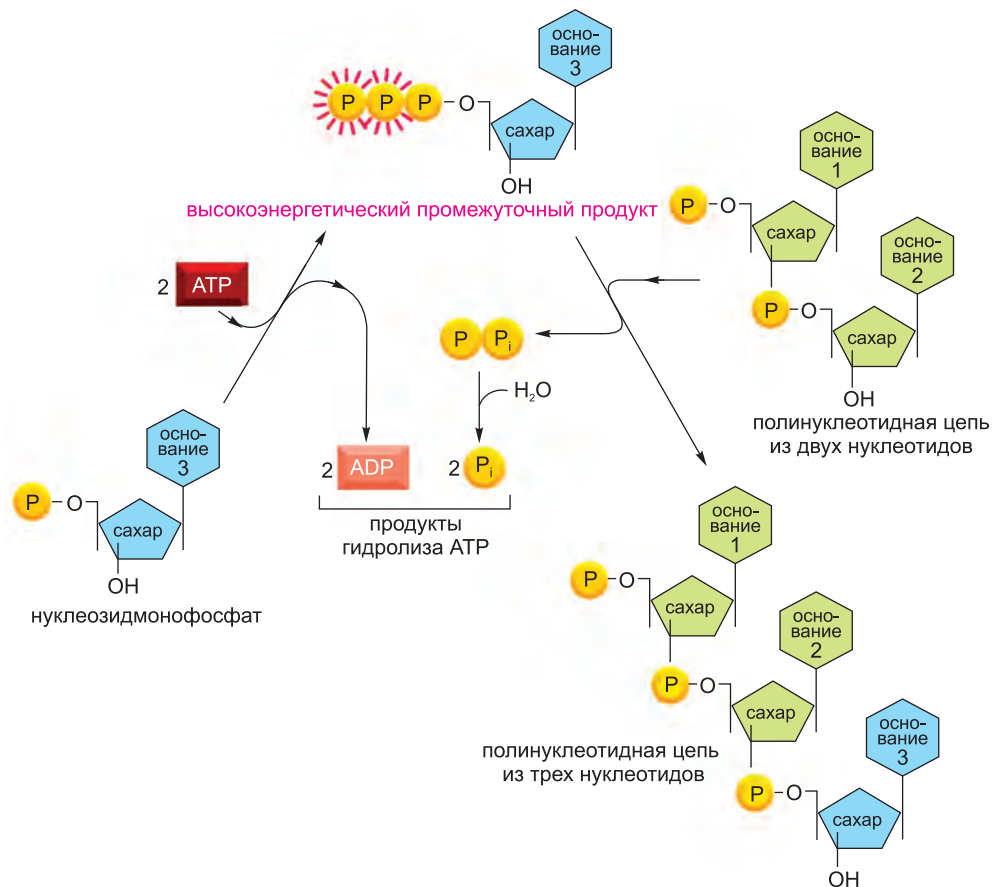


Рис. 2.67. Синтез полинуклеотида, будь это РНК или ДНК, представляет собой многоэтапный процесс, движимый за счет гидролиза АТФ. На первом этапе нуклеозидмонофосфат активируется последовательным переносом концевых фосфатных групп от двух молекул АТФ. Образованный высокоэнергетический промежуточный продукт — нуклеозидтрифосфат — существует в растворе в свободной форме, пока не вступит в реакцию с растущим концом цепи РНК или ДНК, которая сопровождается высвобождением пиррофосфата. Гидролиз последнего до неорганического фосфата — энергетически очень благоприятный процесс, способствующий прохождению реакции в целом в направлении синтеза полинуклеотида. Подробности данного процесса будут раскрыты в главе 5.

гласно законам термодинамики, это возможно только при бесперебойном притоке энергии, часть которой должна выделяться из клеток в окружающую среду в виде теплоты. В конечном счете вся необходимая для жизни энергия поступает в виде электромагнитного излучения Солнца и идет на образование органических молекул в фотосинтезирующих организмах, таких как зеленые растения. Животные получают свою долю энергии, поедая эти органические молекулы и окисляя их в ходе реакций ферментативного катализа, которые сопряжены с образованием АТФ — единственного энергетического актива, ликвидного во всех клетках.

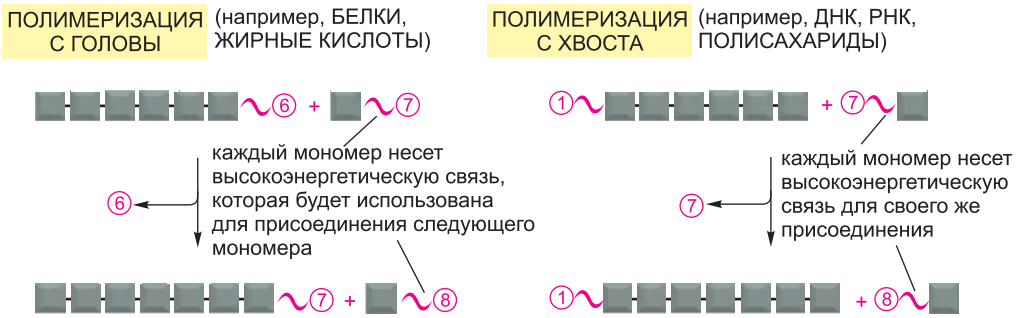


Рис. 2.68. Ориентация активных промежуточных продуктов в повторяющихся циклах реакций конденсации, в ходе которых образуются биологические полимеры. Нарастание полимеров «с головы» в сравнении с его альтернативой — нарастанием «с хвоста». Как показано, эти два механизма используются для построения биологических макромолекул различного типа.

Непрерывное наведение порядка в клетках возможно лишь благодаря сопряжению энергетически неблагоприятных реакций с энергетически благоприятным гидролизом АТФ. При биосинтезе макромолекул это достигается путем переноса фосфатных групп с образованием химически активных фосфорилированных промежуточных продуктов. Поскольку энергетически неблагоприятная реакция теперь становится энергетически благоприятной, гидролиз АТФ, можно сказать, «продвигает» реакцию. Полимерные молекулы, такие как белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды, собираются из маленьких активированных молекул-предшественников в ходе повторяющихся реакций конденсации, движущей силой которых тоже является гидролиз АТФ. Другие химически активные молекулы, называемые либо активными носителями, либо коферментами, в процессе биосинтеза переносят другие химические группы: например, NADPH переносит водород в виде протона с парой электронов (гидрид-ион), тогда как acetylCoA переносит ацетильную группу.

2.3. Каким образом клетки добывают энергию из пищи?

Неиссякаемый поток энергии, необходимый клеткам для созидания и поддержания биологического порядка, благодаря которому они остаются живыми, зарождается в богатых энергией связях молекул пищи, которые, таким образом, служат для клеток своего рода горючим.

Белки, липиды и полисахариды, которые составляют большую часть нашей пищи, должны быть расщеплены до небольших молекул, прежде чем наши клетки смогут использовать их — или как источник энергии, или как кирпичики для построения других молекул. В ходе ферментативного переваривания большие полимерные молекулы, поступившие из пищи, распадаются на мономерные субъединицы: белки — на аминокислоты, полисахариды — на сахара, жиры — на жирные кислоты и глицерин. После переваривания маленькие органические молекулы, полученные из пищи, поступают в цитозоль клеток, где начинается их последовательное окисление.

Сахара — особенно важные молекулы горючего, они окисляются поэтапно, небольшими управляемыми шажками, до углекислого газа (CO₂) и воды (рис. 2.69).

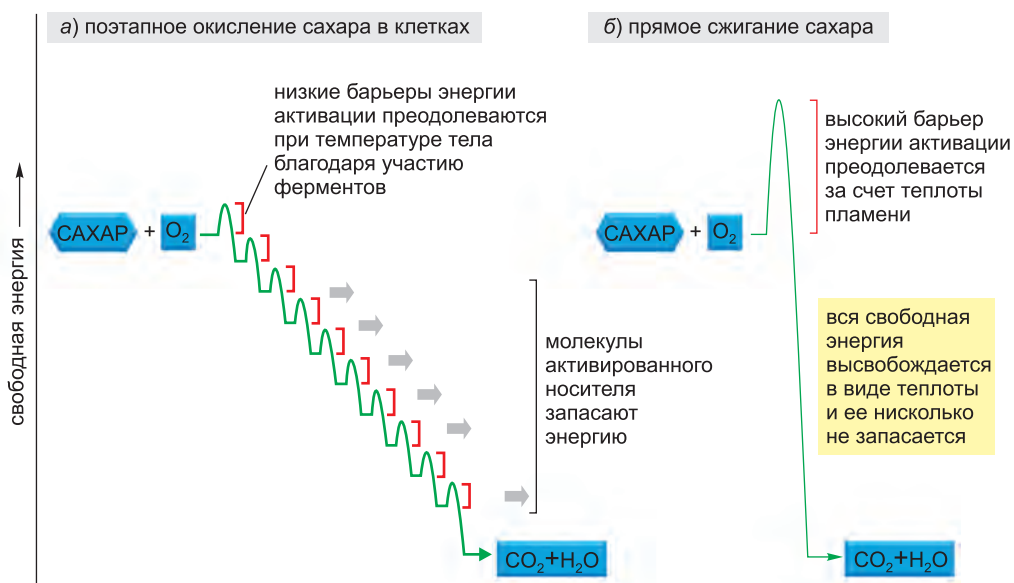


Рис. 2.69. Схематичное представление управляемого поэтапного окисления сахара в клетке в сравнении с обычным сжиганием. а) В клетке ферменты катализируют окисление через несколько следующих друг за другом этапов, на каждом из которых свободная энергия сообщается (в соответствующем количестве) молекулам-носителям — чаще всего АТФ и NADH. На каждом этапе реакцией управляет фермент, снижая барьер энергии активации, который должен быть преодолен, прежде чем данная реакция сможет произойти. Полная свободная энергия, высвобождаемая в вариантах а и б, в точности одна и та же. Но если бы сахар был окислен до CO₂ и H₂O за один прием, как в случае б, то при этом количество высвободившейся энергии превышало бы то, которое может быть поглощено с «пользой для дела» (как полезная энергия).

В этом параграфе мы прослеживаем главные этапы расщепления, или катаболизма, сахаров и показываем, как на этих этапах образуются АТФ, NADH и другие активированные молекулы-носители в животных клетках. Весьма схожий путь протекания этих процессов наблюдается также у растений, грибов и многих бактерий. Как мы покажем, окисление жирных кислот столь же важно для клеток. Другие молекулы, такие как белки, тоже могут служить источниками энергии, будучи направлены по соответствующим ферментативным путям.

2.3.1. Основной способ производства АТФ — гликолиз

Основной процесс окисления сахаров представлен цепочкой реакций и известен под названием **гликолиз** — от греческих слов *glukus*, «конфета»⁷, и *lisis*, «разрыв». Благодаря гликолизу АТФ производится без участия молекулярного кислорода (газа O₂). Гликолиз идет в цитозоле большинства клеток, в том числе и во многих анаэробных микроорганизмах (тех, что могут жить, не потребляя молекулярный

⁷ Безусловно, что «конфеты» древних греков отличались от улаждающих наш вкус произведений современной кондитерской промышленности. Прототипом сих лакомств могли служить всякие вареные пласти в форме небольших кусочков или плиточек из различных плодов и пряностей, сваренных с сахаром и другими сладкими веществами. — *Прим. пер.*

кислород). Вероятно, гликолиз появился в ходе эволюции с первыми проблесками зари, осветившей жизнь на нашей планете, задолго до того, как фотосинтезирующие организмы вдохнули кислород в ее атмосферу. В процессе гликолиза, молекула глюкозы с шестью атомами углерода превращается в две молекулы *пирувата*, каждая из которых содержит по три атома углерода. На каждую молекулу глюкозы гидролизуются две молекулы АТФ, что обеспечивает энергией ранние этапы гликолиза, но зато на более поздних его этапах производятся четыре молекулы АТФ. Следовательно, в конце гликолиза имеется чистый выигрыш в виде двух молекул АТФ на каждую расщепленную молекулу глюкозы.

Поэтапный процесс гликолиза схематично представлен на **рис. 2.70**, а более подробно показан в приложении 2.8 (**стр. 120–121**). Гликолиз включает последовательность из 10 самостоятельных реакций, в каждой из которых образуется «свой» промежуточный продукт и каждую из которых катализирует «свой» фермент. Как и у большинства их собратьев, названия последних оканчиваются «азой» — так, например, изомераза и дегидрогеназа, — причем такое окончание указывает на тип катализируемой ими реакции.

Хотя при гликолизе вообще не используется молекулярный кислород, окисление происходит и проявляется это в том, что NAD^+ снимает электроны (образуя при этом NADH) с некоторых атомов углерода исходной молекулы глюкозы. В силу ступенчатого характера этого процесса энергия окисления высвобождается малыми порциями, так что большая часть ее запасается в активированных молекулах-носителях, а не выделяется целиком в виде теплоты (см. рис. 2.69). Таким образом, часть энергии, высвобождаемой при окислении, идет на прямой синтез молекул АТФ из ADP и P_i , а некоторая доля остается вместе с электронами в носителе высокоэнергетических электронов — NADH .

На одну молекулу глюкозы в ходе гликолиза образуются две молекулы NADH . В аэробных организмах (тех, которым жизненно необходим молекулярный кислород) эти молекулы NADH поставляют свои электроны в цепь переноса электронов, описанную в главе 14, и NAD^+ , образующийся из NADH , вновь используется в реакциях процесса гликолиза (см. 6-й этап в приложении 2.8, **стр. 120–121**).

2.3.2. В процессе брожения АТФ образуется в отсутствие кислорода

Для большинства животных и растительных клеток гликолиз служит лишь предлюдей к заключительному действию расщепления молекул пищи. В этих клетках пируват, образующийся в процессе гликолиза, быстро переносится в митохондрии, где превращается в CO_2 и acetylCoA , который затем полностью окисляется до CO_2 и H_2O .

В противоположность упомянутым аэробам, для многих анаэробных организмов — тех, что не используют молекулярный кислород и могут расти и делиться без него, — гликолиз является основным источником АТФ в клетках. Это верно также и для некоторых животных тканей, образующих, например, мышцы скелета, которые способны продолжать свою работу при ограниченном содержании молекулярного кислорода. В таких анаэробных условиях пируват и электроны NADH остаются в цитозоле. Пируват превращается в продукты, выделяемые из клетки, например, в этанол и CO_2 у дрожжей, что используется в пивоварении и хлебопечении, или в лактат в мышцах. В этом процессе NADH расщепляется со своими электронами и превращается обратно в NAD^+ . Эта регенерация NAD^+ необходима для поддержания реакций гликолиза (**рис. 2.71**).

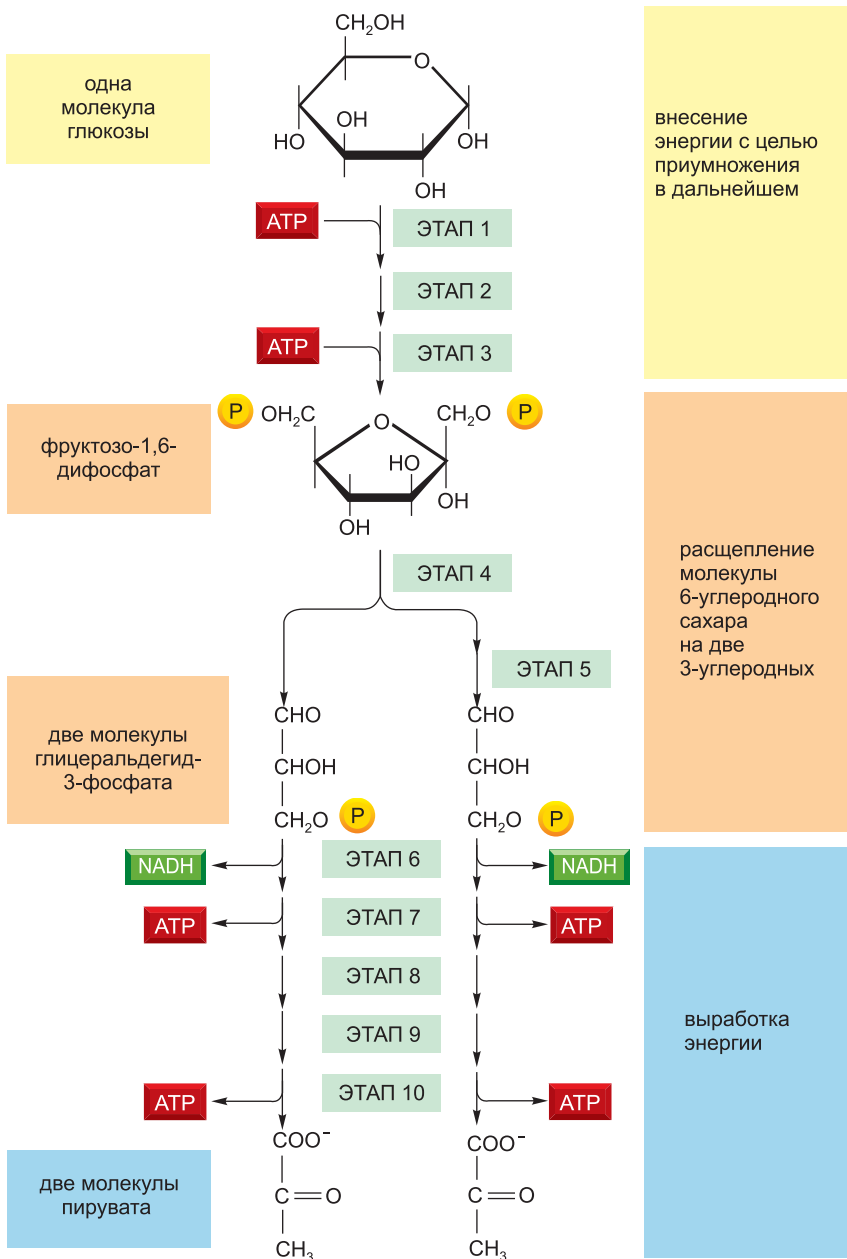


Рис. 2.70. Общая схема гликолиза. Каждый из 10-ти показанных этапов катализируется своим ферментом. Обратите внимание, что на 4-м этапе молекула шестиуглеродного сахара расщепляется на два трехуглеродных глицеральдегида, так что число молекул на каждом этапе после этого удваивается. Обратите внимание, что с 6-го этапа начинается генерирующая энергию стадия гликолиза. Поскольку две молекулы ATP гидролизуются на ранней — энергопотребляющей — стадии, на выходе получаем, что в результате гликолиза одной молекулы глюкозы образуется 2 молекулы ATP и 2 молекулы NADH (см. также приложение 2.8).

БРОЖЕНИЕ С ВЫДЕЛЕНИЕМ ЛАКТАТА

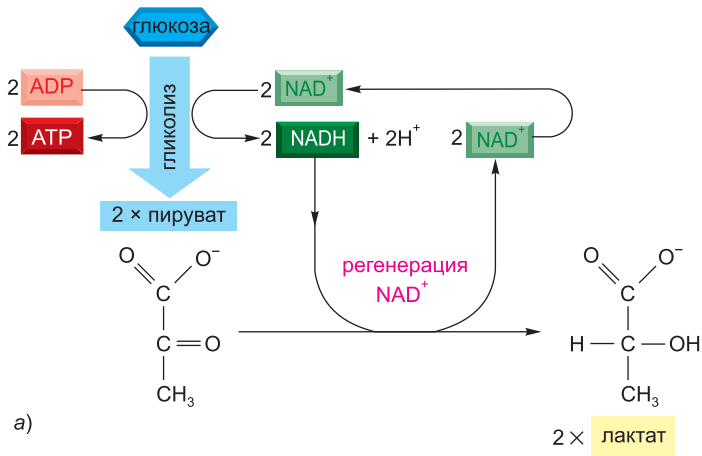
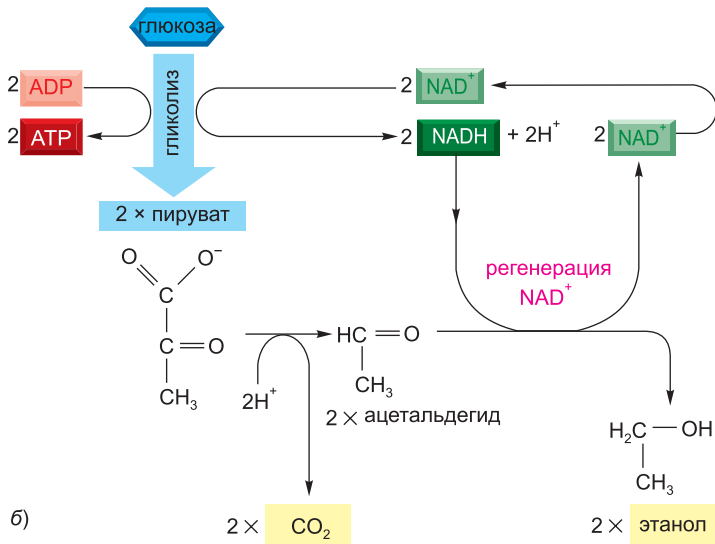
БРОЖЕНИЕ С ВЫДЕЛЕНИЕМ СПИРТА И CO₂

Рис. 2.71. Два пути анаэробного расщепления пирувата. а) При недостатке кислорода — например, в мышечной клетке, испытывающей энергичное сокращение, — пируват, произведенный в ходе гликолиза, превращается в лактат, как показано на рисунке. В этой реакции регенерируется NAD⁺, использованный на 6-м этапе гликолиза, но в целом в результате такого пути выход энергии намного меньше, чем при полном окислении. б) В некоторых организмах, которые могут расти анаэробно (таких как дрожжи), пируват превращается через ацетальдегид в углекислый газ и этанол. Опять же этот путь приводит к образованию NAD⁺ из NADH, что необходимо для продолжения гликолиза. На рисунках, как а, так и б, представлены примеры процесса брожения.

Такие анаэробные пути реакций, сопровождающихся выделением энергии, называют **брожением**. Исследование важных для пищевой промышленности путей брожения, вызываемого дрожжами, во многом подстегнули развитие биохимии в на-

чале ее становления. Работа в этом направлении в XIX столетии привела в 1896 г. к поразительному для того времени открытию, что эти процессы можно изучать вне живых организмов — в клеточных экстрактах. Это совершившее переворот в науке открытие в конечном счете позволило вычлениать и изучать каждую самостоятельную реакцию процесса брожения. В 1930-е годы собранный по кусочкам полный путь гликолиза стал главным триумфом биохимии, после чего вскоре последовало признание центральной роли АТФ в жизненных процессах клетки. Таким образом, почти все основополагающие концепции, рассмотренные в этой главе, утвердились в течение многих лет.

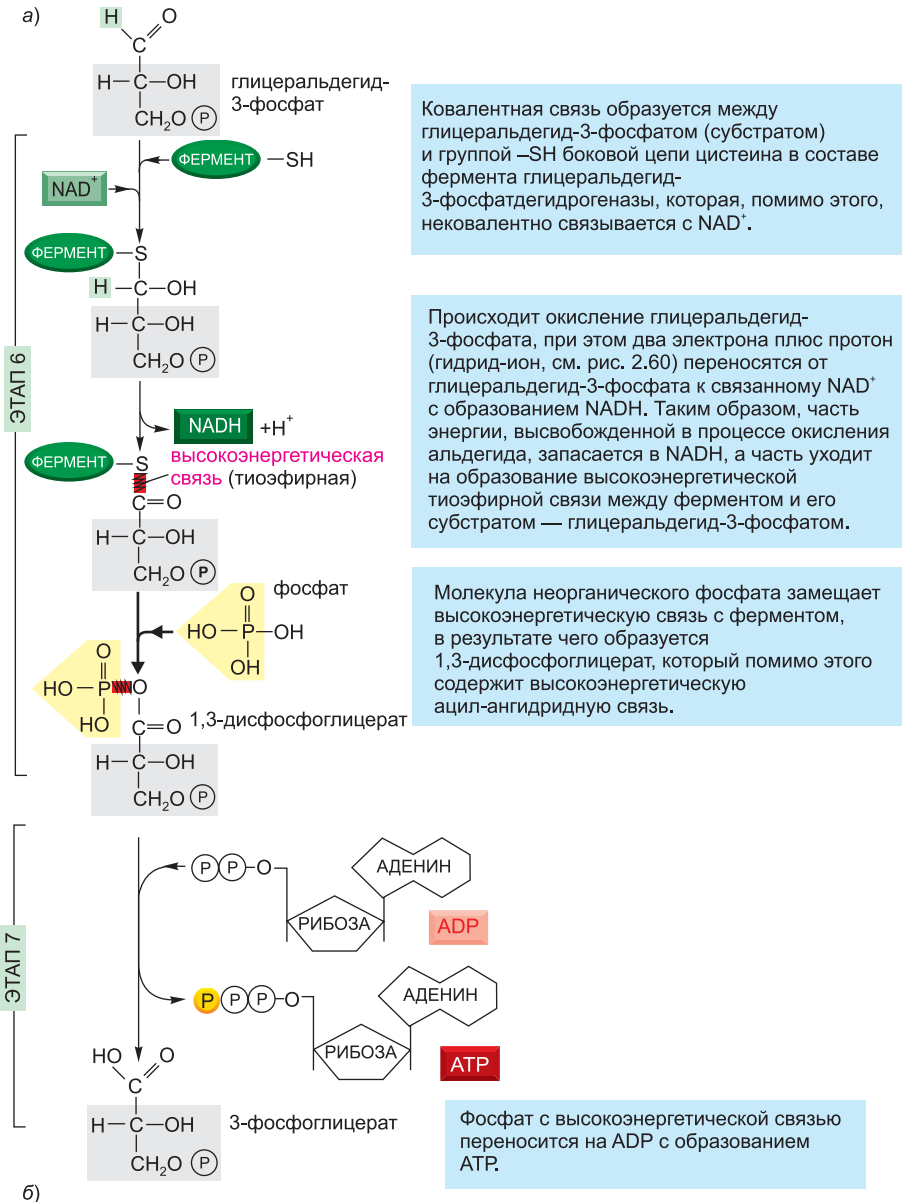
2.3.3. Гликолиз как наглядная иллюстрация метаболического пути, на котором окисление сопряжено с запасанием энергии

Возвращаясь к аналогии с лопастным колесом, к которой мы прибегали для представления сопряженных реакций (см. рис. 2.56), теперь мы можем сравнить ферменты с колесом с лопастями. Ферменты служат для того, чтобы собирать полезную энергию, извлеченную при окислении органических молекул, путем сопряжения энергетически неблагоприятной реакции с благоприятной. Чтобы продемонстрировать такое сопряжение, мы рассмотрим этап гликолиза, дабы представлять механизм таких реакций.

В ходе двух основных реакций гликолиза (этапы 6 и 7) промежуточный продукт — трехуглеродный глицеральдегид-3-фосфат (альдегид) превращается в 3-фосфоглицерат (остаток карбоновой кислоты; см. приложение 2.8, **стр. 120–121**). Так что в ходе двухступенчатой реакции происходит окисление альдегидной группы до карбоксильной. В результате высвобождается количество свободной энергии, достаточное для превращения молекулы ADP в АТФ и переноса двух электронов от альдегида к NAD^+ с образованием NADH, при этом в окружающую среду выделяется достаточно теплоты, благодаря чему вся реакция в целом остается энергетически благоприятной (ΔG° суммарной реакции составляет $-3,0$ ккал/моль).

На **рис. 2.72** приведен образец искусного ремесла — аккумуляции энергии. Представленные химические реакции с большой точностью осуществляют два фермента, с которыми прочно связаны промежуточные продукты гликолиза. Фактически, как подробно показано на рис. 2.72, первый фермент (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) через активную группу $-\text{SH}$ образует короткоживущую ковалентную связь с альдегидом и в этом присоединенном состоянии катализирует его окисление при участии NAD^+ . Затем реакционно-способная связь фермент-субстрат разрушается под действием иона неорганического фосфата с образованием промежуточного продукта — высокоэнергетического фосфата, который высвобождается с фермента. Этот промежуточный продукт связывается со вторым ферментом (фосфоглицераткиназой), который катализирует энергетически благоприятный перенос только что образовавшегося высокоэнергетического фосфата на ADP, в результате чего образуется АТФ и завершается процесс окисления альдегида до карбоновой кислоты.

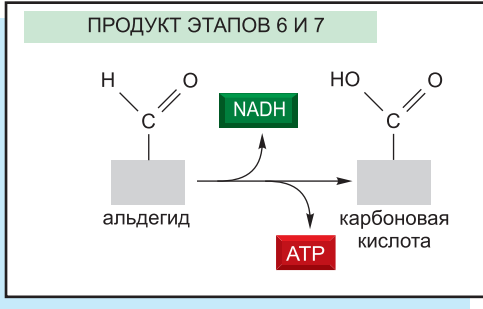
На этом отдельно взятом процессе окисления мы остановились достаточно подробно, потому как он служит наглядным примером опосредствованного ферментами способа накопления энергии в ходе сопряженных реакций (**рис. 2.73**). Этапы 6 и 7 суть единственные реакции в процессе гликолиза, в ходе которых прямо из неорганического фосфата образуется богатая энергией фосфатная связь. Это-то



Ковалентная связь образуется между глицеральдегид-3-фосфатом (субстратом) и группой —SH боковой цепи цистеина в составе фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, которая, помимо этого, нековалентно связывается с NAD⁺.

Происходит окисление глицеральдегид-3-фосфата, при этом два электрона плюс протон (гидрид-ион, см. рис. 2.60) переносятся от глицеральдегид-3-фосфата к связанному NAD⁺ с образованием NADH. Таким образом, часть энергии, высвобожденной в процессе окисления альдегида, запасается в NADH, а часть уходит на образование высокоэнергетической тиозфирной связи между ферментом и его субстратом — глицеральдегид-3-фосфатом.

Молекула неорганического фосфата замещает высокоэнергетическую связь с ферментом, в результате чего образуется 1,3-дифосфоглицерат, который помимо этого содержит высокоэнергетическую ацил-ангидридную связь.



Большая часть энергии окисления запасена в активированных носителях АТФ и NADH.

и обеспечивает «чистую выручку» в виде двух молекул АТФ и двух молекул NADH на одну молекулу глюкозы (см. приложение 2.8, **стр. 120–121**).

Как только что было показано, АТФ может быть легко образована из ADP, когда образующийся в ходе реакции промежуточный продукт несет фосфатную связь, энергия которой выше, чем у фосфатной связи в АТФ. Фосфатные связи можно выстроить в ряд по энергии, сравнивая стандартное изменение свободной энергии (ΔG°) разрыва каждой такой связи в реакции гидролиза. На **рис. 2.74** приведено сравнение высокоэнергетических фосфоангидридных связей в АТФ с энергией некоторых других фосфатных связей, некоторые из которых возникают в процессе гликолиза.

2.3.4. Организмы запасают молекулы питательных веществ в специальных хранилищах

Все организмы для сохранения биологического порядка в своих клетках должны поддерживать высокое значение соотношения АТФ/ADP. И это при том, что животные имеют лишь периодический доступ к пище, а растениям приходится проводить целую ночь без солнечного света, так что в этот период они не могут производить сахар путем фотосинтеза. По этой причине и растения, и животные переводят сахара и жиры в специальную, пригодную для хранения форму (**рис. 2.75**).

Дабы скрасить свои порой затяжные периоды постов, животные запасают жирные кислоты в виде капелек жира, состоящих из нерастворимых в воде триацилглицеринов, преимущественно в цитоплазме специализированных жировых клеток, названных адипоцитами. На более короткие сроки сахар запасается в виде глюкозных звеньев большого разветвленного полисахарида **гликогена**, который присутствует в форме маленьких гранул в цитоплазме многих клеток, в том числе печени и мышц. Синтез и расщепление гликогена хорошо регулируются — согласно потребности. Когда клетки нуждаются в большем количестве АТФ, чем они могут получить из молекул питательных веществ, поступающих с кровотоком, происходит расщепление гликогена с образованием глюкозо-1-фосфата, который быстро превращается в глюкозо-6-фосфат для последующего гликолиза.

Рис. 2.72. Аккумуляция энергии на 6-м и 7-м этапах гликолиза. На этих этапах окисление альдегида до карбоновой кислоты сопряжено с образованием АТФ и NADH. а) Этап 6 начинается с образования ковалентной связи между субстратом (глицеральдегид-3-фосфатом) и группой $-SH$, экспонированной на поверхности фермента (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы). После этого фермент катализирует перенос водорода (в виде гидрид-иона — протона с двумя электронами) от связанного глицеральдегид-3-фосфата на молекулу NAD^+ . Часть энергии, высвобождаемой при этом, идет на образование молекулы NADH, а часть используется для превращения первоначально образовавшейся связи между ферментом и его субстратом в высокоэнергетическую тиоэфирную связь (выделена *красным*). Затем молекула неорганического фосфата замещает эту высокоэнергетическую связь субстрата с ферментом, создавая вместо нее высокоэнергетическую фосфатную связь (*красная*). В этот момент фермент не только запасает энергию в форме NADH, но и сводит воедино энергетически благоприятное окисление альдегида и энергетически неблагоприятное образование высокоэнергетической фосфатной связи. Вторая реакция осуществляется за счет первой, напоминая сопряженное с «лопастным колесом» устройство на рис. 2.56.

На 7-м этапе гликолиза только что произведенный высокоэнергетический промежуточный продукт 1,3-дифосфоглицерат связывается со вторым ферментом — фосфоглицераткиназой. Химически активный фосфат переносится на ADP, образуя молекулу АТФ и высвобождая тем самым карбоксильную группу на окисленном продукте.

б) Итог всех химических превращений, произошедших на этапах 6 и 7 гликолиза.

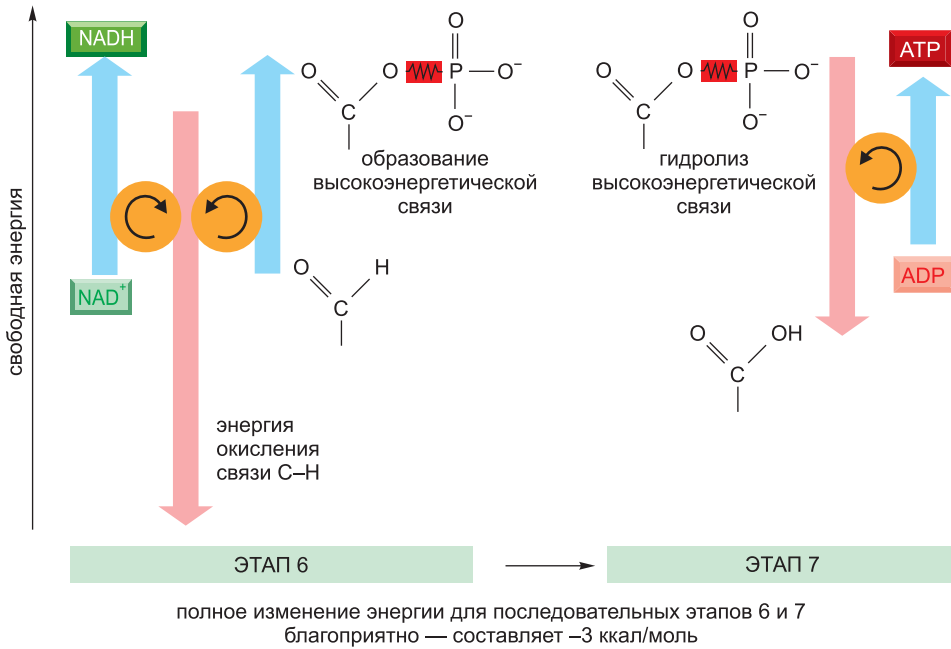


Рис. 2.73. Схематичное представление сопряженных реакций, в ходе которых образуются NADH и ATP на 6-м и 7-м этапах гликолиза. Энергия окисления связи C-H обеспечивает образование NADH, и высокоэнергетической связи с фосфатом. Разрыв высокоэнергетической связи впоследствии приводит к образованию ATP.

В количественном отношении **жир** для животных намного ценнее гликогена в качестве накопителя энергии, обеспечивая более эффективную аккумуляцию. Окисление одного грамма жира дает примерно вдвое больше энергии, чем окисление грамма гликогена. Более того, гликоген отличается от жира наличием большого количества связанной с ним воды, в результате чего для аккумуляции одного и того же количества энергии гликогена, по фактической массе, требуется в шесть раз больше, чем жира. Среднестатистический взрослый человек сохраняет количество гликогена, достаточное приблизительно лишь на один день обычной жизни, и количество жира, достаточное для поддержания жизни в течение почти месяца. Если бы наш главный топливный бак пришлось заполнить гликогеном вместо жира, то масса нашего тела возросла бы в среднем приблизительно на 60 фунтов⁸.

Хотя растения производят NADPH и ATP путем фотосинтеза, сей важный процесс происходит в специализированной органелле, названной хлоропластом, которая отделена от остальной части растительной клетки мембраной, не проницаемой для молекул активированных носителей обоих типов. Более того, растение содержит много других клеток — например, находящихся в корнях, — которые не имеют хлоропластов и поэтому не могут производить свои собственные сахара. Поэтому в плане производства своего ATP растение во многом полагается на экспорт своих сахаров из хлоропластов в митохондрии, которыми располагают все клетки растения. Львиная доля ATP, необходимого растению, синтезируется в этих

⁸) Мы стали бы тяжелее на 27,2 кг. — Прим. пер.

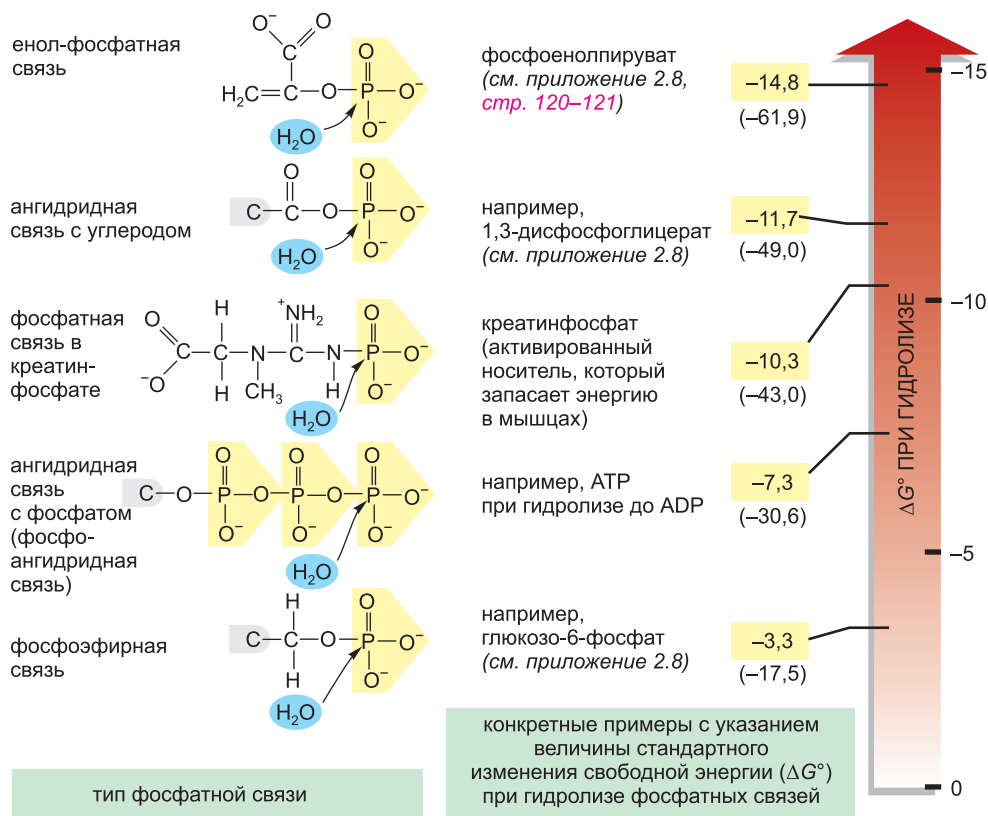
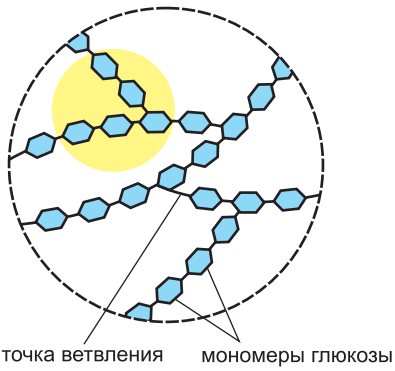


Рис. 2.74. Фосфатные связи с различной энергоемкостью. В молекулах, изображенных слева, показаны фосфатные связи различных типов с их сайтами гидролиза. Те, которые начинаются с *серого* атома углерода, представлены только частью молекулы. Справа даны примеры молекул, содержащих такие связи, при этом изменение свободной энергии при гидролизе выражено в килокалориях (килоджоули в круглых скобках). Перенос фосфатной группы от одной молекулы к другой энергетически благоприятен, если стандартное изменение свободной энергии (ΔG°) при гидролизе фосфатной связи первой молекулы более отрицательно, чем таковое при гидролизе фосфатной связи второй молекулы. Таким образом, фосфатная группа легко переносится с 1,3-дифосфоглицерата на АДФ с образованием АТФ. Реакцию гидролиза можно рассматривать как перенос фосфатной группы на воду.

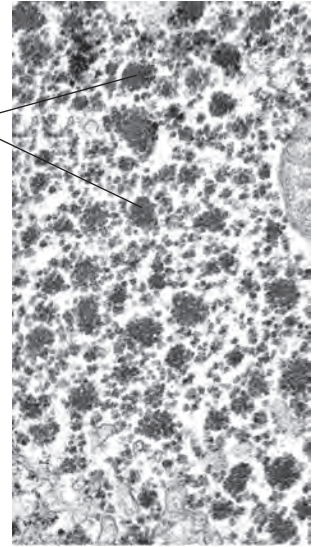
митохондриях и экспортируется из них в остальные части растительной клетки, при этом используются точно такие же пути окислительного расщепления сахаров, как и у нефотосинтезирующих организмов (рис. 2.76).

В дневное время, в периоды избыточной фотосинтетической деятельности, хлоропласты превращают часть вырабатываемых сахаров в жиры и **крахмал** — полимер глюкозы, аналогичный гликогену животных. Жиры в растениях представлены триацилглицеринами, точно так же, как и жиры у животных, и отличаются только типом преобладающих жирных кислот. И жир, и крахмал запасаются в хлоропласте в форме резервуаров, которым предстоит быть пущенными в оборот в качестве источника энергии в ночное время (см. рис. 2.75, в).

Зародыши в семенах растений должны жить на запасенных источниках энергии в течение длительного периода — пока не проклюнутся и не распустятся листья,

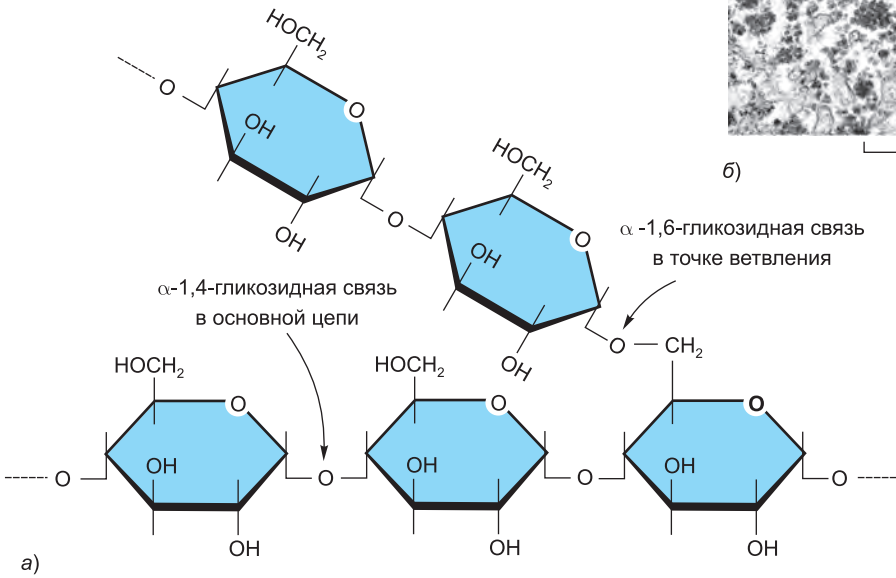


гранулы гликогена в цитоплазме клетки печени

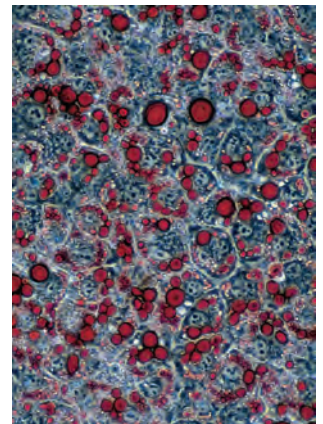


1 мкм

б)



в)



50 мкм

г)

которыми молодое растение сможет вбирать энергию солнечного света. По этой причине семена растений часто содержат особо внушительные количества жиров и крахмала, благодаря чему служат главным источником пищи для животных, а также и для нас с вами (рис. 2.77).

2.3.5. Между приемами пищи большая часть животных клеток извлекает необходимую им энергию из жирных кислот

После роскошной трапезы большая часть энергии, необходимой животному, извлекается из сахаров, усвоенных, в свою очередь, из пищи. Излишек сахаров, при его наличии, используется для пополнения исчерпанных запасов гликогена или для синтеза жиров в качестве запаса продовольствия. Но в скором времени жир, запасенный в жировой ткани, пускается в оборот, и к утру, после ночного воздержания, большая часть необходимой нам АТФ производится уже в результате окисления жирных кислот.

При низких уровнях глюкозы в крови запускается процесс расщепления жиров для производства энергии. Как показано на рис. 2.78, триацилглицерин, запасенный в жировых капельках адипоцитов, подвергается гидролизу с образованием жирных кислот и глицерина, а высвобождаемые жирные кислоты переносятся к клеткам тела через кровоток. Хотя животные легко преобразуют сахара в жиры, они не способны переводить жирные кислоты в сахара. Вместо этого, жирные кислоты окисляются напрямую.

2.3.6. И сахара, и жиры расщепляются в митохондриях до acetylCoA

При аэробном метаболизме пируват, образующийся в процессе проходящего в цитозоле гликолиза из сахаров, переносится в митохондрии ядерных клеток. Там гигантский комплекс из трех ферментов, названный комплексом пируватдегидрогеназы, быстро его декарбоксилирует. В результате декарбоксилирования пирувата получается молекула CO_2 (побочный продукт), молекула NADH и молекула acetylCoA (рис. 2.79).

Жирные кислоты, импортированные из кровотока, перемещаются в митохондрии, где и происходит процесс их окисления (рис. 2.80). Каждая молекула жирной кислоты (в виде активированной молекулы acylCoA жирной кислоты) полностью расщепляется в круговерти реакций, где на каждом витке цикла одновременно теряется сразу два атома углерода с карбоксильного конца и образуется одна молекула acetylCoA. Продуктами данного процесса будут также молекула NADH и молекула FADH_2 (рис. 2.81).

Сахара и жиры — главные источники энергии для большинства нефотосинтезирующих организмов, в том числе и людей. Однако основная доля полезной

Рис. 2.75. Хранение сахаров и жиров в животной и растительной клетках. а) Структуры крахмала и гликогена — формы хранения сахаров у растений и животных соответственно. Оба вещества представляют собой полимеры глюкозы и отличаются только частотой точек ветвления (желтая область показана ниже в увеличенном масштабе). Разветвленность цепи гликогена гораздо выше, чем крахмала. б) На электронной микрофотографии видны гранулы гликогена в цитоплазме клетки печени. в) Тонкий срез хлоропласта клетки растения — видны гранулы крахмала и липида (капельки жира), которые накопились в результате биосинтетических реакций. г) Жировые капельки (окрашены красным) на начальном этапе накопления в развивающихся жировых клетках животного. (Снимок б — любезность Robert Fletterick и Daniel S. Friend; в — любезность K. Plaskitt; г — любезность Ronald M. Evans и Peter Totonoz.)

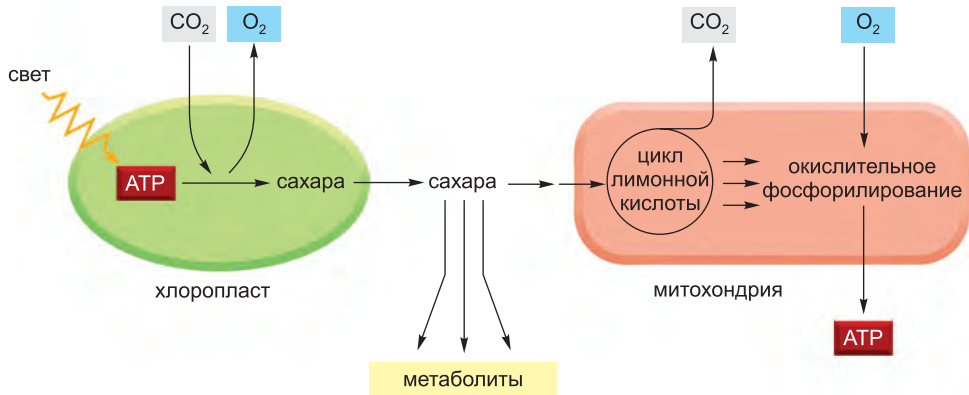


Рис. 2.76. Схема образования АТФ, необходимого для метаболизма в большинстве растительных клеток. В растениях хлоропласты и митохондрии сотрудничают в деле снабжения клеток метаболитами и АТФ. (Подробности смотрите в главе 14.)

энергии, которая может быть извлечена из окисления пищевых продуктов обоих типов, непременно запасается в молекулах acetylCoA , которые образуются в ходе двух только что описанных реакций. Поэтому цикл реакций, названный циклом лимонной кислоты, или циклом Кребса, в котором ацетильная группа acetylCoA окисляется до CO_2 и H_2O , играет определяющую роль в процессах энергетического метаболизма аэробных организмов. У эукариот все эти реакции происходят в митохондриях. Поэтому не вызывает удивления тот факт, что в животных клетках митохондрия служит местом, где производится основная доля АТФ. В противоположность эукариотам, аэробные бактерии предоставляют для всех происходящих в них реакций единую среду — цитозоль, — и именно там идет весь цикл лимонной кислоты.



Рис. 2.77. Семена некоторых растений, которые служат важными пищевыми продуктами для людей. Кукуруза, орехи и горох содержат богатые запасы крахмала и жира, которые обеспечивают молодой зародыш растения энергией и стандартным строительным материалом, необходимым для биосинтеза. (С любезного разрешения John Innes.)

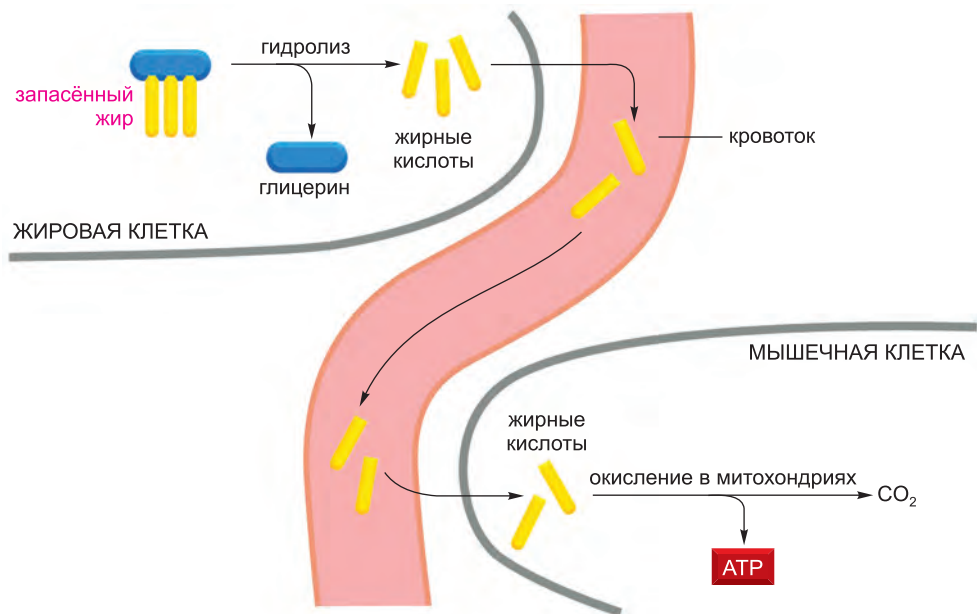


Рис. 2.78. План мобилизации «отправленных в запас» жиров на случай необходимости выработки энергии у животных. При низких уровнях глюкозы в крови запускается гидролиз молекул триацилглицерина в жировых капельках, с тем чтобы высвободить жирные кислоты и глицерин, как показано на схеме. Эти жирные кислоты поступают в кровоток, где связываются с имеющимся в избытке белком крови — сывороточным альбумином. Затем специальные переносчики жирных кислот в плазматической мембране клеток, окисляющих жирные кислоты — таких как мышечные клетки — переносят эти жирные кислоты в цитозоль, из которого они перемещаются в митохондрии для выработки энергии (см. рис. 2.80).

2.3.7. В цикле лимонной кислоты NADH образуется при окислении ацетильных групп до CO_2

В XIX столетии биологи подметили, что при отсутствии воздуха (анаэробные условия) клетки производят молочную кислоту (например, в мышцах) или этанол (например, у дрожжей), тогда как при его наличии (аэробные условия) они потребляют O_2 и производят CO_2 и H_2O . Попытки определить пути аэробного метаболизма в конечном счете сосредоточились на окислении пирувата и привели в 1937 г. к открытию **цикла лимонной кислоты**, также известного как *цикл трикарбоновых кислот*, или *цикл Кребса*. Через цикл лимонной кислоты происходит две трети всего окисления соединений углерода в большинстве клеток, и его главные конечные продукты — CO_2 и высокоэнергетические электроны в форме NADH. Газ CO_2 выделяется как побочный продукт, тогда как высокоэнергетические электроны от NADH поступают в связанную с мембранами цепь переноса электронов (отложим до главы 14) и в конечном счете объединяются с O_2 , в итоге чего образуется H_2O . Хотя в самом цикле лимонной кислоты кислород O_2 не используется, для его осуществления все же необходим O_2 , потому что не существует какого-либо иного эффективного способа лишения NADH его электронов и образования тем самым NAD^+ , необходимого для работы цикла.

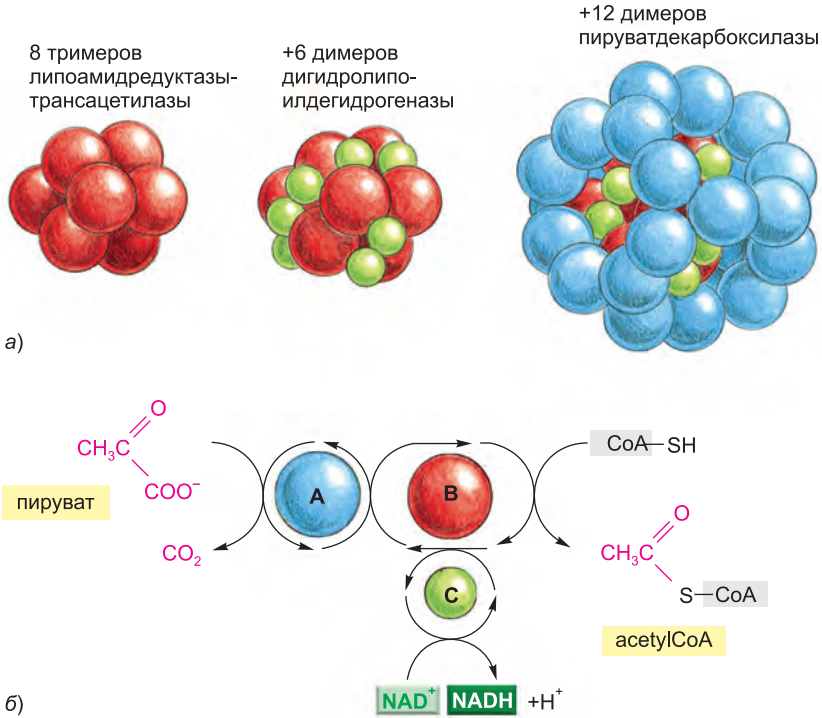


Рис. 2.79. Окисление пирувата до acetylCoA и CO_2 . а) Структура комплекса пируватдегидрогеназы, который содержит 60 полипептидных цепей. Это пример большого мультиферментного комплекса, в котором промежуточные продукты реакции непосредственно переходят от одного фермента к другому. В ядерных клетках он расположен в митохондриях. б) Реакции, осуществляемые комплексом пируватдегидрогеназы. Комплекс преобразует пируват в acetylCoA в митохондриальном матриксе; в этой реакции также производится NADH. Буквами А, В и С обозначены соответственно три фермента: пируватдекарбоксилаза, липоамидредуктаза-трансацетилаза и дигидролипоилдегидрогеназа. Эти ферменты представлены на виде а; их действия взаимосвязаны, как это показано на схеме б.

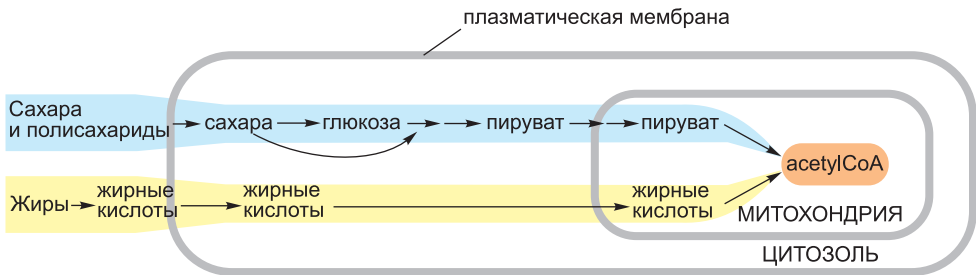


Рис. 2.80. Пути образования acetylCoA из сахаров и жиров. Митохондрия в ядерных клетках — это то место, где из двух основных классов молекул питательных веществ образуется acetylCoA. Поэтому митохондрия есть то место, где происходит большинство окислительных реакций клетки и где образуется большая часть ее АТФ. Структура и функции митохондрий подробно обсуждаются в главе 14.

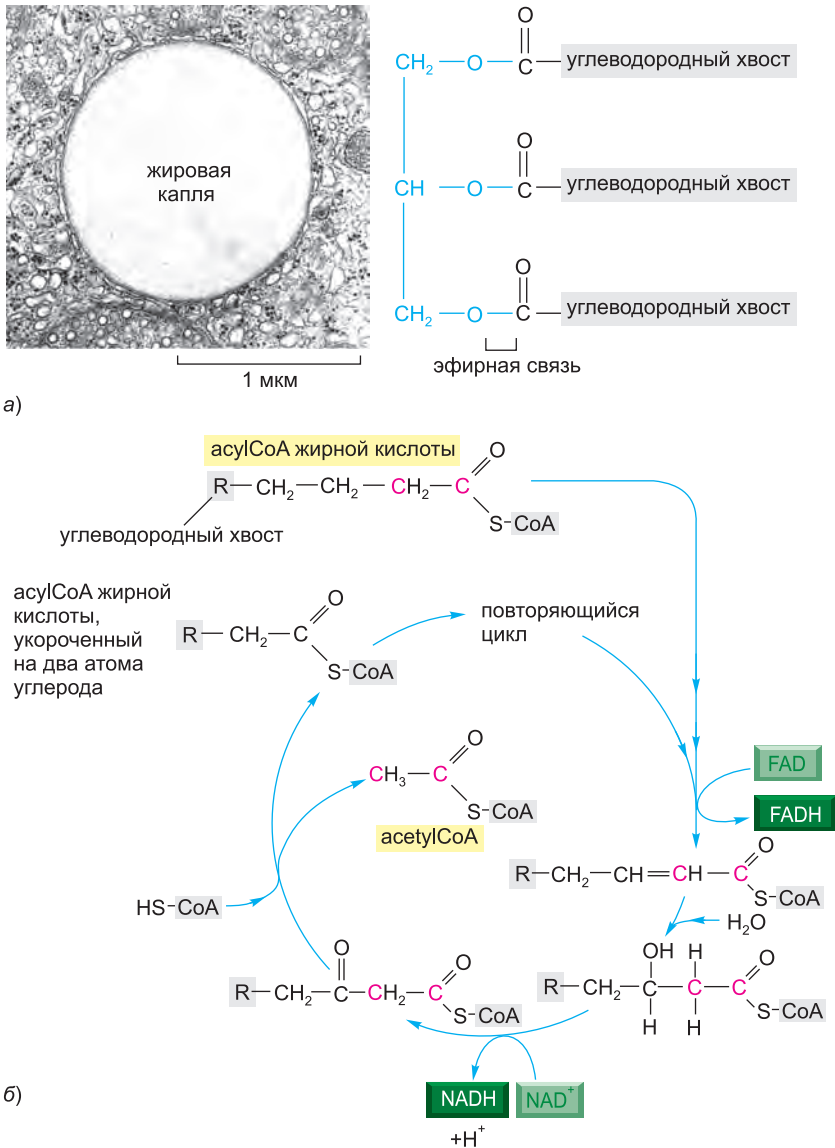
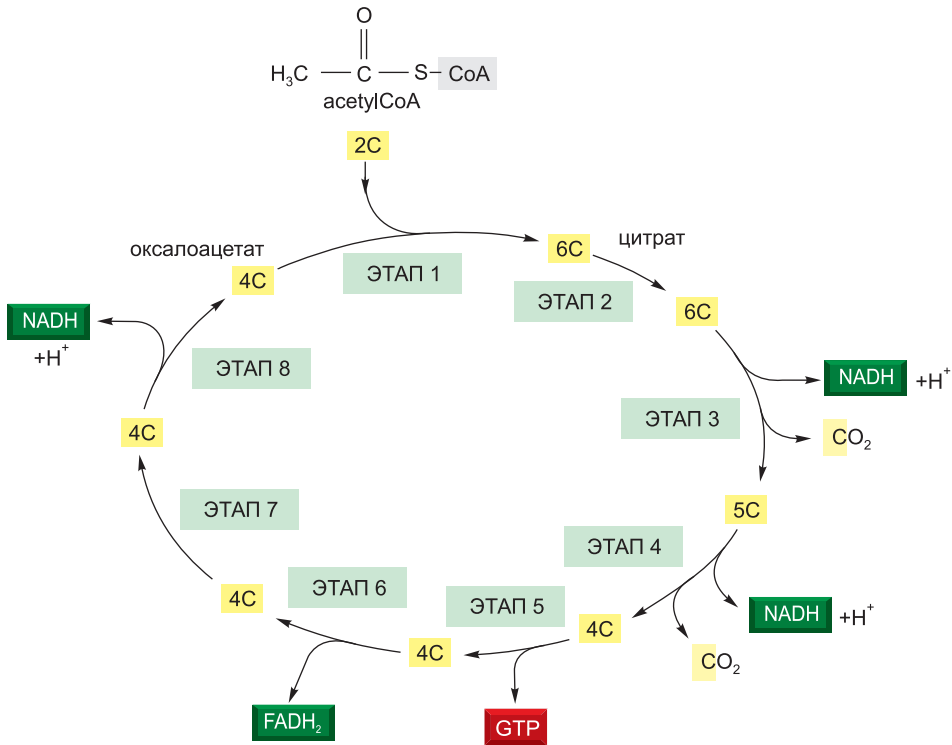


Рис. 2.81. Окисление жирных кислот до acetylCoA. *а)* Электронномикроскопическая фотография липидной капельки в цитоплазме (сверху слева) и структура жиров (сверху справа). Жиры представляют собой триацилглицерины. Глицериновая часть, к которой посредством эфирных связей прикреплены три жирные кислоты, показана синим. Жиры нерастворимы в воде и образуют крупные липидные капельки в специализированных жировых клетках (называемых адипоцитами), в которых они запасаются. *б)* Цикл окисления жирных кислот. Этот цикл катализируется в митохондриях группой из четырех ферментов. С каждым оборотом цикла цепь жирной кислоты укорачивается на два углеродных атома (показанных красным) и образуется одна молекула acetylCoA и по одной молекуле NADH и FADH₂. Структура FADH₂ представлена на рис. 2.83, б. (Снимок *а* — любезность Daniel S. Friend.)

В клетках эукариот цикл лимонной кислоты осуществляется внутри митохондрий. Результатом цикла лимонной кислоты является полное окисление атомов

углерода ацетильных групп acetylCoA до CO . Но ацетильная группа не окисляется напрямую. Вместо этого, она переносится с acetylCoA на более крупную молекулу с четырьмя атомами углерода — *оксалоацетат* — с образованием содержащей шесть атомов углерода трикарбоновой кислоты, а именно *лимонной кислоты*, по наименованию которой и назван этот последовательный цикл реакций. Итак, по прошествии вышеизложенных событий молекула лимонной кислоты ступенчато окисляется, что позволяет использовать энергию этого окисления для производства богатых энергией молекул активированных носителей. Цепь из восьми реакций замыкается в цикл, потому что в конце ее оксалоацетат образуется вновь и вступает в новый виток цикла, что схематично показано на **рис. 2.82**.

К настоящему времени мы рассматривали только один из трех типов активированных молекул-носителей, которые производятся в цикле лимонной кислоты: пару $\text{NAD}^+ - \text{NADH}$ (см. рис. 2.60). Кроме трех молекул NADH в каждом обороте цикла образуется также одна молекула FADH_2 (флавинадениндинуклеотид восстановленный) из FAD и одна молекула рибонуклеотида гуанозинтрифосфата (guanosine triphosphate; **GTP**) из гуанозиндифосфата (guanosine diphosphate;



КОНЕЧНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ: ЗА ОДИН ОБОРОТ ЦИКЛА ПРОИЗВОДИТСЯ ТРИ МОЛЕКУЛЫ NADH , ОДНА GTP И ОДНА FADH_2 , А ТАКЖЕ ВЫСВОБОЖДАЕТСЯ ДВЕ МОЛЕКУЛЫ CO_2

Рис. 2.82. Упрощенная общая схема цикла лимонной кислоты. Цикл начинается с реакции между acetylCoA и оксалоацетатом с образованием цитрата (лимонной кислоты). В каждом цикле выделяется две молекулы CO_2 в качестве отходов плюс три молекулы NADH , одна молекула GTP и одна молекула FADH_2 . Число атомов углерода в каждом промежуточном продукте показано в желтых квадратиках. Подробности можно найти в приложении 2.9 (стр. 122–123).

GDP). Структуры молекул этих двух активированных носителей представлены на **рис. 2.83**. GTP — соединение, близкородственное ATP, и перенос его концевой фосфатной группы на ADP дает одну молекулу ATP в каждом цикле. Подобно NADH, молекула FADH_2 является носителем высокоэнергетических электронов и водорода. Как будет сказано вскоре, энергия, запасаемая в легко переносимых высокоэнергетических электронах в составе NADH и FADH_2 , идет на образова-

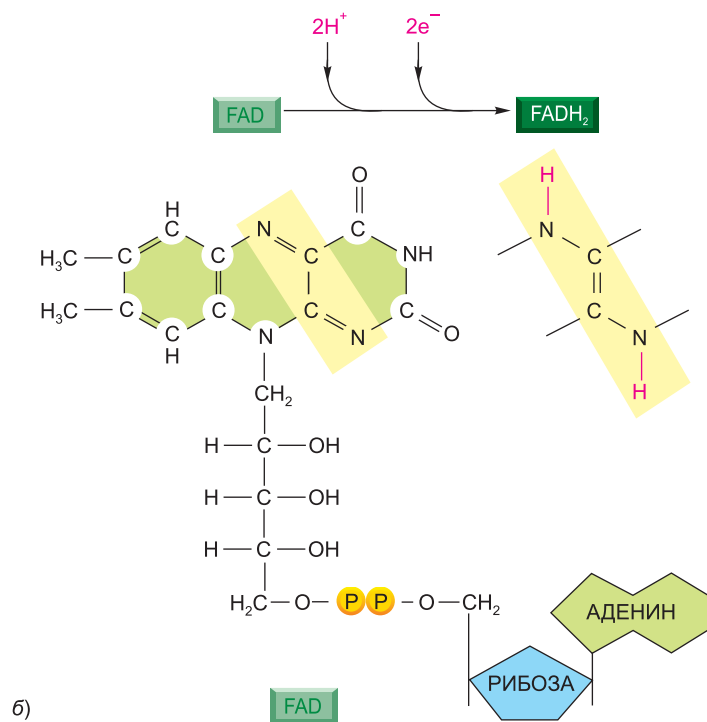
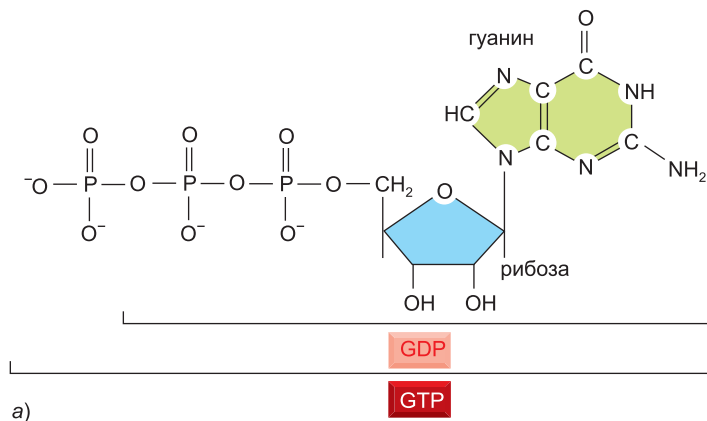


Рис. 2.83. Структуры GTP и FADH_2 . а) GTP и GDP — близкие родственники ATP и ADP соответственно. б) FADH_2 — носитель атомов водорода и высокоэнергетических электронов наподобие NADH и NADPH. Слева приведена его окисленная форма (FAD), где присоединяющие водород атомы выделены желтым.

ние АТФ в процессе *окислительного фосфорилирования*, представляющего собой единственный этап окислительного катаболизма пищевых продуктов, на котором непосредственно необходим газообразный кислород (O_2) из атмосферы.

В приложении 2.9 (стр. 122–123) представлен полный цикл лимонной кислоты. Вода, а не молекулярный кислород, поставляет дополнительные атомы кислорода, требующиеся для получения CO_2 из ацетильных групп, вступающих в цикл лимонной кислоты. Как показано в приложении, в каждом цикле расщепляется три молекулы воды, и атомы кислорода некоторых из них в конечном счете идут на образование CO_2 .

Наряду с пируватом и жирными кислотами, некоторые аминокислоты переходят из цитозоля в митохондрии, где они также превращаются в acetylCoaA или же в другой промежуточный продукт цикла лимонной кислоты. Таким образом, в ядерной клетке митохондрия представляет собой центр, к которому неминуемо стекаются все энерговырабатывающие процессы, начинаются ли они с сахаров, жиров или белков.

Как цикл лимонной кислоты, так и гликолиз служат также и отправными точками для важных реакций биосинтеза, производя жизненно необходимые углеродосодержащие промежуточные продукты, такие как *оксалоацетат* и *α -кетоглутарат*. Некоторые из таких веществ, произведенных в ходе катаболизма, переходят обратно из митохондрии в цитозоль, где служат в анаболических реакциях предшественниками для синтеза многих жизненно важных молекул, таких как аминокислоты (рис. 2.84).

2.3.8. В большинстве клеток синтез большей части АТФ происходит за счет переноса электронов

Основная масса химической энергии высвобождается на последнем этапе распада молекул питательных веществ. На этом заключительном процессе носители электронов NADH и $FADH_2$ передают электроны, которые они получили при окислении других молекул, в **цепь переноса электронов**, которая проходит по внутренней мембране митохондрии (см. рис. 14.10). По мере того как электроны проходят по этой длинной цепи, состоящей из специализированных молекул — акцепторов и доноров электронов, — они последовательно переходят в состояния все более и более низкой энергии. Энергия, высвобождаемая электронами в этом процессе, идет на «перекачку» ионов H^+ (протонов) через мембрану — из внутренней полости митохондрии наружу, — создавая градиент ионов H^+ (рис. 2.85). Этот градиент служит источником энергии, будучи подключаем, подобно батарее, для питания самых различных энергопотребляющих реакций. Наиболее значительной из таких реакций является образование АТФ путем фосфорилирования ADP.

В конце такой «эстафеты по передаче электронов» последние передаются молекулам газа кислорода (O_2), проникшим в митохондрию посредством диффузии, которые молниеносно объединяются с протонами (H^+) окружающего раствора с образованием молекул воды. Электроны теперь достигли своего самого низкого уровня энергии, так что вся доступная энергия извлечена из окисленной молекулы питательного вещества. Этот процесс, который называют **окислительным фосфорилированием** (рис. 2.86), происходит также в плазматической мембране бактерий. Как одному из самых замечательных достижений эволюции клетки, ему отведено центральное место в главе 14.

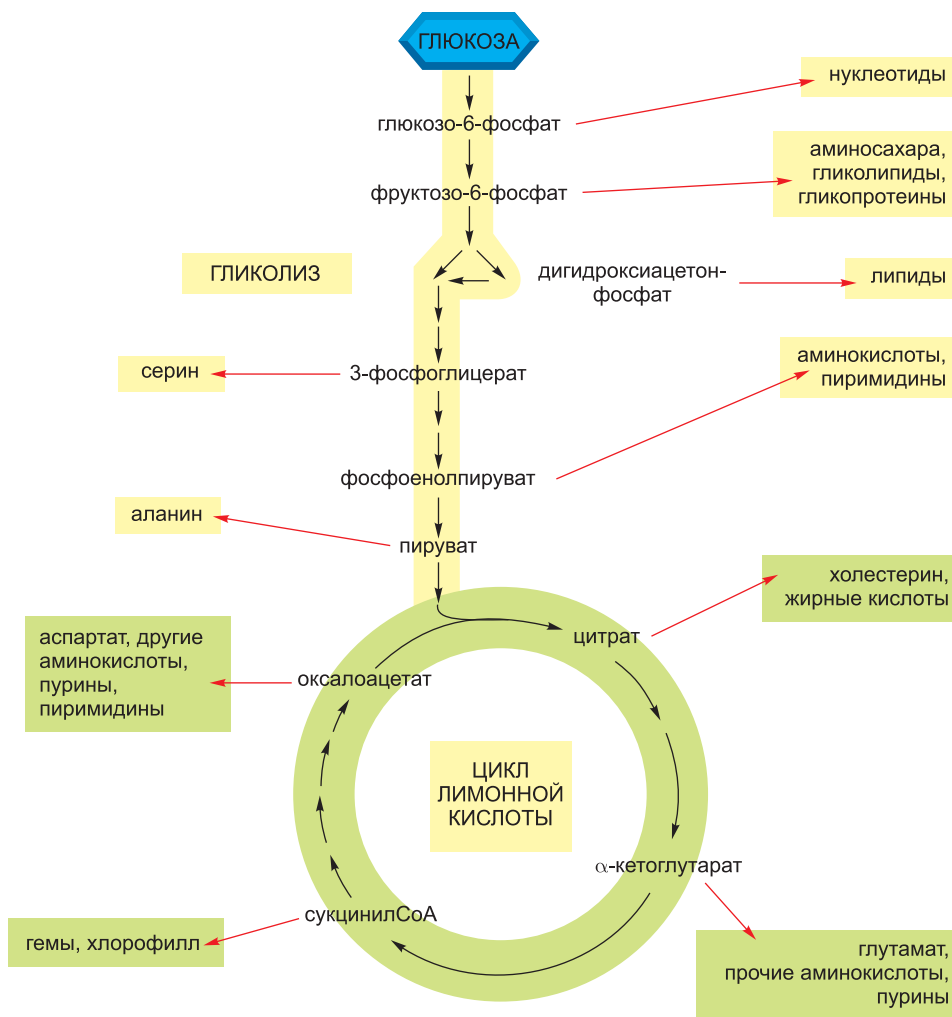


Рис. 2.84. Гликолиз и цикл лимонной кислоты поставляют предшественников, необходимых для синтеза многих важных биологических молекул. Аминокислоты, нуклеотиды, липиды, сахара и другие молекулы, представленные здесь в качестве продуктов, в свою очередь, служат предшественниками для многих макромолекул клетки. Каждая черная стрелка на этой схеме обозначает реакцию, катализируемую одним ферментом; красные стрелки, как правило, представляют многоэтапные пути, которые необходимо пройти для получения указанных продуктов.

В целом полное окисление молекулы глюкозы до H_2O и CO_2 используется клеткой для получения около 30 молекул АТФ. Гликолиз же, взятый в отдельности, дает лишь 2 молекулы АТФ на затраченную молекулу глюкозы.

2.3.9. Неотъемлемые участники цикла азота — аминокислоты и нуклеотиды

В первую очередь мы уделили внимание метаболизму углеводов, а теперь, думаем, пришло время обратить наш взор на метаболизм азота и серы. Эти два эле-

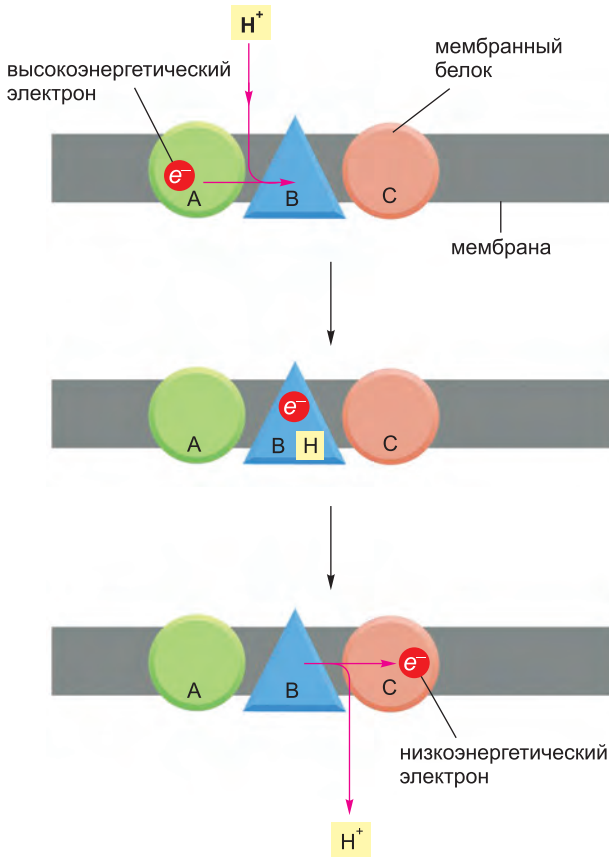


Рис. 2.85. Реакции с переносом электронов создают градиент концентраций ионов H^+ в поперечном сечении мембраны. Высокоэнергетический электрон (полученный, например, в ходе окисления некоего метаболита) переводится последовательно носителями А, В и С в более низкое энергетическое состояние. На этой схеме носитель В организован в мембране таким образом, что принимает H^+ с одной стороны, а выделяет — после прохождения вместе с электроном — с другой. В результате устанавливается градиент H^+ . Как сказано в главе 14, такой градиент представляет собой важную форму энергии, которая используется другими мембранными белками для подпитки синтеза АТФ.

мента являются важнейшими составляющими биологических макромолекул. Атомы азота и серы переходят из соединения в соединение, а также циркулируют между организмами и окружающей средой через последовательность обратимых циклов.

Хотя атмосфера Земли и богата молекулярным азотом, газ азот химически инертен. Лишь

некоторые ныне живущие виды способны встраивать его в органические молекулы, то есть осуществлять процесс так называемой **фиксации (усвоения и связывания) азота**. Связывание азота осуществляется некоторыми микроорганизмами и происходит в результате определенных геофизических процессов, таких как грозовой разряд. Фиксация азота — процесс, необходимый для биосферы в целом, поскольку без него жизнь на нашей планете была бы невозможна. Тем не менее лишь небольшая доля соединений азота в современных организмах образована с участием первичных продуктов усвоения азота из атмосферы. Большая часть органического азота, в свое время уже включенная в круговорот, переходила от одного живого организма к другому. Таким образом, протекающие сегодня реакции связывания азота, можно сказать, выполняют функцию «дозаправки» его биосферных резервуаров.

Позвоночные животные получают весь необходимый им азот из потребляемых с пищей белков и нуклеиновых кислот. В их организме эти макромолекулы расщепляются до аминокислот и составных частей нуклеотидов, а содержащийся в них азот используется для создания новых белков и нуклеиновых кислот или идет на построение иных молекул. Для позвоночных животных около половины из 20-ти аминокислот, образующих белки, являются незаменимыми (**рис. 2.87**), а это означает, что они не могут быть синтезированы из компонентов, составляющих их меню. Остальные же аминокислоты могут синтезироваться в клетках организма с ис-

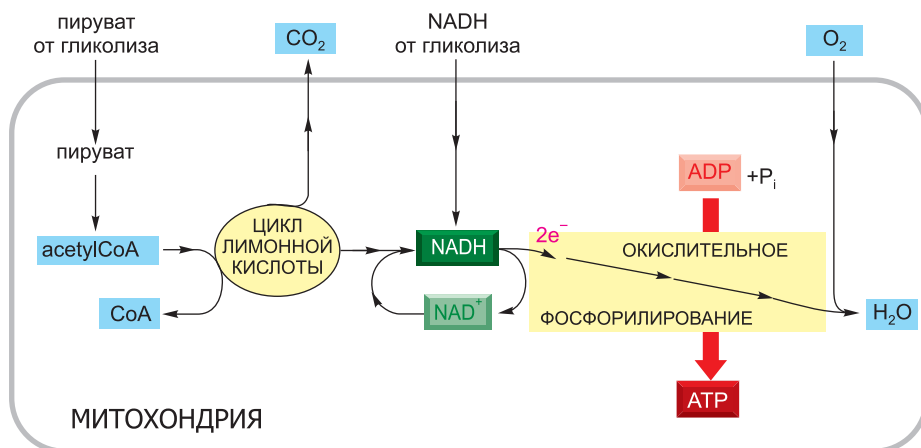


Рис. 2.86. Заключительные этапы окисления молекул питательных веществ. В цикле лимонной кислоты производятся молекулы NADH и $FADH_2$ ($FADH_2$ не показан). Эти активированные носители отдают высокоэнергетические электроны, которые в конечном счете используются для восстановления газообразного кислорода до воды.

Основная доля энергии, высвобождаемой в ходе переноса этих электронов по цепи переноса электронов во внутренней митохондриальной мембране (или же в плазматической мембране бактерий), используется для осуществления синтеза ATP — отсюда и название «окислительное фосфорилирование» (рассмотрено в главе 14).

пользованием разнообразного сырья, в том числе промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты, о чем говорилось ранее. Незаменимые аминокислоты создаются растениями и другими организмами, обычно посредством длинных и энергозатратных путей биосинтеза, которые были утрачены в ходе эволюции позвоночных.

Нуклеотиды, необходимые для построения РНК и ДНК, могут синтезироваться по специализированным путям биосинтеза. Весь азот пуриновых и пиримидиновых оснований (как и часть углерода) получается из содержащихся в больших количествах аминокислот глутамина, аспарагиновой кислоты и глицина, тогда как сахара рибоза и дезоксирибоза образуются из глюкозы. «Незаменимых нуклеотидов», которые обязательно должны присутствовать в пище, нет.

Аминокислоты, не задействованные в биосинтезе, могут быть окислены для получения энергии в ходе метаболизма. Большая часть образующих их атомов углерода и водорода в конечном счете идет на образование CO_2 или H_2O , тогда как содержащиеся в них атомы азота переходят от соединения к соединению и, наконец определившись с выбором, предстают перед нами в виде мочевины, которая выделяется организмом. Каждая аминокислота перерабатывается по-своему, и их катаболизм осуществляется целой плеядой ферментативных реакций.

ДЕВЯТЬ НЕЗАМЕНИМЫХ АМИНОКИСЛОТ

ТРЕОНИН

МЕТИОНИН

ЛИЗИН

ВАЛИН

ЛЕЙЦИН

ИЗОЛЕЙЦИН

ГИСТИДИН

ФЕНИЛАЛАНИН

ТРИПТОФАН

Рис. 2.87. Девять незаменимых аминокислот. Они не могут синтезироваться клетками человека и, следовательно, должны входить в рацион.

Сера встречается на Земле чаще всего в высшей степени окисления, то есть в виде сульфатов (SO_4^{2-}). Чтобы преобразовать ее в формы, доступные для жизни, сульфат должен быть восстановлен до сульфида (S^{2-}) — именно такое состояние окисления серы необходимо для включения ее в процессы синтеза важнейших биологических молекул. К таким молекулам относятся аминокислоты метионин и цистеин, кофермент А (см. рис. 2.62) и железосерные центры, необходимые для переноса электронов (см. рис. 14.23). Данный процесс начинается в бактериях, грибах и растениях, где специализированная группа ферментов использует АТФ и заложенный в этих организмах восстановительный потенциал на пути усвоения сульфатов. В клетках человека и других животных сульфаты не восстанавливаются, поэтому эти организмы получают необходимую для метаболизма серу с пищей.

2.3.10. Метаболизм — совокупность организуемых и регулируемых процессов

При взгляде на изображенную на рис. 2.88 схему связи гликолиза и цикла лимонной кислоты с другими метаболическими путями клетка начинает представляться нам крайне сложной и необычайно замысловатой химической машиной. Диаграмма такого рода, к которой мы уже прибегали в этой главе при ознакомлении с сущностью метаболизма, представляет лишь некоторые из всего многообразия ферментативных путей, пролегающих в биохимическом пространстве клетки. Очевидно, что наш обзор метаболизма клетки осветил лишь малую толику ее химических недр.

Все эти реакции происходят в клетке, имеющей размер менее 0,1 мм в диаметре, и для каждой из этих реакций нужен определенный фермент. Как ясно из рис. 2.88, одна и та же молекула нередко может участвовать во множестве различных путей. Пируват, например, является субстратом для полудюжины и более различных ферментов, каждый из которых химически видоизменяет его своим неповторимым образом. Один фермент преобразует пируват в acetylCoA , другой в оксалоацетат; третий фермент превращает пируват в аминокислоту аланин, четвертый — в лактат и так далее. Все эти различные пути конкурируют в борьбе за одну и ту же молекулу пирувата, и в это же время подобные соревнования идут за тысячи других маленьких молекул.

В многоклеточном организме ситуация еще сложнее. Клеткам различных типов, как правило, требуются в большей или несколько меньшей степени различные наборы ферментов. А разные ткани вносят разный вклад в химию организма в целом. Помимо различий в специализированных продуктах типа гормонов или антител, в одном и том же организме «общие» метаболические пути в клетках разных типов существенно отличаются.

Хотя ферменты для гликолиза, цикла лимонной кислоты, синтеза и расщепления липидов, а также метаболизма аминокислот есть фактически во всех клетках, уровни этих процессов в различных тканях отнюдь не одинаковы. Например, нервные клетки — возможно, наиболее прихотливые клетки организма — не содержат почти никаких запасов гликогена и жирных кислот, почти полностью полагаясь на постоянное снабжение глюкозой из кровотока. И наоборот, клетки печени поставляют глюкозу активно сокращающимся мышечным клеткам и перерабатывают молочную кислоту, образованную мышечными клетками, обратно в глюкозу. Каждый тип клеток характеризуется отличительным нюансом происходящих в них метаболических процессов; и все типы клеток плодотворно сотрудничают, незави-

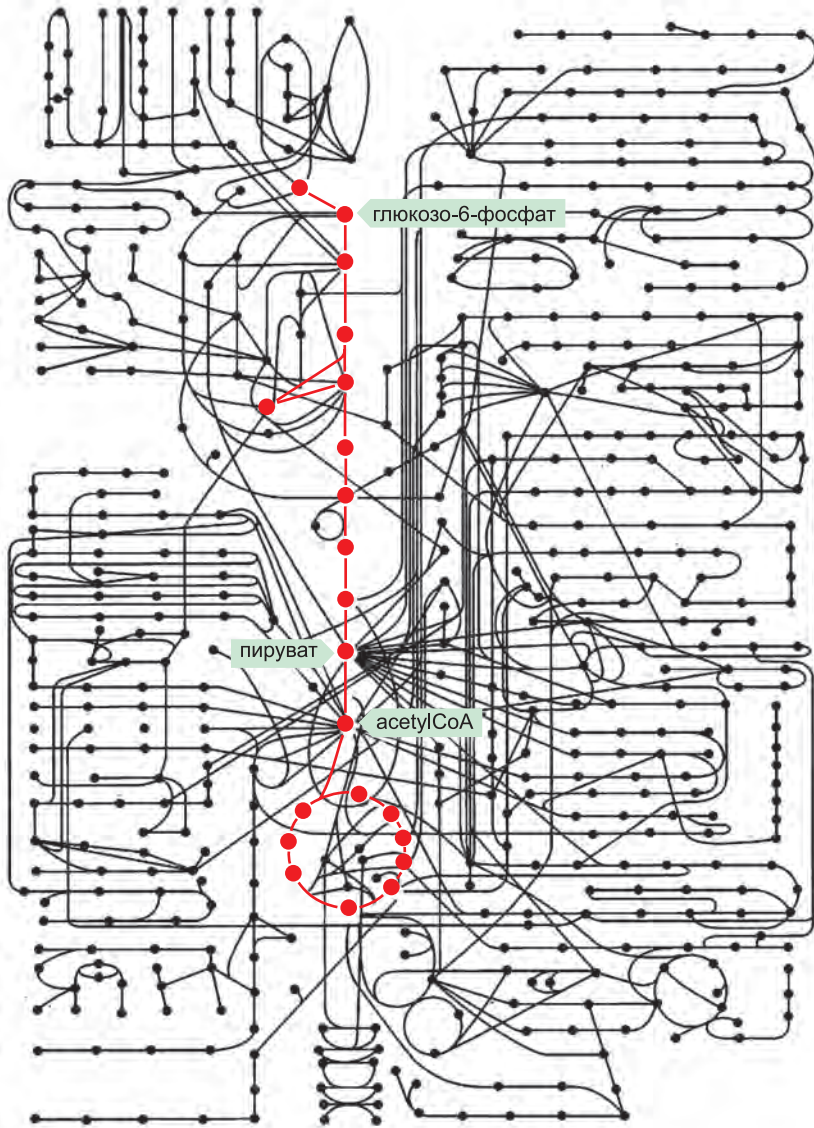


Рис. 2.88. Гликолиз и цикл лимонной кислоты занимают центральное место в сети метаболических путей. Около 500 метаболических реакций типичной клетки показаны схематично, причем реакции гликолиза и цикла лимонной кислоты выделены красным. Другие реакции или входят в эти два центральных пути — поставляя маленькие молекулы с целью их катаболизма и выработки энергии, — или выходят из этих путей и тем самым поставляют соединения углерода для биосинтеза.

симо от того, находятся ли они в обычном состоянии или отвечают на раздражение и голодание. Как может показаться, вся эта система в целом должна быть столь тонко настроена, что любой незначительный сбой, такой как кратковременное изменение рациона, приведет к ее краху.

Фактически же равновесие обмена веществ клетки удивительно устойчиво. При всяком нарушении равновесия клетка реагирует так, чтобы восстановить первоначальное состояние. Клетка может приспосабливаться и продолжать свою жизнедеятельность в периоды голодания или болезни. Мутации многих видов могут повредить или даже уничтожить определенные пути протекания реакций, и все же — при условии, что некоторые минимальные требования соблюдены, — клетка выживает. Это удается ей благодаря тому, что скорости протекания всех проходящих в ней реакций регулируются и координируются сложной сетью *механизмов управления*. Эти средства управления основаны, в конечном счете, на замечательных способностях белков изменять свою форму и химические свойства в ответ на изменения в их ближайшем окружении. Принципы, которые лежат в основе построения больших молекул типа белков и химических процессов, их регулирующих, станут предметом наших дальнейших изысканий.

Заключение

Глюкоза и другие молекулы питательных веществ расщепляются посредством управляемого ступенчатого окисления и тем самым обеспечивают клетки химической энергией в форме АТФ и NADH. Существует три главных набора последовательных реакций, и продукты каждой из них являются исходным материалом для следующей: гликолиз (который происходит в цитозоле), цикл лимонной кислоты (в митохондриальном матриксе) и окислительное фосфорилирование (на внутренних мембранах митохондрий). Промежуточные продукты гликолиза и цикла лимонной кислоты используются и в качестве источников метаболической энергии, и для производства многих маленьких молекул, служащих сырьем в реакциях биосинтеза. Клетки запасают молекулы сахара в виде гликогена (у животных) и крахмала (у растений); кроме того, и растения, и животные всюду используют жиры в качестве продовольственного склада. Эти запасы, в свою очередь, служат основным источником пищи для людей, наряду с белками, которые вместе составляют большую часть сухой массы большинства клеток в пищевых продуктах, которые мы потребляем.

Задачи

Какие утверждения являются верными? Обоснуйте свой ответ

- 2.1. После 10-ти периодов полураспада в образце останется лишь около $1/1000$ его первоначальной радиоактивности.
- 2.2. Раствор HCl с концентрацией 10^{-8} М имеет рН 8.
- 2.3. Большинство взаимодействий между макромолекулами может быть обусловлено с равным успехом как ковалентными, так и нековалентными связями.
- 2.4. Животные и растения используют окисление для извлечения энергии из молекул питательных веществ.
- 2.5. Если в реакции происходит окисление, то ему обязательно сопутствует восстановление.
- 2.6. Сопряжение энергетически неблагоприятной реакции $A \rightarrow B$ со второй, благоприятной, реакцией $B \rightarrow C$ сместит константу равновесия первой реакции.
- 2.7. Критерием возможности самопроизвольного протекания реакции является ΔG , а не ΔG° , потому что ΔG зависит от концентрации субстратов и продуктов реакции.

2.8. Поскольку гликолиз является лишь «прелюдией» к окислению глюкозы в митохондриях, где выход АТФ в 15 раз больше, — значит гликолиз не так уж и важен для клеток человека.

2.9. Кислород, потребляемый в процессе окисления глюкозы в животных клетках, возвращается в атмосферу в виде CO_2 .

Обсудите следующие вопросы

2.10. Органическую химию живых клеток называют особой по двум причинам: она царствует в водной среде и отвечает за протекание некоторых очень сложных реакций. Но считаете ли вы, что она и в самом деле так уж сильно отличается от органической химии, освоенной ведущими лабораториями мира? Поясните свой ответ.

2.11. Молекулярная масса этанола ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) равна 46, а его плотность — $0,789 \text{ г/см}^3$.

А. Какова молярная концентрация этанола в пиве, которое содержит 5 % этанола по объему? [Содержание алкоголя в пиве колеблется приблизительно от 4 % (легкое пиво) до 8 % (крепкое пиво).]

Б. Существуют различные нормы допустимого количества алкоголя в крови водителя, но чаще всего упоминается 80 мг этанола на 100 мл крови (обычно говорят: уровень алкоголя в крови 0,08). Какова будет молярность этанола в крови человека, если он не рискнет выйти за рамки дозволенного?

В. Сколько бутылок по 12 унций⁹ (355 мл) 5 %-го пива может выпить человек, масса которого 70 кг, и при этом не превысить допустимую норму содержания алкоголя в крови? В теле человека содержится приблизительно 40 л воды. Не учитывайте метаболизм этанола и сделайте допущение, что содержание воды в организме этого человека за все время его возлияний остается постоянным.

Г. Этанол, независимо от его концентрации, усваивается с постоянной скоростью около 120 мг в час на кг массы тела. Если бы человек весом 70 кг вдвое превысил предусмотренный законом предел (160 мг/100 мл), сколь долго ему пришлось бы дожидаться того момента, пока уровень алкоголя в крови не снизится до допустимого предела?

2.12. Под удельной активностью понимают количество радиоактивности на единицу количества вещества, обычно в биологии выражаемого, например, в Ки/ммоль. [Один кюри (Ки) соответствует $2,22 \cdot 10^{12}$ актов распада в минуту (распад/мин).] Как видно из **таблицы Q2.1**, в которую сведены свойства четырех изотопов, часто используемых в биологии, существует обратная зависимость между максимальной удельной активностью и периодом полураспада. Как вы считаете — это лишь случайное стечение обстоятельств или тому есть какая-либо причина? Обоснуйте свой ответ.

2.13. По удачному совпадению, ионное произведение воды, $K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-]$, является хорошим круглым числом: $1,0 \cdot 10^{-14} \text{ М}^2$.

А. Почему раствор при рН 7,0 называют нейтральным?

Б. Какова концентрация H^+ и рН раствора NaOH с концентрацией 1 мМ?

В. Если рН раствора 5,0, то какова в нем концентрация ионов OH^- ?

2.14. Предложите упорядоченный ряд значений рК (от низших к высшим) для карбоксильной группы в боковой цепи аспартата, находящейся в составе белка в следующем окружении. Объясните предложенный вами порядок.

⁹ Американская мера объема жидкости: унция жидкости равна $29,57 \text{ см}^3$, или 0,02957 л. — Прим. пер.

Таблица Q2.1. Радиоактивные изотопы и некоторые их свойства (к задаче 2.12)

РАДИОАКТИВНЫЙ ИЗОТОП	ИСПУСКАНИЕ	ПЕРИОД ПОЛУРАСПАДА	МАКСИМАЛЬНАЯ УДЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ (Ки/ммоль)
^{14}C	β -частица	5 730 лет	0,062
^3H	β -частица	12,3 года	29
^{35}S	β -частица	87,4 дня	1 490
^{32}P	β -частица	14,3 дня	9 120

1. Боковая цепь аспартата на поверхности белка в отсутствие каких-либо других ионизируемых групп поблизости.

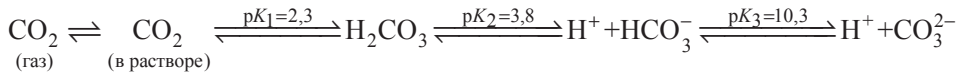
2. Боковая цепь аспартата, погруженная в гидрофобный карман на поверхности белка.

3. Боковая цепь аспартата в гидрофобном кармане, рядом с боковой цепью глутамата.

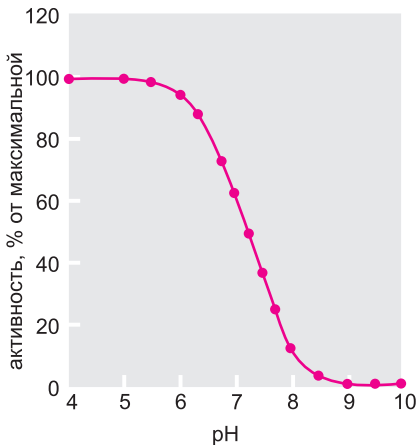
4. Боковая цепь аспартата в гидрофобном кармане, рядом с боковой цепью лизина.

2.15. Боковая цепь гистидина, как известно, играет важную роль в каталитическом акте фермента; однако неясно, в какой форме необходим гистидин: в протонированной (заряженной) или нет (незаряженной). Чтобы ответить на этот вопрос, надо измерить активность фермента в определенном диапазоне pH (результаты представлены на **рис. Q2.1**). Какая форма гистидина требуется для активности фермента?

2.16. Во время быстрого бега в мышцах происходит анаэробный метаболизм глюкозы с образованием высокой концентрации молочной кислоты, которая снижает pH крови и цитозоля и вносит вклад в ощущение усталости спринтеров задолго до того, как их топливные запасы будут исчерпаны. Главный буфер крови, противостоящий изменениям pH, представлен системой бикарбонат/ CO_2 :



Что посоветовали бы вы спринтерам для улучшения результата — сдерживать дыхание или, наоборот, быстро дышать в течение последней минуты перед стартом? Объясните свой ответ.



2.17. Представленные на **рис. Q2.2** три молекулы содержат семь наиболее распространенных в биологии химически активных групп. Большинство молекул в клетке построено из этих функциональных групп. Укажите и назовите функциональные группы в этих молекулах.

2.18. Слово «диффузия» вызывает представление о вялотекущих процессах — и на фоне покрываемых нами расстояний (оставим домосе-

Рис. Q2.1. Активность фермента как функция pH (к задаче 2.15).

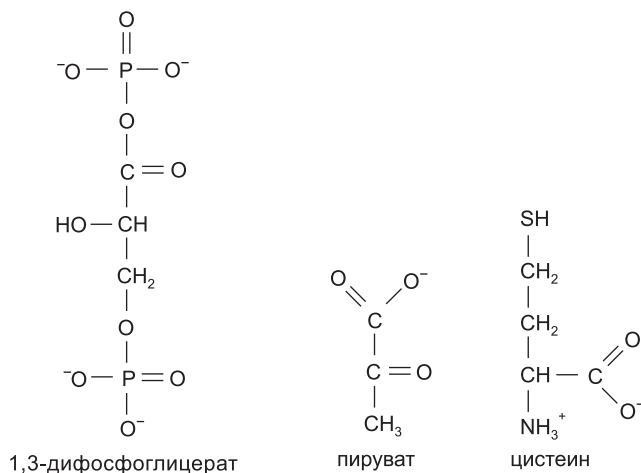


Рис. Q2.2. Три молекулы, которые представляют семь самых распространенных функциональных групп в биологии (к задаче 2.17). 1,3-дифосфоглицерат и пируват — промежуточные продукты гликолиза, а цистеин — аминокислота.

дов греться у камина) это ощущение вполне оправданно, — но в масштабе клетки диффузия происходит очень быстро. Средняя мгновенная скорость частицы в растворе, то есть скорость между столкновениями, равна

$$v = (kT/m)^{1/2},$$

где $k = 1,38 \cdot 10^{-16} \text{ г} \cdot \text{см}^2 / \text{К} \cdot \text{с}^2$, T — температура в К ($37 \text{ }^\circ\text{C} = 310 \text{ К}$), m = масса в г/молекулу.

Вычислите мгновенную скорость молекулы воды (молекулярная масса 18 дальтон), молекулы глюкозы (молекулярная масса 180 дальтон) и молекулы миоглобина (молекулярная масса 15000 дальтон) при $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Забавы ради переведите полученные цифры в километры в час. Прежде чем приступить к каким-либо вычислениям, попытайтесь догадаться, как движутся молекулы: медленное ползание ($< 1 \text{ км/час}$), легкий шаг (5 км/час) или скоростной бег рекорсмена (40 км/час).

2.19. Полимеризация субъединиц тубулина в микротрубочки сопровождается возрастанием упорядоченности субъединиц (рис. Q2.3). И все же полимеризация тубулина происходит с увеличением энтропии (уменьшением порядка). Как такое возможно?

2.20. Взрослому человеку весом 70 кг (154 фунта¹⁰) для удовлетворения полной суточной потребности в энергии достаточно поглотить 3 моля глюкозы (540 г). (Мы бы не рискнули рекомендовать читателю столь легкий способ насыщения.) В ходе окисления каждой молекулы глюкозы до CO_2 высвобождается 30 молекул АТФ. Концентрация АТФ в клетках поддерживается приблизительно на уровне 2 мМ, а 70-килограммовый взрослый человек носит в себе около 25 л внутриклеточной жидкости. Учитывая, что концентрация АТФ в клетках остается постоянной, вычислите, сколько раз в день в среднем каждая молекула АТФ в теле подвергается гидролизу и вновь синтезируется.

¹⁰ Фунт — современная мера веса, используемая в странах с английской системой мер (в Англии, Бельгии и т. п.); 1 фунт = 453,6 г. — Прим. пер.

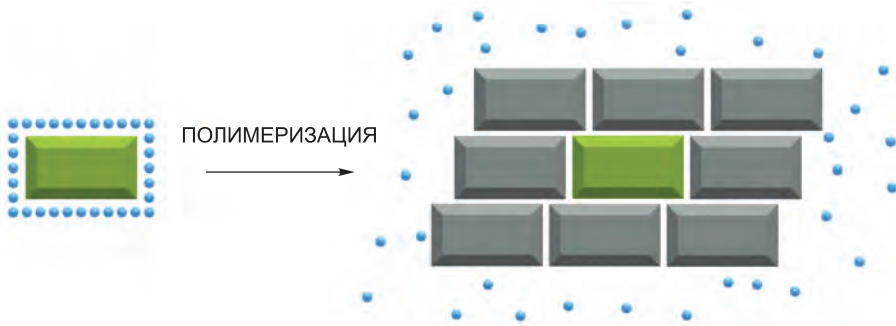


Рис. Q2.3. Полимеризация субъединиц тубулина в микротрубочку (к задаче 2.19). Показана «судьба» одной субъединицы тубулина, вошедшей в состав микротрубочки (выделена цветом), и ассоциированных с ней молекул воды (маленькие шарики).

2.21. Предположим, что в теле человека насчитывается $5 \cdot 10^{13}$ клеток и что оборот АТФ в каждой клетке происходит со скоростью 10^9 молекул АТФ в минуту. Сколько ватт потребляет тело человека? (Ватт равен джоулю в секунду, а одной калории соответствует 4,18 джоуля.) Примем, что гидролиз АТФ дает 12 ккал/моль энергии.

2.22. Достаточно ли энергии, содержащейся в шоколадном батончике «Сникерс™» (65 г, 325 ккал), чтобы подняться от Церматта (высота 1660 м над уровнем моря) к вершине Маттерхорна (4478 м, рис. Q2.4), или понадобится сделать привал в Хёрнли Хут (3260 м) и подкрепиться еще одним? Представьте, что ваша масса вместе со снаряжением составляет 75 кг и что вся совершаемая вами работа идет на преодоление притяжения Земли (то есть вы как будто бы поднимаетесь прямо вверх). Вспомним из успешно пройденного нами вводного курса физики, что

$$\text{работа (Дж)} = \text{масса (кг)} \times g \text{ (м/с}^2\text{)} \times \text{пройденный путь в высоту (м)},$$

где g — ускорение свободного падения ($9,8 \text{ м/с}^2$). Один джоуль равен $1 \text{ кг} \cdot \text{м}^2/\text{с}^2$, а одна килокалория равноценна 4,18 кДж.

Какие из принятых в этой задаче допущений могут привести к наиболее жесткой нехватке шоколадок, которые понадобятся вам в пути?

2.23. На первый взгляд, сбраживание пирувата в лактат представляется своего рода факультативным дополнением к гликолизу. И все же — могли бы клетки, растущие в отсутствие кислорода, отказаться от простой отбраковки пирувата как побочного продукта? Если бы не было брожения, то какие продукты, полученные в результате гликолиза, накапливались бы в клетках при анаэробных условиях? Мог бы метаболизм глюкозы, идущий путем гликолиза, продолжаться при отсутствии кислорода в клетках, которые не способны осуществлять брожение? Обоснуйте свои ответы, будь они утвердительные или отрицательные.



Рис. Q2.4. Маттерхорн (к задаче 2.22). (Любезность Zermatt Tourism.)

2.24. При отсутствии кислорода клетки потребляют глюкозу устойчиво высокими темпами. При появлении кислорода потребление глюкозы резко снижается и затем поддерживается на более низких оборотах. Почему глюкоза потребляется с высокой скоростью при отсутствии кислорода и с низкой скоростью при его наличии?

2.25. Печень снабжает глюкозой весь организм между приемами пищи. Она осуществляет это путем расщепления гликогена с образованием глюкозо-6-фосфата на предпоследнем этапе. Глюкозо-6-фосфат превращается в глюкозу за счет отщепления фосфата ($\Delta G^\circ = -3,3$ ккал/моль). По какой причине, как вы полагаете, печень отбирает фосфат посредством гидролиза, вместо того чтобы проводить обратную реакцию, в ходе которой глюкозо-6-фосфат (G6P) образовывался бы из глюкозы (глюкоза + ATP \rightarrow G6P + ADP, $\Delta G^\circ = -4,0$ ккал/моль)? Далее, обратив эту реакцию вспять, печень могла бы произвести и глюкозу, и ATP.

2.26. В 1904 г. Франц Кнуп провел, быть может, первый успешный эксперимент с применением метки для изучения метаболических путей. Он скормил собакам множество различных жирных кислот, на С-конец которых была введена метка — бензольное кольцо, и анализировал в выделяемой ими моче производные бензола. Всякий раз, когда жирная кислота имела четное число атомов углерода, в моче присутствовал фенилацетат (рис. Q2.5, а). Всякий раз, когда жирная кислота имела нечетное число атомов углерода, выделялся бензоат (рис. Q2.5, б).

На основании этих экспериментов Кнуп пришел к выводу, что окисление жирных кислот до CO_2 и H_2O сопровождается удалением двууглеродных фрагментов с конца цепи, содержащего карбоксильную группу.

Можете ли вы описать логический ход мысли Франца Кнупа, приведшей его к заключению о том, что именно двууглеродные фрагменты цепи, а не какой-либо иной длины, удалялись в ходе окисления, и о том, что деградация происходила с карбоксил-содержащего конца цепи, а не с другого?

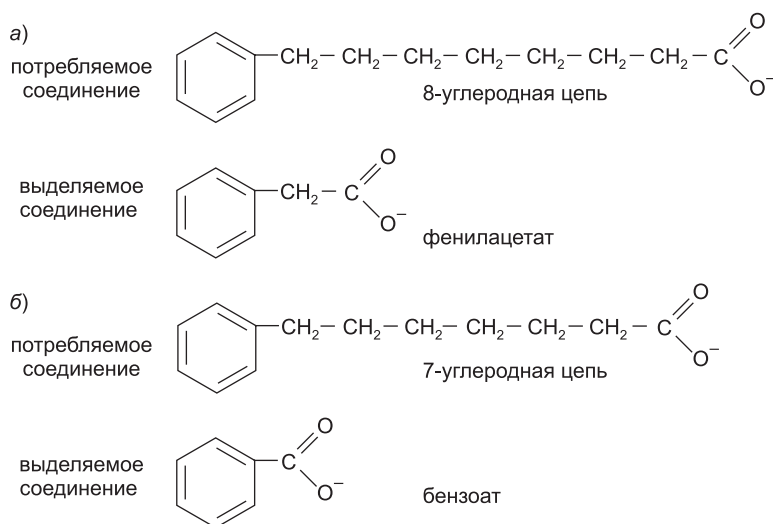
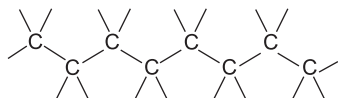


Рис. Q2.5. Оригинальный эксперимент с использованием бензольной метки, проведенный при исследовании механизма окисления жирных кислот (к задаче 2.26). а) Потребляемое производное жирных кислот с четным числом атомов углерода и продукт выделения. б) Потребляемое производное жирных кислот с нечетным числом атомов углерода и продукт выделения.

УГЛЕРОДНЫЕ КАРКАСЫ

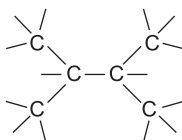
Углерод играет уникальную роль в клетке благодаря своей способности образовывать сильные ковалентные связи с другими атомами углерода. Таким образом, углеродные атомы могут соединяться друг с другом и формировать линейные цепи,



обозначается также как



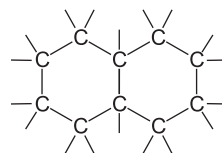
или разветвленные цепи,



обозначается также как



или же кольца.



обозначается также как

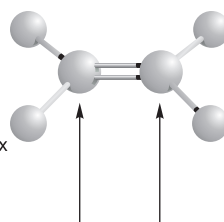


КОВАЛЕНТНЫЕ СВЯЗИ

Ковалентная связь образуется, когда два атома сближаются друг с другом на малое расстояние и обобщают один или несколько своих электронов. В одинарной связи обобщается по одному электрону от каждого из двух атомов; в двойной связи обобщается в общей сложности четыре электрона. Каждый атом образует фиксированное число ковалентных связей, расположенных в пространстве определенным образом. Например, углерод образует четыре одинарные связи, тетраэдрически направленных в пространстве, тогда как азот образует три одинарные связи, а кислород образует две одинарные связи, расположенные как на представленных ниже рисунках.



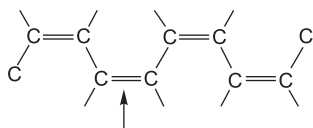
Эти же атомы образуют и двойные связи, имеющие иное пространственное расположение.



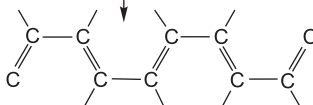
Атомы, соединенные двумя и более ковалентными связями, не могут свободно поворачиваться вокруг оси связи. Это ограничение оказывает определяющее влияние на трехмерную форму многих макромолекул.

ЧЕРЕДУЮЩИЕСЯ ДВОЙНЫЕ СВЯЗИ

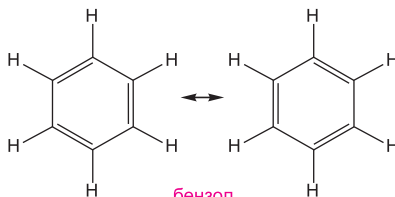
Углеродная цепь может содержать двойные связи. Если они чередуются с одинарными (двойные расположены через одну одинарную связь), электроны связи перемещаются в пределах молекулы, стабилизируя структуру благодаря явлению, названному резонансом.



истина — где-то между двумя этими структурами



Чередующиеся двойные связи в кольце могут образовывать очень устойчивую структуру.



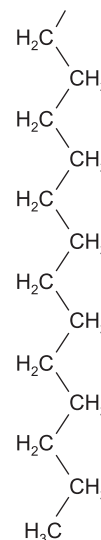
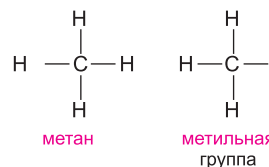
бензол

часто обозначается как



УГЛЕВОДОРОДЫ

В результате соединения углерода и водорода образуются устойчивые соединения (или химические группы), называемые углеводородами. Они неполярны, не образуют водородных связей и, как правило, не растворяются в воде.

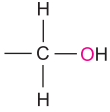


часть углеводородного «хвоста» молекулы жирной кислоты

ХИМИЧЕСКИЕ ГРУППЫ СО СВЯЗЯМИ C—O

Многие биологические соединения содержат связи углерод-кислород. Например:

спирт

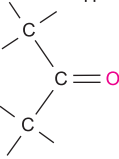


Группа —OH называется **гидроксильной** группой.

альдегид

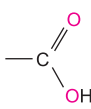


кетон



Группа C=O называется **карбонильной** группой.

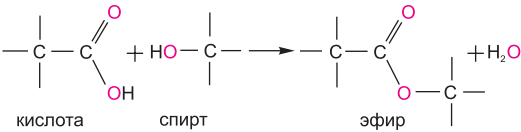
карбоновая кислота



Группа —COOH называется **карбоксильной** группой. В воде она теряет ион H⁺ и превращается в ион —COO⁻.

эферы

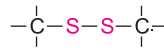
Эферы образуются в ходе реакции конденсации между кислотой и спиртом.



СУЛЬФИДРИЛЬНАЯ ГРУППА

Группа —C—SH называется **сульфидрильной** группой.

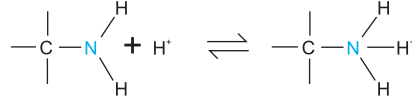
В аминокислоте цистеине сульфидрильная группа может существовать в восстановленной форме —C—SH или, хотя и реже, в окисленной, образующей поперечные связи форме —C—S—S—C—



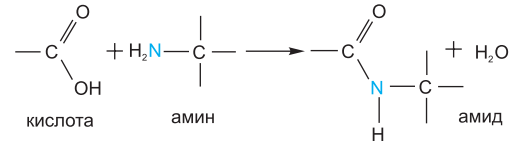
ХИМИЧЕСКИЕ ГРУППЫ СО СВЯЗЯМИ C—N

Амины и амиды представляют два важных примера соединений, содержащих связь углерод-азот.

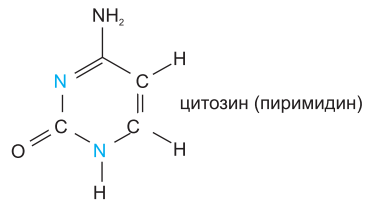
Амины, находясь в воде, присоединяют ион H⁺ и приобретают положительный заряд.



Амиды образуются при взаимодействии кислоты с амином. В отличие от аминов, амиды в воде остаются незаряженными. Пример амидной связи — пептидная связь, посредством которой аминокислоты соединены друг с другом в молекулах белков.

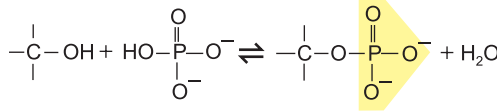
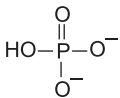


Азот встречается также в некоторых циклических соединениях, в том числе в важных составляющих нуклеиновых кислот: пуринах и пиримидинах.



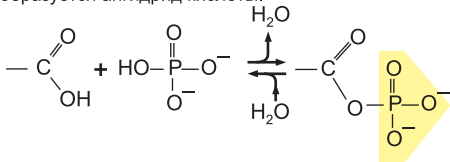
ФОСФАТЫ

Неорганический фосфат представляет собой устойчивый ион, образованный из фосфорной кислоты H₃PO₄. Часто его записывают знаком P_i.



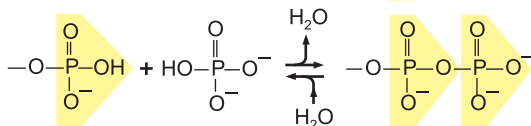
обозначается также как $-\text{C}-\text{O}-\text{P}$

При взаимодействии фосфата и карбоксильной группы или же двух и более фосфатных групп образуется ангидрид кислоты.



высокоэнергетическая ацил-фосфатная связь (ангидрид карбоновой-фосфорной кислот) встречается в некоторых метаболитах

обозначается также как $-\text{C}-\text{O}-\text{P}$

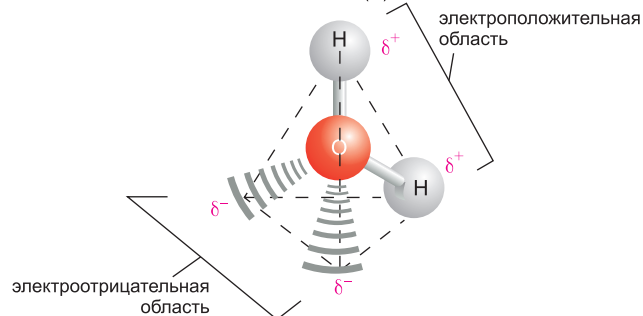


фосфоангидрид — высокоэнергетическая связь, присутствующая в молекулах, например ATP

обозначается также как $-\text{O}-\text{P}-\text{P}$

ВОДА

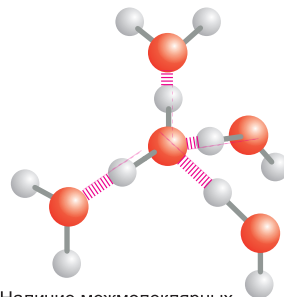
Два атома, соединенные ковалентной связью, могут по-разному притягивать электроны связи. В таких случаях связь является **полярной**, и при этом имеется область с небольшим отрицательным зарядом (δ^-) и область с небольшим положительным (δ^+).



Хотя общий заряд молекулы воды и нейтрален (ввиду равного числа электронов и протонов), электроны в ней распределены асимметрично, в силу чего молекула является полярной. Ядро кислорода оттягивает электроны от ядер атомов водорода, оставляя эти ядра с небольшим результирующим положительным зарядом. Избыток электронной плотности на атоме кислорода обуславливает наличие слабо отрицательных областей в двух других вершинах воображаемого четырехгранника.

СТРУКТУРА ВОДЫ

Молекулы воды кратковременно соединяются друг с другом, образуя решетку из водородных связей. Даже при 37° С 15 % молекул воды соединена с четырьмя другими в непрочную структуру, известную как «мерцающий кластер».



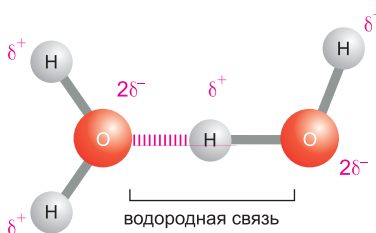
Наличие межмолекулярных взаимодействий (сцепленность молекул) обуславливает многие необыкновенные свойства воды, такие как высокое поверхностное натяжение, высокая удельная теплоемкость и высокая теплота парообразования.

ВОДОРОДНЫЕ СВЯЗИ

Благодаря своей поляризованности две смежные молекулы H_2O могут образовывать связь, известную под названием **водородной**.

Водородная связь приблизительно в 20 раз слабее ковалентной.

Наиболее прочна водородная связь, если три образующие их атома лежат на прямой линии.



длины связей

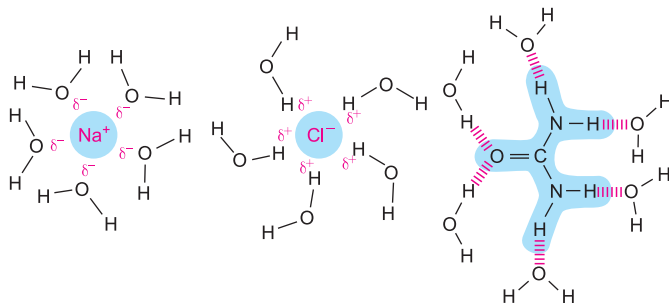
водородная связь

0,27 нм

0,10 нм
ковалентная
связь

ГИДРОФИЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ

Вещества, которые легко растворяются в воде, называют **гидрофильными**. Они состоят из ионов или полярных молекул, которые притягивают молекулы воды за счет действия электрических зарядов. Молекулы воды дружно окружают каждый ион или полярную молекулу на поверхности твердого вещества и уносят его (или ее) в раствор.

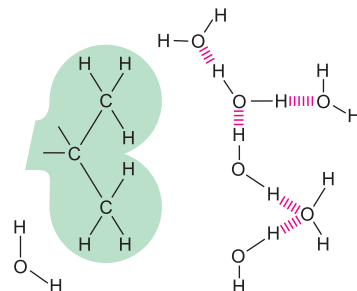


Ионные вещества типа хлорида натрия растворяются потому, что молекулы воды притягиваются к положительно (Na^+) или отрицательно (Cl^-) заряженным ионам.

Полярные вещества типа мочевины растворяются потому, что их молекулы образуют водородные связи с окружающими их молекулами воды.

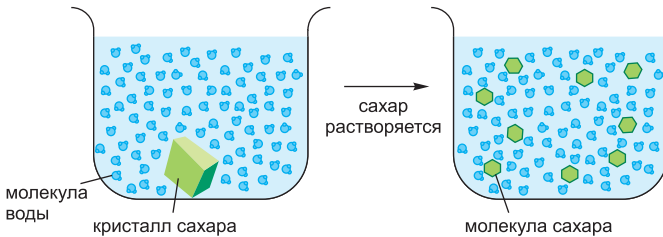
ГИДРОФОБНЫЕ МОЛЕКУЛЫ

Молекулы, которые содержат преимущественно неполярные связи, обычно нерастворимы в воде и называются **гидрофобными**. Это особенно верно для углеводородов, которые содержат множество связей C-H. Молекулы воды ничем не притягиваются к таким молекулам и, как следствие, слабо тяготеют к тому, чтобы окружить их и забирать с собою в раствор.



ВОДА КАК РАСТВОРИТЕЛЬ

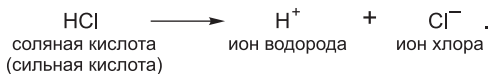
Многие вещества, например столовый сахар, **растворяются** в воде. То есть их молекулы отделяются друг от друга и попадают в окружение молекул воды.



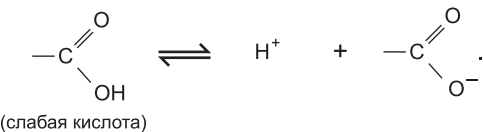
Когда какое-либо вещество растворяется в жидкости, получаемую смесь называют **раствором**. Растворившееся вещество (в данном случае сахар) именуют **растворенным веществом**, а жидкость, которая осуществляет растворение (в нашем случае вода), — **растворителем**. Благодаря наличию полярных связей вода является превосходным растворителем для многих веществ.

КИСЛОТЫ

Вещества, которые в растворе высвобождают ионы водорода, называют **кислотами**.



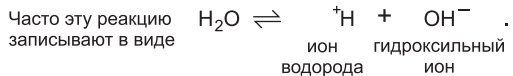
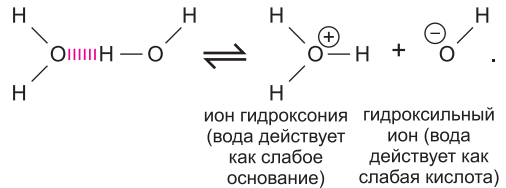
Многие из кислот, играющих важную роль в жизнедеятельности клетки, диссоциированы лишь частично и поэтому являются **слабыми кислотами** — например, карбоновые кислоты, карбоксильная группа которых диссоциирует в растворе с образованием иона водорода.



Обратите внимание, что эта реакция обратима.

ОБМЕН ИОНАМИ ВОДОРОДА

Положительно заряженные ионы водорода (H^+) могут самопроизвольно переходить от одной молекулы воды к другой и приводить, таким образом, к образованию ионов двух видов.



Так как данный процесс быстро обратим, ионы водорода непрерывно курсируют между молекулами воды. Чистая вода содержит соответствующую состоянию устойчивого равновесия концентрацию ионов водорода и гидроксильных ионов (по 10^{-7} М).

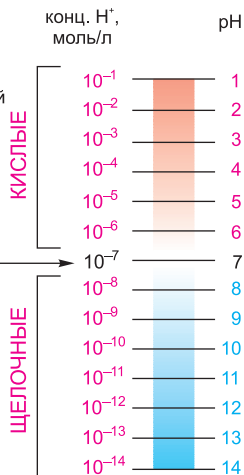
pH

Кислотность раствора определяется концентрацией содержащихся в нем ионов H^+ . Для удобства мы используем шкалу pH, где

$$\text{pH} = -\lg [\text{H}^+].$$

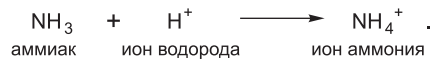
Для чистой воды

$$[\text{H}^+] = 10^{-7} \text{ моль/л}$$

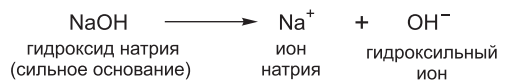


ОСНОВАНИЯ

Вещества, которые снижают концентрацию ионов водорода в растворе, называют **основаниями**. Некоторые основания, например аммиак, непосредственно взаимодействуют с ионами водорода.



Другие основания, такие как гидроксид натрия, уменьшают число ионов H^+ косвенно: образованные ими ионы OH^- взаимодействуют с ионами H^+ с образованием H_2O .

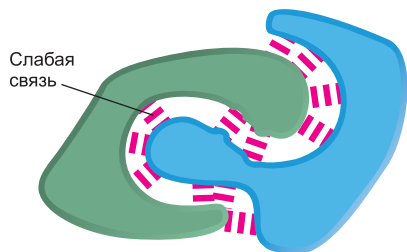


Многие основания, встречающиеся в клетках, диссоциируют частично и потому зарекомендовали себя как **слабые основания**. Такая характеристика справедлива для соединений, содержащих аминогруппу ($-\text{NH}_2$), которые не отличаются сильным стремлением обратимо принять ион H^+ из воды и повысить тем самым количество свободных ионов OH^- .



СЛАБЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ СВЯЗИ

Органические молекулы могут взаимодействовать с другими молекулами посредством сил притяжения ближнего порядка трех типов, известных под общим названием *нековалентных связей*: ван-дер-ваальсова притяжения, электростатического притяжения и водородных связей. Отталкивание гидрофобных групп от воды также имеет важное значение для упорядочения биологических макромолекул.



Слабые химические связи составляют менее 1/20 силы прочной ковалентной связи. Такие связи достаточно прочны только тогда, когда одновременно образуется большое число таких связей.

ВОДОРОДНЫЕ СВЯЗИ

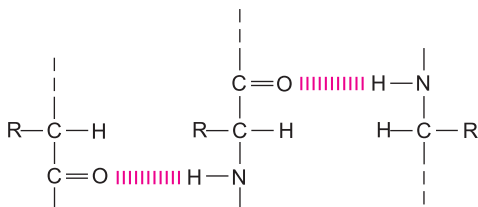
Как уже было сказано при описании воды (см. приложение 2.2), **водородные связи** образуются, когда атом водорода оказывается «зажат» между двумя притягивающими электроны атомами (обычно это атомы кислорода или азота).

Водородная связь обладает наибольшей силой, когда три образующих ее атома находятся на прямой линии.

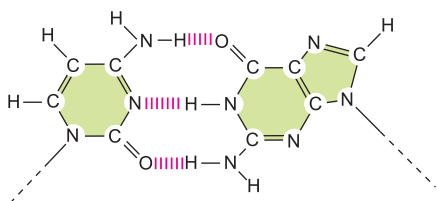


Примеры в макромолекулах.

Водородные связи между аминокислотами в полипептидных цепях.

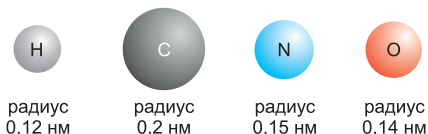


Водородные связи между двумя основаниями, G и C, в ДНК и РНК.

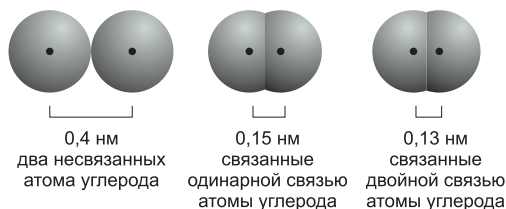


ВАН-ДЕР-ВААЛЬСОВО ПРИТЯЖЕНИЕ

Если два атома сойдутся слишком близко, то они будут очень сильно отталкивать друг друга. По этой причине атом часто можно рассматривать как шар с постоянным радиусом. Характерный «размер» каждого атома определяется уникальным **ван-дер-ваальсовым радиусом**. Таким образом, межатомное расстояние между любыми двумя нековалентно связанными атомами равно сумме их ван-дер-ваальсовых радиусов.

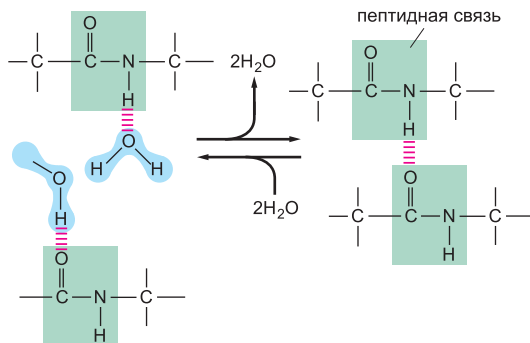


Находясь на очень коротких расстояниях, любые два атома слабо взаимодействуют, что обусловлено присущими им колеблющимися электрическими зарядами. За счет этого такие два атома будут притягиваться друг к другу до тех пор, пока расстояние между их ядрами не станет приблизительно равным сумме их ван-дер-ваальсовых радиусов. Хотя само по себе **ван-дер-ваальсово притяжение** очень слабое, в случае, когда поверхности двух макромолекул очень точно подогнаны одна к другой, возникающие между ними ван-дер-ваальсовы связи могут стать определяюще важными, потому что в их образовании участвует большое число атомов. Обратите внимание, что, когда два атома образуют ковалентную связь, центры этих двух атомов (два атомных ядра) расположены намного ближе друг к другу, чем сумма двух ван-дер-ваальсовых радиусов. Таким образом,

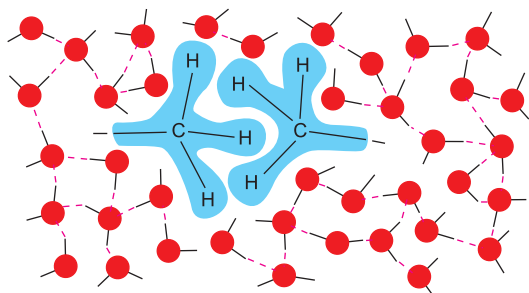
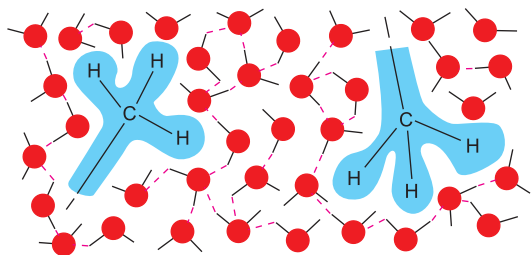


ВОДОРОДНЫЕ СВЯЗИ В ВОДЕ

Любые молекулы, которые способны образовывать водородные связи друг с другом, могут в качестве альтернативы сформировать водородные связи с молекулами воды. Из-за такого соревнования с молекулами воды водородные связи, образуемые между двумя растворенными в воде молекулами, относительно слабы.



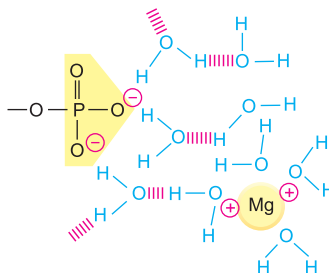
ГИДРОФОБНЫЕ СИЛЫ



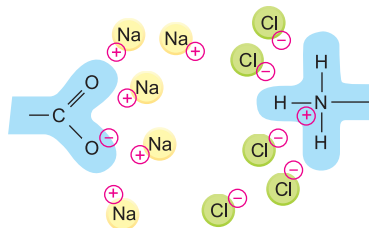
Вода сближает гидрофобные группы, потому что это минимизирует их нарушающее действие на водную сеть, стянутую водородными связями. Иногда говорят, что удерживаемые таким путем вместе гидрофобные группы соединены «гидрофобными связями», хотя фактически это кажущееся притяжение обусловлено их выталкиванием из воды.

ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОЕ ПРИТЯЖЕНИЕ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Заряженные группы экранируются за счет их взаимодействия с молекулами воды. Поэтому в воде электростатическое притяжение весьма слабое.



Подобным же образом ионы в растворе могут группироваться вокруг заряженных групп и еще более ослаблять притяжение.



Несмотря на ослабление водой и солью, электростатические взаимодействия очень важны в биологических системах. Например, фермент, который связывается с положительно заряженным субстратом, часто будет иметь в надлежащем месте аминокислоту с отрицательно заряженной боковой цепью.

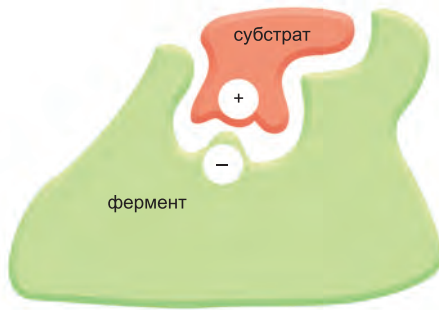
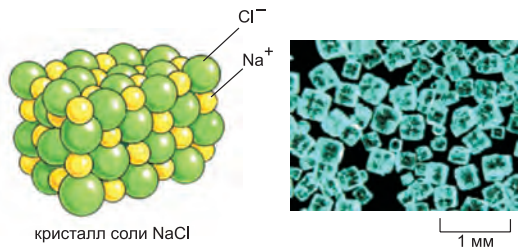
ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОЕ ПРИТЯЖЕНИЕ

Силы притяжения возникают как между полностью заряженными группами (ионная связь), так и между частично заряженными группами в полярных молекулах.



Сила притяжения между двумя зарядами δ^+ и δ^- резко уменьшается по мере увеличения расстояния между ними.

В отсутствие воды электростатические силы очень сильны. Они обуславливают прочность таких минералов, как мрамор и агат, а также формирование кристаллов обычной поваренной соли NaCl.



МОНОСАХАРИДЫ

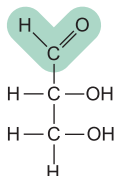
Моносахариды (одна из основных групп углеводов) обычно характеризуются общей формулой $(\text{C}_l\text{H}_{2l}\text{O})_n$, где l может принимать значения 3, 4, 5, 6, 7 или 8, и содержат две и более гидроксильные группы. Они содержат также альдегидную группу ($-\text{C}(=\text{O})\text{H}$) и называются альдозами или кетонную группу ($>\text{C}=\text{O}$) и называются кетозами.

3-углеродные (ТРИОЗЫ)

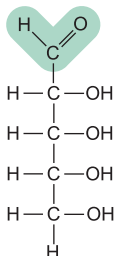
5-углеродные (ПЕНТОЗЫ)

6-углеродные (ГЕКСОЗЫ)

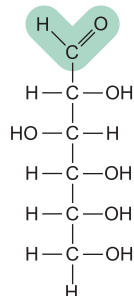
АЛЬДОЗЫ



глицеральдегид

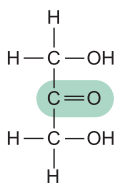


рибоза

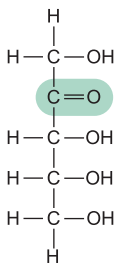


глюкоза

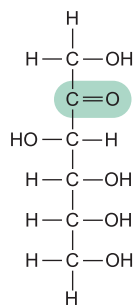
КЕТОЗЫ



дигидроксиацетон



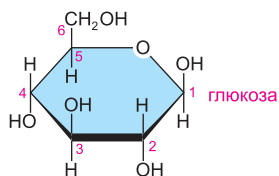
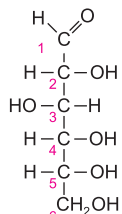
рибулоза



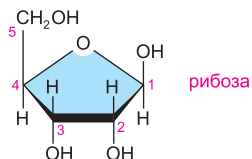
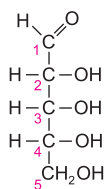
фруктоза

ОБРАЗОВАНИЕ ЦИКЛА

В водном растворе альдегидная или кетонная группа молекулы сахара обычно реагирует с гидроксильной группой той же молекулы и таким образом замыкает эту молекулу в кольцо, или цикл.



глюкоза

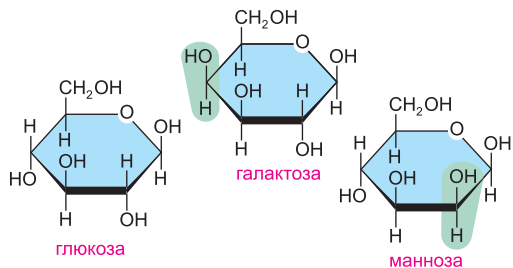


рибоза

Обратите внимание, что каждому атому углерода присвоен номер.

ИЗОМЕРЫ

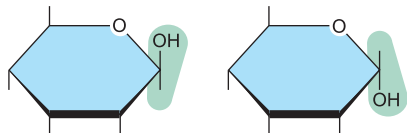
Многие моносахариды отличаются только пространственным расположением атомов, то есть представляют собой **изомеры**. Например, глюкоза, галактоза и манноза имеют одну и ту же формулу ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), но отличаются расположением групп относительно одного или двух атомов углерода.



Такие небольшие различия обуславливают лишь незначительную разницу в химических свойствах сахаров. Однако они распознаются ферментами и другими белками и поэтому могут вызывать серьезные биологические эффекты.

α- И β-СВЯЗИ

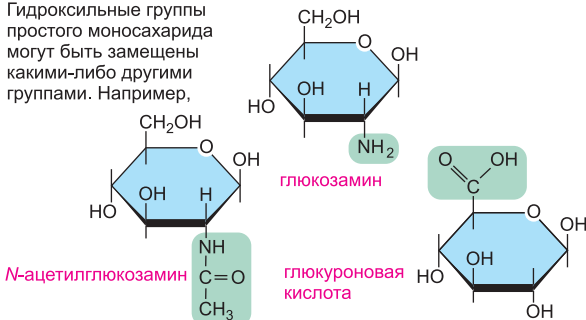
Гидроксильная группа на атоме углерода, который несет альдегид или кетон, может быстро переходить из одного положения в другое. Эти два положения называют α и β.



Как только один сахар связывается с другим, α- или β-форма закрепляется.

ПРОИЗВОДНЫЕ САХАРОВ

Гидроксильные группы простого моносахарида могут быть замещены какими-либо другими группами. Например,



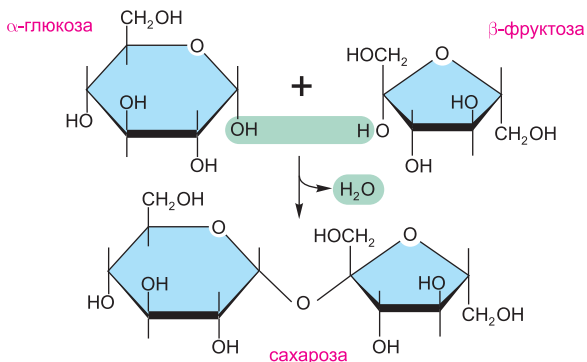
ДИСАХАРИДЫ

Углеродный атом, который несет альдегид или кетон, может реагировать с гидроксильной группой другой молекулы сахара и образовывать **дисахарид**. Такую связь называют гликозидной.

Тройка наиболее распространенных дисахаридов представлена:

- мальтозой (глюкоза + глюкоза),
- лактозой (галактоза + глюкоза),
- сахарозой (глюкоза + фруктоза).

Здесь представлена реакция образования сахарозы.



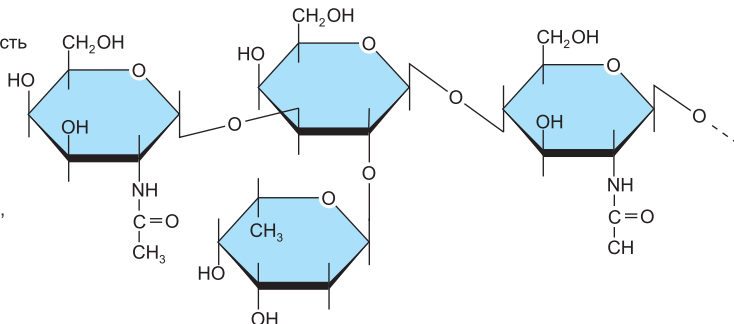
ОЛИГОСАХАРИДЫ И ПОЛИСАХАРИДЫ

Из простых повторяющихся сахарных единиц (моносахаридов) могут образовываться крупные линейные и разветвленные молекулы. Короткие цепи называют **олигосахаридами**, а длинные — **полисахаридами**. Гликоген, например, является полисахаридом, состоящим исключительно из соединенных друг за другом глюкозных субъединиц.



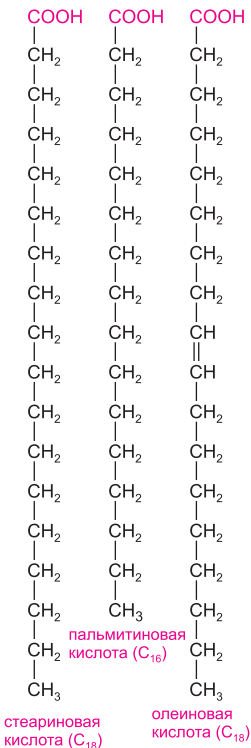
СЛОЖНЫЕ ОЛИГОСАХАРИДЫ

Во многих случаях последовательность сахаров является неповторимой. Возможно множество различных молекул. Такие сложные олигосахариды обычно связываются с белками или липидами, как и этот олигосахарид, который входит в состав расположенной на клеточной поверхности молекулы, определяющей групповую специфичность крови.

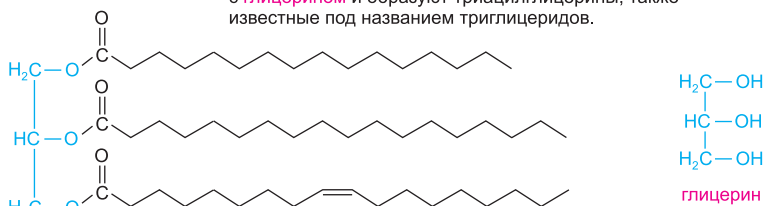


ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ

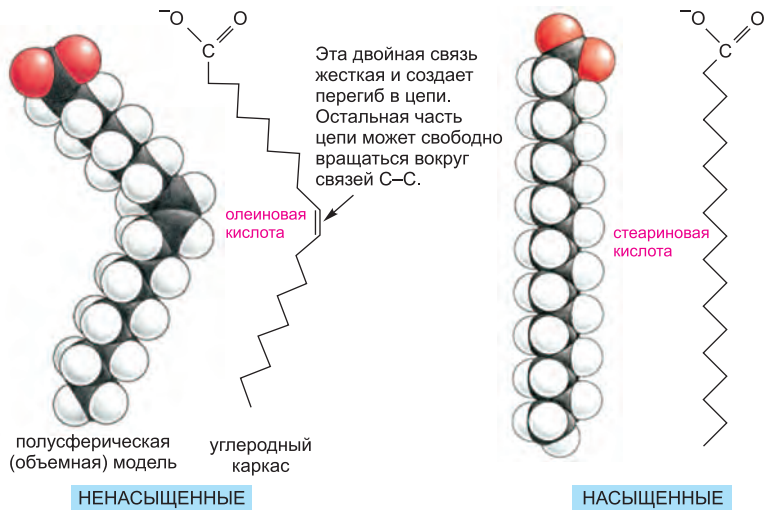
По сути, это карбоновые кислоты с длинными углеводородными хвостами.



ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИН Жирные кислоты сохраняются как резервный запас энергии (жиры и масла) — соединяются посредством эфирных связей с глицерином и образуют триацилглицерины, также известные под названием триглицеридов.



Существуют сотни различных видов жирных кислот. Некоторые имеют одну и более двойных связей в углеводородном хвосте и, как говорят, являются **ненасыщенными**. Жирные кислоты без двойных связей называют **насыщенными**.

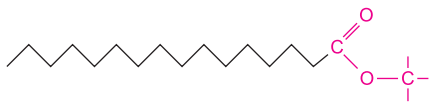


КАРБОКСИЛЬНАЯ ГРУППА

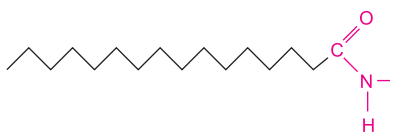
В свободном виде карбоксильная группа жирной кислоты будет ионизирована.



Но чаще она связана с другими группами и образует либо **эфиры**,

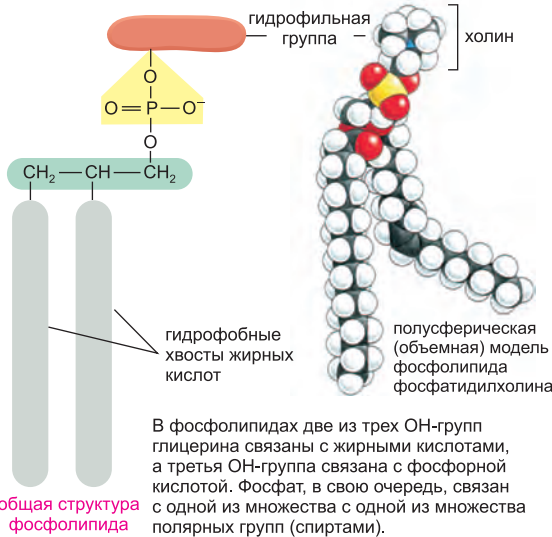


либо **амиды**.



ФОСФОЛИПИДЫ

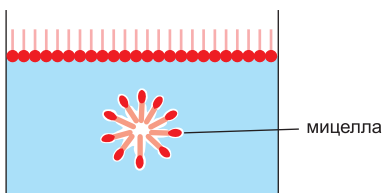
Фосфолипиды являются главными составляющими клеточных мембран.



ЛИПИДНЫЕ АГРЕГАТЫ

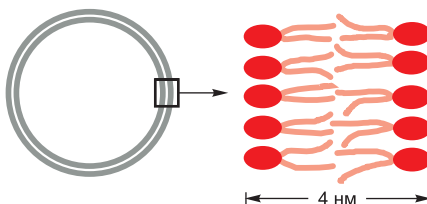
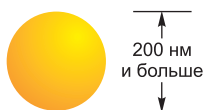
Жирные кислоты имеют гидрофильную головку и гидрофобный хвост

В воде они могут образовывать поверхностную пленку или маленькие мицеллы.



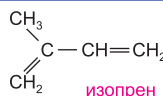
Их производные могут образовывать более крупные агрегаты, которые удерживаются вместе гидрофобными силами.

Триглицериды могут формировать крупные шарообразные жировые капельки в цитоплазме клетки. **Фосфолипиды** и **гликолипиды** образуют самозамыкающиеся двойные липидные слои (липидный бислой), которые являются основой всех клеточных мембран.



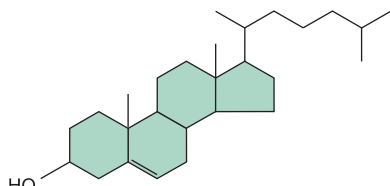
ПРОЧИЕ ЛИПИДЫ

Липидами называют входящие в состав клетки молекулы, не растворимые в воде, но растворимые в органических растворителях. (Такое определение «липидов» неоднозначно; в органической химии определение «липиды» основано на структурных особенностях данных соединений. — Прим. ред.). Два других общих типа липидов представлены стероидами и полиизопреноидами. Оба состоят из изопреновых единиц.

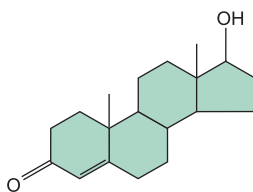


СТЕРОИДЫ

Всем стероидам присуща полициклическая структура.



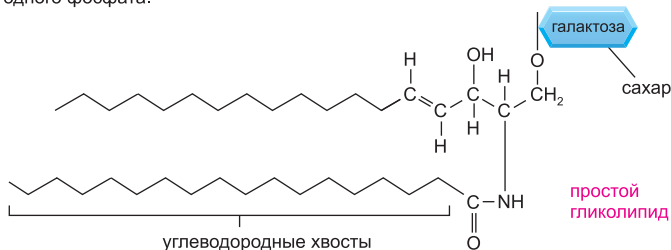
холестерин — встречается во многих мембранах



тестостерон — мужской стероидный гормон

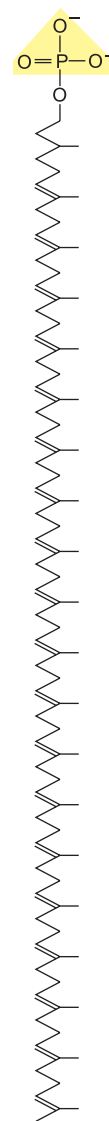
ГЛИКОЛИПИДЫ

Подобно фосфолипидам, эти соединения состоят из гидрофобной области, содержащей два длинных углеводородных хвоста, и полярной области, которая, однако, содержит один или несколько сахаров и ни одного фосфата.



ПОЛИИЗОПРЕНОИДЫ

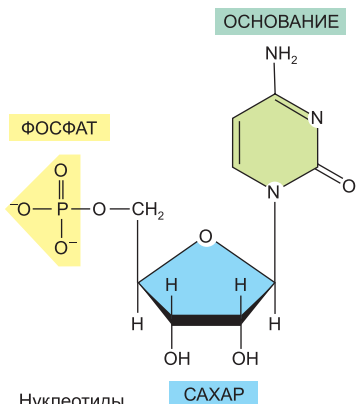
длинноцепные полимеры изопрена



долихолфосфат — используется для переноса активированных сахаров в процессе мембраноассоциированного синтеза гликопротеинов и некоторых полисахаридов

НУКЛЕОТИДЫ

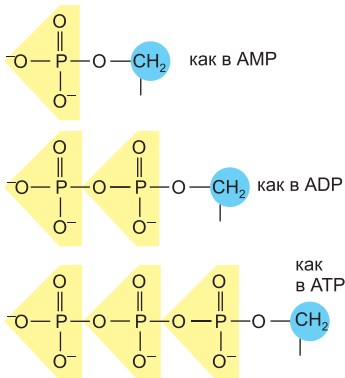
Любой нуклеотид состоит из содержащего азот основания, пятиуглеродного сахара и одной или нескольких фосфатных групп.



Нуклеотиды являются субъединицами **нуклеиновых кислот**.

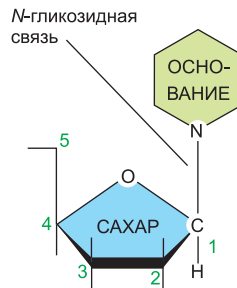
ФОСФАТЫ

Фосфаты обычно присоединяются вместо гидроксильной группы при атоме С₅ рибозы или дезоксирибозы (обозначенного 5'). Известны моно-, ди- и трифосфаты.



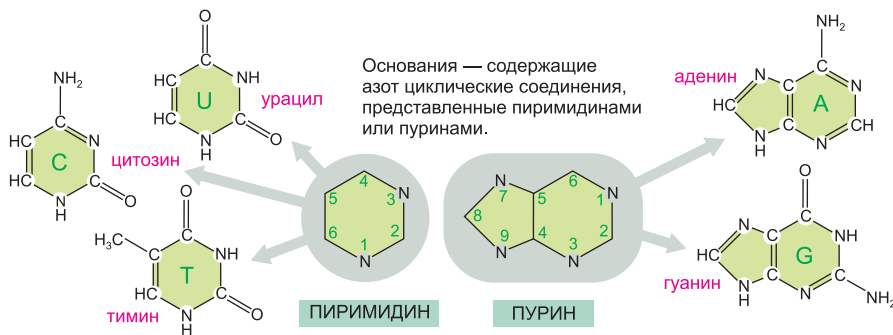
Фосфат придаёт нуклеотиду отрицательный заряд.

САХАРО-ОСНОВНАЯ СВЯЗЬ

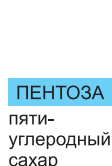


Основание связано с тем же атомом углерода (С1), который используется при образовании гликозидной связи между сахарами.

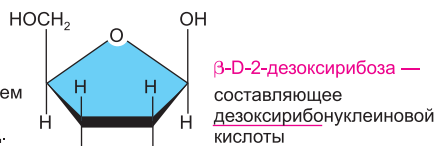
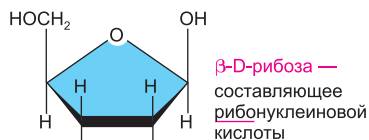
ОСНОВАНИЯ



САХАРА



два вида входит в состав нуклеиновых кислот



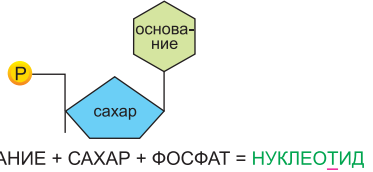
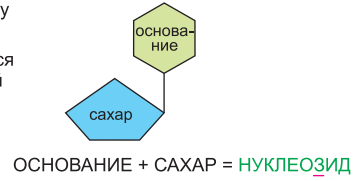
Каждый пронумерованный атом углерода во входящем в нуклеотид сахаре сопровождается знаком штриха; поэтому их называют «5-штрих атом углерода» и т. д.

НОМЕНКЛАТУРА Нуклеозид или нуклеотид называют согласно образуемому его азотистому основанию.

ОСНОВАНИЕ	НУКЛЕОЗИД	ОБОЗН.
аденин	аденозин	A
гуанин	гуанозин	G
цитозин	цитидин	C
урацил	уридин	U
тимин	тимидин	T

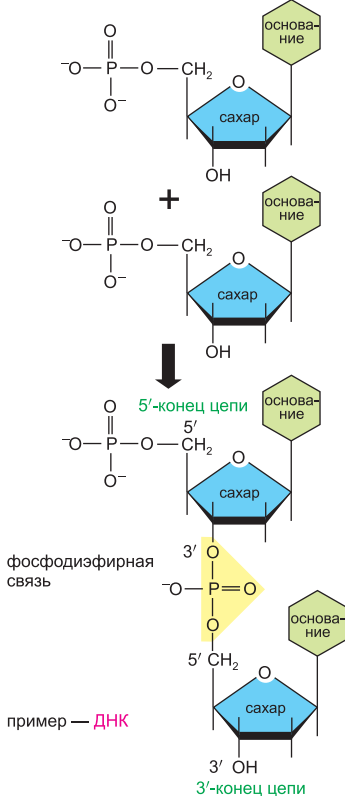
Однбуквенные обозначения употребляются в разных ситуациях в качестве сокращений для 1) основания в отдельности, 2) нуклеозиды или 3) целого нуклеотида — контекст, как правило, показывает, которое из трех соединений подразумевается. Когда контекст недостаточно исчерпывающий, мы добавляем термины «основание», «нуклеозид», «нуклеотид» или — как в представленных ниже примерах, — употребляем полные трёхбуквенные обозначения нуклеотидов.

AMP = аденозинмонофосфат
 dAMP = дезоксиаденозинмонофосфат
 UDP = уридиндифосфат
 ATP = аденозинтрифосфат



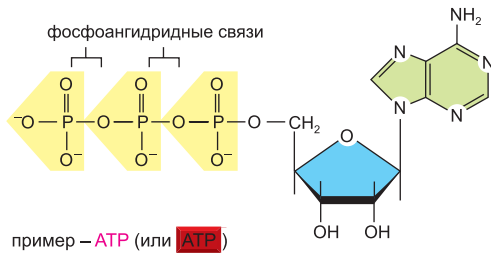
НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нуклеиновые кислоты образуются за счет последовательного соединения нуклеотидов посредством **фосфодиэфирных связей** между 5'- и 3'-атомами углерода. Линейная последовательность нуклеотидов в цепи нуклеиновой кислоты обычно обозначается однобуквенным кодом (A-G-C-T-T-A-C-A), причем 5'-конец цепи расположен слева.

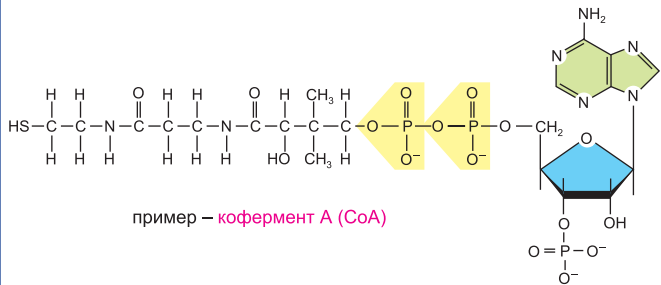


НУКЛЕОТИДЫ ИМЕЮТ МНОЖЕСТВО ИНЫХ ФУНКЦИЙ

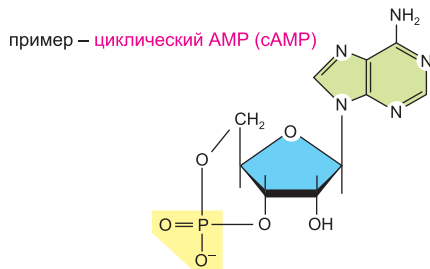
1 Они переносят химическую энергию, заключенную в их легко гидролизуемых фосфоангидридных связях.



2 Они взаимодействуют с другими группами и образуют коферменты.



3 Они используются в качестве специфических сигнальных молекул в клетке.

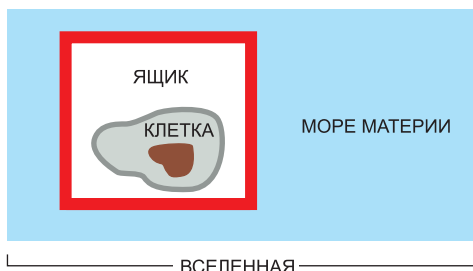


ЗНАЧЕНИЕ СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ ДЛЯ КЛЕТОК

Жизнь возможна благодаря сложной сети взаимосвязанных химических реакций, протекающих в каждой клетке организма. При взгляде на входящие в такую сеть метаболические пути может показаться, что клетка имела возможность в ходе эволюции заполучить любой фермент, способный выполнять любую необходимую ей реакцию. Но это не так. Хотя ферменты и являются мощными катализаторами, они могут ускорять только те реакции, которые благоприятны в термодинамическом отношении; все остальные реакции осуществляются в клетках только потому, что они *сопряжены* с очень благоприятными реакциями, которые и обуславливают их протекание. Вопрос о том, может ли та или иная реакция

происходить самопроизвольно или, напротив, должна быть сопряжена с какой-либо другой реакцией, крайне важен для клеточной биологии. Для ответа на него необходимо обратиться к величине, называемой *свободной энергией*: возможность протекания той или иной череды реакций определяется полным изменением свободной энергии в ходе всех этих реакций в целом. На этой вклейке мы объясним несколько основных представлений, — развитых в рамках специальной отрасли химии и физики, называемой *термодинамикой*, — которые необходимы для понимания того, что свободная энергия собой представляет и почему она столь важна для клеток.

ЭНЕРГИЯ, ВЫСВОБОЖДАЕМАЯ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ХИМИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ, ПРЕОБРАЗУЕТСЯ В ТЕПЛОТУ



Замкнутая система определяется как совокупность молекул, которая не обменивается веществом с остальной частью Вселенной (например, вышепредставленная «клетка в ящике»). Любая такая система будет содержать молекулы с полной энергией E . Эта энергия будет распределена по разным энергетическим категориям: часть как энергия поступательного движения молекул, часть как энергия их колебательных и вращательных движений, но большая часть — в виде энергии связей между отдельными атомами, из которых состоят молекулы. Предположим, что в такой системе происходит некоторая реакция. **Первый закон термодинамики** налагает ограничение на типы возможных реакций: он гласит, что **«при протекании любого процесса общая энергия Вселенной остается неизменной»**.

К примеру, предположим, что в каком-либо месте внутри ящика происходит реакция $A \rightarrow B$ и высвобождается большое количество энергии химических связей. Поначалу эта энергия увеличит интенсивность движений (поступательных, колебательных и вращательных) молекул системы, что равносильно повышению ее температуры. Однако вскоре эти усилившиеся движения будут переданы за пределы системы посредством череды межмолекулярных столкновений, которые нагревают сначала стенки ящика, а затем и внешний мир (представленный в нашем примере морем материи). В конце концов система возвращается к своей первоначальной температуре, причем к этому

времени вся энергия химических связей, высвобожденная в ящике, будет преобразована в тепловую энергию и передана из ящика во внешнюю среду. Согласно первому закону термодинамики, изменение энергии в ящике ($\Delta E_{\text{ящ}}$, которое мы обозначим ΔE) должно быть равно и противоположно по знаку количеству переданной тепловой энергии, которое мы обозначим буквой h , то есть $\Delta E = -h$. Таким образом, по мере того как теплота уходит из системы, энергия в ящике (E) уменьшается.

Энергия E может измениться также и в результате работы, совершенной во внешнем мире. Например, предположим, что в процессе реакции имеет место небольшое увеличение объема (ΔV) ящика. Так как стенки ящика должны сопротивляться постоянному давлению P внешней среды, стремящейся расширяться, во внешнем мире совершается работа, на которую затрачивается энергия. Согласно первому закону термодинамики, за счет потребленной энергии $P(\Delta V)$ энергия в ящике E должна уменьшиться на то же количество. При протекании большинства реакций энергия химических связей преобразуется и в работу, и в теплоту. **Энтальпия H** — это сложная функция, которая включает в себя энергию обоих видов ($H = E + PV$). Если быть точным, то в замкнутой системе именно изменение энтальпии ΔH , а не изменение энергии, равно теплоте, сообщенной внешнему миру в процессе реакции. Реакции, в ходе которых H уменьшается, сопровождаются выделением теплоты во внешнюю среду и называются «экзотермическими», тогда как реакции, во время которых H увеличивается, сопровождаются поглощением теплоты из внешней среды и называются «эндотермическими». Таким образом, $-h = \Delta H$. Однако в большинстве биологических реакций изменение объема пренебрежимо мало, так что с достаточно хорошим приближением мы получаем вполне справедливое выражение

$$-h = \Delta H \cong \Delta E.$$

ВТОРОЙ ЗАКОН ТЕРМОДИНАМИКИ

Рассмотрим контейнер, в котором вся 1 000 монет лежит орлами вверх. Если некоторое время контейнер энергично встряхивать, подвергая монеты всем видам беспорядочных движений, которые все молекулы испытывают ввиду их частых столкновений с собратьями, то в итоге приблизительно половина монет уляжется орлами вниз. Причина такой переориентации состоит в том, что существует лишь один-единственный способ, которым первоначальное упорядоченное состояние монет может быть восстановлено (все монеты должны лежать орлами вверх), тогда как число различных способов достигнуть неупорядоченного состояния, в котором находится смесь равных количеств

монет, смотрящих вверх орлами и решками, огромно (примерно 10^{288}); фактически число способов достичь состояния 50/50 превышает число способов достижения любого другого состояния. Вероятность наступления всякого такого состояния пропорциональна числу способов, которыми оно может быть достигнуто. **Второй закон термодинамики** гласит, что **«системы самопроизвольно переходят из состояний меньшей вероятности в состояния большей вероятности»**. Так как состояния меньшей вероятности более «упорядочены», чем состояния большей вероятности, второй закон может быть переформулирован следующим образом: **«Вселенная неизменно стремится к разупорядочиванию»**.

ЭНТРОПИЯ S

Второй (но ни в коем случае не первый) закон позволяет предсказывать *направление* любой отдельно взятой реакции. Но, чтобы употребить его с пользой для дела, необходимо располагать удобной мерой вероятности или, что равносильно, степенью беспорядка того или иного состояния. Энтропия S и есть такая мера. Это логарифмическая функция вероятности, такая, что *изменение энтропии* ΔS , происходящее, когда реакция A → B превращает один моль вещества A в один моль вещества B, равно:

$$\Delta S = R \ln p_B/p_A,$$

где p_A и p_B — вероятности двух состояний: A и B, R — универсальная газовая постоянная (2 кал/градус-моль), а ΔS измеряется в единицах энтропии (eu). В нашем первом примере с 1000-й монет относительная вероятность выпадения всех орлов (состояние A) против выпадения половины орлов и половины решек (состояние B) равно отношению чисел различных способов, которыми эти два результата могут быть получены. Можно вычислить, что $p_A = 1$, а $p_B = 1000!(500! \times 500!) = 10^{299}$. Поэтому изменение энтропии в процессе переориентации монет при энергичном встряхивании содержащего их контейнера, когда получается равная смесь орлов и решек,

равна $R \ln(10^{299})$, или приблизительно 1370 eu на моль таких контейнеров ($6 \cdot 10^{23}$ контейнеров). Мы видим, что, поскольку определенное выше изменение энтропии ΔS положительно для перехода из состояния A в состояние B ($p_B/p_A > 1$), постольку реакции с большим увеличением S (то есть такие, для которых $\Delta S > 0$), являются благоприятными и происходят самопроизвольно.

Как сказано в главе 2-й, тепловая энергия вызывает беспорядочное столкновение молекул. Поскольку передача теплоты из замкнутой системы в окружающую ее среду увеличивает число вариантов различного взаимного расположения, которое могут принимать молекулы внешнего мира, постольку она увеличивает их энтропию. Можно показать, что при низкой температуре высвобождение определенного количества тепловой энергии имеет большее разупорядочивающее действие, чем при высокой температуре, и что величина ΔS внешней среды, согласно данному выше определению ($\Delta S_{\text{моря}}$), в точности равна величине h , — количеству теплоты, переданной внешней среде из системы, — деленной на абсолютную температуру T:

$$\Delta S_{\text{моря}} = h/T.$$

СВОБОДНАЯ ЭНЕРГИЯ ГИББСА G

Имея дело с замкнутой биологической системой, хотелось бы иметь простой способ предсказания того, будет данная реакция в такой системе происходить самопроизвольно или не будет. Как явствует из наших рассуждений, ключом к ответу на этот вопрос является знак (положительный или отрицательный) изменения энтропии Вселенной при протекании этой реакции. В нашей идеальной системе (клетка в ящичке) находятся две независимые друг от друга составляющие изменения энтропии Вселенной — изменение энтропии системы, заключенной в ящичок, и изменение энтропии окружающего «моря», — и обе нужно сложить вместе, прежде чем может быть дан какой-либо ответ. Например, вполне возможно, что реакция будет поглощать теплоту и тем самым уменьшать энтропию моря ($\Delta S_{\text{моря}} < 0$) и в то же самое время вызывать столь высокую степень разупорядочивания внутри ящичка ($\Delta S_{\text{ящичка}} > 0$), что общее $\Delta S_{\text{Вселенной}} = \Delta S_{\text{моря}} + \Delta S_{\text{ящичка}}$ будет больше нуля. В таком случае реакция будет происходить самопроизвольно, даже притом что в ходе такой реакции море отдаст теплоту ящичку. Примером такой реакции может послужить растворение хлорида натрия в мензурке с водой («ящичок»), каковой процесс является самопроизвольным, хотя температура воды падает по мере перехода соли в раствор.

Химики нашли полезным определить ряд новых «сложных функций», которые описывают *сочетания* физических свойств системы. К свойствам, которые способны сочетаться законным с точки зрения физиков способом, относятся: температура T, давление P, объем V, энергия E и энтропия S. Рассмотренная нами энтальпия H — как раз одна из таких сложных функций. Однако для биологов наиболее полезной из них является, бесспорно, *свободная энергия Гиббса G*. Она служит своего рода счетным устройством, которое позволяет выводить изменение энтропии Вселенной, происходящее из химической реакции в ящичке, и притом избавляет от необходимости отдельно учитывать изменение

$$G = H - TS,$$

где, для ящичка объема V, H — энтальпия, описанная выше ($E + PV$), T — абсолютная температура, а S — энтропия.

Все эти величины относятся только ко внутреннему пространству ящичка. Изменение свободной энергии в ходе реакции в ящичке (G продуктов минус G исходных материалов) обозначается ΔG и, как мы вскоре покажем, служит прямой мерой количества беспорядка, создаваемого во Вселенной в процессе реакции.

При постоянной температуре изменение свободной энергии ΔG в ходе реакции равно $\Delta H - T\Delta S$. Помня, что $\Delta H = -h$, то есть теплоте, поглощенной из моря, мы имеем:

$$-\Delta G = -\Delta H + T\Delta S, \\ -\Delta G = h + T\Delta S, \text{ откуда } -\Delta G/T = h/T + \Delta S.$$

Но h/T равно изменению энтропии моря ($\Delta S_{\text{моря}}$), а ΔS в верхнем уравнении есть $\Delta S_{\text{ящичка}}$. Поэтому

$$-\Delta G/T = \Delta S_{\text{моря}} + \Delta S_{\text{ящичка}} = \Delta S_{\text{Вселенная}}.$$

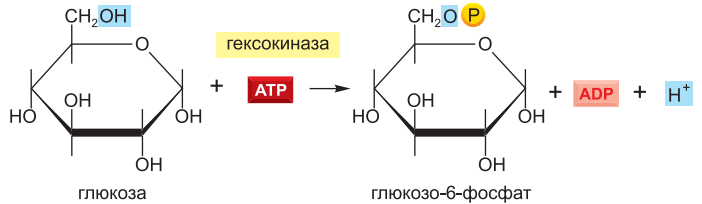
Итак, мы пришли к заключению о том, что **изменение свободной энергии есть прямая мера изменения энтропии Вселенной**. Реакция будет протекать в том направлении, в котором изменение свободной энергии ΔG будет меньше нуля, потому что в этом случае реакция обусловит положительное изменение энтропии Вселенной.

Для сложного набора сопряженных реакций, включающего в себя множество различных молекул, полное изменение свободной энергии может быть вычислено путем простого сложения свободных энергий всех молекул после реакции и сравнения этого значения с суммой свободных энергий всех молекул до начала реакции; для простых веществ необходимые значения свободной энергии могут быть найдены по справочным таблицам. Подобным образом можно предсказать направление той или иной реакции и тем самым легко проверить работоспособность любого предложенного механизма. Таким образом, например, на основании наблюдаемых значений величины электрохимического градиента протонов через внутреннюю мембрану митохондрий и ΔG реакции гидролиза ATP внутри митохондрии, можно убедиться, что для синтеза каждой очередной молекулы ATP ATP-синтаза требует, чтобы через мембрану прошло более одного протона.

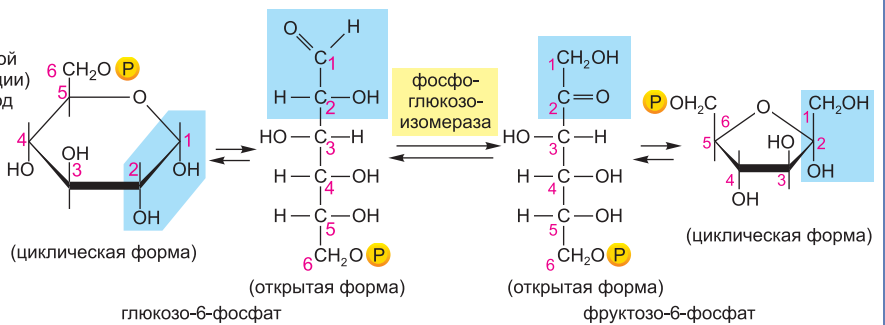
Значение ΔG реакции есть прямая мера того, как далеко реакция находится от состояния равновесия. Большое отрицательное значение для реакции гидролиза ATP в клетке лишь отражает тот факт, что клетки проводят эту реакцию в состоянии, на 10 порядков отклонившись от состояния равновесия. Если какая-либо реакция достигает равновесия, при котором $\Delta G = 0$, то после этого она протекает в прямом и обратном направлениях с абсолютно равными скоростями. В случае гидролиза ATP равновесие будет достигнуто лишь тогда, когда практически вся ATP будет гидролизирована, что имеет место в мертвой клетке.

На каждом этапе часть молекулы, которая подвергается изменению, оттенена синим цветом, а название фермента, который катализирует данную реакцию, дано на желтом фоне.

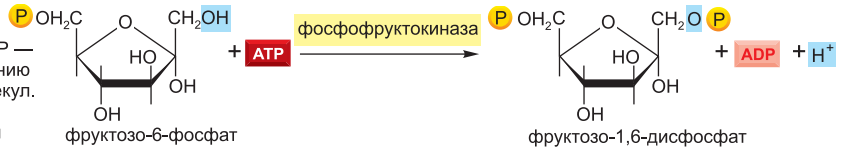
ЭТАП 1. Глюкоза фосфорилируется с участием АТФ и образует сахарофосфат. Отрицательный заряд фосфата препятствует прохождению сахарофосфата через плазматическую мембрану и таким образом запирает глюкозу внутри клетки.



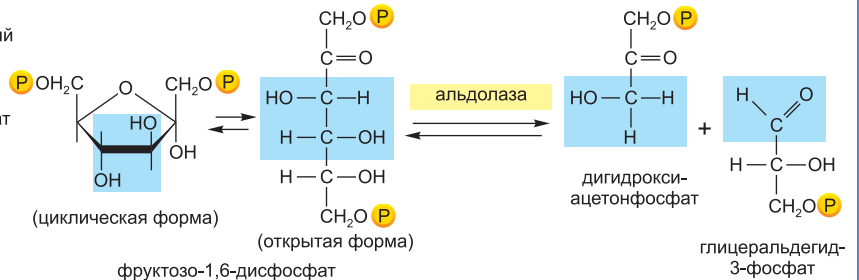
ЭТАП 2. В результате легко обратимой перестройки химической структуры (изомеризации) карбонильный кислород перемещается с атома углерода 1 на атом углерода 2 и из сахара-альдозы образуется кетоза. (см. вклейку 2.4.)



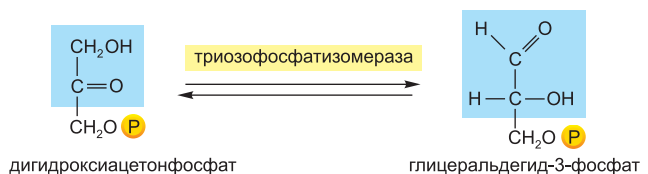
ЭТАП 3. Новая гидроксильная группа на атоме углерода 1 фосфорилируется с участием АТФ — как подготовка к образованию двух трехуглеродных молекул. Вступление сахаров в гликолиз контролируется именно на этом этапе и обусловлено регуляторным действием фермента *фосфофруктокиназы*.



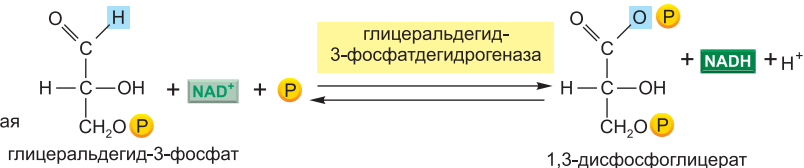
ЭТАП 4. Шестиуглеродный сахар расщепляется на две трехуглеродные молекулы. Только глицеральдегид-3-фосфат может незамедлительно перейти к гликолизу.



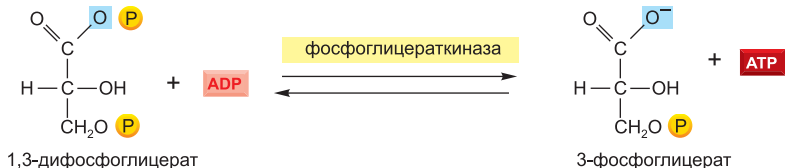
ЭТАП 5. Другой продукт этапа 4 — дигидроксиацетонфосфат — изомеризуется с образованием глицеральдегид-3-фосфата.



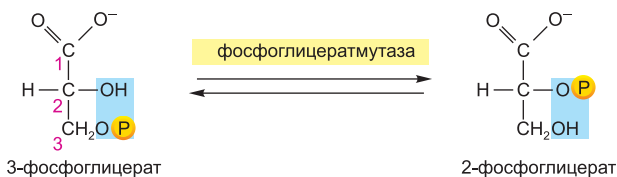
ЭТАП 6. Две молекулы глицеральдегид-3-фосфата окисляются. Начинается энерговырабатывающая стадия гликолиза, поскольку здесь образуется NADH и новая высокоэнергетическая ангидридная связь с фосфатом (см. рис. 2.73).



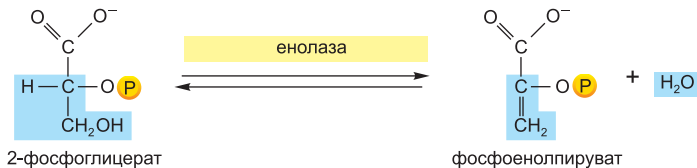
ЭТАП 7. Образование ATP путем переноса на ADP высокоэнергетической фосфатной группы, полученной на 6 этапе.



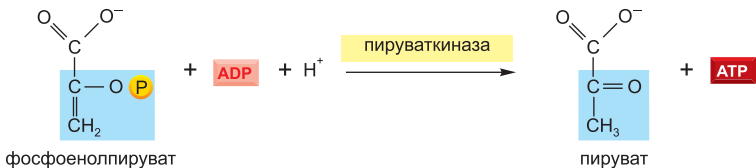
ЭТАП 8. Оставшаяся в 3-фосфоглицерате фосфоэфирная связь, которая обладает относительно низкой свободной энергией гидролиза, перемещается с атома углерода 3 на атом углерода 2 с образованием 2-фосфоглицерата.



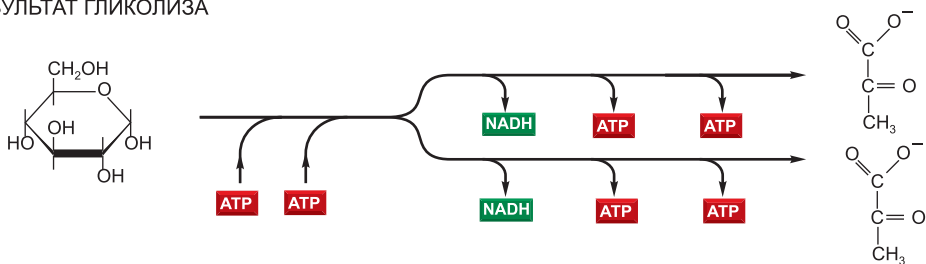
ЭТАП 9. В результате удаления воды из 2-фосфоглицерата создается высокоэнергетическая енолфосфатная связь.

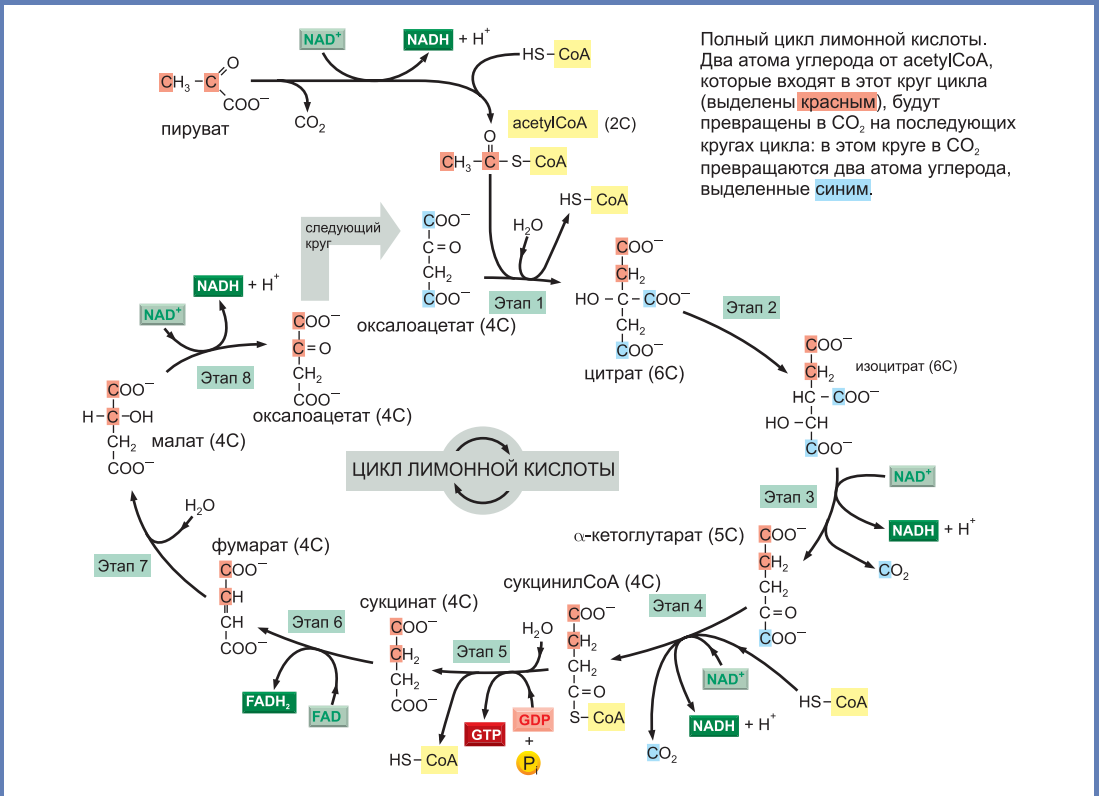


ЭТАП 10. Высокоэнергетическая фосфатная группа, созданная на 9-м этапе, переносится на ADP с образованием ATP, на чем и завершается гликолиз.

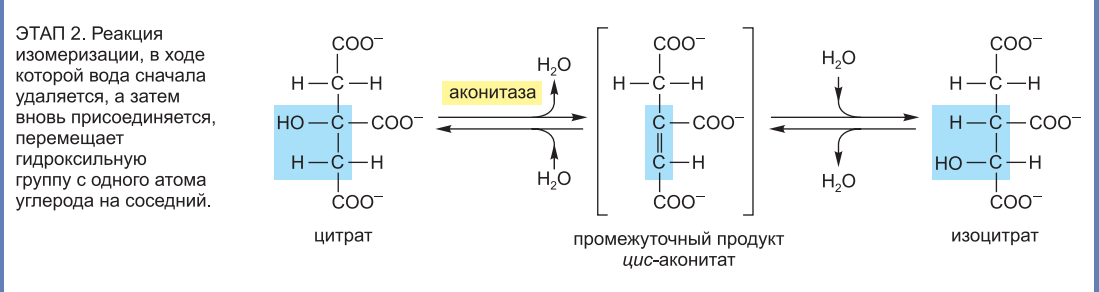
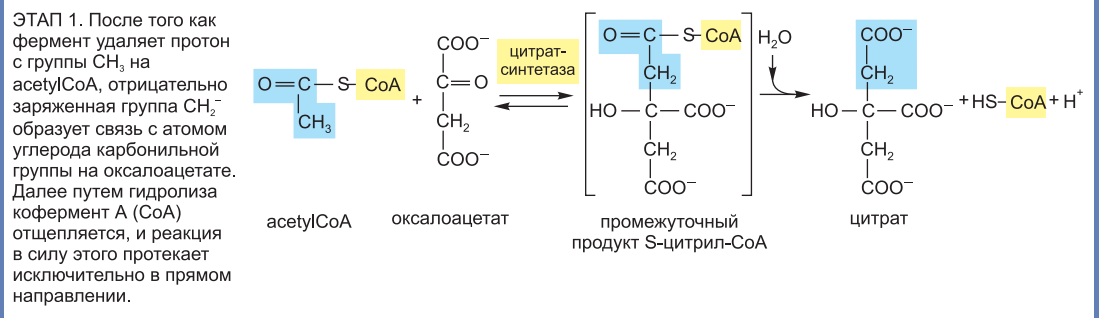


ОБЩИЙ РЕЗУЛЬТАТ ГЛИКОЛИЗА

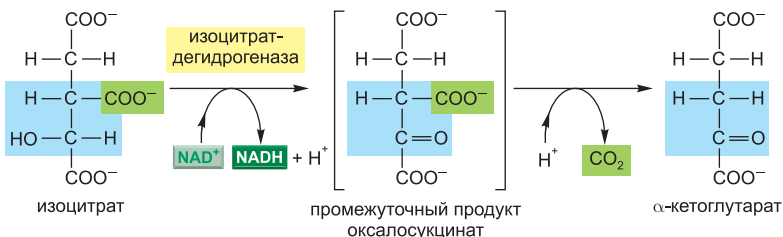




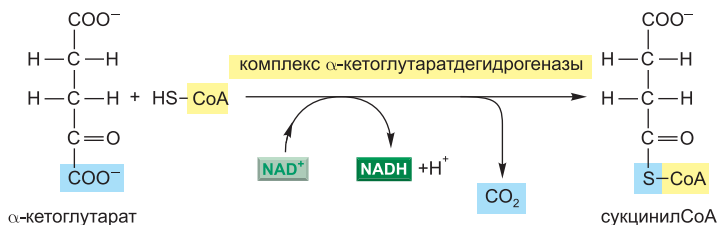
Ниже представлено подробное описание всех восьми этапов. На каждом этапе часть молекулы, которая подвергается изменению, оттенена **синим** цветом, а название фермента, который катализирует данную реакцию, дано на **желтом** фоне.



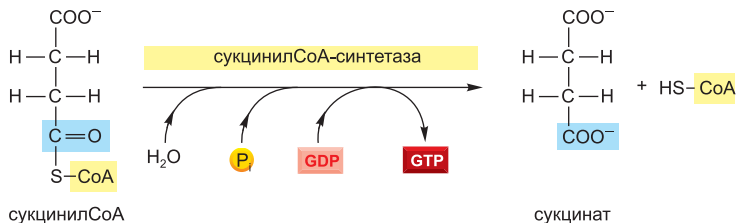
ЭТАП 3. На первом из четырех окислительных этапов цикла атом углерода, который несет гидроксильную группу, превращается в карбонильную группу. Непосредственный продукт неустойчив и теряет CO_2 , но при этом все еще прикреплен к ферменту.



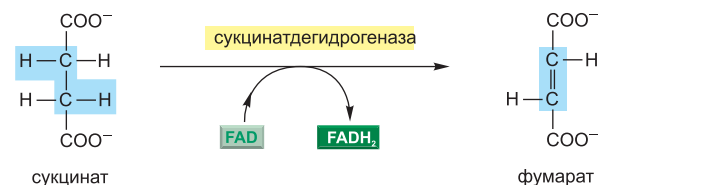
ЭТАП 4. Комплекс α -кетоглутаратдегидрогеназы сильно напоминает крупный ферментный комплекс, который превращает пируват в ацetylCoA (пируватдегидрогеназа). Он подобным же образом катализирует окисление с образованием NADH, CO_2 и высокоэнергетической тиоэфирной связи с коферментом А (CoA).



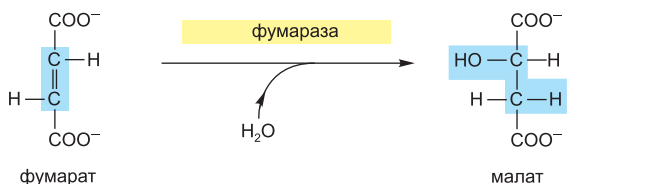
ЭТАП 5. Молекула фосфата из раствора замещает CoA и образует высокоэнергетическую фосфатную связь с сукциноматом. Затем этот фосфат переносится на GDP с образованием GTP. (У бактерий и растений вместо него образуется ATP.)



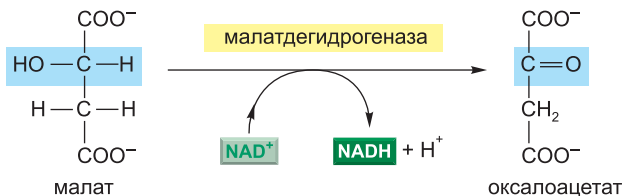
ЭТАП 6. На третьем окислительном этапе цикла FAD удаляет два атома водорода из сукцината.



ЭТАП 7. За счет присоединения молекулы воды к фумарату рядом с атомом углерода карбонильной группы оказывается гидроксильная группа.



ЭТАП 8. На последнем из четырех окислительных этапов цикла атом углерода, несущий гидроксильную группу, превращается в карбонильную группу, в результате чего вновь образуется оксалоацетат, необходимый для этапа 1.



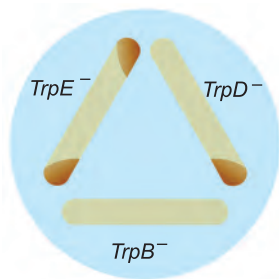
РЕЗУЛЬТАТ ЭКСПЕРИМЕНТА
С ПЕРЕКРЕСТНЫМ ПИТАНИЕМ

Рис. Q2.6. Определение пути синтеза триптофана при помощи экспериментов с перекрестным питанием (задача 2.27). Результаты эксперимента с перекрестным питанием мутантов, у которых нарушены различные этапы пути биосинтеза триптофана. Темные области на дне чашки Петри показывают области роста клеток.

2.27. Пути синтеза аминокислот в микроорганизмах удалось определить отчасти благодаря экспериментам с перекрестным питанием мутантных организмов, у которых были нарушены разные этапы одного и того же биохимического пути. Результаты экспериментов с перекрестным питанием над тремя мутантами с нарушениями в метаболизме триптофана: *TrpB*⁻, *TrpD*⁻ и *TrpE*⁻ — представлены на **рис. Q2.6**. Мутанты высевали полосками на чашку Петри и выращивали короткое время в присутствии очень низких количеств триптофана, в результате чего проявлялись три бледные полосы. Как видно, наиболее бурный рост наблюдался в тех местах, где одни полосы находились вблизи других полос. Эти пятна более усиленного роста указывают, что один мутант может питать (снабжать выделяемым промежуточным продуктом) другого.

Исходя из представленной на рис. Q2.6 схемы перекрестного питания, выведите порядок этапов, управляемых продуктами генов *TrpB*, *TrpD* и *TrpE*. Объясните ход ваших рассуждений.

Литература

Общие вопросы

Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer L. (2006) *Biochemistry*, 6th ed. New York: WH Freeman.

Garrett R. H. & Grisham C. M. (2005) *Biochemistry*, 3rd ed. Philadelphia: Thomson Brooks/Cole.

Horton H. R., Moran L. A., Scrimgeour et al. (2005) *Principles of Biochemistry* 4th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

Nelson D. L. & Cox M. M. (2004) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed. New York: Worth.

Nicholls D. G. & Ferguson S. J. (2002) *Bioenergetics*, 3rd ed. New York: Academic Press

Mathews C. K., van Holde K. E. & Ahem K.-G. (2000) *Biochemistry*, 3rd ed. San Francisco: Benjamin Cummings.

Moore J. A. (1993) *Science As a Way of Knowing*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Voet D., Voet J. G. & Pratt C. M. (2004) *Fundamentals of Biochemistry*, 2nd ed. New York: Wiley.

Химические компоненты клетки

Abeles R. H., Frey P. A. & Jencks W. P. (1992) *Biochemistry*. Boston: Jones & Bartlett.

Atkins P. W. (1996) *Molecules*. New York: WH Freeman.

Branden C. & Tooze J. (1999) Introduction to Protein Structure, 2nd ed. New York: Garland Science.

Bretscher M.S. (1985) The molecules of the cell membrane. *Sci. Am.* 253: 100–109.

Burley S.K. & Petsko G.A. (1988) Weakly polar interactions in proteins. *Adv. Protein Chem.* 39: 125–189.

De Duve C. (2005) Singularities: Landmarks on the Pathways of Life. Cambridge: Cambridge University Press.

Dowhan W. (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* 66: 199–232.

Eisenberg D. & Kauzman W. (1969) The Structure and Properties of Water. Oxford: Oxford University Press.

Fersht A.R. (1987) The hydrogen bond in molecular recognition. *Trends. Biochem. Sci.* 12: 301–304.

Franks F. (1993) Water. Cambridge: Royal Society of Chemistry.

Henderson L.J. (1927) The Fitness of the Environment, 1958 ed. Boston: Beacon.

Neidhardt F.C., Ingraham J.L. & Schaechter M. (1990) Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach. Sunderland, MA: Sinauer.

Pauling L. (1960) The Nature of the Chemical Bond, 3rd ed. Ithaca, NY: Cornell University Press.

Saenger W. (1984) Principles of Nucleic Acid Structure. New York: Springer.

Sharon N. (1980) Carbohydrates. *Sci. Am.* 243: 90–116.

Stillinger F.H. (1980) Water revisited. *Science* 209: 451–457.

Tanford C. (1978) The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* 200: 1012–1018.

Tanford C. (1980) The Hydrophobic Effect. Formation of Micelles and Biological Membranes, 2nd ed. New York: John Wiley.

Катализ и использование энергии клетками

Atkins P.W. (1994) The Second Law: Energy, Chaos and Form. New York: Scientific American Books.

Atkins P.W. & De Paula J.D. (2006) Physical Chemistry for the Life Sciences. Oxford: Oxford University Press.

Baldwin J.E. & Krebs H. (1981) The Evolution of Metabolic Cycles. *Nature* 291: 381–382.

Berg H.C. (1983) Random Walks in Biology. Princeton, NJ: Princeton University Press.

Dickerson R.E. (1969) Molecular Thermodynamics. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings.

Dill K.A. & Bromberg S. (2003) Molecular Driving Forces: Statistical Thermodynamics in Chemistry and Biology. New York: Garland Science.

Dressler D. & Potter H. (1991) Discovering Enzymes. New York: Scientific American Library.

Einstein A. (1956) Investigations on the Theory of Brownian Movement. New York: Dover.

Fruton J.S. (1999) Proteins, Enzymes, Genes: The Interplay of Chemistry and Biology. New Haven: Yale University Press.

Goodsell D.S. (1991) Inside a living cell. *Trends. Biochem. Sci.* 16: 203–206.

Karplus M. & McCammon J.A. (1986) The dynamics of proteins. *Sci. Am.* 254:42–51.

Karplus M. & Petsko G.A. (1990) Molecular dynamics simulations in biology. *Nature* 347:631–639.

Kauzmann W. (1967) Thermodynamics and Statistics: with Applications to Gases. In *Thermal Properties of Matter Vol. 2*. New York: WA Benjamin, Inc.

Kornberg A. (1989) *For the Love of Enzymes*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Lavenda B.H. (1985) Brownian Motion. *Sci. Am.* 252: 70–85.

Lawlor D.W. (2001) *Photosynthesis*, 3rd ed. Oxford: BIOS.

Lehninger A.L. (1971) *The Molecular Basis of Biological Energy Transformations*, 2nd ed. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings.

Lipmann F. (1941) Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Adv. Enzymol.* 1: 99–162.

Lipmann F. (1971) *Wanderings of a Biochemist*. New York: Wiley.

Nisbet E.E. & Sleep N.H. (2001) The habitat and nature of early life. *Nature* 409: 1083–1091.

Racker E. (1980) From Pasteur to Mitchell: a hundred years of bioenergetics. *Fed. Proc.* 39: 210–215.

Schrödinger E. (1944 & 1958) *What is Life?: The Physical Aspect of the Living Cell and Mind and Matter*, 1992 combined ed. Cambridge: Cambridge University Press.

van Holde K.E., Johnson W.C. & Ho P.S. (2005) *Principles of Physical Biochemistry*, 2nd ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

Walsh C. (2001) Enabling the chemistry of life. *Nature* 409: 226–231.

Westheimer F.H. (1987) Why nature chose phosphates. *Science* 235: 1173–1178.

Youvan D.C. & Marrs B.L. (1987) Molecular mechanisms of photosynthesis. *Sci. Am.* 256: 42–49.

Как клетки извлекают энергию из пищи

Cramer W.A. & Knaff D.B. (1990) *Energy Transduction in Biological Membranes*. New York: Springer-Verlag.

Dismukes G.C., Klimov W., Baranov S.V. et al. (2001) The origin of atmospheric oxygen on Earth: The innovation of oxygenic photosynthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98: 2170–2175.

Fell D. (1997) *Understanding the Control of Metabolism*. London: Portland Press.

Flatt J.P. (1995) Use and storage of carbohydrate and fat. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 952S–959S.

Friedmann H.C. (2004) From *Butyobacterium* to *E. coli*: An essay on unity in biochemistry. *Perspect. Biol. Med.* 47: 47–66.

Fothergill-Gilmore L.A. (1986) The evolution of the glycolytic pathway. *Trends Biochem. Sci.* 11: 47–51.

Heinrich R., Melendez-Hevia E., Montero F. et al. (1999) The structural design of glycolysis: An evolutionary approach. *Biochem. Soc. Trans.* 27: 294–298.

Huynen M.A., Dandekar T. & Bork P. (1999) Variation and evolution of the citric-acid cycle: a genomic perspective. *Trends Microbiol.* 7: 281–291.

Kornberg H.L. (2000) Krebs and his trinity of cycles. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 1: 225–228.

Krebs H.A. & Martin A. (1981) *Reminiscences and Reflections*. Oxford/New York: Clarendon Press/Oxford University Press.

Krebs H.A. (1970) The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14: 154–170.

Martin B.R. (1987) *Metabolic Regulation: A Molecular Approach*. Oxford: Blackwell Scientific.

McGilvery R.W. (1983) *Biochemistry: A Functional Approach*, 3rd ed. Philadelphia: Saunders.

Morowitz H.J. (1993) *Beginnings of Cellular Life: Metabolism Recapitulates Biogenesis*. New Haven: Yale University Press

Newsholme E.A. & Stark C. (1973) *Regulation of Metabolism*. New York: Wiley.

3

Белки

Когда мы смотрим на клетку через микроскоп или анализируем ее электрическую или биохимическую активность, мы, в сущности, наблюдаем за белками. Белки составляют основную долю сухой массы клетки. Они не только служат стандартными компоновочными блоками клетки, но и выполняют почти все ее функции. Так, ферменты обеспечивают клетку замысловатым молекулярным «ландшафтом», где, как истоки рек, «берут начало» многочисленные химические реакции. Белки, погруженные в плазматическую мембрану, образуют каналы и насосы, которые управляют прохождением маленьких молекул в клетку и из нее. Другие белки несут сообщения от одной клетки к другой или работают интеграторами сигналов, пересылая группы сигналов внутрь клетки — от плазматической мембраны к ядру. А есть такие, которые служат крошечными молекулярными машинами с подвижными органами: *кinezин*, например, проталкивает органеллы через цитоплазму; *топоизомераза* может распутать спутавшиеся молекулы ДНК. Некоторые специализированные белки функционируют как антитела, токсины или гормоны; есть белки — молекулы антифриза, эластичные волокна, канаты или источник люминесценции. Прежде чем мы утвердимся в надежде постичь принципы работы генов, механизмы сокращения мышц, природу нервных импульсов, таинство развития эмбриона или узнать, как работает наше тело, мы должны глубоко понять то, что объединяет все эти процессы, — это белки.

3.1. Форма и структура белков

С химической точки зрения белки, безусловно, являются наиболее сложными по структуре и выполняют наиболее замысловатые функции по сравнению со всеми прочими известными молекулами. Возможно, это не покажется удивительным, если представить, что структура и химия каждого белка развивались, тонко настраивались и отлаживались на протяжении миллиардов лет истории эволюции. И все же даже искусственных специалистов не может не удивлять необычайная многогранность белков.

В этом параграфе мы рассмотрим, как местоположение каждой аминокислоты в длинной цепи аминокислот, которая и образует белок, определяет его трехмерную структуру. Далее в этой главе, на фоне полученных представлений о строении белка на атомном уровне, мы опишем, как точная форма каждой молекулы белка определяет ее функцию в клетке.

3.1.1. Форма белка определяется последовательностью входящих в его состав аминокислот

Белки собираются из 20-ти типов различных аминокислот, каждая из которых характеризуется своими химическими свойствами. Молекула **белка** состоит из длинной цепи этих аминокислот, связанных между собой ковалентными пептидными

связями. Белки поэтому известны также под названием *полипептидов*. Каждому типу белка свойственна уникальная последовательность аминокислот, и существует много тысяч различных белков, причем каждому присуща своя собственная специфическая последовательность аминокислот.

Повторяющаяся последовательность атомов, образующая стержень полипептидной цепи, называется **полипептидной основной цепью** (полипептидным каркасом). К этой цепи из повторяющихся звеньев прикреплены те звенья аминокислот, которые не участвуют в создании пептидной связи, но придают аминокислотам их уникальные свойства: 20 различных **боковых цепей** аминокислот (**рис. 3.1**). Некоторые из этих боковых цепей неполярны и гидрофобны («боящиеся воды»), другие отрицательно или положительно заряжены, некоторые легко образуют ковалентные связи и так далее. В **приложении 3.1 (стр. 128–129)** показаны их атомные структуры, а на **рис. 3.2** приведены их полные и сокращенные названия.

Как было сказано в главе 2, атомы ведут себя подобно твердым шарам с определенным радиусом (*ван-дер-ваальсов радиус*). Выполнение требования, что никакие два атома не должны перекрываться, значительно ограничивает возможные углы связей в полипептидной цепи (**рис. 3.3**). Это условие и другие стерические взаимодействия накладывают строгие ограничения на число возможных вариантов трехмерного расположения атомов (или *конформацию*). Тем не менее длинная гибкая цепь типа белка может все же сворачиваться огромным числом способов.

Кроме того, сворачивание белковой цепи (фолдинг) определяется множеством слабых *нековалентных связей*, которые образуются между различными участками цепи. В них участвуют как атомы основной полипептидной цепи, так и атомы боковых цепей аминокислот. Известно три типа слабых связей: *водородные связи*, *силы электростатического притяжения* и *ван-дер-ваальсовы силы*, о чем было сказано в главе 2 (см. **стр. 54**). Отдельные нековалентные связи в 30–300 раз слабее типичных ковалентных связей, определяющих целостность биологических молекул. Но множество слабых взаимодействий, действующих вместе, может прочно скрепить две области полипептидной цепи друг с другом. Вот так объединенная сила большого числа таких нековалентных взаимодействий определяет устойчивость каждой по-своему скрученной формы (**рис. 3.4**).

Четвертая «слабая сила» также играет ведущую роль в формировании пространственной структуры белка. Как было описано в главе 2, гидрофобные молекулы, а в их числе и неполярные боковые цепи определенных аминокислот, имеют тенденцию притягиваться друг к другу в водной среде, что минимизирует их разрушающее действие на стянутую водородными связями сеть молекул воды (см. **стр. 54** и приложение 2.2, **стр. 108–109**). Поэтому важный фактор, управляющий фолдингом любого белка, — это распределение его полярных и неполярных аминокислот. Неполярные (гидрофобные) боковые цепи в белке — таких аминокислот, как фенилаланин, лейцин, валин и триптофан, — стремятся группироваться во внутренней части молекулы (так же как и гидрофобные капельки масла объединяются в воде и образуют одну большую каплю). Это позволяет им избежать контакта с водой, которая окружает их в клетке. В отличие от них, полярные группы, — те, что принадлежат, например, аргинину, глутамину и гистидину, — как правило, устраиваются поближе к поверхности, где они могут образовывать водородные связи с водой и другими полярными молекулами (**рис. 3.5**). Полярные аминокислоты, погруженные внутрь белка, обычно соединены водородными связями с другими полярными аминокислотами или с основной цепью полипептида.

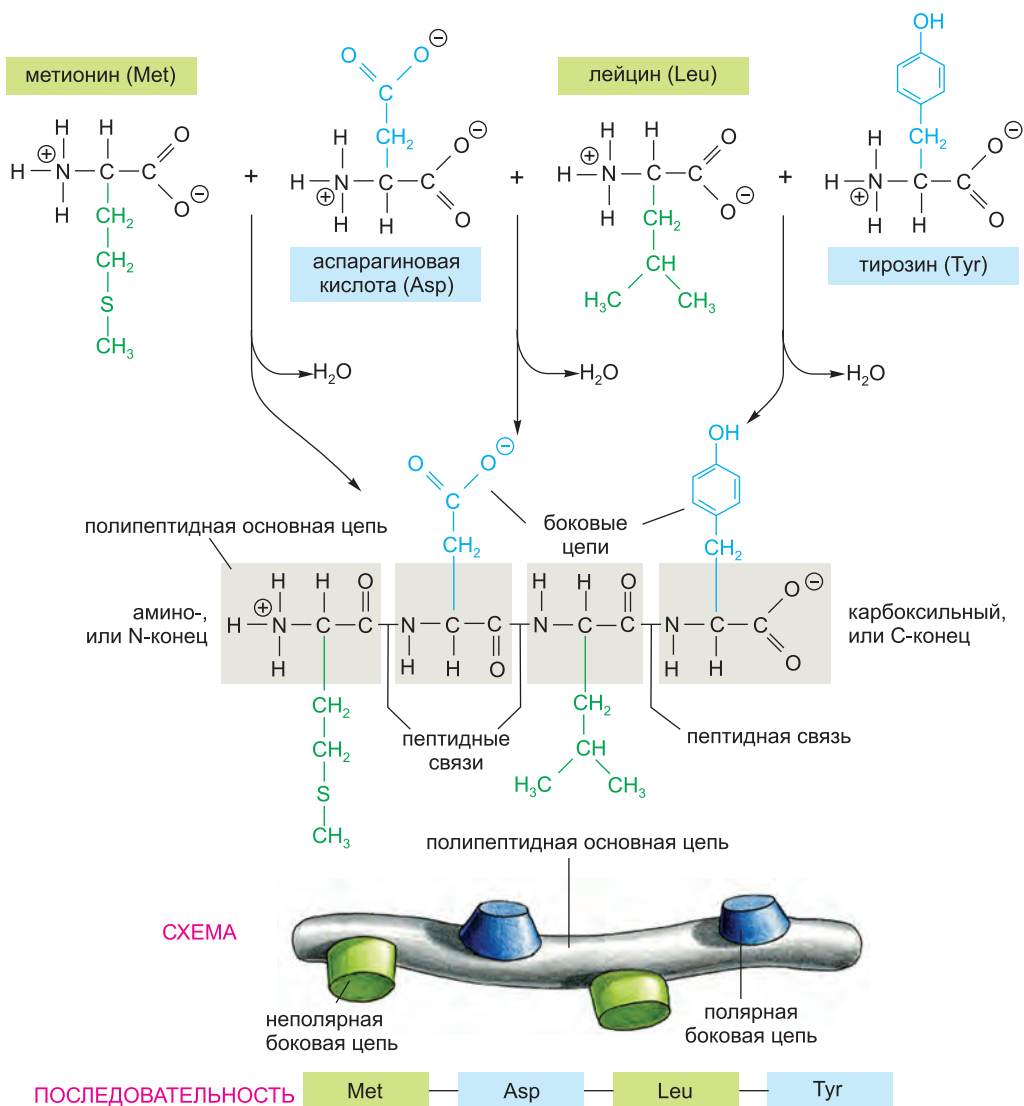


Рис. 3.1. Составные части белка. Белок состоит из полипептидной основной цепи и присоединенных к ней боковых цепей. Белки разных типов отличаются между собой по последовательности и числу аминокислот; поэтому именно последовательность химически различных боковых цепей придает каждому белку его неповторимые качества. Два конца полипептидной цепи химически различны: конец, несущий свободную аминогруппу (NH_3^+ , также записывается как NH_2), называют аминоконцом, или N-концом, а тот, что несет свободную карбоксильную группу (COO^- , также записываемую в виде COOH), величают карбоксильным концом, или C-концом. Аминокислотную последовательность белка всегда представляют в направлении $\text{N} \rightarrow \text{C}$ и читают слева направо.

3.1.2. В результате фолдинга белок принимает конформацию с минимальной энергией

В результате всех вышеперечисленных взаимодействий большинство белков принимает специфическую трехмерную структуру, которая предопределена

АМИНОКИСЛОТА		БОКОВАЯ ЦЕПЬ
Аспарагиновая кислота	Asp	D отрицательно заряженная
Глутаминовая кислота	Glu	E отрицательно заряженная
Аргинин	Arg	R положительно заряженная
Лизин	Lys	K положительно заряженная
Гистидин	His	H положительно заряженная
Аспарагин	Asn	N полярная незаряженная
Глутамин	Gln	Q полярная незаряженная
Серин	Ser	S полярная незаряженная
Треонин	Tre	T полярная незаряженная
Тирозин	Tyr	Y полярная незаряженная

ПОЛЯРНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ

АМИНОКИСЛОТА		БОКОВАЯ ЦЕПЬ
Аланин	Ala	A неполярная
Глицин	Gly	G неполярная
Валин	Val	V неполярная
Лейцин	Leu	L неполярная
Изолейцин	Ile	I неполярная
Пролин	Pro	P неполярная
Фенилаланин	Phe	F неполярная
Метионин	Met	M неполярная
Триптофан	Trp	W неполярная
Цистеин	Cis	C неполярная

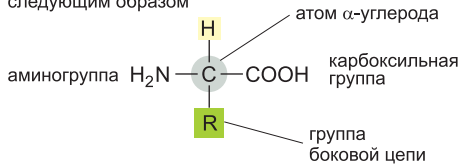
НЕПОЛЯРНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ

Рис. 3.2. Двадцать аминокислот, из которых построены белки. Каждой аминокислоте соответствует определенное трехбуквенное и однобуквенное обозначения. Аминокислот с полярными цепями столько же, как и с неполярными; однако некоторые боковые цепи, приведенные здесь как полярные, достаточно велики, поэтому обладают и некоторыми неполярными свойствами (например, Tyr, Tre, Arg, Lys). Структуры аминокислот можно найти в приложении 3.1 (стр. 128–129).

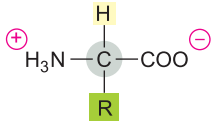
порядком расположения аминокислот в их цепях. В конечном счете, любая полипептидная цепь, как правило, принимает такую структуру, или **конформацию**, в которой ее свободная энергия будет минимальной. Биологи изучали фолдинг белка в пробирке, используя высокоочищенные белки. В результате обработки некоторыми растворителями, которые разрушают нековалентные связи, удерживающие цепь в свернутом состоянии, белок разворачивается, или *денатурирует*. Подобная обработка преобразует белок в гибкую полипептидную цепь, утратившую свою естественную форму. После удаления денатурирующего растворителя белок в большинстве случаев вновь самопроизвольно сворачивается, или *ренатурирует*, в первоначальную конформацию (рис. 3.6). Это указывает на то, что последовательность аминокислот содержит всю необходимую информацию, определяющую трехмерную структуру белка, что является важным моментом для понимания его функции в клетке.

АМИНОКИСЛОТЫ

Общая формула аминокислоты выглядит следующим образом

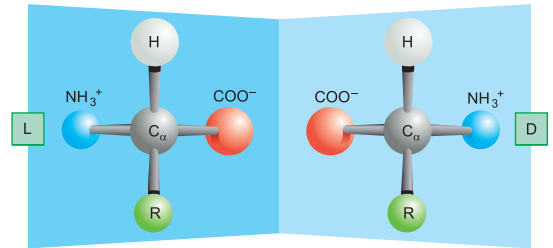


R обычно представлена одной из 20-ти различных боковых цепей. При pH 7 как аминокислоты, так и карбоксильные группы ионизированы.



ОПТИЧЕСКИЕ ИЗОМЕРЫ

Атом α -углерода асимметричен, в силу чего возможно существование двух зеркальных отображений, или стереоизомеров — L и D.



Белки состоят исключительно из L-аминокислот.

СЕМЕЙСТВА АМИНОКИСЛОТ

Аминокислоты группируют согласно следующим характеристикам их боковых цепей:

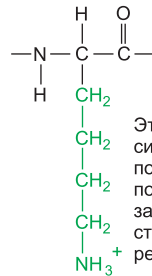
кислые, основные, незаряженные полярные, неполярные.

Этим 20 аминокислотам даны трех- и однобуквенные обозначения.

Таким образом: аланин = Ala = A.

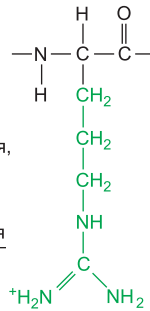
ОСНОВНЫЕ БОКОВЫЕ ЦЕПИ

лизин
(Lys, или K)

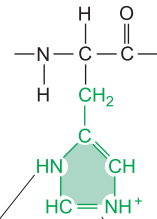


Эта группа, сильно основная, потому что ее положительный заряд стабилизируется резонансом.

аргинин
(Arg, или R)



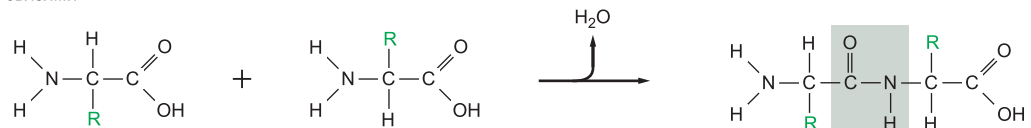
Гистидин
(His, или H)



Эти атомы азота имеют относительно слабое сродство к иону H^+ и являются лишь отчасти положительными при нейтральном значении pH

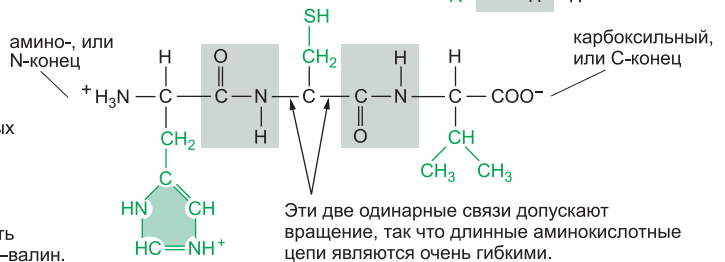
ПЕПТИДНЫЕ СВЯЗИ

Аминокислоты обычно соединены друг с другом амидными связями, которые называют пептидными связями.



Пептидная связь: четыре атома в каждом сером прямоугольнике образуют жесткую плоскую структурную единицу. Никакое вращение вокруг оси связи C-N невозможно.

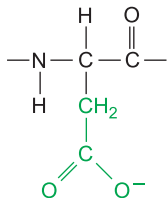
Белки представляют собой длинные полимеры из аминокислот, соединенных пептидными связями, при этом аминокислотная последовательность белка всегда пишется в направлении слева направо, начиная с N-конца. Последовательность этого трипептида — гистидин-цистеин-валин.



КИСЛЫЕ БОКОВЫЕ ЦЕПИ

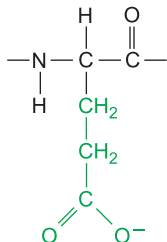
аспарагиновая кислота

(Asp, или D)



глутаминовая кислота

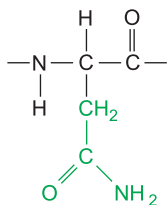
(Glu, или E)



НЕЗАРЯЖЕННЫЕ ПОЛЯРНЫЕ БОКОВЫЕ ЦЕПИ

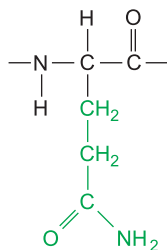
аспарагин

(Asn, или N)



глутамин

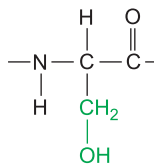
(Gln, или Q)



Хотя при нейтральных значениях pH азот амидной группы не заряжен, полярностью он обладает

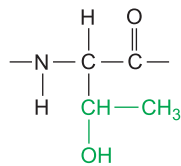
серин

(Ser, или S)



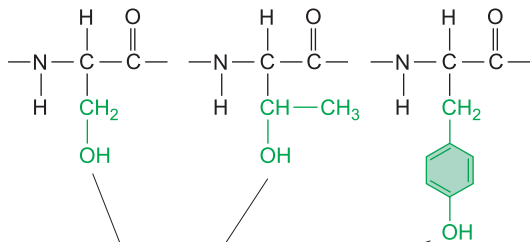
треонин

(Thr, или T)



тирозин

(Tyr, или Y)

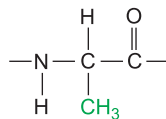


Группа -OH полярна.

НЕПОЛЯРНЫЕ БОКОВЫЕ ЦЕПИ

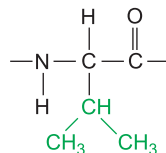
аланин

(Ala, или A)



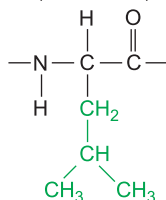
валин

(Val, или V)



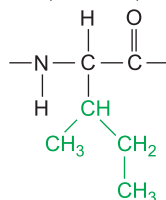
лейцин

(Leu, или L)



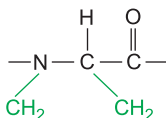
изолейцин

(Ile, или I)



пролин

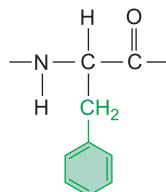
(Pro, или P)



(фактически иминокислота)

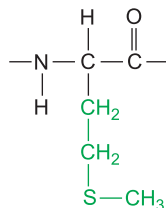
фенилаланин

(Phe, или F)



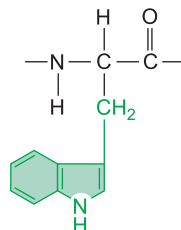
метионин

(Met, или M)



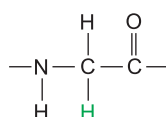
триптофан

(Trp, или W)



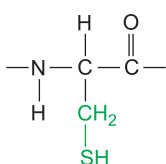
глицин

(Gly, или G)



цистеин

(Cis, или C)



Дисульфидные связи, или мостики, могут образовываться в белках между боковыми цепями двух цистеинов.



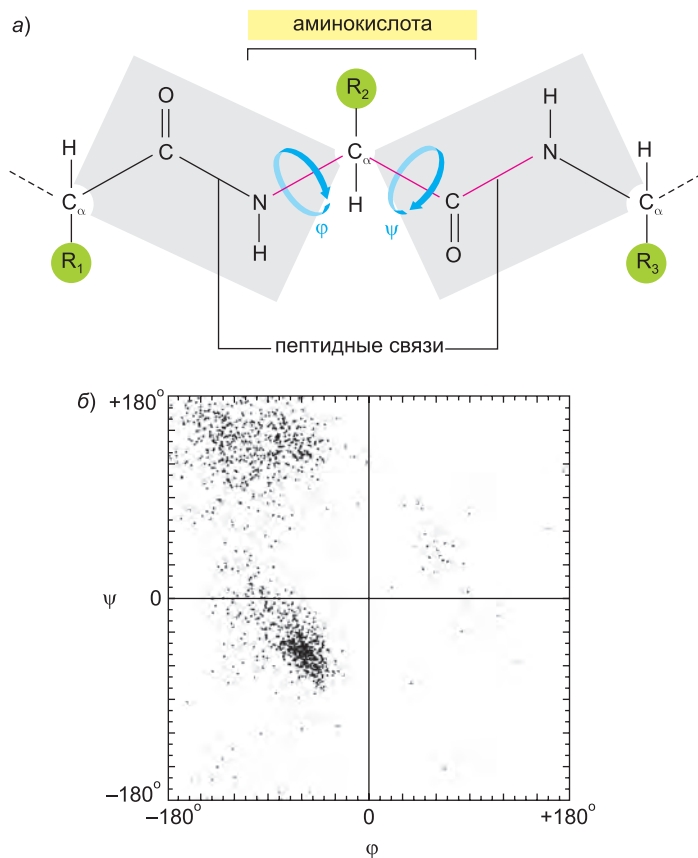


Рис. 3.3 Стерические ограничения на углы связей в полипептидной цепи. а) Каждая аминокислота «привносит» в основную цепь полипептида три связи (обозначены красным цветом). Пептидная связь лежит в одной плоскости (выделена серым фоном) и не допускает вращения. Но вращение может происходить вокруг оси связи $C_{\alpha}-C$, угол вращения которой называют греческой буквой «пси» (ψ), и вокруг оси связи $N-C_{\alpha}$, угол вращения которой называют «фи» (ϕ). По договоренности, боковые цепи аминокислот часто обозначают как R-группы (показаны зелеными кружками).

б) Конформация атомов в основной цепи молекулы белка определяется всеми парами углов вращения ϕ и ψ — по паре от каждой входящей в цепь аминокислоты; из-за пространственных затруднений в пределах каждой аминокислоты вращения вокруг указанных связей ограничены, и поэтому большого разнообразия в парах углов ϕ и ψ не возникает. На этой так называемой карте Рамачандрана каждая точка представляет собой пару углов, наблюдаемую в белке. Группа точек в нижнем левом секторе дает представление о всех аминокислотах, которые расположены в структурах типа α -спирали (см. рис. 3.7, а). (Изображение на виде б заимствовано из J. Richardson, *Adv. Prot. Chem.* 34: 174–175, 1981. С разрешения издательства Academic Press.)

Каждый белок обычно сворачивается в единственно возможную устойчивую конформацию. Однако при взаимодействии белка с другими молекулами клетки его конформация несколько меняется. Как мы увидим позже, такое изменение формы нередко оказывает огромное влияние на функцию белка.

Хотя белковая цепь и способна свернуться в свою правильную конформацию без какой-либо внешней помощи, в этом процессе часто участвуют специальные белки, названные *молекулярными шаперонами*. Этим молекулярные «наставники»

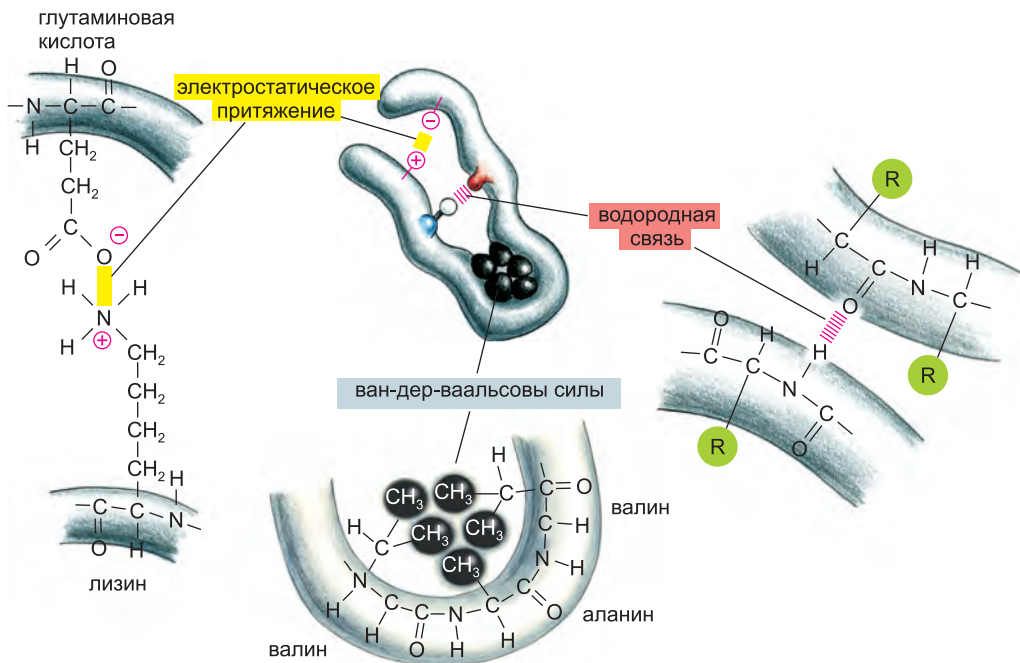


Рис. 3.4. Свернуться белку помогают нековалентные связи трех типов. Хотя каждая такая связь сама по себе весьма слаба, если они образуются одновременно и в большом количестве, как это часто и бывает, то создается прочная структура, как в представленном примере. Как и на предыдущем рисунке, боковые цепи аминокислот обозначены в общем виде буквой R.

связывают частично свернутые полипептидные цепи и помогают им продвигаться по наиболее энергетически благоприятному пути фолдинга. В стесненных условиях

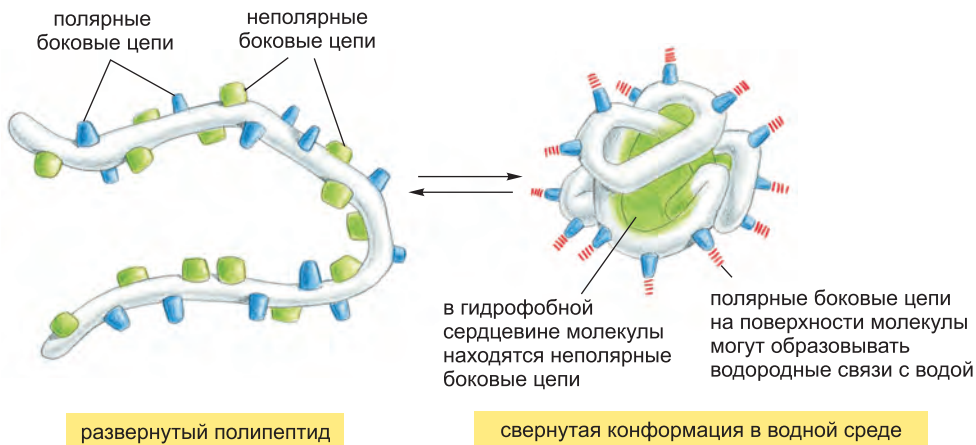


Рис. 3.5. Как белок принимает компактную конформацию. Полярные боковые цепи аминокислот, как правило, расположены на внешней стороне белка, где они могут взаимодействовать с водой; неполярные боковые цепи аминокислот погружены внутрь и образуют плотно упакованное гидрофобное ядро, которое спрятано от воды. На этом схематическом рисунке белок содержит всего лишь около 30-ти аминокислот.

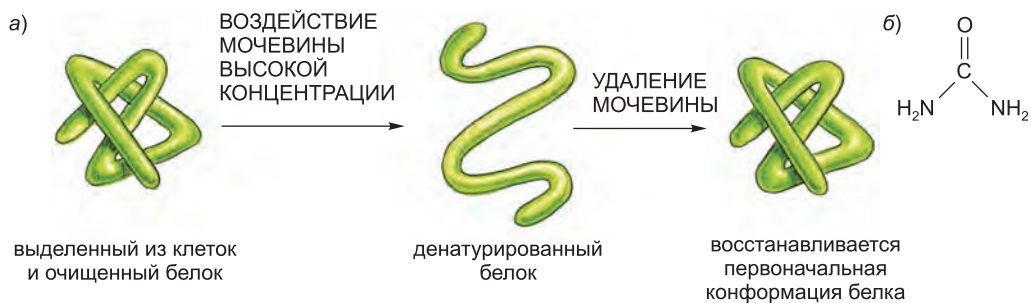


Рис. 3.6. Повторное сворачивание (рефолдинг) денатурированного белка. а) Этот эксперимент, впервые выполненный более 40 лет назад, демонстрирует, что конформация белка определяется исключительно его аминокислотной последовательностью. б) Структура мочевины. Мочевина очень хорошо растворима в воде и при высоких концентрациях разворачивает белки, для этого ее концентрация должна соответствовать приблизительно одной молекуле мочевины на шесть молекул воды.

цитоплазмы, заполненной множеством молекул, шапероны оберегают временно открытые гидрофобные области в недавно синтезированных белковых цепях от взаимной ассоциации с образованием белковых агрегатов (см. [стр. 388](#)). Тем не менее окончательная трехмерная форма белка все же определяется его аминокислотной последовательностью: шапероны попросту повышают надежность процесса фолдинга.

Белки являют нам большое разнообразие форм, а их длина, как правило, составляет от 50 до 2000 аминокислот. Крупные белки обычно состоят из нескольких обособленных *белковых доменов* — структурных единиц, которые сворачиваются более или менее независимо друг от друга, что мы обсудим ниже. Так как в точности представить структуру белка довольно сложно, для ее изображения прибегают к нескольким различным способам, каждый из которых подчеркивает определенные особенности одной.

В [приложении 3.2 \(стр. 132–133\)](#) представлены четыре различных рисунка белкового домена, получившего название SH2, который выполняет важные функции в клетках эукариот. Белковый домен SH2 построен из цепочки, включающей в себя 100 аминокислот; его структура приведена в виде: а) модели основной цепи полипептида, б) ленточной модели, в) каркасной модели, которая включает в себя боковые цепи аминокислот, и г) полусферической (объемной) модели. В трех горизонтальных рядах белок показан в различной ориентации и изображение окрашено таким образом, что можно проследить полипептидную цепь — от N-конца (*фиолетовый*) до C-конца (*красный*).

В [приложении 3.2](#) показано, что даже для такой малой структуры, как домен SH2, конформация белка удивительно сложна. Но описание структуры белков может быть упрощено, потому что они построены из комбинаций нескольких известных структурных мотивов, что мы обсудим позже.

3.1.3. Наиболее распространенные способы укладки полипептидной цепи — это α -спираль и β -лист

При сравнении трехмерных структур множества различных белковых молекул становится ясно, что, хотя общая конформация каждого белка уникальна, в уклад-

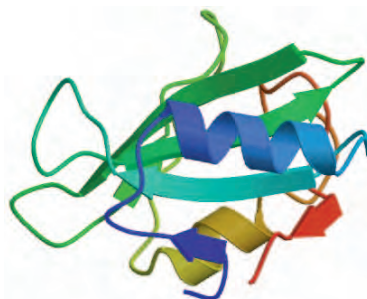
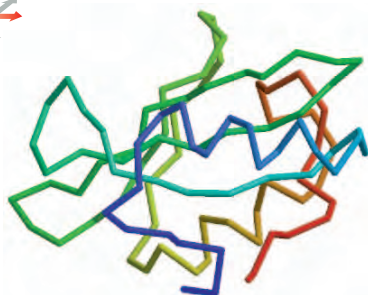
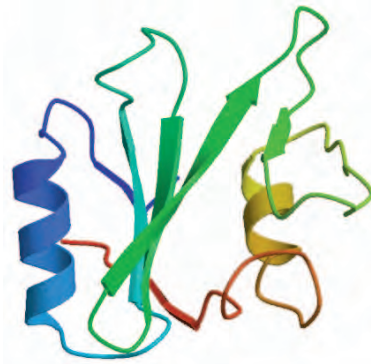
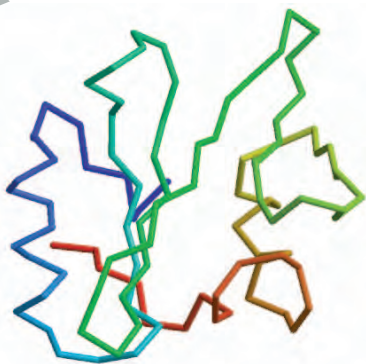
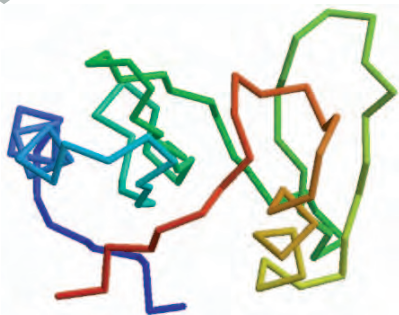
ке их областей чаще всего встречаются два типа структур. Обе формы открыты более 50-ти лет назад в ходе исследований волос и шелка. Первой в этой череде открытий, относящихся к укладке полипептидной цепи, стала структура, названная **α -спиралью**, которая была обнаружена в белке *α -кератине* — им изобилует кожа и ее производные, такие как волосы, ногти и рога. Спустя год после открытия α -спирали в белке *фиб्रोине*, основном компоненте шелка, была обнаружена вторая форма укладки, названная **β -листом**. Эти две формы укладки полипептидной цепи особенно распространены, потому что представляют собой результат водородных взаимодействий между группами N—H и C=O в основной цепи полипептида — без участия боковых звеньев аминокислот. Таким образом, две эти укладки могут формироваться в белках с различной последовательностью аминокислот. В каждом случае белковая цепь принимает регулярную, повторяющуюся конформацию. На **рис. 3.7** показаны обе эти конформации, а также упрощенные их обозначения, которые обычно используют в ленточных моделях белков.

Ядро многих белков содержит обширные области β -листов. Как показано на **рис. 3.8**, такие β -листы могут быть образованы как соседними областями полипептидной цепи, ориентированными в одном и том же направлении (параллельные цепи), так и полипептидной цепью, повернувшейся вспять, при этом каждый участок цепи ориентирован в направлении, противоположном соседней цепи (антипараллельные цепи). Из β -листов обоих типов получается очень жесткая структура, скрепленная водородными связями, которые образуются между пептидными связями соседних цепей (см. рис. 3.7, *г*).

α -спираль образуется, когда одинарная полипептидная цепь закручивается вокруг себя и получается жесткий цилиндр. Между каждой четвертой пептидной связью образуется водородная связь, соединяющая группу C=O одной пептидной связи с группой N—H другой (см. рис. 3.7, *а*). В результате получается правильная спираль с полным витком на каждые 3,6 аминокислотных остатка. Обратите внимание, что белковый домен, представленный на вклейке 3.2, содержит две α -спирали, а также трехцепочечный антипараллельный β -лист.

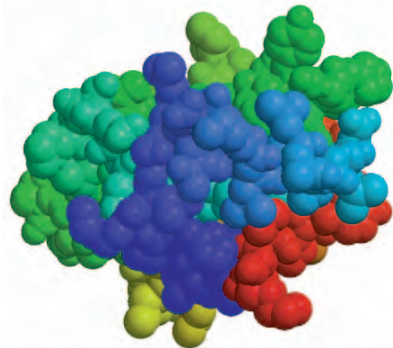
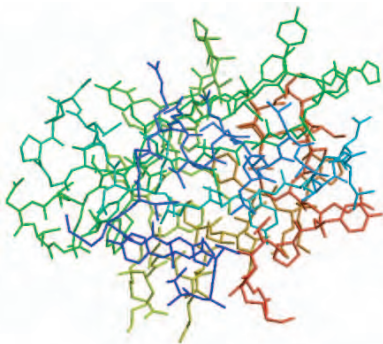
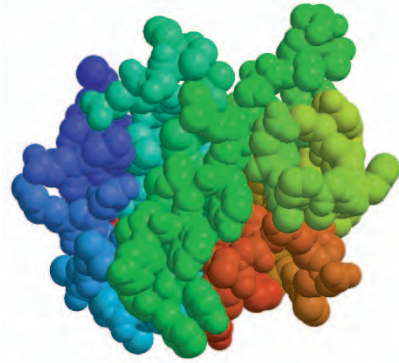
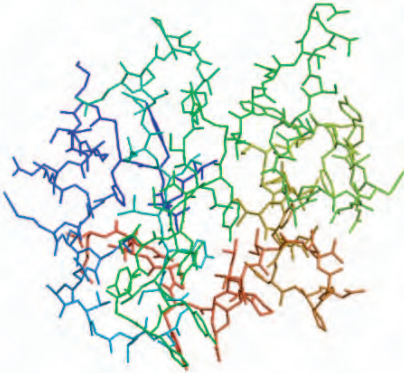
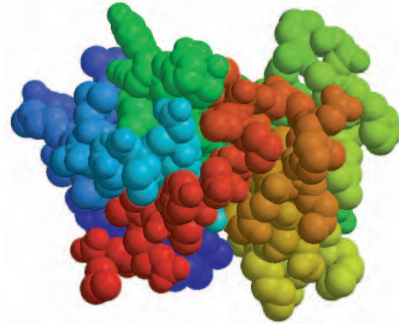
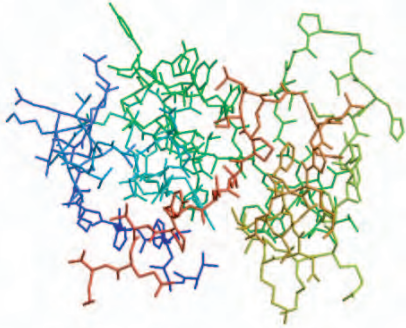
Областями α -спиралей особенно богаты белки, расположенные в клеточных мембранах, такие как транспортные белки и рецепторы. Как будет сказано в главе 10, те части трансмембранного белка, которые пересекают липидный бислой, обычно находятся в форме α -спирали, состоящей в основном из аминокислот с неполярными боковыми цепями. Полипептидная основная цепь, которая является гидрофильной, свернута за счет внутренних водородных связей в α -спираль и ограждена от гидрофобной липидной среды мембраны своими выдающимися наружу неполярными боковыми цепями (см. также рис. 3.78).

В некоторых белках α -спирали обвиваются друг вокруг друга и формируют особо устойчивую структуру, известную как **суперскрученная спираль**, или **суперспираль** (coiled-coil). Такая структура может образоваться, когда в двух (или в некоторых случаях в трех) α -спиралях большинство неполярных (гидрофобных) боковых цепей расположено на одной стороне, и эти α -спирали могут закручиваться вокруг друг друга так, что боковые цепи направлены внутрь (**рис. 3.9**). Длинные стержнеобразные суперспирали служат своего рода несущим каркасом для многих вытянутых белков. Примерами служат α -кератин, что образует внутриклеточные волокна, которые укрепляют наружный слой кожи и ее придатки, а также молекулы миозина, ответственные за сокращение мышц.



а) Модель основной цепи: показывает общую организацию полипептидной цепи; удобный способ сравнения структур родственных белков.

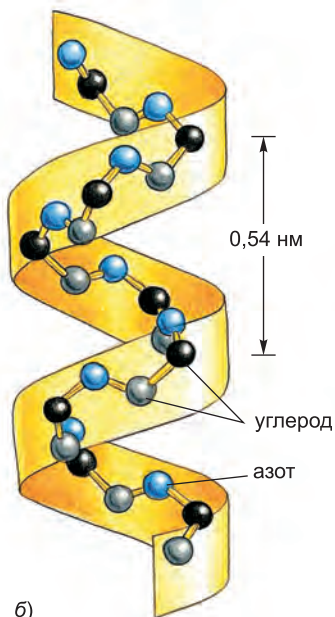
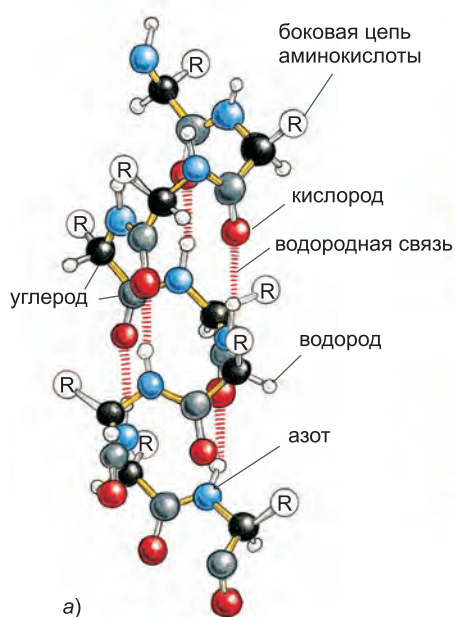
б) Ленточная модель: простой способ наглядного представления вторичных структур, таких как α -спирали и β -листы.



в) Каркасная модель: показывает боковые цепи и их относительное окружение; полезна для предсказания того, какие из аминокислот могут отвечать за активность белка, в особенности если изучаемый белок является ферментом.

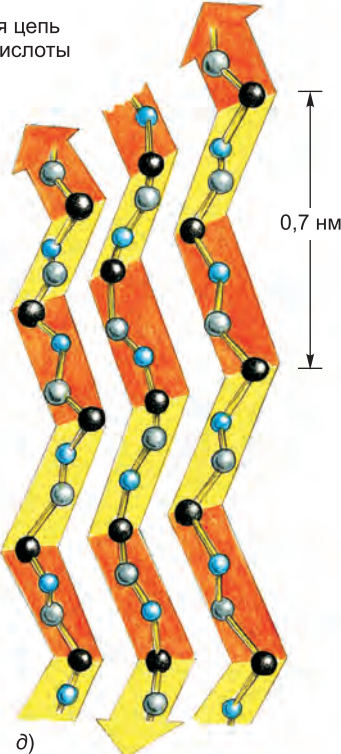
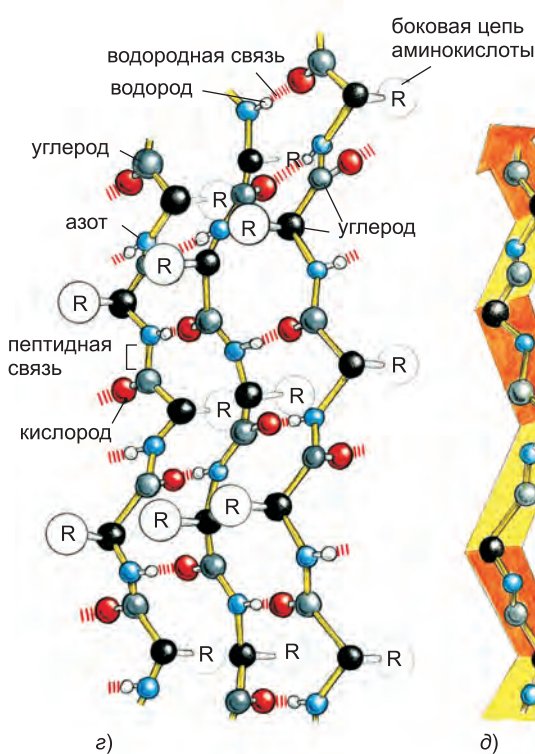
г) Полусферичная (объемная) модель: представляет карту очертаний поверхности белка; дает представление о форме белка и показывает, боковые цепи каких аминокислот выходят на его поверхность. Показывает, как мог бы выглядеть данный белок с какой-либо маленькой молекулой, например воды, или с другим белком.

(Любезность David Lawson.)



α-спираль

в)



β-лист

е)

Рис. 3.7. Регулярная конформация полипептидного остова в α -спирали и в β -листе. *а, б и в*) α -спираль. Группа N–H каждой пептидной связи соединена водородной связью с группой C=O соседней пептидной связи, находящейся в той же цепи и отстоящей от первой на четыре пептидные связи. Обратите внимание, что все группы N–H на этой схеме смотрят вверх, а все группы C=O – вниз (к C-концу); это придает спирали полярность — C-конец имеет частичный отрицательный заряд, а N-конец несет частичный положительный заряд. *г, д и е*) β -лист. В этом примере смежные пептидные цепи ориентированы в противоположных (антипараллельных) направлениях. Водородные связи между пептидными связями различных цепей стягивают отдельные полипептидные цепи в β -лист, а боковые группы аминокислот в следующих друг за другом цепях выдаются из плоскости листа поочередно — то вверх, то вниз. На видах *а* и *г* показаны все атомы полипептидной цепи, разве только боковые цепи аминокислот урезаны и обозначены буквой R. Напротив, на видах *б* и *д* показаны только атомы основной цепи, тогда как на видах *в* и *е* представлены упрощенные изображения α -спирали и β -листа, которые используются для обозначения α -спирали и β -листа в ленточных моделях белков (см. вклейку 3.2, б).

3.1.4. Белковые домены — это те блоки, из которых построены макромолекулы белков

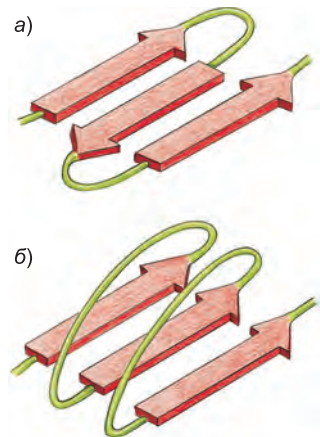
Даже маленькая молекула белка построена из тысяч атомов, соединенных воедино точно ориентированными ковалентными и нековалентными связями, и чрезвычайно трудно показать столь сложную структуру без трехмерного дисплея. По этой причине биологи используют различные графические и компьютерные вспомогательные средства. DVD-диск², прилагаемый к этой книге, содержит полученные на компьютере изображения некоторых белков, которые можно посмотреть и повертеть на экране в разнообразных форматах.

В биологии различают четыре уровня организации структуры белков. Последовательность аминокислот известна как **первичная структура**. Участки полипептидной цепи, которые образуют α -спирали и β -листы, составляют **вторичную структуру** белка. Полная трехмерная организация полипептидной цепи иногда упоминается как **третичная структура**, а если специфическая молекула белка образована в виде комплекса из нескольких (более одной) полипептидных цепей, то полная структура называется **четвертичной структурой**.

Исследования конформации, функции и эволюции белков открыли также крайнюю важность еще одной единицы организации структуры, отличной от вышеозначенных четырех. Это **белковый домен** — субструктура, образованная любой частью полипептидной цепи, способной независимо укладываться в устойчивую компактную структуру. Домены обычно содержат от 40 до 350 аминокислот и служат универсальными модульными блоками, из которых собираются многие более крупные белки.

Различные домены одного белка часто наделены различными функциями. На **рис. 3.10** представлен пример — протеинкиназа Src, которая выполняет важную

Рис. 3.8. Структуры типа β -листа двух типов. *а*) Антипараллельный β -лист (см. рис. 3.7, *г*). *б*) Параллельный β -лист. Обе эти структуры свойственны всем белкам.



² Эта информация относится к оригинальному изданию «Molecular Biology of the Cell. Fifth Edition».

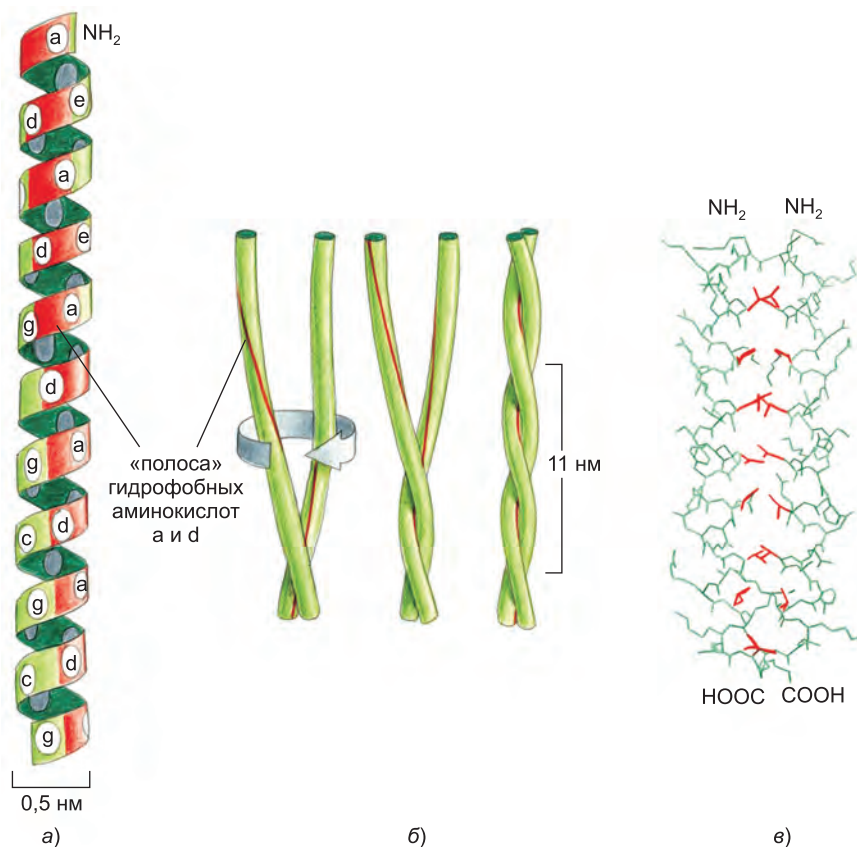


Рис. 3.9. Суперспираль (coiled-coil). *а*) α -спираль, в которой боковые цепи аминокислотной последовательности обозначены как abcdefg (сверху вниз). Аминокислоты а и d в такой последовательности лежат близко друг к другу на поверхности цилиндра, образуя «полосу» (красную), обвивающую α -спираль. У белков, образующих суперспирали, в позициях а и d обычно находятся неполярные аминокислоты. Следовательно, как показано на виде *б*, две спирали могут обвиться одна вокруг другой, при этом неполярные боковые цепи аминокислот одной α -спирали взаимодействуют с неполярными боковыми цепями другой, а более гидрофильные боковые цепи остаются снаружи – открытыми для водной среды. *в*) Атомная структура суперспирали, определенная рентгеноструктурным анализом. Красным цветом отмечены неполярные боковые цепи.

роль в процессах передачи сигналов в клетках позвоночных (название Src следует произносить «сарк»). В этом белке принято выделять три домена: домены SH2 и SH3 выполняют регуляторные функции, а С-концевой домен отвечает за каталитическое действие киназы. Ближе к концу этой главы мы возвратимся к этому белку, с тем чтобы объяснить, как белки могут формировать молекулярные переключатели, которые передают информацию по клеткам.

На **рис. 3.11** представлены ленточные модели трех по-разному организованных белковых доменов. Как показывают данные примеры, полипептидная цепь стремится пройти весь домен, а затем совершает крутой разворот на его поверхности. Центральное ядро домена может быть построено из α -спиралей, β -листов или же из различных сочетаний этих двух фундаментальных элементов фолдинга.

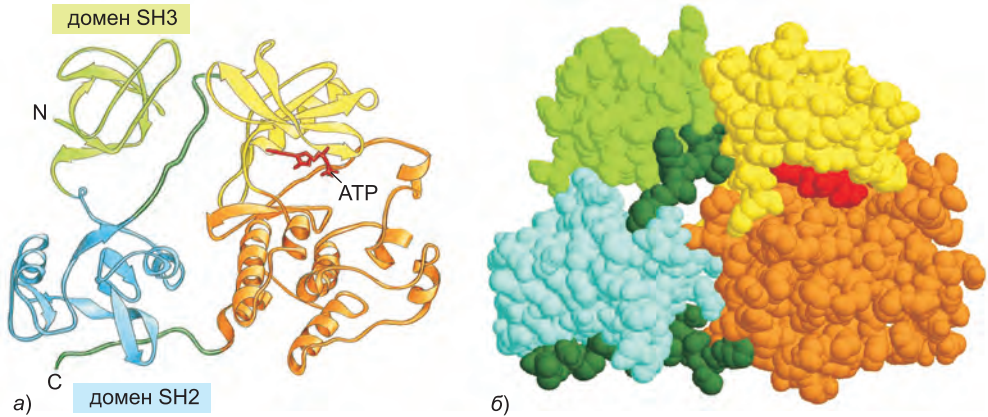
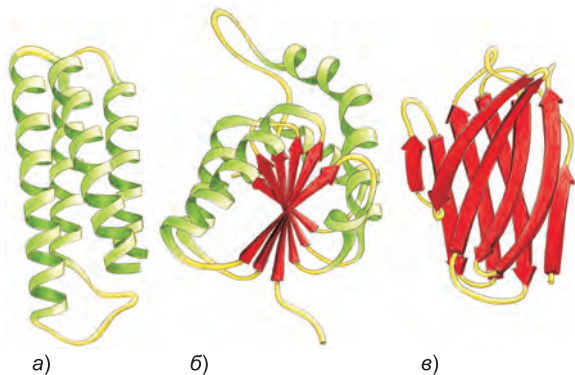


Рис. 3.10. Белок, образованный из множества доменов. В показанном белке Src С-концевой домен, состоящий из двух модулей (отмеченных *желтым* и *оранжевым*), образует фермент протеинкиназу, тогда как домены SH2 и SH3 выполняют регуляторные функции. *а)* Ленточная модель, в которой АТФ (субстрат) выделен *красным*. *б)* Объемная модель, в которой АТФ (субстрат) также выделен *красным*. Обратите внимание, что участок, который связывает АТФ, размещен на границе двух модулей, образующих киназу. Подробная структура домена SH2 представлена в приложении 3.2 ([стр. 132–133](#)).

Белковые молекулы самых малых размеров содержат только один домен, тогда как крупные белки могут содержать несколько десятков доменов, часто соединенных друг с другом короткими, относительно бесструктурными отрезками полипептидной цепи.

Рис. 3.11. Ленточные модели трех различных белковых доменов. *а)* Цитохром b_{562} — однодоменный белок, участвующий в переносе электронов в митохондриях. Этот белок почти полностью состоит из α -спиралей. *б)* NAD-связывающий домен фермента лактатдегидрогеназы, который сформирован из α -спиралей и параллельных β -листов. *в)* Вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина (антитела), образованный двумя сложными вместе антипараллельными β -листами. В этих примерах α -спирали показаны *зеленым* цветом, а цепи, организованные в β -листы, обозначены *красными стрелками*.

Обратите внимание, как полипептидная цепь в каждом случае проходит в прямом и обратном направлениях через домен насквозь, образуя крутые изгибы только на поверхности белка. Именно такие выдающиеся из поверхности петельные области (окрашены *желтым*) часто формируют участки связывания других молекул. (Переработано с рисунков, любезно предоставленных Jane Richardson.)



3.1.5. Лишь малая часть из множества возможных вариантов полипептидных цепей будет использована клеткой

Поскольку каждая из 20 аминокислот отличается по химическим свойствам и каждой из них, в принципе, дозволено занять любую позицию в полипептидной цепи, постольку существует $20 \cdot 20 \cdot 20 \cdot 20 = 160\,000$ возможных различных полипептидных цепей длиной в четыре аминокислоты, или 20^n возможных различных полипептидных цепей с длиной n аминокислот. При средней длине белка около 300 аминокислот клетка могла бы теоретически производить более 10^{390} (20^{300}) вариантов различных полипептидных цепей. Это число столь огромно, что для создания только одной молекулы каждого вида потребовалось бы намного больше атомов, чем существует во Вселенной.

Лишь очень малая доля этого огромного множества мысленно возможных полипептидных цепей приняла бы единственную в своем роде устойчивую трехмерную конформацию — по некоторым оценкам, меньше одной миллиардной. И все же основная масса белков, находящихся в клетках, принимает уникальные и устойчивые конформации. Как такое возможно? Ответ кроется в существовании естественного отбора. Всякий белок с непредсказуемо изменчивой структурой и соответственной биохимической активностью вряд ли будет способствовать выживанию клетки, в которой он пребывает. Поэтому такие белки должны быть устранены естественным отбором в течение чрезвычайно длительной отбраковки методом проб и ошибок, который лежит в основе биологической эволюции.

Поскольку эволюция производила отбор белков по критерию необходимых живым организмам функций, аминокислотная последовательность большинства современных белков такова, что какая-либо одна (из всех возможных) конформация является чрезвычайно устойчивой. Кроме того, химические свойства этой конформации в точности настроены на выполнение специфической каталитической или структурной функции в клетке. Белки построены столь совершенно, что замена даже нескольких атомов в одной аминокислоте может иногда нарушить структуру всей молекулы в целом, причем настолько сильно, что ее функция будет полностью утрачена.

3.1.6. Белки можно подразделить на множество семейств

Как только эволюция наделила белок способностью сворачиваться в устойчивую конформацию, придающую ему полезные свойства, у нее появилась возможность видоизменять структуру одного и получать новые функции. Этот процесс был сильно ускорен генетическими механизмами, которые эпизодически дублируют гены, что позволяет одной копии гена эволюционировать независимо от другой и приобретать новую функцию (обсудим подробнее в главе 4). В прошлом события такого рода происходили довольно часто, в результате многие современные белки могут быть сгруппированы в семейства белков, так что все члены одного семейства будут иметь сходные последовательности аминокислот и схожие трехмерные структуры.

Рассмотрим, например, *сериновые протеазы* — большое семейство белок-расщепляющих (протеолитических) ферментов, в число которых входят ферменты пищеварительного тракта: химотрипсин, трипсин и эластаза, — а также несколько протеаз, участвующих в свертывании крови. При сравнении протеазных частей любых двух из этих ферментов обнаруживается сходство некоторых частей их аминокислотных последовательностей. Схожесть их трехмерных конформаций еще

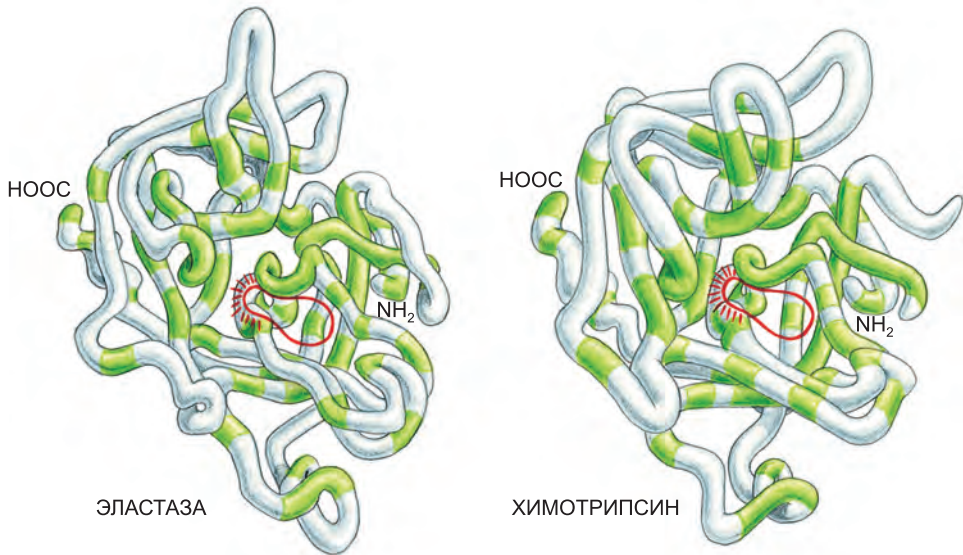


Рис. 3.12. Сравнение конформаций двух сериновых протеаз. На рисунке изображены конформации основных полипептидных цепей эластазы и химотрипсина. Хотя в полипептидных цепях этих двух белков совпадают только те аминокислоты, которые окрашены *зеленым*, эти две конформации очень схожи. Активные участки обоих ферментов обведены *красным* контуром; именно в этих зонах пептидные связи белков, служащих субстратом, связываются и расщепляются в ходе гидролиза. Сериновые протеазы получили свое название по аминокислоте серину, боковая цепь которой является частью активного центра этого фермента и непосредственно участвует в реакции расщепления.

более поразительна: бóльшая часть мельчайших витков и изгибов их полипептидных цепей, при том что их длина составляет несколько сотен аминокислот, фактически идентична (рис. 3.12). Тем не менее различные сериновые протеазы обладают разным ферментативным действием, и каждая из них расщепляет свой белок или разрывает пептидные связи между определенными типами аминокислот. Таким образом, каждая из них выполняет в организме лишь ей присущую функцию.

Историю, что мы поведали о сериновых протеазах, можно повторить и для сотен других семейств белков. Вообще, структура различных членов какого-либо семейства белков оказалась намного более консервативной, чем последовательность аминокислот. Во многих случаях последовательности аминокислот разошлись настолько далеко, что теперь невозможно с уверенностью утверждать о принадлежности двух белков к одному семейству, не определив их трехмерные структуры. Например, и белок $\alpha 2$ дрожжей, и белок engrailed дрозофилы являются регулирующими гены белками семейства гомеодоменов (отнесем их обсуждение к главе 7). Поскольку они тождественны только в 17 из 60 составляющих их остатков аминокислот, их родственные узы стали очевидными лишь при сравнении трехмерных структур (рис. 3.13). Множество подобных примеров говорит о том, что два белка с более чем 25%-й тождественностью аминокислотных последовательностей обычно обладают одинаковой общей структурой.

Различные члены любого большого семейства белков нередко имеют разные функции. Некоторые из произошедших аминокислотных замен, вследствие которых

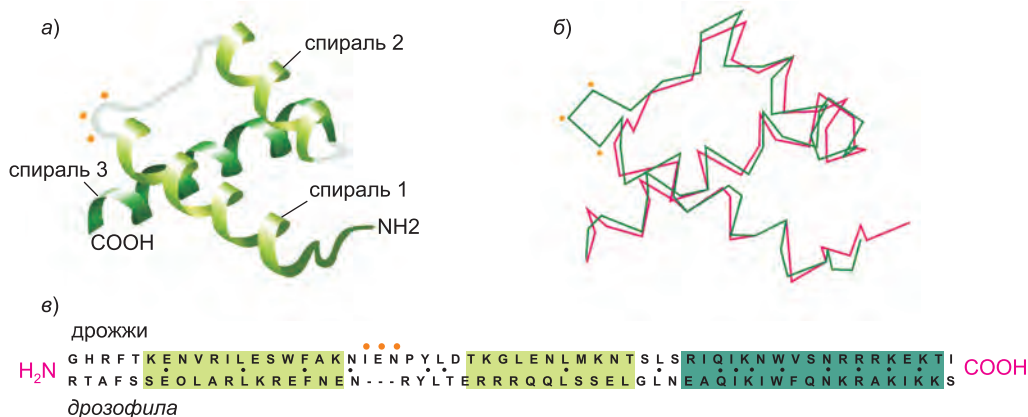


Рис. 3.13. Сравнение ДНК-связывающих доменов (из класса так называемых гомеодоменов) в паре белков из двух организмов, разошедшихся на эволюционном пути более миллиарда лет назад. а) Ленточная модель структуры, одинаковая у обоих белков. б) Контур позиций атомов α -углерода. Изображенные здесь трехмерные структуры определены рентгеноструктурным анализом белка $\alpha 2$ дрожжей (зеленый) и белка engrailed¹ дрозофилы (красный). в) Сравнение аминокислотных последовательностей областей белков, показанных на видах а и б. Черными точками отмечены участки, содержащие идентичные аминокислоты. Оранжевыми точками обозначены позиции вставки из трех аминокислот в белке $\alpha 2$. (Переработано на основе С. Wolberger et al., *Cell* 67: 517–528, 1991. С разрешения издательства Elsevier.)

члены семейства стали отличаться друг от друга, были, без сомнения, отобраны и закреплены в ходе эволюции, потому что привели к полезным изменениям в биологической активности, придав отдельным членам семейства различные функциональные свойства, которыми они обладают по сей день. Но многие другие аминокислотные замены оказываются в сущности «нейтральными», ибо не оказывают ни благотворного, ни тлетворного воздействия на структуру и функцию белка. Кроме того, поскольку возникновение мутации представляет собой случайный процесс, то, должно быть, появлялось и много вредных замен, которые вызывали изменения трехмерной структуры этих белков, чего было достаточно для их повреждения. Такие дефектные белки, скорее всего, «изымались из оборота» всякий раз, когда отдельные организмы, производящие их, оказывались в достаточно невыгодном положении, не позволяющем им пройти естественный отбор.

Семейства белков легко опознаются при секвенировании генома любого организма; например, определение последовательности ДНК полного генома человека показало, что у каждого из нас около 24000 белок-кодирующих генов. Путем сравнения последовательностей мы можем приписать продукты приблизительно 40 процентов этих генов известным белковым структурам, относящимся больше чем к 500 различным семействам белков. В основной массе, белки в каждом семействе эволюционировали таким образом, что стали выполнять немного разные функции, как например, в случае ферментов эластазы и химотрипсина, представленных ранее на рис. 3.12. Такие белки иногда называют *паралогами*, дабы отличить их от соответствующих белков в разных организмах (*ортологов*, таких как эластазы

¹ Означает «с насечкой» или «засубренный». — Прим. пер.

мышь и человека).

Как описано в главе 8, благодаря появлению методов рентгеноструктурного анализа и ядерного магнитного резонанса (ЯМР), мы теперь знаем трехмерные структуры, или конформации, более 20 000 белков. Путем тщательного сравнения конформаций этих белков «структурные биологи» (то есть специалисты в области структуры биологических молекул) установили, что существует ограниченное число способов укладки белковых доменов — возможно, не более 2000. К настоящему времени определены приблизительно 800 видов укладки белковых цепей. Среди этих известных укладок преимущественно встречаются те, что наиболее распространены в мире белковых структур: например, почти для трех четвертей семейств доменов с предсказанными структурами характерны всего 50 видов укладки полипептидных цепей. Поэтому можно надеяться, что полный каталог наиболее важных белковых укладок, которые существуют в живых организмах, будет в пределах нашей досягаемости.

3.1.7. По аминокислотным последовательностям можно выявить близкородственные белки

Существующая база данных известных белковых последовательностей содержит более десяти миллионов записей, и их число растет очень быстро, по мере того, как все больше и больше геномов проходит операцию секвенирования — и открывает нам мириады новых генов, кодирующих белки. В распоряжении ученых имеются мощные программы компьютерного поиска, которые позволяют им сравнивать любой недавно открытый белок со всей этой базой данных с целью поиска его возможных родственников. Многие белки, гены которых эволюционировали от общего предка, могут быть идентифицированы на основании статистически значимых подобию в последовательностях аминокислот.

Ввиду столь великого числа белков в базе данных программы поиска находят много незначимых совпадений, обуславливающих такой уровень фонового шума, при котором становится очень трудно распознать все родственные белки, кроме наиболее близких. Вообще говоря, для того, чтобы сопоставить два белка, необходима 30%-я идентичность их последовательностей. Однако нам известны функции многих коротких опознавательных, или сигнатурных, последовательностей («отпечатков пальцев»), и это широко используется для установления более отдаленных

WYFGKITRRESERLL	GTFLVRESE	— сигнатурные последовательности			
WYFGKITRRESERLL	LNAENPRGTFLVRESE	TTKGAYCLSVSDFDNAKGL — человек			
W+F	+ R+E+++LLL	ENP GTFLVR SE Y LSV D+++ +G — совпадения в последовательностях			
WFFENVLRKEADKLL	LAEENPEGTFLVLRPSE	HNPNNGYSLSVKDWEDGRGY — дрозофила			
1	10	20	30	40	50

Рис. 3.14. Употребление коротких сигнатурных последовательностей для поиска родственных белковых доменов. Две короткие последовательности длиной 15 и 9 аминокислот, отмеченные зеленым фоном, могут быть использованы для поиска в крупных базах данных домена, который встречается во многих белках, а именно домена SH2. Здесь приведено сравнение первых 50 из 100 аминокислот домена SH2 в белках Src человека и дрозофилы (см. рис. 3.10). В построенных компьютером выровненных последовательностях (желтая строка) точные совпадения между белками человека и дрозофилы отмечены однобуквенными обозначениями соответствующих аминокислот; позиции с подобными, но не тождественными аминокислотами обозначены знаком +, а в местах несовпадений оставлены пропуски. На этой схеме везде, где один или оба белка содержат точное совпадение с позициями в зеленых последовательностях, обе выровненные последовательности окрашены красным.

связей (рис. 3.14).

Сравнительный анализ белков важен потому, что родственные структуры часто подразумевают схожие функции. Если удастся обнаружить, что аминокислотная последовательность нового белка имеет сходство с белком, функция которого известна, то на этом можно сэкономить многие годы экспериментирования. По родству последовательностей, например, впервые узнали, что определенные гены, которые ассоциированы со злокачественной трансформацией клеток млекопитающих, кодируют протеинкиназы. Подобным же образом удалось быстро определить, что многие белки, которые управляют закладкой общего строения организма в ходе эмбрионального развития плодовой мушки дрозофилы, являются ген-регулирующими белками.

3.1.8. Некоторые белковые домены служат составными частями множества различных белков

Как утверждалось ранее, большинство белков состоит из ряда белковых доменов, где различные области полипептидной цепи свернулись независимо от других областей и образовали компактные структуры. Такие многодоменные белки, как полагают, произошли от случайного соединения последовательностей ДНК, кодирующих эти домены, что обусловило появление нового гена. В местах соприкосновения доменов часто создавались новые поверхности связывания, и многие функциональные участки, где и происходит связывание маленьких молекул, как оказалось, расположены именно там. В ходе эволюционного процесса, названного *перетасовкой доменов*, многие крупные белки появились как новые сочетания уже существующих доменов (рис. 3.15).

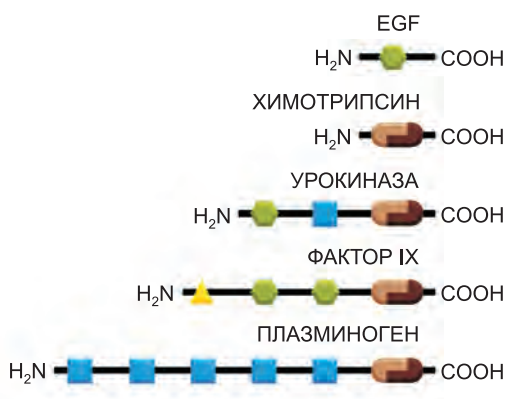


Рис. 3.15. Перетасовка доменов. В ходе эволюции белка происходила серьезная перетасовка блоков белковой последовательности (белковых доменов). Те части белка, которые на этой схеме представлены одинаковой формой и одинаковым цветом, являются эволюционно родственными. Сериновые протеазы, подобно химотрипсину, образованы из двух доменов (*коричневые*). В остальных трех показанных протеазах, с более высокими уровнями регуляции и специализации, эти два протеазных домена соединены с одним или несколькими доменами, которые подобны, обнаруженным в эпидермальном факторе роста (EGF; *зеленые*), с кальций-связывающим белком (*желтый*) или с доменом kringle² (*синий*), который содержит три внутренних дисульфидных мостика. Химотрипсин показан на рис. 3.12.

² Крис Крингл — тайное имя Санта Клауса, известного также как Дед Мороз (искаженное нем. Christ Kindlein — «Христос-младенец»). — *Прим. пер.*

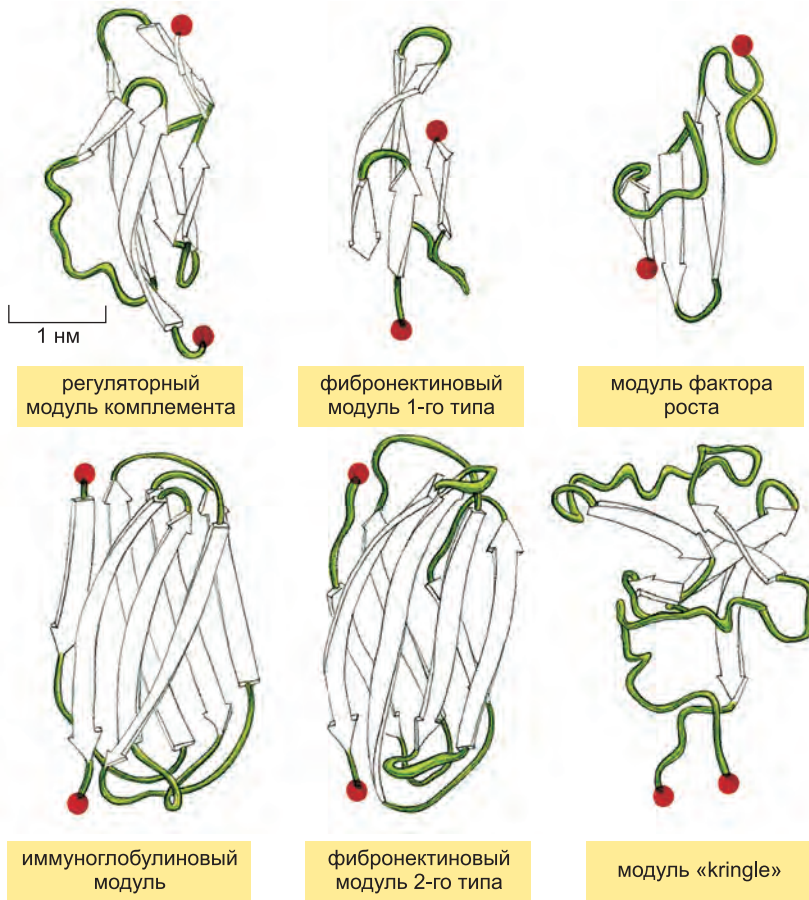


Рис. 3.16. Трехмерные структуры некоторых белковых модулей. В представленных здесь ленточных моделях цепи β -листов изображены в виде *стрелок*, а N- и C-концы обозначены *красными кружками*. (Перерисовано из M. Baron, D. G. Norman and I. D. Campbell, *Trends Biochem. Sci.* 16: 13–17, 1991, с разрешения издательства Elsevier, и D. J. Leahy et al., *Science* 258: 987–991, 1992, с разрешения издательства AAAS).

Одна подгруппа белковых доменов была особенно подвижной в ходе эволюции; они, как кажется, имеют особенно универсальные структуры и упоминаются иногда как *белковые модули*. Структура одного такого модуля, домена SH2, показана в приложении 3.2 (стр. 132–133). Некоторые другие из этих «вездесущих» белковых доменов представлены на **рис. 3.16**.

У каждого из доменов есть стабильная внутренняя структура, или сердцевина, называемая «кор» (от английского «core»), которая образована из цепей β -листа с выступающими менее упорядоченными петлями полипептидной цепи (окрашены *зеленым*). Такие петли имеют идеальное расположение для формирования участков связывания других молекул, что наиболее ясно видно при рассмотрении укладки цепей иммуноглобулина, которые формируют основание молекулы антитела (см. рис. 3.41). По всей вероятности, такие домены из β -листов достигли вершин эволюцион-



Рис. 3.17. Протяженная структура, состоящая из ряда соединенных в линию белковых модулей. Четыре модуля 3-го типа (см. рис. 3.16) молекулы фибронектина внеклеточного матрикса представлены на виде *a* в виде ленточной модели, а на схеме *б* — в виде объемной модели. (Переработано из статьи D. J. Leahy, I. Aukhil and H. P. Erickson, *Cell* 84: 155–164, 1996. С разрешения издательства Elsevier.)

ного успеха потому, что их структура обеспечивает удобную основу для создания новых участков связывания лигандов посредством незначительных изменений в хитросплетении выпячивающихся из них петель.

Вторая особенность этих белковых доменов, которая объясняет их практичность, — это простой способ встраивания в другие белки. В пяти из шести доменов, помещенных на рис. 3.16, N- и C-концы находятся на противоположных полюсах домена. Когда ДНК, кодирующая такой домен, подвергается тандемному дублированию, что совсем не считается необычным в эволюции геномов (обсуждается в главе 4), дублированные модули с таким расположением «в ряд» могут быть легко соединены последовательно с образованием протяженных структур — как из множества своих копий-дубликатов, так и в сочетании с другими последовательно

вставленными доменами (**рис. 3.17**). Жесткие удлиненные структуры, состоящие из ряда доменов, особенно многочисленны в молекулах внеклеточного матрикса и во внеклеточных частях белков — рецепторов клеточной поверхности. Другие модули, в том числе домен SH2 и домен krigle, представленные на рис. 3.16, относятся к «штепсельному» типу, при этом их N- и C-концы расположены поблизости друг от друга. После перестроек генома такие модули обычно находят себе место для встраивания в петельную область второго белка.

Сравнение относительной частоты встречаемости доменов у различных эукариот показывает, что для многих распространенных доменов, таких как протеинкиназы, эта частота схожа у таких столь разнящихся между собой организмов, как дрожжи, растения, черви, мухи и человек (**рис. 3.18**). Но есть некоторые достойные интереса исключения, как например, антиген-узнающий домен главного комплекса гистосовместимости (МНС, Major Histocompatibility Complex) (см. рис. 25.52), который у человека присутствует в 57 копиях, но в остальных только что упомянутых четырех организмах отсутствует. Такие домены предположительно имеют специализированные функции, которыми не наделены другие эукариоты, и в ходе эволюции были подвергнуты строгому отбору, с тем чтобы дать начало множеству копий. Подобным же образом можно допустить, что домен наподобие SH2, с необычайно высоким уровнем частотности в организмах высших эукариот,

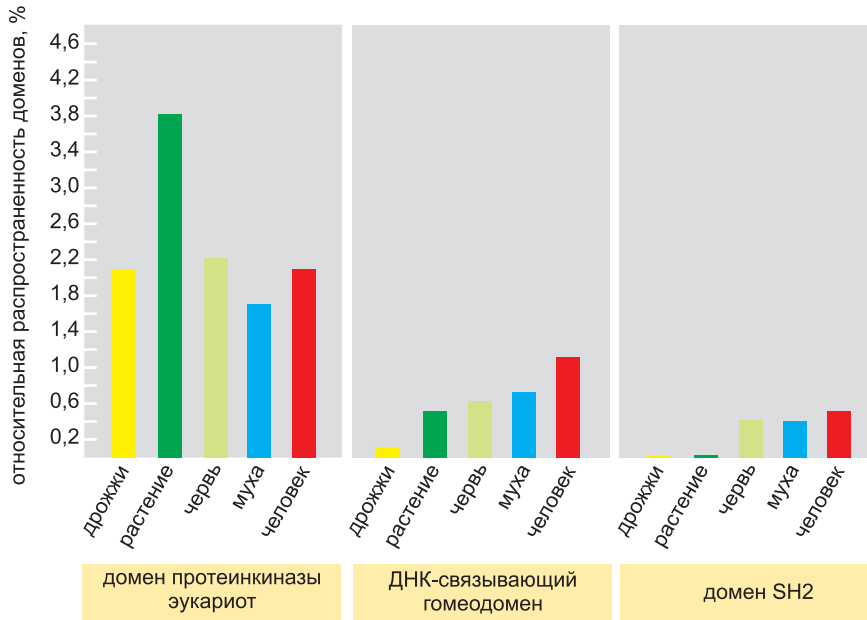


Рис. 3.18. Относительная частота встречаемости трех белковых доменов в организмах пяти эукариот. Приведенные здесь приблизительные данные рассчитаны как частное от деления числа копий каждого домена на общее число белков, кодируемых каждым из организмов, что установлено по последовательности их геномов. Таким образом, для доменов SH2 в организме человека имеем $120/24\,000 = 0,005$.

особенно важен для многоклеточного организма (сравните многоклеточные организмы с дрожжами на рис. 3.18).

3.1.9. Определенные пары доменов встречаются во многих белках

Мы можем составить большую таблицу, показывающую степень используемости доменов во всех организмах, последовательности геномов которых известны. Например, геном человека, согласно оценкам, содержит около 1000 доменов иммуноглобулина, 500 доменов протеинкиназы, 250 ДНК-связывающих гомеодоменов, 300 доменов SH3 и 120 доменов SH2. Важная дополнительная информация может быть получена при сравнении частоты встречаемости и расположения доменов в более чем 100 геномах эукариот, бактерий и архей, которые полностью секвенированы. Например, мы находим, что более чем две трети белков состоят из двух и более доменов, и что одни и те же пары доменов неоднократно встречаются в одинаковом взаимном расположении в белке. Хотя половина всех семейств доменов есть у архей, бактерий и эукариот, только около 5% двудоменных сочетаний являются общими для всех этих групп организмов. Такая закономерность позволяет предположить, что большинство белков, содержащих особенно важные двудоменные сочетания, возникло на сравнительно поздних этапах эволюции.

200 самых распространенных двудоменных сочетаний встречаются примерно у одной четверти всех белков, домены которых есть в полной базе данных. Поэтому было бы очень полезно определить точную трехмерную структуру по крайней мере одного белка для каждого общего двудоменного сочетания, с тем чтобы показать,

как эти домены взаимодействуют в белковых структурах соответствующих типов.

3.1.10. Геном человека кодирует сложный набор белков и являет нам многое, что остается еще непонятым

Результаты секвенирования генома человека оказались удивительными, потому что они показали, что наши хромосомы содержат всего лишь около 25000 генов. Если судить только по числу генов, то может показаться, что мы устроены не сложнее, чем крошечный сорняк горчицы, арабидопсис, и только в 1,3 раза сложнее червя нематоды. Последовательности геномов показывают также, что позвоночные унаследовали почти все свои белковые домены от беспозвоночных, и только 7 процентов идентифицированных доменов человека являются специфичными для позвоночных.

Однако в среднем, все наши белки организованы сложнее (рис. 3.19). Перегасовка доменов во время эволюции позвоночных обусловила появление многих новых комбинаций белковых доменов, так что в итоге в белках человека встречается почти вдвое больше сочетаний доменов, чем в белках червя или мухи. Так, например, в белках человека домен трипсин-подобной сериновой протеазы связан с белковыми доменами по крайней мере 18-ти типов, тогда как у червя, как известно, он ковалентно связывается лишь с 5-ю различными доменами. Это дополнительное разнообразие в наших белках значительно увеличивает диапазон возможных межбелковых взаимодействий (см. рис. 3.82), однако не известно, способствует ли оно сколько-нибудь развитию в нас человеческой сущности.

Сложность живых организмов ошеломляет, и весьма отрезвляюще звучит тот факт, что мы в настоящее время не имеем даже самого отдаленного представления о возможных функциях более чем 10000 белков, которые к настоящему времени идентифицированы в геноме человека. Несомненно, следующему поколению клеточных биологов предстоит разгадать множество завораживающих таинств природы, которые она являет в избытке.

3.1.11. Крупные белковые молекулы часто содержат более одной полипептидной цепи

Те же слабые нековалентные связи, которые придают белковой цепи специфическую конформацию, позволяют белкам также связываться друг с другом и образовывать в клетке внушительные структуры. Любую область поверхности белка,

которая может взаимодействовать с другой молекулой за счет образования нековалентных связей, называют **участком связывания, или сайтом связывания (binding site)**. Белок может содержать участки связывания раз-

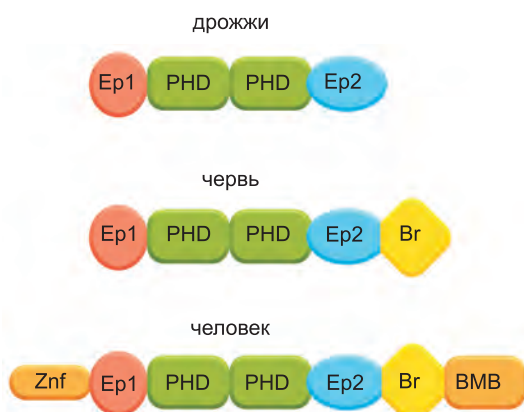


Рис. 3.19. Доменная структура группы эволюционно родственных белков с предположительно сходными функциями. Вообще, для белков наиболее сложных организмов, таких как человек, характерно наличие дополнительных доменов — как в случае сравниваемого здесь ДНК-связывающего белка.

личных больших и малых молекул. Если некоторый участок связывания узнает поверхность какого-либо второго белка, то прочное связывание двух свернутых полипептидных цепей в этом участке приводит к образованию более крупной молекулы белка с точно заданной геометрией. Все полипептидные цепи в таком белке называют **белковыми субъединицами**.

В простейшем случае две одинаково свернутые полипептидные цепи связываются друг с другом в расположении «лицом к лицу», образуя симметричный комплекс из двух белковых субъединиц (*димер*), скрепляемый воедино за счет



Рис. 3.20. Две идентичные белковые субъединицы связываются вместе с образованием симметричного белкового димера. Белок Cro-репрессор бактериофага лямбда связывается с ДНК, чтобы «выключить» определенные гены вируса. Две идентичные субъединицы этого белка связаны «голова к голове» и скреплены воедино за счет комбинации гидрофобных сил (*синих*) и водородных связей (*желтая* область). (Переработано из D. H. Ohlendorf, D. E. Tronrud, B. W. Matthews, *J. Mol. Biol.* 280: 129–136, 1998. С разрешения Academic Press.)

взаимодействий между двумя идентичными участками связывания. Примером служит *Cro-репрессор бактериофага лямбда* — регуляторный белок, который связываясь с ДНК, выключает экспрессию некоторых вирусных генов в зараженной бактериальной клетке (**рис. 3.20**). Клетки содержат множество других типов симметричных белковых комплексов, образованных из многочисленных копий одной полипептидной цепи. Например, фермент *нейраминидаза* состоит из четырех одинаковых белковых субъединиц, соединенных друг с другом по принципу «голова к хвосту» в замкнутое кольцо (**рис. 3.21**).

Многие белки в клетках содержат полипептидные цепи двух и более типов. *Гемоглобин* — белок, обратимо связывающий кислород и содержащийся в красных кровяных тельцах, — состоит из двух одинаковых субъединиц α -глобина и двух одинаковых субъединиц β -глобина, симметрично расположенных друг относительно друга (**рис. 3.22**). Такие многосубъединичные белки содержатся в клетках в большом количестве и могут быть огромных размеров. На **рис. 3.23** представлен ряд белков, структуры которых установлены, для сравнения их по размеру и форме — от нескольких больших белков до нескольких относительно малых, с моделями которых мы уже знакомили читателя.

3.1.12. Некоторые белки образуют длинные спиралевидные нити

Некоторые белковые молекулы могут собираться в филаменты (нити), которые могут простираться по всей длине клетки. Проще всего длинная цепь одинаковых

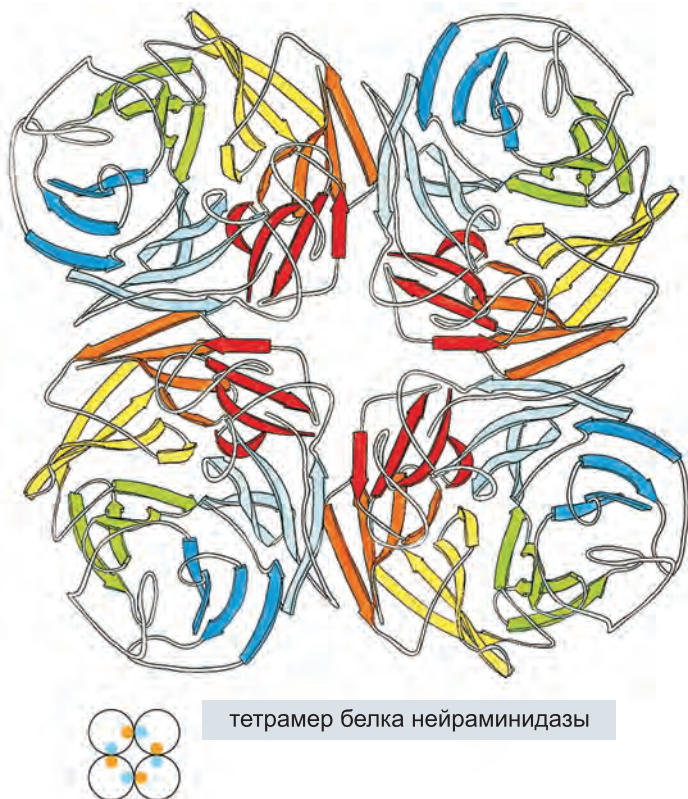


Рис. 3.21. Молекула белка, состоящая из нескольких копий одной белковой субъединицы. Фермент нейраминидаза похож на кольцо, составленное из четырех одинаковых полипептидных цепей, каждая из которых образована из шести повторов четырехцепочечного β -листа, что изображено цветными стрелками. На маленькой схеме показано, за счет каких мотивов происходит взаимодействие между субъединицами с образованием данной структуры.

белковых молекул может быть построена, если каждая молекула имеет участок связывания, комплементарный другой области поверхности той же молекулы (**рис. 3.24**). Например, актиновый филамент представляет собой длинную спиральную

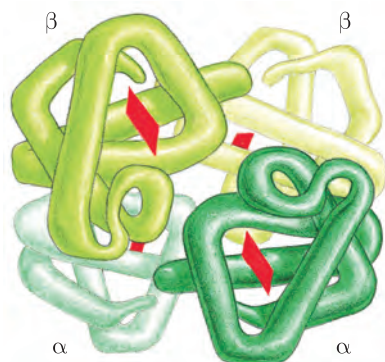


Рис. 3.22 Белок, образуемый в результате симметричной сборки двух различных субъединиц. Гемоглобин — белок, в большом количестве содержащийся в красных кровяных тельцах и состоящий из двух копий α -глобина и двух копий β -глобина. Каждая из этих четырех полипептидных цепей содержит молекулу гема (показана красным), которая является участком связывания кислорода (O_2). Таким образом, каждая молекула гемоглобина в крови переносит четыре молекулы кислорода.

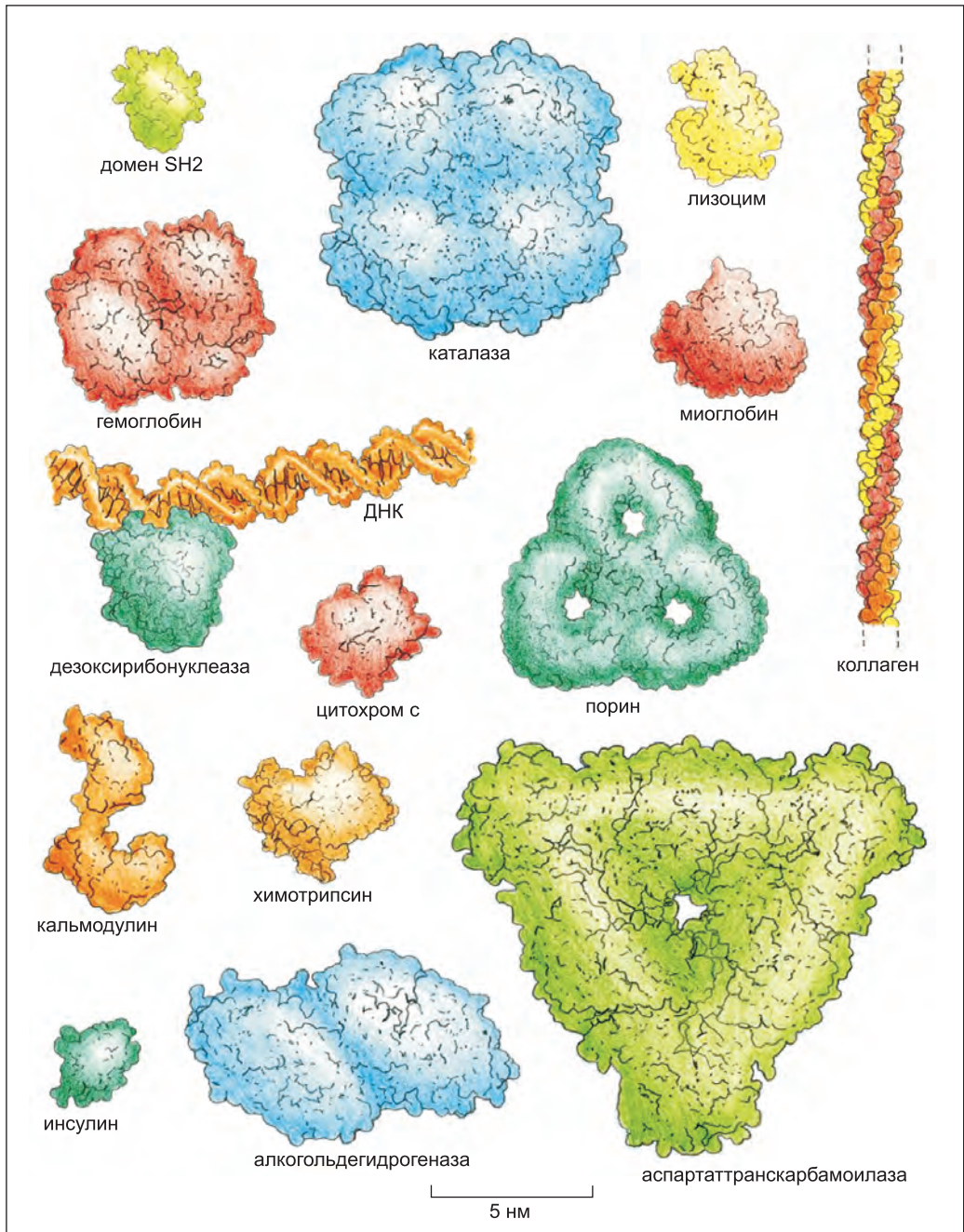


Рис. 3.23. Молекулы белков в одном масштабе. Сравнения ради показана молекула ДНК, связанная с белком. Эти объемные модели приведены для того, чтобы можно было представить многообразие размеров и форм белков. Гемоглобин, каталаза, порин, алкогольдегидрогеназа и аспартаттранскарбамоилаза состоят из множества копий субъединиц. Домен SH2 (в левом верхнем углу) изображен во всех подробностях в приложении 3.2 (стр. 132–133). (Займствовано с переработкой из David S. Goodsell, *Our Molecular Nature*. New York: Springer-Verlag, 1996. С разрешения Springer Science and Business Media.)

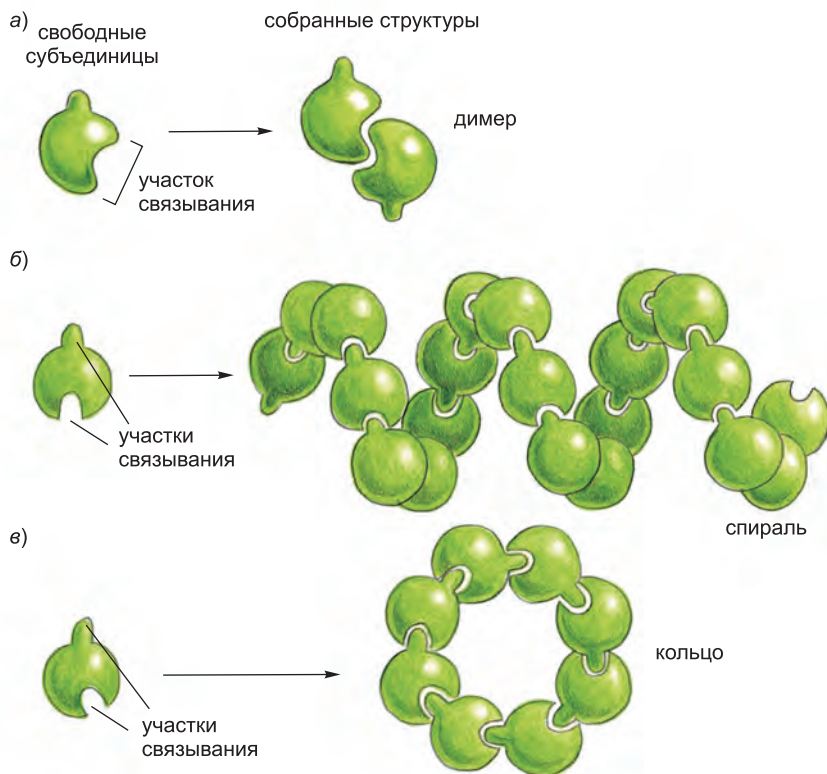


Рис. 3.24. Сборка белков. а) Белок только с одним участком связывания может образовать димер с другим аналогичным белком. б) Одинаковые белки с двумя различными участками связывания часто образуют длинную спиралевидную нить. в) Если два участка связывания расположены соответствующим образом друг относительно друга, то вместо нити белковые субъединицы могут образовать замкнутое кольцо. (Пример варианта а представлен на рис. 3.20, а пример варианта в — на рис. 3.21.)

структуру, образованную двумя молекулами белка *актина* (рис. 3.25). Клетки эукариот очень богаты актином, который формирует в них одну из главных систем филаментов клеточного скелета (рассмотрим в главе 16).

Почему спираль заняла столь видное место в сонме биологических структур? Как мы могли убедиться, биологические структуры часто образуются путем связывания подобных субъединиц — таких как аминокислоты или белковые молекулы — в длинные повторяющиеся цепи. Если все субъединицы одинаковы, то соседние субъединицы в цепи чаще всего могут подходить одна к другой лишь одним способом, при котором их относительные положения подогнаны так, что свободная энергия контакта между ними минимальна. В силу этого все субъединицы располагаются друг относительно друга в точности одним и тем же образом, так что субъединица 3 пригнана к субъединице 2 тем же способом, что и субъединица 2 к субъединице 1, и так далее. Поскольку субъединицы соединяются в прямую линию очень редко, такой тип сборки обычно дает спираль — регулярную структуру, напоминающую собой винтовую лестницу, что наглядно показано на рис. 3.26. В зависимости от направления закручивания спираль, как говорят, бывает правой или левой (см.

Рис. 3.25. Актиновые филаменты (микрофиламенты). а) Полученные на трансмиссионном электронном микроскопе микрофотографии негативно окрашенных актиновых филаментов. б) Расположение молекул актина по спирали в актиновом филаменте. (Фотографию а любезно предоставил Roger Craig.)

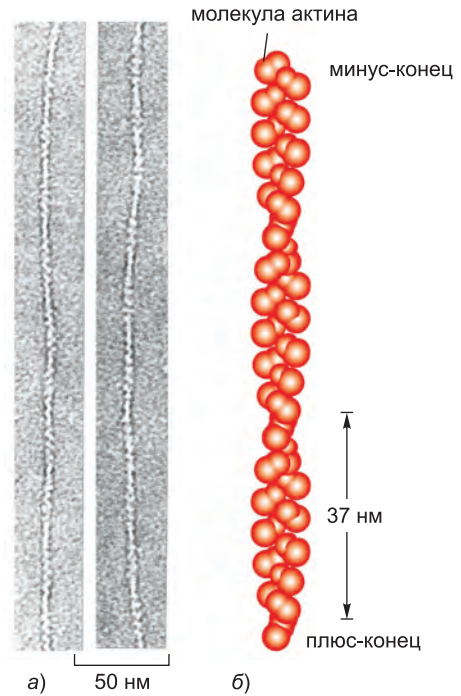


рис. 3.26, д). При перевертывании спирали вверх тормашками направление ее вращения не изменяется, но при зеркальном отражении спирали оно меняется на противоположное.

Спирали присутствуют в биологических структурах очень часто, будь субъединицы маленькими молекулами, соединенными друг с другом ковалентными связями (например, аминокислоты в α -спирали), или крупными белковыми молекулами, скрепленными нековалентными взаимодействиями (например, молекулы актина в актиновых филаментах). Это неудивительно. Спираль — обыкновенная структура, которая строится путем простого включения большого числа подобных субъединиц друг за другом — каждая в одном и том же строго повторяющемся пространственном отношении к предыдущей, то есть когда заданный поворот сопровождается определенным поступательным движением по оси спирали, как при движении по винтовой лестнице.

3.1.13. Молекулы многих белков имеют протяженную волокноподобную форму

Большинство белков, о которых мы успели поговорить, относятся к *глобулярным белкам*, в которых полипептидная цепь сворачивается в компактную форму, подобную шару с неровной поверхностью. Ферменты обычно представляют собой глобулярные белки: даже при том, что многие из них обладают большими размерами и сложным строением, состоят из множества субъединиц, в большинстве своем они имеют в целом округлую форму (см. рис. 3.23). Напротив, другие белки выполняют в клетке такие роли, которые требуют, чтобы каждая отдельно взятая молекула белка простиралась на большое расстояние. Такие белки, как правило, имеют относительно простую, вытянутую трехмерную структуру и упоминаются обычно как *волоконистые*, или *фибриллярные, белки*.

В ходе рассмотрения α -спирали мы познакомили вас с α -кератином — представителем одного большого семейства внутриклеточных фибриллярных белков, включающего, помимо α -кератина, еще ряд родственных ему белков. Нити кератина чрезвычайно устойчивы и являются главным компонентом таких долговечных структур, как волосы, рога и ногти. Молекула α -кератина представляет собой димер, состоящий из двух идентичных субъединиц, причем длинные α -спирали субъединиц образуют витую суперспираль (см. рис. 3.9). Каждый конец этой суперспирали увенчан глобулярным доменом, содержащим участки связывания. Такое строение

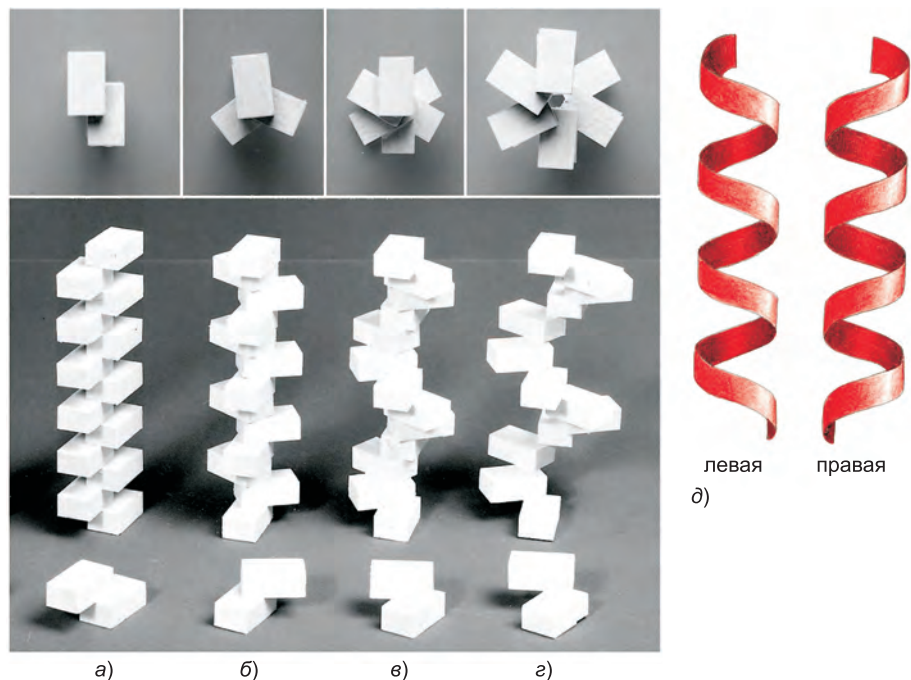


Рис. 3.26. Некоторые свойства спирали. а–г) Спираль образуется, когда ряд субъединиц связывается друг с другом регулярным образом. В основании рисунка показано взаимодействие между двумя субъединицами; позади них расположены спирали, выстраиваемые в результате такого взаимодействия. В этих спиралях на один виток приходится две (а), три (б) и шесть (в и г) субъединиц. На фотографиях в верхней части рисунка показано расположение субъединиц, если смотреть на спирали строго сверху вниз. Обратите внимание, что спираль под буквой г имеет более широкий контур по сравнению с такой под буквой в при том же самом числе субъединиц на виток. д) Спираль может быть как правой, так и левой. В качестве примера можно привести стандартные металлические винты, которые вкручиваются при вращении по часовой стрелке и являются правовинтовыми. Следует иметь в виду, что спираль сохранит исходное направление закрутки, даже если ее перевернуть вверх тормашками.

позволяет белкам данного класса собираться в веревкообразные *промежуточные филаменты* — важные компоненты цитоскелета, который образует внутренний структурный каркас клетки (см. рис. 16.19).

Фибриллярных белков особенно много вне клетки, где они являются главным компонентом гелеобразного *внеклеточного матрикса*, который помогает связывать совокупности клеток воедино с образованием тканей. Клетки выделяют белки внеклеточного матрикса в окружающую их среду, где те часто собираются в пласты или длинные волокна.

В тканях животных из таких белков наиболее широко распространен *коллаген*. Молекула коллагена состоит из трех длинных полипептидных цепей, которые в каждой третьей позиции содержат неполярную аминокислоту глицин. Такая регулярная структура позволяет цепям закручиваться друг вокруг друга и образовывать длинную правильную тройную спираль (рис. 3.27, а). Множество молекул коллагена связывается друг с другом — как концами, так и боковыми сторонами — в длинные собранные внахлестку массивы, и таким образом создается чрезвычайно тугие

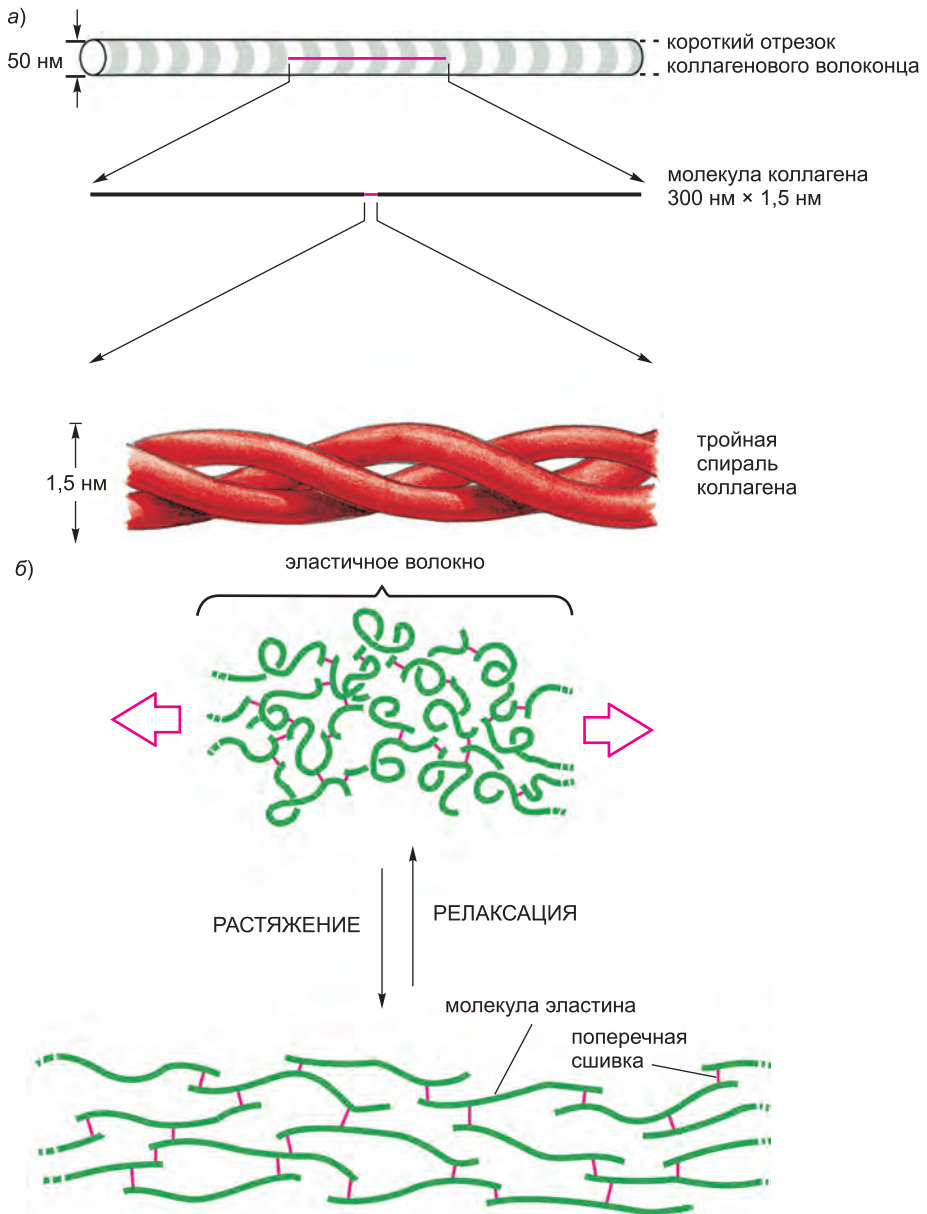


Рис. 3.27. Коллаген и эластин. а) Коллаген представляет собой тройную спираль, образуемую тремя вытянутыми белковыми цепями, которые обвиваются друг вокруг друга (в нижней части рисунка). Множество стержнеобразных молекул коллагена стягивается воедино поперечными сшивками во внеклеточном пространстве и формирует нерастяжимые коллагеновые волокна (в верхней части рисунка), которые обладают прочностью на растяжение, сопоставимой с таковой для стали. Чередование полос, заметное на поверхности коллагенового волокна, обусловлено регулярным повторяющимся расположением молекул коллагена в структуре такого волокна. б) Полипептидные цепи эластина связаны друг с другом поперечными сшивками и образуют резиноподобные эластичные волокна. Молекулы эластина принимают более вытянутые конформации, когда волокно растягивают, и самопроизвольно скручиваются обратно после снятия растягивающей силы.

коллагеновые волокна, которые и придают соединительным тканям присущую им прочность на растяжение, о чем еще будет сказано в главе 19.

3.1.14. В полипептидных цепях многих белков содержится удивительно много неструктурированных участков

Уже давно известно, что, в отличие от коллагена, другой изобилирующий во внеклеточном матриксе белок — *эластин* — представляет собой в структурном отношении крайне неупорядоченный полипептид. Такая разупорядоченность необходима для функции эластина. Его относительно вялые и неструктурированные полипептидные цепи сшиты поперечными ковалентными связями и образуют резиноподобную эластичную сетчатую структуру, которая может обратимо растягиваться с переходом из одной конформации в другую, как показано на рис. 3.27, б. Получающиеся в результате упругие волокна позволяют коже и прочим тканям, образующим, например, артерии и легкие, растягиваться и обратно сжиматься без разрыва.

В действительности, неструктурированные области белков весьма часто встречаются в природе, выполняя важные функции внутри клеток. Как мы успели заметить, белки используют короткие петли полипептидной цепи, которые обычно выступают из сердцевинной области белковых доменов для связывания других молекул. Многие белки имеют намного более протяженные неструктурированные области аминокислотных последовательностей, которые взаимодействуют с какой-либо другой молекулой (часто это ДНК или белок), претерпевая структурный переход в специфическую свернутую конформацию при связывании с этой другой молекулой. Другие белки в большей или меньшей мере напоминают эластин в том смысле, что для выполнения их функции нужно, чтобы они оставались в значительной степени неструктурированными. Например, встречающиеся в больших количествах нуклеопорины, которые покрывают внутреннюю поверхность комплекса ядерной поры, образуют сетчатую структуру из беспорядочно расположенных спиралей, что неразрывно связано с переносом веществ через ядерную мембрану (см. рис. 12.10). Наконец, как мы покажем ближе к концу этой главы (см. рис. 3.80, в), неструктурированные области полипептидной цепи зачастую используются как участки связывания тех или иных белков, совместно функционирующих в катализе какой-либо биологической реакции. Так, например, для содействия передаче сигналов между клетками крупные *каркасные белки* используют такие гибкие области как «привязи», на которых скапливаются группы взаимодействующих белков, что позволяет удерживать последние в определенных участках клетки (обсудим это в главе 15).

Мы можем идентифицировать неструктурированные области во многих белках по их отличающемуся от остальной цепи аминокислотному составу: они содержат очень мало разветвленных гидрофобных аминокислот, которые обычно формируют внутреннюю часть (кор) свернутого белка, но включают большую долю аминокислот Gln, Ser, Pro, Glu и Lys. Такие «естественно развернутые» области часто содержат и повторяющиеся последовательности аминокислот.

3.1.15. Внеклеточные белки нередко стабилизируются ковалентными поперечными межмолекулярными связями

Молекулы многих белков или прикреплены к внешней стороне плазматической мембраны клетки, или выделяются как часть внеклеточного матрикса. Все такие

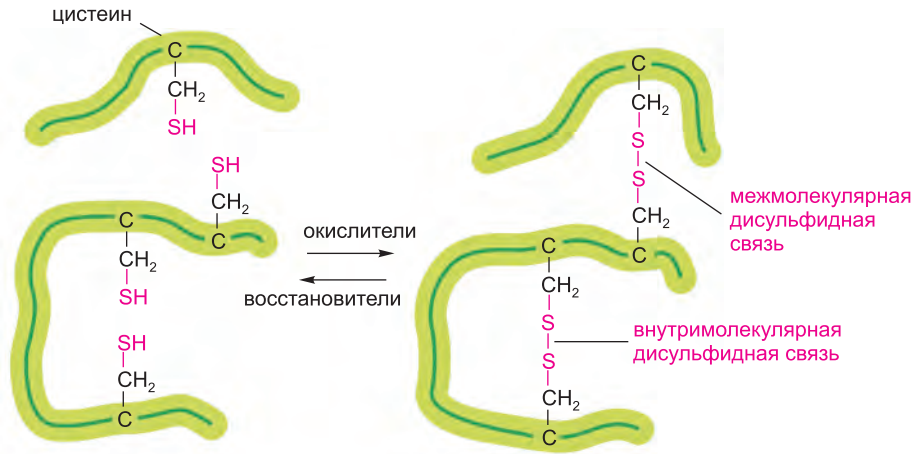


Рис. 3.28. Дисульфидные связи. На этой схеме показано, как между расположенными поблизости остатками цистеина образуются ковалентные дисульфидные связи. Как видно, такие поперечные шивки могут соединить или две части одной и той же полипептидной цепи, или две разные полипептидные цепи. Так как энергия, требуемая для разрыва одной ковалентной связи, намного больше энергии, необходимой для нарушения даже целой группы нековалентных связей (см. таблицу 2.1, [стр. 53](#)), дисульфидные связи могут давать основной вклад в стабилизацию белка.

белки непосредственно соприкасаются с внеклеточной средой и подвергаются ее воздействию. Для поддержания структуры таких белков их полипептидные цепи часто стабилизированы поперечными ковалентными связями. Такие поперечные шивки могут либо связывать друг с другом две аминокислоты из одного и того же белка, либо соединять различные полипептидные цепи в многосубъединичном белке. Самые обычные поперечные шивки в белках представлены ковалентными связями типа сера–сера. Такие *дисульфидные связи* (также называемые *связями S–S*) образуются, когда клетки подготавливают недавно синтезированные белки к экспорту. Как будет описано в главе 12, их образование катализируется в эндоплазматической сети особым ферментом, который связывает две SH-группы из боковых цепей пары цистеинов, оказавшихся рядом в свернутом белке ([рис. 3.28](#)). Дисульфидные связи не изменяют конформацию белка, но, вместо этого, действуют как атомарные скобы, скрепляющие его наиболее благоприятную конформацию. Например, лизоцим — содержащийся в слезах фермент, который растворяет клеточные стенки бактерий, — сохраняет свои антибактериальные свойства в течение длительного времени, потому что он стабилизирован такими поперечными шивками.

Дисульфидные связи обычно не могут образоваться в цитозоле клетки, где высокая концентрация восстановителей превращает связи S–S обратно в SH-группы цистеина. Очевидно, в относительно мягкой среде внутри клетки белкам не требуются «укрепления» такого типа.

3.1.16. Молекулы белка часто служат субъединицами для сборки довольно крупных структур

Те же самые принципы, которые позволяют молекуле белка связать свои собственные части в кольца или нити, обуславливают также образование namного

более крупных структур в клетке — надмолекулярных структур типа ферментных комплексов, рибосом, белковых нитей, вирусов и мембран. Такие колоссальные образования строятся не в виде единых гигантских скрепленных внутренними ковалентными связями молекул. Напротив, они образуются за счет нековалентного связывания многочисленных, производимых по отдельности, молекул, которые служат субъединицами конечной структуры.

Применение малых субъединиц для построения из них более крупных структур имеет ряд преимуществ.

1. Для построения крупной структуры из одной или нескольких повторяющихся субъединиц меньшего размера требуется лишь небольшое количество генетической информации.

2. Как сборкой, так и разборкой можно легко управлять (суть обратимые процессы), потому что субъединицы связываются между собой посредством множественных связей относительно низкой энергии.

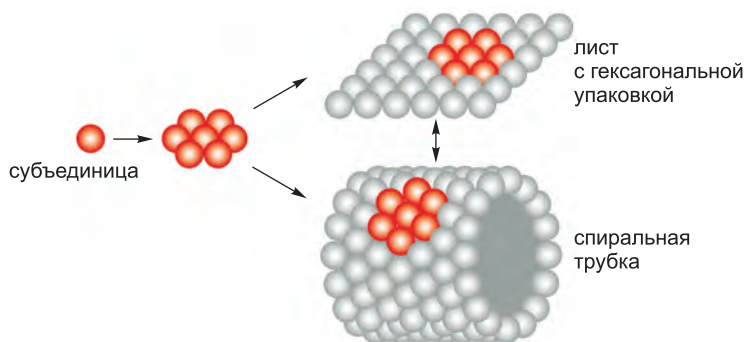


Рис. 3.29. Пример сборки из единичных белковых субъединиц, в ходе которой образуются многочисленные межбелковые контакты. Гексагонально упакованные шаровидные белковые субъединицы могут образовать либо плоский лист, либо трубку.

3. При синтезе такой структуры легче избежать ошибок, так как в ходе сборки могут работать механизмы исправления, позволяющие оперативно изымать из него дефектные субъединицы.

Некоторые белковые субъединицы собираются в плоские листы, где они располагаются по принципу гексагональной упаковки. Иногда подобным образом упаковываются специализированные мембранные белки в липидных бислоях. С небольшим изменением в геометрии отдельных субъединиц гексагонально упакованный лист может быть преобразован в трубку (рис. 3.29) или — при более существенных изменениях — в полый шар. Белковые трубки и сферы, которые связывают специфические молекулы РНК и ДНК в своих внутренних полостях, образуют оболочки вирусов.

Образование замкнутых структур, таких как кольца, трубки или сферы, обеспечивает им дополнительную устойчивость, потому что они скреплены большим числом связей между белковыми субъединицами. Более того, поскольку такая структура создана за счет взаимозависимых коллективных взаимодействий между субъединицами, относительно небольшое изменение, способное затронуть каждую

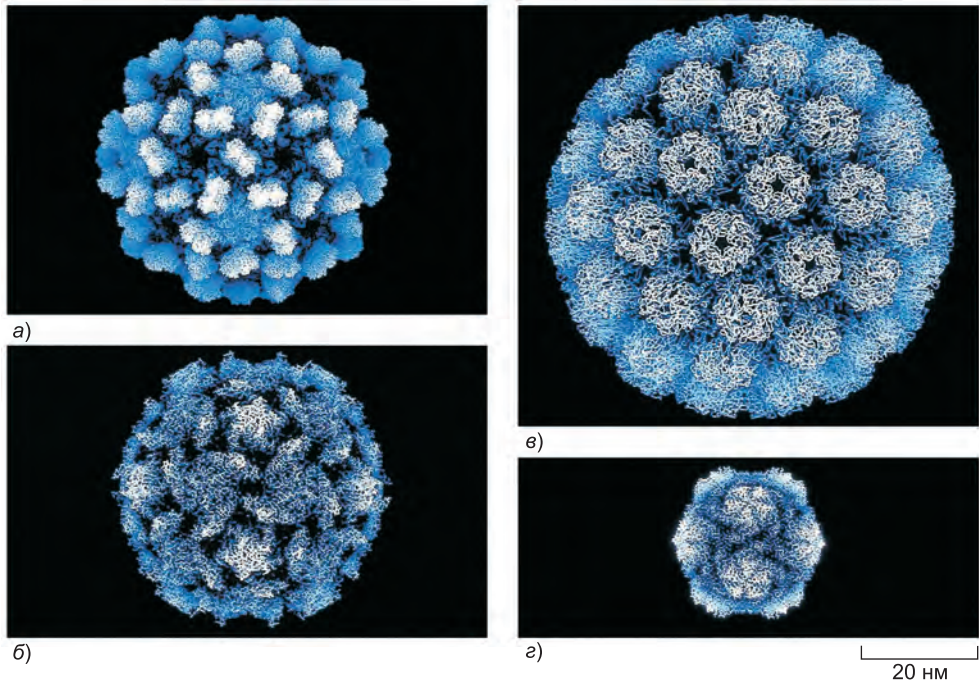


Рис. 3.30. Капсиды некоторых вирусов, представленные в едином масштабе. а) Вирус кустистой карликовости томата; б) полиовирус (вирус полиомиелита); в) вирус обезьян 40 (SV40, simian virus); г) сателлитный вирус некроза табака. Структуры всех этих капсидов определены с помощью рентгеноструктурного анализа и известны на атомарном уровне. (Снимки любезно предоставили R. Grant, S. Crainic, J. Hogle.)

из субъединиц в отдельности, может вызвать сборку или разборку всей структуры. Эти принципы заложены в белковой оболочке, или *капсиде*, многих простых вирусов, имеющих форму полого шара, в котором просматриваются двадцать правильных граней (рис. 3.30). Часто капсиды вирусов строятся из сотен тождественных белковых субъединиц, которые прикрывают и защищают вирусную нуклеиновую кислоту (рис. 3.31). Белок во всяком таком капсиде должен обладать структурой, в особенности легко адаптируемой к новым условиям: кроме того, что ему необходимо образовывать контакты нескольких разных видов для создания сферы, он еще должен обладать способностью изменять эту конструкцию, чтобы «выпускать» нуклеиновую кислоту наружу для запуска репликации вируса, как только последний проникнет в клетку.

3.1.17. Многие структуры в клетках обладают способностью к самосборке

Информация, необходимая для образования многих сложных макромолекулярных ансамблей в клетках, должно быть, содержится в самих субъединицах, потому что в соответствующих условиях очищенные субъединицы способны самопроизвольно собираться в окончательную структуру. Первой крупной совокупностью макромолекул, продемонстрировавшей свою способность к самосборке из составных частей, был *вирус табачной мозаики* (ВТМ). Этот вирус представляет

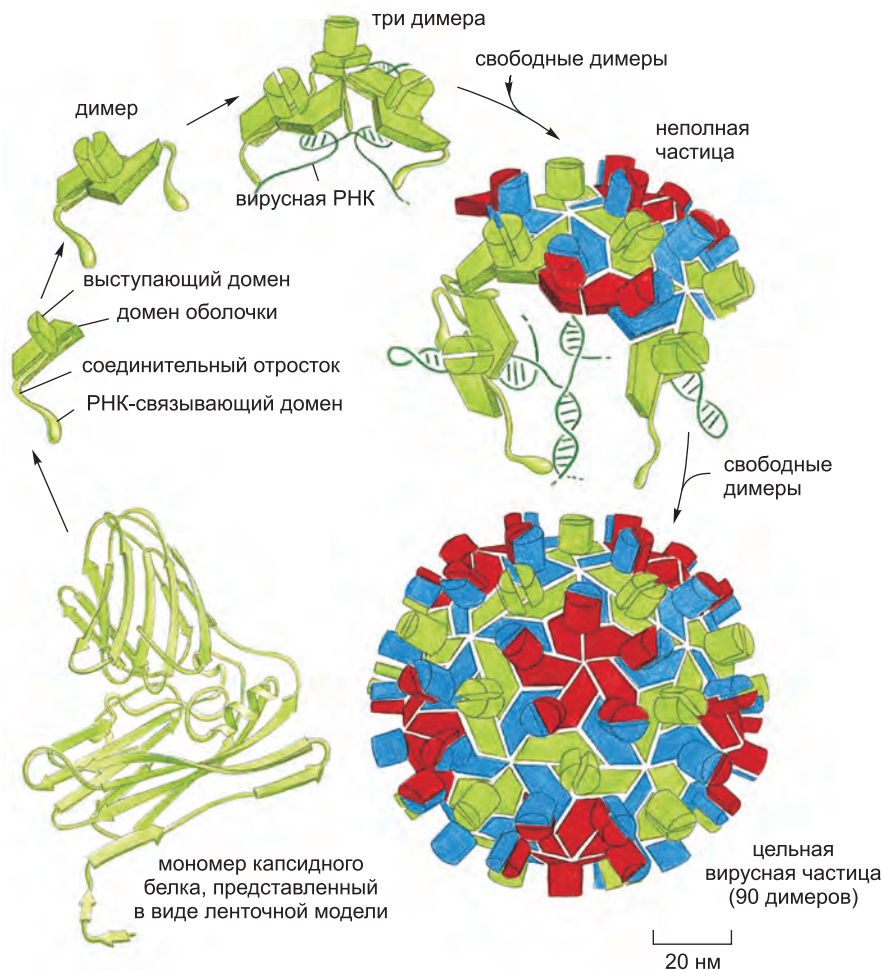


Рис. 3.31. Структура сферического вируса. У многих вирусов идентичные белковые субъединицы упакованы одна к одной в сферическую оболочку (капсид), в которой заключен геном вируса, состоящий из РНК либо из ДНК (см. также рис. 3.30). По геометрическим причинам не более 60-ти идентичных субъединиц могут быть упакованы воедино с соблюдением точной симметрии. Однако, если допустимы небольшие нерегулярности в упаковке, то число субъединиц может быть больше и созданный из них нуклеокапсид будет иметь более внушительный размер, сохраняя при этом икосаэдрическую симметрию. Например, изображенный на этом рисунке вирус кустистой карликовости томата (TBSV) представляет собой сферический вирус диаметром около 33 нм, образованный из 180-ти тождественных копий состоящего из 386-ти аминокислот капсидного белка и РНК-генома из 4500 нуклеотидов. Для того чтобы построить столь крупный капсид, белок должен быть способен вписаться в три различных окружения, по-разному окрашенных в представленной на рисунке вирусной частице. Показан предполагаемый путь сборки; точная трехмерная структура определена с помощью рентгеноструктурного анализа. (С разрешения S. Harrison.)

собой длинную трубку, в которой стержень из закрученной в спираль РНК обнесен белковым цилиндром (рис. 3.32). Если отделенные друг от друга РНК и белковые субъединицы смешать в растворе, то они воссоединятся с образованием полностью активных вирусных частиц. Процесс сборки на удивление сложен и включает

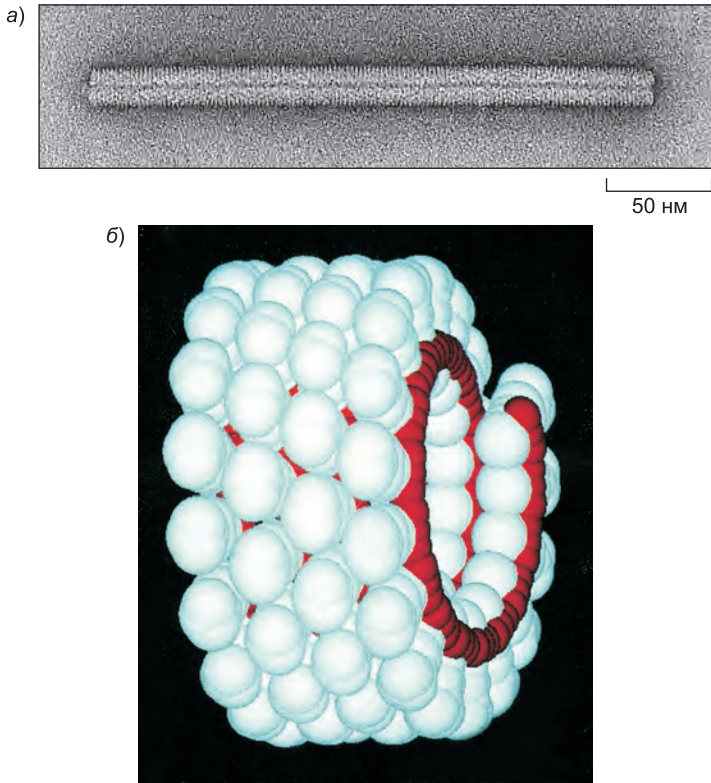


Рис. 3.32. Структура вируса табачной мозаики (ВТМ). *а)* Электронный микрофотоснимок вирусной частицы, которая состоит из одной длинной молекулы РНК, заключенной в цилиндрическую белковую оболочку, состоящую из идентичных белковых субъединиц. *б)* Модель, показывающая часть структуры ВТМ. Молекула одноцепочечной РНК из 6395 нуклеотидов упакована в спиралевидную оболочку, построенную из 2130 копий белка оболочки, состоящего из 158 аминокислот. Инфекционные вирусные частицы могут самособираться в пробирке из очищенных молекул РНК и белка. (Рисунок под буквой *а* любезно предоставил R. Williams; *б* — R. J. Feldmann.)

в себя формирование двойных белковых колец, которые служат промежуточными звеньями и добавляются к растущей вирусной оболочке.

Еще одна сложная макромолекулярная конструкция, которая способна повторно собираться из составляющих ее частей, — бактериальная рибосома. Эта структура состоит примерно из 55-ти различных белковых молекул и 3-х различных молекул рРНК. Инкубирование отдельных компонентов при соответствующих условиях в пробирке приводит к самопроизвольной сборке в первоначальную структуру. Что наиболее важно, такие реконструированные рибосомы способны катализировать синтез белка. Как можно ожидать, повторная сборка рибосом идет по определенному пути: после того как определенные белки свяжутся с РНК, этот комплекс узнается другими белками, и так далее, пока структура не будет полностью собрана.

Все еще не ясно, как регулируются некоторые из более сложных процессов самосборки. Например, многие структуры в клетке, как оказалось, имеют точно заданную длину, которая во много раз превышает протяженность составляющих их макромолекул. Как достигается столь точное предопределение длины, является во



а) СБОРКА НА СТЕРЖНЕ

б) НАРАСТАНИЕ НАПРЯЖЕНИЯ

в) МЕХАНИЗМ ВЕРНЬЕ

Рис. 3.33. Три механизма, предопределяющих размер крупных белковых ансамблей. а) Совместная сборка на вытянутом стержневом кор-белке (или иной макромолекуле), который выступает в роли дозатора. б) Завершение сборки из-за напряжения, которое накапливается в полимерной структуре по мере включения в нее дополнительных субъединиц, так что по достижении некоторой установленной длины энергия, необходимая для присоединения следующей субъединицы к цепи, становится чрезмерно большой. в) Сборка по механизму Вернье, когда две группы стержнеобразных молекул, отличающихся по длине, формируют внутренне смещенный комплекс, который растет до тех пор, пока концы этих молекул в точности не совместятся друг с другом. Это название происходит от измерительного устройства (верньера, или нониуса), основанного на том же принципе и применяемого в механических измерительных инструментах.

многих случаях необъяснимой тайной. Три возможных механизма представлены на **рис. 3.33**. В наиболее простом случае длинный стержневой (кор) белок или другая макромолекула служат каркасом, который предопределяет пределы окончательной сборки. Это механизм, который определяет длину частицы ВТМ, где стержнем выступает цепь РНК. Подобным же образом кор-белок, как думают, определяет длину тонких филаментов в мышцах, равно как и размер длинных хвостов некоторых бактериальных вирусов (**рис. 3.34**).



100 нм

3.1.18. Образованию сложных биологических структур часто помогают факторы сборки

Не все клеточные структуры, собирающиеся в единое целое за счет нековалентных взаимодействий, делают это сами. Например, митохондрия, ресничка или миофибрилла мышечной клетки не могут самопроизвольно образоваться в растворе, который содержит все входящие в их состав ма-

Рис. 3.34. Электронный микрофотоснимок бактериофага λ. Кончик хвоста вируса прикрепляется к специфическому белку на поверхности бактериальной клетки, после чего плотно упакованная в его головке ДНК вводится через хвост в клетку. Хвост имеет точно заданную длину, определяемую механизмом, показанным на рис. 3.33, а.

кромоллекулы. В подобных случаях часть необходимой для сборки информации предоставляется специальными ферментами и другими белками, которые выполняют функцию матриц, направляющих построение по должному пути, но никоим образом не присутствующих в окончательно собранной структуре.

Даже относительно простым структурам может не хватать некоторых компонентов, необходимых для их сборки. Например, при образовании некоторых бактериальных вирусов головка, которая состоит из множества копий одной белковой субъединицы, собирается на временном каркасе, состоящем из другого белка. Поскольку второй белок отсутствует в конечной вирусной частице, головка не

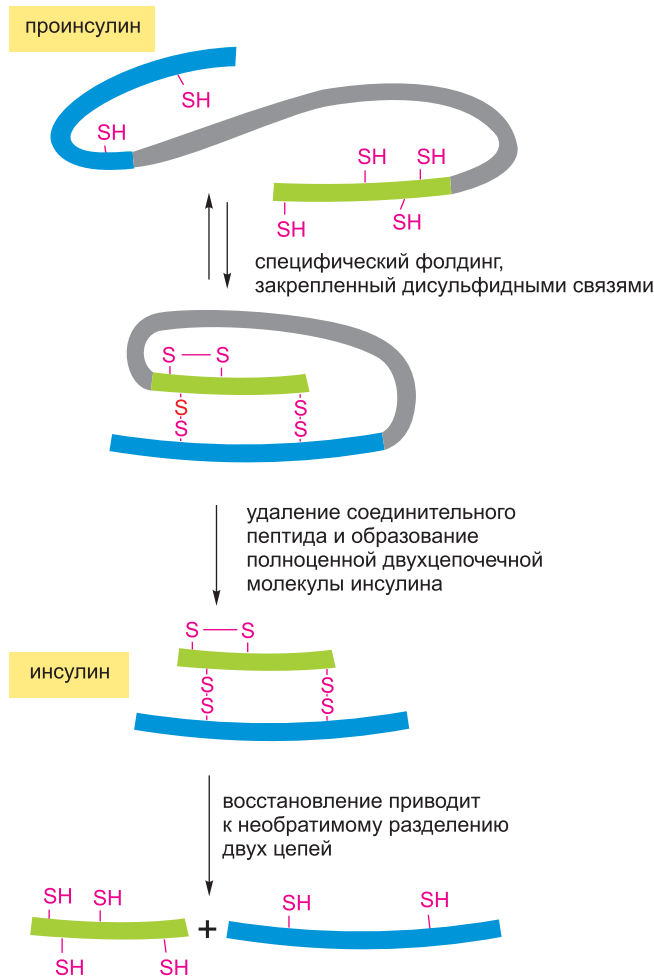


Рис. 3.35. Протеолитическое расщепление при сборке инсулина. Полипептидный гормон инсулин не может самопроизвольно осуществлять эффективную повторную сборку после разрушения его дисульфидных связей. Он синтезируется в виде крупного белка (*проинсулина*), который расщепляется протеолитическим ферментом, после того как белковая цепь свернется и примет специфическую форму. При вырезании части полипептидной цепи проинсулина удаляется и часть информации, необходимая для самопроизвольного сворачивания белка в его естественную конформацию. Как только инсулин будет денатурирован, его две полипептидные цепи отделятся одна от другой и способность к повторной сборке будет утрачена.

может самопроизвольно собраться вновь, если была разрушена. Известны и другие примеры, в которых протеолитическое расщепление является существенным и необратимым шагом в естественном процессе сборки. Это относится даже к некоторым малым белковым сборкам, в том числе к структурному белку коллагену и гормону инсулину (рис. 3.35). Из этих относительно простых примеров становится очевидно, что сборка такой сложной структуры, как например, митохондрия или ресничка, предполагает временное и пространственное упорядочение, сообщаемое ей множеством других компонентов клетки.

Заключение

Трехмерная конформация молекулы белка определяется ее аминокислотной последовательностью. Ее свернутая структура стабилизируется нековалентными взаимодействиями между различными частями полипептидной цепи. Аминокислоты с гидрофобными боковыми цепями тяготеют к образованию кластеров внутри молекулы, а локальные взаимодействия на основе водородных связей между соседними пептидными связями дают начало α -спиралям и β -листам.

Глобулярные области, известные под названием домены, служат модульными единицами, из которых строятся многие белки; такие домены обычно содержат 40–350 аминокислот. Малые белки, как правило, состоят только из одного-единственного домена, тогда как крупные белки образованы из нескольких доменов, соединенных друг с другом участками полипептидной цепи различной длины, при этом некоторые из таких областей могут быть относительно неупорядочены. В ходе эволюции белков домены видоизменялись и по-новому сочетались с другими доменами, в результате чего появлялись новые белки. К настоящему времени известно приблизительно 800 различных способов укладки доменов для более 20 000 известных белковых структур.

Белки объединяются в крупные структуры с помощью таких же некова-

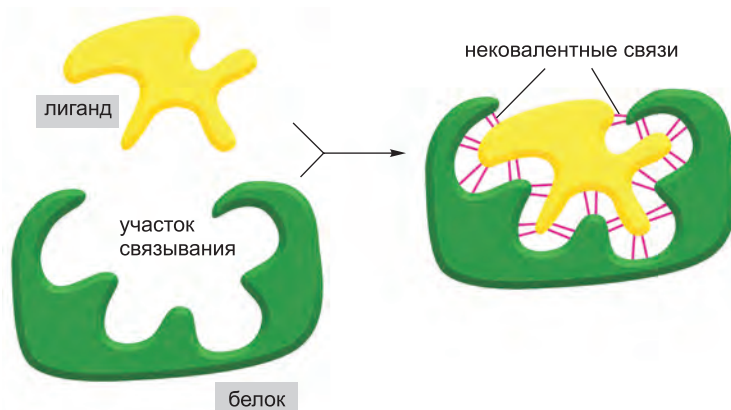


Рис. 3.36. Избирательное связывание белка с другой молекулой. Чтобы белок мог прочно связаться с другой молекулой, которая служит для него *лигандом*, необходимо образование большого числа слабых связей. Поэтому лиганд должен точно вписываться в участок связывания белка, как, скажем, рука входит в перчатку, с тем чтобы между белком и лигандом могло образоваться большое число нековалентных связей.

лентных взаимодействий, что и те, которые определяют сворачивание белка. Белки с участками связывания, настроенными на их собственную поверхность, могут собираться в димеры, замкнутые кольца, сферические оболочки или спиралеподобные полимеры. Хотя, как было показано, в пробирке смеси белков и нуклеиновых кислот способны самопроизвольно собираться в сложные структуры, многие биологические процессы сборки включают необратимые события. В силу этого не все клеточные структуры способны самопроизвольно воссоединяться после разделения их на составные части.

3.2. Функция белка

Как мы могли убедиться, белок каждого определенного типа состоит из точно заданной последовательности аминокислот, которая позволяет ему сворачиваться в специфическую трехмерную структуру, или конформацию. Но белки отнюдь не являются жесткими кусками материала. Чаще всего они имеют искусно сработанные подвижные органы, механические действия которых сопряжены с химическими процессами. Именно эта взаимосвязь — химии и движения — придает белкам их необыкновенные способности, которые лежат в основе динамических процессов, протекающих в живых клетках.

В данном параграфе мы объясняем механизм избирательного связывания белков с другими молекулами и разъясняем, как активность первых зависит от связывания с последними. Мы показываем, что способность связываться с другими молекулами позволяет белкам выполнять функции катализаторов, сигнальных рецепторов, переключателей, двигателей или крошечных насосов. Примеры, которые мы разбираем в этой главе, ни в коем случае не исчерпывают обширный функциональный репертуар белков. Внимательный читатель не упустит из вида множества упоминаний о специализированных функциях многих других белков, основанных на подобных принципах.

3.2.1. Всем белкам предначертана связь с другими молекулами

Биологические свойства любой молекулы белка определяются ее физическим взаимодействием с другими молекулами. Так, антитела прикрепляются к вирусам или бактериям и тем самым «метят» их для разрушения; фермент гексокиназа связывает глюкозу и АТФ, чтобы катализировать реакции между ними; молекулы актина связываются друг с другом и собираются тем самым в актиновые филаменты, и тому подобное. И в самом деле, все белки слипаются, или *связываются*, с другими молекулами. В одних случаях такое связывание очень прочное, в других оно слабое и недолговечное. Но взаимодействия подобного рода всегда отличает высокая *специфичность* — в том смысле, что обычно молекула белка может связать только одну или несколько молекул из многих тысяч различных видов молекул, с которыми она сталкивается. Вещество, которое связано белком, — будь оно ионом, какой-либо маленькой молекулой или макромолекулой, скажем, другого белка, — является **лигандом** этого белка (от латинского слова *ligare*, означающего, «связываться»).

Способность белка связывать лиганд избирательно и с высокой степенью сродства определяется набором группы слабых нековалентных связей: водородных связей, электростатических взаимодействий и ван-дер-ваальсовых сил, — а также благоприятных гидрофобных взаимодействий (см. приложение 2.3, **стр. 110–111**).

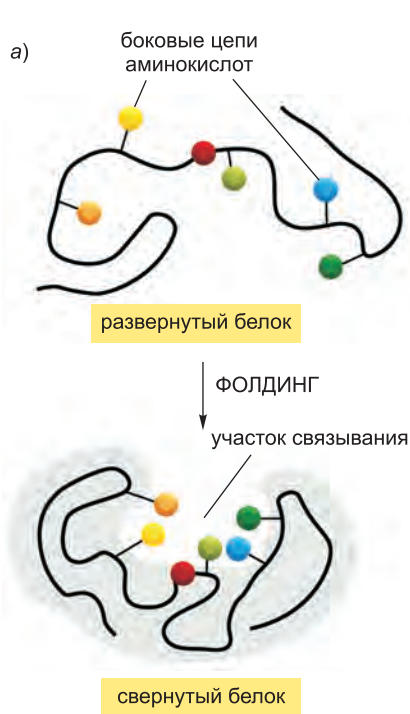
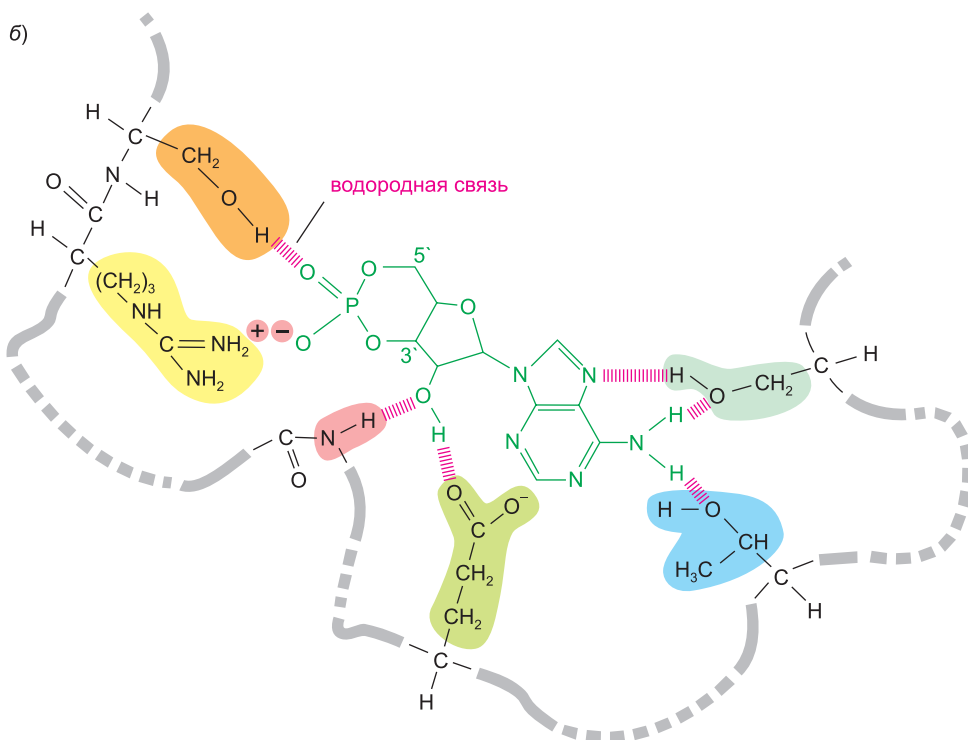


Рис. 3.37. Участок связывания белковой молекулы. а) В результате фолдинга полипептидной цепи обычно образуется бороздка, или углубление, на поверхности белка. Такая бороздка содержит группу аминокислот, боковые цепи которых расположены таким образом, что могут образовывать нековалентные связи лишь с определенными лигандами. б) Крупный план реального участка связывания, на котором показаны водородные связи и электростатические взаимодействия между белком и его лигандом. В данном примере связан лиганд представлен циклическим AMP (сAMP).



Поскольку каждая отдельная связь слаба, эффективное связывание возникает только тогда, когда одновременно образуется большое число таких связей. Такое связывание возможно только в том случае, если контуры поверхности молекулы лиганда полностью соответствуют поверхности белковой молекулы, в результате чего они настолько хорошо прилегают одна к другой, как выбранная по размеру перчатка к руке (**рис. 3.36**).

Область белка, которая непосредственно соединяется с лигандом, известна в научных кругах под названием *участка связывания* (сайта связывания) лиганда и обычно состоит из углубления в поверхности белка, образуемого за счет специфического расположения аминокислот. Эти аминокислоты могут принадлежать к разным частям полипептидной цепи, которые сблизились друг с другом в результате фолдинга белка (**рис. 3.37**). На разнесенных друг от друга областях белковой поверхности, как правило, формируются участки связывания разных лигандов, что позволяет регулировать активность белка, как мы увидим чуть позже. Остальные части белка, можно сказать, играют роль манипулятора, необходимого для надлежащего размещения белка в клетке, — примером служит уже рассматривавшийся нами домен SH2, который во многих случаях в ответ на специфические сигналы перемещает белок, его содержащий, в определенные области внутри клетки.

Хотя атомы, находящиеся во внутренних областях белковой молекулы, не имеют прямого контакта с лигандом, они формируют каркас, который придает поверхности ее очертания и обуславливает ее химические и механические свойства. Даже небольшие изменения аминокислот во внутренних областях белковой молекулы

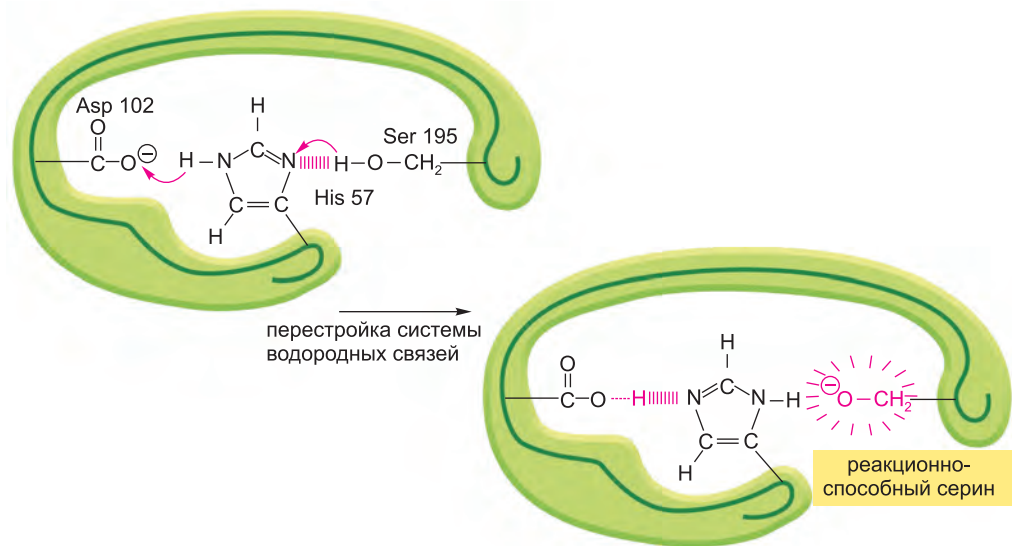


Рис. 3.38. Аминокислота, проявляющая необычайно высокую реакционную способность в активном участке фермента. Данный пример относится к так называемой «каталитической триаде», свойственной химотрипсину, эластазе и другим сериновым протеазам (см. **рис. 3.12**). Боковая цепь аспарагиновой кислоты (Asp 102) возбуждает гистидин (His 57), который забирает протон у серина (Ser 195). Эти действия активируют серин, получающий способность образовывать ковалентную связь с субстратом фермента, гидролизую при этом пептидную связь. На рисунке не показаны многочисленные изгибы полипептидной цепи.

способны изменить ее пространственную структуру достаточно сильно — вплоть до разрушения участка связывания.

3.2.2. Химия белка определяется его поверхностной конформацией

Белки обладают удивительными химическими свойствами, потому что соседствующие химические группы на их поверхности часто взаимодействуют таким образом, что химическая активность боковых цепей аминокислот возрастает. Такого рода взаимодействия можно подразделить на две основные категории.

Во-первых, взаимодействие соседних частей полипептидной цепи может ограничить доступ молекул воды к участкам связывания лиганда этого белка. Это важно, потому что молекулы воды легко образуют водородные связи и могут конкурировать с лигандами за участки на поверхности белка. Белки и их лиганды формируют более прочные водородные связи (и электростатические взаимодействия), если молекул воды нет на участках связывания. Возможно, не так просто представить себе механизм, который исключал бы связывание с поверхностью белка столь малой молекулы, как молекула воды, и не препятствовал бы при этом доступу самого лиганда к этой поверхности. Тем не менее из-за сильного стремления молекул воды к образованию водородных связей друг с другом эти молекулы существуют в виде протяженной сети, стянутой водородными связями (см. приложение 2.2, стр. 108–109). Благодаря этому белок может сохранять лиганд-связывающий сайт «сухим», потому что в энергетическом отношении процесс отрыва молекул воды от водной сети — а именно это им пришлось бы совершить, чтобы проникнуть в бороздку на поверхности белка, — не является благоприятным.

Во-вторых, определенное группирование соседних полярных боковых цепей аминокислот может изменить их реакционную способность. Например, если в результате фолдинга в одной из областей белка сосредоточивается ряд аминокислот с отрицательно заряженными боковыми цепями, то, несмотря на их взаимное отталкивание, сродство такого участка к положительно заряженному иону много-

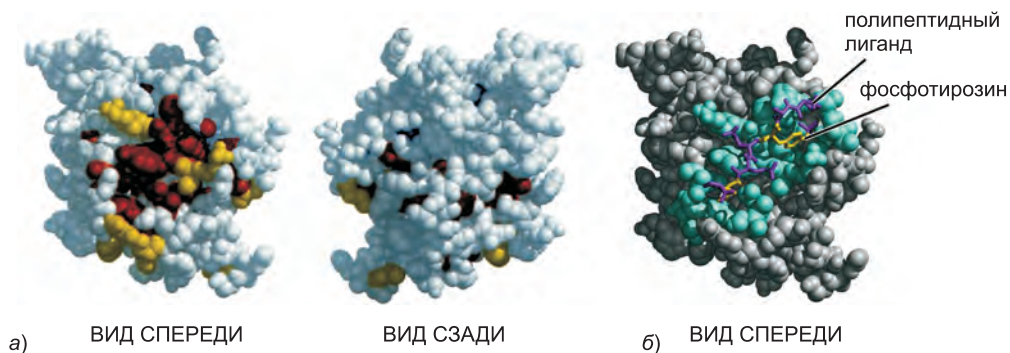


Рис. 3.39. Применение метода эволюционного следа к домену SH2. а) Вид спереди и сзади на объемной модели домена SH2, где эволюционно консервативные аминокислоты на поверхности белка окрашены желтым, а ближе к сердцевине белка — красным. б) Структура домена SH2 со связанным им полипептидом. Здесь аминокислоты, расположенные в пределах 0,4 нм от связанного лиганда, окрашены голубым. Две ключевые аминокислоты лиганда желтые, а все остальные — фиолетовые. Обратите внимание на высокую степень соответствия между структурами, изображенными на видах а и б. (Переработано на основе иллюстраций из О. Lichtarge, H. R. Bourne and F. E. Cohen, *J. Mol. Biol.* 257: 342–358, 1996. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

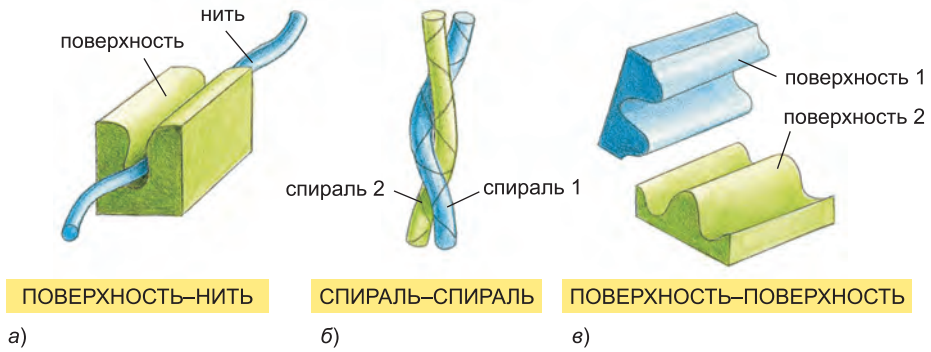


Рис. 3.40. Три возможных способа, которыми два белка могут связываться друг с другом. Показаны только взаимодействующие части двух таких белков. а) Жесткая поверхность одного белка может связаться с развернутой петлей полипептидной цепи («нити») второго белка. б) Две α-спирали могут связаться друг с другом путем образования витой биспирали. в) Две взаимно дополняющие друг друга (комплементарные) жесткие поверхности часто удерживают два белка вместе.

кратно усиливается. Кроме того, когда боковые цепи аминокислот взаимодействуют друг с другом через водородные связи, обыкновенно неактивные боковые группы (такие как $-\text{CH}_2\text{OH}$ серина, показанного на [рис. 3.38](#)) могут стать реакционно-способными, что позволяет им участвовать в образовании или разрушении определенных ковалентных связей.

Поэтому поверхность любой белковой молекулы обладает неповторимой совокупностью химических свойств, которая зависит не только от того, боковые цепи каких аминокислот смотрят наружу, но также и от их точной взаимной ориентации. По этой причине две даже слегка отличающиеся конформации одной и той же белковой молекулы могут разительно отличаться по химическим свойствам.

3.2.3. Ключевые участки связывания лигандов можно выявить при сравнении аминокислотных последовательностей белков, входящих в одно семейство

Как было сказано ранее, последовательности генома позволяют нам группировать многие белковые домены по семействам, в пределах которых явно прослеживается их эволюция от общего предка. Трехмерные структуры членов одного и того же семейства доменов поразительно похожи. Например, даже когда идентичность аминокислотных последовательностей снижается до 25%, укладка атомов в остоле полипептидной цепи домена подчиняется общей закономерности в пределах 0,2 нанометров (2 Å).

Поэтому для идентификации в белковом домене тех участков, которые наиболее значимы для функции этого домена, мы можем использовать метод «эволюционного следа» (evolutionary tracing). Для этой цели на модель трехмерной структуры одного из членов семейства наносят те аминокислоты, которые остались неизменившимися (инвариантными) или почти неизменившимися во всех известных членах этого семейства белков. В результате, наиболее инвариантные позиции, как правило, образуют один или несколько кластеров на поверхности белка, что можно видеть на [рис. 3.39, а](#), где изображен домен SH2, описанный ранее (см. приложение 3.2, [стр. 132–133](#)). Эти кластеры обычно и соответствуют участкам

связывания лигандов.

Домен SH2 служит модулем, который участвует в межбелковых взаимодействиях. Он связывает белок, его содержащий, со следующим белком, который содержит боковую цепь фосфорилированного тирозина в окружении определенной аминокислотной последовательности, как показано на рис. 3.39, б. Аминокислоты, расположенные на участке связывания фосфорилированных полипептидов, как оказалось, изменялись медленнее всего в течение длительного эволюционного процесса, который дал многочисленное семейство пептид-узнающих SH2-доменов. Поскольку мутация — случайное событие, этот результат приписывают предпочтительному устранению в ходе эволюции всех тех организмов, у которых домены SH2 изменялись таким образом, что пептид-связывающий участок терял активность, и, таким образом, нарушалась сама функция SH2-домена.

В нашу эру интенсивного секвенирования геномов открыто много новых семейств белков, функции которых неизвестны. Как только удастся определить трехмерную структуру одного из членов семейства, метод «эволюционного следа» позволяет биологам определить участки связывания у остальных членов этого семейства, помогая тем самым расшифровать функции этих белков.

3.2.4. Одни белки связываются с другими белками через контактные поверхности нескольких типов

Белки способны связываться с другими белками по крайней мере тремя способами. Во многих случаях часть поверхности одного белка («замок») входит в контакт с распрямленной петлей полипептидной цепи («ключ») на втором белке (рис. 3.40, а). Такое взаимодействие типа ключ—замок позволяет, например, домену SH2 опознавать фосфорилированную полипептидную петлю второго белка, как только что было описано, или протеинкиназе — белки, которые ей предстоит фосфорилировать (смотрите ниже).

Межбелковое соединение второго типа образуется, когда две α -спирали, по одной от каждого белка, спариваются одна с другой с образованием витой суперспирали (рис. 3.40, б). Межбелковый стык такого типа встречается в нескольких семействах ген-регулирующих белков, о чем мы расскажем в главе 7.

Наиболее распространенным способом контактного взаимодействия белков, однако, является точное соответствие одной жесткой поверхности другой (рис. 3.40, в). Такое взаимодействие может быть достаточно сильным, так как между двумя точно пригнанными одна к другой поверхностями может образоваться большое число слабых связей. По той же причине такие межповерхностные взаимодействия могут быть чрезвычайно специфичными, что позволяет белку выбирать лишь одного партнера из многих тысяч различных белков клетки.

3.2.5. Особым многообразием отличаются участки связывания антител

Для того чтобы выполнять разнообразные функции, каждый белок должен связываться с определенным лигандом. Семейство антител примечательно тем, что все его члены обладают способностью к сильному избирательному связыванию (рассматривается подробно в главе 25).

Антитела, или иммуноглобулины, представляют собой белки, производимые иммунной системой в ответ на появление чужеродных молекул, например, тех, что

находятся на поверхности вторгшегося микроорганизма. Каждое антитело прочно связывается с определенной целевой молекулой, тем самым или инактивируя ее напрямую, или помечая для разрушения. Всякое антитело распознает свою мишень (называемую **антигеном**) с удивительной специфичностью. Поскольку возможно существование миллиардов различных антигенов, с которыми люди сталкиваются в жизни, наш организм должен быть готов произвести миллиарды различных антител.

Антитела представляют собой Y-образные молекулы с двумя идентичными участками связывания, которые комплементарны небольшой части поверхности молекулы антигена. Подробный анализ участков связывания антигенов на антителах показывает, что они сформированы несколькими петлями полипептидной цепи, которые выступают по концам пары близко совмещенных белковых доменов (**рис. 3.41**). Огромное многообразие участков связывания антигенов различными антителами обусловлено всего лишь изменениями длины и аминокислотной последовательности этих петель, без изменения основной структуры белка.

Петли такого рода идеальны для того, чтобы захватывать другие молекулы. Они позволяют окружать лиганд большим числом химических групп, с тем чтобы белок

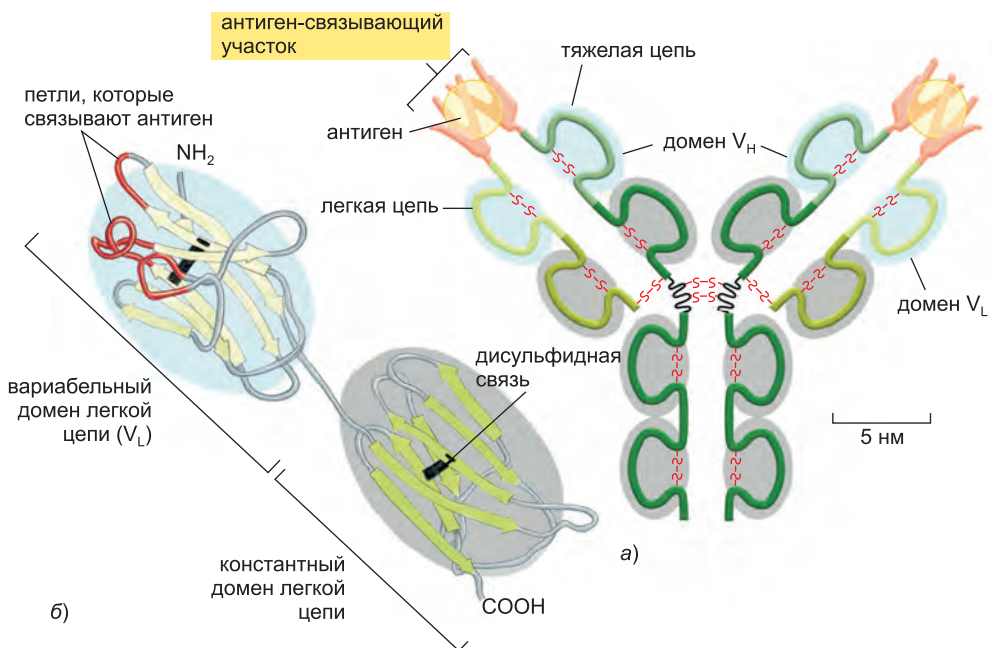


Рис. 3.41. Молекула антитела. *а)* Типичная молекула антитела имеет Y-образную форму с двумя идентичными участками связывания своего антигена – по одному на каждом плече Y-образной структуры. Этот белок состоит из четырех полипептидных цепей (двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных и меньших легких цепей), скрепленных вместе дисульфидными связями. Каждая цепь состоит из нескольких различных доменов иммуноглобулина, помещенных на данном рисунке на голубой или серый фон. Антиген-связывающий участок образуется в том месте, где переменный (изменчивый) домен тяжелой цепи (V_H) и переменный домен легкой цепи (V_L) сближены друг с другом. Последовательности и структуры именно этих доменов отличаются в различных антителах. Каждый из доменов на концах плеч молекулы антитела образует петли, которые связываются с антигеном. На виде *б* мы можем видеть эти подобные пальцам петли (красные), выдающиеся из домена V_L .

мог связаться с ним посредством многочисленных слабых связей. По этой причине лиганд-связывающие участки белков часто формируются именно из петель.

3.2.6. Мерой силы связывания служит константа равновесия

Молекулы в клетке очень часто наталкиваются друг на друга из-за непрерывного беспорядочного теплового движения. Сталкивающиеся молекулы, поверхности которых «не вписываются» друг в друга, образуют между собой небольшое число нековалентных связей и расходятся столь же скоро, сколь быстро они сошлись. Другая крайность — когда между двумя сталкивающимися молекулами образуется много нековалентных связей и их союз может существовать довольно длительное время (рис. 3.42). Сильные взаимодействия в клетках возникают всякий раз, когда биологическая функция требует, чтобы молекулы оставались взаимосвязанными в течение продолжительного промежутка времени, например, когда группа молекул РНК и молекул белка собирается воедино с образованием субклеточной структуры наподобие рибосомы.

Мы можем измерить силу, с которой любые две молекулы связываются друг с другом. В качестве примера рассмотрим популяцию идентичных молекул антител, которая внезапно сталкивается с популяцией лигандов, диффундирующих в окружающей антитела жидкости. При этом с определенной частотой одна из молекул лиганда будет врезаться в участок связывания на антителе и будет образовываться комплекс антитело—лиганд. Так что популяция комплексов антитело—лиганд будет расти, но не беспредельно: через какое-то время начнет превалировать второй процесс, в ходе которого отдельные комплексы будут распадаться из-за теплового движения. В конечном счете всякая популяция молекул антитела и лиганда достигнет устойчивого состояния, или равновесия, при котором число событий ассоциации в секунду в точности равно числу событий диссоциации (см. рис. 2.52).

По известным концентрациям лиганда, антитела и комплекса антитело—лиганд в состоянии равновесия мы можем рассчитать параметр, который позволяет оценить силу связывания антитела с лигандом, — **константу равновесия (K)** (рис. 3.43, а). Константа равновесия реакции, в которой две молекулы (А и В) связываются друг с другом с образованием комплекса (АВ), выражается в единицах литр/моль и означает, что половина участков связывания будет занята лигандом, когда концентрация этого лиганда (в моль/литр) достигнет значения, равного $1/K$. Определенная таким образом константа равновесия тем больше, чем больше сила связывания, и служит прямой мерой разности свободной энергии между связанным и свободным состояниями системы (рис. 3.43, б и в). Изменение даже нескольких нековалентных связей может оказать значительное влияние на взаимодействие, как показано в примере на рис. 3.44. (Следует иметь в виду, что константа равновесия, соответствующая данному нами определению, известна также как константа аффинности, или константа сродства, K_a .)

Мы обратились к случаю связывания антитела со своим лигандом, дабы проиллюстрировать влияние силы связывания на константу равновесия, но те же самые принципы относятся к любой другой молекуле и ее лиганду. Многие белки являются ферментами, которые, как мы теперь говорим, сначала связываются со своими лигандами, а затем катализируют разрыв или образование ковалентных связей в этих молекулах.

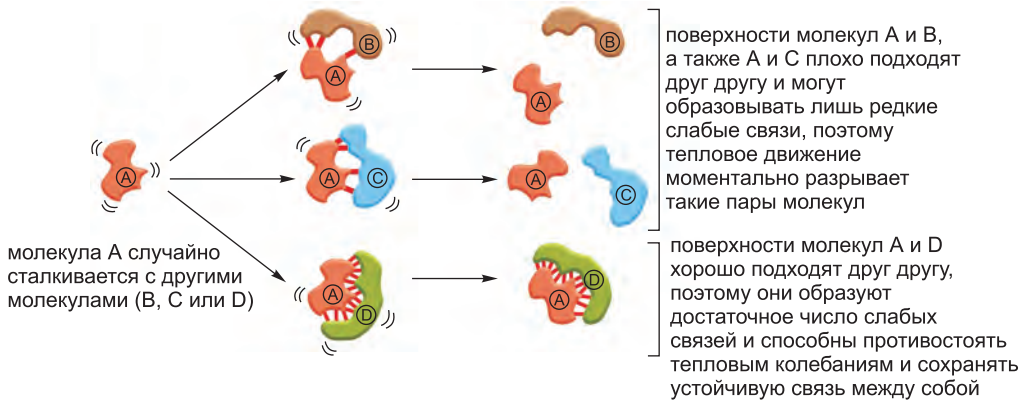


Рис. 3.42. Как нековалентные связи опосредуют взаимодействие между макромолекулами.

3.2.7. Ферменты — высокоспецифичные катализаторы

Многим белкам для исполнения предписанных им ролей достаточно просто связаться с некоторой другой молекулой. Например, молекуле актина необходимо всего лишь объединиться с другими молекулами актина, чтобы образовать филамент. Есть, однако, и иные белки, для которых связывание лиганда является лишь необходимым отправным шагом в процессе осуществления своей функции. Это относится к большому и очень важному классу белков, названных **ферментами**. Как было описано в главе 2, ферменты суть удивительные молекулы, обслуживающие все химические превращения, в ходе которых образуются и разрушаются ковалентные связи в клетках. Они связываются с одним или несколькими лигандами, названными **субстратами**, и превращают их в один или несколько химически модифицированных *продуктов*, делая это много раз и с поразительной скоростью. Ферменты ускоряют реакции, часто в миллион и более раз, а сами при этом не претерпевают никаких изменений, то есть они действуют как **катализаторы**, которые позволяют клеткам создавать или разрушать ковалентные связи управляемым способом. Именно благодаря осуществляемому ферментами катализу упорядоченного набора химических реакций клетки поддерживают свою жизнедеятельность, и жизнь становится возможной.

Мы можем подразделить ферменты на классы согласно выполняемым им функциям, по подобию химических реакций (**таблица 3.1**). Каждый фермент в пределах такого класса характеризуется высокой специфичностью, катализируя реакции только одного типа. Так, *гексокиназа* присоединяет фосфатную группу к D-глюкозе, но игнорирует оптический изомер последней — L-глюкозу; фермент свертывания крови *тромбин* разрезает пептидную связь только в одном типе белка крови и нигде более, и так далее. Как было подробно описано в главе 2, ферменты работают в команде, где продукт одного фермента становится субстратом для следующего. В результате столь слаженного взаимодействия возникает сложнейшая сеть метаболических путей, которая снабжает клетку энергией и поставляет все многообразие больших и малых молекул, необходимых клетке для жизни (см. **рис. 2.35**).

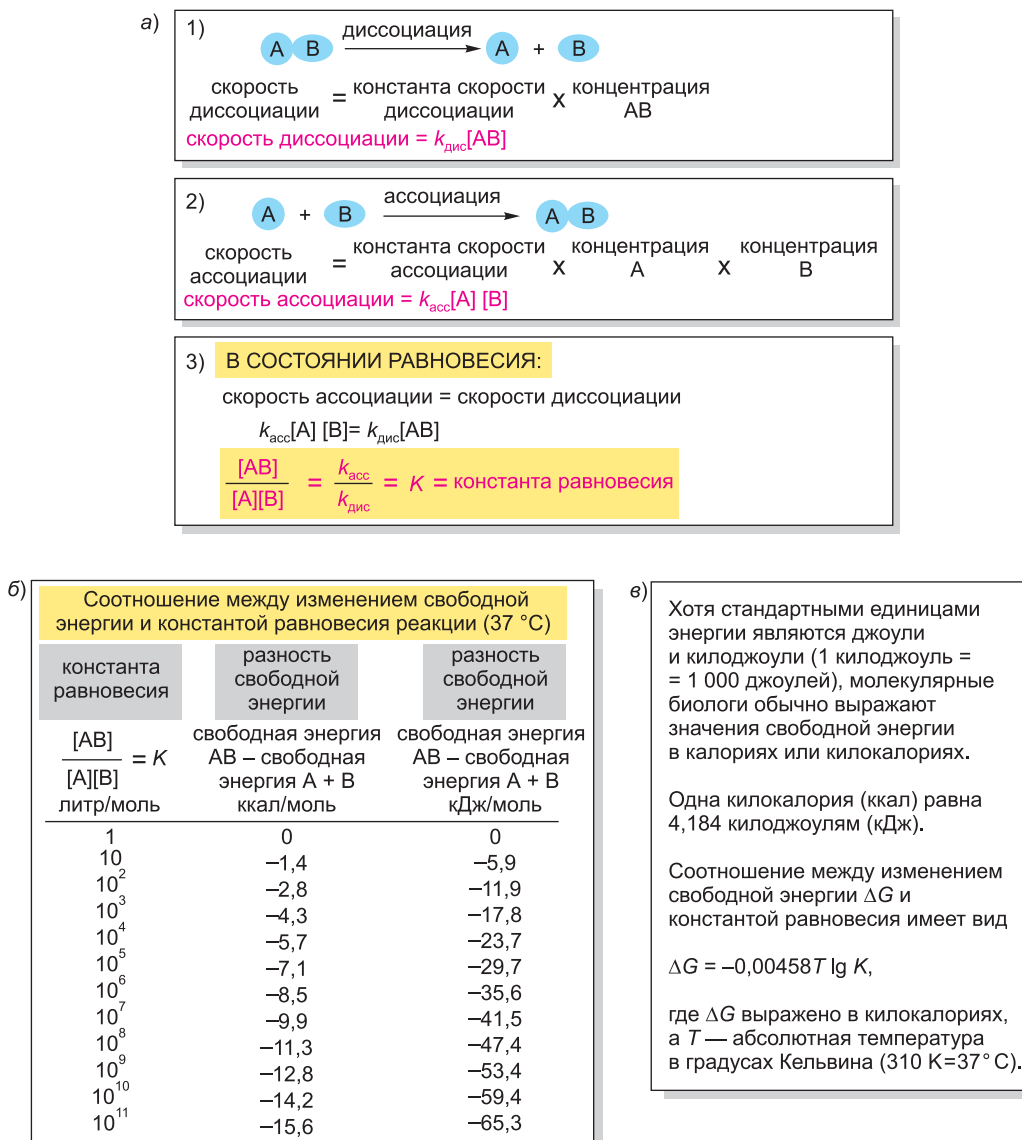


Рис. 3.43. Взаимосвязь энергии связи и константы равновесия для реакции ассоциации. а) Равновесие между молекулами А и В и комплексом АВ поддерживается равновесием между двумя взаимно обратными реакциями, представленными на панелях 1 и 2. Молекулы А и В, чтобы прореагировать друг с другом, должны столкнуться, и поэтому скорость их ассоциации пропорциональна произведению их концентраций [А]·[В]. (Квадратные скобки обозначают концентрацию.) Как показано на панели 3, отношение констант скорости для реакций ассоциации и диссоциации равно константе равновесия (K) этой реакции. б) Константа равновесия на панели 3 относится к реакции $A + B \leftrightarrow AB$, и чем больше ее величина, тем сильнее связывание между А и В. Обратите внимание, что на каждые 1,41 ккал/моль (5,91 кДж/моль) уменьшения свободной энергии константа равновесия возрастает в 10 раз (при 37 °C). В данном случае константа равновесия выражена в единицах литр/моль: для простых взаимодействий по типу связывания ее называют также *константой сродства*, или *константой аффинности*, и обозначают K_d . Обратную ей величину называют константой диссоциации K_d (в единицах моль/литр).

Рис. 3.44. Небольшие изменения в числе слабых связей могут оказать сильное влияние на взаимодействие. Данный пример иллюстрирует биологический смысл математических выкладок по влиянию числа присутствия или отсутствия нескольких слабых нековалентных связей.

3.2.8. Первый шаг ферментативного катализа — связывание субстрата

Для белка, который катализирует ту или иную химическую реакцию (т. е. для фермента), связывание молекулы субстрата является необходимой прелюдией. В простейшем случае, если мы обозначим фермент буквой E, субстрат — буквой S, а продукт — буквой P, то основной путь протекания реакции примет вид $E + S \rightarrow ES \rightarrow EP \rightarrow E + P$. Отсюда

следует, что одна молекула фермента может «обработать» за данное время ограниченное количество субстрата. Увеличение концентрации субстрата увеличивает и скорость, с которой образуется продукт, но до какого-то максимального значения (рис. 3.45). В этой точке молекула фермента насыщается субстратом и скорость реакции (V_{\max}) зависит только от того, сколь быстро фермент может обработать молекулу субстрата. Эта максимальная скорость, поделенная на концентрацию фермента, носит название *числа оборотов*. Число оборотов часто равно приблизительно 1000 молекул субстрата в секунду, обрабатываемых одной молекулой фермента, хотя известны и другие значения — от 1 до 10000.

Другой кинетический параметр, часто используемый для характеристики фермента, — это K_m — концентрация субстрата, при которой скорость реакции равна половине ее максимальной скорости ($0,5 V_{\max}$) (см. рис. 3.45). Низкое значение K_m означает, что фермент достигает максимальной каталитической скорости при *низкой концентрации* субстрата, и обычно указывает на то, что этот фермент связывается со своим субстратом очень сильно, тогда как *высокое* значение K_m соответствует слабому связыванию³. Методы, применяемые для характеристики ферментов подобным образом, расписаны в **приложении 3.3 (стр. 162–163)**.

3.2.9. Ферменты ускоряют реакции за счет избирательной стабилизации переходных состояний

Ферменты достигают чрезвычайно высоких скоростей химических реакций — скоростей, которые намного выше, чем у синтетических катализаторов. Есть несколько причин такой эффективности. Во-первых, фермент увеличивает локальную

Допустим, что в эукариотической клетке находится 1 000 молекул вещества А и 1 000 молекул вещества В. Тогда концентрация обоих веществ составляет около 10^{-9} М.

Если константа равновесия (K) реакции $A + B \leftrightarrow AB$ будет равна 10^{10} , то, как показывают вычисления, в состоянии равновесия в клетке будет находиться

270 молекул	270 молекул	730 молекул
A	B	AB

Если константа равновесия немного меньше и составляет 10^8 , что означает уменьшение энергии связи в сравнении с предыдущим примером на 2,8 ккал/моль и, как следствие, утрату 2–3 водородных связей в комплексе А–В, то в состоянии равновесия в клетке будет содержаться

915 молекул	915 молекул	85 молекул
A	B	AB

³ Строго говоря, низкое значение K_m означает, что фермент катализирует превращение данного субстрата быстро, тогда как высокое значение K_m соответствует медленному каталитическому процессу. Иногда просто говорят «быстрая» и «медленная» реакция. — Прим. ред.

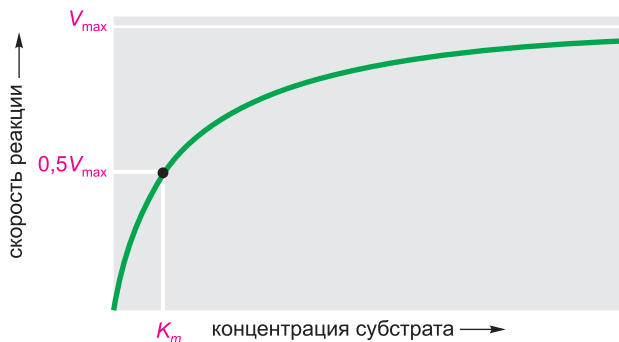
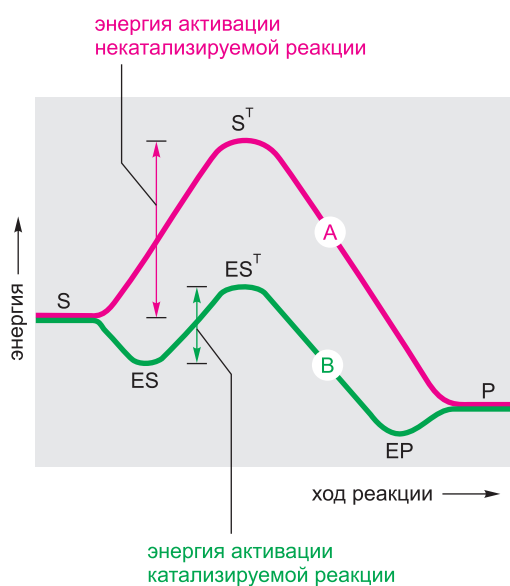


Рис. 3.45. Ферментативная кинетика. С увеличением концентрации субстрата скорость ферментативной реакции (V) возрастает до тех пор, пока не будет достигнуто максимальное значение (V_{\max}). В этой точке все связывающие субстрат участки на молекулах фермента полностью заняты и скорость реакции ограничивается скоростью каталитического процесса на поверхности фермента. Для большинства ферментов концентрация субстрата (K_m), при которой скорость

реакции равна половине от максимально возможной (отмечена черной точкой), служит мерой того, насколько хорошо фермент связывает субстрат, причем большая величина K_m соответствует слабому связыванию.

концентрацию молекул субстрата на каталитическом участке и удерживает все необходимые атомы в правильной для протекания намеченной реакции ориентации. Но что еще важнее, часть энергии связывания вносит прямой вклад в катализ. Молекулы субстрата должны пройти через ряд промежуточных состояний со своей слегка изменяющейся геометрией и своим распределением электронов, прежде чем из них образуются конечные продукты реакции. Свободную энергию, необходимую для достижения наиболее неустойчивого **переходного состояния**, называют *энергией активации* этой реакции, и это главная определяющая скорости реакции. Ферменты обладают намного более высоким сродством к переходному состоянию субстрата, чем к его устойчивой форме. Поскольку это сильное связывание значительно снижает энергию переходного состояния, фермент намного ускоряет определенную реакцию, понижая ее энергию активации (**рис. 3.46**).

Целенаправленно получая антитела, которые действуют подобно ферментам, мы можем продемонстрировать, что стабилизация переходного состояния



может во много раз увеличить скорость реакции. Рассмотрим, например, гидролиз амидной связи, которая аналогична пептидной связи, соединяющей две соседние аминокислоты в белке. В водном растворе амидная связь очень медленно гидролизует по механизму, показанному на **рис. 3.47, а**. В расположенном в

Рис. 3.46. Ферментативное ускорение химических реакций путем снижения энергии активации. Часто оказывается так, что и некатализируемая реакция *A* и катализируемая ферментом реакция *B* могут проходить через несколько переходных состояний. Именно переходное состояние с наиболее высокой энергией (S^T и ES^T) определяет энергию активации и лимитирует скорость реакции. (S = субстрат; P = продукт реакции; ES = комплекс фермент–субстрат; EP = комплекс фермент–продукт.)

Таблица 3.1. Некоторые распространенные типы ферментов

ФЕРМЕНТ	КАТАЛИЗИРУЕМАЯ РЕАКЦИЯ
Гидролазы	Общее название ферментов, катализирующих реакции гидролитического расщепления; <i>нуклеазы</i> и <i>протеазы</i> суть более специальные названия подклассов таких ферментов.
Нуклеазы	Расщепляют нуклеиновые кислоты, гидролизуя связи между нуклеотидами.
Протеазы	Расщепляют белки, гидролизуя связи между аминокислотами
Синтетазы	Синтез молекул в ходе анаболических реакций путем объединения меньших молекул в более крупные посредством реакции конденсации.
Изомеразы	Перестройка системы связей в пределах молекулы.
Полимеразы	Реакции полимеризации, такие как синтез ДНК и РНК.
Киназы	Присоединение фосфатных групп к молекулам. Протеинкиназы образуют важную группу киназ, присоединяющих фосфатные группы к белкам.
Фосфатазы	Гидролитическое удаление фосфатных групп из молекул.
Оксидоредуктазы	Общее название ферментов, которые катализируют реакции, в ходе которых одна молекула окисляется, а другая — восстанавливается. Часто ферментам данного типа дают более узко-специфические названия: <i>оксидазы</i> , <i>редуктазы</i> или <i>дегидрогеназы</i> .
АТФ-азы	Гидролиз АТФ. Многие белки с широким диапазоном функций обладают энергопреобразующим действием в составе их общей функции, например, моторные белки, такие как <i>миозин</i> , и белки мембранного транспорта, такие как <i>натриево-калиевый насос</i> .

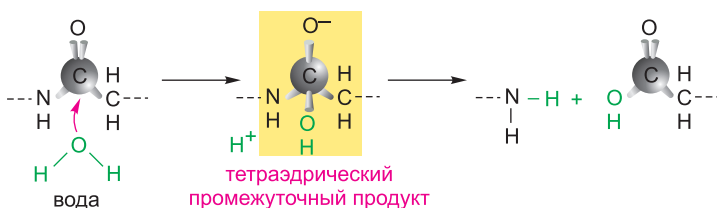
Примечание: названия ферментов обычно оканчиваются на «-азу», за исключением некоторых ферментов, таких как пепсин, трипсин, тромбин и лизоцим, которые были открыты и названы до того, как данная номенклатура стала общепринятой к концу XIX века. Стандартное название любого фермента указывает на его субстрат и (или) природу катализируемой им реакции. Например, *цитратсинтетаза* катализирует *синтез цитрата* в ходе реакции между acetylCoA и оксалоацетатом.

центре промежуточном продукте, или переходном состоянии, карбонильный углерод связан с четырьмя атомами, находящимися в вершинах тетраэдра. Производя моноклональные антитела, которые прочно связываются с устойчивым аналогом этого очень неустойчивого *тетраэдрического промежуточного продукта*, можно получить антитело, которое действует подобно ферменту (рис. 3.47, б). Поскольку такое *каталитическое антитело* связывается с тетраэдрическим промежуточным продуктом и стабилизирует его, оно увеличивает скорость самопроизвольного гидролиза амидной связи более чем в 10000 раз.

3.2.10. Ферменты могут одновременно использовать кислотный и основной катализ

На **рис. 3.48** приведено сравнение скоростей самопроизвольно протекающих реакций со скоростями катализируемых соответствующим ферментом реакций — по пяти ферментам. Степени увеличения скорости изменяются от 10^9 до 10^{23} . Ясно, что ферменты являются намного более совершенными катализаторами, нежели каталитические антитела. Ферменты не только прочно связываются с переходным состоянием, они также содержат точно размещенные атомы, которые изменяют электронные распределения в тех атомах, которые непосредственно участвуют в создании и разрушении ковалентных связей. Пептидные связи, например, можно

а) ГИДРОЛИЗ АМИДНОЙ СВЯЗИ



б) АНАЛОГ ПЕРЕХОДНОГО СОСТОЯНИЯ ПРИ ГИДРОЛИЗЕ АМИДНОЙ СВЯЗИ

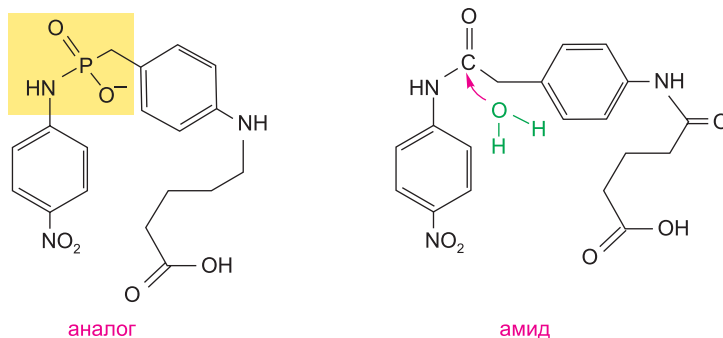


Рис. 3.47. Каталитические антитела. Стабилизируя переходное состояние, антителом становится фермент. а) В ходе реакции гидролиза амидной связи образуется тетраэдрический промежуточный продукт, соответствующий в реакции переходному состоянию с высокой энергией. б) Молекула слева была ковалентно связана с белком и использована в качестве антигена для создания антитела, которое прочно связывается с областью молекулы, показанной желтым. Поскольку это антитело прочно связывается также и с переходным состоянием на виде а, оно, как оказалось, обладает действием фермента, который эффективно катализирует гидролиз амидной связи в молекуле, изображенной справа.

гидролизовать и при отсутствии фермента, подвергая полипептид действию сильной кислоты или сильного основания, как показано на [рис. 3.49](#). Однако в отношении способности одновременно использовать кислотный и основной катализ ферменты уникальны, так как жесткий полипептидный остов связывает кислотные и основные остатки и препятствует их объединению друг с другом (что они сделали бы в растворе) (рис. 3.49, з).

Соответствие между ферментом и его субстратом должно быть абсолютно точным. Небольшое изменение, привнесенное посредством генной инженерии в активный участок фермента, может оказать глубокое воздействие. Например, в одном ферменте замена глутаминовой кислоты аспарагиновой кислотой смещает положение каталитического карбоксильного иона всего лишь на 1 Å (то есть примерно на один радиус атома водорода); и все же этого достаточно, чтобы снизить активность фермента в тысячу раз.

3.2.11. Лизоцим работает как типичный фермент

Чтобы наглядно показать, как ферменты катализируют химические реакции, мы рассмотрим фермент, который служит природным антибиотиком в яичном белке, слюне, слезах и других выделениях. **Лизоцим** катализирует разрезание полисахара-

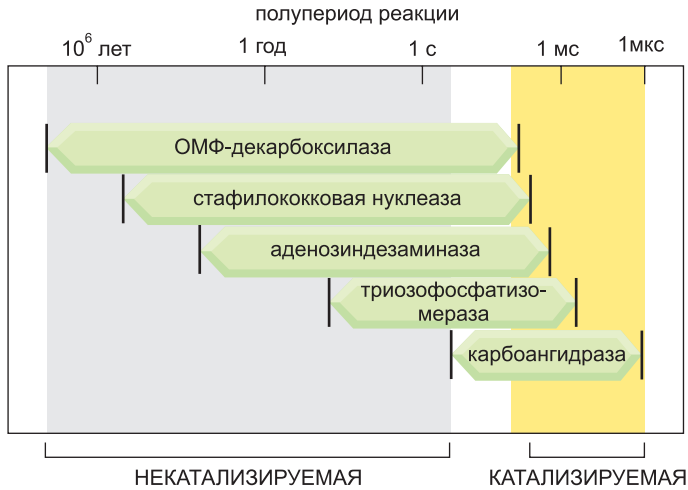


Рис. 3.48. Ускорение реакций ферментами. (Переработано из A. Radzicka and R. Wolfenden, *Science* 267: 90–93, 1995. С любезного разрешения издательства AAAS.)

ридных цепей в клеточных стенках бактерий. Поскольку бактериальная клетка находится под давлением осмотических сил, разрезание даже небольшого числа полисахаридных цепей вызывает разрыв клеточной стенки и разрушение клетки. Лизоцим представляет собой относительно маленький и устойчивый белок, который можно легко выделить в больших количествах. По этим причинам его интенсивно изучали, и он был первым ферментом, структура которого была полностью опреде-

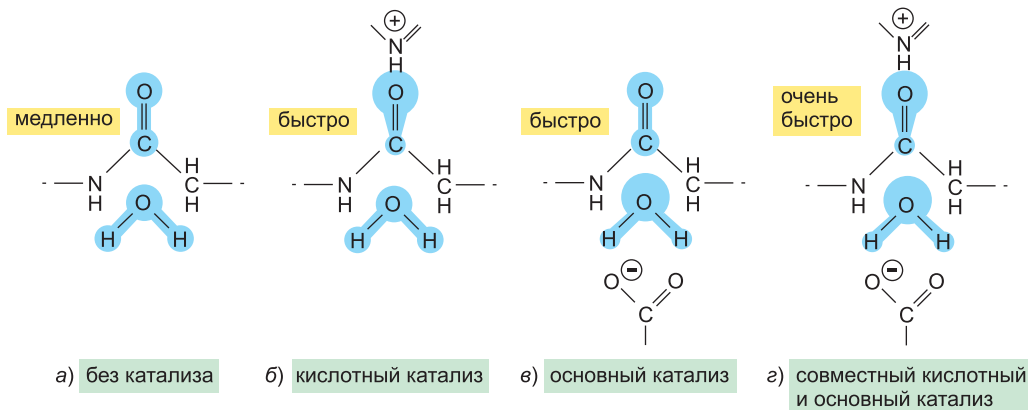


Рис. 3.49. Кислотный и основной катализ. а) Начало некатализируемой реакции, представленной на рис. 3.47, а, где синим показано распределение электронов в молекулах воды и карбонильных связях. б) Кислота стремится отдать протон (H^+) другим атомам. Соединяясь с кислородом карбонильной группы, кислота оттягивает электроны от углерода карбонильной группы, делая этот атом намного более привлекательным для электроотрицательного кислорода вступающей в реакцию молекулы воды. в) Основание стремится отобрать H^+ . Соединяясь с водородом участвующей в реакции молекулы воды, основание побуждает электроны сдвигаться к атому кислорода молекулы воды, делая ее более совершенной реакционной группой по отношению к углероду карбонильной группы. г) За счет особого расположения атомов на своей поверхности фермент способен одновременно осуществлять и кислотный и основной катализ.

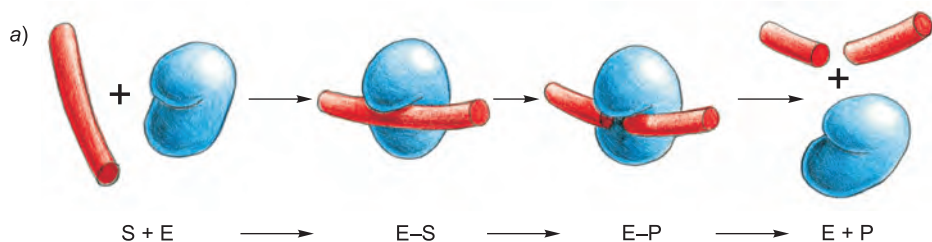
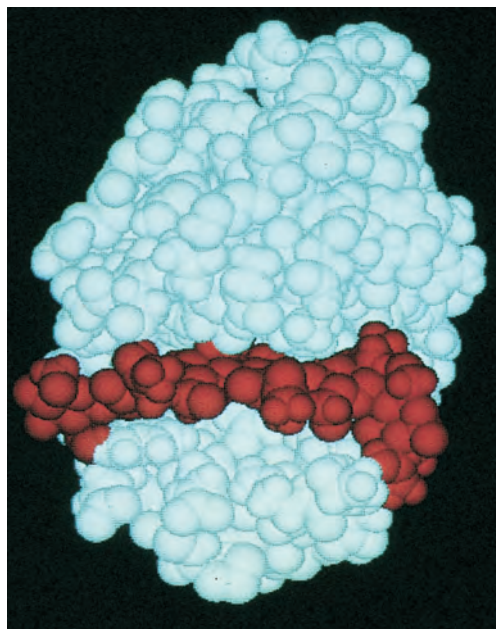


Рис. 3.50. Реакция, катализируемая лизоцимом.

а) Фермент лизоцим (E) катализирует разрезание полисахаридной цепи, которая является его субстратом (S). Этот фермент сначала связывается с цепью с образованием ферментно-субстратного комплекса (E-S) и затем катализирует расщепление определенной ковалентной связи в основной цепи полисахарида, образуя комплекс фермент-продукт (E-P), который быстро диссоциирует. Высвобождение расчлененной цепи (продукты P) освобождает фермент для дальнейшей работы — со следующей молекулой субстрата. б) Пространственная модель молекулы лизоцима, связанного с короткой цепью полисахарида перед ее расщеплением. (Изображение б любезно предоставил R. J. Feldmann.)



лена на атомном уровне методами рентгеновской кристаллографии.

Реакция, которую катализирует лизоцим, относится к гидролизу: он присоединяет молекулу воды к одинарной связи между двумя соседними сахарными группами в полисахаридной цепи, таким образом вызывая разрыв этой связи (см. рис. 2.19). Такая реакция энергетически благоприятна, потому что свободная энергия разъединенной полисахаридной цепи ниже, чем свободная энергия неповрежденной цепи. Однако чистый полисахарид может сохраняться в воде годами, не претерпевая никакого заметного гидролиза. Это связано с тем, что для такой реакции существует энергетический барьер, о чем было сказано в главе 2 (см. рис. 2.46). Молекула воды может разрушить связь, соединяющую два сахара, только в том случае, если молекула полисахарида искажена и пребывает в определенной форме — переходном состоянии, — в котором окружающие эту связь атомы имеют видоизмененную геометрию и иное распределение электронов. Из-за этого искажения энергии активации, получаемой в результате случайных столкновений, становится достаточно для протекания реакции. В водном растворе при комнатной температуре энергия столкновений почти никогда не превышает энергию активации. Вследствие этого гидролиз, если и происходит, то чрезвычайно медленно.

Когда же полисахарид связывается с лизоцимом, положение дел изменяется коренным образом. Активный участок лизоцима (по той причине, что его субстратом

служит полимер) представляет собой длинную бороздку, в которой одновременно удерживается шесть последовательно связанных друг с другом сахаров. Как только полисахарид связывается с образованием фермент-субстратного комплекса, фермент разрезает полисахарид, присоединяя молекулу воды по одной из межуглеводных связей. После этого образовавшиеся олигосахариды быстро высвобождаются, тем самым освобождая фермент для выполнения следующих циклов (рис. 3.50).

Химия связывания лизоцима со своим субстратом та же, что и для антитела со своим антигеном, — образование многочисленных нековалентных связей. Однако лизоцим удерживает полисахаридный субстрат особым образом — так, что он искажает один из двух сахаров, образующих подлежащую уничтожению связь, относительно его нормальной, наиболее устойчивой конформации. Кроме того, эта

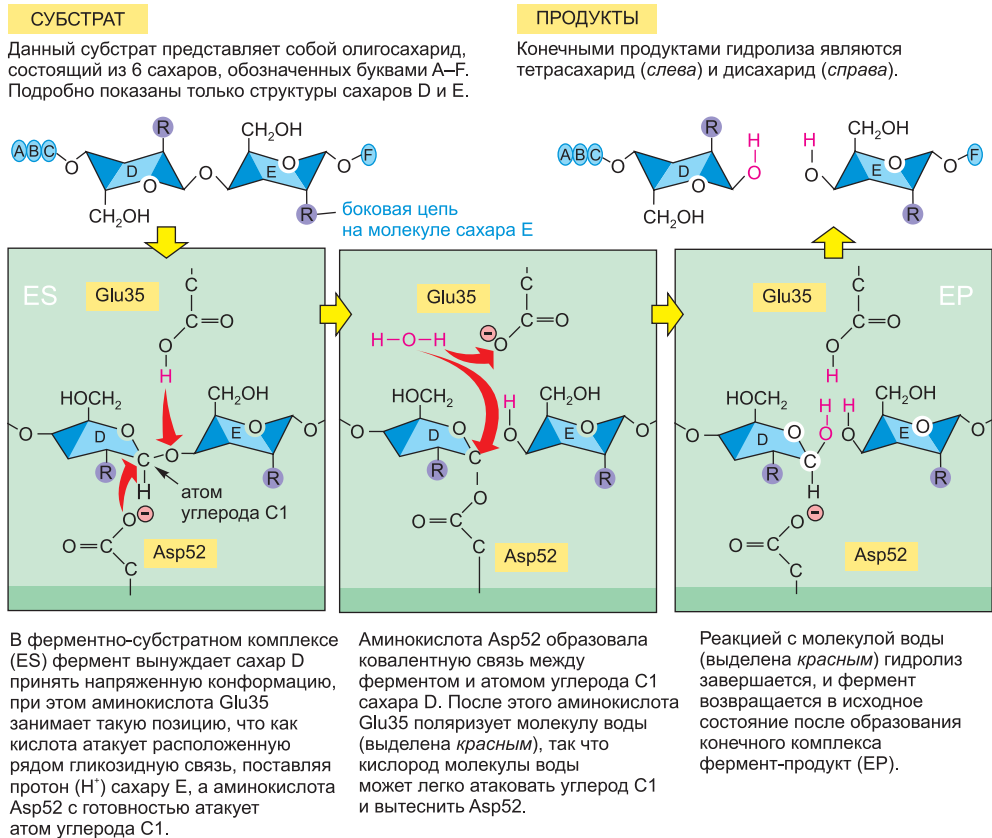


Рис. 3.51. События на активном участке лизоцима. На верхнем левом и верхнем правом рисунках показаны соответственно свободный субстрат и свободные продукты, тогда как другие три рисунка показывают последовательность событий, происходящих в активном центре фермента. Обратите внимание на изменение конформации сахара D в ферментно-субстратном комплексе; такое изменение формы стабилизирует переходные состояния, подобные иону оксокарбония, что необходимо для образования и гидролиза ковалентного промежуточного продукта, показанного на среднем рисунке. Также возможно, что на этапе 2 в качестве промежуточного продукта образуется ион карбония, поскольку ковалентный промежуточный продукт, показанный на среднем рисунке, был обнаружен только в реакции с синтетическим субстратом. (См. D. J. Vocadlo et al., *Nature* 412: 835–838, 2001.)



а) фермент связывается с двумя молекулами субстрата и точно их ориентирует, содействуя тем самым протеканию реакции между ними

б) связывание субстрата с ферментом изменяет распределение электронов в субстрате, создавая частично отрицательные и частично положительные заряды, которые способствуют протеканию реакции

в) фермент создает деформацию в структуре связанной молекулы субстрата, вынуждая ее перейти в переходное состояние, благоприятствующее протеканию реакции

Рис. 3.52. Некоторые общие принципы ферментативного катализа. а) Удерживать субстраты вместе в точно заданном взаимном расположении. б) Стабилизировать промежуточные продукты реакции путем перераспределения зарядов. в) Приложить силу, которая искажает связи в субстрате, и тем самым увеличить скорость определенной реакции.

связь, которая будет разрушена, удерживается вблизи двух находящихся в активном участке лизоцима аминокислот с кислыми боковыми цепями (глутаминовая и аспарагиновая кислоты).

Таким образом, в микросреде активного участка лизоцима создаются условия, которые сильно уменьшают энергию активации, необходимую для гидролиза. На **рис. 3.51** представлены три основных этапа этой ферментативно катализируемой реакции.

1. Фермент вызывает напряжения в связанном им субстрате, так что форма одного из сахаров напоминает форму переходных состояний с высокой энергией, образующихся в ходе реакции.

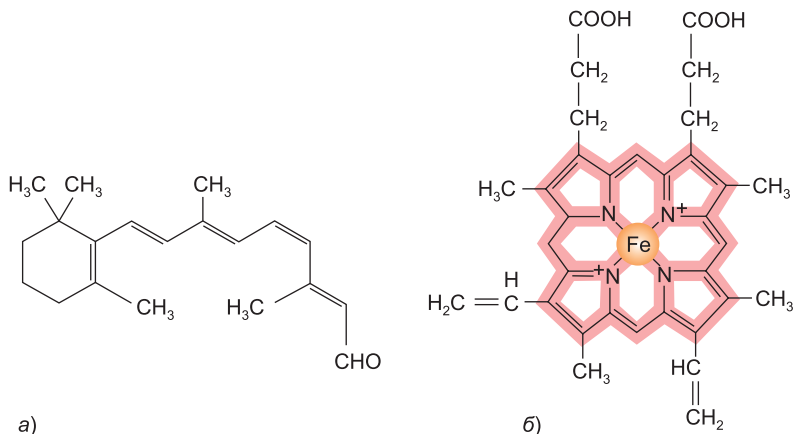


Рис. 3.53. Ретиналь и гем. а) Структура ретиналя — светочувствительной молекулы, присоединенной к родопсину (основному зрительному пигменту). б) Структура группы гема. Содержащее углерод кольцо гема отмечено *красным*, а атом железа в его центре окрашен *оранжевым*. Группа гема прочно связана со всеми четырьмя полипептидными цепями в гемоглобине — переносящем кислород белке, структура которого показана на рис. 3.22.

2. Отрицательно заряженная аспарагиновая кислота реагирует с атомом углерода C1 искаженного сахара, а глутаминовая кислота жертвует свой протон кислороду, который связывает этот сахар с соседним. В результате связь между этими двумя сахарами расщепляется, и боковая цепь аспарагиновой кислоты остается ковалентно связанной с C1, по которому и произошло расщепление связи.

3. При помощи отрицательно заряженной глутаминовой кислоты молекула воды реагирует с атомом углерода C1, вытесняя боковую цепь аспарагиновой кислоты и завершая процесс гидролиза.

Полная химическая реакция — от начального связывания полисахарида на поверхности фермента и до заключительного высвобождения разобщенных цепей происходит во много миллионов раз быстрее, чем протекала бы в отсутствие фермента.

Другие ферменты используют подобные механизмы для снижения энергии активации и ускорения реакций, которые они катализируют. В реакциях, где во взаимодействие вовлечено два и более агентов, активный участок служит также и матрицей, или шаблоном, на которой, или соответственно которм, эти субстраты «сводятся вместе» в надлежащей ориентации так, что реакция между ними становится возможной (рис. 3.52, а). Как мы видели на примере лизоцима, атомы, входящие в активный участок фермента, размещены очень точно, чтобы ускорять реакцию за счет использования своих заряженных групп для изменения распределения электронов в субстратах (рис. 3.52, б). Кроме того, когда субстрат связывается с ферментом, связи в субстрате часто искажаются, изменяя форму субстрата. Эти изменения, наряду с механическими силами, продвигают субстрат к специфическому переходному состоянию (рис. 3.52, в). Наконец, подобно лизоциму, многие ферменты оказываются глубоко вовлеченными в реакцию и даже образуют кратковременную ковалентную связь между субстратом и боковой цепью входящей в активный центр аминокислоты фермента. На последующих этапах реакции боковая цепь возвращается в свое исходное состояние, так что сам фермент остается неизменным после реакции (см. также рис. 2.72).

3.2.12. Прочно связанные с белками маленькие молекулы придают белкам дополнительные функции

Хотя мы и подчеркивали многофункциональность белков как аминокислотных цепей, которые выполняют различные функции, известно много примеров, в которых самих по себе цепочек аминокислот недостаточно. Точно так же как люди употребляют инструменты, чтобы увеличить и расширить возможности своих рук, белки часто используют маленькие небелковые молекулы, чтобы выполнять функции, которые было бы трудно или невозможно выполнить, располагая одними лишь аминокислотами. Так, белок сигнальных рецепторов *родопсин*, который производится фоторецепторными клетками сетчатки, обнаруживает свет посредством маленькой, заложенной в него, молекулы *ретиная* (рис. 3.53, а). Когда ретиналь поглощает фотон света, он изменяет свою форму, и это изменение заставляет белок запускать каскад ферментативных реакций, которые в конечном счете ведут ксылке электрического сигнала мозгу.

Другим примером белка, содержащего небелковую часть, служит гемоглобин (см. рис. 3.22). Молекула гемоглобина несет четыре группы *гема* — кольцеобразные молекулы, в центре каждой из которых находится один атом железа (рис. 3.53, б).

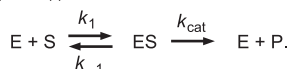
ДЛЯ ЧЕГО АНАЛИЗИРУЮТ КИНЕТИКУ ФЕРМЕНТОВ?

Ферменты можно охарактеризовать как наиболее избирательные и действенные из всех известных катализаторов. Доскональное знание механизмов их действия — это мощный инструмент для создания новых лекарственных препаратов, серийного синтеза необходимых человечеству химических веществ в промышленном масштабе и постижения тайн химии клеток и организмов. Подробное исследование скоростей химических реакций, катализируемых очищенным ферментом, а точнее — того, как эти скорости меняются при изменении таких условий, как концентрации субстратов, продуктов, ингибиторов и регуляторных лигандов, позволяет биохимикам

прийти к точному пониманию принципов работы каждого фермента. Например, именно таким образом производящие ATP реакции гликолиза, показанные ранее на рис. 2.72, были разгаданы, позволяя нам разобраться в фундаментальных основах этого важнейшего ферментативного пути. В этом приложении мы знакомим читателя с важнейшей областью знания, **ферментативной кинетикой**, освоение которой было абсолютно необходимым для получения большей части имеющихся у нас всесторонних знаний о химии клетки.

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА СТАЦИОНАРНОГО СОСТОЯНИЯ

Многие ферменты имеют только один субстрат, который они связывают и затем преобразуют, а в конечном счете производят продукты согласно схеме, представленной на рис. 3.50, а. В этом случае реакция записывается в следующем виде:



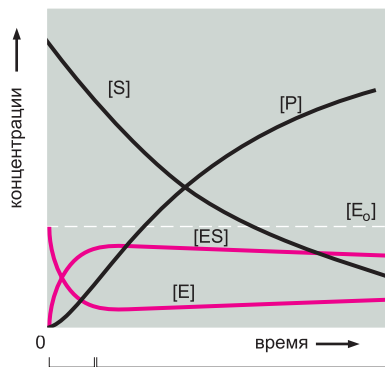
Здесь мы делаем допущение о том, что обратная реакция, в которой E + P вновь объединяются с образованием EP, а затем и ES, происходит столь редко, что мы можем не принимать ее в расчет. В таком случае нет необходимости представлять EP в выражении реакции, и мы можем выразить скорость протекания реакции — известную как ее скорость V, — в виде

$$V = k_{cat} [ES]$$

где [ES] — концентрация ферментно-субстратного комплекса, а k_{cat} — «число оборотов» — константа скорости, которая численно равна числу молекул субстрата, превращаемых в продукт одной молекулой фермента за одну секунду.

Но каким образом величина [ES] связана с концентрациями, которые мы знаем — это исходная концентрация фермента, $[E_0]$, и концентрация субстрата?

На начальном этапе реакции, когда реакция фермента и субстрата только что началась, концентрация [ES] будет быстро возрастать от нуля до так называемого стационарного уровня, как показано ниже.



предстабионарное состояние: образование ES
стабионарное состояние: концентрация ES почти постоянна

В таком стационарном состоянии [ES] почти постоянна, так что

$$k_{-1}[ES] + k_{cat}[ES] = k_1[E][S]$$

или, так как концентрация свободного фермента [E] равна $[E_0] - [ES]$,

$$[ES] = \left(\frac{k_1}{k_{-1} + k_{cat}} \right) [E][S] = \left(\frac{k_1}{k_{-1} + k_{cat}} \right) ([E_0] - [ES])[S].$$

Производя перегруппировку и определяя константу K_m в виде

$$\frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1},$$

мы получаем

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_m + [S]},$$

или, помня, что $V = k_{cat}[ES]$, мы получаем известное уравнение Михаэлиса – Ментен:

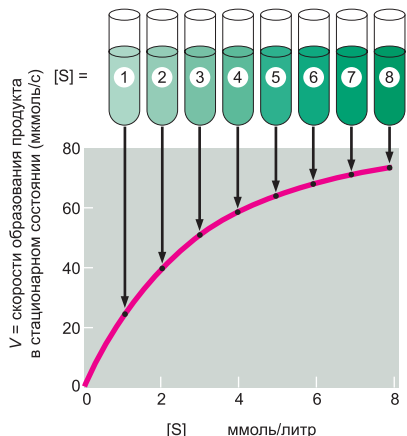
$$V = \frac{k_{cat} [E_0][S]}{K_m + [S]}.$$

При увеличении [S] наступит момент, когда фактически весь фермент будет связан с субстратом; в этой точке скорость реакции достигает максимального значения, V_{max} , и $V = V_{max} = k_{cat} [E_0]$. И тогда уравнение Михаэлиса – Ментен можно представить в следующем виде:

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}.$$

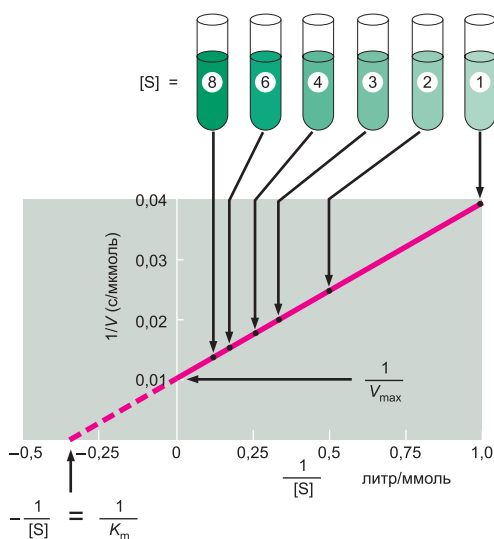
ГРАФИК ДВОЙНЫХ ОБРАТНЫХ КООРДИНАТ

Типичный график зависимости V от $[S]$ для всякого фермента, который подчиняется кинетике Михаэлиса – Ментен, представлен ниже. По этому графику невозможно непосредственно оценить ни значение V_{max} , ни величину K_m .



Для того чтобы получить V_{max} и K_m из таких данных, часто используют график двойных обратных координат, для построения которого уравнение Михаэлиса–Ментен преобразуют так, что получается зависимость величины $1/V$ от значений $1/[S]$.

$$1/V = \left(\frac{K_m}{V_{max}} \right) \left(\frac{1}{[S]} \right) + 1/V_{max}$$



ЗНАЧЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ K_m , k_{cat} И k_{cat}/K_m ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ

Как описано в тексте книги, величина K_m служит приближенным показателем сродства субстрата к ферменту: численно она равна концентрации $[S]$ при $V = 0,5 V_{max}$. Вообще, более низкое значение K_m означает более прочное связывание субстрата. Фактически для тех случаев, где k_{cat} намного меньше k_{-1} , значение K_m будет равно K_d — константе диссоциации для реакции связывания субстрата с ферментом ($K_d = 1/K_2$).

Как было показано, величина k_{cat} представляет собой число оборотов фермента. При очень низких концентрациях субстрата, когда $[S] \ll K_m$, большинство молекул фермента находится в свободном состоянии. Таким образом, мы можем принять $[E] = [E_0]$, так что уравнение Михаэлиса – Ментен принимает вид $V = k_{cat}/K_m[E][S]$. Таким образом, отношение k_{cat}/K_m по величине равно константе скорости реакции между свободным ферментом и свободным субстратом.

Сравнение k_{cat}/K_m для одного и того же фермента с различными субстратами или для двух ферментов с их различными субстратами широко используется как мера эффективности работы фермента.

Простоты ради в этом приложении мы рассматривали ферменты, которые имеют только один субстрат, такие как фермент лизоцим, описываемый в тексте книги (см. стр. 164). Большинство ферментов имеет два субстрата, один из которых часто представлен активной молекулой носителя — например, NADH или ATP.

Для определения кинетики таких ферментов используется похожий, хотя и более сложный анализ, который позволяет определить порядок связывания субстратов и обнаружить образование ковалентно связанных промежуточных продуктов в ходе реакции.

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЛИМИТИРУЕТ ДИФфуЗИЯ

Значения величин k_{cat} , K_m , и k_{cat}/K_m для некоторых ферментов приведены ниже

фермент	субстрат	k_{cat} , с ⁻¹	K_m , М	k_{cat}/K_m , с ⁻¹ ·М ⁻¹
ацетилхолин-эстераза	ацетилхолин	$1,4 \times 10^4$	9×10^{-5}	$1,6 \times 10^8$
каталаза	H ₂ O ₂	4×10^7	1	4×10^7
фумараза	фумарат	8×10^2	5×10^{-5}	$1,6 \times 10^8$

Поскольку реакции между ферментом и его субстратом должно предшествовать их соударение, то максимально возможное значение величины k_{cat}/K_m ограничено частотой столкновений. Если в результате каждого столкновения образуется ферментно-субстратный комплекс, то можно вычислить из теории диффузии, что значение k_{cat}/K_m будет находиться в интервале от 10^3 до 10^9 с⁻¹·М⁻¹, в случае когда все последующие этапы происходят незамедлительно. Таким образом, можно утверждать, что ферменты, подобные ацетилхолинэстеразе и фумаразе, являются «совершенными ферментами», ибо каждый такой фермент эволюционировал до такого состояния, что почти каждое его столкновение с субстратом завершается превращением оного в надлежащий продукт.

Гем придает гемоглобину (да и всей крови) характерный для нее красный цвет. Благодаря обратимому связыванию с газообразным кислородом через заложенный в нем атом железа гем позволяет гемоглобину вбирать кислород в легких и выпускать его в тканях.

Иногда такие маленькие молекулы присоединены ковалентно и постоянно к своему белку и, таким образом, становятся неотъемлемой частью самой белковой молекулы. Из главы 10 мы узнаем, что белки часто бывают прикреплены к клеточным мембранам посредством ковалентно присоединенных молекул липидов. А мембранные белки, выставленные на поверхности клетки, а также белки, выделяемые из клетки вовне, часто модифицированы ковалентно присоединенными к ним сахарами и олигосахаридами.

В составе ферментов часто имеется маленькая молекула или атом металла, которые прочно связаны с активным участком фермента и усиливают его каталитическую активность. Например, *карбоксипептидаза* — фермент, который разрезает полипептидные цепи, — несет в своем активном участке прочно связанный ион цинка. В процессе расщепления пептидной связи карбоксипептидазой ион цинка образует переходную связь с одним из атомов субстрата, способствуя таким образом реакции гидролиза. У иных ферментов подобной цели служит маленькая органическая молекула. Такие органические молекулы часто упоминаются как **коферменты**. Примером является *биотин*, встречающийся в ферментах, которые переносят карбоксильную группу ($-\text{COO}^-$) с одной молекулы на другую (см. рис. 2.63). Биотин участвует в таких реакциях путем образования переходной ковалентной связи с готовой к переносу группой $-\text{COO}^-$, причем он подходит для этой функции лучше, чем любая из аминокислот, идущих на построение белка. Поскольку биотин не может быть синтезирован организмом человека и поэтому должен содержаться в малых количествах в нашей пище, он относится к *витаминам*.

Таблица 3.2. Многие витамины являются источниками важнейших коферментов для клеток человека

ВИТАМИН	КОФЕРМЕНТ	ФЕРМЕНТАТИВНО КАТАЛИЗИРУЕМЫЕ РЕАКЦИИ, ДЛЯ КОТОРЫХ НЕОБХОДИМ ЭТОТ КОФЕРМЕНТ
Тиамин (витамин В ₁)	тиаминпирофосфат	активация и перенос альдегидов
Рибофлавин (витамин В ₂)	FADH ₂	окисление-восстановление
Никотиновая кислота (витамин РР)	NADH, NADPH	окисление-восстановление
Пантотеновая кислота (витамин В ₃)	кофермент А	активация и перенос ацильной группы
Пиридоксин (витамин В ₆)	пиридоксальфосфат	активация аминокислот, а также гликогенфосфорилаза
Биотин (витамин Н)	биотин	активация и перенос CO ₂
Липоевая кислота (витамин Н)	липоамид	активация ацильной группы; окисление-восстановление
Фолиевая кислота (витамин В ₉)	тетрагидрофолат	активация и перенос одноуглеродных групп
Цианкобаламин (витамин В ₁₂)	кобаламины	изомеризация; перенос метильной группы

Многие другие коферменты синтезируются из витаминов (*таблица 3.2*). Витамины необходимы также и для того, чтобы синтезировать маленькие молекулы других типов, которые являются незаменимыми партнерами наших белков; витамин А, например, необходим в рационе, чтобы синтезировать ретиналь — светочувствительную часть родопсина.

3.2.13. В ферментах со множественными каталитическими участками субстраты движутся по особым внутримолекулярным туннелям

В ходе некоторых химических реакций, катализируемых ферментами в клетках, образуются промежуточные продукты, которые или являются очень неустойчивыми, или могут легко диффундировать из клетки сквозь плазматическую мембрану, будучи в цитозоле. Чтобы сохранить за собой такие промежуточные продукты, ферменты используют полученные в ходе эволюции *молекулярные туннели*, которые соединяют два и более активных участка и позволяют быстро превращать промежуточный продукт в конечный продукт, при этом оставаясь связанным с ферментом.

Рассмотрим, например, фермент карбамоилфосфатсинтетазу, который использует аммиак, полученный из глутамина, и две молекулы АТФ, чтобы превращать бикарбонат (HCO_3^-) в карбамоилфосфат — важный промежуточный продукт в нескольких метаболических путях (*рис. 3.54*). Этот фермент содержит три далеко отстоящих друг от друга активных участка, которые соединены друг с другом посредством туннеля. Реакция начинается на активном участке 2, расположенном в середине туннеля, с использованием АТФ для фосфорилирования (присоединения фосфатной группы) бикарбоната и заканчивается образованием карбоксифосфата. Это событие запускает гидролиз глутамина до глутаминовой кислоты на активном участке 1, что сопровождается высвобождением аммиака в туннель. Аммиак немедленно диффундирует через первую половину туннеля к активному участку 2, где реагирует с карбоксифосфатом — с образованием карбамината. Далее этот неустойчивый промежуточный продукт диффундирует через вторую половину туннеля к активному участку 3, где фосфорилируется АТФ до конечного продукта — карбамоилфосфата.

Некоторые другие хорошо охарактеризованные ферменты также содержат подобные молекулярные туннели. Аммиак — легко диффундирующий промежуточный продукт, который иначе мог быть утрачен клеткой, — является субстратом, который, как теперь известно, чаще всего направляется по ферментативным туннелям.

3.2.14. Мультиферментные комплексы помогают увеличить скорость метаболизма в клетке

Эффективность ферментов в плане ускорения химических реакций является крайне важной для поддержания жизни. Клетки, в сущности, должны бежать наперегонки с неизбежными процессами распада, которые — если позволить им уйти вперед — заставят макромолекулы скатываться вниз ко все большему и большему беспорядку. Если бы скорости желательных реакций не были выше, чем скорости конкурирующих побочных реакций, то клетка вскоре умерла бы. Мы можем получить некоторое представление о скорости протекания метаболизма в клетке, измеряя скорость использования АТФ. Типичная клетка млекопитающих «оборачивает» (то есть гидролизует и восстанавливает фосфорилированием) резерв АТФ в

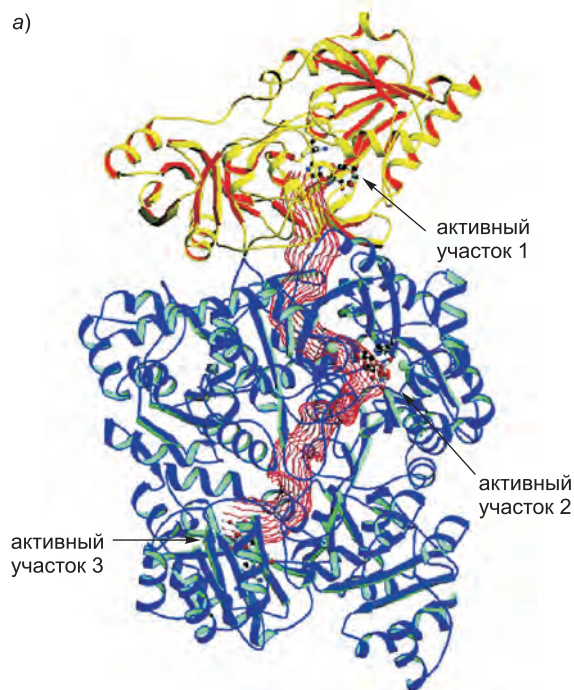
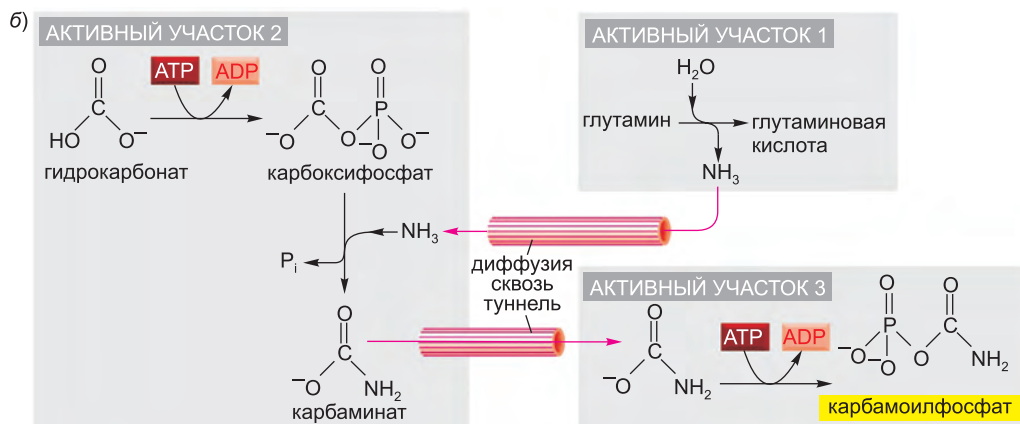


Рис. 3.54. Туннелирование промежуточных продуктов реакции в ферменте карбамоилфосфатсинтазе. а) Схематичное изображение структуры фермента, в котором красная лента используется для обозначения туннеля, проходящего во внутренней части белка и соединяющего три его активных участка. Малая и большая субъединицы этого димерного фермента отмечены соответственно желтым и синим цветами. б) Схема реакции. Как отмечено, активный участок 1 производит аммиак, который диффундирует по туннелю к активному участку 2, где соединяется с карбоксифосфатом с образованием карбамината. Затем этот весьма нестойкий промежуточный продукт диффундирует сквозь туннель к активному участку 3, где фосфорилируется АТФ и наконец превращается в конечный продукт — карбамоилфосфат. (Изображение а переработано из F. M. Raushel, J. V. Thoden, and H. M. Holden, *Acc. Chem. Res.* 36: 539–548, 2003. С разрешения American Chemical Society.)



полном объеме за 1–2 минуты. Для каждой клетки такая оборачиваемость означает использование примерно 10^7 молекул АТФ в секунду (или, для всего организма человека, приблизительно 1 грамм АТФ каждую минуту).

Скорости реакций в клетках велики именно благодаря столь высокой эффективности ферментативного катализа. Многие важные ферменты стали настолько эффективными, что нет никакой необходимости в дальнейшем усовершенствовании. Фактор, который ограничивает скорость реакции, более не определяется свойственной ферменту скоростью действия; скорее, он обусловлен частотой, с которой фермент сталкивается со своим субстратом. Говорят, что такая реакция является *диффузионно-лимитированной* (см. приложение 3.3, [стр. 162–163](#)).

Если скорость катализируемой ферментом реакция лимитирована диффузией,

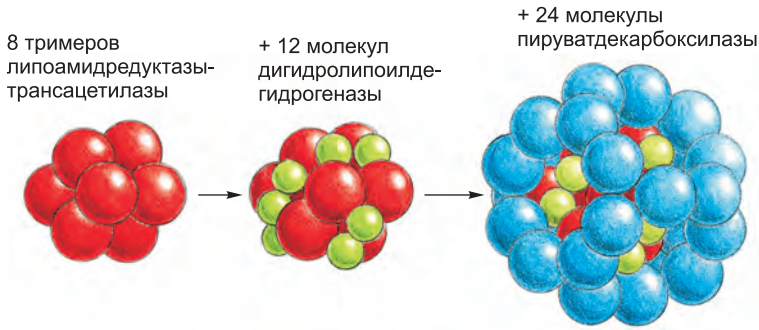


Рис. 3.55. Структура пируватдегидрогеназы. Этот ферментный комплекс катализирует превращение пирувата в acetylCoA – реакцию, являющаяся составной частью пути окисления сахара до CO_2 и H_2O (см. рис. 2.79). Пируватдегидрогеназа служит примером крупного мультиферментного комплекса, в котором промежуточные продукты реакции непосредственно передаются от одного фермента к другому.

то она зависит от концентрации и самого фермента, и его субстрата. Если нужно, чтобы некоторая последовательность реакций происходила чрезвычайно быстро, то каждый промежуточный продукт метаболизма и участвующий в реакциях фермент должны присутствовать в высокой концентрации. Однако, ввиду огромного числа различных реакций, выполняемых клеткой, существуют пределы концентраций, которые реально могут быть достигнуты. Фактически большинство метаболитов присутствует в микромолярных (10^{-6} моль/литр) концентрациях, а концентрации большинства ферментов намного ниже. Как же при таком раскладе возможно поддерживать очень быстрые скорости метаболических реакций?

Ответ кроется в пространственной организации компонентов клетки. Клетка способна увеличивать скорости реакций, не повышая концентрации субстратов, за счет сведения различных ферментов, участвующих в последовательности реакций, воедино и образования из них крупного белкового ансамбля, известного под названием *мультиферментного комплекса* (рис. 3.55). Поскольку это позволяет передавать продукт фермента А непосредственно ферменту В и так далее, интенсивность диффузии уже не должна ограничивать скорость реакции, даже когда концентрации субстратов в клетке в целом очень низки. Поэтому не должен вызывать удивления тот факт, что такие ферментные комплексы довольно распространены и есть почти во всех «закоулках» метаболических путей, включая ключевые генетические процессы синтеза ДНК, РНК и белка. Фактически лишь немногие ферменты в ядерных клетках свободно диффундируют в растворе; вместо этого, большинство, кажется, выковало в кузнице эволюции такие участки связывания, благодаря которым они группируются с другими белками родственной функции в определенных областях клетки, увеличивая тем самым скорость и эффективность катализируемых ими реакций.

Эукариотические клетки располагают еще одним способом повышения скорости метаболических реакций — использование систем внутриклеточных мембран. Эти мембраны могут заключать определенные субстраты и ферменты, которые воздействуют на них, в одну и ту же обособленную мембраной полость, такую как эндоплазматический ретикулум или ядро клетки. Если, например, некоторая полость занимает в целом 10% от общего объема клетки, то концентрация реагентов в этой

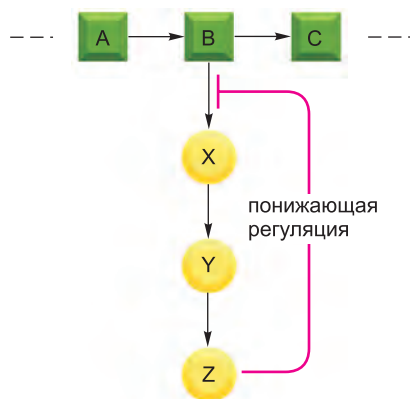


Рис. 3.56. Торможение по типу обратной связи на отдельно взятом пути биосинтеза. Конечный продукт Z ингибирует первый фермент, который является уникальным для его синтеза, и тем самым управляет уровнем своей концентрации в клетке. Это пример отрицательной регуляции.

полости будет увеличена в 10 раз по сравнению с концентрацией этих же молекул в клетке с тем же числом молекул фермента и субстрата, но без «распределения» по полостям. Таким вот образом реакции, ограниченные скоростью диффузии, могут быть ускорены в 10 раз.

3.2.15. Каталитическое действие ферментов регулируется самой клеткой

Живая клетка включает в себя тысячи ферментов, многие из которых работают одновременно и в общем малом объеме цитозоля. Своим каталитическим действием эти ферменты создают сложную сеть метаболических путей, каждый из которых состоит из цепочек химических реакций, в которых продукт одного фермента становится субстратом следующего. В таком лабиринте путей есть много точек ветвления (узлов), в которых различные ферменты конкурируют за один и тот же субстрат. Подобная система настолько сложна (см. рис. 2.88), что для регулирования того, в какой момент времени и как быстро каждая из реакций должна произойти, необходим сложный контроль.

Регуляция осуществляется на многих уровнях. На одном уровне клетка управляет тем, сколько молекул каждого из ферментов она производит, путем регулирования экспрессии генов, кодирующих эти ферменты (обсудим подробнее в главе 7). Клетка управляет активностью ферментов также и за счет заключения наборов этих ферментов в специфические субклеточные полости, окруженные обособленными мембранами (обсуждается в главах 12 и 14). Как будет сказано позже в этой главе, ферменты часто ковалентно модифицируются — для регулирования их активности. Скорость разрушения белка целенаправленным протеолизом представляет еще один важный регуляторный механизм (см. **стр. 395**). Но самый общий процесс, посредством которого выверяются скорости реакций, работает через прямое, причем обратимое изменение активности фермента в ответ на определенные маленькие молекулы, с которыми он встречается.

Регуляция самого распространенного типа происходит, когда некая молекула, не входящая в репертуар субстратов, связывается с ферментом в специальном регуляторном участке, расположенном вне активного центра, и за счет этого изменяет скорость, с которой фермент превращает свои субстраты в продукты. Например, при **ингибировании по типу обратной связи** продукт, производимый на более позднем участке цепочки реакций, ингибирует фермент, который действует на более раннем этапе их протекания. Таким образом, всякий раз, когда начинает накапливаться большое количество конечного продукта, он связывается с ферментом и замедляет каталитическое действие, чем ограничивает дальнейший расход субстратов в этой реакции (**рис. 3.56**). В тех местах, где пути ветвятся или пересекаются, находится обычно множество рычагов управления, осуществляемого с привлечением различ-

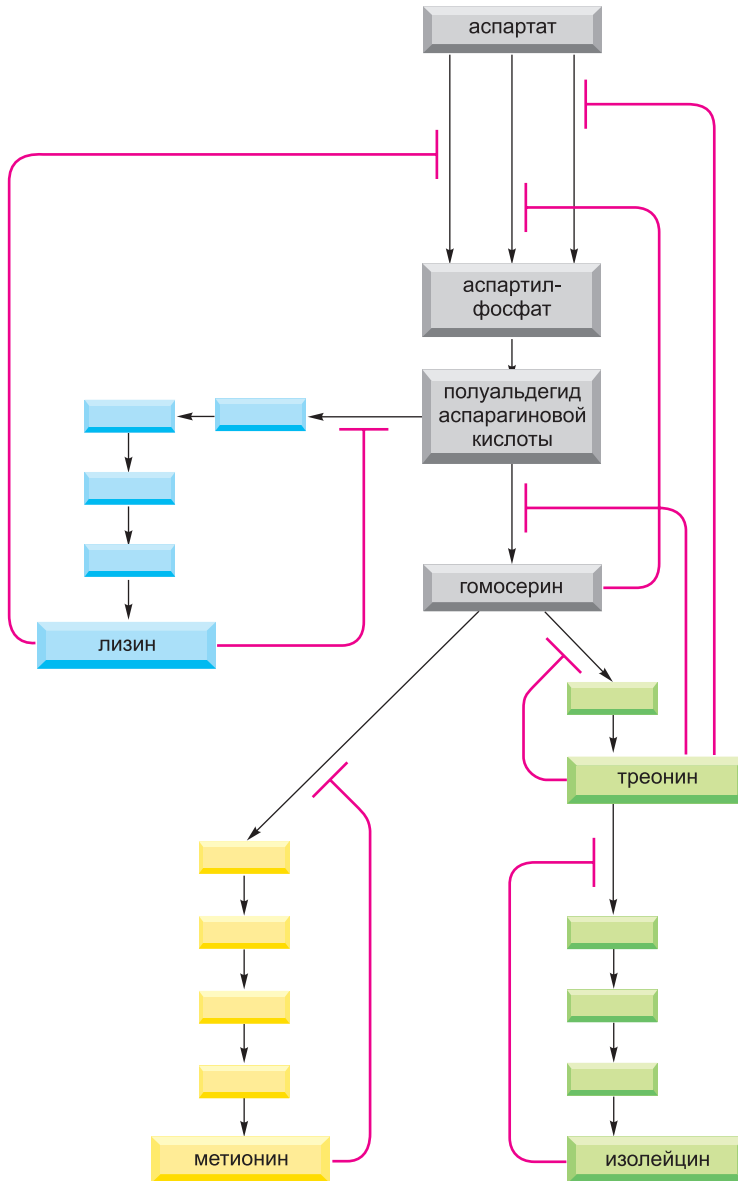


Рис. 3.57. Многократное ингибирование по типу обратной связи. В данном примере, который показывает пути биосинтеза четырех различных аминокислот в бактериях, *красные стрелки* отмечают положения, в которых продукты ингибируют ферменты по типу обратной связи. Каждая аминокислота контролирует работу первого фермента, специфического именно для ее синтеза, и тем самым регулирует свой собственный уровень, предотвращая возможность расточительного или даже опасного накопления промежуточных продуктов. Конечные продукты могут ингибировать также и «пакет» изначальных реакций, общий для всех последующих реакций их синтеза; в данном случае начальную реакцию катализируют три различных фермента, каждый из которых ингибируется определенным, отличным от других, конечным продуктом.

ных конечных продуктов, каждый из которых выступает регулятором своего собственного синтеза (рис. 3.57). Ингибирование по типу обратной связи может срабатывать почти мгновенно, и система может быстро возвращаться к исходному состоянию после падения уровня концентрации продукта.

Ингибирование по типу обратной связи представляет собой, по сути, *отрицательную регуляцию* — оно препятствует деятельности фермента. Ферменты могут подвергаться также и *положительной регуляции*, когда регулирующая молекула стимулирует действие фермента, вместо того чтобы приостанавливать его. Положительная регуляция имеет место, когда продукт в одной ветви метаболической сети стимулирует активность некоторого фермента на другом пути. В качестве одного из примеров положительной регуляции можно привести следующий: накопление ADP активирует несколько ферментов, участвующих в окислении молекул сахара, и таким образом стимулирует клетку для превращения больших объемов ADP в АТР.

3.2.16. Аллостерические ферменты обладают двумя и более взаимно влияющими друг на друга участками связывания лигандов

Поразительная особенность как положительной, так и отрицательной регуляции по типу обратной связи заключается в том, что молекула-регулятор часто имеет форму, совершенно отличную от формы субстрата данного фермента. Именно поэтому воздействие на белок называют *аллостерией* (от греческих слов *allos*, означающего «иной», и *стерео*, означающего «пространственный», или «трехмерный»). Когда биологи больше узнали о регуляции по типу обратной связи, они признали, что вовлеченные в такого рода регуляцию ферменты должны иметь по крайней мере два разных участка связывания на своей поверхности — **активный участок**, который распознает субстраты, и **регуляторный участок**, который опознает регуляторную молекулу. Эти два участка должны каким-то образом сообщаться между собой, с тем чтобы каталитические события на активном участке так или иначе зависели от связывания регуляторной молекулы на предназначенном для нее отдельном участке на поверхности белка.

Взаимодействие между разобленными участками на молекуле белка, как теперь известно, зависит от *конформационного изменения* в белке: связывание на одном из участков вызывает переход из одной свернутой формы в другую, немного отличную. В процессе ингибирования по типу обратной связи, например, связывание ингибитора на одном участке белка побуждает белок перейти в конформацию, которая выводит из строя его активный участок, расположенный в ином месте белковой молекулы.

Считается, что в большинстве своем белковые молекулы являются аллостерическими. Они способны принимать две и более слегка различающиеся конформации, и переход из одной в другую, вызванный связыванием лиганда, может изменить их активность. Это верно не только для ферментов, но также и для многих других белков, в том числе рецепторов, структурных белков и моторных белков. Во всех случаях аллостерической регуляции каждая из конформаций белка характеризуется несколько отличающимися очертаниями поверхности, так что присущие белку участки связывания лигандов изменяются, когда белок изменяет форму. Более того, о чем мы еще скажем позже, каждый лиганд стабилизирует ту конформацию, в которой его связывание наиболее сильно, и, таким образом, — при достаточно

высоких концентрациях — будет стремиться «переключить» белок в ту конформацию, которую предпочитает.

3.2.17. Два лиганда, участки связывания которых сопряжены, оказывают взаимное влияние на связывание с этим ферментом

Воздействие связывания лиганда на белок проистекает из фундаментального химического принципа, известного как взаимосвязь, или **сопряжение**. Предположим, например, что некоторый белок, который связывает глюкозу, связывает также и другую молекулу X на участке, расположенном на каком-то расстоянии от глюкозосвязывающего. Если участок связывания молекулы X изменяет свою форму как часть конформационного изменения, вызванного связыванием глюкозы, то участки связывания молекул X и глюкозы, как говорят, *сопряжены*. Как следует из основных начал термодинамики, если два лиганда предпочтительно связываются с *одной и той же* конформацией аллостерического белка, то каждый из этих лигандов должен увеличивать сродство данного белка ко второму лиганду. Таким образом, если переход белка на **рис. 3.58** в замкнутую конформацию, которая связывает глюкозу наилучшим образом, обуславливает также и лучшее соответствие X-участка связывания молекулам X, то при наличии молекул X такой белок будет связывать глюкозу сильнее, чем в их отсутствие.

И наоборот, механизм сцепления развивается по негативному сценарию, если два лиганда предпочитают связываться с *различными* конформациями одного и того же белка. В таком случае связывание первого лиганда препятствует связыванию второго лиганда. Таким образом, если изменение конформации, вызванное связыванием глюкозы, уменьшает сродство белка к молекуле X, то связывание молекулы X будет тоже снижать сродство белка к глюкозе (**рис. 3.59**). В количественном отношении действие двух сопряженных лигандов тоже взаимосвязано, так что, например, если глюкоза оказывает очень сильное влияние на связывание вещества X, то вещество X очень сильно влияет на связывание глюкозы.

Зависимости, представленные на **рис. 3.58** и **3.59**, относятся ко всем белкам, и лежат в основе всей клеточной биологии. В ретроспективе, в которой мы теперь воспринимаем их как нечто само собой разумеющееся, они кажутся вполне очевидными. Но открытие сопряжения в ходе изучения нескольких ферментов в 1950-х гг., за которым последовал всесторонний анализ аллостерических механизмов в белках в начале 1960-х, произвело революционный эффект в нашем понимании биологии. Поскольку молекула X в этих примерах связывается с ферментом на некотором участке, который отделен от участка, где происходит катализ, она может быть представлена любым веществом и не «состоять в родственной связи» — в химическом отношении — с глюкозой или любым другим лигандом, который связывается с этим ферментом в активном участке. Более того, как мы только что убедились, для ферментов, которые регулируются подобным образом, молекула X может либо «включать» фермент (положительная регуляция), либо «выключать» его (отрицательная регуляция). Благодаря такому механизму **аллостерические белки** служат главными переключателями, которые, в принципе, позволяют какой-либо одной молекуле в клетке влиять на метаболическое будущее любой другой молекулы.

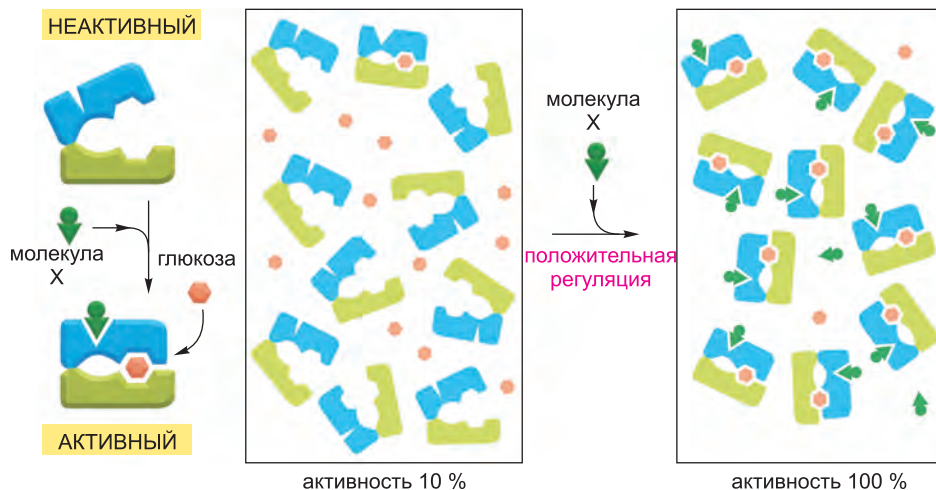


Рис. 3.58. Положительная регуляция, обусловленная конформационным сопряжением между двумя разнесенными в пространстве участками связывания. В данном примере и глюкоза, и молекула X связываются лучше всего с *замкнутой* конформацией некоторого белка, состоящего из двух доменов. Поскольку и глюкоза, и молекула X побуждают белок принять замкнутую конформацию, каждый из лигандов способствует связыванию другого. Глюкоза и молекула X, как говорят, *кооперативно* связываются с белком.

3.2.18. Симметричные белковые комплексы создают кооперативные аллостерические переходы

Односубъединичный фермент, который регулируется отрицательной обратной связью, в ответ на 100-кратное увеличение концентрации ингибирующего лиганда, с которым он связывается, может самое большее снизить активность с 90% до приблизительно 10 (**рис. 3.60, красная линия**). Вполне очевидно, что отклика такого уровня недостаточно для оптимального управления клеткой, и большинство ферментов, которые включаются или отключаются посредством связывания лиганда, образовано симметричными комплексами, состоящими из идентичных субъединиц. При таковой организации связывание молекулы лиганда на единственном участке одной субъединицы может обусловить аллостерическое изменение во всей сборке, которое помогает соседним субъединицам связывать тот же лиганд. В результате происходит *кооперативный аллостерический переход* (**рис. 3.60, синяя линия**), позволяющий при относительно малом изменении концентрации лиганда в клетке переводить весь ансамбль белков из почти полностью активной конформации в почти полностью неактивную форму (или наоборот).

Принципы, лежащие в основе кооперативного перехода (осуществляющегося по правилу «все или ничего»), одинаковы для всех белков, будь то ферменты или нет. Но эти принципы, возможно, легче всего наглядно продемонстрировать на примере фермента, который образует симметричный димер. В примере, показанном на **рис. 3.61**, первая молекула ингибирующего лиганда связывается с большим трудом, так как ее связывание нарушает энергетически благоприятное взаимодействие между двумя идентичными мономерами в димере. Однако после этого вторая молекула ингибирующего лиганда связывается легче, потому что ее связывание восстанавливает энергетически благоприятные мономер-мономерные контакты в симметричном

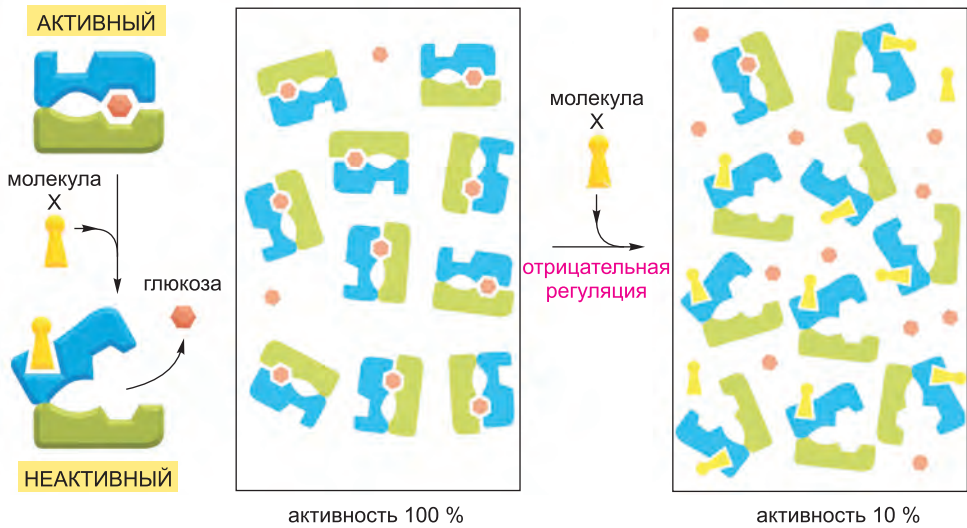


Рис. 3.59. Отрицательная регуляция, обусловленная конформационным сопряжением между двумя разнесенными в пространстве участками связывания. Представленная здесь схема напоминает такую на предыдущем рисунке, но здесь молекула X предпочитает *открытую* конформацию, тогда как глюкоза отдает предпочтение *замкнутой* конформации. Поскольку глюкоза и молекула X побуждают белок принять противоположные конформации (соответственно замкнутую и открытую), присутствие какого-либо из лигандов мешает связыванию другого.

димере (в результате этих процессов фермент полностью инактивируется).

В качестве альтернативы такой модели кооперативного аллостерического перехода по типу *вынужденного соответствия* мы можем рассматривать такой симметричный фермент, как имеющий только две возможные конформации, соответствующие структурам «фермент работает» и «фермент не работает», как это показано на рис. 3.61. Согласно такому представлению, связывание лиганда возмущает равновесие типа «все или ничего» между этими двумя состояниями, посредством чего изменяет долю активных молекул. Обе модели представляют истинную и удобную в использовании концепцию; вот эту вторую модель мы и опишем в очередном пункте.

3.2.19. Аллостерический переход в аспартаттранскарбамоилазе изучен с точностью до отдельных атомов

Одним из ферментов, применявшихся в ранних исследованиях аллостерической регуляции, была аспартаттранскарбамоилаза, получаемая из *E. coli*. Она катализирует важную реакцию, с которой начинается синтез пиримидинового кольца нуклеотидов С, U и Т: карбамоилфосфат + аспартат → N-карбамоиласпартат. Один из конечных продуктов этого пути, цитозинтрифосфат (СТР), связывается с ферментом, чтобы выключить его, всякий раз, когда концентрация СТР достигает определенного порога.

Аспартаттранскарбамоилаза представляет собой крупный комплекс из шести регуляторных и шести каталитических субъединиц. Каталитические субъединицы образуют два тримера, каждому из которых придана форма равностороннего

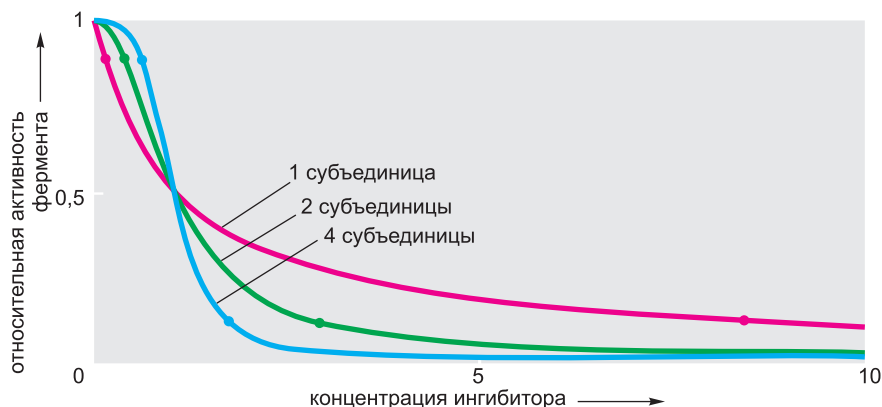
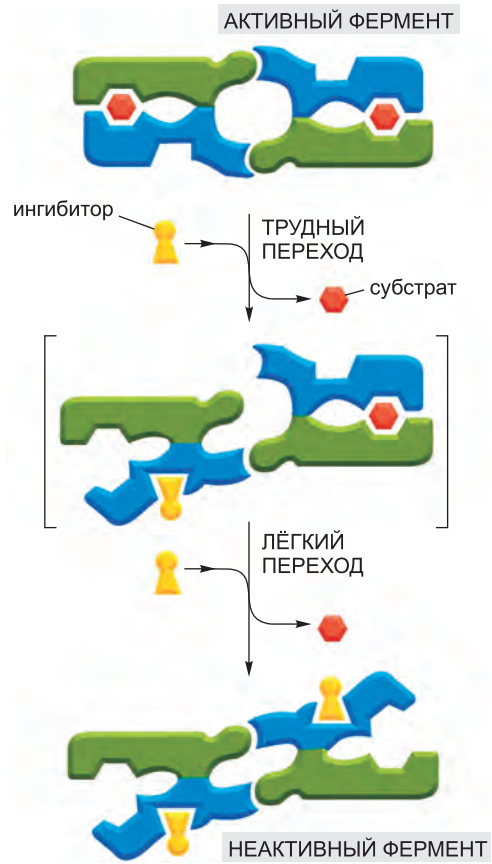


Рис. 3.60. Активность фермента в зависимости от концентрации ингибирующего лиганда: для фермента из одной субъединицы и многосубъединичных аллостерических ферментов. В случае фермента из одной-единственной субъединицы (красная линия) для снижения его ферментативной активности с 90 до 10% (отмечены двумя точками на кривой) требуется увеличение концентрации ингибитора в 100 раз. Активность фермента вычисляется из простого отношения равновесия $K = [IP]/[I][P]$, где P — активный белок, I — ингибитор, а IP — неактивный белок, связанный с ингибитором. Такая же кривая будет отражать характер любого простого взаимодействия типа связывания между двумя молекулами: А и В. В противоположность первому, многосубъединичный аллостерический фермент может откликнуться на изменение концентрации лиганда по типу «переключателя»: крутой участок кривой соответствует кооперативному связыванию молекул лиганда, которое поясняется на рис. 3.61. Здесь зеленая линия представляет идеализированный результат, ожидаемый от кооперативного связывания двух ингибирующих молекул лиганда с аллостерическим ферментом из двух субъединиц, а синяя линия показывает идеализированный «отклик» для фермента из четырех субъединиц. Как отмечено двумя точками на каждой из кривых, для более сложных ферментов снижение активности с 90 до 10% происходит в гораздо более узком диапазоне концентраций ингибитора, чем для фермента, состоящего из одной-единственной субъединицы.

треугольника; эти два тримера смотрят друг на друга и удерживаются в должном положении тремя регуляторными димерами, которые образуют своеобразный мост между ними. Вся молекула в целом подготовлена к осуществлению слаженного, отвечающего принципу «все или ничего» аллостерического перехода между двумя конформациями, обозначаемыми буквами Т (напряженное) и R (ненапряженное) состояния (рис. 3.62).

Связывание субстратов (карбамоилфосфата и аспартата) с каталитическими тримерами переводит аспартаттранскарбамоилазу в каталитически активное состояние R, что сопровождается диссоциацией регуляторных молекул СТР. И наоборот, связывание СТР с регуляторными димерами переводит фермент в неактивное состояние Т, и тогда происходит диссоциация субстрата. Такое «перетягивание каната» между СТР и субстратами по своему принципу тождественно описанному нами ранее «противоборству» на рис. 3.59 — на примере более простого аллостерического белка. Но поскольку подобного рода конкуренция развивается в симметричной молекуле с многочисленными участками связывания, фермент подвергается кооперативному аллостерическому переходу, который внезапно включает его при накоплении субстратов (переводя его в состояние R) или быстро отключает, если скопится большой объем СТР (переключая его в состояние Т).

Рис. 3.61. Кооперативный аллостерический переход в ферменте, состоящем из двух идентичных субъединиц. На данной схеме показан механизм, посредством которого конформация одной субъединицы может влиять на конформацию соседней. Связывание одной молекулы ингибирующего лиганда (желтого) с одной субъединицей фермента происходит с трудом, потому что приводит к изменению конформации этой субъединицы и таким образом нарушает симметрию фермента. Однако, как только такое конформационное изменение произошло, выигрыш в энергии, получаемый при восстановлении симметричности спаривания между этими двумя субъединицами, обуславливает возможность особенно легкого связывания второй субъединицы ингибирующего лиганда с осуществлением того же конформационного перехода. Поскольку связывание первой молекулы лиганда увеличивает сродство, с которым другая субъединица связывает тот же лиганд, реакция фермента на изменение концентрации этого лиганда намного более резкая, нежели отклик фермента, состоящего лишь из одной субъединицы (см. рис. 3.60).



Благодаря сочетанию биохимии и рентгеновской кристаллографии удалось выявить множество захватывающих подробностей такого аллостерического перехода. Каждая из регуляторных субъединиц имеет два домена, и связывание СТР вызывает смещение этих двух доменов друг относительно друга, так что они работают подобно рычагу, который поворачивает два каталитических тримера и подтягивает их ближе друг к другу в состоянии Т (см. рис. 3.62). Когда это происходит, между противостоящими каталитическими субъединицами образуются водородные связи. Это помогает расширить углубление, которое образует активный участок в пределах каждой каталитической субъединицы, и таким образом разрушает участки связывания субстратов (рис. 3.63). Увеличение количества субстрата вызывает противоположный эффект — когда предпочтение отдается состоянию R, ибо происходит связывание субстрата в углублениях всех каталитических субъединиц, что противодействует вышеописанному конформационному изменению. Конформации, которые являются промежуточными между состояниями R и T, неустойчивы, так что фермент главным образом перескакивает туда-сюда между своими R- и T-формами, давая смесь этих двух разновидностей в соотношениях, которые зависят от относительных концентраций СТР и субстратов.

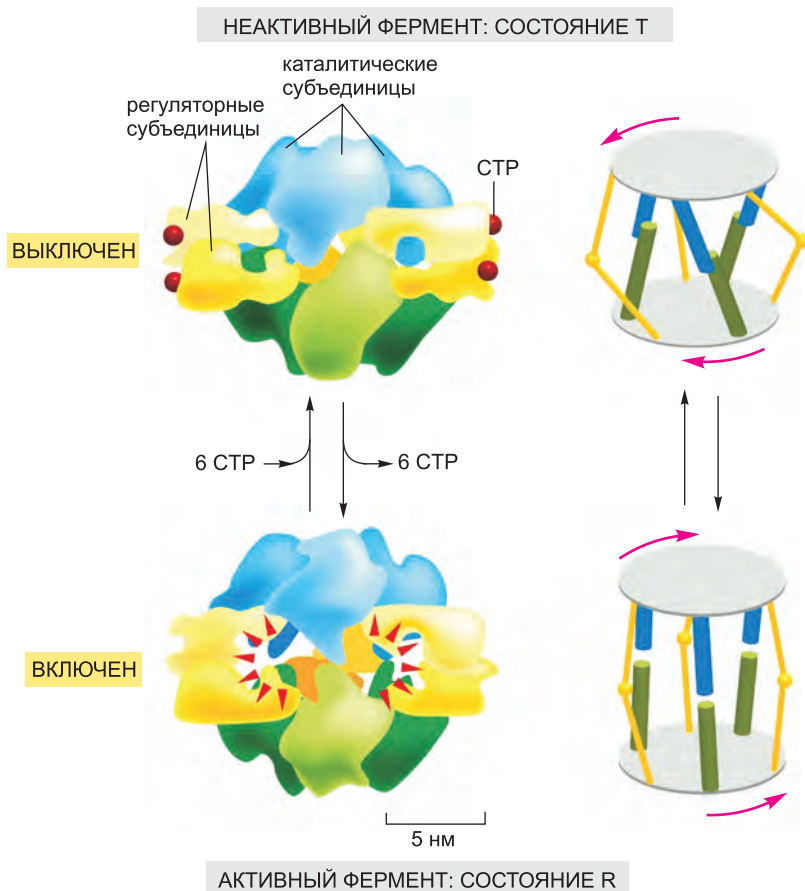


Рис. 3.62. Переход между состояниями R и T в ферменте аспартаттранскарбамоилазе. Этот фермент представляет собой комплекс из шести каталитических субъединиц и шести регуляторных субъединиц; структуры неактивной (состояние T) и активной (состояние R) форм этого фермента были определены с помощью рентгеноструктурной кристаллографии. Фермент «выключается» посредством ингибирования по типу обратной связи, когда концентрация CTP повышается. Каждая регуляторная субъединица может связать одну молекулу CTP — один из конечных продуктов протекающего через данный фермент метаболического пути. Посредством такой регуляции по типу отрицательной обратной связи этот путь огражден от производства большего количества CTP, чем это необходимо клетке. (В основу рисунка положена иллюстрация из K. L. Krause, K. W. Volz and W. N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1643–1647, 1985. С любезного разрешения National Academy of Sciences.)

3.2.20. Многие изменения в белках осуществляются за счет фосфорилирования

Белки регулируются отнюдь не только обратимым связыванием с какими-либо другими молекулами. Второй способ, к которому эукариотические клетки прибегают для регулирования функций белков, — ковалентное присоединение более мелкой молекулы к одной или нескольким боковым цепям аминокислот белка. Наиболее обычной формой такой регуляторной модификации у высших эукариот является присоединение фосфатной группы. Поэтому мы используем фосфорилирование

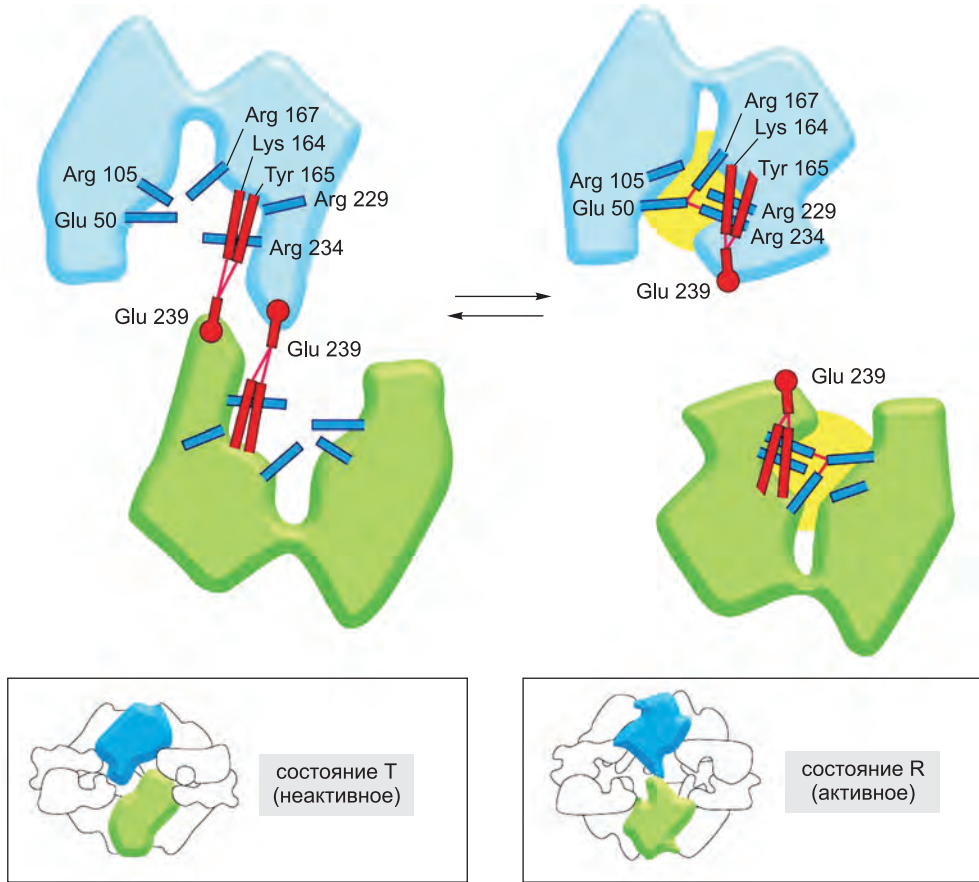


Рис. 3.63. Часть переключателя типа «включено-выключено» в каталитических субъединицах аспартаттранскарбамоилазы. Изменения в обозначенных водородных связях отчасти ответственны за переключение активного участка этого фермента на активную (*желтая*) или неактивную конформацию. Водородные связи обозначены *тонкими красными линиями*. Аминокислоты, вовлеченные во взаимодействие субъединица–субъединица в состоянии Т, показаны *красным*, тогда как те, что образуют активный участок фермента в состоянии R, показаны *синим*. На больших рисунках показан каталитический участок изнутри; заключенные в рамку эскизы показывают те же субъединицы на внешней поверхности фермента. (Переработано из E. R. Kantrowitz and W. N. Lipscomb, *Trends Biochem. Sci.* 15: 53–59, 1990. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

белка для иллюстрации некоторых общих принципов, лежащих в основе управления функцией белка путем модификации боковых цепей аминокислот.

Событие фосфорилирования может воздействовать на модифицируемый белок по двум важным путям. Во-первых, поскольку каждая фосфатная группа несет два отрицательных заряда, то катализируемое ферментом присоединение фосфатной группы к белку может вызвать значительное конформационное изменение в этом белке за счет, например, притяжения группы положительно заряженных боковых цепей аминокислот. Это может, в свою очередь, повлиять на связывание лигандов и тем самым заметно изменить активность фосфорилированного белка по сравнению с исходным. Когда второй фермент удаляет фосфатную группу, белок возвращается

в исходную конформацию и восстанавливает первоначальную активность.

Во-вторых, присоединенная фосфатная группа может образовать часть структуры, которую опознают участки связывания других белков. Как было сказано ранее, некоторые белковые домены, иногда называемые модулями, довольно часто входят в состав более крупных белков. Одним из таких модулей является домен SH2, описанный ранее, который связывается с короткой пептидной последовательностью, содержащей фосфорилированную боковую цепь тирозина (см. рис. 3.39, б). Более десяти других весьма распространенных доменов служат участками связывания для прикрепления несущего их белка к фосфорилированным пептидам, входящим в состав других белковых молекул, при этом каждый из этих доменов распознает фосфорилированную боковую цепь аминокислоты лишь в определенном пептидном контексте. В результате фосфорилирование и дефосфорилирование белка очень часто выступают движущей силой регулируемой сборки и разборки белковых комплексов (см. рис. 15.22).

В клетках эукариот обратимое фосфорилирование белка обеспечивает управле-

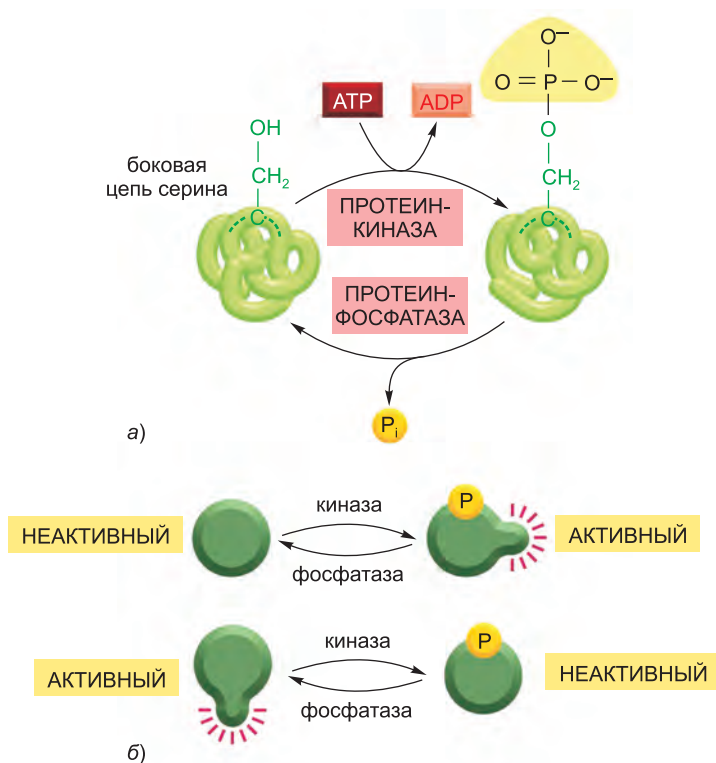


Рис. 3.64. Фосфорилирование белка. В типичной эукариотической клетке многие тысячи белков модифицируются путем ковалентного присоединения фосфатной группы. а) Приведенная здесь общая схема реакции дает представление о том, как с помощью протеинкиназы фосфатная группа АТФ переносится на боковую цепь аминокислоты целевого белка. Удаление фосфатной группы катализируется вторым ферментом — протеинфосфатазой. В данном примере фосфат модифицирует боковую цепь серина; в других случаях фосфат, вместо этого, присоединяется по группе —ОН треонина или тирозина целевого белка. б) Фосфорилирование белка протеинкиназой может либо увеличивать, либо уменьшать активность белка — в зависимости от участка фосфорилирования и структуры этого белка.

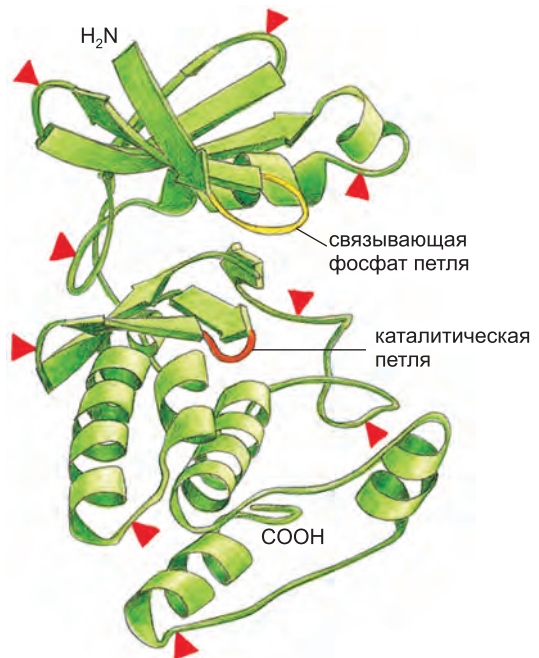
ние активностью, структурой и размещением в клетке как ферментов, так и белков многих других типов. Фактически, такая регуляция настолько всеобъемлюща, что более трети из 10 000 или около того белков в типичной клетке млекопитающих, как думают, подвергается фосфорилированию в любой момент времени — и многие более чем одним фосфатом. Как можно ожидать, добавление фосфатных групп к определенным белкам и «отъятие» первых от последних часто происходит в ответ на сигналы, определяющие некоторое изменение в состоянии клетки. Например, сложная череда событий, которая имеет место во время деления эукариотической клетки, в значительной степени хронометрируется именно таким способом (будет раскрыто в главе 17) и многие сигналы, опосредствующие межклеточные взаимодействия, передаются с плазматической мембраны к ядру при помощи каскада событий фосфорилирования белка (рассмотрим в главе 15).

3.2.21. Все эукариотические клетки содержат богатый набор протеинкиназ и протеинфосфатаз

Процесс фосфорилирования белка включает в себя катализируемый ферментом перенос конечной фосфатной группы молекулы АТФ на гидроксильную группу боковой цепи серина, треонина или тирозина в молекуле этого белка (рис. 3.64). Эта реакция катализируется **протеинкиназой** и является в высшей степени однонаправленной из-за высвобождения большого количества свободной энергии при разрыве межфосфатной связи в АТФ с последующим образованием АДФ (о чем говорилось в главе 2). **Протеинфосфатаза** катализирует обратную реакцию — удаление фосфата, или *дефосфорилирование*. Клетки содержат сотни различных протеинкиназ, каждая из которых отвечает за фосфорилирование своего белка или набора белков. Имеется в них также множество различных протеинфосфатаз; некоторые из них крайне специфичны и удаляют фосфатные группы только с одного или с нескольких белков, тогда как другие работают с широким диапа-

Рис. 3.65. Трехмерная структура протеинкиназы.

Нанесенные на эту структуру *красные стрелки* указывают участки, в которых у некоторых членов семейства протеинкиназ были обнаружены вставки размером 5–100 аминокислот. Эти вставки расположены в находящимся на поверхности фермента петлях, где другие лиганды взаимодействуют с этим белком. Таким образом, они служат отличительными признаками различных киназ и обуславливают характерные для них взаимодействия с другими белками. АТФ (который отдает фосфатную группу) и пептид, подлежащий фосфорилированию, удерживаются в активном участке, который простирается между связывающей фосфат петлей (*желтой*) и каталитической петлей (*оранжевой*). См. также рис. 3.10. (Переработано на основе D.R. Knighton et al., *Science* 253: 407–414, 1991. С любезного разрешения издательства AAAS.)



зоном белков и нацеливаются на определенные субстраты своими регуляторными субъединицами. Состояние фосфорилирования белка в любой момент времени, и тем самым его активность, зависит от относительной активности протеинкиназ и протеинфосфатаз, которые его модифицируют.

Протеинкиназы, которые фосфорилируют белки в ядерных клетках, принадлежат к очень большому семейству ферментов, которые имеют общую каталитическую (киназную) последовательность из приблизительно 290 аминокислот. Разные члены семейства содержат различные последовательности аминокислот на обоих концах киназной последовательности (например, см. рис. 3.10) и часто имеют короткие последовательности аминокислот, вставленные в петли внутри нее (*красные стрелки на рис. 3.65*). Некоторые из таких дополнительных аминокислотных последовательностей позволяют каждой киназе распознавать определенный набор белков, ею фосфорилируемый, или связываться со структурами, которые удерживают ее в определенных областях клетки. Другие составные части этого белкового фермента регулируют активность данной киназы, так что она может быть «включена» и «выключена» в ответ на различные специальные сигналы, как будет описано ниже.

На основании сравнений числа различий в аминокислотной последовательности разных членов семейства белков можно построить «эволюционное дерево», которое, как думают, отражает схему событий дублирования и расхождения генов, которые и повлекли за собой развитие семейства. На **рис. 3.66** изображено эволюционное дерево протеинкиназ. Киназы с близкими функциями часто расположены на близлежащих ветвях дерева: например, все протеинкиназы, участвующие в передаче сигналов в клетке, завершающейся фосфорилированием боковых цепей тирозина, группируются в верхнем левом углу дерева. Другие представленные здесь кина-

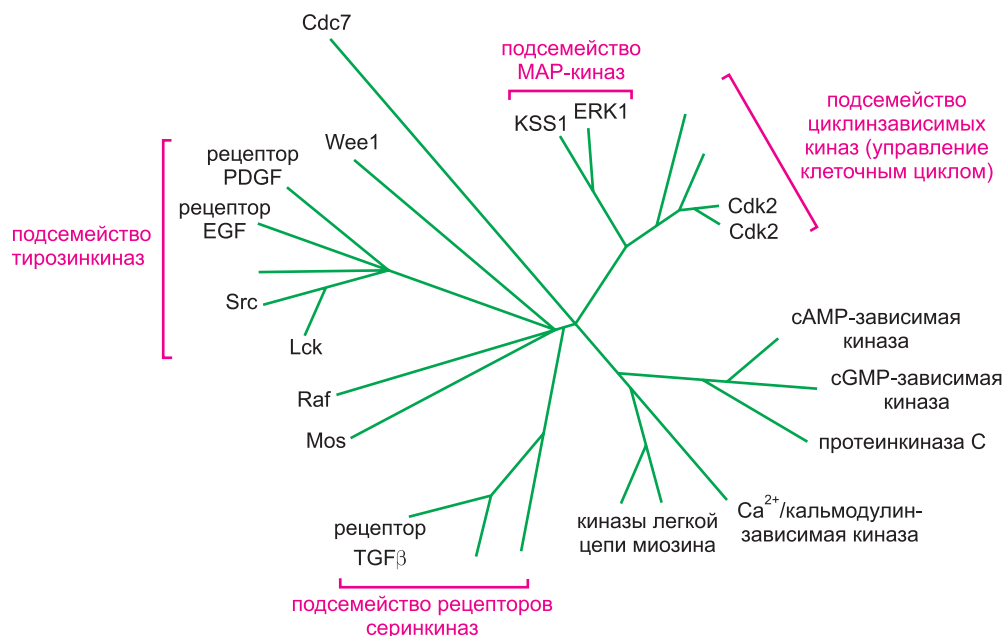


Рис. 3.66. Эволюционное дерево избранных протеинкиназ. Хотя всякая клетка высших эукариот содержит сотни таких ферментов, а геном человека кодирует более 500, лишь некоторые из упоминаемых в этой книге показаны на данном рисунке.

зы фосфорилируют боковые цепи серина либо треонина, а многие организованы в группы, которые, кажется, отражают их функцию — трансмембранную передачу сигналов, усиление внутриклеточных сигналов, управление клеточным циклом и так далее.

В результате совместных действий протеинкиназ и протеинфосфатаз фосфатные группы на белках непрерывно оборачиваются — присоединяются и затем быстро удаляются. Такие циклы фосфорилирования могут показаться неэкономными, но они важны уже лишь тем, что позволяют фосфорилируемым белкам быстро переключаться из одного состояния в другое: чем быстрее цикл, тем быстрее совокупность белковых молекул может изменить свое состояние фосфорилирования в ответ на внезапное изменение скорости фосфорилирования (см. рис. 15.11). Энергия, необходимая для подпитки такого цикла фосфорилирования, поступает от гидролиза АТФ — на одно событие фосфорилирования расходуется одна молекула АТФ.

3.2.22. Регулирование Cdk- и Src-протеинкиназ показывает, каким образом белок может функционировать в качестве микрочипа

Сотни различных протеинкиназ, находящихся в ядерной клетке, организованы в сложные сети путей передачи сигналов, которые помогают координировать действия клетки, осуществлять клеточный цикл и проводить сигналы в клетку из окружающей ее среды. Нужно, чтобы многие из пробегающих по этой сети внеклеточных сигналов и интегрировались и усиливались клеткой. Отдельные протеинкиназы (равно как и прочие сигнальные белки) служат своеобразными устройствами ввода-вывода, или «микрочипами», в процессе интеграции сигналов. Важный вклад в такие обрабатывающие сигналы системы белков вносит регулирование их «работы» путем присоединения к ним и удаления с них фосфатов соответственно протеинкиназами и протеинфосфатазами.

Вообще, если одни наборы фосфатных групп служат для активации белка, то другие наборы могут инактивировать его. Хорошим примером служит циклин-зависимая протеинкиназа (Cdk). Киназы этого класса фосфорилируют серин и треонин и выступают ключевыми составляющими системы управления клеточным циклом в клетках эукариот, о чем будет подробно рассказано в главе 17. В клетке позвоночных отдельные белки Cdk включаются и выключаются в определенной последовательности, по мере того как клетка проходит различные этапы цикла деления. Когда киназа активна, она влияет на различные моменты поведения клетки за счет воздействий на фосфорилируемые ею белки.

Белок Cdk начинает проявлять действие серин/треонин-протеинкиназы только будучи связанным со вторым белком, названным *циклином*. Но, как видно на



Рис. 3.67. Как белок Cdk выполняет роль интегрирующего устройства. Функция этих главных регуляторов клеточного цикла обсуждается в главе 17.

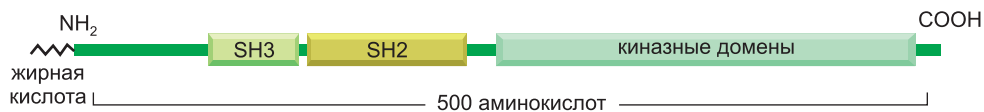


Рис. 3.68. Доменная структура семейства Src-протеинкиназ, нанесенная на карту последовательности аминокислот. Желаящим увидеть трехмерную структуру Src следует обратиться к рис. 3.10.

рис. 3.67, связывание циклина есть лишь один из трех разных «вводов», необходимых для активации Cdk. В дополнение к связыванию циклина, к боковой цепи определенного треонина должен быть присоединен фосфат, а в другом месте белка должен быть удален один фосфат (ковалентно связанный с боковой цепью определенного тирозина). Cdk, таким образом, отслеживает определенный набор компонентов клетки: циклин, протеинкиназа и протеинфосфатаза — и выступает устройством «ввода-вывода», которое включается тогда и только тогда, когда все эти компоненты достигают положенного им состояния активности. Концентрация некоторых циклинов растет и падает в ногу с клеточным циклом, постепенно повышаясь в количестве, пока они внезапно не будут разрушены в определенной точке цикла. Внезапное разрушение циклина (путем целенаправленного протеолиза) немедленно выключает его партнера — фермент Cdk, и это событие запускает определенный этап клеточного цикла.

Поведение семейства Src-протеинкиназ (см. рис. 3.10) тоже напоминает работу микрочипов — по аналогии с вышеописанным. Белок *Src* (произносится «сарк» и назван по имени типа опухоли — саркомы, — которую прекращение его регулирования может вызвать) был первым из открытых тирозинкиназ. Он, как ныне известно, является частью подсемейства из девяти весьма подобных протеинкиназ, которые обнаружены только у многоклеточных животных. Как видно по эволюционному дереву на рис. 3.66, сравнения последовательностей говорят о том, что тирозинкиназы как группа были относительно поздним новшеством, которое отделилось от серин/треонинкиназ, причем подсемейство Src является только одной из нескольких подгрупп тирозинкиназ, появившихся таким способом.

Белок Src и родственные ему белки содержат короткую N-концевую область, которая ковалентно связана с сильно гидрофобной жирной кислотой, что удерживает киназу у соприкасающейся с цитоплазмой стороны плазматической мембраны. Затем идут два связывающихся с пептидом модуля, гомологичный Src домен 3 (SH3) и домен SH2, за которыми следует каталитический домен киназы (**рис. 3.68**). Такие киназы обычно пребывают в неактивной конформации, в которой фосфорилированный тирозин около C-конца связан с доменом SH2, а домен SH3 связан с внутренним пептидом, в результате чего активный участок фермента оказывается искаженным, что способствует его переходу в неактивное состояние.

В активацию киназы вовлечены по крайней мере два определенных процесса: удаление C-концевого фосфата и связывание с доменом SH3 специфического активирующего белка (**рис. 3.69**). Подобно активации белка Cdk, активация Src-киназы сигнализирует о завершении череды отдельных событий и о ее готовности войти в череду следующих (**рис. 3.70**). Таким образом, и семейство Cdk и семейство Src-белков служат своеобразными интеграторами сигналов и способствуют организации сложной сети событий обработки информации, которая позволяет клетке выстраивать логические ответы на сложный набор условий.

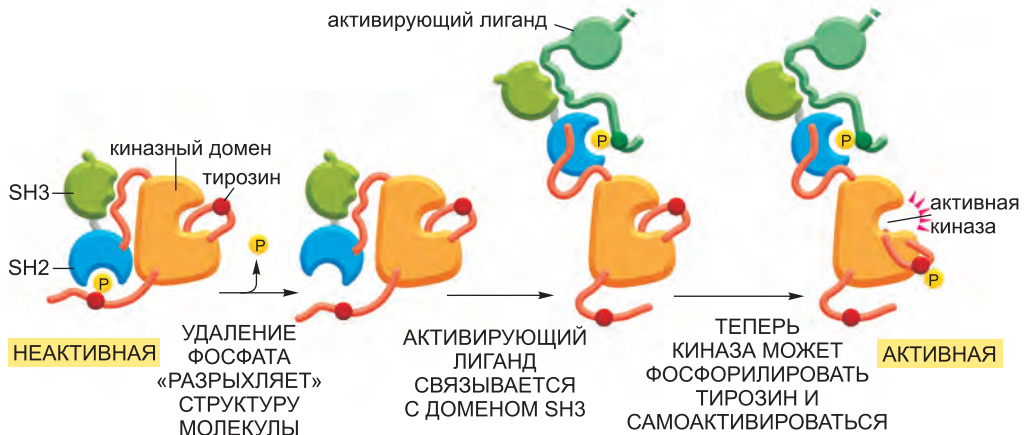


Рис. 3.69. Активация протеинкиназы Src-типа двумя последовательными событиями. (Переработано из S. C. Harrison et al., *Cell* 112: 737–740, 2003. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

3.2.23. Белки, которые связывают и гидролизуют GTP, суть вездесущие клеточные регуляторы

Мы описали то, как процессы присоединения к белку фосфатных групп или их удаления с него могут быть использованы клеткой для управления активностью этого белка. В доселе рассмотренных нами примерах фосфат переносится с молекулы АТФ на боковую цепь входящей в состав белка аминокислоты в ходе реакции, катализируемой определенной протеинкиназой. Клеткам эукариот знаком также и другой способ управления активностью белка — путем присоединения и удаления фосфата. В этом случае фосфат не присоединяется непосредственно к белку; вместо этого, он является частью гуанинового нуклеотида GTP, который очень прочно связывается с белком. Вообще, белки, регулируемые таким способом, находятся в своих активных конформациях, будучи связаны с GTP. Потеря фосфатной группы происходит, когда связанный GTP гидролизуется до GDP в ходе реакции, катализируемой самим белком, и в таком связанном с GDP состоянии белок неактивен. Таким способом GTP-связывающие белки работают двухпозиционными переключателями, активность которых определяется присутствием или отсутствием дополнительного фосфата на связанной молекуле GDP (**рис. 3.71**).

GTP-связывающие белки (называемые также GTPаза ввиду катализируемого ими гидролиза GTP) охватывают большое семейство белков, все из которых содержат разновидности одного и того же связывающего GTP глобулярного домена. Когда прочно связанный GTP гидролизуется до GDP, этот домен подвергается конформационному изменению, в результате которого инактивируется. Трехмерная структура прототипного члена этого семейства, мономерной GTPазы, известной под названием Ras, показана на **рис. 3.72**.

Белок Ras играет важную роль в передаче сигналов в клетках (обсуждается в главе 15). В связанной с GTP форме он активен и стимулирует каскад реакций фосфорилирования белка в клетке. Большую часть времени, однако, белок находится в неактивной, связанной с GDP форме. Он становится активным, когда заменяет свою молекулу GDP на молекулу GTP в ответ на внеклеточные сигналы, такие

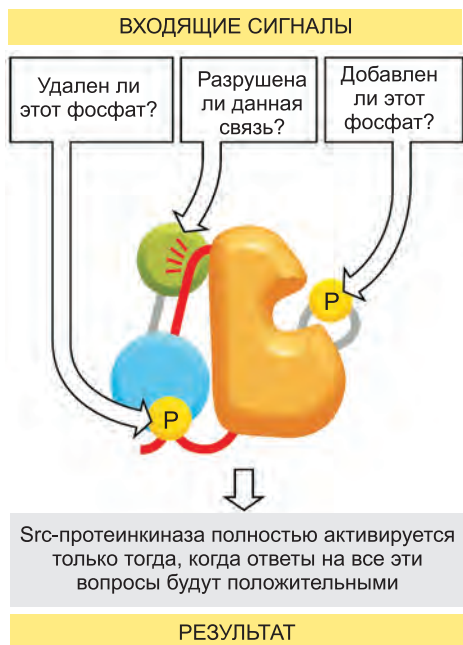


Рис. 3.70. Принцип работы протеинкиназы Src-типа в качестве интегрирующего устройства. Нарушение взаимодействия с доменом SH3 (зеленый) состоит в замене его связывания с обозначенной красным связующей областью на более сильное связывание с активирующим лигандом, как показано на рис. 3.69.

как факторы роста, которые связываются с рецепторами, находящимися в плазматической мембране (см. рис. 15.58).

3.2.24. Регуляторные белки управляют активностью GTP-связывающих белков, побуждая их к связыванию либо GTP, либо GDP

GTP-связывающие белки управляются регуляторными белками, которые решают, будет ли с ними связан GTP или GDP, точно так же как фосфорилируемые белки включаются и выключаются протеинкиназами и

протеинфосфатазами. Так Ras инактивируется *активирующим GTPазу белком* (*GAP, GTPase-activating protein;*), который связывается с белком Ras и побуждает его гидролизировать связанную им молекулу GTP до GDP — которая остается прочно связанной, — и неорганического фосфата (P_i), который быстро высвобождается. Белок Ras остается в своей бездействующей, GDP-связанной конформации,

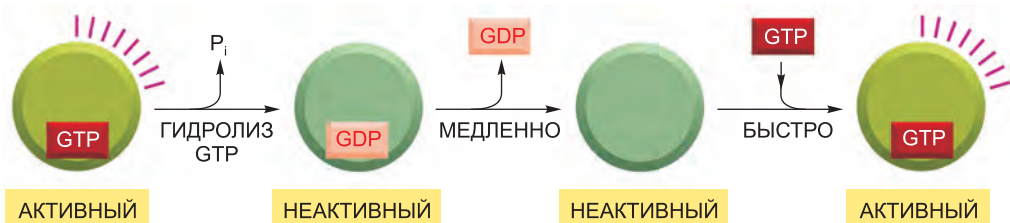


Рис. 3.71. GTP-связывающие белки в роли молекулярных переключателей. Для активности GTP-связывающего белка (называемого также GTPазой), как правило, необходимо присутствие прочно связанной молекулы GTP (состояние «включено»). Гидролиз этой молекулы GTP дает GDP и неорганический фосфат (P_i), что побуждает белок перейти в другую, обычно неактивную, конформацию (состояние «выключено»). Как показано на этом рисунке, для возврата переключателя в исходное состояние необходимо, чтобы прочно связанный GDP отделился от фермента, — медленная стадия, которая значительно ускоряется определенными сигналами; как только GDP отделился, молекула GTP вновь быстро присоединяется к белку.

пока не сталкивается с *фактором обмена нуклеотида гуанина* (*guanine nucleotide exchange factor*; *GEF*), который связывается с комплексом GDP–Ras и вынуждает его высвободить молекулу GDP. Поскольку пустой участок связывания нуклеотида незамедлительно занимает молекула GTP (в клетках GTP присутствует в большом избытке над GDP), GEF активирует Ras путем *косвенного* возвращения фосфата, удаленного в ходе гидролиза GTP, на свое исконное место. Таким образом, в некотором смысле роли GAP и GEF аналогичны соответственно протеинфосфатазе и протеинкиназе (рис. 3.73).

3.2.25. Небольшие движения в белках могут приводить к масштабным изменениям

Белок Ras принадлежит к большому надсемейству *мономерных GTPаз*, каждая из которых состоит из единственного GTP-связывающего домена размером приблизительно 200 аминокислот. В ходе эволюции этот домен присоединился также и к более крупным белкам с дополнительными доменами, в результате чего образовалось многочисленное семейство GTP-связывающих белков. Члены этого семейства включают связанные с рецепторами тримерные G-белки, участвующие в передаче сигналов в клетках (обсудим в главе 15); белки, регулирующие движение

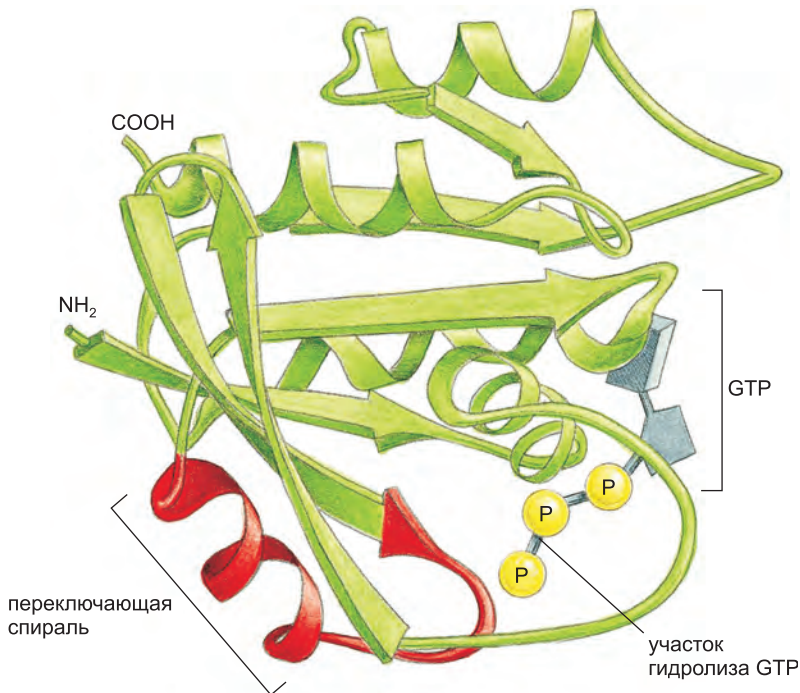


Рис. 3.72. Структура белка Ras в связанной с GTP форме. Эта мономерная GTPаза иллюстрирует структуру связывающего GTP домена, наличие коего характерно для членов большого семейства GTP-связывающих белков. *Красные* области изменяют свою конформацию, когда молекула GTP гидролизуется белком до GDP и неорганического фосфата; GDP остается связанным с белком, а неорганический фосфат высвобождается. Специальная роль «переключающей спирали» в белках, связанных с Ras, объясняется далее (см. рис. 3.75).

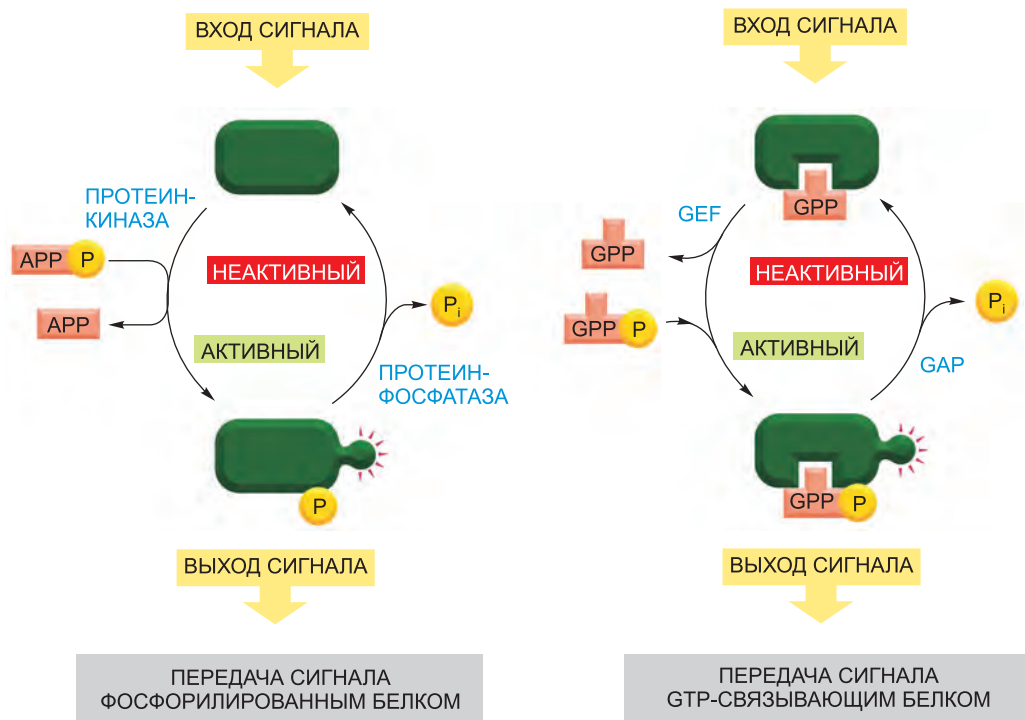


Рис. 3.73. Сравнение двух главных внутриклеточных механизмов передачи сигналов в клетках эукариот. В обоих случаях сигнальный белок активируется за счет присоединения фосфатной группы и инактивируется посредством удаления этого фосфата. Для того чтобы подчеркнуть сходство этих двух путей, ATP и GTP представлены соответственно в виде APPP и GPPP, а ADP и GDP — в виде APP и GPP. Как показано на рис. 3.64, присоединение фосфата к белку может оказывать и ингибирующее действие.

пузырьков между внутриклеточными полостями (обсудим в главе 13); и белки, которые связываются с транспортной РНК и востребованы в качестве факторов сборки для синтеза белка в рибосоме (рассмотрим в главе 16). В каждом случае жизненно важная биологическая функция управляется изменением конформации белка, вызываемым гидролизом GTP в домене, подобном Ras.

Хорошим примером принципа действия белков этого семейства служит белок *EF-Tu*. В клетке *EF-Tu* присутствует в большом количестве, выполняя роль фактора элонгации (продления цепи — отсюда название *EF* — elongation factor) в ходе синтеза белка: *EF-Tu* осуществляет погрузку молекул аминокил-тРНК на рибосому. Молекула тРНК образует прочный комплекс с GTP-связанной формой *EF-Tu* (рис. 3.74). В этом комплексе аминокислота, прикрепленная к тРНК, размещена таким образом, что не может участвовать в синтезе белка. тРНК может отдать связанную с ней аминокислоту только после того, как связанный с *EF-Tu* GTP будет гидролизован на рибосоме, что позволит *EF-Tu* отсоединиться. Поскольку гидролиз GTP запускается точным соответствием молекулы тРНК молекуле мРНК на рибосоме, *EF-Tu* выполняет функцию фактора, различает правильные и неправильные пары мРНК–тРНК (рис. 6.67 служит отправной точкой для дальнейшего экскурса на тему этой функции *EF-Tu*).

Рис. 3.74. Аминоацил-тРНК, связанная с EF-Tu. Три домена белка EF-Tu окрашены по-разному, соответственно цветам на рис. 3.75. Это бактериальный белок; однако весьма подобный белок существует у эукариот; его называют EF-1. (Из P. Nissen et al., *Science* 270: 1464–1472, 1995. С любезного разрешения издательства AAAS.)

Сравнивая трехмерные структуры EF-Tu в его связанной с GTP и GDP формах, можно видеть, как происходит изменение положения тРНК. Отделение группы неорганического фосфата (P_i), которым сопровождается реакция $GTP \rightarrow GDP + P_i$, вызывает сдвиг на несколько десятых нанометра в участке связывания GTP, так же как это происходит в белке Ras. Этот ничтожно малый сдвиг, равный нескольким диаметрам атома водорода, вызывает конформационное изменение, которое распространяется по важнейшей части α -спирали, названной *переключающей спиралью* (*switch*

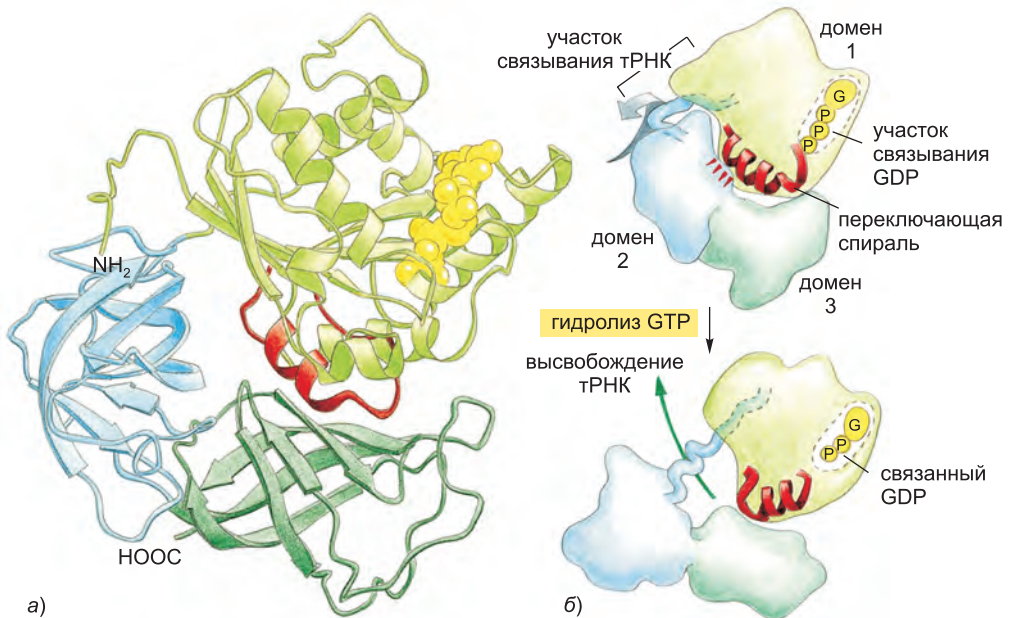
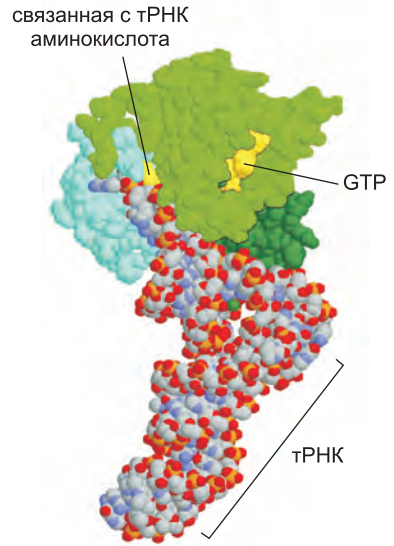


Рис. 3.75. Важнейшее конформационное изменение в EF-Tu, вызываемое гидролизом GTP. а) Трехмерная структура EF-Tu со связанным с ним GTP. Домен сверху имеет структуру, подобную белку Ras, и его *красная* α -спираль является переключающей спиралью, которая смещается после гидролиза GTP. б) Изменение конформации переключающей спирали в домене 1 вызывает поворот доменов 2 и 3 как целостной единицы примерно на 90° в сторону наблюдателя, в результате чего высвобождается тРНК, которая была показана связанной с этой структурой на рис. 3.74. (Рис. а переработан из H. Berchtold et al., *Nature* 365:126–132, 1993. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd. Изображение б любезно предоставили Mathias Sprinzl и Rolf Hilgenfeld.)

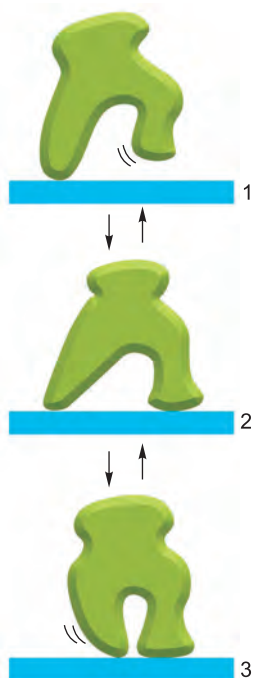


Рис. 3.76. Аллостерический «шагающий» белок. Хотя три его различные конформации позволяют ему «блуждать» беспорядочно взад и вперед, будучи связанным с волокном или филаментом, этот белок не способен равномерно передвигаться в каком-либо одном направлении.

helix), в Ras-подобном домене этого белка. Переключающая спираль напоминает своеобразную защелку, которая будучи сцеплена с определенным участком в другом домене молекулы, удерживая белок в «замкнутой» конформации. Конформационное изменение, запускаемое гидролизом GTP, заставляет переключающую спираль раскрываться, отпуская связанные с ней домены, которые выворачиваются в сторону на расстояние приблизительно 4 нм. В результате этого связанная молекула тРНК высвобождается, а бывшая с ней аминокислота получает возможность быть встроенной в полипептид (рис. 3.75).

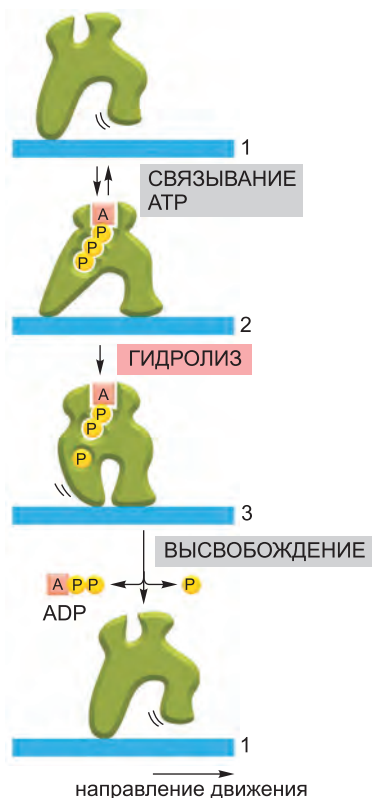
В этом примере интересно обратить внимание на то, как клетки используют энергию простой химической реакции, которая происходит на поверхности маленького белкового домена, чтобы произвести движение в 50 раз большее по размаху. При значительных изменениях подобного типа происходят очень большие передвижки, как в двигательных, или моторных, белках, о чем

мы поговорим позже.

3.2.26. Движение в клетках обеспечивают моторные белки

Мы узнали, что конформационные изменения в белках играют центральную роль в регуляции работы ферментов и передаче сигналов в клетках. Теперь мы обсудим белки, главная функция которых заключается в перемещении других молекул. Такие **моторные белки** производят силы, за счет которых осуществляется сокращение мышц, а также ползание и плавание клеток. Моторные белки ответственны также и за внутриклеточные движения гораздо меньшего масштаба: они помогают перемещать хромосомы к противоположным концам клетки во время митоза (обсуждается в главе 17), передвигать органеллы по молекулярным путям в

Рис. 3.77. Аллостерический моторный белок. Переход между тремя различными конформациями включает этап перемещения, который обусловлен гидролизом связанной молекулы АТФ, и благодаря этому полный цикл становится по существу необратимым. Поэтому, осуществляя повторные циклы, белок непрерывно перемещается вправо по нити.



пределах клетки (обсуждаем в главе 16) и перемещать ферменты по цепи ДНК в процессе синтеза новой молекулы ДНК (обсуждается в главе 5). Все эти основополагающие процессы зависят от белков, в состав которых входят двигательные домены и которые являются своего рода силовыми машинами.

Как такие машины работают? Другими словами, как клетки используют изменения формы в белках, чтобы производить направленные движения? Если, например, белок должен идти по узкой нити типа молекулы ДНК, он может делать это за счет прохождения через ряд конформационных изменений наподобие представленных на [рис. 3.76](#). Но не имея ничего, что могло бы осуществлять эти изменения в строгой последовательности, они будут абсолютно обратимы, и белок обречен лишь беспорядочно блуждать по нити взад и вперед. Мы можем взглянуть на эту ситуацию иначе. Так как имеет место направленное движение белка, законы термодинамики (рассмотренные нами в главе 2) требуют, чтобы такое движение использовало свободную энергию из какого-то другого источника (в противном случае такой белок мог бы быть использован для создания вечного двигателя). Следовательно, без подачи энергии молекула белка может лишь скитаться туда-сюда безо всякой цели.

Как клетка может сделать такой ряд конформационных изменений однонаправленным? Чтобы полный цикл протекал лишь в одном направлении, достаточно сделать какое-либо одно из изменений формы необратимым. Большая часть белков, которые способны продвигаться в одном направлении на большие расстояния, достигает этого за счет сопряжения одного из конформационных изменений с гидролизом связанной с ними молекулы АТФ. Механизм подобен только что описанному — который питает изменения формы аллостерического белка энергией гидролиза GTP. Поскольку при гидролизе АТФ (или GTP) высвобождается большая порция свободной энергии, очень маловероятно, что связывающий нуклеотид белок претерпит обратное изменение формы, необходимое для движения назад, так как для этого потребовалось бы, чтобы он обратил вспять также и гидролиз АТФ, добавляя молекулу фосфата к ADP с воссозданием АТФ.

В модели, показанной на [рис. 3.77](#), связывание АТФ переводит моторный белок из конформации 1 в конформацию 2. После этого связанный АТФ гидролизуется с образованием ADP и неорганического фосфата (P_i), что вызывает изменение конформации 2 в конформацию 3. Наконец, высвобождение связанных ADP и P_i переключает белок обратно в конформацию 1. Поскольку энергия, вырабатываемая в ходе гидролиза АТФ, расходуется на переход $2 \rightarrow 3$, этот ряд конформационных изменений является фактически необратимым. Таким образом, полный цикл происходит только в одном направлении, в силу чего молекула белка непрерывно перемещается вправо, как показано в данном примере.

Многие моторные белки направляют движение именно таким общим способом, в том числе и двигательный белок мышц *миозин*, который движется по актиновым филаментам, чтобы вызвать сокращение мышцы, и белки *кинезины*, которые передвигаются по микротрубочкам (оба белка будут подробнее рассмотрены в главе 16). Подобного рода движения могут быть быстрыми: некоторые моторные белки, участвующие в репликации ДНК (ДНК-хеликазы), продвигаются по нити ДНК с такими высокими скоростями, как 1000 нуклеотидов в секунду.

3.2.27. Связанные с мембраной переносчики используют энергию для перекачивания молекул через мембраны

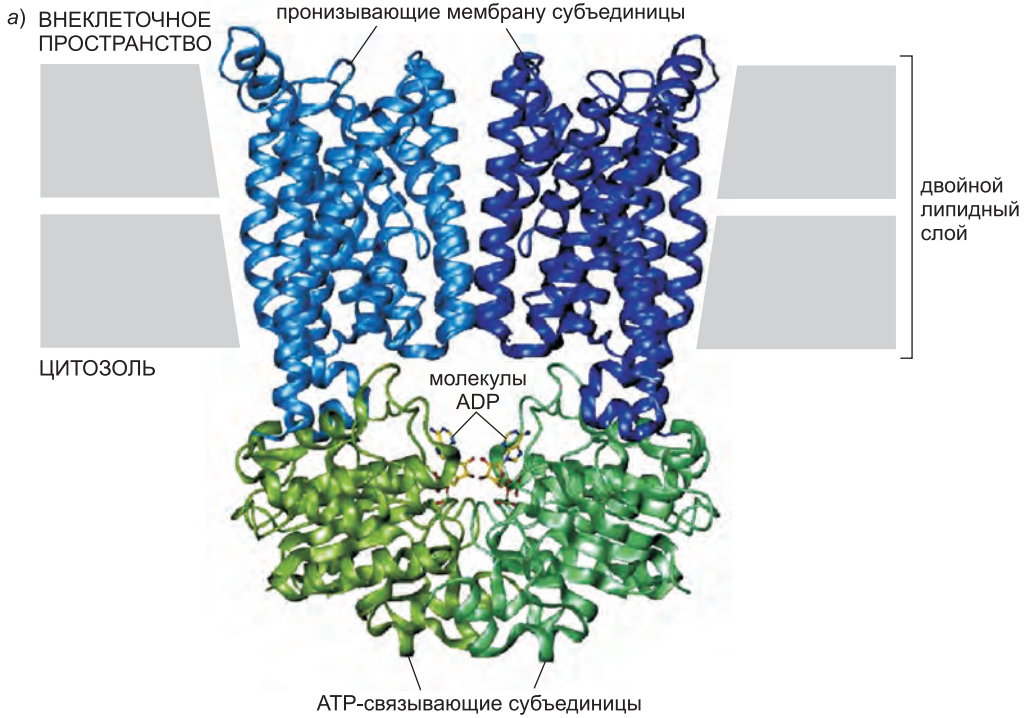
К настоящему времени мы познакомились с тем, как аллостерические белки могут работать в качестве микрочипов (Cdk и Src-киназы), факторов сборки (EF-Tu) и генераторов механической силы и движения (моторные белки). Аллостерические белки могут также использовать энергию, полученную за счет гидролиза АТФ, градиентов концентрации ионов или процессов переноса электронов, для перекачивания определенных ионов или малых молекул через мембраны. Здесь и сейчас мы рассмотрим один из таких примеров; другие же отложим до главы 11.

АВС-переносчики (АТФ-binding cassette) образуют важный класс связанных с мембраной белков-насосов. У людей кодируют их по крайней мере 48 различных генов. Эти переносчики главным образом работают на экспорт гидрофобных молекул из цитоплазмы и тем самым выполняют, например, задачу удаления токсичных молекул у поверхности слизистой оболочки кишечного тракта или в гематоэнцефалическом барьере. Изучение АВС-переносчиков представляет большой интерес в клинической медицине, потому что перепроизводство белков этого класса вносит вклад в развитие устойчивости опухолевых клеток к химиотерапевтическим лекарствам. А у бактерий белки того же типа выполняют главным образом функцию импорта необходимых питательных веществ в клетку.

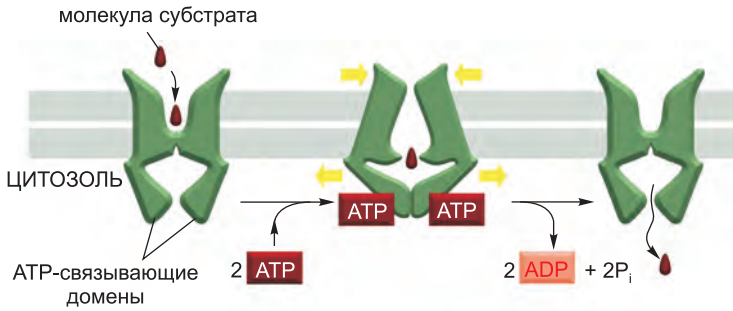
АВС-переносчик представляет собой тетрамер, состоящий из пары пронизывающих мембрану субъединиц, связанных с парой АТФ-связывающих субъединиц, расположенных чуть ниже плазматической мембраны (рис. 3.78, а). Как и в других рассмотренных нами примерах, гидролиз связанных молекул АТФ сопровождается конформационными изменениями в белке, причем такой силы, что это заставляет пронизывающие мембрану субъединицы перемещать связанные ими молекулы сквозь двойной липидный слой (рис. 3.78, б).

Люди изобрели множество различных типов механических насосов, и не должно выглядеть удивительным, что клетки тоже содержат привязанные к мембране насосы, которые, правда, работают иным образом. В числе наиболее примечательных — ротационные насосы, которые сопрягают гидролиз АТФ с переносом ионов H^+ (протонов). Эти насосы напоминают собой миниатюрные турбины и используются для подкисления внутренней среды лизосом и других органелл эукариот. Подобно другим ионным насосам, которые создают градиенты концентрации ионов, они могут выполнять обратную функцию и катализировать реакцию $ADP + P_i \rightarrow ATP$, если установившийся в мембране градиент того иона, который они переносят, будет

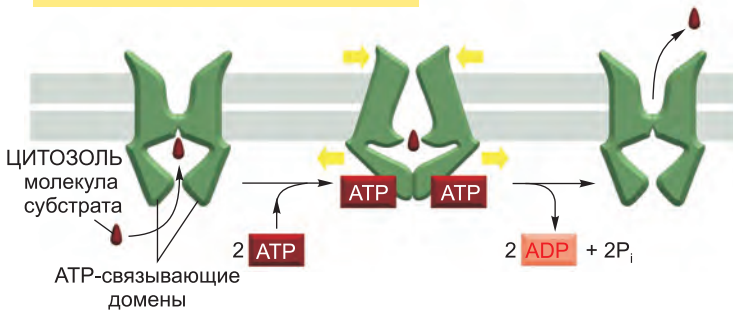
Рис. 3.78. Переносчик АВС (АТФ-связывающая кассета) — белковая машина, которая перекачивает большие гидрофобные молекулы через мембрану. а) Бактериальный белок BtuCD, который импортирует витамин B_{12} в *E. coli*, потребляя для этого энергию гидролиза АТФ. Связывание двух молекул АТФ приводит к образованию смычки между двумя АТФ-связывающими субъединицами. Структура представлена в АДФ-связанном состоянии, где канал во внеклеточное пространство, как можно видеть, открыт, но проход к цитозолю остается закрытым. б) Схематическое представление перекачки субстрата АВС-переносчиками. У бактерий связывание молекулы субстрата на внеклеточной стороне белкового комплекса запускает гидролиз АТФ, сопровождаемый высвобождением АДФ, в результате чего открывается проход к цитоплазме; после этого насос принимает исходное состояние в клетках и становится готовым к осуществлению следующего цикла. В эукариотических клетках имеет место противоположный процесс, в ходе которого молекулы субстрата выкачиваются из клетки. (Изображение а переработано из К. Р. Locher, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 426–441, 2004. С любезного разрешения издательства Elsevier.)



б) АВС-ПЕРЕНОСЧИК У БАКТЕРИЙ



АВС-ПЕРЕНОСЧИК У ЭУКАРИОТ



достаточно крутым.

Один из таких насосов, АТФ-синтаза, использует градиент концентрации протонов, устанавливаемый за счет процессов переноса электронов, для выработки большей части АТФ, используемой в живом мире. Этот повсеместный насос играет центральную роль в преобразовании энергии, и мы непременно изучим его трехмерную структуру и обсудим механизм его работы в главе 14.

3.2.28. Часто белки образуют крупные комплексы, из которых получаются настоящие белковые машины

Крупные белки, состоящие из многих доменов, способны выполнять более сложные функции, чем маленькие, однодоменные белки. Однако наиболее впечатляющие задачи выполняют крупные белковые ансамбли, образованные из множества белковых молекул. Теперь, когда имеется возможность воссоздать большинство биологических процессов в бесклеточных системах в лабораторных условиях, ясно, что все основополагающие процессы в клетке — такие как репликация ДНК, синтез белка, отпочковывание пузырьков или трансмембранная передача сигналов — катализируются точно согласованными, связанными воедино наборами из 10 и более белков. В большинстве таких *белковых машин* энергетически благоприятная реакция, например гидролиз связанных нуклеозидтрифосфатов (АТФ или GTP), приводит к упорядоченной серии конформационных изменений в одной или нескольких отдельных белковых субъединицах, что позволяет всему ансамблю белков перемещаться согласованно. Таким же образом, каждый фермент может быть непосредственно перемещен в очередную, надлежащую ему, позицию, по мере того как машина катализирует последовательную цепь реакций, одну за другой. Именно это происходит, например, при синтезе белка на рибосоме (рассматривается в главе 6) или при репликации ДНК — когда большой многобелковый комплекс быстро передвигается по ДНК (рассматривается в главе 5).

В ходе эволюции клетки создали белковые машины по той же причине, по которой люди изобрели механические и электронные машины. При выполнении почти любой задачи манипуляции, которые согласованы и в пространственном, и во временном отношении посредством взаимосвязанных процессов, оказываются намного более эффективными, чем использование отдельных инструментов.

3.2.29. Белковые машины со взаимозаменяемыми деталями эффективно используют генетическую информацию

Дабы погрузиться в природу белковых машин глубже, мы рассмотрим относительно простую из них: **убиквитинлигазу SCF**. Этот белковый комплекс связывает различные «целевые белки» в различные моменты клеточного цикла и ковалентно присоединяет мультиубиквитиновые полипептидные цепи к этим белкам. Его С-образная структура образована из пяти белковых субъединиц, наибольшая из них служит *каркасным белком (scaffold protein)*, на котором зиждутся остальные. Благодаря такой структуре и возможно функционирование сего замечательного механизма (**рис. 3.79**). На одном конце буквы С находится убиквитин-конъюгирующий фермент E2. На другом конце — субстрат-связывающий отросток — субъединица, известная под названием *белок F-бокс*. Эти две субъединицы разделяет зазор протяженностью около 5 нм. Когда белковый комплекс активируется, белок F-бокс связывается со специфическим участком на целевом белке, благодаря чему белок

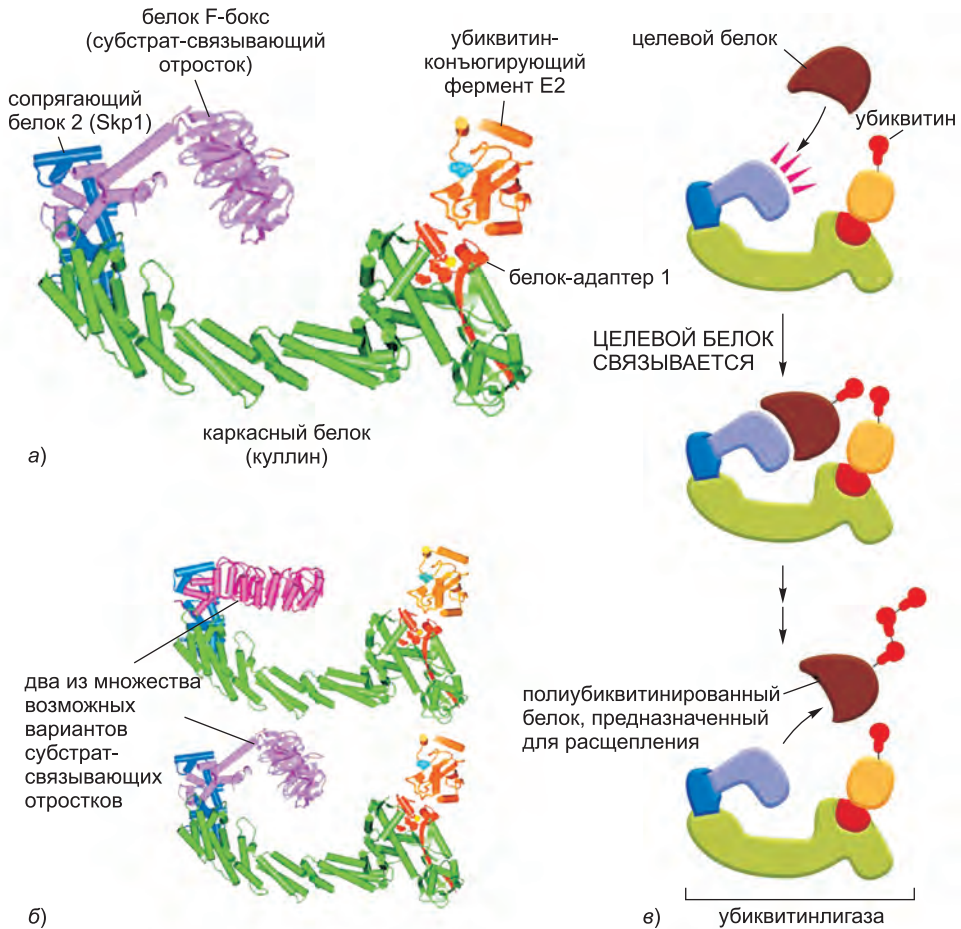


Рис. 3.79. Структура и принцип действия SCF убиквитинлигазы. а) Структура комплекса из пяти белков, который включает в себя убиквитинлигазу E2. Белок, обозначенный здесь как сопрягающий адаптер 1, представлен белком Rbx1/Hrt1, сопрягающий адаптер 2 — белком Skp1, а куллин — белком Cul1. б) Сравнение одного и того же комплекса с двумя различными субстрат-связывающими отростками — белками F-блок, соответственно, Skp2 (вверху) и β -trCP1 (внизу). в) Связывание и убиквитинирование целевого белка SCF убиквитинлигазой. Если, как показано, цепь молекул убиквитина прикрепляется к одному и тому же лизину целевого белка, то этот белок получает метку (можно сказать «черную метку») на быстрое разрушение протеасомой. (Изображения а и б переработаны из G. Wu et al., *Mol. Cell* 11: 1445–1456, 2003. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

помещается в зазоре таким образом, что некоторые из его лизиновых боковых цепей входят в контакт с убиквитин-конъюгирующим ферментом. В результате этого фермент получает возможность многократно катализировать присоединение убиквитиновой полипептида к этим лизинам (см. рис. 3.79, в), производя полиубиквитиновую цепь, которая становится меткой для быстрого разрушения целевого белка в протеасоме (см. **стр. 393**).

Подобным же образом определенные белки помечаются для быстрого разруше-

ния в ответ на определенные сигналы, что способствует планомерному протеканию клеточного цикла (обсуждается в главе 17). Определение временных моментов разрушения зачастую предполагает создание специфической схемы фосфорилирования целевого белка, что необходимо для его опознания субъединицей F-бокс. Для такого рода хронометрирования также требуется активация убиквитинлигазы SCF, которая несет на себе соответствующий субстрат-связывающий отросток. Многие из таких отростков (субъединиц типа F-бокс) взаимозаменяемы в подобных белковых комплексах (см. рис. 3.79, б), и существует более 70 генов человека, которые их кодируют.

Как было подчеркнуто ранее, как только в результате эволюции появляется удачный белок, природа стремится дублировать его генетическую информацию, чтобы положить начало семейству родственных белков. Так, например, мало того что существует целое множество белков F-бокс, — что делает возможным узнавание различных наборов целевых белков, — имеется также и семейство каркасов (известных под более претенциозным названием куллинов), которые образуют семейство SCF-подобных убиквитинлигаз.

Давление естественного отбора на живые организмы, оказываемое с целью минимизировать число генов (см. **стр. 265**), возможно, помогает объяснить, почему РНК-сплайсинг столь распространен у высших эукариот, ибо это позволяет синтезировать многочисленные родственные белки из одного-единственного гена (обсудим это в главе 6). Белковая машина, построенная наподобие убиквитинлигазы SCF, с ее взаимозаменяемыми частями, аналогичным образом обеспечивает экономичное использование генетической информации в клетках, поскольку новые функции всего комплекса могут возникать в ходе эволюции попросту за счет появления альтернативного варианта одной из его субъединиц.

3.2.30. Активация белковых машин зачастую предполагает размещение их на специфических участках

По мере того как ученые проникали во все более и более сокровенные тайны клеточной биологии, они постигали химию клетки на все более и более высоком уровне. Таким образом, кроме того что, как теперь знаем, преобладающую роль в ней играют белковые машины, недавно стало очевидно, что большинство таких машин формируется на определенных участках клетки и активируется только там и тогда, где и когда они необходимы. Используя флуоресцентно-меченые — слитые с зеленым флуоресцентным белком (GFP) — белки в живых клетках (см. **стр. 593**), цитологи могут проследить за изменением положения конкретных белков, которое происходит в ответ на определенные сигналы. Таким образом, когда некоторые внеклеточные сигнальные молекулы связываются с рецепторными белками в плазматической мембране, они часто привлекают группу других белков к внутренней поверхности плазматической мембраны, с тем чтобы сформировать белковые машины, которые передают поступивший сигнал дальше. В качестве примера на **рис. 3.80, а** показано быстрое движение фермента протеинкиназы С (PKC) к некоторому комплексу в плазматической мембране, где она связывается со специфическими белками-субстратами, которые и фосфорилирует.

В клетках человека обнаружено более 10 различных ферментов PKC, которые отличаются и по способу регулирования, и по функциям. Будучи активированы, эти ферменты перемещаются из цитоплазмы в различные области внутри клетки и

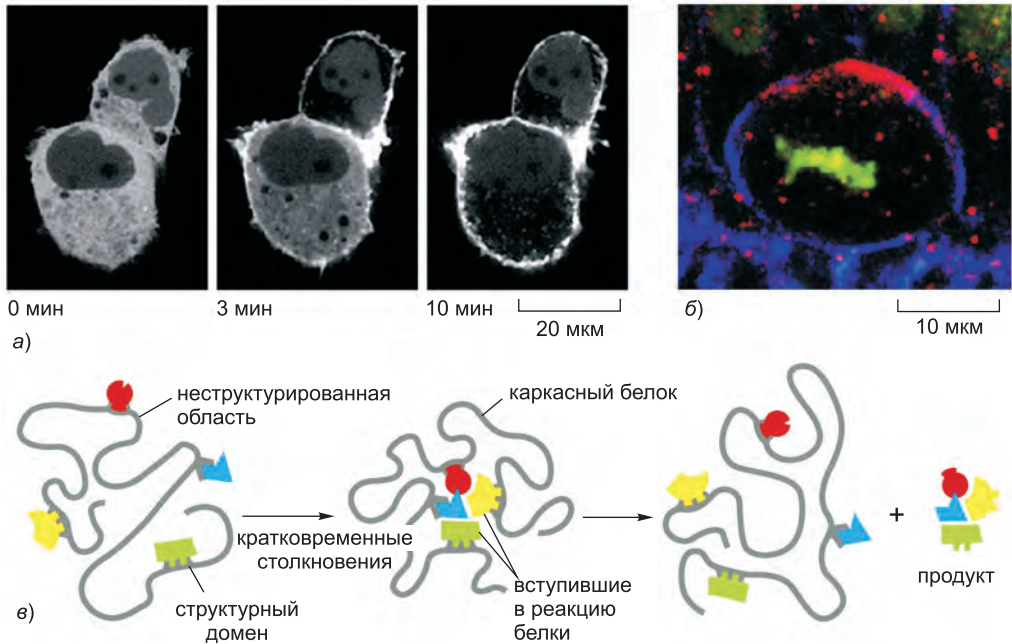


Рис. 3.80. Сборка белковых машин в определенных участках клетки. *а)* В ответ на сигнал (в данном случае эфир форбола) γ -разновидность протеинкиназы С быстро перемещается из цитозоля к плазматической мембране. Протеинкиназа флуоресцирует в этих живых клетках, потому что соответствующий, встроенный методами генной инженерии, ген в клетке кодирует рекомбинантный белок, в котором киназа соединена с зеленым флуоресцентным белком (GFP). *б)* Специфическая ассоциация различных подвидов протеинкиназы С (аРКС) с апикальной верхушкой дифференцирующегося нейробласта (ранний эмбрион дрозофилы). Киназа окрашена красным, а ядро клетки — зеленым. *в)* Схема, показывающая, как пространственная близость, создаваемая каркасными белками, может значительно ускорить протекание реакций в клетке. В данном примере длинные неструктурированные области полипептидной цепи в крупном каркасном белке соединяют ряд структурированных доменов, таким образом связывая группу участвующих в реакции белков. Неструктурированные области служат гибкими «привязями», которые намного ускоряют скорости реакций за счет организации быстрого случайного столкновения всех белков, связанных с каркасом. (Простой пример «привязи» представлен на рис. 16.38.) (Изображение *а* заимствовано из N. Sakai et al., *J. Cell Biol.* 139: 1465–1476, 1997. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press. Схема *б* любезно предоставлена Andreas Wodarz, Institute of Genetics, University of Düsseldorf, Germany.)

образуют с другими белками специфические комплексы, которые позволяют им фосфорилировать различные белковые субстраты (рис. 3.80, *б*). SCF-убиквитинлигазы могут также перемещаться в определенные участки для выполнения положенной функции в заданный момент времени. Как будет объяснено позже при обсуждении в главе 15 темы передачи сигналов в клетках, в подобного рода механизмы часто вовлечены процессы фосфорилирования белка, равно как и **каркасные белки (scaffold proteins)**, которые сводят воедино набор активирующих, ингибирующих, адапторных и субстратных белков в определенном местоположении в клетке.

Это общее явление известно как *индуцированное сближение (induced proximity)* и объясняет в некотором смысле то озадачивающее наблюдение, что немного различные формы ферментов с одним и тем же каталитическим участком зачастую

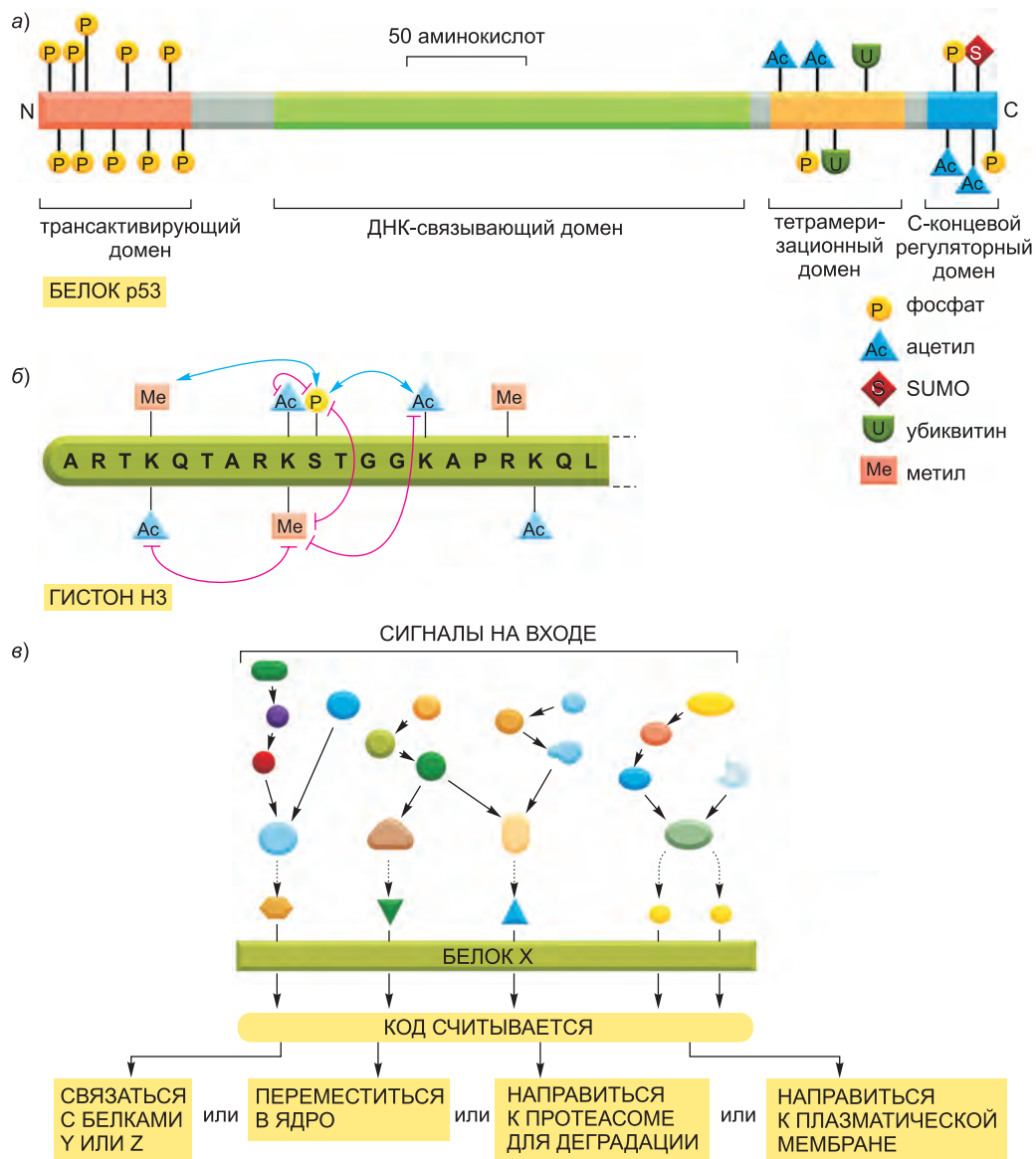


Рис. 3.81. Мультицентровая модификация белка и ее воздействие. Белок, который несет посттрансляционный довесок на боковых цепях более чем одной из своих аминокислот, можно рассматривать как белок, несущий комбинаторный регуляторный код. а) Схема известных ковалентных модификаций белка p53; убиквитин и SUMO суть родственные полипептиды (см. таблицу 3.3). б) Возможные модификации первых 20 аминокислот, считая с N-конца гистона H3; показаны не только их местоположения, но также их активирующее (синим) и ингибирующее (красным) воздействие на появление ковалентных модификаций по-соседству. В дополнение к показанным воздействиям, ацетилирование и метилирование лизина являются взаимно исключаящими реакциями (см. рис. 4.38). в) Диаграмма, показывающая общий способ всевозможных модификаций белков: модифицирующие группы ковалентно присоединяются к ним (и удаляются с них) через сети передачи сигналов — и то, как получающийся комбинаторный регуляторный код на белке считывается для определения дальнейшего пути этого белка в клетке.

Таблица 3.3. Некоторые молекулы, ковалентно связанные с белками, регулируют функции этих белков

МОДИФИЦИРУЮЩАЯ ГРУППА	НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРНЫЕ ФУНКЦИИ
Фосфат на Ser, Trp или Tyr	Стимулирует сборку белков в крупные комплексы (см. рис. 15.19).
Метил на Lys	Способствует созданию гистонного кода на хроматине, образуя моно-, ди- или триметиллизины (см. рис. 4.38).
Ацетил на Lys	Способствует созданию гистонного кода на хроматине (см. рис. 4.38).
Пальмитиновая группа на Cys	Присоединение такого остатка жирной кислоты способствует прикреплению белка к мембранам (см. рис. 10.20).
N-ацетилглюкозамин на Ser или Trp	Управляет активностью ферментов и экспрессией генов при глюкозном гомеостазе.
Убиквитин на Lys	Присоединение моноубиквитина регулирует перенос мембранных белков в пузырьках (см. рис. 13.58). Полиубиквитиновая цепь на белке служит сигналом к его деградации (см. рис. 3.79).

Примечание: убиквитин представляет собой 76-аминокислотный полипептид; существует по крайней мере 10 родственных убиквитинов белков, таких как SUMO, которые модифицируют белки аналогичным образом.

имеют сильно отличающиеся биологические функции. Клетки меняют местоположение своих белков, ковалентно изменяя их множеством различных способов — как части «регуляторного кода», который будет описан позже.

В результате таких модификаций на белках создаются участки, которыми они связываются с определенными каркасными белками, что позволяет группировать белки, необходимые для протекания заданных реакций в определенных областях клетки. Большинство биологических реакций катализируют наборы из 5 и более белков, и такая кластеризация часто требуется для протекания реакции. Таким образом, благодаря каркасам клетки обретают возможность разделять реакции в пространстве — по зонам клетки — даже при отсутствии мембран. Хотя кластеризация такого рода лишь недавно признана широко распространенным явлением, особенно ярко оно представлено в ядре клетки (см. рис. 4.69).

Многие каркасы, как оказалось, весьма сильно отличаются от куллина, изображенного ранее на рис. 3.79: вместо того, чтобы удерживать связанные с ними белки в точно установленных положениях друг относительно друга, в случае механизма индуцированного сближения взаимодействующие белки сводятся воедино бесструктурными областями полипептидной цепи. В этом ограниченном пространстве белки часто сталкиваются друг с другом в случайных ориентациях — и некоторые столкновения в конечном счете приводят к продуктивной реакции (рис. 3.80, **в**). В сущности, этот механизм значительно ускоряет реакции за счет создания очень высокой локальной концентрации реагирующих веществ. По этой причине использование каркасных белков представляет собой особенно универсальный способ управления химией клетки (см. также рис. 15.61).

3.2.31. Функционирование многих белков регулируется мультицентровой ковалентной модификацией

К настоящему моменту мы успели описать посттрансляционную модификацию белков только одного типа — ту, в ходе которой фосфат ковалентно присоединяется к боковой цепи аминокислоты (см. рис. 3.64). Однако на самом деле число других таких модификаций огромно — всего известно более 200 различных типов. **Таблица 3.3** призвана создать ощущение этого разнообразия — в ней представлена подборка модифицирующих групп с известными регуляторными функциями. Как и в случае фосфата, эти группы присоединяются и затем удаляются с белков соответственно нуждам и потребностям клетки.

Теперь науке известно большое число белков, которые модифицируются не по одному, а по нескольким аминокислотным остаткам, причем различным регуляторным событиям соответствуют разные схемы таких модификаций. Поразительный пример являет нам белок р53, который играет центральную роль в управлении реакцией клетки на неблагоприятные воздействия окружающей ее среды (см. **стр. 1105**). Посредством одного из четырех различных типов молекулярных «присадок» этот белок может быть модифицирован на 20 различных участках (**рис. 3.81, а**). Ввиду того что возможно огромное число различных комбинаций этих 20 модификаций, поведение этого белка может, в принципе, быть изменено бесчисленным числом вариантов. Более того, схема модификаций на белке может определять его восприимчивость к дальнейшей модификации, как показано на примере гистона H3 на рис. 3.81, б.

Цитологи лишь недавно пришли к пониманию того, что присущий каждому белку набор ковалентных модификаций образует важный *комбинаторный регуляторный код*. Когда определенные модифицирующие группы присоединяются к белку или удаляются с него, этот код определяет тот или иной набор поведенческих характеристик белка, изменяя активность или стабильность самого белка, связывающихся с ним партнеров и его специфическое местоположение в клетке (рис. 3.81, в). Благодаря всему этому клетка имеет возможность быстро реагировать на изменения в состоянии окружающей ее среды и быстро адаптироваться к новым условиям.

3.2.32. В основе функционирования клетки лежит сложная сеть белковых взаимодействий

Даже в нашу «постгеномную» эру, когда известны полные последовательности геномов, перед цитобиологами все еще стоит немало сложнейших задач. Одна из них — необходимость разложить на элементарные звенья и воссоздать каждую из тысяч белковых машин, которые существуют в организме таких как мы с вами существ. Для понимания этих впечатляющих белковых комплексов каждый из них нужно воссоздать из очищенных составных частей, с тем чтобы затем изучать во всех подробностях принцип его работы в контролируемых условиях — в пробирке, в отсутствие остальных компонентов клетки. Уже сама по себе такая задача невероятно трудна. Но теперь мы знаем, что каждый из таких субкомпонентов клетки взаимодействует также и с другими наборами макромолекул, в результате чего образуется обширная сеть взаимодействий типа белок—белок и белок—нуклеиновая кислота, простирающаяся по всей клетке. Поэтому, для того чтобы постичь устройство клетки, мы должны проанализировать также и большинство других взаимодействий

подобного рода.

Мы можем получить некоторое представление о сложности внутриклеточных белковых сетей, познакомившись с особенно хорошо изученным примером, описываемым в главе 16: многие десятки белков, которые взаимодействуют с актиновым цитоскелетом клетки у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (см. [рис. 16.18](#)). Степень или, лучше сказать, глубина таких межбелковых взаимодействий может быть оценена также и в более широком ракурсе. Огромное количество ценной информации теперь легко найти в базах данных белков по сети Интернет: десятки тысяч трехмерных структур белков плюс десятки миллионов последовательностей белков, полученных на основании нуклеотидных последовательностей генов. Ученые разрабатывают новые методы информационной «проходки» этого бескрайнего ресурса, чтобы повысить нашу осведомленность о клетках. В частности, компьютерные возможности биоинформатики в сочетании с робототехникой и технологиями, основанными на микроматрицах (см. [стр. 574](#)), позволяют исследовать тысячи белков в одной-единственной серии опытов. Для описания такого исследования, ориентированного на анализ белков в крупном масштабе, часто употребляют термин **протеомика**, который аналогичен термину *геномика*, описывающему широкомасштабный анализ последовательностей ДНК и генов.

Биологи используют два различных серийных метода картирования прямых взаимодействий между многими различными белками в клетке. Первоначальный выбор метода основывался на генетике: при помощи хитроумной техники, известной под названием дрожжевая двугибридная система скрининга (yeast two-hybrid screen) (см. [рис. 8.24](#)), были картированы десятки тысяч взаимодействий между тысячами белков у дрожжей, у нематоды и у плодовой мушки дрозофилы. Ближе к настоящему времени всеобщее признание обрел биохимический метод, основанный на аффинном мечении (affinity tagging) и масс-спектрологии (обсуждается в главе 8), потому что он, как оказалось, дает меньше ложных результатов. Результаты этих и другого типа исследований, которые позволяют прогнозировать взаимодействия между белками, были сведены в таблицу и организованы в базы данных, доступные по сети Интернет. Это позволяет клеточному биологу, изучающему небольшой набор белков, легко обнаружить, какие другие белки в той же самой клетке, как думают, связываются с белками из этого набора и, таким образом, взаимодействуют с ними. При графическом отображении в виде *карты белковых взаимодействий* (*protein interaction map*) каждый белок представлен прямоугольничком, или квадратиком, или точкой в двумерной сети, а прямые линии соединяют те белки, которые, как удалось установить, взаимодействуют друг с другом.

Когда на одной карте показаны сотни или тысячи белков, диаграмма сети становится ошеломляюще сложной и помогает понять, сколько еще нам предстоит постичь, прежде чем мы сможем утверждать, что действительно изучили клетку. Намного более полезны маленькие подразделы таких карт, высвечивающие лишь группу из нескольких интересующих нас белков. Так, на [рис. 3.82](#) показана сеть межбелковых взаимодействий пяти белков, образующих SCF-убиквитинлигазу в клетке дрожжей (см. [рис. 3.79](#)). Четыре субъединицы этой лигазы расположены в правой нижней части [рис. 3.82](#). Последняя субъединица, белок F-блок, который служит ее субстрат-связывающим отростком, представлена в виде набора из 15-ти различных продуктов генов, которые связываются с белком-адаптором 2 (белок Skp1). По верхней и левой частям рисунка разбросаны наборы дополнительных белковых взаимодействий, отмеченных *желтым* и *зеленым* фоном: как показано,

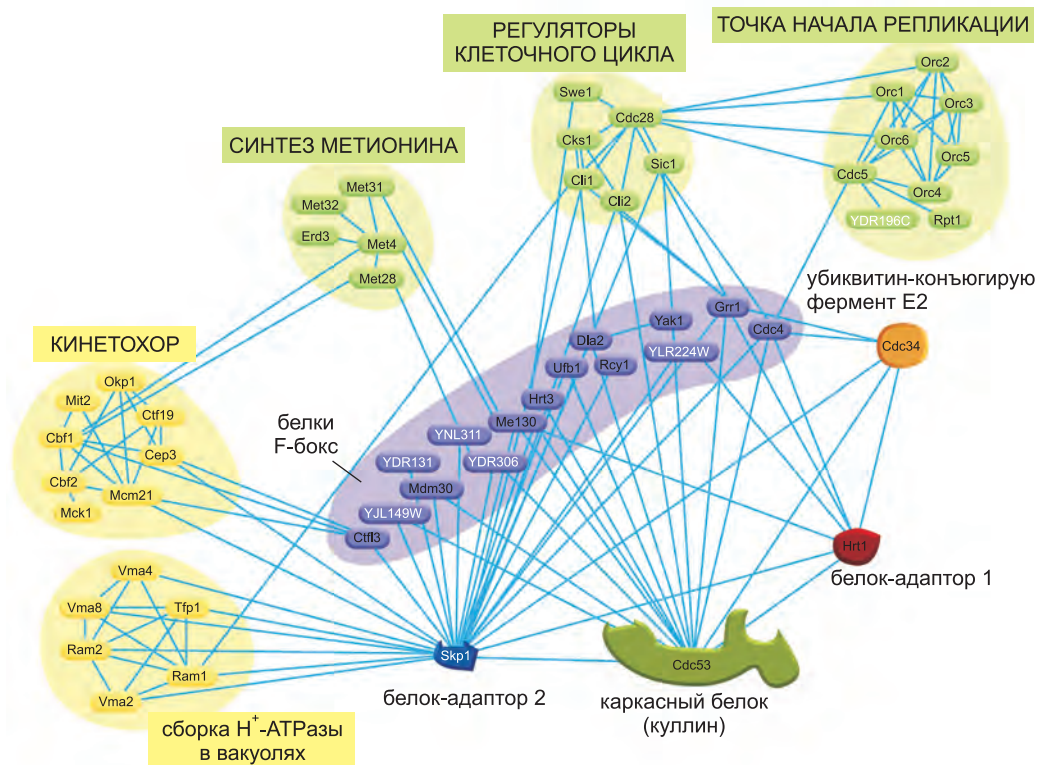
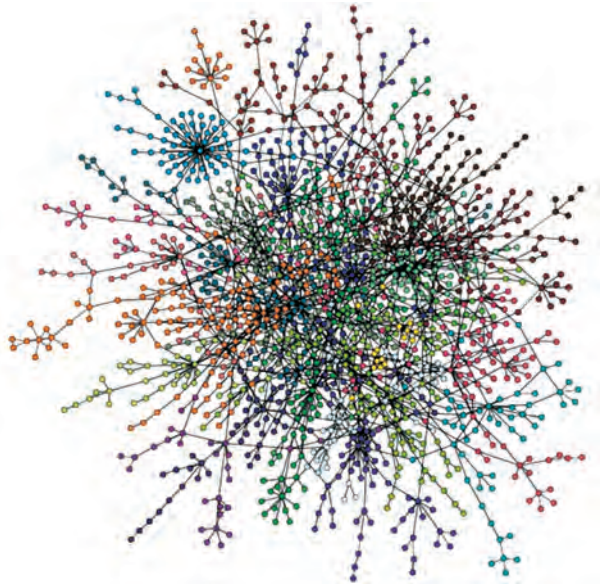


Рис. 3.82. Карта некоторых межбелковых взаимодействий SCF-убиквитинлигазы и других белков у дрожжей *S. cerevisiae*. Символы и (или) цвета, используемые для 5 входящих в молекулу лигазы белков, соответствуют таковым на рис. 3.79. Обратите внимание, что показаны 15 различных белков F-блок (фиолетовый фон); те, что помечены белыми буквами (начинаются с Y), известны лишь гипотетически по последовательности генома как продукты открытых рамок считывания. Подробности сообщаются в тексте. (Схема любезно предоставлена Peter Bowers и David Eisenberg, UCLA-DOE Institute for Genomics and Proteomics, UCLA.)

эти наборы белков работают в репликации ДНК, задействованы в управлении клеточным циклом, участвуют в синтезе метионина, несут свою службу в кинетохоре и в вакуолярной сборке H^+ -АТРаза. Мы будем опираться на этот рисунок, чтобы объяснить, как такие карты белковых взаимодействий используются и что они могут показать, а что не могут.

1. Карты белковых взаимодействий удобны для распознавания вероятной функции еще неохарактеризованных белков. Примеры представлены теми продуктами генов, о которых ко времени исследования известен (по последовательности генома дрожжей) лишь факт их существования; это шесть белков на рисунке, для которых не дано трехбуквенное обозначение (белые буквы, начинающиеся с Y). Один из них, продукт так называемой *открытой рамки считывания* YDR196C, расположен в основании репликационной группы и поэтому он, по всей вероятности, играет ту

Рис. 3.83. Сеть белок-белковых взаимодействий в клетке дрожжей. Каждая линия, соединяющая пару точек (белков), отмечает взаимодействие между ними. (Заимствовано из A. Guimerá and M. Sales-Pardo, *Mol. Syst. Biol.* 2: 42, 2006. С разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)



или иную роль в запуске новых репликационных вилок. Остальные пять из представленных на этой схеме белков относятся к белкам F-блока, которые связываются с белком Skp1; поэтому они, вероятно, работают как составная часть убиквитинлигазы, служа субстрат-связывающими отростками, которые распознают различные целевые белки.

Однако, как мы обсудим далее, никакие предписанные таким способом функции нельзя считать достоверными без привлечения дополнительных данных.

2. Сети белковых взаимодействий надлежит интерпретировать с должной осмотрительностью, потому что в результате эволюции, эффективно использующей генетическую информацию всех живых организмов, один и тот же белок может быть использован как часть двух различных белковых комплексов, которые выполняют функции разного типа. Так, если, скажем, белок А связывается с белком В, а белок В связывается с белком С, то из этого отнюдь не следует, что белки А и С функционируют в одном и том же процессе. Например, из доскональных биохимических исследований мы знаем, что функции белка Skp1 в кинетохоре и вакуолярной сборке H^+ -АТРаза (*желтый фон*) отличаются от его функции в SCF-убиквитинлигазе. Фактически только последние три функции белка Skp1 из представленных на схеме: в синтезе метионина, в регулировании клеточного цикла и в истоке репликации (*зеленый фон*) — предполагают убиквитинирование.

3. В ходе межвидовых сравнений те белки, которые показывают подобные профили на обеих картах белковых взаимодействий, весьма вероятно, имеют одинаковую функцию в клетке. Таким образом, поскольку ученые получают все более и более подробные карты для множества организмов, результаты становятся все более и более пригодными для выяснения функции белка. Такой сравнительный анализ карт представляет собой особенно действенный инструмент для выяснения функций белков человека. Большое количество прямой информации о функции белка (каковая не может быть раскрыта организмом самого человека) может быть получено средствами геной инженерии, мутационного и генетического анализа в ходе экспериментов с модельными организмами — такими как дрожжи, черви и мухи.

Имеющиеся в нашем распоряжении данные позволяют предположить, что типичный белок в клетке человека может взаимодействовать с различными партнерами,

число которых может варьировать от 5 до 15. Часто каждый из различных доменов мультидоменного белка связывается со своей группой партнеров; фактически, мы можем предположить, что необычайно огромные многодоменные структуры, обнаруженные в клетках человека, могли появиться в ходе эволюции ради того, чтобы облегчить возникновение таких взаимодействий. Исходя из огромной сложности сетей взаимодействия макромолекул в клетках (рис. 3.83), можно прийти к очевидному умозаключению, что на раскрытие всего их функционального значения у ученых мужей уйдет не одно столетие напряженного труда.

Заключение

Белки способны образовывать необычайно искусные химические механизмы, функции которых в значительной степени зависят от тонких химических свойств их поверхности. Участки связывания лигандов формируют на поверхности белка полости, в которых точно размещенные боковые цепи аминокислот сближены друг с другом за счет соответствующей укладки полипептидной цепи белка. Подобным же образом обычно инертные в реакционном отношении боковые цепи аминокислот могут активироваться путем образования и разрыва ковалентных связей. Ферменты представляют собой каталитические белки, которые значительно ускоряют скорости реакций, связывая на определенном этапе реакции промежуточные продукты высокой энергии; вдобавок к этому они способны осуществлять одновременно кислотный и основной катализ. Зачастую скорости ферментативных реакций бывают настолько быстрыми, что их лимитирует только диффузия; скорости могут достигать еще больших значений, если ферменты, поочередно воздействующие на субстрат, объединены в единый мультиферментный комплекс или если ферменты и их субстраты сосредоточены в одних и тех же компартментах клетки.

Белки обратимо изменяют свою форму, когда лиганды связываются с их поверхностью. Аллостерические изменения конформации белка, производимые одним лигандом, влияют на связывание второго лиганда, и такое сопряжение между двумя участками связывания лигандов обуславливает важнейший механизм регулирования происходящих в клетке процессов. Например, метаболические пути регулируются по типу обратной связи: одни малые молекулы ингибируют, а другие малые молекулы активируют ферменты, стоящие в начале пути. Обычно управляемые таким способом ферменты образуют симметричные сборки, что позволяет им давать быструю ответную реакцию — благодаря кооперативным конформационным изменениям, происходящим во всем комплексе, — на изменение концентрации лигандов, регулирующих активность этих ферментов.

За счет потребления химической энергии могут осуществляться односторонние изменения формы белка. Например, благодаря сопряжению аллостерического изменения формы с гидролизом АТФ, белки могут выполнять полезную работу, такую как сообщение механической силы или перемещение на длинные расстояния в одном направлении. Трехмерные структуры белков, определенные методами рентгеновской кристаллографии, явили нашему взору механизм, посредством которого небольшое локальное изменение, вызванное гидролизом нуклеозидтрифосфата, усиливается, с тем чтобы произвести существенные изменения в каком-либо другом месте белковой молекулы. Будучи наделены средствами подобного рода, такие белки могут служить устройствами «ввода-

вывода», которые служат своего рода передатчиками информации, факторами сборки, моторами или прикрепленными к мембране насосами. Высокоэффективные белковые машины образуются путем включения большого числа различных молекул белка в более крупные ансамбли, в которых полностью согласованы аллостерические движения отдельных компонентов. Как теперь известно, такие машины осуществляют многие наиболее важные процессы в клетках.

Белки подвергаются множеству обратимых посттрансляционных модификаций, таких как ковалентное присоединение фосфатной или ацетильной группы к боковой цепи определенной аминокислоты. Прикрепление таких модифицирующих групп используется для регулирования активности белка, изменения его конформации, связывания с другими белками и размещения в клетке. Типичный белок в клетке способен взаимодействовать с более чем пятью различными партнерами. Вооружившись новыми технологиями протеомики, биологи имеют возможность анализировать тысячи белков в одной серии экспериментов. Один из важнейших результатов — создание подробных карт белковых взаимодействий, которые призваны в конечном счете описать все взаимодействия, связывающие между собой тысячи различных белков, наполняющих клетку.

Задачи

Какие из утверждений являются верными? Обоснуйте свой ответ

3.1. Все цепи в β -листе представляют собой спираль с двумя аминокислотами на виток.

3.2. Полипептидные петли, которые выступают на поверхности белка, часто образуют участки связывания других молекул.

3.3. Любой фермент достигает максимальной скорости при высокой концентрации субстрата, потому что он имеет строго определенное число активных участков, на которых субстрат связывается.

3.4. Более высокая концентрация фермента соответствует более высокому числу оборотов.

3.5. Ферменты наподобие аспартаттранскарбамоилазы, которые подвергаются кооперативным аллостерическим переходам, неизменно содержат большое число идентичных субъединиц.

3.6. Непрерывное присоединение и удаление фосфатов протеинкиназами и протеинфосфатазами расточительно в плане расхода энергии — так как их совместное действие потребляет АТФ, — но это необходимое условие эффективного регулирования путем фосфорилирования.

Обсудите следующие задачи

3.7. Обсудите следующее утверждение. «На создание по одной молекуле каждого возможного вида полипептидной цепи длиной 300 аминокислот ушло бы больше атомов, чем существует во Вселенной». Принимая во внимание размеры Вселенной, считаете ли вы, что данное высказывание в принципе может быть верным? Так как подсчет числа атомов — мудреное дело, рассмотрим эту задачу с точки зрения массы. Масса обозримой части Вселенной оценивается примерно в 10^{80} граммов, плюс-минус один-два порядка величины. Если принять среднюю массу аминокислоты равной 110 дальтон, то какова была бы масса одной молекулы

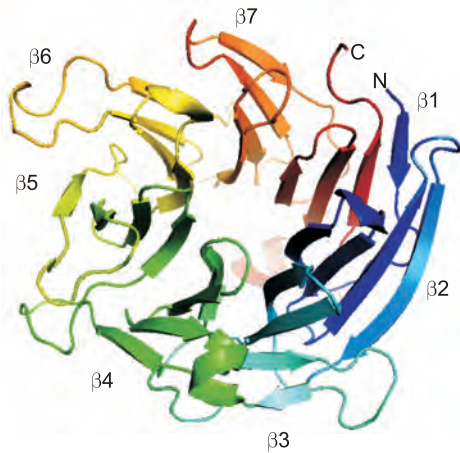


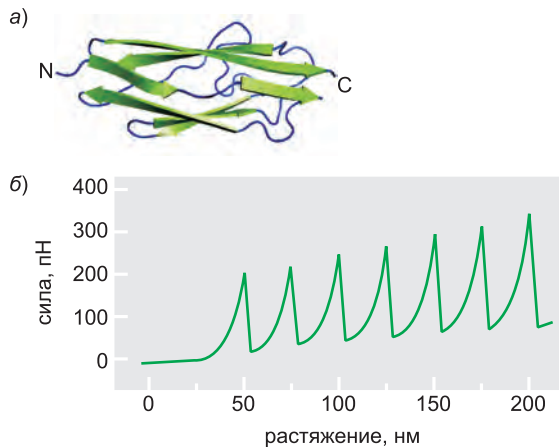
Рис. Q3.1. Повторяющийся домен kelch галактооксидазы у *D. dendroides* (к задаче 3.9). Обозначены все семь отдельных β -пропеллеров. N- и C-концы обозначены, соответственно буквами N и C.

каждого возможного вида полипептидной цепи длиной 300 аминокислот? Превышает ли она массу Вселенной?

3.8. Общепринятая методика идентификации белков, состоящих в дальнем родстве, заключается в следующем: по базе данных с использованием короткой сигнатурной последовательности, наличие которой свидетельствует об определенной функции белка. Почему лучше проводить поиск по короткой последовательности, а не по длинной? Разве не будет больше вероятность искомого события при совпадении длинных последовательностей из базы данных?

3.9. Так называемый мотив kelch состоит из четырехцепочечного β -листа, который образует структуру, известную под названием β -пропеллера. Обычно он повторяется четыре-семь раз, образуя тем самым повторяющийся домен kelch в многодоменном белке. Один из таких повторяющихся доменов kelch изображен на рис. Q3.1. Как бы вы классифицировали этот домен — как домен «встроенного» или «съемного» типа?

3.10. Титин, обладающий молекулярной массой $3 \cdot 10^6$ дальтон, является наиболее крупным из доселе описанных полипептидов. Молекулы титина простираются от толстых мышечных волокон к телофрагме; они, как думают, действуют подобно пружинам, поддерживающим толстые волокна сосредоточенными в саркомере. Титин состоит из большого числа повторяющихся последовательностей иммуноглобулина (Ig) длиной 89 аминокислот, каждая из этих последовательностей свернута в домен длиной около 4 нм (рис. Q3.2, а).



Вы подозреваете, что подобное пружинное поведение титина обусловлено последовательным разворачиванием (и сворачиванием) отдельных доменов Ig. Вы проверяете эту гипотезу, используя атомно-силовой микроскоп, который позволяет ухватиться за один конец белковой мо-

Рис. Q3.2. Пружиноподобные свойства титина (к задаче 3.10). а) Структура отдельного Ig-домена. б) График зависимости растяжения (в нанометрах) от силы (в пиконыютонах), полученный с помощью атомно-силовой микроскопии.

лекулы и тянуть за него с точно измеряемой силой. Для фрагмента титина из семи повторяющихся доменов Ig этот эксперимент дает пилообразную кривую сила—растяжение, представленную на **рис. Q3.2, б**. При повторении данного эксперимента в растворе 8 М мочевины (денатуратор белков), пики не появляются, а измеряемое растяжение становится намного сильнее при тех же растягивающих усилиях. Если эксперимент повторяется после введения в белок поперечных сшивок путем его обработки глутаральдегидом, пики так же отсутствуют, но растяжение становится намного меньше при заданных растягивающих усилиях.

А. Согласуются ли эти данные с выдвинутой вами гипотезой о том, что пружиноподобное поведение титина обусловлено последовательным разворачиванием отдельных доменов Ig? Объясните ход ваших рассуждений.

В. Соответствует ли величина растяжения, вызванного каждым предполагаемым событием разворачивания домена, вашим ожиданиям? (В растянутой полипептидной цепи аминокислоты расположены с интервалом 0,34 нм.)

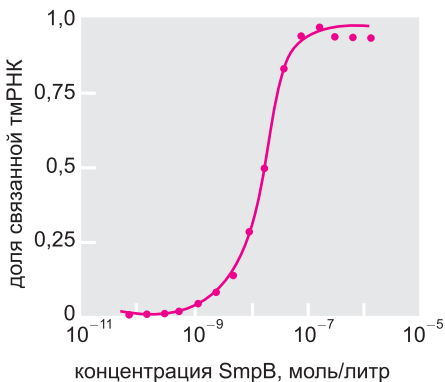
С. Почему каждый последующий пик на **рис. Q3.2, б** немного выше предыдущего?

Д. Почему сила спадает столь резко после каждого пика?

3.11. Часто говорят, что белковые комплексы состоят из субъединиц (то есть, синтезируемых по отдельности белков), а не построены в виде единого длинного белка, потому что в первом случае они с большей вероятностью дадут правильную конечную структуру.

А. Исходя из допущения о том, что аппарат белкового синтеза включает одну неправильную аминокислоту на каждые 10 000 им вставляемых, вычислите долю бактериальных рибосом, которые были бы собраны правильно, если бы белки синтезировались в виде одного большого белка и если бы они строились из отдельных белков? При расчете исходите из допущения о том, что рибосома состоит из 50 белков, каждый по 200 аминокислот в длину, и что субъединицы — правильные и неправильные — собираются в полную рибосому с равной вероятностью. [Вероятность того, что полипептид будет сделан правильно, P_C , равна доле правильных за каждую операцию, f_C , возведенную в степень, равную числу операций, n : $P_C = (f_C)^n$. При частоте появления ошибок $1/10\,000$, $f_C = 0,9999$.]

В. Правдоподобно ли допущение о том, что правильные и неправильные субъединицы собираются в рибосому одинаково хорошо? Обоснуйте свой ответ. Как бы изменение этого допущения на противоположное повлияло на результат вычислений в части А?



3.12. Вирус саркомы Рауса (RSV) несет в себе онкоген с названием *Src*, который кодирует непрерывно активную тирозиновую протеинкиназу и тем самым способствует неконтролируемой пролиферации клеток. Обычно белок *Src* несет присоединенную группу жирной кислоты (миристоилат), которая позволяет ему связываться с цитоплазматической стороной плазматической мембраны. Мутантный вариант *Src*, к которому присоединение

Рис. Q3.3. S-образная кривая зависимости доли связанной тмРНК от концентрации SmpB (к задаче 3.14).

миристоилата невозможно, не связывается с мембраной. Заражение клеток вирусом, кодирующим как нормальную, так и мутантную форму Src, ведет к одинаково высокому уровню активности тирозиновой протеинкиназы, но вирус с мутантным белком Src не вызывает пролиферации клеток.

А. Основываясь на допущении о том, что нормальный Src весь связан с плазматической мембраной, а мутантный Src распределен по всей цитоплазме, вычислите их относительные концентрации вблизи плазматической мембраны. Для этого расчета предположите, что клетка имеет форму сферы радиусом 10 мкм и что мутантный Src распределен по всему внутреннему пространству, тогда как нормальный Src ограничен слоем толщиной 4 нм, непосредственно примыкающим к мембране. [Для решения этой задачи допустите, что мембрана не имеет толщины. Объем сферы равен $(4/3)\pi r^3$.]

В. Мишень (X) для фосфорилирования белком Src пребывает в мембране. Объясните, почему мутантный Src не вызывает разрастания клеток.

3.13. Некоторое антитело связывается с другим белком с константой равновесия $K = 5 \cdot 10^9$ (моль/литр) $^{-1}$. Когда оно связывается со вторым, родственным первому, белком, оно образует на три водородные связи меньше, в силу чего константа связывания уменьшается на 2,8 ккал/моль. Какова величина K связывания антитела со вторым белком? (Изменение свободной энергии связано с константой равновесия уравнением $\Delta G^\circ = -2,3RT \lg K$, где R равна $1,98 \cdot 10^{-3}$ ккал/(моль·К), а T равна 310 К.)

3.14. Белок SmpB связывается с определенными видами тРНК, а именно тмРНК, с тем чтобы удалять неполные белки, кодируемые процессированными молекулами мРНК бактерий. Если связывание SmpB с тмРНК представить графически в виде зависимости доли связанных молекул тмРНК от концентрации SmpB, то получается симметричная S-образная кривая наподобие изображенной на **рис. Q3.3**.

Q3.3. Эта кривая представляет собой графическое отображение очень полезной зависимости между K_d и концентрацией и поэтому часто используется. Общее выражение для доли связанного лиганда выводится из уравнения для K_d ($K_d = [Pr][L]/[Pr-L]$) путем подстановки $([L]_{TOT} - [L])$ вместо $[Pr-L]$ и последующей перестановки. Поскольку общая концентрация лиганда ($[L]_{TOT}$) равна сумме таковых для свободного лиганда ($[L]$) и связанного лиганда ($[Pr-L]$), имеем

$$\text{доля связанного} = [L]/[L]_{TOT} = [Pr]/([Pr] + K_d).$$

Для SmpB и тмРНК

$$\text{доля связанного} = [\text{тмРНК}]/[\text{тмРНК}]_{TOT} = [\text{SmpB}]/([\text{SmpB}] + K_d).$$

Используя эти соотношения, вычислите долю связанной тмРНК при концентрации SmpB, равной $10^4 K_d$, $10^3 K_d$, $10^2 K_d$, $10^1 K_d$, K_d , $10^{-1} K_d$, $10^{-2} K_d$, $10^{-3} K_d$ и $10^{-4} K_d$.

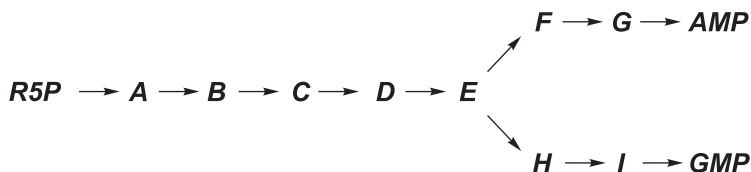


Рис. Q3.4. Схема метаболического пути синтеза AMP и GMP из рибозо-5-фосфата (R5P) (к задаче 3.18).

3.15. Многие ферменты подчиняются простой кинетике Михаэлиса—Ментен, выражаемой в общем виде уравнением

$$\text{скорость} = V_{\max}[S]/([S] + K_m),$$

где V_{\max} — максимальная скорость, $[S]$ — концентрация субстрата, а K_m — константа Михаэлиса.

Было бы весьма поучительно подставить несколько значений $[S]$ в это уравнение, чтобы увидеть, как данная величина влияет на скорость. Каковы скорости при $[S]$, равной нулю, K_m и бесконечности?

3.16. Фермент гексокиназа присоединяет фосфат к D-глюкозе, но игнорирует ее зеркальное отображение — L-глюкозу. Предположим, что вам удалось синтезировать гексокиназу исключительно из D-аминокислот, которые являются зеркальным отображением нормальных L-аминокислот.

А. Опираясь на допущение о том, что фермент «D» свернется в устойчивую конформацию, какое отношение, можно ожидать, он составит к нормальному ферменту «L»?

В. Предполагаете ли вы, что фермент «D» займется присоединением фосфата к L-глюкозе, игнорируя при этом D-глюкозу?

3.17. Каким, по вашему предположению, образом молекула гемоглобина способна эффективно связывать кислород в легких и при этом эффективно высвобождать его в тканях?

3.18. Синтез пуриновых нуклеотидов AMP и GMP идет по разветвленному пути, начинающемуся с рибозо-5-фосфата (R5P), как схематично показано на **рис. Q3.4**. Опираясь на принципы ингибирования по типу обратной связи, предложите такую стратегию регулирования этого пути, которая обеспечила бы адекватное снабжение как AMP, так и GMP и минимизировала бы при этом накопление промежуточных продуктов (A–I) при достаточных запасах AMP и GMP.

Литература

Общая

Berg J. M., Tymoczko J. L. & Stryer L. (2006) *Biochemistry*, 6th ed. New York: WH Freeman.

Branden C. & Tooze J. (1999) *Introduction to Protein Structure*, 2nd ed. New York: Garland Science.

Dickerson, R. E. (2005) *Present at the Flood: How Structural Molecular Biology Came About*. Sunderland, MA: Sinauer

Kyte J. (2006) *Structure in Protein Chemistry*. New York: Routledge.

Petsko G. A. & Ringe D. (2004) *Protein Structure and Function*. London: New Science Press.

Perutz M. (1992) *Protein Structure: New Approaches to Disease and Therapy*. New York: WH Freeman.

Форма и структура белков

Anfinsen C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223–230.

Bray D. (2005) Flexible peptides and cytoplasmic gels. *Genome Biol.* 6: 106–109.

Burkhard P., Stetefeld J. & Strelkov S. V. (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* 11: 82–88.

Caspar D. L. D. & Klug A. (1962) Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 27: 1–24.

Doolittle R. F. (1995) The multiplicity of domains in proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 287–314.

Eisenberg D. (2003) The discovery of the alpha-helix and beta-sheet, the principle structural features of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11207–11210.

Fraenkel-Conrat H. & Williams R. C. (1955) Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 41: 690–698.

Goodsell D. S. & Olson A. J. (2000) Structural symmetry and protein function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29: 105–153.

Harrison S. C. (1992) Viruses. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 293–299.

Harrison S. C. (2004) Whither structural biology? *Nature Struct. Mol. Biol.* 11: 12–15.

Hudder A., Nathanson L. & Deutscher M. P. (2003) Organization of mammalian cytoplasm. *Mol. Cell Biol.* 23: 9318–9326.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921.

Meiler J. & Baker D. (2003) Coupled prediction of protein secondary and tertiary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 12105–12110.

Nomura M. (1973) Assembly of bacterial ribosomes. *Science* 179: 864–873.

Orengo C. A. & Thornton J. M. (2005) Protein families and their evolution—a structural perspective. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 867–900.

Pauling L. & Corey R. B. (1951) Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: two new pleated sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37: 729–740.

Pauling L., Corey R. B. & Branson H. R. (1951) The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37: 205–211.

Ponting C. P., Schultz J., Copley R. R. et al. (2000) Evolution of domain families. *Adv. Protein Chem.* 54: 185–244.

Trinick J. (1992) Understanding the functions of titin and nebulin. *FEBS Lett.* 307: 44–48.

Vogel C., Bashton M., Kerrison N. D. et al. (2004) Structure, function and evolution of multidomain proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 208–216.

Zhang C. & Kim S. H. (2003) Overview of structural genomics: from structure to function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7: 28–32.

Функция белка

Alberts B. (1998) The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* 92: 291–294.

Benkovic S. J. (1992) Catalytic antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 29–54.

Berg O. G. & von Hippel P. H. (1985) Diffusion-controlled macromolecular interactions. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 14: 131–160.

Bhattacharyya R. P., Remenyi A., Yeh B. J. & Lim W. A. (2006) Domains, motifs,

and scaffolds: The role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 655–680.

Bourne H. R. (1995) GTPases: a family of molecular switches and clocks. *Philos Trans. R. Soc. Lond. B.* 349: 283–289.

Braden B. C. & Poljak R. J. (1995) Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. *FASEB J.* 9: 9–16.

Dickerson R. E. & Geis I. (1983) Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings.

Dressler D. & Potter H. (1991) Discovering Enzymes. New York: Scientific American Library.

Eisenberg D., Marcotte, E. M., Xenarios I. & Yeates T. O. (2000) Protein function in the post-genomic era. *Nature* 405: 823–826.

Fersht A. R. (1999) Structure and Mechanisms in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis. New York: WH Freeman.

Johnson, L. N. & Lewis R. J. (2001) Structural basis for control by phosphorylation. *Chem. Rev.* 101: 2209–2242.

Kantrowitz E. R. & Lipscomb W. N. (1988) *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase: the relation between structure and function. *Science* 241: 669–674.

Khosla C. & Harbury P. B. (2001) Modular enzymes. *Nature* 409: 247–252.

Kim E. & Sheng M. (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nature Rev. Neurosci.* 5: 771–781.

Koshland D. E., Jr. (1984) Control of enzyme activity and metabolic pathways. *Trends Biochem. Sci.* 9: 155–159.

Kraut D. A., Carroll K. S. & Herschlag D. (2003) Challenges in enzyme mechanism and energetics. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 517–571.

Krogan N. J., Cagney G., Yu H. et al. (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440: 637–643.

Lichtarge O., Bourne H. R. & Cohen F. E. (1996) An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families. *J Mol Biol* 257: 342–358.

Marcotte E. M., Pellegrini M., Ng H. L. et al. (1999) Detecting protein function and protein-protein interactions from genome sequences. *Science* 285: 751–753.

Monod J., Changeux J. P. & Jacob F. (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6: 306–329.

Pawson T. & Nash P. (2003) Assembly of regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300: 445–452.

Pavletich N. P. (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* 287: 821–828.

Pellicena P. & Kuriyan J. (2006) Protein-protein interactions in the allosteric regulation of protein kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16: 702–709.

Perutz M. (1990) Mechanisms of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins. Cambridge: Cambridge University Press.

Rauschel F., Thoden, J. B. & Holden H. M. (2003) Enzymes with molecular tunnels. *Acc. Chem. Res.* 36: 539–548.

Radzicka A. & Wolfenden R. (1995) A proficient enzyme. *Science* 267: 90–93.

Sato T. K., Overduin M. & Emr S. (2001) Location, location, location: Membrane

targeting directed by PX domains. *Science* 294: 1881–1885.

Schramm V.L. (1998) Enzymatic transition states and transition state analog design. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 693–720.

Schultz P.G. & Lerner R.A. (1995) From molecular diversity to catalysis: lessons from the immune system. *Science* 269: 1835–1842.

Vale R.D. & Milligan R.A. (2000) The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* 288: 88–95.

Vocadlo D.J., Davies G.J., Laine R. & Withers S.G. (2001) Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* 412: 835–838.

Walsh C. (2001) Enabling the chemistry of life. *Nature* 409: 226–231.

Yang X.J. (2005) Multisite protein modification and intramolecular signaling. *Oncogene* 24: 1653–1662.

Zhu H., Bilgin M. & Snyder M. (2003) Proteomics. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 783–812.

ЧАСТЬ II

ОСНОВНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

Главы:

4. ДНК, хромосомы и геномы

5. Репликация, восстановление
и рекомбинация ДНК

6. Клеточные механизмы
считывания генома:
путь от ДНК к белку

7. Управление экспрессией генов

4

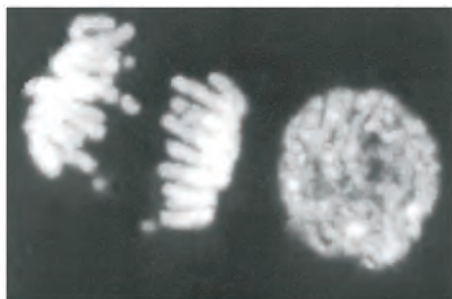
ДНК, хромосомы и геномы

Жизнь зависит от способности клеток хранить, извлекать и переводить генетические инструкции, необходимые для создания и поддержания живого организма. Эта *наследственная* информация передается от клетки клетке при клеточном делении и от организма организму через репродуктивные клетки. Такие инструкции сохраняются внутри всех живых клеток в виде их **генов** — содержащих информацию элементов, которые определяют как признаки вида в целом, так и особенности отдельных его представителей.

Как только генетика возникла как наука в начале XX столетия, ученые увлеклись поисками химической структуры генов. На протяжении жизни многоклеточного организма наполняющая гены информация копируется и передается от материнской клетки ее дочерним клеткам миллионы раз и переносится практически неизменной. Какой формы молекула могла бы быть способна к столь точной и почти неограниченной репликации и вместе с тем могла бы направлять развитие организма и предопределять повседневную жизнь клетки? Какого рода предписания несет в себе генетическая информация? Каким образом может огромное количество информации, необходимой для развития и поддержания организма, помещаться в крошечном пространстве клетки?

Ответы на некоторые из этих вопросов начали прорисовываться в 1940-х гг. В это время в ходе изучения простых грибов ис-

Рис. 4.1. Хромосомы в клетках. а) Две смежные клетки растения, сфотографированные в оптический микроскоп. ДНК была окрашена флуоресцентным красителем (DAPI¹⁾), который связывается с ней. ДНК находится в хромосомах, которые становятся видимыми как обособленные структуры в световом микроскопе только тогда, когда они превращаются в компактные, имеющие форму сосисок структуры в ходе подготовки к делению клетки, что показано в левой части изображения. Помещенная справа клетка, которая не делится, содержит идентичные хромосомы, но их невозможно отчетливо различить в световом микроскопе на этой стадии жизненного цикла, потому что они находятся в более развернутой конформации. б) Схематическое изображение очертаний этих двух клеток и находящихся в них хромосом. (Изображение а любезно предоставлено Peter Shaw.)



а) делящаяся клетка неделящаяся клетка



б)

10 мкм

¹⁾ 4,6-диамино-2-фенилиндолдигидрохлорид. —

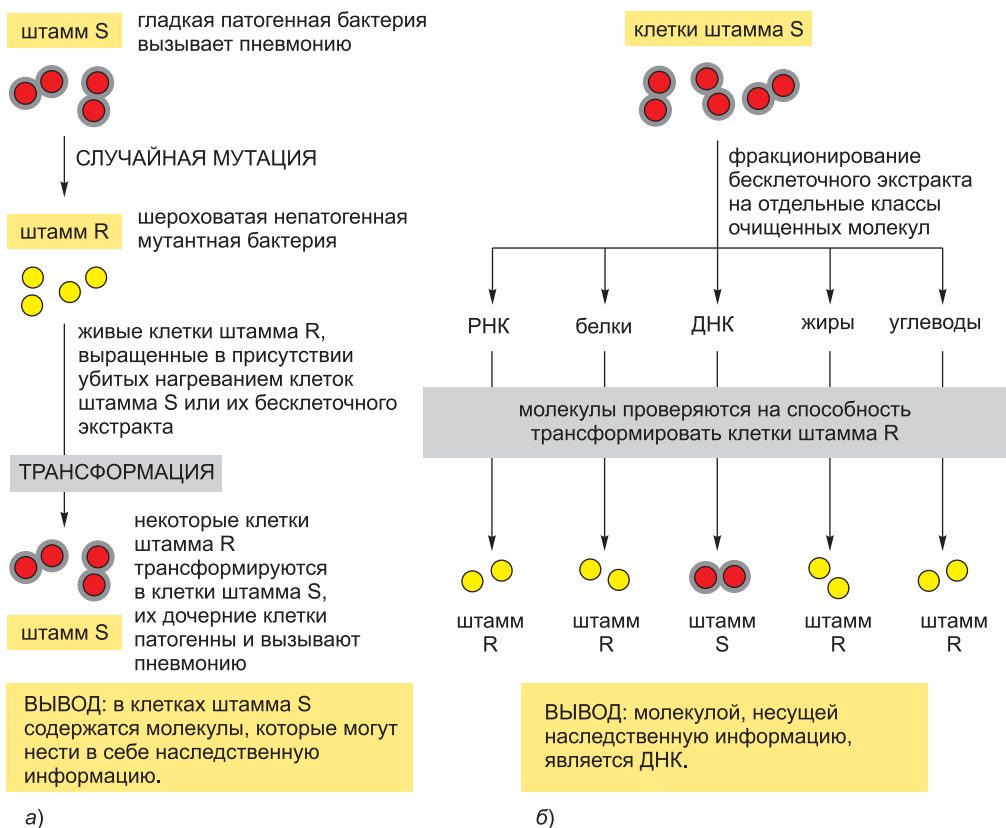


Рис. 4.2. Первое экспериментальное подтверждение того, что именно ДНК является генетическим материалом. Эти эксперименты, проведенные в 1940-х гг., показали, что добавление очищенной ДНК к бактерии изменяет ее свойства и что это изменение в точности передается последующим поколениям. Два близкородственных штамма бактерии *Streptococcus pneumoniae* отличаются друг от друга и по внешнему виду под микроскопом, и по патогенности. Один штамм выглядит гладким (S) и вызывает смерть, будучи введен в организм мыши, а другой выглядит шероховатым (R) и не смертелен (термины «гладкий» и «шероховатый» характеризует вид колоний — прим.ред.). а) Исходный эксперимент показывает, что в штамме S присутствует некое вещество, способное изменить (или трансформировать) штамм R в штамм S, и что это изменение наследуется последующими поколениями бактерий. б) Этот эксперимент, в ходе которого штамм R выдерживался с различными классами биомолекул, выделенных из штамма S, показал, что этим веществом является ДНК.

следователи открыли, что генетическая информация состоит преимущественно из рецептов приготовления белков. Белки — это макромолекулы, которые выполняют большинство функций клетки: они служат стандартными блоками для построения клеточных структур и образуют ферменты, которые катализируют химические реакции клетки (глава 3), они регулируют экспрессию генов (глава 7), а также позволяют клеткам общаться друг с другом (глава 15) и двигаться (глава 16). Свойства и функции клетки в значительной степени определяются белками, которые она способна производить. Если мысленно перемахнуть через пласты научных открытий, вздымающиеся между прошлым и настоящим, то трудно будет вообра-

зить еще какие-либо инструкции сверх этих, могущие содержаться в генетической информации.

Усердные наблюдения над клетками и эмбрионами в конце XIX-го столетия привели к пониманию того, что наследственную информацию несут на себе *хромосомы* — нитевидные структуры в ядре эукариотической клетки, которые становятся видимыми с помощью световой микроскопии, когда клетка начинает делиться (рис. 4.1). Позже, когда стал возможен биохимический анализ, было установлено, что хромосомы состоят из дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и белка. В течение многих десятилетий считалось, что ДНК попросту является структурным элементом. Однако следующей вехой научного прогресса, поставленной в 1940-е гг., было признание ДНК в качестве вероятного носителя генетической информации. Этот скачок в нашем понимании клеток был совершен благодаря исследованиям механизмов наследования у бактерий (рис. 4.2). Но в начале 1950-х гг. все еще казалось полной загадкой и то, каким образом белки могли определяться инструкциями, заложенными в ДНК, и то, как эта информация могла бы копироваться для передачи от клетки к клетке. Эта загадка была неожиданно разгадана в 1953 г., когда структура ДНК была верно предсказана Джеймсом Уотсоном и Фрэнсисом Криком. Как было упомянуто в главе 1, двухцепочечная структура ДНК тотчас же решила задачу о том, как информация в этой молекуле могла бы копироваться, или *реплицироваться*. Она также дала первые ключи к решению вопроса о том, как молекула ДНК может использовать последовательность своих субъединиц для кодирования инструкций по изготовлению белков. Сегодня тот факт, что генетическим материалом является ДНК, настолько фундаментален для биологической мысли, что трудно оценить тот огромный пробел в наших представлениях о наследственности, который был заполнен благодаря этому открытию.

Эту главу мы начинаем с описания структуры ДНК. Мы увидим, как, несмотря на химическую простоту, структура и химические свойства ДНК делают ее идеально подходящей в качестве исходного материала для генов. После этого мы познакомимся с тем, как многочисленные белки в хромосомах приводят в порядок и упаковывают эту ДНК. Упаковка должна быть упорядоченной — такой, чтобы хромосомы могли реплицироваться и правильно распределяться между двумя дочерними клетками при каждом делении материнской клетки. Она должна также обеспечивать доступ к хромосомной ДНК тем ферментам, которые восстанавливают ее, когда она повреждена, и тем специализированным белкам, которые направляют экспрессию всего множества ее генов. Нам предстоит увидеть и то, как упаковка ДНК изменяется по всей длине каждой хромосомы у эукариот, и как в особенностях укладки ДНК может сохраняться ценная летопись истории развития клетки.

За последние два десятилетия произошли кардинальные изменения в нашей способности определять точную последовательность субъединиц в молекулах ДНК. В результате этого мы теперь знаем порядка 3 миллиардов субъединиц ДНК, в которых заложена информация о формировании взрослого человека из оплодотворенной яйцеклетки, равно как и последовательности ДНК тысяч других организмов. Подробный анализ этих последовательностей выявил захватывающие сведения о процессе эволюции, и именно этой темой и завершается данная глава.

Это первая из четырех глав, которые мы посвятили основным генетическим механизмам, посредством которых клетка поддерживает, копирует, выражает, или экспрессирует, а иной раз и улучшает генетическую информацию, содержащуюся в ее ДНК. В этой главе представлен широкий обзор структуры ДНК и принци-

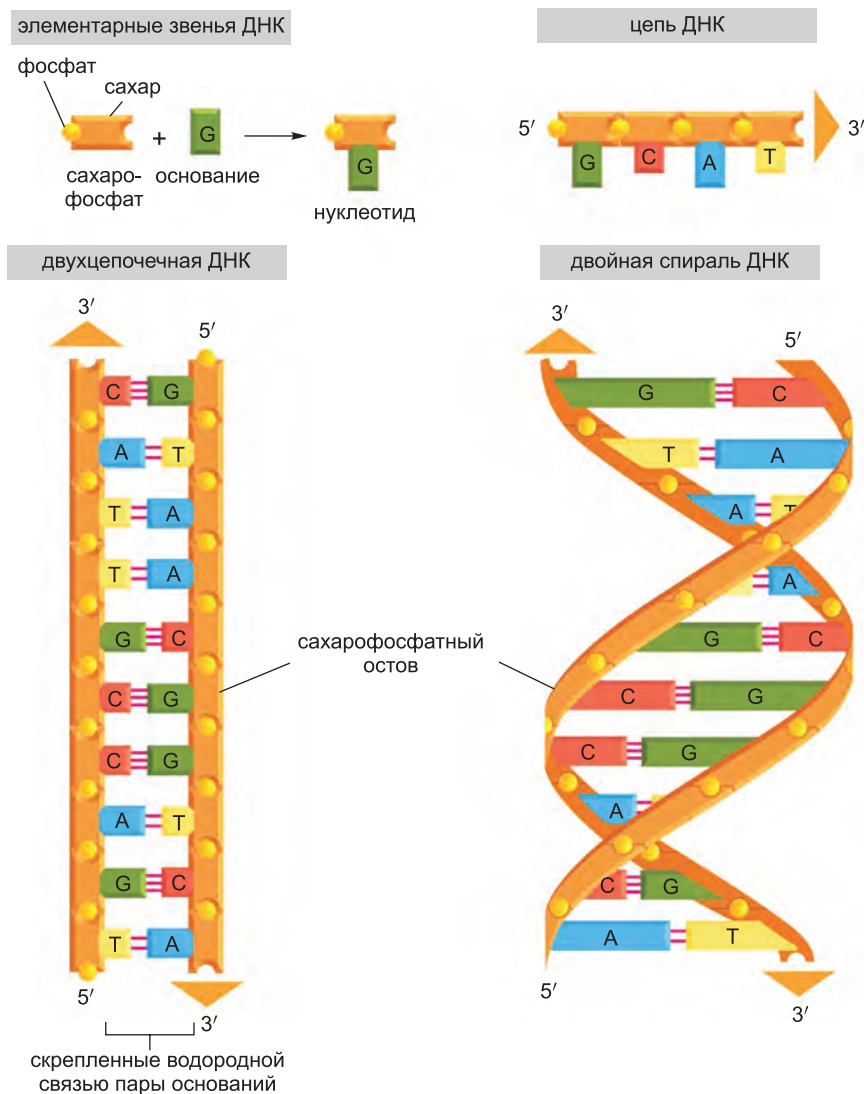


Рис. 4.3. Цепь ДНК и ее элементарные звенья. ДНК состоит из нуклеотидов четырех типов, которые ковалентно связаны в полинуклеотидную цепь (нить ДНК), от сахаро-фосфатной основы которой отходят в сторону основания (А, С, Г и Т). Молекула ДНК состоит из двух нитей ДНК, скрепленных друг с другом водородными связями между спаренными основаниями. Стрелки при концах цепей ДНК показывают их полярность, из чего можно видеть, что цепи в молекуле ДНК антипараллельны. На схеме в левом нижнем углу рисунка молекула ДНК показана выпрямленной; в действительности она закручена в двойную спираль, показанную справа. На рис. 4.5 та же структура изображена подробнее.

па ее упаковки в хромосомы. В следующей главе (глава 5) мы рассматриваем механизмы, при помощи которых клетка точно реплицирует и восстанавливает ДНК; мы описываем также процесс генетической рекомбинации, в ходе которого последовательности ДНК могут перестраиваться. Экспрессия генов — процесс, через который информация, закодированная в ДНК, интерпретируется клеткой

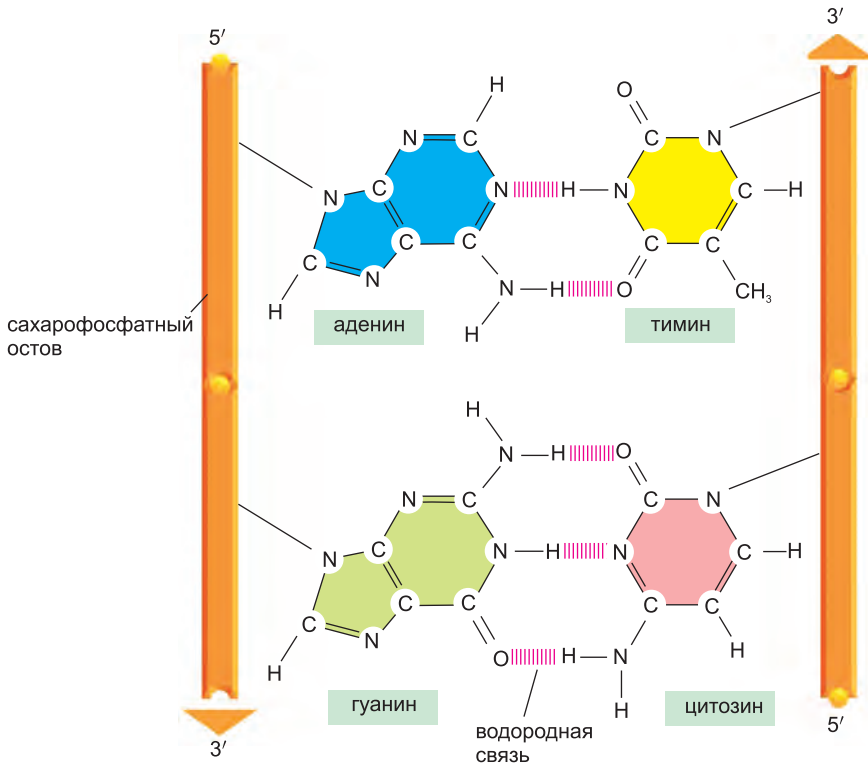


Рис. 4.4. Комплементарные пары оснований в двойной спирали ДНК. Формы и химическая структура оснований обеспечивают эффективное образование водородных связей только между парами оснований А–Т и Г–С; при этом атомы, которые способны образовывать водородные связи (см. приложение 2.3, стр. 110–111), могут быть сведены на близкое друг от друга расстояние без искажения двойной спирали. Как показано, между А и Т образуются две водородные связи, тогда как между Г и С образуется три связи. Основания могут спариваться подобным образом, только если обе полинуклеотидные цепи, которые их содержат, антипараллельны друг другу.

для проведения синтеза белков, — является главной темой главы 6. В главе 7 мы описываем, как такая экспрессия генов управляется клеткой, чтобы гарантировать, что каждый из многих тысяч белков и молекул РНК, зашифрованных в ее ДНК, будет «изготовлен» только в надлежащее время и в нужном месте на всем протяжении жизненного цикла клетки.

4.1. Структура и функция ДНК

В 1940-е гг. биологам было трудно представить, каким образом ДНК могла быть генетическим материалом ввиду очевидной простоты ее химического строения. К тому времени было известно, что ДНК представляет собой длинный полимер, состоящий из субъединиц всего лишь четырех типов, которые к тому же обладают схожими химическими характеристиками. В начале 1950-х гг. ДНК была исследована при помощи рентгеноструктурного анализа — методики определения трехмерной атомной структуры молекулы (обсудим ее в главе 8). Первые результаты

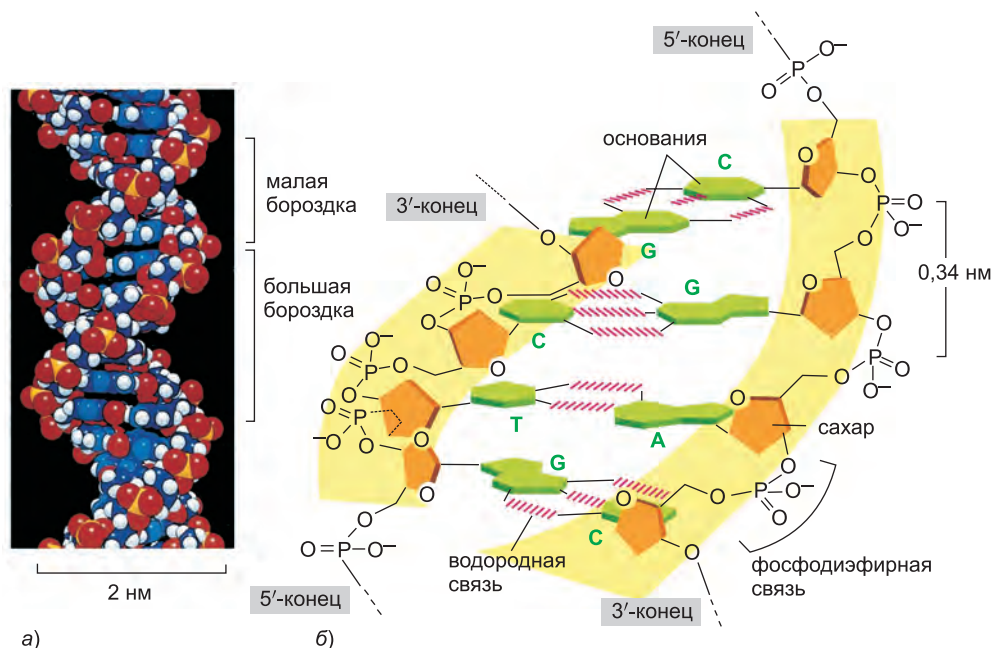


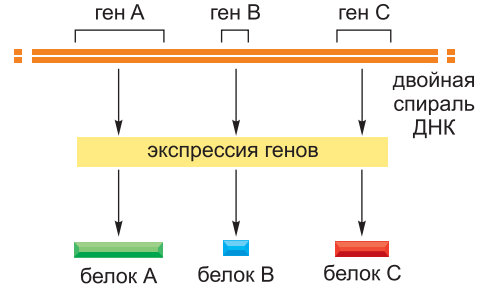
Рис. 4.5. Двойная спираль ДНК. а) Объемная модель полутора витков двойной спирали ДНК. Каждый виток ДНК состоит из 10,4 пар нуклеотидов, а расстояние между центрами смежных пар нуклеотидов — 0,34 нм. В результате обвития обеих цепей друг вокруг друга по двойной спирали бегут две бороздки: более широкую бороздку называют большой бороздкой, а меньшую — малой бороздкой. б) Короткий отрезок двойной спирали, показанный сбоку, охватывает четыре пары оснований. Нуклеотиды ковалентно связаны между собой посредством фосфодиэфирных связей, которые соединяют 3'-гидроксильную группу (—ОН) одного сахара с 5'-фосфатной группой следующего сахара. Таким образом, каждая из полинуклеотидных цепей обладает химической полярностью, то есть два ее конца химически различны. 5'-конец полимера ДНК в соответствии с общепринятой системой обозначений часто изображают с фосфатной группой, а на 3'-конце показывают гидроксил.

рентгеновского анализа показали, что ДНК состоит из двух полимерных нитей, закрученных в спираль. Тот факт, что ДНК является двухцепочечной молекулой, имел решающее значение и послужил одним из главных ориентиров, которые в своей совокупности привели Уотсона и Крика к созданию модели структуры ДНК. Но только когда эта модель была предложена в 1953 г., стал очевиден потенциал ДНК для репликации и кодирования информации. В этом параграфе мы изучим структуру молекулы ДНК и объясним в общих чертах, что дает ей возможность хранить наследственную информацию.

4.1.1. Молекула ДНК состоит из двух комплементарных цепей нуклеотидов

Молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) образована двумя длинными полинуклеотидными цепями, состоящими из нуклеотидных субъединиц четырех типов. Каждая из таких цепей известна как *цепь ДНК*, или *нить ДНК*. Водородные связи между входящими в состав нуклеотидов основаниями скрепляют эти две цепи друг с другом (рис. 4.3). Как мы увидели в главе 2 (приложение 2.6, стр. 116–117), нуклеотиды состоят из пятиуглеродного сахара, к которому

Рис. 4.6. Связь между генетической информацией, заложенной в ДНК, и белками (было рассмотрено в главе 1).



присоединены одна или несколько фосфатных групп и азот-содержащее основание. В случае нуклеотидов ДНК сахар представлен дезоксирибозой, а к ней присоединена одна фосфатная группа (отсюда название «дезоксирибонуклеиновая кислота»), а в качестве основания может выступать *аденин* (А), *цитозин* (С), *гуанин* (G) или *тимин* (Т). Нуклеотиды ковалентно связаны друг с другом в цепь через сахара и фосфаты, которые, соответственно, образуют «основную цепь» из чередующихся звеньев —сахар—фосфат—сахар—фосфат—. Поскольку субъединицы этих четырех типов отличаются только основанием, каждая полинуклеотидная цепь в ДНК походит на ожерелье (основная цепь) из нанизанных бусин четырех типов (четыре основания А, С, G и Т). Эти же символы (А, С, G и Т) обычно употребляются также и для обозначения четырех различных нуклеотидов, то есть оснований с присоединенными к ним сахарными и фосфатными группами.

Способ, которым нуклеотидные субъединицы соединены друг с другом, придает нити ДНК химическую полярность. Если представить каждый сахар как блок с выдающимся штырьком (5'-фосфат) на одной стороне и с гнездом (3'-гидроксил) на другой (см. рис. 4.3), то в любой завершенной цепи, образованной путем сочленения штырьков с гнездами, все субъединицы будут выстроены в ряд в одной и той же ориентации. Более того, оба конца такой цепи будут легко различимы, поскольку на краю одного будет зиять свободное гнездо (3'-гидроксил), а на оконечности другого — торчать штырек (5'-фосфат). При ссылаках на такого рода полярность в цепи ДНК один конец называют *3'-концом*, а другой — *5'-концом*.

Трехмерная структура ДНК — **двойная спираль** — обусловлена химическими и структурными особенностями двух ее полинуклеотидных цепей. Так, обе эти цепи скрепляются вместе водородными связями между находящимися друг против друга основаниями из различных нитей, при этом все основания находятся во внутренней части двойной спирали, а сахарофосфатные основные цепи располагаются с внешней ее стороны (см. рис. 4.3). Во всех случаях более громоздкое двуциклическое основание (пурин; см. приложение 2.6, стр. 116–117) спаривается с меньшим по «габаритам» одноциклическим основанием (пиримидином); А всегда образует пару с Т, а G — с С (рис. 4.4). Такое **комплементарное спаривание оснований** позволяет природе упаковывать **пары оснований** в энергетически наиболее благоприятном расположении — в сердцевине двойной спирали. При таком раскладе каждая пара оснований имеет практически одинаковую ширину, благодаря чему сахарофосфатные основные цепи удерживаются на равном расстоянии одна от другой на всем протяжении молекулы ДНК. Ради пущего умножения эффективности упаковки пар оснований обе сахарофосфатные основные цепи закручиваются друг вокруг друга и образуют двойную спираль с одним полным витком на каждые десять пар оснований (рис. 4.5).

Члены каждой пары оснований могут совместно уместиться в пределах сечения двойной спирали, только если обе цепи спирали будут **антипараллельны**, то есть если полярность одной нити ориентирована противоположно полярности другой

CCSTGTGGAGCCACACCCSTAGGGTTGGCCCA
 ATCTCTCCAGAGGAGGGAGGGCCAGCTAGG
 CCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGGCAGAG
 CCATCTATTGCTTACATTTGCTCTTGCACAC
 AACTGTGTTCACTAGCAACTCAAAACAGACA
 CCAATGGTGCACCTGACTCTCTGAGGGAGAAT
CTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGA
ACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGG
GCAGGTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGT
 TTAAGGAGACCAATAGAAAATGGGCATGTG
 GAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATA
 GGCACCTGACTCTCTCTGCSTATTGGTCTAT
 TTTCCACCCSTTAGGCTGTGCTGGTGGTCTAC
CCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCSTTT
GGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATG
GGCAACCCSTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAG
AAAGTGTCTCGGTGCSTTTAGTGAATGGCCTG
GCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACSTTT
GCCACACTGAGTGAAGTGCACCTGTGACAAG
GTGCACGTTGGATCCTGAGAACCTCAGGGTG
 AGTCTATGGGACCCCTTGAATTTTCTTTCC
 CCTCTTTTCTATGGTTAAGTTTATGTCAT
 AGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGGTACAGTTT
 AGAATGGGAAACAGACGGAATGATTGCATCA
 GTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTC
 TTTTATTGCTGTTCATAACAATTTGTTTTCT
 TTTTGTTAATVTTGVTTCSTTTTTTTTTT
 CTCTCCGCAATTTTTACTATTATACTTAA
 TGCSTTAACTATGTGTATAACAAAAGGAA
 TATCTCTGAGATACATTAAGTAACSTAAAA
 AAAAATTTACACAGTCTGCSTAGTACAT
 ACTATTTGGAATATATGTGTGCTATTATTC
 ATATTCATAATCTCCSTACTTTATTTCTCT
 TTAATTTTAATGATACATAATCATTTATAC
 ATATTTATGGGTTAAAGTGAATGTTTTAA
 TATGTGTACACATATTGACCAAACTAGGGT
 AATTTTGCATTTTGAATTTTAAAAATGCT
 TTCTTCTTTAATAATATCTTTTTTGTTTATC
 TTAATTTCTAATCTTTCCSTTCTCTTTCT
 TTTCAGGGCAATAATGATACAAATGATCAT
 GCCTCTTTGCACCACTTCTAAAGAAATAACAG
 TGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATACGAAT
 ATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAA
 ATTGTAACSTGATGTAAGAGGTTTTCATATTG
 СТААТАГСАГСТАСААСТСГТТАССТАТТ
 ТГСТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТ
 ГАТТАТТСТГАГТССААГСТАГГССТТТТ
 ГСТААТСАТСТТСАТАССТСТТАТСТТСТ
 СССАСАГ**CTCCTGGGCAACGTCCTGGTCTG**
TGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAAGAAAT
CACCCACACAGTGCAGGCTGCSTTACAGAA
AGTGGTGGCTGGTGTGCTCAATCCCTTGCC
CCACAAGTATCACTAAAGCTCGCTTTCTTCC
 TGTCSAATTTCTATTTAAAGGTTCTTTGT
 CCTAAGTCCAACTACTAAACTGGGGATA
 TТАТГААГГГССТТГАГСАТСТГГАТТСТГ
 ССТААТААААААСАТТТАТТТТТТТТТТТ
 ТГАТГАТТТАААТТАТТТТТТТТТТТТТ
 АСТАААААГГГААТТТТТТТТТТТТТТТ
 АААСТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТ
 СТСАТГТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТ
 СТААТГСАТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТ
 СТАТГСТТАТТТТТТТТТТТТТТТТТТТ
 ТАТТТГАГГГСРГАТТТТТТТТТТТТТТ
 ТТТТГСАТГСТГТАТТТТТТТТТТТТТ
 ТГТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТТ

нити (см. [рис. 4.3](#) и [4.4](#)). Вследствие этих требований к спариванию оснований нуклеотидная последовательность каждой из двух цепей молекулы ДНК является в точности **комплементарной** последовательности нуклеотидов второй свитой с нею цепи.

4.1.2. В структуре ДНК заложены механизмы наследственности

Гены несут биологическую информацию, которая должна точно копироваться для передачи следующему поколению каждый раз, когда клетка делится с образованием двух дочерних клеток. Исходя из этих требований возникают два ключевых вопроса биологии: каким образом информация, необходимая для описания строения организма, может кодироваться в химической форме и каким образом она может быть точно скопирована? Открытие структуры двойной спирали ДНК явилось путеводной вехой для биологии XX столетия, потому что оно дало прямые ответы на оба вопроса и таким образом объяснило молекулярную основу наследственности. В этом параграфе мы кратко обсуждаем эти ответы, но в последующих главах книги исследуем их намного скрупулезнее.

Информация в ДНК закодирована собственно порядком следования, или последовательностью нуклеотидов в обеих цепях. Каждое основание: А, С, Т или G — можно рассматривать как букву четырехсимвольного алфавита, которым описываются биологические сообщения, заложенные в химической структуре ДНК. Как мы увидели в главе 1, организмы отличаются один от другого потому, что их соответствующие молекулы

Рис. 4.7. Нуклеотидная последовательность гена β-глобина человека. Последовательность нуклеотидов принято записывать в направлении от 5'-конца к 3'-концу и ее следует читать слева направо построчно сверху вниз страницы, как если бы это был обычный текст. Этот ген несет в себе информацию об аминокислотной последовательности одного из двух типов субъединиц молекулы гемоглобина — белка, который переносит кислород в крови. Иной ген — α-глобина — несет информацию о другого типа субъединице гемоглобина (молекула гемоглобина имеет четыре субъединицы, по две каждого из этих типов). Показана только одна из двух нитей двойной спирали ДНК, содержащая ген β-глобина; другая нить имеет в точности комплементарную последовательность. Последовательности ДНК, выделенные *желтым* фоном, показывают три области гена, определяющие аминокислотную последовательность белка β-глобина. Нам еще предстоит увидеть в главе 6, как клетка сращивает эти три последовательности вместе на уровне информационной РНК, с тем чтобы синтезировать полномерный белок β-глобина.

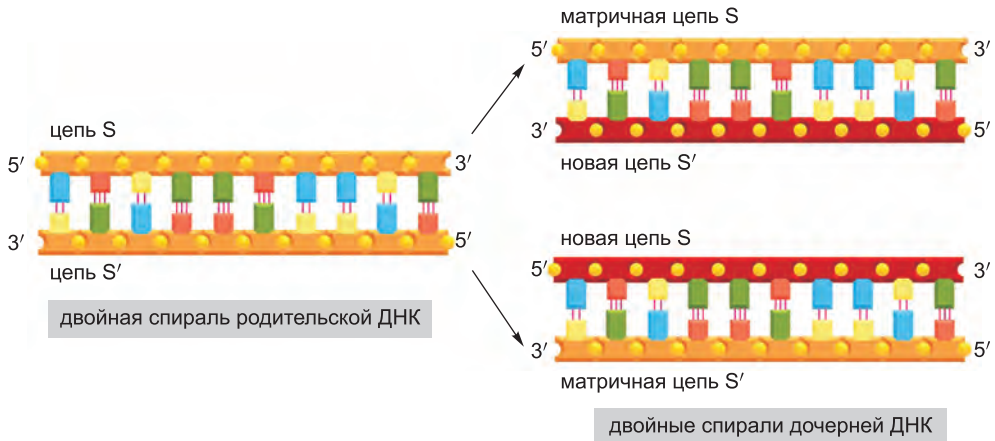


Рис. 4.8. ДНК как матрица для дублирования самой себя. Поскольку нуклеотид А успешно спаривается только с Т, а G — с С, каждая из цепей ДНК может быть использована в качестве матрицы для задания последовательности нуклеотидов в комплементарной ей цепи. За счет этого двухцепочечная ДНК может копироваться с необходимой точностью и каждая из родительских спиралей ДНК давать начало двум идентичным дочерним спиральям ДНК.

ДНК имеют различные последовательности нуклеотидов и, следовательно, несут различные биологические сообщения. Но как алфавит нуклеотидов используется для составления таких сообщений, и что в них написано?

Как обсуждалось выше, задолго до того, как определили структуру ДНК, было известно, что гены содержат инструкции для производства белков. Отсюда ясно, что сообщения, записанные в ДНК, тем или иным образом кодируют белки (рис. 4.6). Эта связь сразу же облегчает поиск ответа на вышеозначенный вопрос. Как было сказано в главе 3, свойства любого белка, которые определяют его биологическую функцию, обусловлены его трехмерной структурой. Эта структура определяется, в свою очередь, линейной последовательностью аминокислот, из которых он состоит. Поэтому линейная последовательность нуклеотидов в гене должна так или иначе описывать линейную последовательность аминокислот в белке. Структура ДНК не говорит прямо о существовании точного соответствия между четырехбуквенным алфавитом нуклеотидов ДНК и двадцатибуквенным алфавитом аминокислот белков — генетического кода, — и прошло десятилетие после открытия двойной спирали, прежде чем его удалось установить. В главе 6 мы опишем этот код подробно в ходе разбора процесса, известного под названием *экспрессии генов*, посредством которого клетка преобразует нуклеотидную последовательность гена сначала в нуклеотидную последовательность молекулы РНК, а затем в аминокислотную последовательность белка.

Полный набор информации в ДНК организма называют его **геномом**, и он несет в себе информацию обо всех белках и молекулах РНК, которые организм когда-либо будет синтезировать. (Термин «геном» употребляется также и для описания ДНК, которая несет эту информацию.) Количество информации, содержащейся в геномах, колеблется: например, типичная диплоидная клетка человека содержит 2 метра двойной спирали ДНК. Засписанная в виде четырехбуквенного нуклеотидного алфавита, последовательность нуклеотидов одного очень маленького гена человека

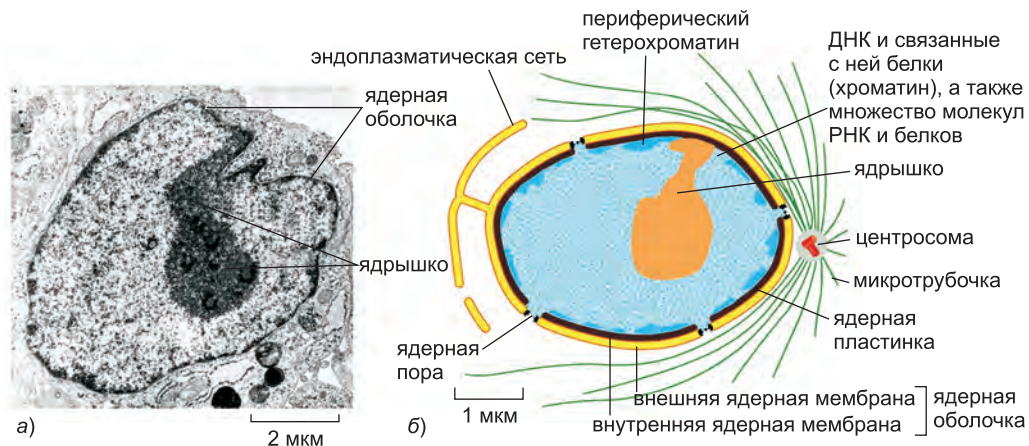


Рис. 4.9. Поперечный срез типичного ядра клетки. а) Электронный микрофотоснимок тонкого среза ядра фибробласта человека. б) Схематический рисунок, показывающий, что ядерная оболочка состоит из двух мембран, наружная плавно переходит в мембрану эндоплазматической сети (см. также [рис. 12.8](#)). Пространство внутри эндоплазматической сети (просвет ЭС) окрашено *желтым*; оно непосредственно связано с пространством между обеими ядерными мембранами. Двойные липидные слои внутренней и внешней ядерных мембран соединяются друг с другом через стенки всех ядерных пор. Подобная листовая сеть промежуточных нитей (*коричневый цвет*) внутри ядра создает механическую опору ядерной оболочке, образуя специальную поддерживающую структуру, называемую ядерной пластинкой (ее подробное описание также дано в главе 12). Гетерохроматин вблизи тонкой пластинки содержит особым образом уплотненные области ДНК, о которых мы поговорим позже.

занимает четверть страницы текста ([рис. 4.7](#)), тогда как полная последовательность нуклеотидов генома человека заполнила бы более тысячи книг размером с эту. В дополнение к важной информации другого рода, она несет инструкции примерно для 24 000 различных белков.

При каждом делении клетка должна копировать содержащийся в ней геном, чтобы передать его обеим дочерним клеткам. Открытие структуры ДНК раскрыло также и принцип, благодаря которому такое копирование становится возможным: поскольку каждая из нитей ДНК содержит последовательность нуклеотидов, которая является точно комплементарной последовательности нуклеотидов спаренной с ней нити, каждая из них может служить **матрицей**, или шаблоном, для синтеза новой комплементарной нити. Другими словами, если мы обозначим две нити ДНК как S и S' , то нить S может служить матрицей для изготовления новой нити S' , а нить S' может служить матрицей для создания новой нити S ([рис. 4.8](#)). Таким образом, заключенная в ДНК генетическая информация может быть точно скопирована до гениальности простым процессом, в ходе которого нить S отделяется от нити S' и каждая из отделившихся нитей затем служит матрицей для производства новой комплементарной нити-напарницы, которая является идентичной прежней партнерше.

Способность каждой из цепей молекулы ДНК выступать в качестве матрицы для «производства» комплементарной цепи позволяет клетке копировать, или *реплицировать*, хранимый в ее чреве геном перед передачей его потомкам. В следующей главе мы опишем изящную машину, используемую клеткой для выполнения этой чудовищной по своему размаху задачи.

4.1.3. У эукариот ДНК заключена в ядре клетки

Как сообщалось в главе 1, почти вся ДНК в клетке эукариот заключена в ядре, которое во многих клетках занимает около 10 % общего объема клетки. Эта полость ограничена *ядерной оболочкой*, образованной двумя концентрическими мембранами из двойного липидного слоя (рис. 4.9). Эти мембраны проколоты через определенные промежутки большими ядерными порами, через которые происходит перенос молекул между ядром и цитозолем. Оболочка ядра непосредственно соединена с раскинувшимися в объеме клетки мембранами эндоплазматической сети. И она механически поддерживается сетью промежуточных нитей, называемой *ядерной пластинкой*, которая образует тонкую листообразную сетчатую структуру, расположенную сразу под внутренней ядерной мембраной (см. рис. 4.9, б).

Ядерная оболочка позволяет многим белкам, которые взаимодействуют с ДНК, скапливаться в тех местах внутриклеточного пространства, где они необходимы, и, как мы увидим в последующих главах, она также удерживает ядерные и цитозольные ферменты отдельно друг от друга, что крайне важно для надлежащего функционирования клеток эукариот. Разделение пространства клетки на полости, или компартиментализация, примером чего служит ядро, является важным принципом биологии; это необходимо для обеспечения среды, в которой протекание биохимических реакций облегчается за счет высокой концентрации и субстратов, и ферментов, на них воздействующих. Кроме того, такое обособление пространственных областей препятствует ферментам, необходимым в одной части клетки, попадать в выстроенные биохимические пути в другой ее части.

Заключение

Генетическая информация содержится в линейной последовательности нуклеотидов ДНК. Все молекулы ДНК суть двойные спирали, образованные из двух комплементарных нуклеотидных цепей, скрепляемых одна с другой водородными связями между парами оснований G—C и A—T. Дублирование генетической информации происходит путем использования одной из цепей ДНК в качестве матрицы для формирования комплементарной ей цепи. Генетическая информация, хранимая в ДНК организма, содержит инструкции для всех белков, которые организм будет когда-либо синтезировать, и, как говорят, составляет его геном. У эукариот ДНК расположена в ядре клетки — крупном, окруженном мембраной компарimente.

4.2. Хромосомная ДНК и ее упаковка в хроматиновое волокно

Самая важная функция ДНК — нести в себе гены, а в них — информацию, которая определяет все белки и молекулы РНК, из которых строится организм, — включая информацию о том, когда, в какого типа клетках и в каком количестве каждый белок должен быть выпущен в жизнь. Геномы эукариот поделены на хромосомы, и в данном параграфе мы увидим, как гены обычно располагаются на хромосомах. Кроме того, мы опишем специализированные последовательности ДНК, которые требуются хромосоме для точного ее дублирования и передачи от одного поколения к следующему.

Перед нами стоит также серьезная задача разобраться в принципах упаковки

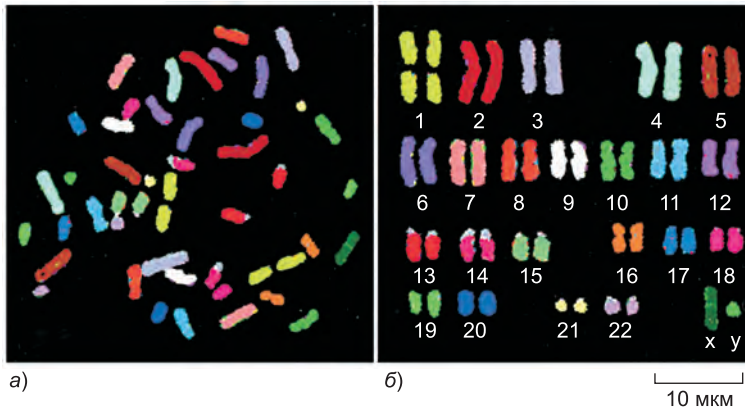


Рис. 4.10. Полный набор хромосом человека. Эти хромосомы, некогда принадлежавшие мужскому организму, были выделены из клетки, претерпевающей деление ядра (митоз), и поэтому сильно уплотнены. Каждая из этих хромосом была «раскрашена» своим цветом, чтобы обеспечить ее однозначное опознавание в поле светового микроскопа. Для раскрашивания хромосом вводят молекулы ДНК человека, меченные флуоресцентными красителями, которые взаимодействуют с хромосомами. Например, молекулы ДНК, полученные из хромосомы 1, метят одной определенной комбинацией красителей, выделенные из хромосомы 2 — другой, и так далее. Поскольку меченая ДНК может образовывать пары оснований, или гибридизироваться, только с той хромосомой, из которой она была извлечена (все пояснения — в главе 8), разные хромосомы окрашиваются по-разному. Для таких экспериментов хромосомы подвергают обработке различными препаратами, которые разделяют двуцепочечную ДНК на отдельные нити и работают так, что допускают спаривание с основаниями однострочечной меченой ДНК и сохраняли структуру хромосомы относительно неповрежденной. *а)* Хромосомы, как мы их видим сразу после лизиса клетки. *б)* Те же хромосомы, искусственно выстроенные в порядке их нумерации. Такой вот полный набор хромосом называют кариотипом. (Заимствовано из E. Schröck et al., *Science* 273:494–497, 1996. С любезного разрешения издательства «АААС».)

ДНК. Если бы двойные спирали всех 46 хромосом, находящихся в клетке человека, можно было бы выстроить конец в конец, то они достигли бы длины около 2 метров; хотя ядро, в котором содержится вся эта ДНК, имеет лишь около 6 мкм в диаметре. Геометрически это равносильно упаковке 40 км (24 мили) чрезвычайно тонкой нити в теннисный шар! Столь сложная задача упаковки ДНК блестяще решается специализированными белками, которые связываются с ДНК и сворачивают ее, образуя ряд спиралей и петель, которые обеспечивают все более и более высокие уровни организации и не допускают спутывания ДНК в гордиев узел. Что удивительно, хотя ДНК свернута очень туго, она уложена таким образом, что остается доступной для многих ферментов в клетке, которые ее реплицируют, восстанавливают и используют заложенные в ней гены для производства молекул РНК и белка.

4.2.1. ДНК эукариот упакована в набор хромосом

У эукариот находящаяся в ядре ДНК разделена на отдельные **хромосомы**. Например, геном человека — примерно $3,2 \cdot 10^9$ нуклеотидов — распределен по 24-м различным хромосомам. Каждая хромосома состоит из одной чрезвычайно длинной линейной молекулы ДНК, связанной с белками, которые свертывают и упаковывают тончайшую нить ДНК в более компактную структуру. Комплекс ДНК с белком

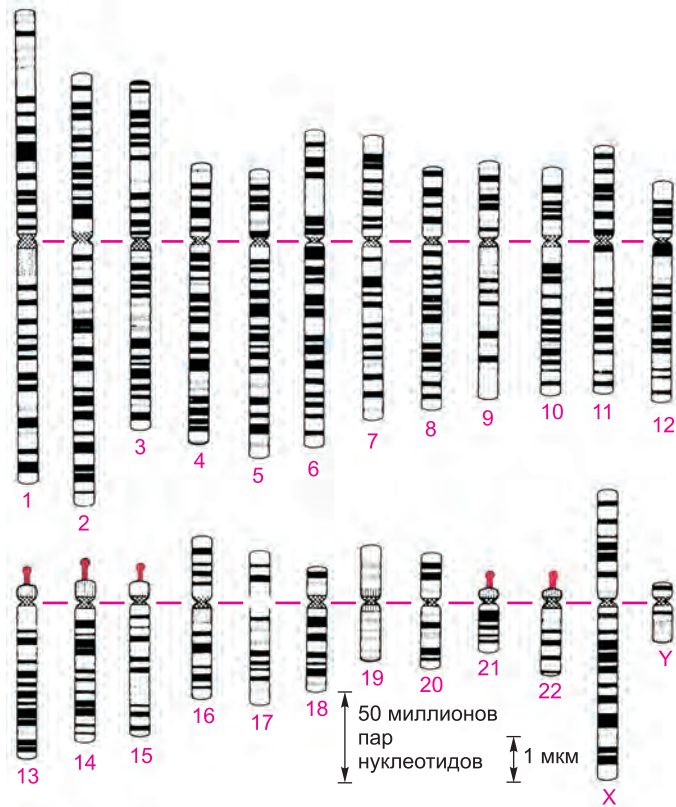


Рис. 4.11. Картины полосчатости хромосом человека. Хромосомы с 1-й по 22-ю пронумерованы в приблизительном порядке их размера. Типичная соматическая клетка человека (не из зародышевой линии) содержит по две копии каждой из этих хромосом плюс две половые хромосомы: две X-хромосомы у женских особей и X-с-Y-хромосомой у представителей мужского племени. Хромосомы, идущие на составление таких карт, были окрашены на раннем этапе митоза, когда они не полностью уплотнены. Красная горизонтальная линия представляет положение центромеры (см. рис. 4.21), которая имеет вид перетяжки на митотических хромосомах. Красные вздутия на хромосомах 13, 14, 15, 21 и 22 показывают позиции генов, которые кодируют молекулы большой рибосомной РНК (обсудим в главе 6). Такие картины получают путем окрашивания хромосом красителем Гимза, и их можно наблюдать в световой микроскоп. (Желающих ознакомиться с микрофотоснимками отсылаем к рис. 21.18; переработано из U. Franke, *Cytogenet. Cell. Genet.* 31: 24–32, 1981. С любезного разрешения издательства Karger.)

называют *хроматином* (от греческого слова *chroma*, означающего «цвет») в силу его способности окрашиваться. В дополнение к белкам, участвующим в упаковке ДНК, хромосомы связаны также и с многочисленными молекулами белка и РНК, необходимыми для протекания процессов экспрессии генов, репликации ДНК и восстановления ДНК.

Бактерии выделяют своим генам лишь одну-единственную молекулу ДНК, чаще всего кольцевую (см. рис. 1.29). Эта ДНК связана с белками, что упаковывают и уплотняют ДНК, но они отличаются от белков, которые выполняют те же функции на службе у эукариот. Хотя ее и называют нередко бактериальной «хромосомой», она не имеет той структуры, что хромосомы эукариот, и о способе упаковки бакте-

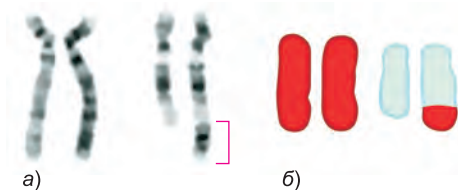


Рис. 4.12. Аномальная хромосома человека. а) Две пары хромосом, окрашенных красителем Гимза (см. рис. 4.11), от пациента с атаксией — болезнью, характеризующейся прогрессирующим нарушением координации движения. Этот пациент имеет нормальную пару хромосом 4 (пара слева), но одну нормальную хромосому 12 и одну aberrантную хромосому 12, о чем свидетельствует ее увеличенная длина (пара справа). Дополнительный

материал, содержащийся на аномальной хромосоме 12 (красная скобка), как было узнано по ее картине полос, представляет собой копию отрезка хромосомы 4, который оказался прикрепленным к хромосоме 12 в результате события неправильной рекомбинации, называемого хромосомной транслокацией. б) Рисунок тех же двух пар хромосом, «раскрашенных» красным для ДНК хромосомы 4 и синим для ДНК хромосомы 12. Два этих метода приводят к одному и тому же заключению о природе ненормальной хромосомы 12, но раскрашивание хромосом обеспечивает лучшее разрешение и позволяет тем самым точно опознавать даже короткие части хромосом, претерпевших транслокацию. Однако окрашивание по Гимза проще в выполнении. (Переработка из E. Schröck et al., *Science* 273: 494–497, 1996. С любезного дозволения издательства AAAS.)

риальной ДНК известно гораздо меньше. Поэтому наше исследование структуры хромосом будет почти полностью сосредоточено на хромосомах эукариот.

За исключением зародышевых клеток (обсудим их в главе 21) и клеток нескольких высокоспециализированных типов, которые не могут размножаться и к тому же не содержат ДНК (например, красные клетки крови), все клетки человека содержат по две копии каждой из хромосом: одна из копий наследуется от матери, а вторая — от отца. Материнские и отцовские хромосомы соответствующих пар называют **гомологичными хромосомами (гомологами)**. Единственные негомологичные пары хромосом — половые хромосомы у мужских особей, когда *Y-хромосома* наследуется от отца, а *X-хромосома* заимствуется у матери. Таким образом, общее число хромосом в каждой клетке человека — 46 — это 22 пары, имеющиеся как у мужских, так и у женских особей (они называются аутосомами — прим.ред.), плюс две так называемые половые хромосомы (X и Y в мужских организмах, две X — в женских). *Гибридизация ДНК* представляет собой методику, в которой нить меченой нуклеиновой кислоты служит «зондом», который отыскивает комплементарную нить, о чем будет подробно написано в главе 8. Эта методика может быть использована для различения хромосом человека путем «раскрашивания» их в разные цвета (рис. 4.10). Раскрашивание хромосом обычно выполняют на этапе



Рис. 4.13. Расположение генов в геноме *S. cerevisiae*. *S. cerevisiae* — почкующиеся дрожжи, широко применяемые в пивоварении и хлебопечении. Геном клетки этих дрожжей распределен по 16-ти хромосомам. Чтобы показать высокую плотность генов, характерную для этого вида, была произвольно отобрана небольшая область одной из хромосом. Как показывает *светло-красный фон*, одни гены транскрибируются с нижней нити, тогда как другие транскрибируются с верхней нити. Всего в полном геноме содержится около 6 300 генов, на которые приходится чуть более 12 миллионов пар нуклеотидов. (Стоит напомнить, что на рис. 1.29 представлены плотно упакованные гены бактерии, геном которой насчитывает 4,6 миллионов пар нуклеотидов в длину.)

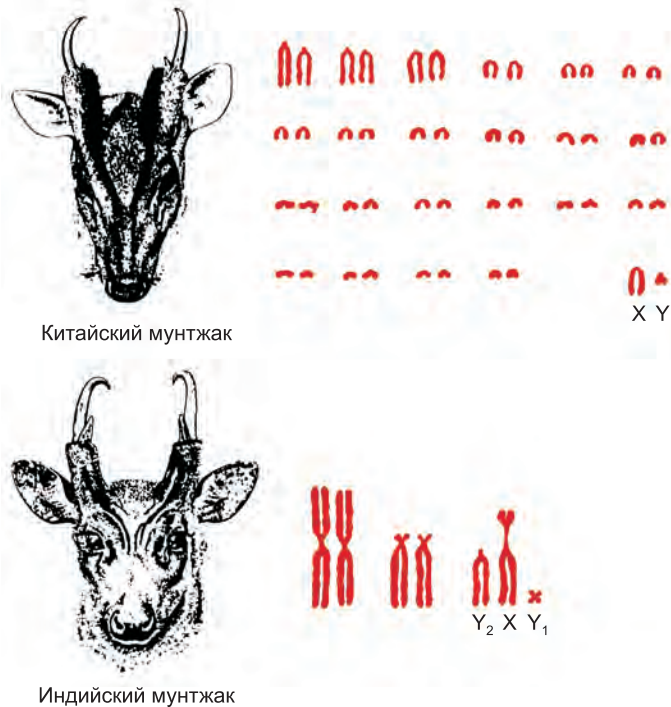


Рис. 4.14. Два близкородственных вида оленей с сильно отличающимся числом хромосом. В ходе эволюции индийского мунтжака изначально отдельные хромосомы сливались, не оказав какого-либо заметного воздействия на животное. Эти два вида содержат одинаковое число генов. (Взято из M. W. Strickberger, *Evolution*, 3rd ed. Sudbury, MA: Jones & Bartlett Publishers, 2000.)

клеточного цикла, называемом митозом, когда хромосомы уплотнены особенно сильно и их легко наблюдать (см. ниже).

Еще один более традиционный способ отличить одну хромосому от другой состоит в том, чтобы окрасить их красителями, которые производят яркую и устойчивую картину полос на всех митотических хромосомах (рис. 4.11). Структурная основа существования таких картин «полосчатости» еще не изучена до конца. Тем не менее картина распределения полос уникальна для хромосом одного типа, и именно такого рода картины полос позволили изначально опознать и пронумеровать все хромосомы человека.

Изображение всех 46 хромосом человека в стадии митоза называют **кариотипом** человека. Если части хромосом теряются или перескакивают между хромосомами, то такие изменения могут быть обнаружены по изменениям картин полосчатости или по изменениям картины раскраски хромосом (рис. 4.12). Цитогенетики используют эти изменения для обнаружения в хромосомах нарушений, которые связывают с наследственными дефектами, равно как и для соотнесения раковых образований с определенными перестройками хромосом в соматических клетках (подробнее об этом — в главе 20).

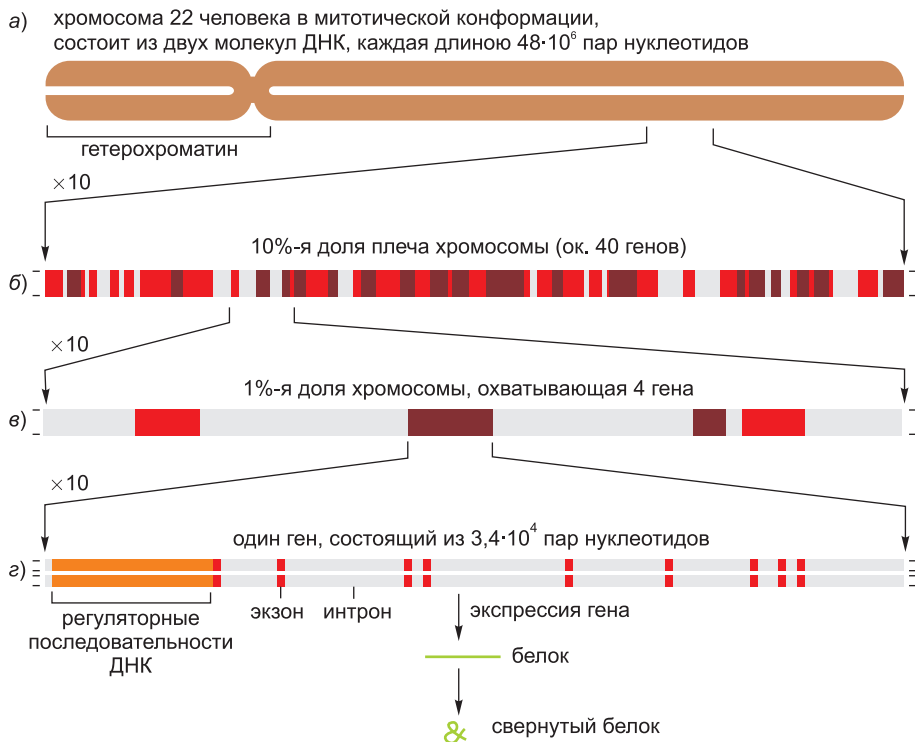


Рис. 4.15. Организация генов в хромосоме человека. а) Хромосома 22, одна из наименьших хромосом человека, содержит $48 \cdot 10^6$ пар нуклеотидов и составляет приблизительно 1,5 % полного генома человека. Большая часть левого плеча хромосомы 22 состоит из коротких повторяющихся последовательностей ДНК, которые упакованы в особенно компактной форме хроматина (гетерохроматин), который мы рассмотрим далее в этой главе. б) Десятикратное увеличение отрезка хромосомы 22, на коем обозначено около 40 генов. Известные гены отмечены *темно-коричневым цветом*, а *красным* — предсказанные гены. в) Увеличенная часть изображения б показывает несколько генов в полную длину. г) Интронно-экзонная организация типичного гена показана при дальнейшем десятикратном увеличении. Каждый экзон (*красный*) кодирует какую-то часть белка, тогда как интронная последовательность ДНК (*серый*) несет сравнительно небольшую нагрузку, о чем будет сказано подробнее в главе 6.

Геном человека ($3,2 \cdot 10^9$ пар нуклеотидов) — все количество генетической информации, принадлежащей нашему виду. Почти весь этот геном распределен по 22 аутосомам и 2 половым хромосомам (см. [рис. 4.10](#) и [4.11](#)), пребывающим в пределах ядра. Мельчайшая доля генома человека (16 569 пар нуклеотидов в виде многократных копий в клетке) находится в митохондриях (с которыми мы познакомили читателя в главе 1 и еще познакомим подробнее в главе 14). Термин *последовательность генома человека* относится к полной нуклеотидной последовательности ДНК, содержащейся в 24-х ядерных хромосомах и в митохондриях. Будучи диплоидным, ядро соматической клетки человека содержит примерно двойное (сравнительно с гаплоидным) количество ДНК, или $6,4 \cdot 10^9$ пар нуклеотидов, когда не дублирует свои хромосомы при подготовке к делению. (Переработка из Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* 409: 860–921, 2001. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

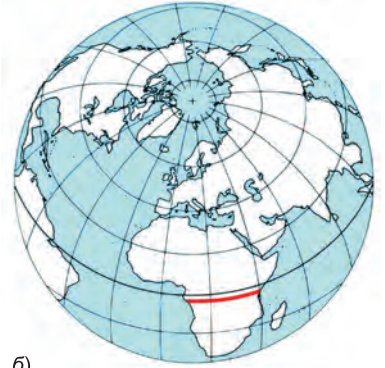
4.2.2. Хромосомы содержат длинные вереницы генов

Хромосомы несут в себе гены — функциональные единицы наследственности. Под геном обычно понимают сегмент ДНК, который содержит инструкции для выработки некоторого определенного белка (или группы близкородственных белков).

Рис. 4.16. Масштаб генома человека. Если геном человека нарисовать с интервалом 1 мм между нуклеотидами, как на изображении *а*, то он простирался бы на 3 200 км (приблизительно 2 000 миль) — достаточно большое расстояние, чтобы протянуться от берега до берега через центральную часть Африки, места появления наших предков (красная линия на изображении *б*). При таком масштабе один ген, кодирующий один белок, приходился бы в среднем на каждые 130 м. Среднего размера ген простирался бы на 30 м, но кодирующие последовательности в этом гене составляли бы в сумме лишь чуть более метра.



а)



б)

Хотя это определение относится к большинству генов, несколько процентов генов производит в качестве своего конечного продукта молекулу РНК вместо белка. Подобно белкам, такие молекулы РНК выполняют разнообразный набор структурных и каталитических функций в клетке, и мы еще обсудим их во всех подробностях в последующих главах.

Как и следовало ожидать, существует некоторая зависимость между сложностью организма и числом генов в его геноме (см. табл. 1.1, **стр. 18**). Например, некоторые простые бактерии имеют всего лишь 500 генов по сравнению с приблизительно 25 000 у людей. Бактерии и некоторые одноклеточные эукариоты, такие как дрожжи, имеют особенно сжатые (компактные) геномы; полная нуклеотидная последовательность их геномов показывает, что молекулы ДНК, которые составляют их хромосомы, лишь немногим больше верениц плотно упакованных генов (**рис. 4.13**). Однако хромосомы многих эукариот (а в том числе и людей) содержат, в дополнение к генам, большой избыток рассеянной по геному ДНК, которая, как видно, не несет никакой особо важной информации. Иногда ее называют «бросовой», или «мусорной», ДНК, чтобы показать, что ее полезность для клетки так и не была доказана; специфическая нуклеотидная последовательность львиной доли этой ДНК, быть может, совсем не важна. Однако часть этой ДНК имеет большое значение для надлежащей экспрессии некоторых генов, о чем мы еще упомянем.

Из-за различий в количестве ДНК, рассыпанной между генами, размеры геномов могут варьировать в широком диапазоне значений (см. **рис. 1.37**). Например, геном человека в 200 раз больше генома дрожжей *S. cerevisiae*, но всего в 30 раз меньше генома некоторых растений и земноводных и в 200 раз меньше генома амебы одного вида. Более того, из-за различий в количестве избыточной ДНК геномы подобных организмов (костные рыбы, например) могут отличаться в несколько сот раз по количеству содержащейся в них ДНК, несмотря на то что они содержат примерно одинаковое число генов. За что бы ни отвечала избыточная ДНК, определенно известно, что она не является такой уж большой помехой для клетки эукариот, чтобы от нее стоило избавиться.

Характер разделения генома на хромосомы также отличается у разных видов эукариот. Например, по сравнению с 46-ю у людей, соматические клетки одного из видов мелких оленей содержат всего лишь 6 хромосом, тогда как в соматических клетках одного из видов карпов содержится более 100. Даже близкородственные виды с подобными размерами геномов могут иметь далеко не близкие числа и размеры хромосом (**рис. 4.14**). Таким образом, нет никакой простой зависимости

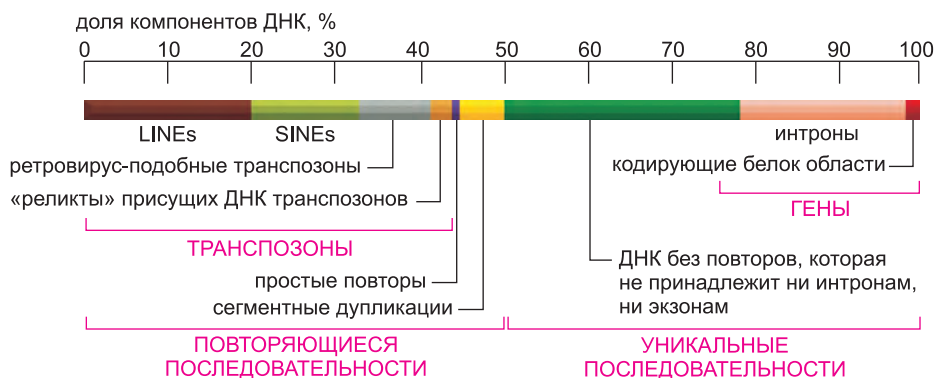


Рис. 4.17. Схематическое изображение состава нуклеотидной последовательности полностью секвенированного генома человека. LINEs, SINEs, ретровирусноподобные элементы и присущие ДНК транспозоны – это подвижные генетические элементы, которые приумножились в нашем геноме путем саморепликации и встраивания новых копий в различных позициях. Такого рода подвижным генетическим элементам мы уделим место в главе 5 (см. таблицу 5.3, стр. 318). Простые повторы представляют собой короткие последовательности нуклеотидов (менее 14-ти пар нуклеотидов), которые повторяются снова и снова на протяжении достаточно длинных отрезков. Сегментные дупликации — большие блоки генома (1000–200000 пар нуклеотидов), которые присутствуют в двух или нескольких местах генома. Блоки ДНК с наиболее высокой плотностью повторов, находящиеся в гетерохроматине, еще не были полностью секвенированы; поэтому приблизительно 10 % последовательности ДНК человека не представлено на этой схеме. (Данные любезно сообщены E. Margulies.)

между числом хромосом, сложностью организмов вида и полным размером генома. Скорее, геномы и хромосомы современных видов оформились уникальной историей, по-видимому, случайных генетических событий, воздействовавших на них под давлением естественного отбора в течение длительного периода эволюции.

4.2.3. Последовательность нуклеотидов генома человека показывает, каким образом расположены гены у людей

В главе 1 мы в общих фразах порассуждали о том, как хранимая в ДНК информация считывается и используется через РНК-посредники для синтеза белков (см. рис. 1.4). В 1999 г. впервые появилась возможность точно увидеть, как расположены гены в полной хромосоме позвоночного (рис. 4.15). Сегодня, с опубликованием «черновика» полного генома человека в 2001 г. и «чистой последовательности ДНК» в 2004 г., в распоряжении ученых имеется генетическая информация по всем хромосомам человека. Само количество информации, выданной на-гора проектом «Геном человека», ошеломляет (рис. 4.16 и таблица 4.1). В апогее своей работы проект вырабатывал черновые последовательности нуклеотидов со скоростью 1000 нуклеотидов в секунду 24 часа в сутки. Пройдет еще немало десятилетий, прежде чем вся эта информация будет полностью проанализирована, но она уже послужила стимулом для проведения новых экспериментов, которые оказали большое влияние на содержание всех глав этой книги.

Первая удивительная особенность генома человека состоит в том, сколь малая его толика (всего лишь несколько процентов) кодирует белки (рис. 4.17). Большая часть остальной хромосомной ДНК состоит из коротких подвижных частей ДНК, которые за время эволюции постепенно встроились в хромосому. Мы еще побеседуем

подробнее о таких *подвижных генетических элементах* в последующих главах.

Вторая примечательная особенность генома человека — большой средний размер гена, равный 27 000 пар нуклеотидов. Как было сказано выше, типичный ген несет в своей линейной последовательности нуклеотидов информацию о линейной последовательности аминокислот белка. Для кодирования белка среднего размера (около 430 аминокислот у человека) необходимо приблизительно 1300 пар нуклеотидов. Большая часть остальной ДНК гена состоит из длинных отрезков некодирующей ДНК, которые прерывают относительно короткие сегменты ДНК, кодирующие белок. Как будет описано подробно в главе 6, кодирующие последовательности называют **экзонами**; вклинивающиеся в них (некодирующие) последовательности называют **интронами** (см. [рис. 4.15](#) и таблицу 4.1). Таким образом, в большинстве своем гены человека состоят из длинной вереницы чередующихся экзонов и интронов, и в основном последовательность гена занята интронами. Напротив, большинство генов организмов с короткими геномами не имеет интронов. Этим объясняется намного меньший размер их генов (приблизительно одна двадцатая от размера генов человека), а также намного более весомая доля кодирующей ДНК в их хромосомах.

В довесок к интронам и экзонам, ко всем генам приписаны *регуляторные последовательности ДНК*, которые обеспечивают включение и отключение подопечных генов в надлежащее время, а также их экспрессию на соответствующем уровне и только в клетках надлежащего типа. У человека регуляторные последовательности типичного гена простираются на десятки тысяч пар нуклеотидов. Как и следовало ожидать, такие регуляторные последовательности более сжаты в организмах с короткими геномами. В главе 7 мы обсудим вопрос о том, как работают регуляторные последовательности ДНК.

Наконец, нуклеотидная последовательность генома человека показала, что существенно важная информация по созданию человека, кажется, находится в крайней степени беспорядка. Вот слова одного комментатора, описавшего наш геном: «В некотором смысле он может напоминать ваш гараж, спальню, холодильник или вообще жизнь: очень индивидуалистическую, но неопратно-неряшливую; редкие признаки организованности; множество скопившихся завалов рабочего беспорядка (называемого обычно “барахлом”); фактически ничего никогда не выбрасывается за ненадобностью и немногочисленные очевидно ценные предметы, вперемешку со всяким хламом, небрежно разбросаны повсюду».

4.2.4. Сравнение геномов позволяет выявлять консервативные в эволюционном отношении области последовательности ДНК

Основной помехой в интерпретации нуклеотидных последовательностей хромосом человека выступает тот факт, что большая часть последовательности не имеет, по всей вероятности, никакого значения. Более того, кодирующие области генома (экзоны), как правило, присутствуют в нем в виде маленьких островков (средним размером около 145-ти пар нуклеотидов), разбросанных в море ДНК, точная последовательность нуклеотидов которой имеет малое значение. Такая организация значительно затрудняет идентификацию всех экзонов на том или ином отрезке последовательности ДНК. Еще труднее определить, где ген начинается и заканчивается и сколько экзонов в точности он охватывает.

Точная идентификация гена требует подходов, которые извлекают инфор-

Таблица 4.1. Некоторые статистические данные о геноме человека

	ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ ГЕНОМ
Длина ДНК	3,2·10 ⁹ пар нуклеотидов*
Число генов	примерно 25 000
Наибольший ген	2,4·10 ⁶ пар нуклеотидов
Средний размер гена	27 000 пар нуклеотидов
Наименьшее число экзонов на ген	1
Наибольшее число экзонов на ген	178
Среднее число экзонов на ген	10,4
Наибольший размер экзона	17 106 пар нуклеотидов
Средний размер экзона	145 пар нуклеотидов
Число псевдогенов**	более 20 000
Процентное содержание последовательностей ДНК в экзонах (кодирующие белки последовательности)	1,5 %
Процентное содержание ДНК в других высококонсервативных последовательностях***	3,5 %
Процентное содержание ДНК в многокопийных повторах	примерно 50 %

* Последовательность 2,85 миллиардов нуклеотидов известна точно (коэффициент ошибок всего лишь около одной на 100 000 нуклеотидов). Остальная ДНК преимущественно состоит из коротких часто повторяющихся последовательностей, которые повторяются тандемно, а число повторов отличается у разных особей.

** Псевдоген — нуклеотидная последовательность ДНК, близко напоминающая таковую функционального гена, но содержащая множественные мутации, которые препятствуют ее нормальной экспрессии. Большинство псевдогенов появляется в результате дублирования функционального гена, сопровождавшегося накоплением губительных мутаций в одной из копий.

*** Консервативные функциональные области; к ним относится ДНК, кодирующая 5'- и 3'-UTRs (нетранслируемые области), структурные и функциональные РНК, а также расположенные на ДНК консервативные участки связывания ее с белками.

мацию из неотъемлемо (по сути своей) низкого отношения сигнал—шум генома человека. Мы опишем некоторые из них в главе 8. Здесь мы обсудим только один общий подход, который основывается на том наблюдении, что последовательности, которые имеют какую-либо функцию, остаются сравнительно консервативными в ходе эволюции, тогда как не обремененные исполнением какой-либо функции, могут позволить себе сколь угодно случайных мутаций. Исходя из этого, стратегия построена на сравнении последовательности человека с последовательностью соответствующих областей родственного генома — например, мыши. Люди и мыши, как думают, разошлись от общего, относящегося к млекопитающим предка приблизительно 80·10⁶ лет назад, после чего прошло достаточно времени, чтобы большинство нуклеотидов в их геномах изменилось в результате событий случайных мутаций. Следовательно, единственными областями, которые останутся во многом подобными в этих двух геномах, будут те мутации, которые вредили бы их функ-

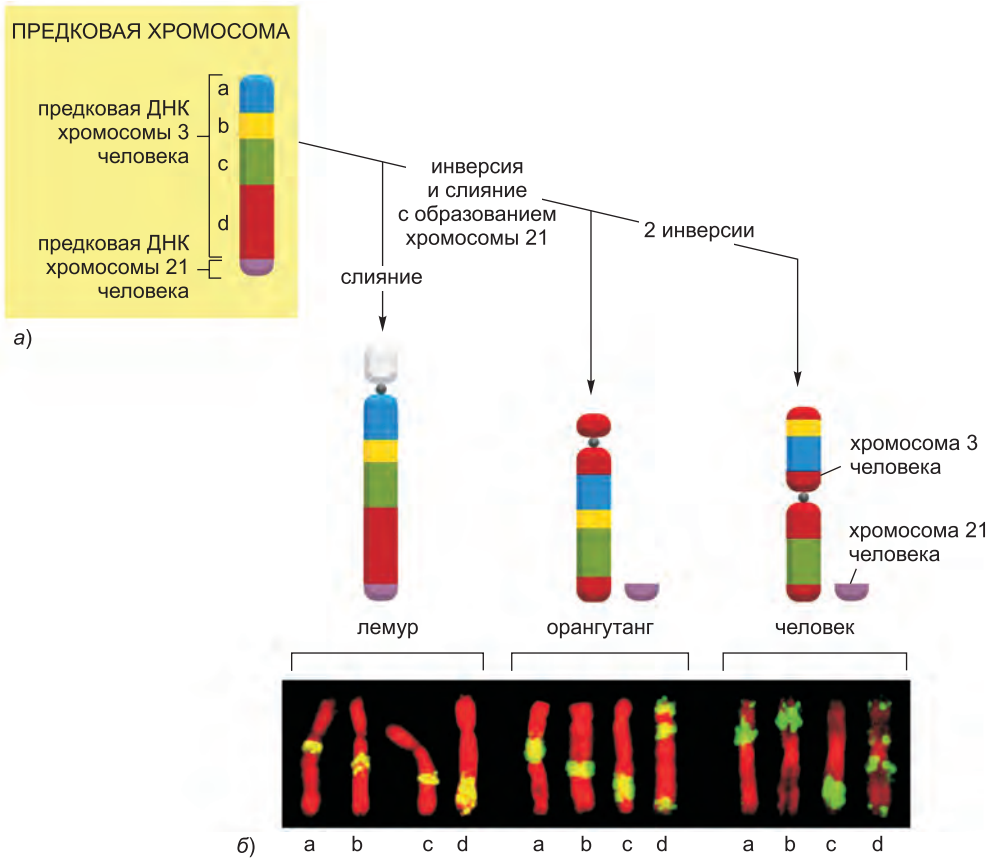


Рис. 4.18. Предполагаемая эволюционная история хромосомы 3 человека и родственной ей хромосом других млекопитающих. а) Порядок сегментов хромосомы 3, гипотетически имевшийся на хромосоме относящегося к млекопитающим предка, представлен на фоне *желтого* прямоугольного поля. Отмечены минимальные изменения в этой предковой хромосоме, необходимые для объяснения появления всех трех современных хромосом. (Современные хромосомы человека и африканских человекообразных обезьян при таком раскладе выглядят идентичными.) *Маленькие кружки*, изображенные на современных хромосомах, представляют положения центромер. Слияние и инверсия, которая ведет к изменению организации хромосомы, как думают, происходят у млекопитающих с частотой раз в $5-10 \cdot 10^6$ лет. б) Некоторые эксперименты по окрашиванию хромосом, на основании которых была построена схема а. Каждое изображение показывает хромосому, наиболее близко связанную родством с хромосомой 3 человека, окрашенную *зеленым* путем гибридизации с различными сегментами ДНК, обозначенными буквами а, б, с и d, стоящими в ряд под изображением вариантов гибридизации хромосомы. Эти буквы соответствуют буквам, обозначающим цветные сегменты в схемах на изображении а. (Заимствовано из S. Müller et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 97: 206–211, 2000. С любезного разрешения Национальной академии наук США.)

ции и ставили бы животных, несущих эти мутации, в невыгодное положение по сравнению с остальными особями и тем самым предопределяли бы их устранение из популяции под давлением естественного отбора. Такие весьма схожие области известны как *консервативные области*. Консервативные области включают как функционально значимые экзоны, так и регуляторные последовательности ДНК.

Напротив, *неконсервативные области* представлены ДНК, последовательность которой вряд ли имеет какое-либо значение для функционирования организма.

Действенность этого метода может быть увеличена за счет сравнения нашего генома с таковыми тех животных, для которых они полностью секвенированы, включая крысу, курицу, шимпанзе и собаку. Демонстрируя подобным образом результаты очень продолжительного «эксперимента» природы, длящегося сотни миллионов лет, такие сравнительные исследования секвенированных ДНК высветили наиболее интересные области в этих геномах. Сравнение показывает, что около 5% генома человека состоит из «многовидовых консервативных последовательностей», о чем подробнее сказано ближе к концу этой главы. Что было совсем неожиданно, так это то, что только приблизительно одна треть этих последовательностей кодирует белки. Некоторые из консервативных некодирующих последовательностей соответствуют группам белок-связывающих участков, каковые вовлечены в регулирование генов, тогда как иные производят молекулы РНК, которые не транслируются в белки. Но функция большинства таких последовательностей остается неизвестной. Это неожиданное открытие позволило ученым заключить, что наши познания о цитобиологии позвоночных намного скуднее, чем мы раньше воображали. Конечно, есть огромные возможности для новых открытий, и впереди нас ждет еще много неожиданностей.

Сравнительные исследования показали не только то, что у человека и других млекопитающих большинство генов одинаковы, но также и то, что большие блоки наших геномов содержат эти гены в одинаковом порядке, каковая особенность получила название *консервативной синтении*. В результате большие блоки наших хромосом могут быть узнаны в геномах представителей других биологических видов. Это позволяет использовать технологию раскрашивания хромосом для вос-



Рис. 4.19. Упрощенное представление клеточного цикла эукариот. Во время интерфазы клетка активно экспрессирует свои гены и поэтому синтезирует белки. Кроме того, в период интерфазы и перед делением клетки ДНК реплицируется и каждая хромосома дублируется, давая начало двум тесно спаренным дочерним хромосомам (здесь в клетке показаны только две хромосомы). По завершении репликации ДНК клетка может войти в *М-фазу*, когда происходит митоз и ядро делится на два дочерних ядра. В течение этой стадии хромосомы уплотняются, ядерная оболочка разрушается и образуется митотическое веретено деления из микротрубочек и прочих белков. Уплотненные митотические хромосомы улавливаются митотическим веретеном, и по одному полному набору хромосом затем подтягиваются к обоим концам клетки, при этом все пары дочерних хромосом разделяются. Ядерная оболочка вновь образуется вокруг каждого набора хромосом, и на заключительном этапе *М-фазы* клетка делится на две дочерние клетки. Большая часть времени клеточного цикла расходуется на интерфазу; *М-фаза* в сравнении с нею краткая и во многих клетках млекопитающих занимает лишь около часа.

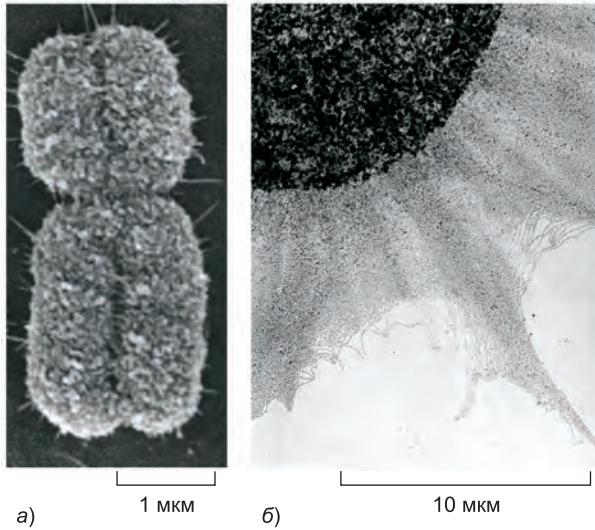


Рис. 4.20. Сравнение развернутого интерфазного хроматина с хроматином в митотической хромосоме. *а)* Микрофотоснимок митотической хромосомы, полученный на растровом электронном микроскопе: уплотненная дублированная хромосома, в которой две новые хромосомы все еще соединены друг с другом (см. [рис. 4.21](#)). Стянутая область отражает положение центромеры, описанной на [рис. 4.21, б\)](#) Электронный микрофотоснимок, показывающий гигантское сплетение хроматина, выходящего из лизированного интерфазного ядра. Обратите внимание на различие в масштабах. (Изображение *а* любезно предоставлено Terry D. Allen; *б* — получено с благосклонного позволения Victoria Foe.)

становления недавней эволюционной истории хромосом человека ([рис. 4.18](#)).

4.2.5. На протяжении жизни клетки хромосомы находятся в различных состояниях

Мы познакомились с тем, как гены расположены в хромосомах, но для образования функционально активной хромосомы молекула ДНК должна быть способна на нечто большее, чем просто нести в себе гены: она должна быть способна реплицироваться, а реплицированные копии должны отделяться друг от друга и надежно разделяться по дочерним клеткам при каждом делении клетки. Этот процесс происходит через упорядоченный ряд стадий, совокупность которых составляет клеточный цикл, который предусматривает временной разрыв между дублированием хромосом и их расхождением на две дочерние нити. Клеточный цикл вкратце и схематично представлен на [рис. 4.19](#), а подробно рассматривается в главе 17. В этой главе мы коснемся лишь некоторых моментов клеточного цикла. Во время *интерфазы* хромосомы реплицируются, и в ходе *митоза* они сильно уплотняются и затем разделяются и распределяются по двум дочерним ядрам. Сильно уплотненные хромосомы в делящейся клетке называют *митотическими хромосомами* ([рис. 4.20, а](#)). Это форма, в которой хромосомы наиболее легко просматриваются; фактически на всех иллюстрациях хромосом, представленных ранее в этой главе, хромосомы изображены на стадии митоза. Во время деления клетки такое уплотненное состояние важно для точного разделения дублированных хромосом митотическим веретеном деления, о чем еще будет сказано подробнее в главе 17.

В течение тех этапов клеточного цикла, когда клетка не делится, хромосомы разворачиваются, и большая часть их хроматина пребывает в ядре в виде сплетения длинных тонких нитей, так что нельзя явно различить отдельные хромосомы ([рис. 4.20, б](#)). Мы будем называть хромосомы в таком развернутом состоянии *интерфазными хромосомами*. Поскольку клетки проводят большую часть своего времени в интерфазе, и именно в этот период их генетическая информация считы-

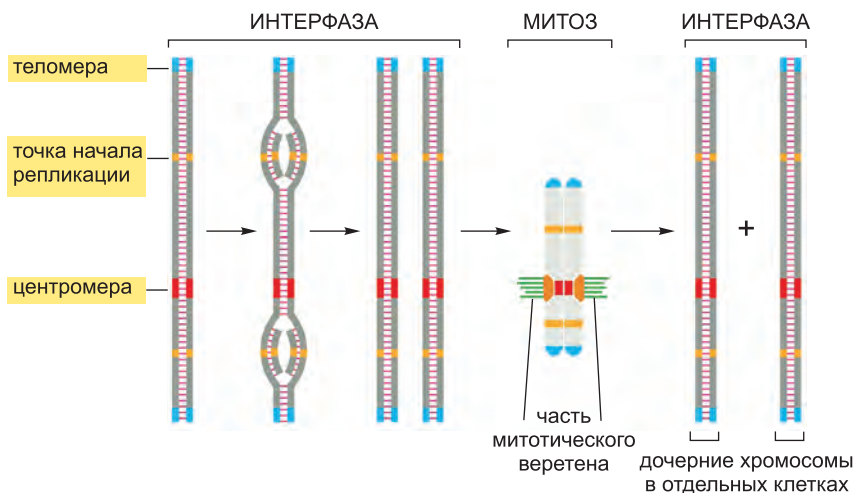


Рис. 4.21. Троица последовательностей ДНК, необходимых для создания в хромосоме эукариот – для ее репликации и, далее, расхождения в митозе. Каждая хромосома имеет множество точек начала репликации, одну центромеру и две теломеры. Здесь показана цепь событий, которые типичная хромосома проходит за один клеточный цикл. ДНК реплицируется в интерфазе, начиная с точек начала репликации и продвигаясь от них в двух направлениях через всю хромосому. В М-фазе центромера прикрепляет дублированные хромосомы к митотическому веретену деления, с тем чтобы каждая из дочерних клеток получила по одной копии всех хромосом во время митоза. Вдобавок к этому центромера помогает удерживать дублированные хромосомы вместе до тех пор, пока они не будут готовы к расхождению. Теломеры формируют специальные колпачки на обоих концах хромосомы.

вается, хромосомы представляют наибольший интерес для цитобиологов именно тогда, когда они наименее различимы.

4.2.6. Каждая молекула ДНК, которая образует линейную хромосому, должна содержать центромеру, две теломеры и точку начала репликации

Хромосома работает как обособленная структурная единица: для того чтобы при делении клетки копия передавалась каждой дочерней клетке, все хромосомы должны реплицироваться, а недавно реплицированные копии – разделяться и правильно распределяться по двум дочерним клеткам. Эти основополагающие функции управляются тремя типами специализированных последовательностей нуклеотидов в ДНК, каждая из которых связывает специфические белки, что направляют машины, которые реплицируют и разводят хромосомы (рис. 4.21).

В ходе экспериментов над дрожжами, хромосомы которых относительно малы и легко поддаются манипуляциям, были идентифицированы минимальные элементы последовательности ДНК, отвечающие за каждую из этих функций. Последовательность нуклеотидов одного типа служит **точкой начала репликации**, или сайтом инициации репликации (replication origin), ДНК – здесь начинается дублирование ДНК. Хромосомы эукариот содержат много точек начала репликационных вилок, что позволяет гарантировать быструю репликацию всей хромосомы в целом; это обсуждается подробно в главе 5.

После репликации две дочерние хромосомы остаются соединенными друг

с другом и, по мере продвижения клеточного цикла, еще более уплотняются и преобразуются в митотические хромосомы. Наличие второй специализированной последовательности ДНК, названной **центромерой**, позволяет в момент деления клетки затянуть в каждую дочернюю клетку по одной копии каждой дублированной и уплотненной хромосомы. При центромере образуется белковый комплекс, называемый *кинетохором*, который прикрепляет дублированные хромосомы к митотическому веретену деления, что позволяет оттянуть их друг от друга (обсуждение — в главе 17).

Третья специализированная последовательность ДНК образует **теломеры**, то есть концы хромосомы. Теломеры содержат повторяющиеся последовательности нуклеотидов, которые обеспечивают эффективную репликацию концов хромосом. Теломеры исполняют также и другую функцию: повторные последовательности теломерной ДНК вместе с областями, примыкающими к ним, формируют структуры, которые защищают конец хромосомы от того, чтобы быть ошибочно признанным клеткой за разорванную молекулу ДНК при оценке клеткой необходимого объема ремонта. Как восстановление такого рода, так и структуру, и функцию теломер мы обсудим в главе 5.

В клетках дрожжей последовательности этих трех типов, необходимые для приумножения хромосом, относительно коротки (обычно не более 1000 пар оснований каждая) и поэтому занимают лишь ничтожную долю информационной емкости хромосомы. Хотя последовательности теломер довольно просты и малы у всех эукариот, последовательности ДНК, которые образуют центромеры и точки начала репликации в более сложных организмах, намного длиннее своих аналогов у дрожжей. Например, эксперименты показывают, что центромеры человека содержат до 100 000 пар нуклеотидов и не обязательно требуют отрезка ДНК с заданной последовательностью. Вместо этого, о чем мы еще расскажем в этой главе, они, по-видимому, состоят из большой регулярно повторяющейся структуры типа белок нуклеиновая кислота, которая передается по наследству при репликации хромосомы.

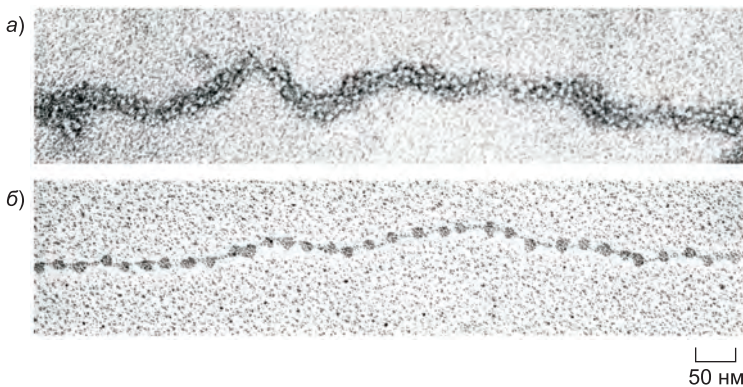
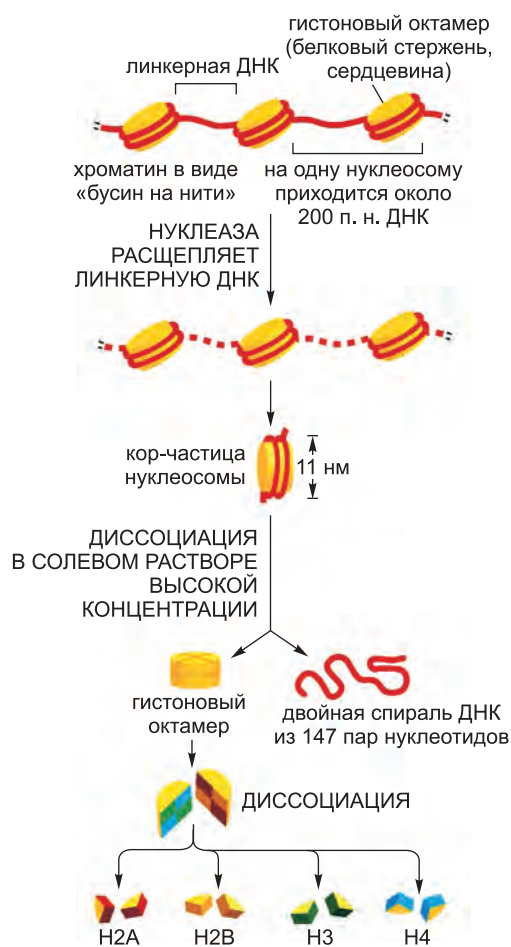


Рис. 4.22. Нуклеосомы как они есть в поле зрения электронного микроскопа. а) Хроматин, выделенный прямо из интерфазного ядра, выглядит как нить толщиной 30 нм. б) На этом электронном микрофото- снимке показан сегмент хроматина, который после выделения был искусственно «распакован», или разуплотнен, чтобы можно было различить нуклеосомы. (Снимок а любезно предоставила Barbara Hamkalo; фотография б была прислана Victoria Foe.)

4.2.7. В хромосомах молекулы ДНК сильно уплотнены

Все относящиеся к эукариотам организмы имеют специальные способы упаковки ДНК в хромосомы. Например, если 48 миллионов пар нуклеотидов ДНК, составляющих хромосому 22, вытянуть в виде одной длинной правильной двойной спирали, то молекула простиралась бы приблизительно на 1,5 см от одного конца до другого. Но во время митоза хромосома 22 составляет в длину лишь около 2 мкм (см. рис. 4.10 и 4.11), что соответствует степени уплотнения по всей длине почти в 10 000 раз. Эта достойная восхищения степень уплотнения достигается работой белков, которые последовательно сматывают и укладывают ДНК на все более и более высоких уровнях организации. Хотя ДНК интерфазных хромосом человека значительно менее уплотнена, чем митотические хромосомы, она все же достаточно плотно упакована: общая степень уплотнения составляет приблизительно 500 раз (длина спирали хромосомной ДНК делится на полную длину этой хромосомы).

При чтении этих пунктов важно иметь в виду, что структура хромосомы сама по себе динамична. Мы узнали, что все хромосомы уплотняются до необычайной степени в М-фазе клеточного цикла. Намного менее наглядным явлением, но представляющим огромный интерес и значение, является то, как определенные области



интерфазных хромосом разуплотняются, когда клетка получает доступ к определенным последовательностям ДНК для экспрессии генов, репарации и репликации ДНК, — и затем вновь уплотняются по завершении этих процессов. Поэтому упаковка хромосом осуществляется таким способом, который допускает возможность быстрого локального доступа к ДНК по требованию клетки. В следующих пунктах мы рассматриваем специализированные белки, благодаря которым и осуществляется упаковка такого типа.

Рис. 4.23. Структурная организация нуклеосомы. Нуклеосома содержит белковый стержень, или ядро (core), состоящий из восьми молекул гистонов. В ходе биохимических экспериментов стержневую кор-частицу нуклеосомы можно высвободить из выделенного хроматина, обработав его нуклеазой — ферментом, расщепляющим ДНК, который удалит всю линкерную ДНК. (Нуклеаза способна деградировать экспонированную линкерную ДНК, но не может воздействовать на ДНК, плотно намотанную на стержень нуклеосомы.) После диссоциации выделенной нуклеосомы на гистоновый стержень и ДНК последовательность этого сегмента ДНК, который был обвит вокруг стержня, можно определить секвенированием. Такого отрезка длиной 147 пар нуклеотидов достаточно, чтобы 1,7 раза обернуться вокруг гистонового стержня.

4.2.8. Основная структурная единица хромосомы эукариот — нуклеосома

Белки, которые связываются с ДНК и образуют хромосомы эукариот, традиционно подразделяют на два общих класса: **гистоны** и *негистоновые хромосомные белки*. Комплекс белков обоих классов с ядерной ДНК клеток эукариот известен как **хроматин**. Гистоны присутствуют в клетке в столь огромных количествах (приблизительно 60 миллионов молекул каждого типа в одной клетке человека), что их полная масса в хроматине практически равна массе ДНК.

Гистоны отвечают за первый и стоящий в самом основании уровень упаковки хромосомы — **нуклеосому**, представляющую собой комплекс белок—ДНК, который был открыт в 1974 г. Когда интерфазные ядра вскрывают очень бережно и их содержимое исследуют под электронным микроскопом, большая часть хроматина находится в форме волокна с диаметром приблизительно 30 нм (**рис. 4.22, а**). Если такой хроматин подвергнуть обработке различными методами, в результате которых он частично разворачивается, то его можно наблюдать под электронным микроскопом в виде ряда «бусин на нити» (**рис. 4.22, б**). Нить представлена ДНК, а каждая бусина, называемая сердцевинной, или кор-частицей, нуклеосомы (nucleosome core particle), состоит из ДНК, намотанной, как на катушку, на белковый стержень, образованный гистонами.

Структурная организация нуклеосом впервые была определена в гидролизате, полученном после обработки развернутого хроматина специфическими ферментами

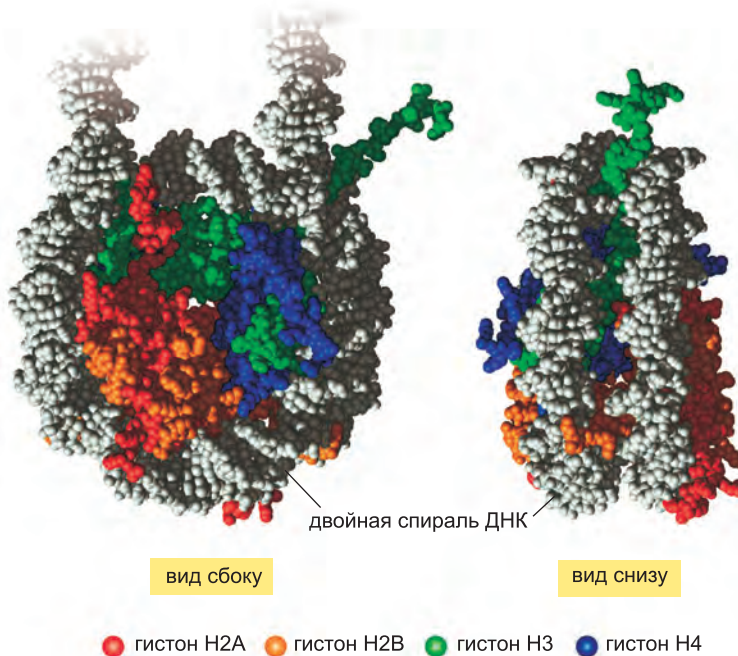


Рис. 4.24. Структура стержневой кор-частицы нуклеосомы, определенная рентгеноструктурным анализом кристаллов. Все гистоны окрашены в соответствии со схемой, представленной на рис. 4.23, а двойная спираль ДНК — в *светло-серый* цвет. (Займствовано из K. Luger et al., *Nature* 389: 251–260, 1997. С любезного позволения Macmillan Publishers Ltd.)

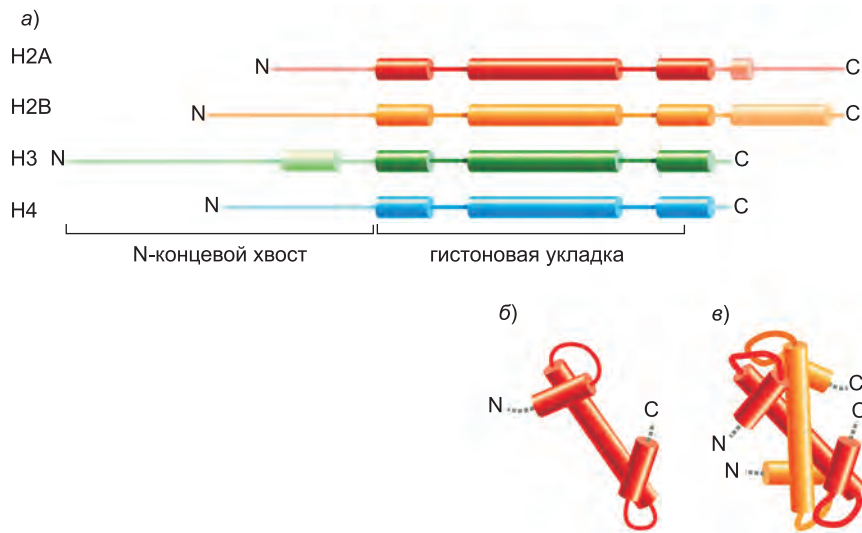


Рис. 4.25. Общая структурная организация гистонового стержня. а) Как показано на рисунке, каждый из основных гистонов содержит N-концевой хвост, который претерпевает ковалентную модификацию нескольких видов, и область гистоновой укладки. б) Структура гистоновой укладки, которую образуют все четыре стержневых гистона. в) Гистоны 2А и 2В образуют димер за счет взаимодействия, известного как «рукопожатие». Гистоны Н3 и Н4 образуют димер за счет взаимодействия того же типа.

(так называемыми нуклеазами), которые разрезают ДНК между нуклеосомами. В ходе обработки такими ферментами в течение короткого периода ничем не защищенная ДНК из промежутков между нуклеосомными стержневыми кор-частицами — *линкерная ДНК* — подвергается деградации. Каждая отдельно взятая нуклеосомная стержневая кор-частица (которую называют также «минимальной нуклеосомой» — *Прим. ред.*) состоит из комплекса восьми гистоновых белков: по две молекулы гистонов Н2А, Н2В, Н3 и Н4 и двухцепочечной ДНК длиной 147 пар нуклеотидов. *Гистоновый октамер* образует белковый стержень (или ядро, сердцевину; от англ. protein core), вокруг которого намотана двуниевая ДНК (**рис. 4.23**).

Каждая нуклеосомная стержневая кор-частица отделена от следующей областью линкерной ДНК, которая может быть различной длины: от нескольких пар нуклеотидов до примерно 80. (Термин *нуклеосома* в техническом плане обозначает нуклеосомную стержневую кор-частицу вместе с одной из примыкающих к ней ДНК-связок, но часто его употребляют как синоним нуклеосомной стержневой кор-частицы.) Поэтому в среднем нуклеосомы повторяются с промежутками в 200 пар нуклеотидов или около того. Например, диплоидная клетка человека с $6,4 \cdot 10^9$ пар нуклеотидов содержит приблизительно 30 миллионов нуклеосом. Формирование нуклеосом преобразует молекулу ДНК в хроматиновую нить, протяженность которой составляет приблизительно одну треть от ее первоначальной длины.

4.2.9. Структура нуклеосомной стержневой кор-частицы показывает характер упаковки ДНК

Структура нуклеосомной стержневой частицы получена с высоким разрешением в 1997 г.: это имеющий форму диска гистоновый стержень, вокруг которого

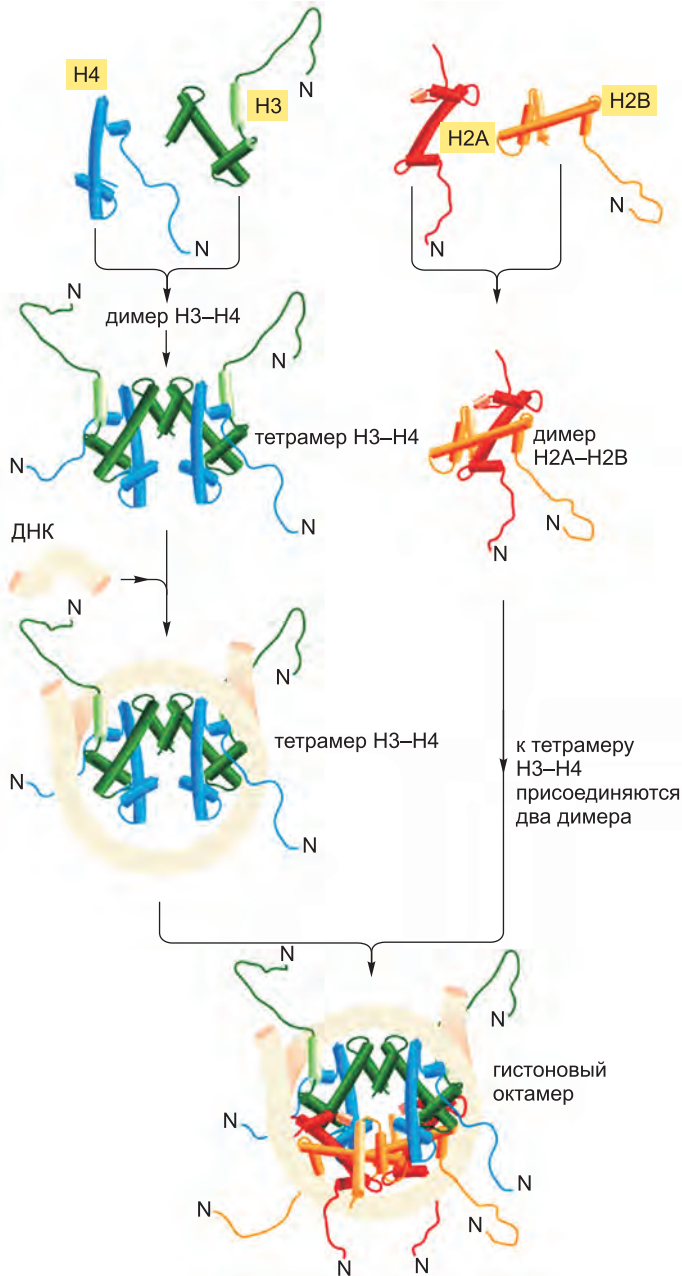
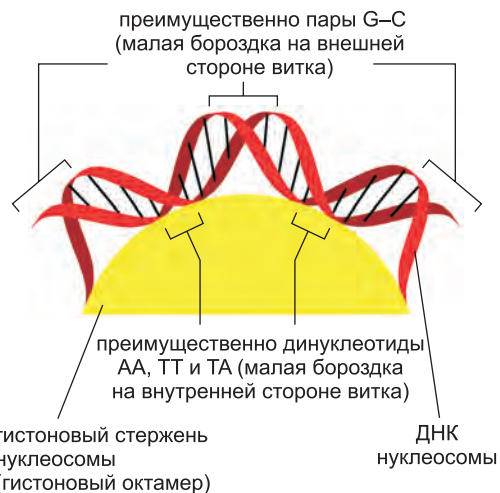


Рис. 4.26. Сборка гистонного октамера на ДНК. Гистоновый димер H3–H4 и димер H2A–H2B образуются за счет взаимодействия типа «рукопожатия». Тетрамер H3–H4 образуется и связывается с ДНК. После этого два димера H2A–H2B присоединяются и завершают построение нуклеосомы. Гистоны окрашены, как и на рис. 4.24 и 4.25. Обратите внимание, что все восемь N-концевых хвостов гистонов как бы висят на имеющей форму диска стержневой структуре. Их конформации очень гибкие. Внутри клетки реакции сборки нуклеосомы, показанные здесь, опосредствуются белками, называемыми *гистоновыми шаперонами* (histone shaperon proteins), или *наставниками гистонов*, одни из которых специфичны к гистонам H3–H4, а другие — к гистонам H2A–H2B. (Переработано на основе иллюстраций J. Waterborg.)

Рис. 4.27. Изгиб ДНК в нуклеосоме. Спираль ДНК делает 1,7 тугих оборота вокруг гистонового октамера. На этой схеме показано, как малая бороздка сжимается на внутренней части витка. Благодаря некоторым структурным особенностям молекулы ДНК, обозначенные динуклеотиды предпочитают располагаться в таких суженных местах малой бороздки, что позволяет объяснить, почему определенные последовательности ДНК прочнее других прикрепляются к стержню нуклеосомы.



плотно намотаны 1,7 оборота ДНК (рис. 4.24). Гистоны всех четырех типов, из которых образована сердцевина нуклеосомы, — относительно небольшие белки (102–135 аминокислот), которые имеют общий структурный мотив, известный как *гистоновая укладка* (histone fold): образована тремя α -спиралями, соединенными двумя петлями (рис. 4.25). При сборке нуклеосомы «гистоновые укладки» сначала связываются друг с другом с образованием димеров H3–H4 и H2A–H2B, а димеры H3–H4 объединяются в тетрамеры. После этого тетрамер H3–H4 далее

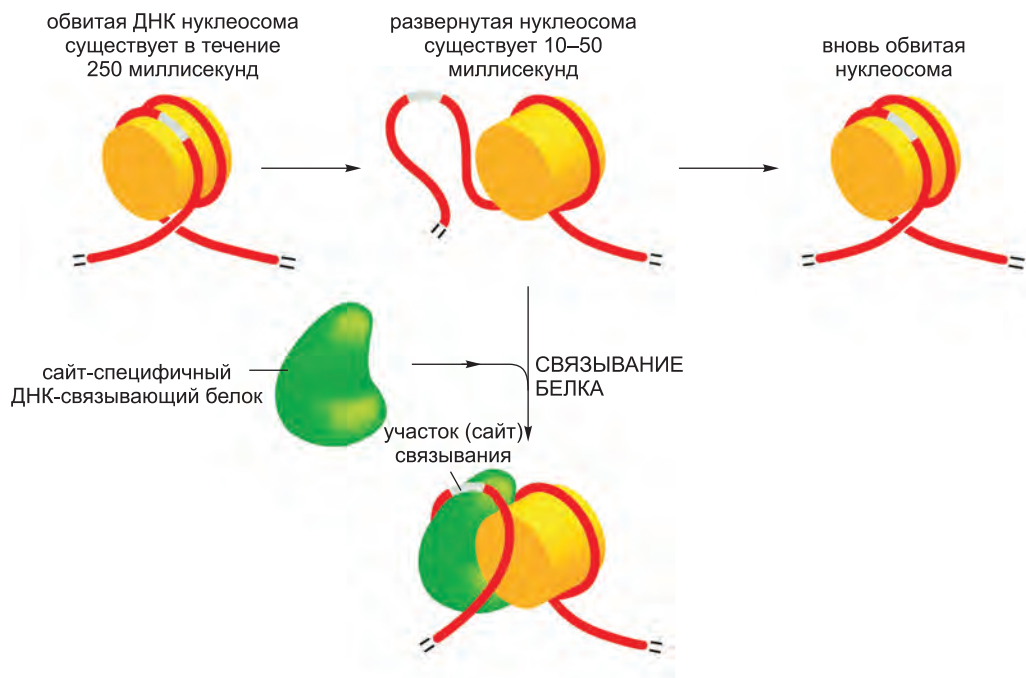


Рис. 4.28. Динамические нуклеосомы. Измерения кинетики показывают, что ДНК в отдельно взятой нуклеосоме удивительно динамична: она быстро разматывается и затем вновь оборачивается вокруг нуклеосомного стержня. Как видно, благодаря этому большая часть связанной с ней последовательности ДНК доступна для других связывающихся с ДНК белков. (Данные взяты из G. Li and J. Widom, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 763–769, 2004. С благосклонного дозволения Macmillan Publishers Ltd.)

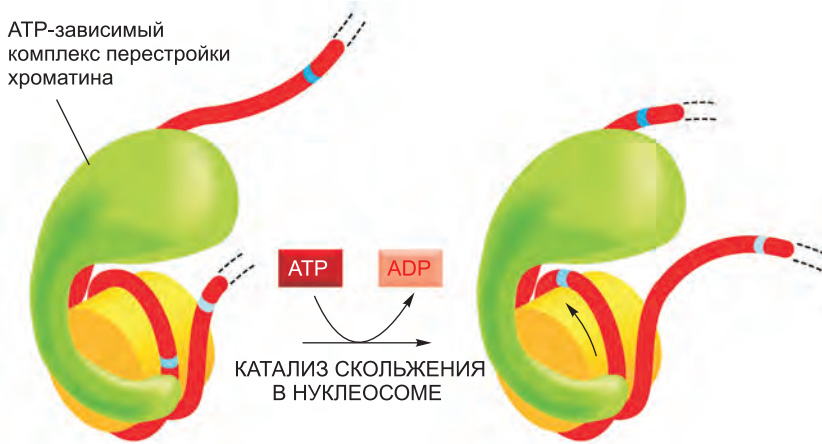


Рис. 4.29. Скольжение в нуклеосоме, катализируемое АТР-зависимыми комплексами перестройки хроматина. Используя энергию гидролиза АТР, комплекс перестройки, как думают, продвигает ДНК связанной им нуклеосомы и ослабляет ее прикрепление к стержню нуклеосомы. Таким образом, каждый цикл, состоящий из связывания АТР, гидролиза АТР и высвобождения продуктов — АDP и P_i — перемещает ДНК по гистоновому октамеру в направлении стрелки, показанной на этом рисунке. Для осуществления представленного на рисунке скольжения в нуклеосоме требуется много таких циклов. (См. также [рис. 4.46, б.](#))

объединяется с двумя димерами Н2А—Н2В с образованием компактного октамерного стержня, на который при желании наматывается ДНК ([рис. 4.26](#)).

ДНК и гистоны надежно соединены: в каждой нуклеосоме между ДНК и гистоновым стержнем образуется 142 водородные связи. Почти половина этих связей возникает между основной цепью аминокислот гистонов и фосфодиэфирными группами сахарофосфатного остова ДНК. Многочисленные гидрофобные взаимодействия и солевые мостики также скрепляют ДНК с белком в нуклеосоме. Например, более одной пятой от общего числа аминокислот в каждом из гистоновых стержней представлено лизином или аргинином (обе аминокислоты с основными боковыми цепями), и их положительные заряды могут эффективно нейтрализовать отрицательно заряженный остов ДНК. Эти многочисленные взаимодействия отчасти объясняют, почему ДНК практически любой последовательности может быть связана с октамерным гистоновым стержнем. Путь ДНК вокруг гистонового стержня не гладок, скорее наоборот: исходя из неровной поверхности стержня, можно было ожидать несколько изломов в молекуле ДНК. Подобного рода изгибы предполагают существенное сжатие малой бороздки спирали ДНК. Некоторые динуклеотиды в малой бороздке особенно легко поддаются сжатию, поэтому некоторые последовательности нуклеотидов связываются с нуклеосомой более плотно, чем другие ([рис. 4.27](#)). Это, вероятно, объясняет некоторые поразительные и притом весьма неординарные примеры очень точного расположения нуклеосом на протяжении всей цепи ДНК. Однако для большинства последовательностей ДНК, имеющих в хромосомах, предпочтение тех или иных последовательностей нуклеосомами должно быть незначительным, чтобы обеспечить преимущество других факторов, которые позволяют нуклеосоме занять любую из множества позиций в последовательности

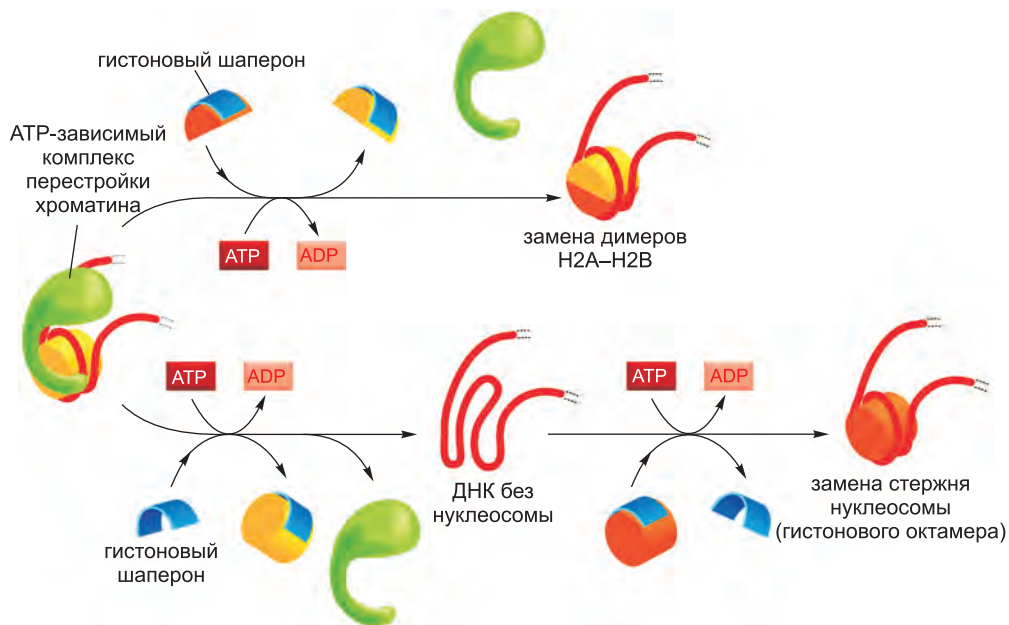


Рис. 4.30. Удаление нуклеосомы и замена гистонов, катализируемые АТР-зависимыми комплексами перестройки хроматина. За счет кооперативного взаимодействия с определенными гистоновыми шаперонами некоторые комплексы перестройки хроматина могут удалять димеры H2A–H2B из нуклеосомы (верхний ряд реакций) и заменять их димерами, которые содержат иной гистон, такими, например, как димер H2AZ–H2B (см. рис. 4.41). Другие комплексы перестройки привлекаются к определенным участкам на хроматине, с тем чтобы полностью удалить гистоновый октамер и/или заменить его иным стержнем нуклеосомы (нижний ряд реакций).

ДНК большинства хромосомных областей.

Кроме гистоновой укладки, каждый из стержневых гистонов имеет аминокислотный N-концевой «хвост», который выступает из гистонического стержня (см. рис. 4.26). Такие гистоновые хвосты подвергаются ковалентным модификациям нескольких различных типов, которые, в свою очередь, управляют ключевыми особенностями структуры и функции хроматина, что мы обсудим вкратце.

Как отражение их фундаментальной роли в предопределении функции ДНК посредством управления структурой хроматина гистоны входят в когорту наиболее высококонсервативных белков эукариот. Например, последовательности аминокислот гистона H4 гороха и коровы отличаются только по 2 из 102 позиций. Такая высокая консервативность в ходе эволюции навлекает на мысль о том, что функции гистонов определяются почти всеми их аминокислотами, так что изменение даже в какой-либо одной позиции было бы губительно для клетки. Это предположение проверили непосредственно на клетках дрожжей, у которых можно мутировать данный ген гистона *in vitro* и ввести его обратно в геном дрожжей вместо нормального гена. Как и ожидали, в большинстве своем изменения в последовательностях гистонов летальны для клетки; немногие, которые не приводят к летальному исходу, вызывают изменения в профиле нормальной экспрессии генов, а также другие отклонения от нормы.

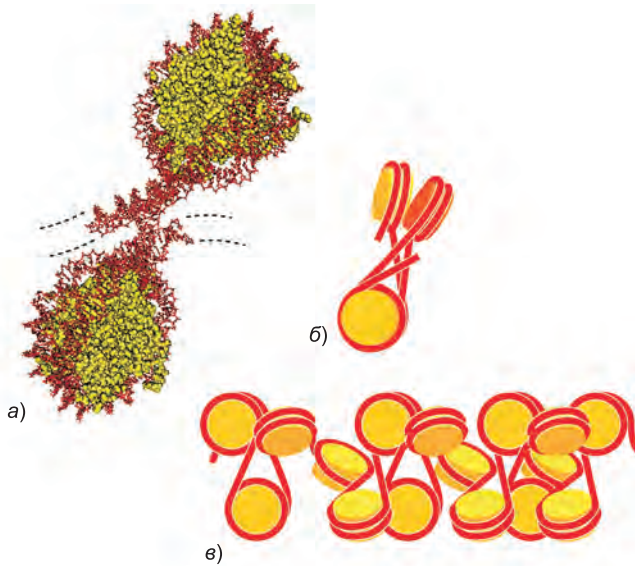


Рис. 4.31. Зигзагообразная модель 30-нм хроматиновой фибриллы. *а)* Конформация двух из четырех нуклеосом, входящих в тетрануклеосому, восстановлена по структуре, определенной рентгеноструктурным анализом. *б)* Схематическое изображение полной тетрануклеосомы; четвертая нуклеосома не видна, будучи совмещена с нижней нуклеосомой и расположена позади нее на этой схеме. *в)* Схематическое представление возможной зигзагообразной структуры, которая могла бы объяснить строение 30-нм хроматиновой фибриллы. (Переработано из С. L. Woodcock, *Nut. Struct. Mol. Biol.* 12: 639–640, 2005. С великодушного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

Несмотря на высокую консервативность стержневых гистонов, эукариотические организмы содержат, хотя и в меньших количествах, также стержневые гистоны специализированного варианта, которые отличаются по последовательности аминокислот от обычных. Как мы увидим, эти варианты, вкупе с удивительно большим разнообразием ковалентных модификаций, которыми могут быть дополнены гистоны в нуклеосомах, делают возможным все множество различных структур хроматина, которое требуется для функционирования ДНК в клетках высших эукариот.

4.2.10. Нуклеосомы обладают динамичной структурой и часто подвергаются изменениям, катализируемым АТФ-зависимыми комплексами перестройки хроматина

Многие годы биологи полагали, что, однажды сформировавшись в определенной позиции на ДНК, нуклеосома остается закрепленной за этим местом из-за очень прочного соединения между ее стержневыми гистонами и ДНК. Будь это так, это создало бы проблемы генетическим механизмам считывания, которые, в принципе, требуют быстрого доступа ко многим специфическим последовательностям ДНК, а также машинам транскрипции и репликации ДНК, которым нужно быстро продвигаться по хроматину. Но кинетические исследования показывают, что ДНК в отдельно взятой нуклеосоме разматывается с каждого конца со скоростью приблизительно 4 раза в секунду и остается голой на 10–50 миллисекунд, после

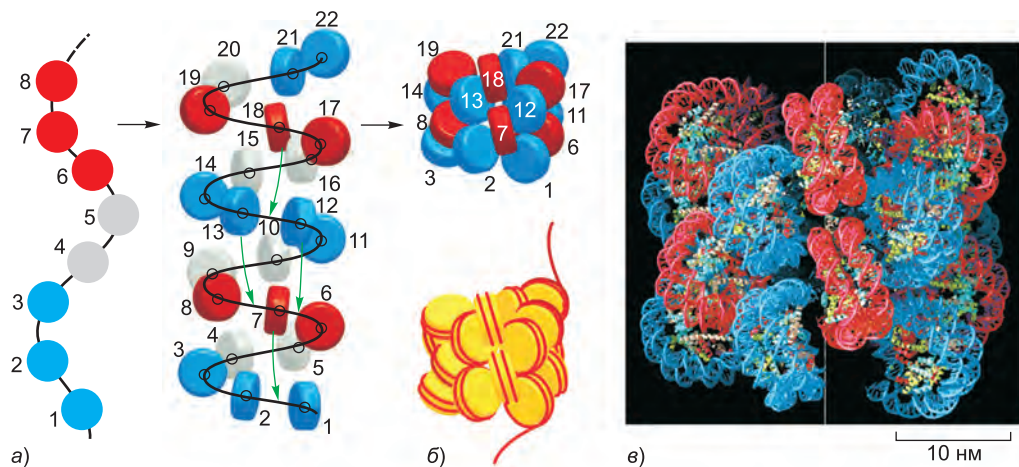


Рис. 4.32. Модель 30-нм хроматиновой фибриллы типа гребенчатого соленоида. *а)* Изображения, на которых использовано схематическое изображение нити с закодированными цветом нуклеосомами, чтобы показать, как образуется такой соленоид. *б)* Схематическое изображение конечной структуры на виде *а*. *в)* Структурная модель. Эта модель построена на основе полученной с помощью высокоразрешающей криоэлектронной микроскопии структуры нуклеосом, реконструированных из очищенных гистонов и молекул ДНК определенной длины и последовательности. Как нуклеосомные октамеры, так и линкерный гистон (обсудим ниже) были использованы для получения регулярно повторяющихся структур, содержащих до 72 нуклеосом. (Переработано из P. Robinson, L. Fairall, V. Huynh and D. Rhodes, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 103: 6506–6511, 2006. С любезного разрешения National Academy of Sciences.)

чего частично развернутая структура вновь «закрывается» в нуклеосоме. Таким образом, большая часть ДНК в выделенной нуклеосоме, в принципе, доступна для связывания с другими белками (**рис. 4.28**).

Для находящегося в клетке хроматина явно необходимо дальнейшее ослабление ДНК-гистоновых контактов, потому что клетки эукариот содержат большое разнообразие АТР-зависимых комплексов перестройки хроматина. В этих комплексах субъединица, которая гидролизует АТР, эволюционно родственна ДНК-хеликазам (обсуждаемым в главе 5) и связывается как с белковым стержнем нуклеосомы, так и с двунитевой ДНК, намотанной на него. Используя энергию гидролиза АТР для перемещения ДНК по стержню, эта субъединица временно изменяет структуру нуклеосомы, ослабляя прикрепление ДНК к гистоновому стержню. Посредством повторяющихся циклов гидролиза АТР такие комплексы перестройки могут катализировать *скольжение в нуклеосоме* и, продвигая таким способом стержень нуклеосомы по двойной спирали ДНК, делают нуклеосомную ДНК доступной для других белков клетки (**рис. 4.29**). Кроме того, за счет кооперативного взаимодействия с отрицательно заряженными белками, которые выступают в роли гистоновых шаперонов, некоторые комплексы перестройки способны удалять из нуклеосомы либо весь стержень, либо часть его — катализируя либо замену гистонов H2A–H2B, либо полное удаление октамерного стержня из катушки ДНК (**рис. 4.30**).

Клетки содержат десятки различных АТР-зависимых комплексов перестройки хроматина, которые специализируются на выполнении различных задач. По большей части это крупные белковые комплексы, которые могут содержать 10 и

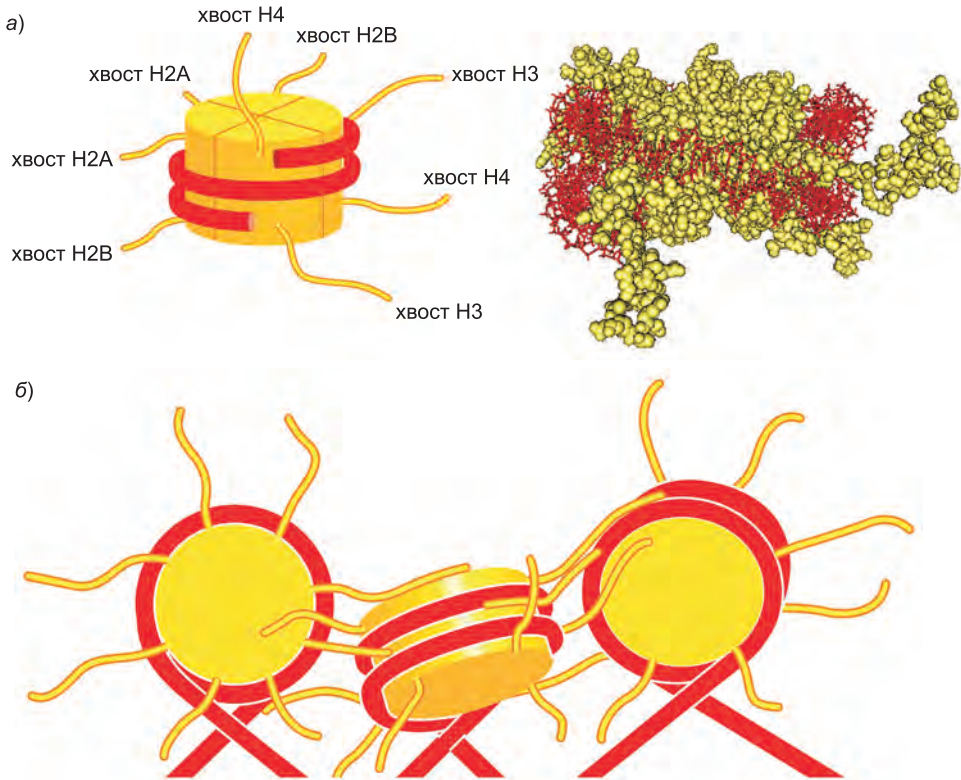


Рис. 4.33. Гипотетическая модель роли гистонных хвостов в образовании 30-нм фибрилл. а) На этой иллюстрации схематически показаны приблизительные точки выхода восьми гистонных хвостов (по одному от каждого гистонного белка), которые отходят от каждой нуклеосомы. Фактическая структура представлена в правой части рисунка. В полученной с высоким разрешением структуре нуклеосомы хвосты в значительной мере бесструктурны, что предполагает их чрезвычайную гибкость. б) Гипотетическая модель, показывающая, как гистонные хвосты могут помочь упаковывать нуклеосомы в 30-нм фибриллы. Эта модель опирается 1) на экспериментальные данные, что гистонные хвосты способствуют формированию 30-нм фибрилл, и 2) на определенную с помощью рентгеновской кристаллографии структуру нуклеосомы, в которой хвосты одной нуклеосомы находятся в контакте с гистоновым стержнем соседней нуклеосомы в образованной ими кристаллической решетке.

более субъединиц. Деятельность таких комплексов подлежит тщательному управлению со стороны клетки. Когда гены включаются и выключаются, комплексы перестройки хроматина доставляются к определенным областям ДНК, в которых они оказывают локальное действие на структуру хроматина (обсуждаем в главе 7; см. также [рис. 4.46](#) далее).

Как упоминалось ранее, для большинства последовательностей ДНК, находящихся в хромосомах, экспериментально показано, что нуклеосома может занять любую из множества позиций относительно последовательности ДНК. Самое важное влияние на расположение нуклеосомы, кажется, оказывает присутствие на молекуле ДНК других сильно связанных с ней белков. Некоторые связанные белки предпочитают формирование нуклеосомы «бок о бок» с ними. Другие создают препятствия, которые вынуждают нуклеосому передвигаться в позицию «между

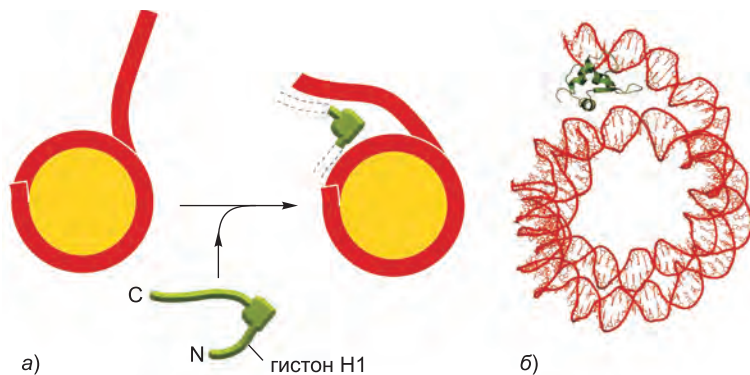


Рис. 4.34. Как связующий гистон связывается с нуклеосомой. Показаны положение и структура глобулярной области гистона Н1. Как видно, эта область удерживает дополнительные 20 пар нуклеотидов ДНК, где последняя отходит от стержня нуклеосомы. Связывание такого типа гистонем Н1, как думают, является важным для формирования 30-нм хроматинового волокна. Длинный С-концевой хвост гистона Н1 нужен ему также и для высокоаффинного связывания с хроматином, но ни его положение, ни позиция N-концевого хвоста не известны. Изображение *а* схематично, *б* — модель структуры. (Изображение *б* заимствовано из D. Brown, T. Izard and T. Misteli, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13: 250–255, 2006. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

ними». Поэтому точные позиции нуклеосом на отрезке ДНК зависят главным образом от присутствия и природы других белков, связанных с ДНК. Благодаря присутствию АТР-зависимых комплексов перестройки взаимное расположение нуклеосом на ДНК может быть очень динамичным и быстро изменяться согласно потребностям клетки.

4.2.11. Нуклеосомы обычно упакованы в компактную хроматиновую фибриллу

Хотя на хромосомной ДНК и образуются чрезвычайно длинные нити нуклеосом, хроматин в живой клетке, по всей вероятности, лишь изредка принимает развернутую форму «бусин на нити». Вместо этого, нуклеосомы укладываются друг на друга и образуют правильный строй, в котором ДНК уплотнена еще сильнее. Таким образом, когда ядра очень мягко лизируют на сетке электронного микроскопа, основная доля хроматина наблюдается в виде нити (фибриллы) с диаметром около 30 нм, что значительно толще, чем хроматин в форме «бусин на нити» (см. [рис. 4.22](#)).

Как же нуклеосомы упакованы в 30-нм хроматиновой фибрилле? Этому вопросу еще не найден окончательный ответ, однако получена важная информация о структуре фибриллы. В частности, высокоразрешающие структурные исследования были проведены на гомогенных коротких нитях нуклеосом, приготовленных из очищенных гистонов и очищенных молекул ДНК. Структура тетра-нуклеосомы, определенная с помощью рентгеноструктурного анализа, была положена в основу зигзагообразной модели укладки нуклеосом в 30-нм хроматиновой фибрилле ([рис. 4.31](#)). Но криоэлектронная микроскопия более длинных нитей нуклеосом говорит в пользу совершенно иной, соленоидальной, структуры с частично вклинивающимися друг в друга нуклеосомами ([рис. 4.32](#)).

Что заставляет нуклеосомы столь плотно укладываться друг с другом в 30-нм хроматиновой фибрилле? Одним важным фактором выступают связи между нуклеосомами, образованные гистоновыми хвостами, в особенности хвостами гистона H4 (рис. 4.33). Другой важный фактор — дополнительный гистон, который часто пребывает в отношении 1:1 со стержнями нуклеосом, известный как **гистон H1**. Этот так называемый связующий гистон крупнее, чем каждый из стержневых гистонов, и его намного сильнее «потрепало» в ходе эволюции. С каждой нуклеосомой связывается одна молекула гистона H1, который контактирует и с ДНК и, с белком, видоизменяя тем самым траекторию выхода ДНК из нуклеосомы. Хотя еще не выяснено во всех подробностях, как H1 уплотняет нуклеосомы в 30-нм фибриллы, изменение траектории выхода ДНК выглядит определяюще важным фактором для того, чтобы нуклеосомная ДНК входила в зацепление и замкнулась с образовыванием 30-нм фибриллы (рис. 4.34). В организмах большинства эукариот синтезируется несколько форм белка гистона H1 с родственными, но весьма различными последовательностями аминокислот.

Возможно, что 30-нм структура, обнаруженная в хромосомах, представляет собой постоянно меняющуюся мозаику из нескольких разновидностей H1. Например, линкерный гистон семейства H1 присутствовал в структуре исследуемых нуклеосом, представленных на рис. 4.32, но отсутствовал в тетра-нуклеосоме, представленной на рис. 4.31. Более того, ранее у нас была возможность убедиться в том, что линкерная ДНК, которая соединяет смежные нуклеосомы, может варьировать по длине; такие различия в длине связей, вероятно, приносят местные возмущения в структуру. А присутствие многих других связывающихся с ДНК белков, равно как и белков, которые связываются непосредственно с гистонами, несомненно, приносит важные дополнительные особенности в любое сомножество нуклеосом.

Заключение

Ген — некоторая последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК, которая служит функциональным элементом для производства белка, структурной РНК или же каталитической либо регуляторной молекулы РНК. Кодирющие белок гены эукариот обычно состоят из чередующихся интронов и экзонов, связанной с регуляторными областями ДНК. Хромосома образуется из единственной и чрезвычайно длинной молекулы ДНК, которая содержит линейную группу множества генов. Геном человека содержит $3,2 \cdot 10^9$ пар нуклеотидов ДНК, разделенных на 22 различные аутосомы и 2 половые хромосомы. Только малая доля этой ДНК кодирует белки или молекулы функциональной РНК. Молекула хромосомной ДНК содержит также и три другие важные в функциональном отношении последовательности нуклеотидов: точки начала репликации (сайты инициации) и теломеры позволяют молекуле ДНК эффективно реплицироваться, тогда как в центромерах дочерние молекулы ДНК прикрепляются к митотическому веретену деления, что обеспечивает их точное расхождение по дочерним клеткам во время М-фазы клеточного цикла.

ДНК эукариот тесно связана с равной по весу массой гистонов, которые формируют повторяющиеся массивы ДНК-белковых частиц, названных нуклеосомами. Нуклеосома состоит из октамерного гистонового стержня гистоновых белков, который обвит двойной спиралью ДНК. Нуклеосомы разделены промежутками около 200 пар нуклеотидов и обычно совместно упакованы (с помощью молекул гистона H1) в квазирегулярное множество, образующее

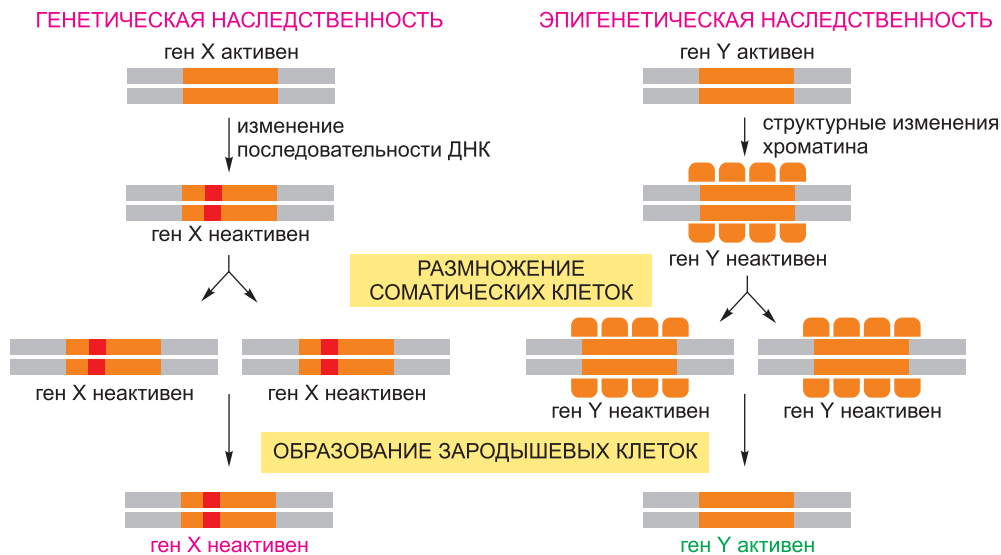


Рис. 4.35. Сравнение генетического наследования с эпигенетическим наследованием, проводимое по структурам хроматина. Генетическое наследование основано на прямом наследовании нуклеотидных последовательностей ДНК в ходе репликации ДНК. Изменения в последовательности ДНК не только точно передаются от соматической клетки всем ее потомкам, но также — через зародышевые клетки — от одного поколения другому. Область генетики, рассматриваемая в главе 8, основывается на наследовании таких изменений между поколениями. Представленная здесь схема наследования эпигенетического типа основана на других молекулах, связанных с ДНК, и поэтому такое наследование менее устойчиво, чем изменение в последовательности ДНК; в частности, эпигенетическая информация обычно (но не всегда) стирается во время образования яйцеклеток и сперматозоидов. В этой главе обсуждается только один эпигенетический механизм, основанный на наследовании структур хроматина. Другие эпигенетические механизмы будут представлены в главе 7, которая посвящена регулированию экспрессии генов (см. [рис. 7.86](#)).

30-нм хроматиновую фибриллу. Несмотря на высокую степень уплотнения хроматина, его структура должна быть очень динамичной — чтобы сохранялась возможность доступа к ДНК. В самой нуклеосоме происходит некоторое самопроизвольное разматывание и повторное наматывание ДНК; однако общая стратегия обратимого изменения локальной структуры хроматина является прерогативой движимых гидролизом АТФ комплексов перестройки хроматина. Клетки содержат богатый набор таких комплексов, которые нацеливаются на определенные области хроматина в надлежащие моменты времени. Комплексы перестройки сотрудничают с гистоновыми шаперонами, что позволяет им передвигать нуклеосомные стержни, воссоздавать их из различных наборов гистонов или даже полностью удалять их из нуклеосом, с тем чтобы высвободить связанную с ними ДНК.

4.3. Управление структурой хроматина

Описав принципы упаковки ДНК в нуклеосомы и образования хроматинового волокна, мы обратим наш взор на механизмы, которые создают различные структуры

хроматина в различных областях генома клетки. Теперь мы знаем, что механизмы такого типа используются для управления многими генами в геномах эукариот. Самое главное, некоторые типы структуры хроматина могут быть унаследованы; то есть структура может быть непосредственно передана от клетки ее потомкам. Поскольку такого рода клеточная память основывается на унаследованной структуре белка, а не на изменении последовательности ДНК, она относится к одной из форм **эпигенетического наследования**. Приставка *epi* в переводе с греческого означает «на» и соответствует сути механизма, потому что эпигенетика представляет собой форму наследования, которая накладывается на генетическое наследование, основанное на ДНК (рис. 4.35).

В главе 7 мы представим множество различных способов регулирования экспрессии генов. Там мы обсуждаем эпигенетическое наследование подробно и представляем несколько различных механизмов, которые его обеспечивают. Здесь же нас интересует только один из таких механизмов, основанный на структуре хроматина. Мы начнем этот параграф с введения в наследуемые структуры хроматина, а затем опишем основу для них — ковалентную модификацию гистонов в нуклеосомах. Мы увидим, что такие модификации служат опознавательными участками для белковых модулей, которые приносят определенные белковые комплексы к соответствующим областям хроматина и таким образом оказывают определенные воздействия на экспрессию генов или запускают другие биологические функции. За счет таких механизмов структура хроматина играет ключевую роль в развитии, росте и поддержании жизнедеятельности организмов эукариот, в том числе и наших с вами беременных тел.

4.3.1. Некоторые ранние домыслы и предположения о структуре хроматина

Тридцать лет назад гистоны считались относительно неинтересными белками. Было известно, что нуклеосомы охватывают всю ДНК хромосом и, как думали, существуют для того, чтобы обеспечить упаковку огромного количества ДНК, имеющегося во многих ядерных клетках, в компактные хромосомы. Основываясь на том, что было известно из опытов над бактериями, многие ученые полагали, что регулирование генов у эукариот происходит в обход нуклеосомы, считая нуклеосомы «безучастными обывателями».

Но были причины бросить вызов данному мнению. Так, например, биохимики установили, что хроматин млекопитающих состоит из приблизительно равной массы гистоновых и негистоновых белков. Это может говорить о том, что *в среднем* каждые 200 пар нуклеотидов ДНК в наших клетках связаны с более чем 1000 аминокислот негистоновых белков (то есть масса белка эквивалента полной массе гистонового октамера плюс гистона H1). Теперь мы знаем, что многие из этих белков связываются с нуклеосомами, и их обилие могло бы предполагать, что гистоны являются чем-то более существенным, нежели только «упаковочным материалом».

Вторая причина оспорить точку зрения, согласно которой гистоны не существенны для регуляции генов, основывалась на удивительно медленных темпах эволюционного изменения в последовательностях четырех стержневых гистонов. Ранее упомянутый факт, что последовательности гистона H4 млекопитающих и гороха различаются только двумя аминокислотами, подразумевает, что замена почти любой из 102 аминокислот в последовательности гистона H4 должна быть

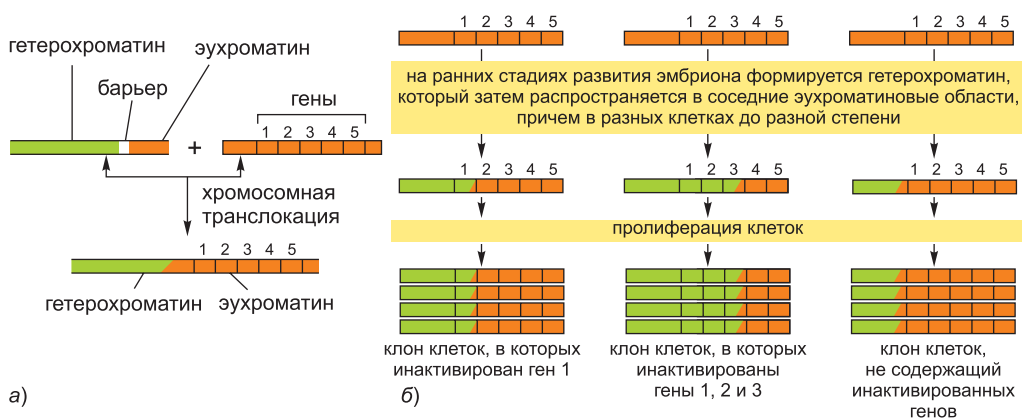


Рис. 4.36. Объяснение эффекта раскраски мозаичного типа у *Drosophila melanogaster*. а) Распространению гетерохроматина (зеленый) в смежные области эухроматина (красный) обычно препятствуют специальные последовательности барьерной ДНК, о которых мы поговорим вскоре. Однако у мух, которые унаследовали некоторые хромосомные перестройки, этот барьер более не присутствует. б) На ранних периодах развития таких мух гетерохроматин может распространиться на соседнюю хромосомную ДНК, продвигаясь в разных клетках на различные расстояния. Такое распространение вскоре останавливается, но установившаяся картина распределения гетерохроматина наследуется, так что производятся большие клоны клеток потомства, в которых одни и те же соседние гены конденсированы в гетерохроматин и таким образом инактивированы (отсюда «мозаичная» внешность некоторых из таких мух; см. рис. 4.37). Хотя термин «распространение» употребляется для описания формирования нового гетерохроматина вблизи с уже имеющимся гетерохроматином, этот термин, быть может, не абсолютно точен. Есть данные, что во время расширения гетерохроматин может «перескочить» через некоторые области хроматина, избавляя гены, которые лежат в их пределах, от репрессивных мер.

губительна для этих организмов. Какого рода процесс мог сделать жизнь организма настолько чувствительной к точной структуре стержня нуклеосомы, что только две аминокислоты заменились за более чем 500 миллионов лет случайной изменчивости, сопровождаемой естественным отбором?

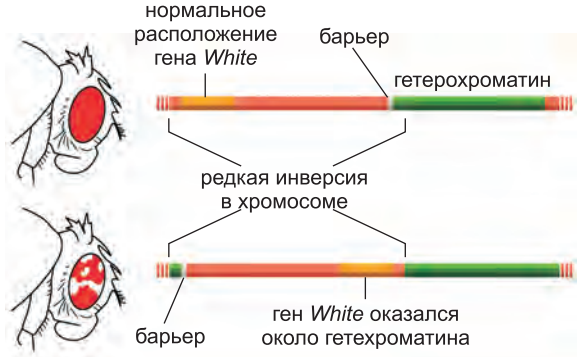
Есть и последнее, но не менее важное обстоятельство: сочетание генетики и цитологии показало, что специфическая форма хроматина заглушает гены, которые она упаковывает, безотносительно к последовательности нуклеотидов, а значит, это способ хранения генетической информации, который непосредственно наследуется обеими дочерними клетками при делении материнской клетки. Именно к этому предмету мы и обратимся далее.

4.3.2. Гетерохроматин высокоорганизован и необычайно устойчив к экспрессии генов

Исследования на световых микроскопах в 1930-е гг. позволили различить два типа хроматина в интерфазных ядрах клеток многих высших эукариот: высокоспирализованную форму, названную **гетерохроматином**, и весь остальной, менее уплотненный хроматин, названный **эухроматином**. Гетерохроматин представляет собой особо компактную форму хроматина (см. рис. 4.9), и мы, наконец, начинаем понимать важные проявления его молекулярных свойств. Хотя он расположен во многих местах по всей длине хромосом, при всем при том он особенно сосредоточен в определенных областях и наиболее заметно — в центромерах и теломерах, о ко-

Рис. 4.37. Открытие позиционных эффектов

на основании экспрессии генов. Ген *White* у плодовой мушки дрозофила регулирует экспрессию пигмента глаза и назван по мутации, которая позволила его впервые опознать. Мухи дикого типа с нормальным геном *White* (*White*⁺) имеют нормальную выработку пигмента, который обуславливает *красный* цвет их глаз, но, если ген *White* мутирован и инактивирован, мутантные мухи (*White*⁻) совершенно не производят этот пигмент и имеют *белые* глаза. У тех мушек, у которых нормальный ген *White*⁺ был перемещен в примыкающую к гетерохроматину



область, глаза крапчатые с *красными* и *белыми* пятнами. *Белые* пятна представляют последовательности клеточных поколений, в которых ген *White*⁺ «умолк» под влиянием гетерохроматина. Напротив, *красные* пятна представляют последовательности клеточных поколений, в которых ген *White*⁺ экспрессируется. На ранних стадиях развития, когда гетерохроматин изначально формируется, он распространяется на соседний эухроматин в различной степени в разных клетках эмбриона (см. [рис. 4.36](#)). Наличие крупных зон *красных* и *белых* клеток показывает, что состояние транскрипционной активности, определяемое упаковкой этого гена в хроматин в предковых клетках, унаследовано всеми дочерними клетками.

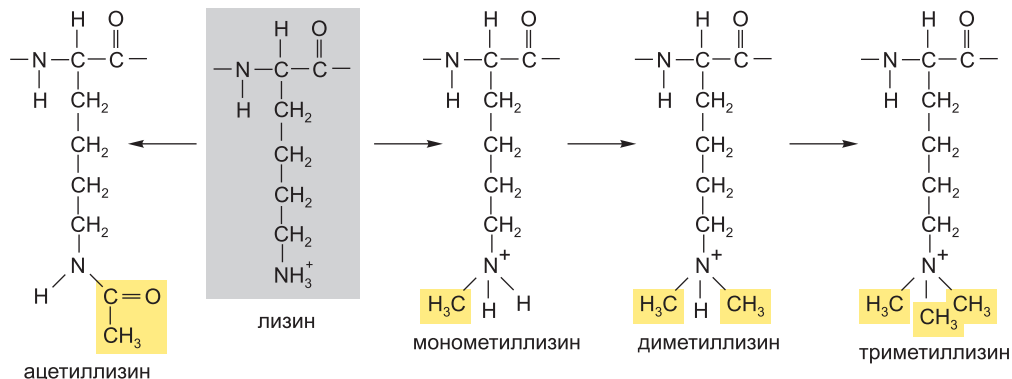
торых уже было сказано ранее (см. [рис. 4.21](#)). В типичной клетке млекопитающих более десяти процентов генома упаковано в такую форму гетерохроматина.

ДНК в гетерохроматине содержит очень немного генов, и те эухроматиновые гены, которые становятся упакованными в гетерохроматин, выключаются упаковкой такого типа. Однако теперь мы знаем, что термин *гетерохроматин* охватывает структуры хроматина нескольких различных типов, общей особенностью которых является особо высокая степень компактизации. Таким образом, о гетерохроматине следует думать не как о заключающем в себе «мертвую» ДНК, а скорее как о создающем различные типы компактного хроматина с разными свойствами, которые делают его очень устойчивым к экспрессии подавляющего большинства генов.

Когда ген, который обычно экспрессируется в эухроматине, экспериментально перемещают в область гетерохроматина, он прекращает экспрессироваться и умолкает, или, как говорят, *заглушается*. Такие отличия в экспрессии генов являются примерами **позиционных эффектов** (position effects), суть которых — в зависимости активности гена от его позиции относительно близлежащей области гетерохроматина на хромосоме. Изначально распознанные у дрозофилы позиционные эффекты к настоящему времени обнаружены у многих эукариот, в том числе у дрожжей, растений и человека.

Позиционные эффекты, связанные с гетерохроматином, показывают особенность, названную *мозаичным эффектом положения* (position effect variegation), который в прошлом стал важнейшим ключом к пониманию функции хроматина. У дрозофилы события разрыва хромосомы, которые непосредственно соединяют область гетерохроматина с областью эухроматина, как правило, инактивируют близлежащие эухроматиновые гены. Зона инактивации распространяется на различное расстояние в разных первых клетках зародыша мухи, но как только гетерохроматиновое состояние устанавливается в гене, оно обычно устойчиво насле-

а) РЕАКЦИИ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ И МЕТИЛИРОВАНИЯ ЛИЗИНА ЯВЛЯЮТСЯ КОНКУРИРУЮЩИМИ



б) ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ СЕРИНА

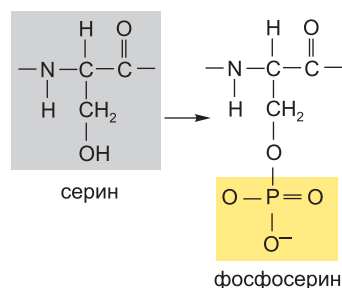


Рис. 4.38. Некоторые характерные типы ковалентных модификаций боковых цепей аминокислот в гистонах нуклеосом. а) Показаны три разных уровня метилирования лизина; каждый может быть опознан своим связывающимся белком и, таким образом, каждый может иметь свое особое значение для клетки. Обратите внимание, что ацетилирование удаляет положительный заряд с лизина и, что наиболее важно, ацетилированный лизин не может быть метилирован, и наоборот. б) Фосфорилирование серина сообщает отрицательный заряд гистону. Модификации, не показанные здесь, — моно- или диметилирование аргинина, фосфорилирование треонина, присоединение ADP-рибозы к глутаминовой кислоте и присоединение убиквитина, СУМО или биотиновой группы к лизину.

дугается всеми потомками этой клетки (рис. 4.36). Это замечательное явление было впервые открыто в ходе досконального генетического анализа причин мозаичной потери красного пигмента в мушином глазу (рис. 4.37); как оказалось, интенсивное распространение гетерохроматина участвует также в инактивации одной из двух X-хромосом у женских особей млекопитающих (см. стр. 473).

С целью поиска продуктов генов, которые усиливают или подавляют распространение гетерохроматина и его устойчивого наследования, — то есть генов, которые, будучи мутированы, или усиливают, или подавляют (супрессируют) эффект мозаичного типа, — был проведен массовый генетический скрининг как на дрозофиле, так и на грибах. С помощью этой методики было идентифицировано более 50-ти генов, которые играют определяющую роль в этих процессах. В последние годы получена подробная информация о свойствах белков, произведенных этими генами; как оказалось, многие из них представлены негистоновыми хромосомными белками, на которых и зиждется основание замечательного механизма регулирования генов эукариот — того, который требует точных последовательностей аминокислот

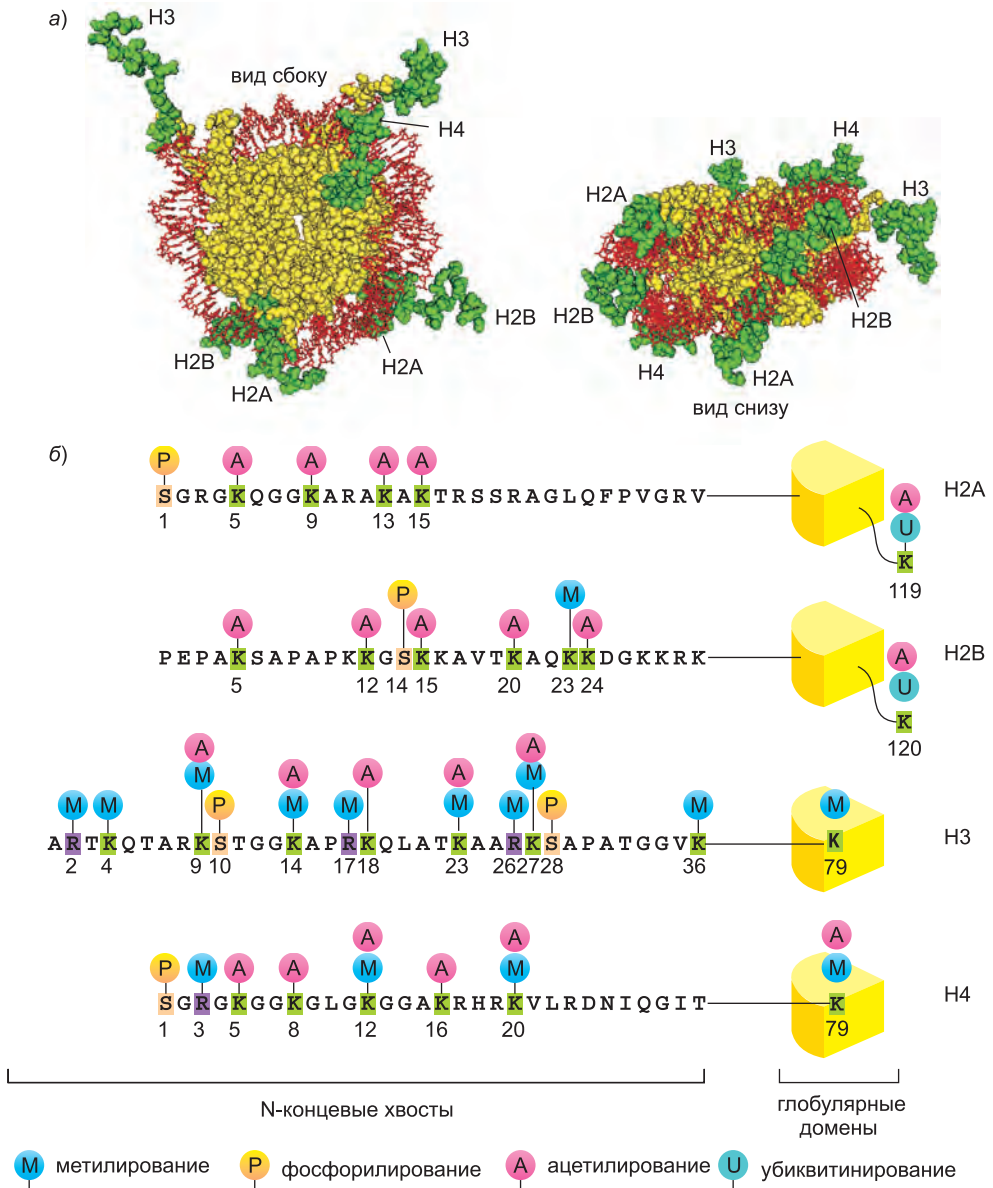


Рис. 4.39. Ковалентная модификация хвостов стержневых гистонов. а) Структура нуклеосомы с обозначенным цветом местоположением первых 30-ти аминокислот в каждом из его восьми (зеленых) N-концевых гистонных хвостов. б) Обозначены хорошо известные модификации четырех гистонных стержневых белков. Хотя здесь для обозначения метилирования используется один символ (М), каждый лизин (К) или аргинин (R) может быть метилирован несколькими различными способами. Обратите внимание также и на то, что некоторые позиции (например, лизин 9 гистона H3) могут быть модифицированы либо метилированием, либо ацетилованием, но не тем и другим вместе. Большинство из показанных модификаций заключается в присоединении относительно маленькой молекулы к гистонным хвостам; исключение — убиквитин — 76-аминокислотный белок, используемый также в других клеточных процессах (см. рис. 6.92). (Переработано из Н. Santos-Rosa and С. Caldas, *Eur. J. Cancer* 41: 2381–2402, 2005. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

стержневых гистонов. Поэтому данный механизм регуляции генов помогает объяснить поразительно медленное изменение гистонов с течением времени.

4.3.3. Гистоны стержня ковалентно модифицируются по множеству различных сайтов

Боковые цепи аминокислот всех четырех гистонов в стержне нуклеосомы подвергаются поразительно разнообразным ковалентным модификациям, включая ацетилирование лизинов, моно-, ди- и триметилирование лизинов, а также фосфорилирование серинов (рис. 4.38). Большое число такого рода модификаций боковых цепей происходит на восьми относительно бесструктурных N-концевых «гистонных хвостах», которые высовываются из нуклеосомы (рис. 4.39). Однако встречаются также определенные модификации боковых цепей на дискообразном стержне нуклеосомы (рис. 4.40).

Модификации всех вышеупомянутых типов обратимы. Модификация определенной боковой цепи аминокислоты в нуклеосоме осуществляется специфическим ферментом, причем в большинстве своем эти ферменты воздействуют только на один или несколько участков. За удаление каждой конкретной модификации боковой цепи отвечает иной фермент. Так, например, ацетильные группы присоединяются к определенным лизинам набором различных гистонацетилтрансфераз (НАТ) и удаляются набором комплексов гистондеацетилаз (HDAC). Аналогичным образом метильные группы присоединяются к боковым цепям лизина набором различных гистонметилтрансфераз и удаляются набором гистондеметилаз. Каждый фермент направляется к определенным участкам на хроматине в определенные моменты времени жизненного цикла каждой клетки. Начальная «вербовка» этих ферментов по большей части зависит от белков, регулирующих гены, — *регуляторных белков* (gene regulatory proteins), которые связываются с определенными последовательностями ДНК по длине хромосом и, в свою очередь, тоже производятся в разные

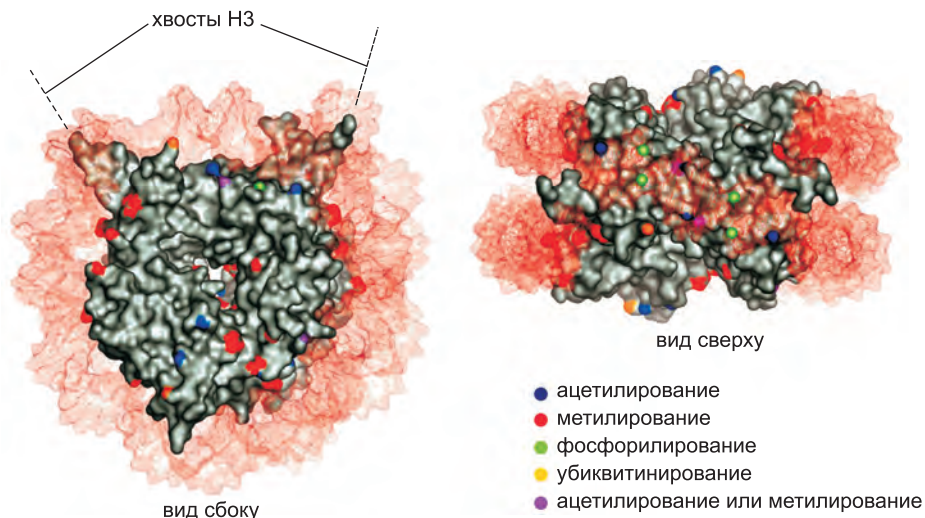


Рис. 4.40. Карта модификаций гистонов на поверхности кор-частицы нуклеосомы. Заметим, что гистонные хвосты были здесь опущены (сравните с рис. 4.39). Функции большинства этих модификаций стержня еще не известны. (Переработано из M. S. Cosgrove, J. D. Boeke and C. Wolberger, *Nut. Struct. Mol. Biol.* 11: 1037–1043, 2004. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

периоды времени жизни организма, как описано в главе 7. Но, по крайней мере в некоторых случаях, ковалентные модификации на нуклеосомах могут сохраняться надолго, даже после того, как регулирующие гены белки, которые в свое время вызвали их, исчезнут, — и, таким образом, они несут в себе память об истории развития клетки. Поэтому различные группы нуклеосом могут сильно отличаться по схемам ковалентных модификаций, что зависит от их точного положения в хромосоме и от статуса клетки.

Модификации гистонов тщательно регулируются и имеют важные последствия. Ацетилирование лизинов по N-концевым «хвостам», как правило, разрыхляет структуру хроматина, отчасти потому, что присоединение ацетильной группы к лизину удаляет его положительный заряд и тем самым снижает сродство «хвостов» к соседним нуклеосомам (см. [рис. 4.33](#)). Однако наиболее глубокое воздействие модификаций гистонов заключается в их способности привлекать к отрезку хроматина, который был соответствующим образом модифицирован, специфические белки. Эти новые белки определяют, как и когда гены будут экспрессированы, а так же предопределяют другие биологические функции. Вот так точная структура хроматинового домена определяет экспрессию генов, в нем упакованных, и тем самым — структуру и функцию эукариотической клетки.

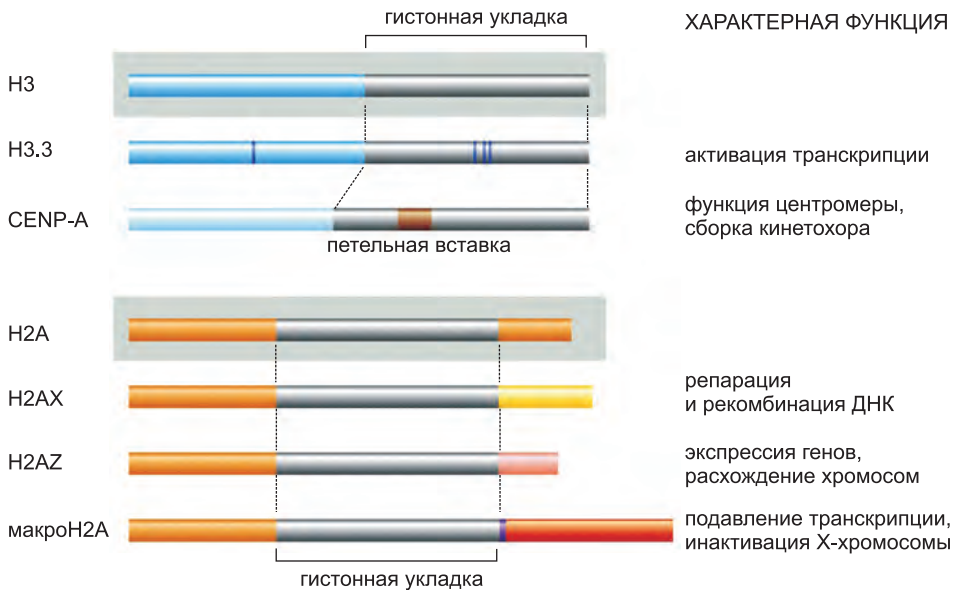


Рис. 4.41. Структура некоторых минорных вариантов гистонов в сравнении с мажорным гистоном, который они заменяют. Эти гистоны встраиваются в нуклеосомы на определенных участках хромосом АТФ-зависимыми ферментами перестройки хроматина, которые действуют совместно с гистоновыми шаперонами (см. [рис. 4.30](#)). Разновидность гистона H3 CENP-A обсуждается позже в этой главе (см. [рис. 4.48–4.51](#)); другие разновидности обсуждаются в главе 7. Последовательности, которые окрашены по-разному в каждом варианте, отличаются от соответствующей последовательности мажорного гистона. (Переработано из K. Sarma and D. Reinberg, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 139–149, 2005. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

4.3.4. Хроматин приобретает дополнительное разнообразие за счет наличия сайт-специфичной замены гистонов на их минорные варианты

Несмотря на устойчивую консервативность аминокислотных последовательностей четырех стержневых гистонов на протяжении сотен миллионов лет, эукариоты содержат по несколько разновидностей гистонов, которые собираются в нуклеосомы. Эти гистоны присутствуют в гораздо меньших количествах, чем основные гистоны, и их консервативность в течение длительных периодов эволюции не столь высока. Для всех стержневых гистонов, за исключением гистона H4, известны минорные варианты; некоторые примеры представлены на [рис. 4.41](#).

Основные гистоны синтезируются главным образом во время S-фазы клеточного цикла (см. [рис. 17.4](#)) и собираются в нуклеосомы на дочерних нитях ДНК сразу за репликационной вилкой (см. [рис. 5.38](#)). Напротив, большинство минорных вариантов гистонов синтезируется на всем протяжении интерфазы. Часто они встраиваются в уже сформированный хроматин, для чего требуется процесс замены гистонов, катализируемый АТФ-зависимыми комплексами перестройки хроматина, о которых было сказано ранее. Такие комплексы перестройки содержат субъединицы, которые индуцируют их связывание как с определенными участками на хроматине, так и с гистоновыми шаперонами, несущими на себе ту или иную разновидность гистона. В результате каждый вариант гистона встраивается в хроматин очень избирательно (см. [рис. 4.30](#)).

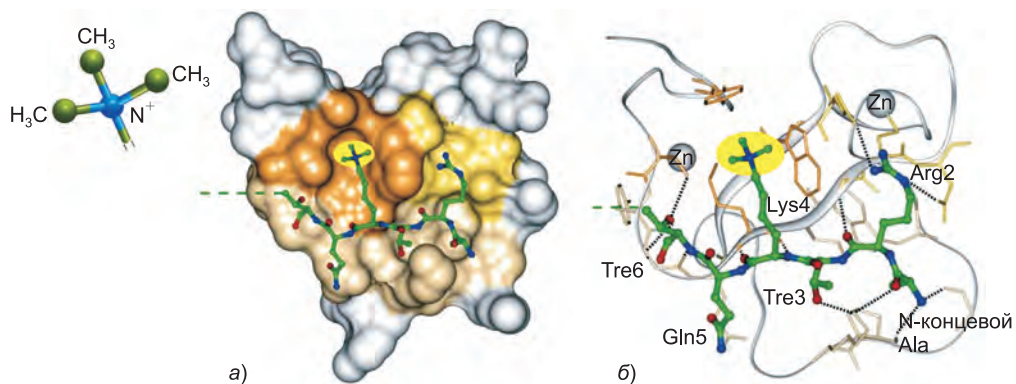


Рис. 4.42. Считывание меток на нуклеосомах. Показана структура белкового модуля, который специфично узнает гистон H3, триметилированный по лизину 4. *а*) Объемная модель домена ING PHD, связанного с гистонным хвостом (зеленый, триметильная группа выделена желтым). *б*) Ленточная модель, показывающая, как распознаются шесть N-концевых аминокислот на хвосте гистона H3. Пунктирные линии изображают водородные связи. Это один из многих доменов PHD, которые узнают метилированные лизины на гистонах; различные домены прочно связываются с лизинами, расположенными в различных позициях, и способны проводить различие между моно-, ди- и триметилированным лизином. Подобным же образом, прочие малые белковые модули узнают определенные боковые цепи гистонов, которые помечены ацетильными, фосфатными и другими группами. (Переработано из P. V. Pena et al., *Nature* 442: 100–103, 2006. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

4.3.5. Вместе взятые, ковалентные модификации и разновидности гистонов образуют так называемый «гистоновый код», который помогает установить биологическую функцию

Число возможных различных меток на отдельной нуклеосоме огромно. Даже при учете того, что одни ковалентные модификации взаимно исключающие (например, невозможно одновременно и ацетилировать и метилировать лизин), а другие модификации совмещены, будучи выстроены в единую цепь в виде набора событий, ясно, что возможны тысячи их сочетаний. Это разнообразие пополняется за счет

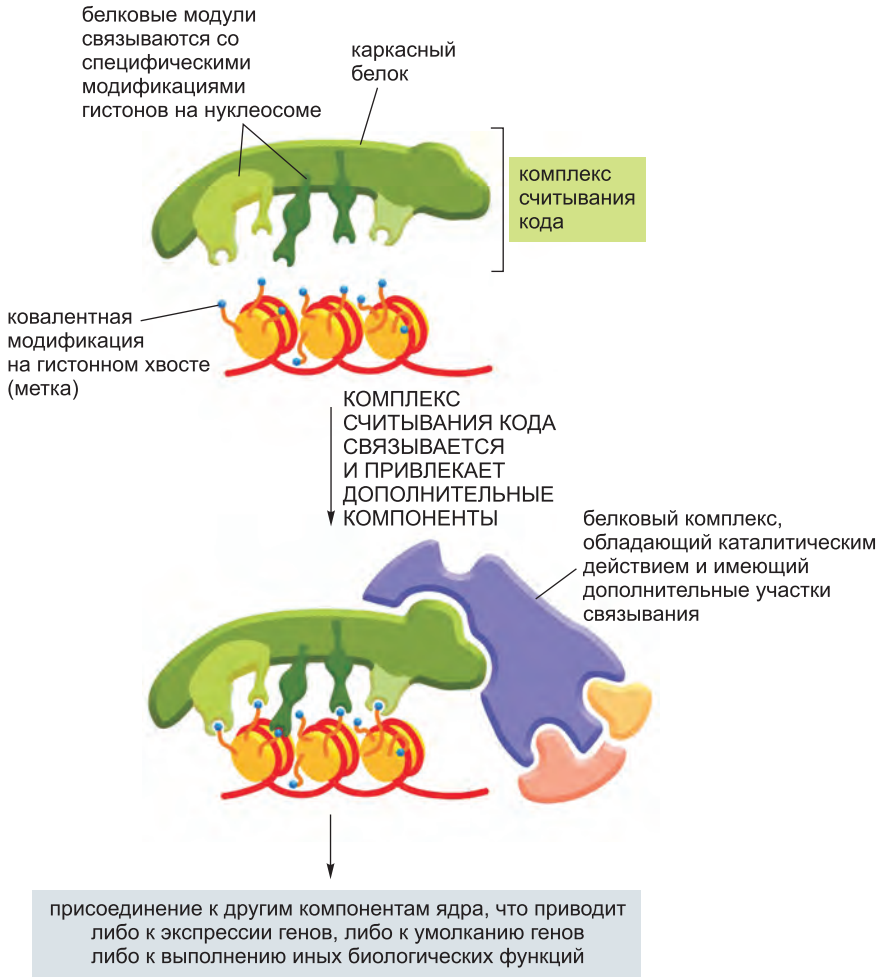


Рис. 4.43. Принципиальная схема, показывающая, как гистоновый код может считываться комплексом считывания кода. На рисунке схематично показан (зеленым) крупный белковый комплекс, который содержит ряд белковых модулей, каждый из которых распознает специфическую гистонную метку. Такой «комплекс считывания кода» связывается сильно только с областью хроматина, в которой содержится несколько различных гистонных меток, узнаваемых им. Поэтому только определенная комбинация меток вызовет связывание комплекса с хроматином и привлечет дополнительные белковые комплексы (фиолетовый), которые катализируют одну или несколько биологических функций.

нуклеосом, которые содержат разновидности основных гистонов.

Многие из комбинаций, кажется, имеют определенное значение для клетки, потому что они определяют, как и когда к ДНК, упакованной в нуклеосомах, открывается доступ; такие наблюдения привели ученых к выдвиганию гипотезы о **гистоновом коде** (histone code). Например, метка одного типа сигнализирует о том, что отрезок хроматина был недавно реплицирован, другая метка сигнализирует, что ДНК в этом хроматине была повреждена и нуждается в восстановлении, тогда как многие другие сигнализируют о том, когда и как должна проводиться экспрессия генов. Малые белковые модули связываются с определенными метками, опознавая, например, триметилированный лизин 4 на гистоне H3 (рис. 4.42). Эти модули, как думают, действуют совместно с другими модулями и выступают частью *комплекса считывания кода* (code-reader complex), который позволяет специфическим комбинациям меток на хроматине привлекать дополнительные белковые комплексы, которые исполняют соответствующую им биологическую роль в нужное время (рис.

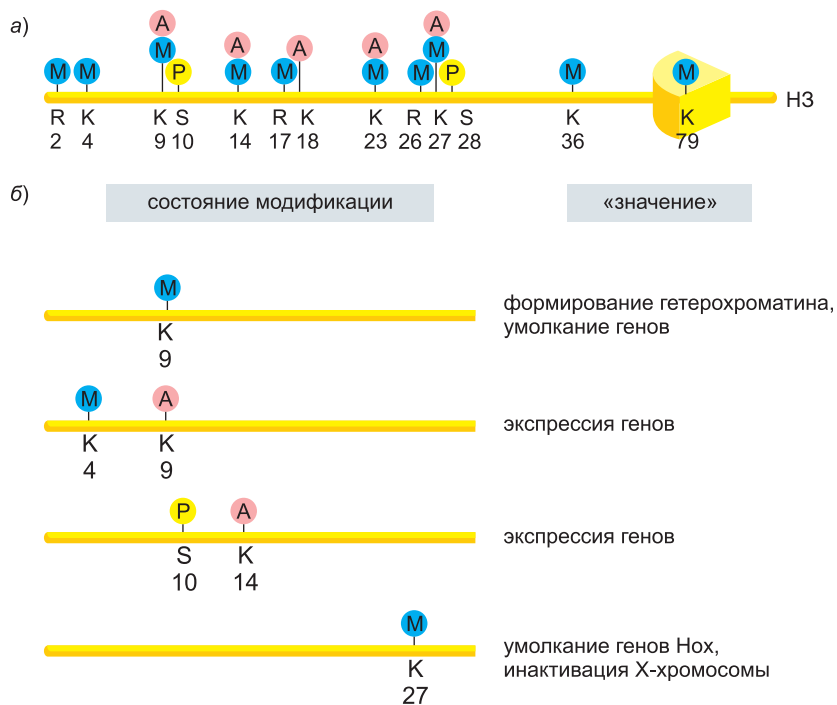
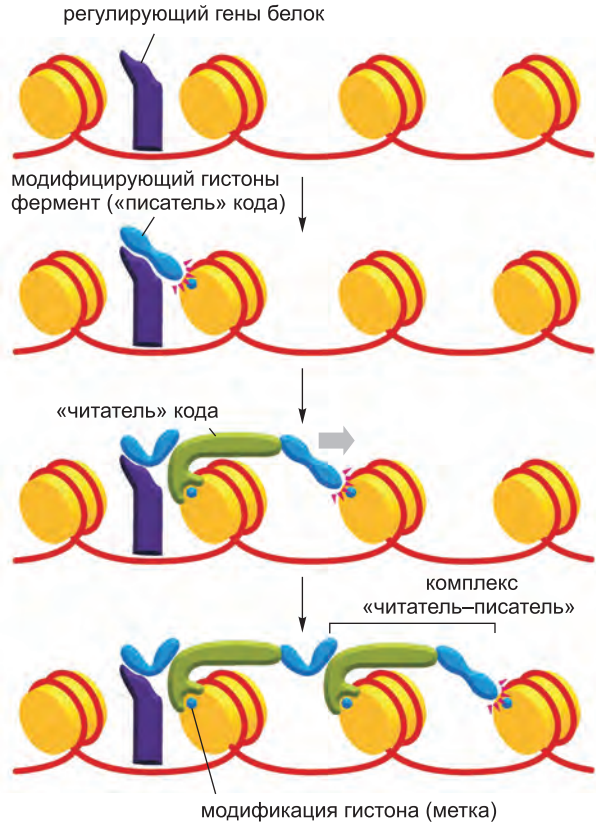


Рис. 4.44. Некоторые определенные значения гистонового кода. а) Модификации на N-концевом хвосте гистона H3 показаны сообразно обозначениям на рис. 4.39. б) Хвост гистона H3 может быть помечен различными комбинациями модификаций, которые придают определенное «значение» отрезку хроматина, где такая комбинация расположена. Известно лишь несколько такого рода значений, в том числе четыре представленных примера. Обратим внимание на один пример: триметилирование лизина 9 привлекает специфичный к гетерохроматину белок HP1, что вызывает распространяющуюся волну дальнейшего триметилирования лизина 9, за которым следует дальнейшее связывание HP1, согласно общей схеме, которая будет проиллюстрирована вскоре (см. рис. 4.46). Не показан тот факт, который только что обсуждался (см. рис. 4.43), что считывание гистонового кода обычно предполагает сопутствующее «общее» узнавание метки на других участках нуклеосомы, наряду с показанным узнаванием хвоста гистона H3. Кроме того, требуются определенные уровни метилирования (моно-, ди- или триметильные группы), как это показано на рис. 4.42.

Рис. 4.45. Как набор комплекса «чтения-записи» кода может распространить изменения хроматина по хромосоме.

Белок записи кода представляет собой фермент, который создает специфическую модификацию на одном или нескольких из четырех гистонов нуклеосомы. После его «вербовки» на определенном участке хромосомы регулирующим гены белком записывающий белок («писатель») сотрудничает с код-считывающим белком («читатель»), чтобы распространять свою метку от нуклеосомы к нуклеосоме посредством изображенного комплекса «чтения-записи». Для того чтобы этот механизм работал, считывающий белок должен опознавать ту же метку модификации гистона, которую вносит записывающий белок (см. также [рис. 4.43](#)).



4.43).

Метки на нуклеосомах, образуемые ковалентными модификациями гистонов, динамичны, будучи постоянно удаляемыми и устанавливаемыми с быстротой, которая зависит от их местоположения на хро-

мосоме. Поскольку гистонные хвосты «высунуты» из нуклеосомы в направлении от стержня в стороны и с большой вероятностью доступны, даже когда хроматин уплотнен, они, казалось бы, обеспечивают особенно подходящий формат для создания меток в форме, которая может быть легко видоизменена всякий раз, когда клетка потребует перемен. Хотя многое еще предстоит узнать о значении многих различных комбинаций гистонного кода, несколько хорошо изученных примеров информации, которая может быть закодирована в хвосте гистона H3, представлены на [рис. 4.44](#).

4.3.6. Комплекс код-считывающих и код-записывающих белков может распространять специфические модификации хроматина по хромосоме на большие расстояния

Явление мозаичного эффекта положения, описанное ранее, требует, чтобы по крайней мере некоторые модифицированные формы хроматина имели возможность распространяться на значительные расстояния по молекуле хромосомной ДНК (см. [рис. 4.36](#)). Как такое возможно?

Ферменты, которые модифицируют гистоны (или удаляют с них модификации) в нуклеосомах, являются частью мультисубъединичных комплексов. Они могут первоначально быть принесены к определенной области хроматина одним из сайт-специфичных к последовательности ДНК-связывающих белков (регулирующих гены

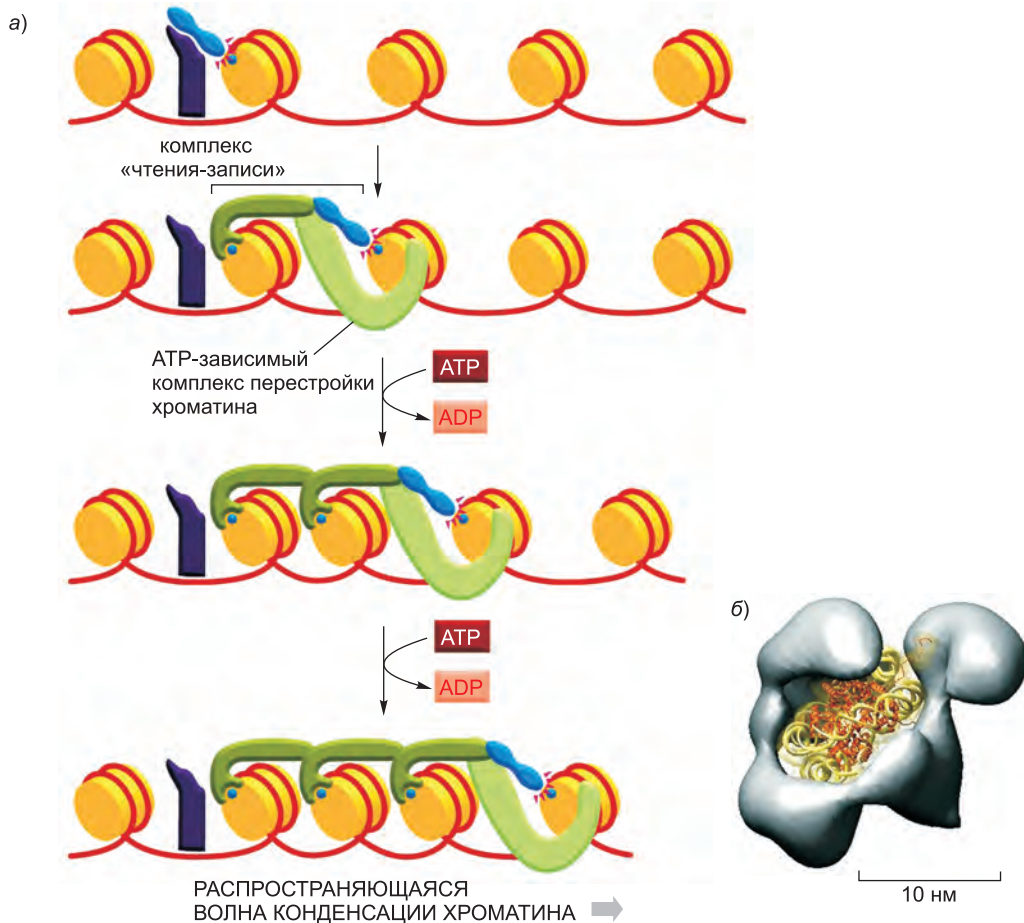


Рис. 4.46. Как комплекс, содержащий считывающие, записывающие и АТФ-зависимые белки перестройки хроматина, может распространять изменения в хроматине по хромосоме. а) Распространяющаяся волна уплотнения хроматина. Этот механизм идентичен представленному на [рис. 4.45](#), за исключением того, что комплекс считывающих–записывающих белков сотрудничает с АТФ-зависимым белком перестройки хроматина (см. [рис. 4.29](#)) для перемещения нуклеосом и упаковки их в высококонденсированную материю. Это крайне упрощенное представление данного механизма, который, как известно, способен распространять мажорную форму гетерохроматина на значительные расстояния по хромосомам (см. [рис. 4.36](#)). Специфичный к гетерохроматину белок HP1 играет главную роль в том процессе. HP1 связывается с триметиллизином 9 на гистоне H3 и остается связанным с уплотненным хроматином в качестве одного из считывающих белков в комплексе «чтения-записи-перестройки», который, хотя и не полностью понят, является значительно более замысловатым, чем показанный здесь. б) Фактическая структура комплекса «чтения-перестройки» хроматина, показывающая, как он, как думают, взаимодействует с нуклеосомой. Окрашенная серым модель демонстрирует RSC-комплекс дрожжей, который содержит 15 субъединиц — включая АТФ-зависимый белок перестройки хроматина и по крайней мере 4 субъединицы со считывающими код доменами. (Изображение б заимствовано из A. E. Leschziner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104: 4913–4918, 2007. С любезного разрешения National Academy of Sciences.)

белков), которые мы обсудим в главах 6 и 7 (конкретный пример можно увидеть на [рис. 7.87](#)). Но после того как модифицирующий фермент «запишет» свою метку на одной или нескольких соседних нуклеосомах, могут последовать события, напоминающие цепную реакцию. В этом случае код-записывающий (code writer) фермент работает совместно с код-считывающим (code-reader) белком, находящимся в том же белковом комплексе. Этот второй белок содержит модуль считывания кода, который опознает метку и сильно связывается с недавно модифицированной нуклеосомой (см. [рис. 4.42](#)), помещая прикрепленный к нему записывающий фермент вблизи соседней нуклеосомы. Посредством множества таких циклов чтения-записи считывающий белок может переносить записывающий фермент вдоль ДНК, распространяя метку по цепочке «из рук в руки» по хромосоме ([рис. 4.45](#)).

В действительности данный процесс более сложен, чем только что описанная схема. И считывающие, и записывающие «устройства» являются частями белкового комплекса, который, вероятно, содержит множество и тех, и других и требует присутствия множественных меток на нуклеосоме — чтобы распространять их. Более того, многие из таких комплексов «чтения-записи», или «читатель-писатель» (reader-writer), содержат также АТР-зависимый белок перестройки хроматина, при этом считывающие, записывающие и перестраивающие белки работают слаженно как в деле деконденсации, так и в деле конденсации протяженных отрезков хроматина — по мере того как считывающий белок движется по упакованной в нуклеосомы ДНК ([рис. 4.46](#)).

Некоторое представление о сложности только что описанных процессов может быть получено из результатов генетических скринингов мутантных генов, которые или усиливают, или подавляют распространение и стабильность гетерохроматина в испытаниях на мозаичный эффект положения у дрозофилы (см. [рис. 4.37](#)). Как было упомянуто ранее, известно более 50 таких генов, и большинство из них, вероятно, «работает» в виде субъединиц в одном или нескольких комплексах считывающих-записывающих-перестраивающих белков.

4.3.7. Барьерные последовательности ДНК блокируют распространение комплексов белков «чтение-запись» и тем самым разделяют соседствующие хроматиновые домены

Вышеупомянутый механизм распространения хроматиновых структур вызывает у исследователей следующий вопрос. Поскольку каждая хромосома состоит из одной непрерывной и очень длинной молекулы ДНК, совершенно неясно, что предотвращает какофонию перекрестных помех между смежными хроматиновыми доменами с различной структурой и функцией? Первоначальные исследования мозаичного эффекта положения предложили такой ответ: существуют определенные последовательности ДНК, которые отделяют один хроматиновый домен от другого (см. [рис. 4.37](#)). К настоящему времени несколько таких *барьерных* последовательностей идентифицировано и охарактеризовано с помощью методов геной инженерии, которые позволяют удалять или добавлять к хромосомам определенные области последовательности ДНК.

Например, последовательность под названием HS4 обычно отделяет активный хроматиновый домен, который содержит локус β-глобина, от смежной области заглушенного, конденсированного хроматина в эритроцитах (см. [рис. 7.61](#)). Если эта последовательность удалена, то в локус β-глобина вторгается конденсированный

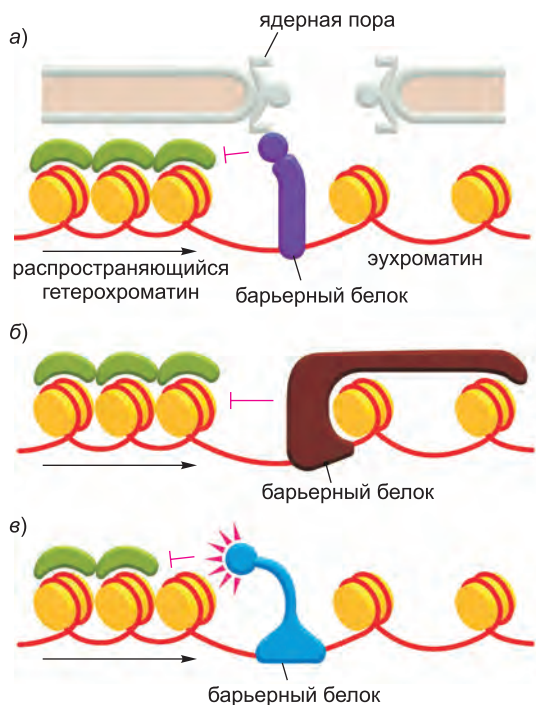


Рис. 4.47. Некоторые механизмы действия барьера. Эти модели построены на основе результатов различных исследований по изучению механизмов действия барьера и того, как сочетание нескольких из них может функционировать в любом участке. а) Прикрепление области хроматина к большому закреплённому участку, такому как ядерный поровый комплекс, изображенный здесь, может создать барьер, который останавливает распространение гетерохроматина. б) Сильное связывание барьерных белков с группой нуклеосом может конкурировать с распространением гетерохроматина. в) С помощью группы очень активных модифицирующих гистоны ферментов барьеры могут стереть гистонные метки, которые необходимы для распространения гетерохроматина. Например, более успешное ацетилирование лизина 9 на гистоне H3 конкурирует с метилированием лизина 9 и таким образом предотвращает связывание белка HP1, что необходимо для образования некоторых форм гетерохроматина (см. рис. 4.46). (Иллюстрации созданы на основе A. G. West and P. Fraser, *Hum. Mol. Genet.* 14: R101–R111, 2005. С любезного разрешения издательства Oxford University Press.)

хроматин. Этот хроматин заглушает гены, которые он охватывает, и в разных клетках распространяется на различное расстояние, порождая картину эффекта положения, подобную наблюдаемой у дрозофилы. Как будет описано в главе 7, такое вторжение имеет печальные последствия: гены глобина экспрессируются вяло, и у индивидуумов с такой делецией наблюдается тяжелая форма анемии.

Часто к обоим концам гена, который экспериментально встраивают в геном млекопитающих, добавляют последовательность HS4, чтобы защитить этот ген от умолкания, вызываемого распространяющимся гетерохроматином. Анализ этой барьерной последовательности показывает, что она содержит группу участков связывания ферментов гистонацетилаз. Поскольку ацетилирование боковой цепи лизина несовместимо с метилированием той же боковой цепи, гистонацетилазы и гистондеацетилазы — логически объяснимые кандидаты на образование барьеров в ДНК — барьеров, которые блокируют распространение различных форм хроматина

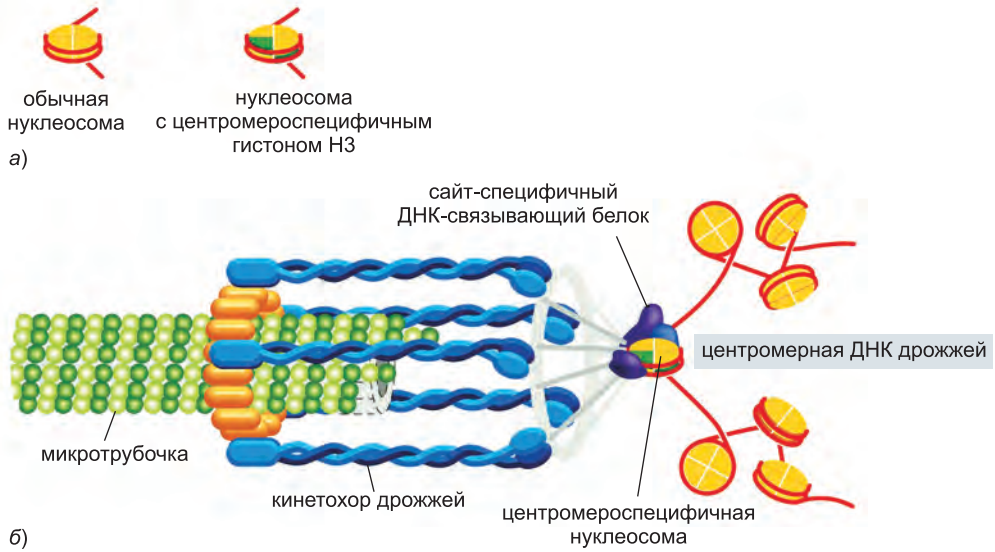


Рис. 4.48. Модель структуры простой центромеры. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* специальная последовательность центромерной ДНК собирает единственную нуклеосому, в которой две копии разновидности гистона Н3 (названного СЕНР-А в большинстве организмов) заменяют нормальный гистон Н3. Затем пептидные последовательности, уникальные для этой разновидности гистона (см. рис. 4.41), помогают собирать дополнительные белки, некоторые из которых образуют кинетохор. Этот кинетохор необычен тем, что захватывает только одну микротрубочку; у человека намного более крупные центромеры и кинетохоры способны захватывать 20 и более микротрубочек (см. рис. 4.50). Кинетохор подробно будет рассмотрен в главе 17. (Переработано на основе A. Joglekar et al., *Nat. Cell Biol.* 8: 381–383, 2006. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

(рис. 4.47). Однако известно и несколько других типов модификаций хроматина, которые также могут защищать гены от умолкания.

4.3.8. Хроматин в центромерах раскрывает механизм образования разновидностями гистонов особых структур

Присутствие нуклеосом, несущих разновидности гистонов, как думают, служит специфическими метками в хроматине, которые необычайно устойчивы. Рассмотрим, например, формирование и наследование хроматина, который образуется на центромерах — областях ДНК на каждой хромосоме, необходимых для организованного расхождения хромосом по дочерним клеткам при каждом делении материнской клетки (см. рис. 4.21). Во многих сложных организмах, в том числе человека, каждая центромера встроена в отрезок специального *центромерного гетерохроматина*, который сохраняется на всем протяжении интерфазы, даже при том, что опосредствованное центромерой движение ДНК происходит только во время митоза. Этот хроматин содержит специфичную к центромере разновидность гистона Н3, известную как СЕНР-А (см. рис. 4.41), плюс дополнительные белки, которые упаковывают нуклеосомы в особенно плотные структуры и образуют кинетохор — специальную структуру, необходимую для прикрепления митотического веретена деления.

Специфическая последовательность ДНК приблизительно из 125 пар нуклео-

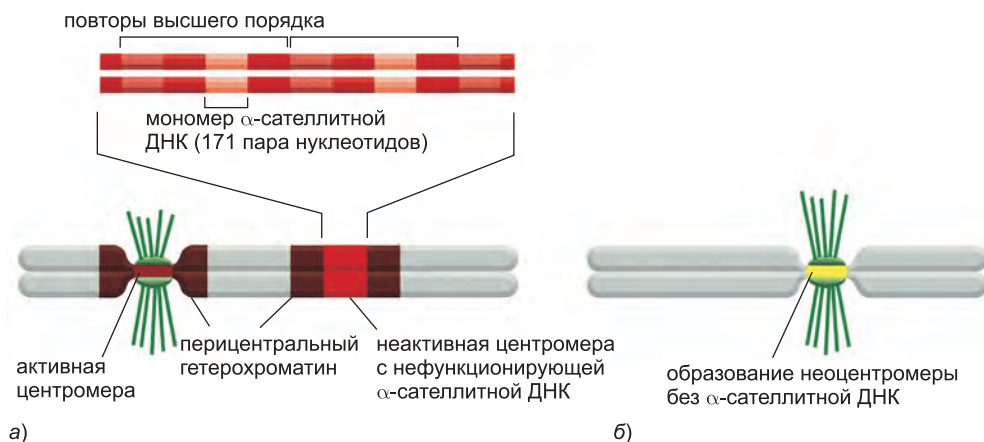


Рис. 4.49. Свидетельство пластичности формирования центромер у человека. а) Ряд обогащенных А–Т парами последовательностей α -сателлитной ДНК повторяется много тысяч раз во всех центромерах (красный) хромосом человека, окруженных прицентромерный гетерохроматином (коричневый цвет). Однако из-за древнего события разрыва и воссоединения хромосомы некоторые хромосомы человека содержат два блока α -сателлитной ДНК, каждый из которых предположительно функционировал как центромера в его исходной хромосоме. Обычно такие дицентрические хромосомы не размножаются устойчиво, потому что они неправильно прикрепляются к веретену деления и разрываются во время митоза. Однако в тех хромосомах, которые остаются целыми, одна из центромер так или иначе инактивирована, даже при том, что она содержит все необходимые последовательности ДНК. Это позволяет хромосоме устойчиво размножаться. б) У малой доли (1/2000) потомков человека в клетках наблюдаются лишние хромосомы. Некоторые из таких лишних хромосом, которые образовались в результате события разрыва, совершенно не имеют α -сателлитной ДНК, и все же новые центромеры (неоцентромеры) возникают из того, что было первоначально эухроматиновой ДНК.

тидов достаточна, чтобы служить центромерой у дрожжей *S. cerevisiae*. Несмотря на ее небольшой размер, более дюжины различных белков собирается на этой последовательности ДНК; в число этих белков входит разновидность CENP-A гистона H3, которая, наряду с тремя другими стержневыми гистонами, образует специфичную к центромере нуклеосому. Дополнительные белки в центромере дрожжей прикрепляют эту нуклеосому к единственной микротрубочке митотического веретена деления дрожжей (рис. 4.48).

Центромеры в более сложных организмах значительно крупнее, чем таковые в почкующихся дрожжах. Например, центромеры мухи и человека простираются на сотни тысяч пар нуклеотидов и, кажется, не содержат специфичную к центромере последовательность ДНК. Эти центромеры в основном состоят из коротких повторяющихся последовательностей ДНК, известных у человека под названием *α -сателлитной ДНК*. Но те же повторяющиеся последовательности обнаружены также и в других (нецентромерных) позициях на хромосомах, а это указывает на то, что их недостаточно, чтобы направлять формирование центромеры. Что наиболее поразительно, в некоторых необычных случаях наблюдалось, как на фрагментированных хромосомах человека самопроизвольно формируются новые центромеры, названные неоцентромерами. Некоторые из этих новых позиций были первоначально эухроматиновыми и совершенно не содержали α -сателлитную ДНК (рис. 4.49).

Поэтому кажется, что в сложных организмах центромеры предопределяются сборкой белков, а не специфической последовательностью ДНК. Когда для исследования растянутых волокон хромосомы из области центромеры используют антитела, которые позволяют окрасить специфически модифицированные нуклеосомы, наблюдается поразительное чередование двух модифицированных форм хроматина (рис. 4.50). Видимо, такая организация позволяет центромерному гетерохроматину свернуться таким образом, чтобы поместить CENP-A-содержащие нуклеосомы на внешней стороне митотической хромосомы, где они связывают набор белков, которые формируют кинетохорные пластинки. Эти пластинки, в свою очередь, захватывают группу микротрубочек митотического веретена деления, чтобы точно разделить хромосомы, как будет описано в главе 17.

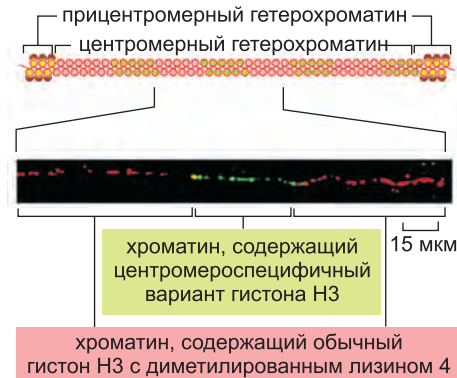
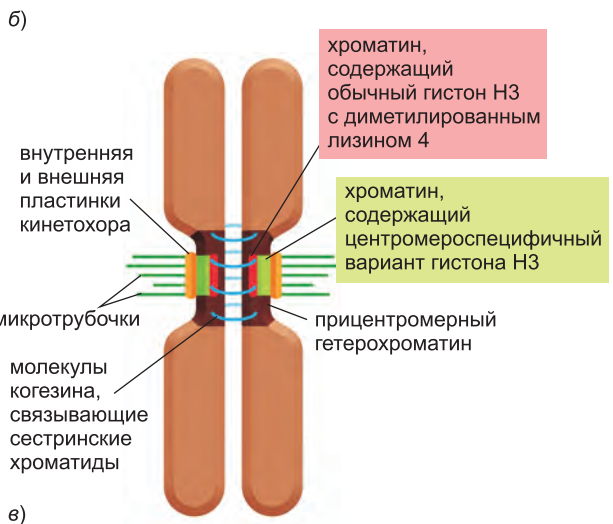
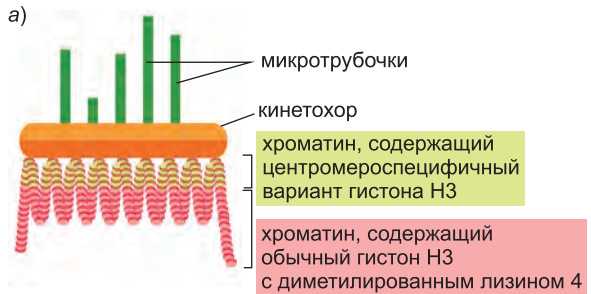


Рис. 4.50. Организация и функция хроматина, из которого формируются центромеры у человека.

а) При окрашивании растянутых волокон хроматина флуоресцентно-мечеными антителами α -сателлитная ДНК, из которой формируется центромерный гетерохроматин у человека, видна упакованной в чередующиеся блоки хроматина. Один блок сформирован из длинной цепочки нуклеосом, содержащих CENP-A вариант гистона H3 (зеленый); другой блок содержит нуклеосомы, которые специально помечены диметиллизином 4 (красный). Каждый блок состоит из более тысячи нуклеосом. **б)** Модель организации двух типов центромерного гетерохроматина. Как и у дрожжей, нуклеосомы, которые содержат разновидность гистона H3, формируют кинетохор. **в)** Расположение центромерного и прицентромерного гетерохроматина на метафазной хромосоме человека; изображение получено с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием тех же антител, что и на изображении **а**. (Переработано из В. А. Sullivan and G. H. Karpen, *Nut. Struct. Mol. Biol.* 11: 1076–1083, 2004. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)



в)

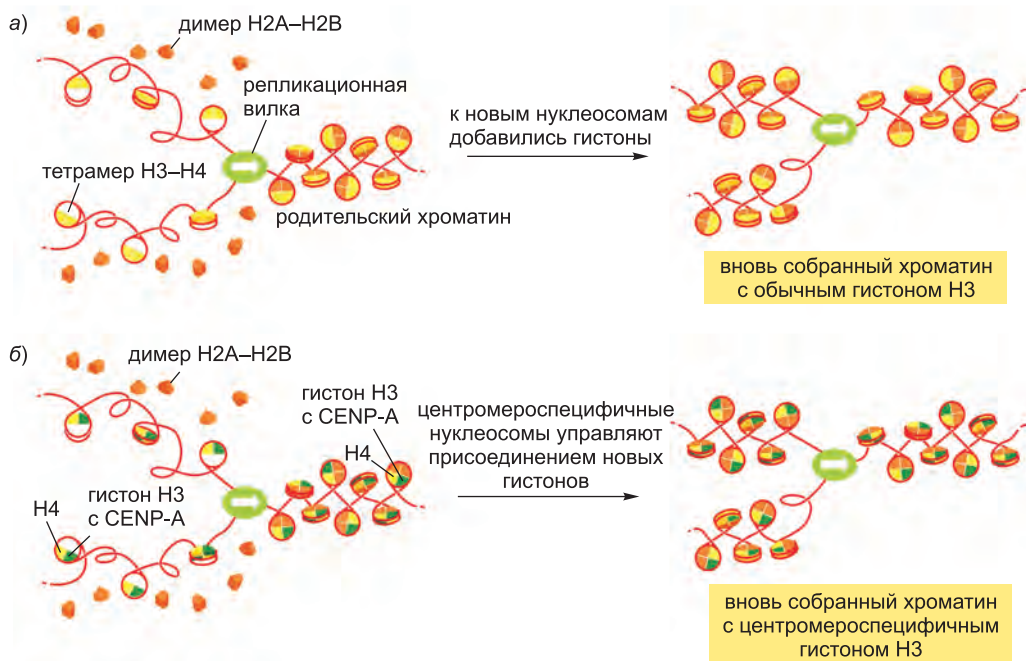


Рис. 4.51. Модель прямого наследования центромерного гетерохроматина. а) Нормальная сборка хроматина на двух дочерних спиральных ДНК, осуществляемая в репликационной вилке, требует помещения димеров H2A–H2B в тетрамеры H3–H4, наследуемые напрямую, а также сборки новых гистоновых октамеров (см. подробности на рис. 5.38). б) В центромере наследование тетрамеров разновидности H3–H4 служат затравкой для формирования новых гистоновых октамеров, которые, таким образом, содержат разновидность гистона H3. Подобный процесс затравки может привести к наследованию смежных блоков центромерного гетерохроматина (содержащих гистон H3, диметилированный по лизину 4; см. рис. 4.50). Хотя подробности не известны, в процесс затравки, вероятно, вовлечены и другие центромерные белки, которые наследуются наряду с нуклеосомами (см. рис. 4.52).

4.3.9. Структуры хроматина наследуются напрямую

Чтобы объяснить вышеупомянутые наблюдения, было высказано предположение о том, что для формирования центромеры *de novo* требуется первоначальное событие — затравка, — суть которого заключается в формировании специализированной ДНК-белковой структуры, содержащей нуклеосомы, образованные при участии разновидности CENP-A гистона H3. У человека такое событие затравки происходит легче в массивах α -сателлитной ДНК, чем в других последовательностях ДНК. Тетрамеры H3–H4 от каждой нуклеосомы на родительской спирали ДНК напрямую наследуются дочерними спиральными ДНК в репликационной вилке (см. рис. 5.38). Поэтому, как только набор содержащих CENP-A нуклеосом собран на отрезке ДНК, легко понять, как новая центромера может далее формироваться — в том же самом месте на обеих дочерних хромосомах после каждого цикла деления клетки (рис. 4.51).

Пластичность центромер может давать им важное эволюционное преимущество. Мы увидели, что хромосомы эволюционируют частично за счет событий разрыва и воссоединения (см. рис. 4.18). Многие из таких событий дают хромосомы с двумя

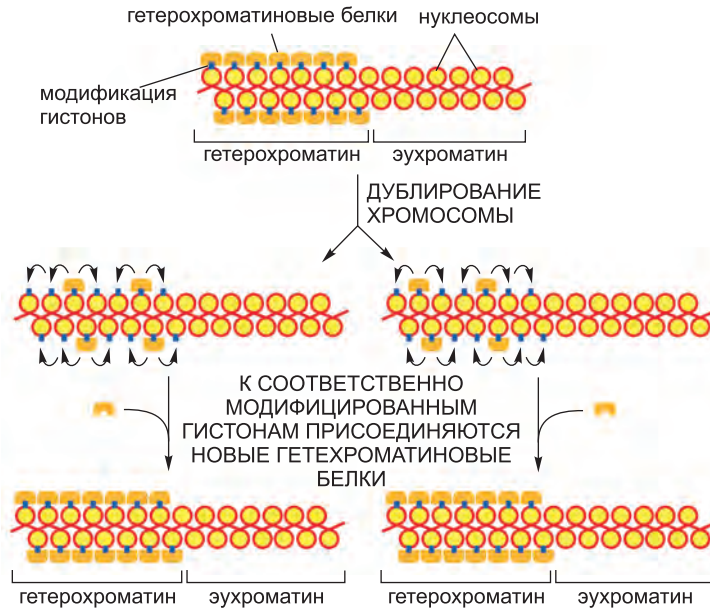


Рис. 4.52. Как упаковка ДНК в хроматине может быть унаследована в ходе репликации хромосомы. В этой модели некоторые из специализированных компонентов хроматина распределяются по всем дочерним хромосомам после дублирования ДНК, наряду со специально помеченными нуклеосомами, которые они связывают. После репликации ДНК унаследованные нуклеосомы, которые модифицированы особым образом, действуя совместно с унаследованными компонентами хроматина, изменяют картину модификации гистонов в недавно сформированных дочерних нуклеосомах в близлежащей к ним области. Это создает новые участки связывания для тех же компонентов хроматина, которые сюда собираются и завершают структуру. Последний процесс, вероятно, вовлекает комплексы «чтения-записи-перестройки», работающие по схеме, подобной представленной ранее на [рис. 4.46](#).

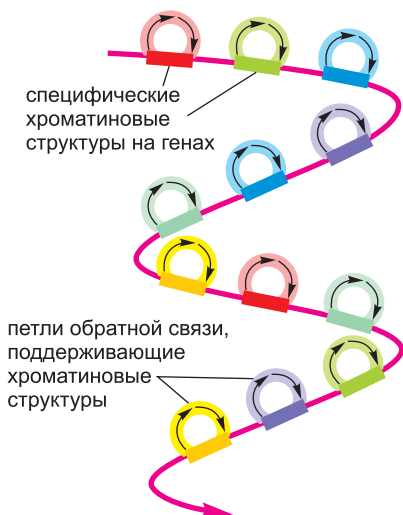


Рис. 4.53. Принципиальная схема памяти клетки, хранимой в виде основанной на хроматине эпигенетической информации в генах эукариот. Гены в клетках эукариот могут быть упакованы в большое разнообразие различных структур хроматина, обозначенных здесь разными цветами. По крайней мере некоторые из таких структур хроматина оказывают на экспрессию генов особое воздействие, которое может быть напрямую унаследовано в виде эпигенетической информации при делении клетки. Это позволяет части регулирующих генов белков, которые обуславливают различные состояния генов, действовать только единожды, поскольку состояние может быть запомнено после того, как регуляторный белок ушел. Эпигенетическая информация может сохраняться также в сетях сигнальных молекул, которые управляют экспрессией генов (см. [рис. 7.86](#)).

центромерами или же фрагменты хромосом вообще без центромер. Хотя редко, но инактивация центромер и их способность активироваться *de novo* может позволить недавно сформированным хромосомам поддерживать центромеры в устойчивом состоянии и таким образом облегчать процесс эволюции хромосомы.

Есть некоторые поразительные подобия между формированием и поддержанием центромер и формированием и поддержанием других областей гетерохроматина. В частности, полноценная центромера образуется, в сущности, как «все или ничего», что предполагает в высшей степени кооперативное присоединение белков после события затравки. Более того, будучи сформирована, эта структура, кажется, напрямую наследуется вместе с самой ДНК в каждом цикле репликации хромосомы.

4.3.10. Структуры хроматина обуславливают уникальные свойства хромосом эукариот

Хотя многое еще остается неизученным в функциях различных структур хроматина, упаковка ДНК в нуклеосомы была, вероятно, определяющим шагом в эволюции эукариот наподобие нас с вами. Появление сложных многоклеточных организмов, казалось бы, возможно только в том случае, если клетки в различных последовательностях клеточных поколений будут специализироваться путем изменения доступности и скорости реагирования многих сотен генов для нужд генетического считывания. Как будет описано в главе 22, каждая клетка сохранит память о своей прошлой истории развития в цепях регуляции, которые управляют многими ее генами.

Хотя бактериям тоже нужны механизмы памяти клетки, сложность запоминающих цепей, необходимых высшим эукариотам, беспрецедентна. Упаковка избранных областей геномов эукариот в различные формы хроматина делает возможным существование механизма памяти клетки такого типа, который не доступен бактериям. Фундаментальная особенность этой уникальной для эукариот формы регулирования генов — хранение памяти о состоянии гена на основе «ген за геном», а именно в форме локальных структур хроматина, которые могут сохраняться в течение различных отрезков времени. На одном полюсе находятся структуры наподобие центромерного гетерохроматина, которые устойчиво наследуются от одного поколения клеток к следующему (см. [рис. 4.51](#)). Имеющие много общего с ними механизмы, которые по аналогии основаны на прямом наследовании родительских форм хроматина дочерними спиралями ДНК позади репликационной вилки, как думают, отвечают за другие типы конденсированного хроматина ([рис. 4.52](#)). Например, постоянно заглушенный, классический тип гетерохроматина содержит белок HP1, тогда как конденсированный хроматин, который охватывает важные регуляторные гены, связанные с развитием, поддерживается группой белков polycomb. Гетерохроматин последнего типа заглушает большое число генов, которые кодируют регуляторные белки генов на ранних этапах развития зародыша, охватывая в общем около 2 процентов генома человека, и удаляется, только когда каждый индивидуальный ген необходим развивающемуся организму (обсудим в главе 22). Хотя существуют и другие типы наследуемых структур хроматина, еще не совсем ясно, сколько вообще имеется их различных типов: это число определенно может превышать 10 (см. [стр. 238](#)). Фундаментальное значение этого механизма для различия разных генов схематично представлено на [рис. 4.53](#).

Другие формы хроматина могут иметь более короткий жизненный цикл, мно-

го меньший, чем время деления клетки; однако для многих характерно удивительное постоянство, которое помогает опосредствовать биологическую функцию.

Заключение

Несмотря на однородность сборки хромосомной ДНК в нуклеосомах, в организмах эукариот возможно большое разнообразие различных структур хроматина. В основе этого разнообразия лежит большой набор обратимых ковалентных модификаций всех четырех гистонов, составляющих стержень нуклеосомы. Эти модификации включают моно-, ди- и триметилирование многих различных боковых цепей лизина — очень важная реакция, которая не совместима с ацетилированием тех же лизинов. Определенные комбинации модификаций «помечают» каждую нуклеосому «гистоновым кодом». Гистоновый код считывается, когда белковые модули, которые являются частью более крупного белкового комплекса, связываются с модифицированными нуклеосомами в области хроматина. После этого такие код-считывающие белки привлекают дополнительные белки, которые катализируют биологически значимые функции.

Некоторые комплексы код-считывающих белков содержат модифицирующий гистоны фермент, такой как гистонметилаза, который «записывает» ту же метку, что опознал «читатель» кода. Комплекс «чтения-записи-перестройки» такого типа может распространять определенную форму хроматина по хромосоме на большие расстояния. В частности, большие области конденсированного гетерохроматина, как думают, образуются именно таким образом. Гетерохроматин обычно встречается вокруг центромеры и около теломер, но может присутствовать также и во многих других позициях хромосом. Плотная упаковка ДНК в гетерохроматине обычно заглушает гены в его пределах.

Явление мозаичного эффекта положения представляет хорошее доказательство прямого наследования конденсированных форм хроматина дочерними спиралями ДНК, образованными в репликационной вилке; и подобный этому механизм, кажется, отвечает за поддержание специализированного хроматина в центромерах. Если смотреть шире, способность передавать определенные структуры хроматина от одного поколения клеток следующему обеспечивает основу эпигенетического процесса памяти клетки, который, по всей вероятности, является определяюще важным для поддержания сложного набора различных состояний клетки, необходимых сложным многоклеточным организмам.

4.4. Глобальная структура хромосом

Рассмотрев молекулы ДНК и белка, из которых образуется 30-нм хроматиновое волокно, мы обратимся к организации хромосомы в более глобальном масштабе. В виде 30-нм волокна типичная хромосома человека все еще была бы 0,1 см в длину, то есть более чем в 100 раз длиннее ядра клетки. Ясно, что должен существовать еще более высокий уровень укладки, даже в интерфазных хромосомах. Хотя молекулярная основа такой упаковки более высокого порядка все еще в значительной мере остается тайной, она почти наверняка заключается в свертывании 30-нм волокна в ряд петель и катушек. Такая упаковка хроматина неустойчивая и часто изменяется в ответ на потребности клетки.

Мы начнем с описания некоторых необычных интерфазных хромосом, которые

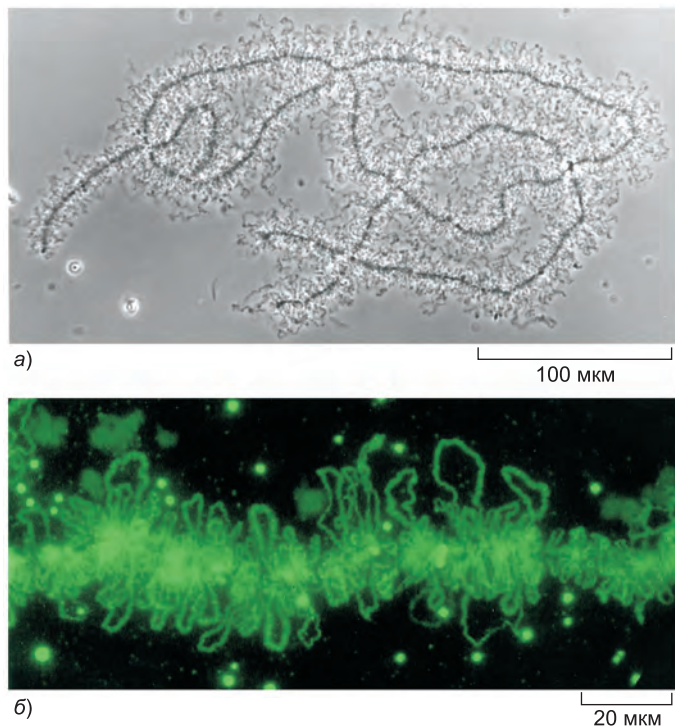


Рис. 4.54. Хромосомы типа ламповой щетки. а) Полученный на световом микроскопе микрофото- снимок хромосом типа ламповой щетки в ооците земноводного. На ранних стадиях дифференциации ооцита каждая хромосома реплицируется, чтобы начать мейоз, и гомологичные реплицированные хромосомы спариваются и образуют эту протяженную структуру, содержащую в целом четыре молекулы реплицированной ДНК, или хроматиды. Стадия ламповой щетки сохраняется в хромосоме в течение многих месяцев или лет, пока ооцит создает запас материалов, требующихся для его окончательного развития в новую особь. б) Увеличенная область подобной хромосомы, окрашенной флуоресцентным реактивом, который позволяет ясно различить петли, на которых происходит синтез РНК. (Снимки любезно предоставлены J. G. Gall.)

могут быть легко изображены, поскольку некоторые особенности этих исключительных случаев, как думают, являются характерными для всех интерфазных хромосом. Более того, они представляют уникальное средство исследования некоторых фундаментальных вопросов о структуре хроматина, поставленных в предыдущем параграфе. Затем мы опишем, как типичная интерфазная хромосома устроена в ядре клетки, сосредоточив внимание на клетках человека. Наконец, мы завершим наш обзор обсуждением дополнительного десятикратного уплотнения, которому интерфазные хромосомы подвергаются во время процесса митоза.

4.4.1. Хромосомы свернуты в крупные петли хроматина

Представление о структуре хромосом в интерфазных клетках было получено в ходе исследований плотных и распростертых спаренных в мейозе хромосом в растущих ооцитах (незрелых яйцеклетках) земноводных. Эти очень необычные **хромосомы типа ламповой щетки** (наибольшие из известных хромосом) ясно вид-

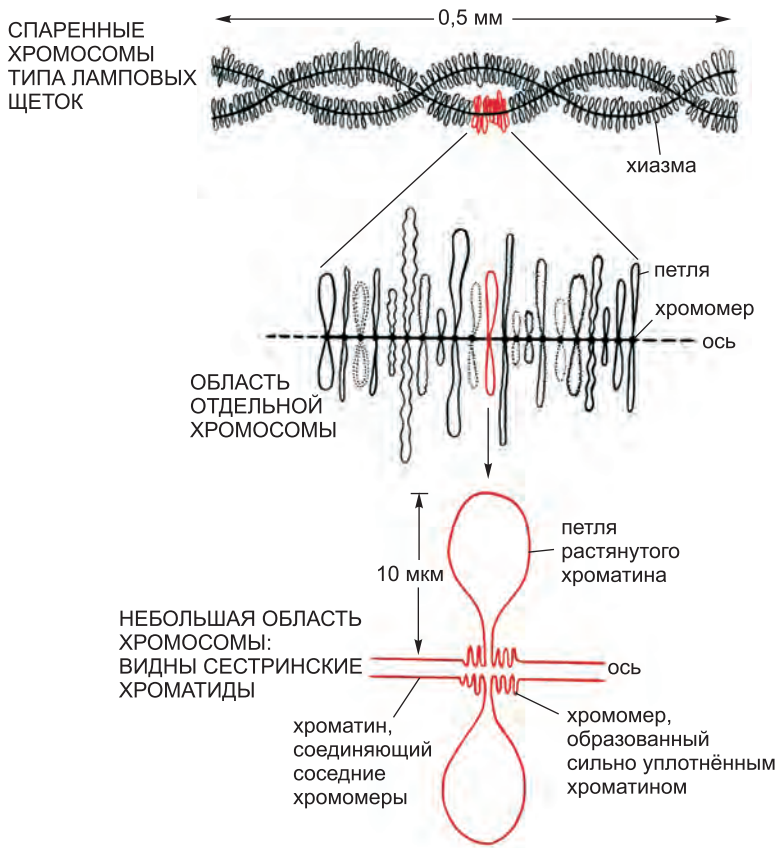


Рис. 4.55. Модель структуры хромосомы типа ламповой щетки. Набор хромосом типа ламповой щетки у многих земноводных содержит в общем около 10 000 хроматиновых петель, хотя основная доля ДНК во всех хромосомах остается в высококонденсированной форме и пребывает в хромомерах. Каждая петля соответствует определенной последовательности ДНК. В каждой клетке имеется по четыре копии каждой петли, так как каждая из двух главных единиц, показанных в верхней части рисунка, состоит из двух сильно сближенных недавно реплицированных хромосом. Такая четырехнитевая структура характерна для этой стадии развития ооцита (диплотенная стадия мейоза); см. [рис. 21.9](#).

ны даже в световой микроскоп, где они имеют вид организованного ряда больших петель хроматина, отходящих от линейной оси хромосомы ([рис. 4.54](#)).

Организация хромосомы типа ламповой щетки показана на [рис. 4.55](#). Всякая отдельно взятая петля всегда содержит одну и ту же последовательность ДНК и на всем протяжении роста ооцита остается развернутой в одной и той же степени. Такие хромосомы производят большие количества РНК для ооцита, и большинство генов, расположенных в петлях ДНК, активно экспрессируются. Однако большая часть ДНК находится не в петлях, а остается в высококонденсированной форме в *хромомерах* на оси, где гены, как правило, не экспрессируются.

Думают, что интерфазные хромосомы всех эукариот подобным образом организованы в виде петель. Хотя эти петли обычно слишком малы и хрупки, чтобы их можно было легко наблюдать в световой микроскоп, можно обнаружить их наличие с помощью других методов. Например, стало возможно оценить частоту, с которой

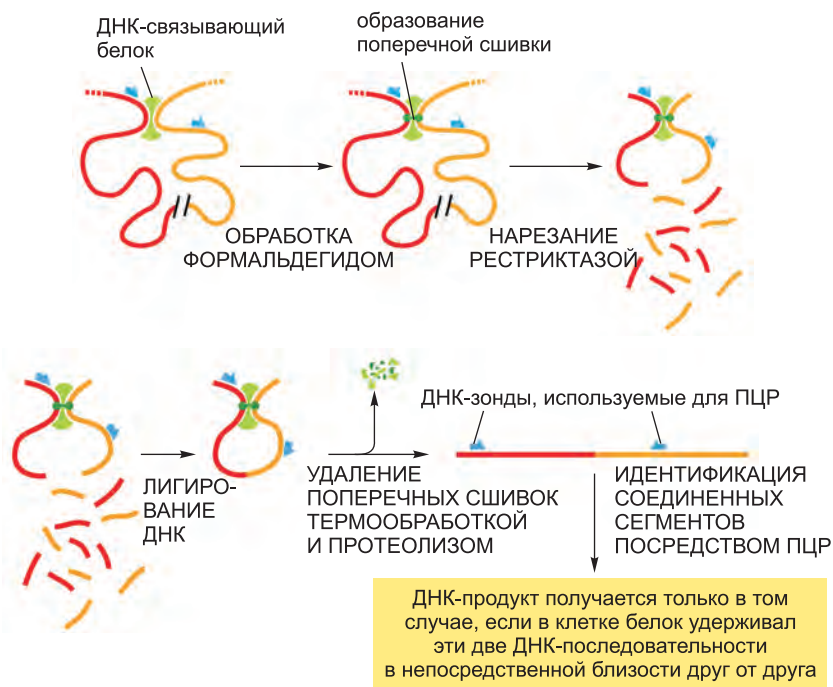


Рис. 4.56. Метод определения положения петель в интерфазных хромосомах. В этой методике, известной под названием метода ЗС (chromosome conformation capture; захват конформации хромосомы), клетки обрабатывают формальдегидом, чтобы создать обозначенные на рисунке ковалентные поперечные сшивки типа ДНК–белок и ДНК–ДНК. Затем ДНК обрабатывают нуклеазой рестрикции, которая нарезает ее на множество кусочков, производя разрезы в строго определенных последовательностях нуклеотидов и формируя наборы идентичных «липких концов» (см. рис. 8.34). Липкие концы могут соединиться друг с другом за счет комплементарного спаривания оснований. Важно, чтобы перед показанным шагом лигирования ДНК находилась в растворенной форме, с тем чтобы фрагменты, которые поддерживались в близком соседстве друг с другом (при помощи поперечных сшивок), соединились с наибольшей вероятностью. Наконец, поперечные сшивки разрушаются, и недавно лигированные фрагменты ДНК идентифицируют и определяют их количество при помощи ПЦР (полимеразная цепная реакция, описанная в главе 8). Объединив информацию о частоте контактов сегментов ДНК, полученную ЗС-методом, с информацией о последовательности ДНК, можно построить структурные модели конформации интерфазных хромосом.

любые два локуса интерфазной хромосомы контактируют друг с другом, и таким образом определить вероятные потенциальные участки на хроматине, которые формируют сильно сближенные основания петельных структур (рис. 4.56). Эти и другие эксперименты дают возможность предположить, что ДНК в хромосомах человека организована в петли различной длины. Типичная петля может содержать от 50 000 до 200 000 пар нуклеотидов ДНК, хотя допустимым и вполне возможным пределом является миллион пар нуклеотидов (рис. 4.57).

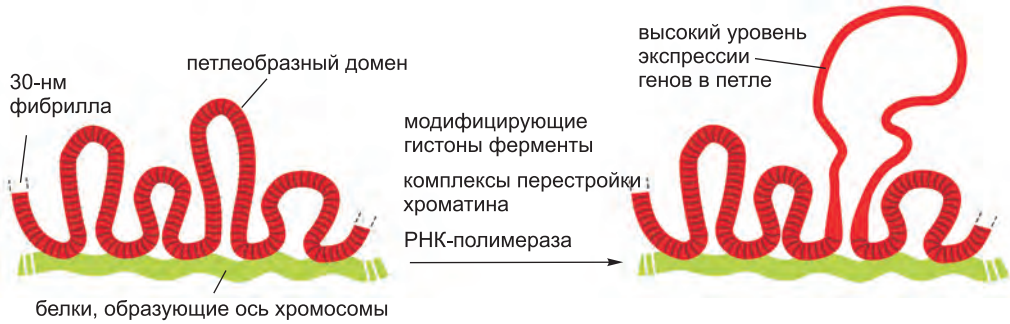


Рис. 4.57. Модель организации интерфазной хромосомы. Схематическое изображение участка интерфазной хромосомы, имеющего петлевую организацию. Каждый из петлеобразных доменов содержит, возможно, 50 000–200 000 пар нуклеотидов двойной спирали ДНК, конденсированной в 30-нм фибриллу. Хроматин в каждой отдельной петле еще более конденсирован благодаря пока еще недостаточно понятным процессам фолдинга, которые обращаются вспять, когда клетка требует прямого доступа к ДНК, упакованной в петле. Ни состав постулированной хромосомной оси, ни то, как свернутая 30-нм фибрилла закрепляется на ней, не ясны. Однако в митотических хромосомах основания хромосомных петель обогащены и конденсинами, и ферментами ДНК-топоизомеразы II — двумя белками, которые могут формировать во время метафазы большую часть оси (см. [рис. 4.74](#)).

4.4.2. Политенные хромосомы как ничто иное пригодны для демонстрации структур хроматина

Некоторые гигантские клетки насекомых выросли до своих огромных размеров за счет многократных циклов синтеза ДНК, не сопровождавшегося делением клетки. Такие клетки с комплементом ДНК, превышающим нормальный, являются, как говорят, *полиплоидными* и содержат повышенное число стандартных хромосом. Но у личинок мухи в секреторных клетках нескольких типов все гомологичные копии хромосом удерживаются бок о бок, подобно соломинкам для питья в коробке, и образуют отдельные крупные **политенные хромосомы**. Поскольку в некоторых случаях политенные хромосомы могут распасться и дать начало обычной полиплоидной клетке, эти два состояния хромосом близко связаны между собой. Поэтому внутренняя структура политенной хромосомы должна быть подобна таковой нормальной хромосомы.

Политения была лучше всего изучена в клетках слюнных желез личинок плодовой мушки дрозофилы. Когда такие политенные хромосомы рассматривают в световой микроскоп, заметны отдельные чередующиеся темные полосы, или *диски*, и светлые *междисковые участки* ([рис. 4.58](#)), каждый из которых образован из тысяч идентичных последовательностей ДНК, расположенных в ряд бок о бок. Приблизительно 95% ДНК в политенных хромосомах находится в дисках, а 5% — в междисковых промежутках. Очень тонкая полоса может содержать 3000 пар нуклеотидов, тогда как толстая полоса может содержать 200 000 пар нуклеотидов в каждой из своих хроматиновых нитей. Хроматин в каждом диске выглядит темным, потому что в них ДНК уплотнена сильнее, чем ДНК в междисковых участках; к тому же в диске может содержаться более высокая доля белков ([рис. 4.59](#)).

В полном наборе политенных хромосом дрозофилы насчитывается приблизительно 3700 полос и 3700 междисков. Полосы могут быть идентифицированы по их различной толщине и разным промежуткам в их взаимной разбивке, и каждой

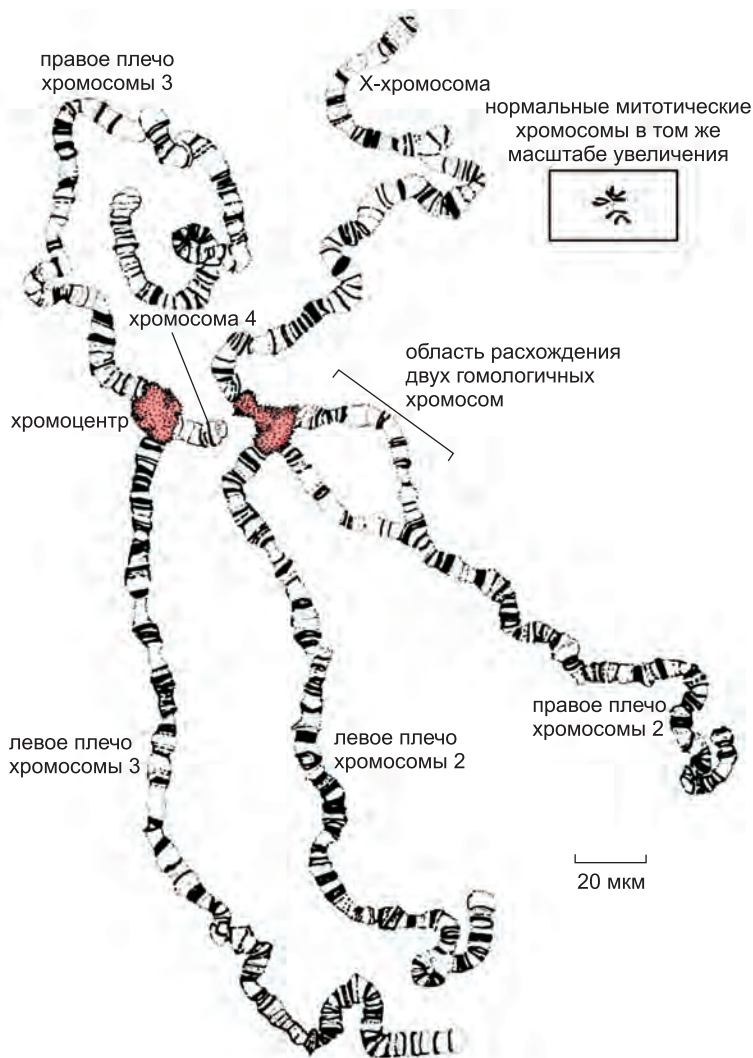


Рис. 4.58. Полный набор политенных хромосом из клетки слюнной железы *Drosophila melanogaster*.

На этой иллюстрации, полученной на световом микроскопе микрофотоснимка, гигантские хромосомы для большей наглядности расправлены на предметном стекле и прижаты покровным стеклом — «раздавлены». Дрозофила имеет четыре хромосомы, и четыре различные пары хромосом представлены. Но каждая хромосома крепко спарена со своим гомологом (так что каждая пара выглядит как единая структура), что не свойственно большинству ядер (разве только во время мейоза). Каждая хромосома подверглась многократным циклам репликации, и гомологи, а также все их дубликаты остались в точном строевом порядке друг с другом, в результате чего образовались огромные хроматиновые канаты, состоящие из множества нитей ДНК.

Все четыре политенные хромосомы обычно связаны друг с другом гетерохроматиновыми областями около своих центромер, которые объединяются и образуют единый большой хромосомный центр (розовая область). Однако в этом препарате хромосомный центр был раздроблен на две части при процедуре «раздавливания». (Переработано на основе T.S. Painter, *J. Hered.* 25: 465–476, 1934. С любезного разрешения издательства Oxford University Press.)

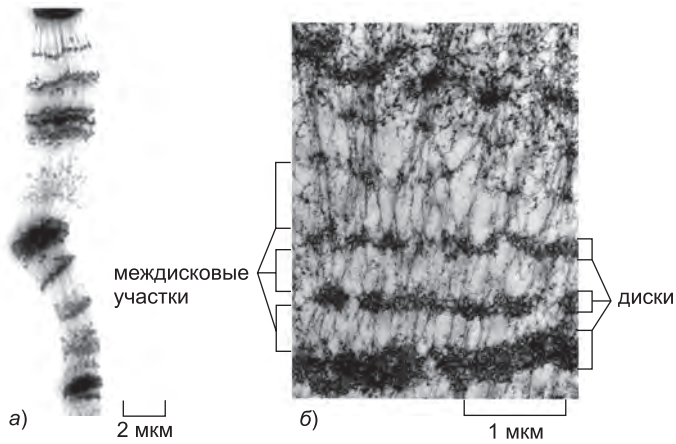


Рис. 4.59. Микрофотографии политенных хромосом в слюнных железах *Drosophila melanogaster*. *а*) Полученный на оптическом микроскопе микрофотоснимок участка хромосомы. ДНК была окрашена флуоресцентным красителем, но здесь представлено обращенное изображение, в котором *белые* участки ДНК выглядят *черными*; ясно видно, что диски являются областями повышенной концентрации ДНК. Эта хромосома была обработана при высоком давлении, чтобы отличающий ее профиль распределения полос и междисковых промежутков проявился более четко. *б*) Электронный микрофотоснимок маленького участка политенной хромосомы дрозофилы, наблюдаемого в тонком срезе. Легко различимы полосы, сильно отличающиеся по толщине и отделенные междисковыми промежутками, в которых хроматин находится в менее конденсированной форме. (Иллюстрация *а* переработана из D. V. Novikov, I. Kireev and A. S. Belmont, *Nat. Methods* 4: 483–485, 2007. С благосклонного разрешения Macmillan Publishers Ltd. Снимок *б* любезно предоставлен Veikko Sorsa.)

из них был присвоен номер, чтобы построить «карту» хромосом, которая была индексирована в соответствии с секвенированной последовательностью генома этой мухи.

Политенные хромосомы дрозофилы служат хорошей отправной точкой для изучения организации хроматина высокого уровня. В предыдущем параграфе мы увидели, что существует много форм хроматина и каждая из них содержит нуклеосомы с различной комбинацией модифицированных гистонов. В ходе считывания такого гистонного кода определенные наборы негистоновых белков собираются на нуклеосомах и влияют на биологическую функцию тем или иным образом. Некоторые из этих негистоновых белков могут распространяться по ДНК на значительные расстояния, сообщая подобную структуру хроматина соседним областям генома (см. [рис. 4.46](#)). Так, в некоторых областях весь хроматин имеет подобную структуру и отделен от соседних доменов барьерными белками (см. [рис. 4.47](#)). Поэтому при низком разрешении интерфазная хромосома может рассматриваться как чересполосица структур хроматина, каждая из которых содержит специфические модификации нуклеосом, сопряженные со специфическим набором негистоновых белков. (При более высоком уровне разрешения в глаза бросается множество специфичных к последовательности связывающихся с ДНК белков, которые будут описаны в главе 7).

Такая картина интерфазной хромосомы помогает нам интерпретировать результаты, полученные в ходе исследований политенных хромосом. Путем окрашивания высокоспецифичными антителами можно показать, что на разных дисках

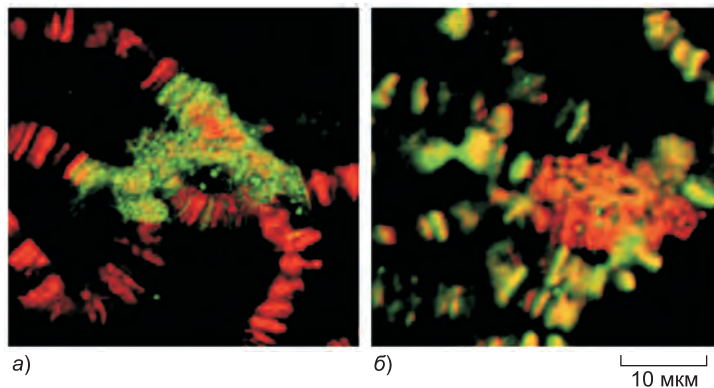


Рис. 4.60. Картина модификаций гистонов на политенных хромосомах *Drosophila melanogaster*. Антитела, которые специфично узнают различные модификации гистонов, могут указать местоположение каждой такой модификации среди множества дисков и междисковых промежутков на этих хромосомах. В двух показанных здесь препаратах сравниваются положения двух различных меток на хвостах гистона H3. В обоих случаях антитело, «пометившее» модифицированный гистон, окрашено *зеленым*, а ДНК — *красным*. Показана только маленькая область, окружающая хромоцентр. *а)* Диметиллизин 9 (*зеленый*) — модификация гистона, относящаяся к прицентромерному гетерохроматину. Как это видно, метка связана с хромоцентром. *б)* Ацетилированный лизин 9 (*зеленый*) — модификация, которая сосредоточена в гистонах, связанных с активными генами. Как видно, эта метка присутствует в многочисленных полосах на плечах хромосомы и отсутствует в гетерохроматиновом хромоцентре. Подобные эксперименты могут быть проведены с целью определения местоположения многих других модифицированных гистонов, а также негистоновых белков (см., например, на [рис. 22.45](#) хромосомы, окрашенные для идентификации белка Polycomb). (Переработано на основе A. Ebert, S. Lein, G. Schotta and G. Reuter, *Chromosome Res.* 14: 377–392, 2006. С любезного разрешения издательства Springer.)

политенных хромосом гистоны модифицированы по-разному ([рис. 4.60](#)), а также различны наборы негистоновых белков. Это наводит на мысль о мощной общей стратегии. Применяя сочетания антител, прочно связывающихся с соответствующими модификациями гистонов, которые создают гистонный код (см. [рис. 4.39](#)), можно определить, какие сочетания модификаций характерны для тех или иных типов хроматиновых доменов. А выполняя подобные эксперименты с антителами, которые узнают каждый из сотен различных негистоновых белков в хроматине,

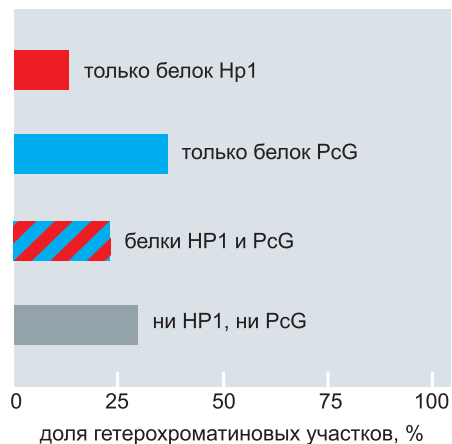
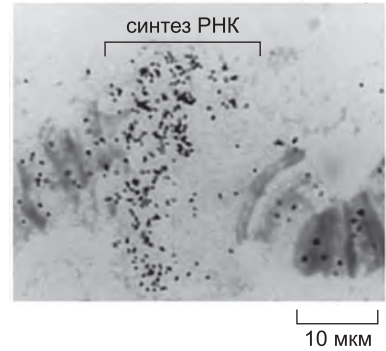


Рис. 4.61. Свидетельство в пользу существования множества форм гетерохроматина. В данном исследовании 240 поздно реплицируемых участков на плечах политенных хромосом дрозофилы изучили на предмет присутствия двух негистоновых белков. Известно, что эти белки способствуют компактизации двух различных форм гетерохроматина (см. текст). Как обозначено, окрашивание антителами предполагает, что примерно половина участков упакована в те формы гетерохроматина, которые отличаются от этих двух. Эксперименты наподобие этих демонстрируют, что мы знаем об упаковке ДНК эукариот гораздо меньше, чем нам еще предстоит узнать. (Данные заимствованы из I. F. Zhimulev and E. S. Belyaeva, *BioEssays* 25: 1040–1051, 2003. С любезного разрешения издательства John Wiley & Sons.)

Рис. 4.62. Синтез РНК в пучках политенных хромосом. Авторадиографический снимок отдельного пучка в политенной хромосоме из слюнных желез комара-звонца *C. tentans*. Как было упомянуто в главе 1 и будет подробно описано в главе 6, первый этап экспрессии гена — синтез молекулы РНК с использованием ДНК в качестве матрицы. На разуплотненном участке хромосомы происходит синтез РНК, которая метится ^3H -уридином (см. [стр. 603](#)) — молекулой РНК-предшественника, которая встраивается в растущие цепи РНК. (Снимок любезно предоставлен J. Bonner.)



можно попытаться расшифровать множество различных загадок, закодированных в модификациях гистонов.

4.4.3. Существует множество форм гетерохроматина

Молекулярные исследования привели к переоценке нашего взгляда на гетерохроматин. В течение многих десятилетий гетерохроматин представлялся единообразным веществом, для которого характерна сильно уплотненная (высококонденсированная) структура и которое способно перманентно «заглушать» гены. Но если мы определяем гетерохроматин как форму компактного хроматина, способную заглушать гены, наследоваться по эпигенетическому механизму и распространяться по хромосомам, чтобы вызывать мозаичный эффект положения (см. [рис. 4.36](#)), то становится ясно, что существуют различные типы гетерохроматина. Фактически мы уже рассмотрели три таких типа при обсуждении центромеры у человека (см. [рис. 4.50](#)).

Каждый домен гетерохроматина, как думают, образуется совместной сборкой

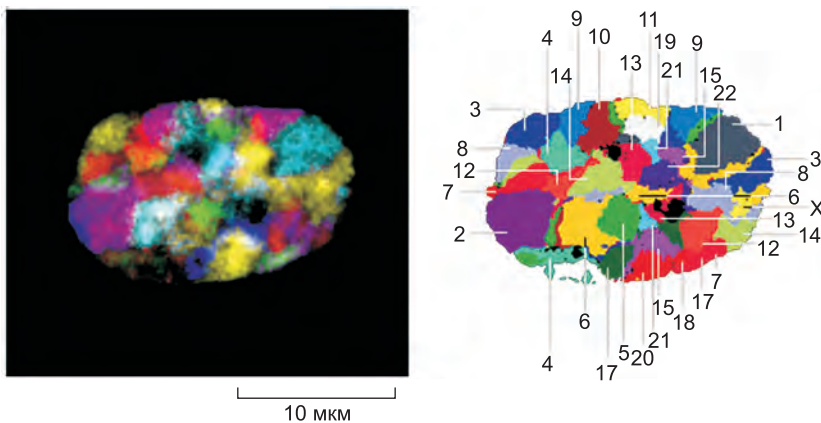


Рис. 4.63. Одновременное проявление хромосомных территорий всех хромосом человека в одном ядре на стадии интерфазы. Анализ FISH, в котором используется различная смесь флуорохромов для мечения ДНК каждой хромосомы. Детекция по семи цветовым каналам флуоресцентного микроскопа позволяет различить каждую хромосому в трехмерном измерении. Справа от микрофотографии каждая хромосома опознана на схеме действительного изображения. Обратите внимание, что две гомологичные хромосомы (например, две копии хромосомы 9), как правило, не располагаются парами. (Заимствовано из M. R. Speicher and N. P. Carter, *Nat. Rev. Genet.* 6: 782–792, 2005. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

набора негистоновых белков. Например, классический прицентромерный гетерохроматин содержит более шести таких белков, в том числе и гетерохроматиновый белок 1 (HP1), тогда как так называемая форма Polcomb гетерохроматина содержит подобное число белков из неперекрывающегося набора (белки PcG). Есть сотни маленьких блоков гетерохроматина, разбросанных по плечам политенных хромосом *Drosophila* и определенных по их поздней репликации (обсуждается в главе 5). Результаты окрашивания таких областей гетерохроматина антителами указывают на то, что известные формы гетерохроматина могут объяснить не более половины гетерохроматиновых политенных полос (рис. 4.61). Таким образом, должны существовать и другие типы гетерохроматина, белковый состав которых не известен. По всей вероятности, все эти типы гетерохроматина регулируются по-разному и играют различную роль в клетке.

Структура хроматина во всех доменах в конечном счете зависит от белков, которые связываются с определенными последовательностями ДНК и которые, как известно, изменяются в зависимости от типа клетки и стадии ее развития в многоклеточном организме. Таким образом, и картина распределения хроматиновых доменов, и их индивидуальный состав (модификации нуклеосом плюс негистоновые белки) могут быть различными в разных тканях. Эти различия делают разные гены доступными для генетического считывания и помогают объяснить рост многообразия клеток, который сопутствует развитию зародыша (описано в главе 22). Сравнения политенных хромосом в двух различных тканях мухи заложили основу этому общему представлению: хотя картины распределения дисков и междисковых участков в значительной степени одинаковы, есть воспроизводимые различия.

4.4.4. Петли хроматина становятся менее конденсированными во время экспрессии расположенных в них генов

Когда насекомое переходит из одной стадии развития в другую, в его политенных хромосомах возникают характерные вздутия, или *хромосомные пuffs*, а старые пuffs спадают, по мере того как новые гены начинают экспрессироваться, а старые выключаться (рис. 4.62). Осмотр каждого такого вздутия, когда оно является относительно маленьким и картина полосчатости все еще различима, показывает, что большинство вздутий появляется в результате деконденсации тех или иных хромосомных дисков.

Отдельные хроматиновые фибриллы, которые образуют пuff, можно наблюдать в электронный микроскоп.

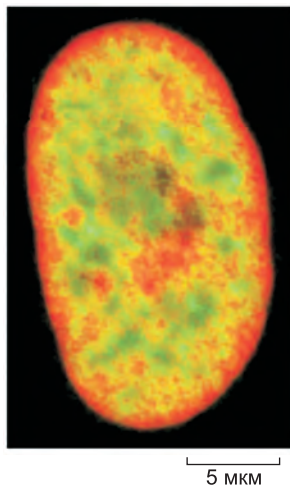


Рис. 4.64. Распределение богатых генами областей генома человека в интерфазном ядре. Детекцию богатых генами областей проводили с помощью флуоресцентного зонда, гибридного с рассеянным повтором Alu, который представлен более чем миллионом копий в геноме человека (см. рис. 5.75). По неизвестным причинам эти последовательности группируются в областях хромосом, богатых генами. На данной картине области, обогащенные последовательностями Alu — *зеленые*; области, обедненные этими последовательностями — *красные*, тогда как области с их средним содержанием — *желтые*. Как видно, ДНК вблизи ядерной оболочки «обделена» областями, обогащенными генами. (Займствовано из A. Bolzer et al., *PLoS Biol.* 3: 826–842, 2005. С разрешения Public Library of Science.)

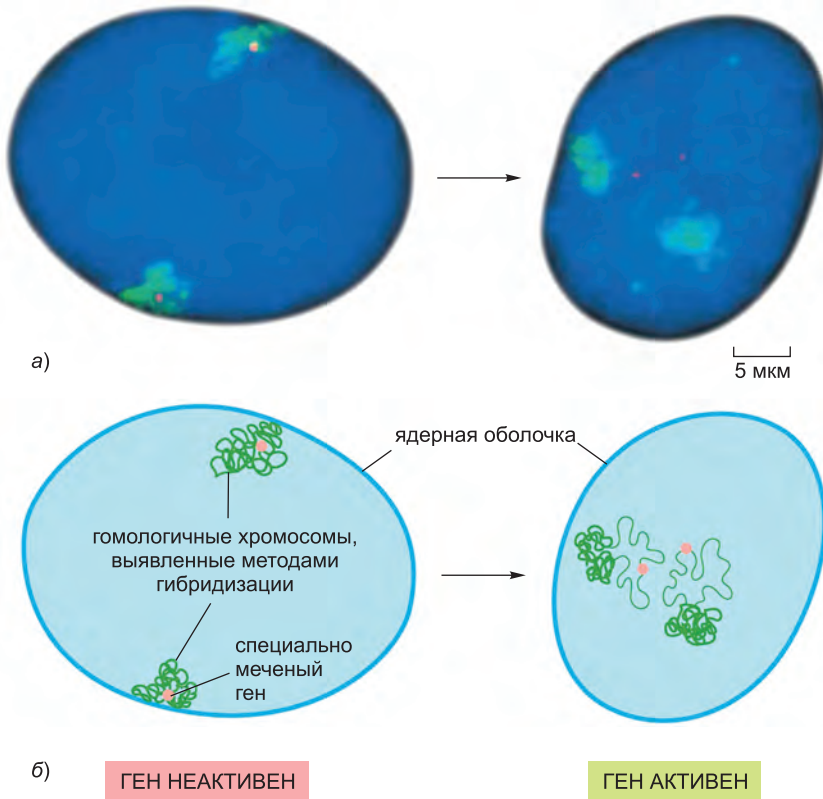


Рис. 4.65. Влияние высоких уровней экспрессии генов на внутриядерную местную локализацию хроматина. а) Флуоресцентные микрофотографии ядер клеток человека показывают, как положение гена изменяется, когда он начинает эффективно транскрибироваться. Область хромосомы, смежная с геном (*красный*), как заметно, покидает свою хромосомную территорию (*зеленую*) только тогда, когда ген высоко активен. б) Схематичное представление большой петли хроматина, которая разворачивается, когда ген «включен», и стягивается, когда этот ген «выключен». Как показывают те же самые методы, остальные гены, которые экспрессируются менее активно, остаются на своей хромосомной территории во время транскрипции. (Заимствовано из J. R. Chubb and W. A. Bickmore, *Cell* 112: 403–406, 2003. С любезного дозволения издательства Elsevier.)

В благоприятных случаях заметны петли, во многом напоминающие наблюдаемые в хромосомах типа ламповых щеток, свойственных земноводным, о которых было сказано раньше. В отсутствие экспрессии петля ДНК принимает утолщенную структуру, возможно, свернутой 30-нм фибриллы, но когда происходит экспрессия гена, петля растягивается. На полученных с помощью электронной микроскопии фотографиях хроматин, расположенный по обе стороны от деконденсированной петли, кажется значительно более компактным, а это предполагает, что петля представляет собой обособленный функциональный домен структуры хроматина.

Наблюдения, сделанные при исследовании клеток человека, также позволяют предположить и то, что плотно свернутые петли хроматина расширяются, как бы стараясь занять больший объем, когда находящийся в них ген экспрессируется. Например, находящиеся в состоянии покоя области хромосомы протяженностью

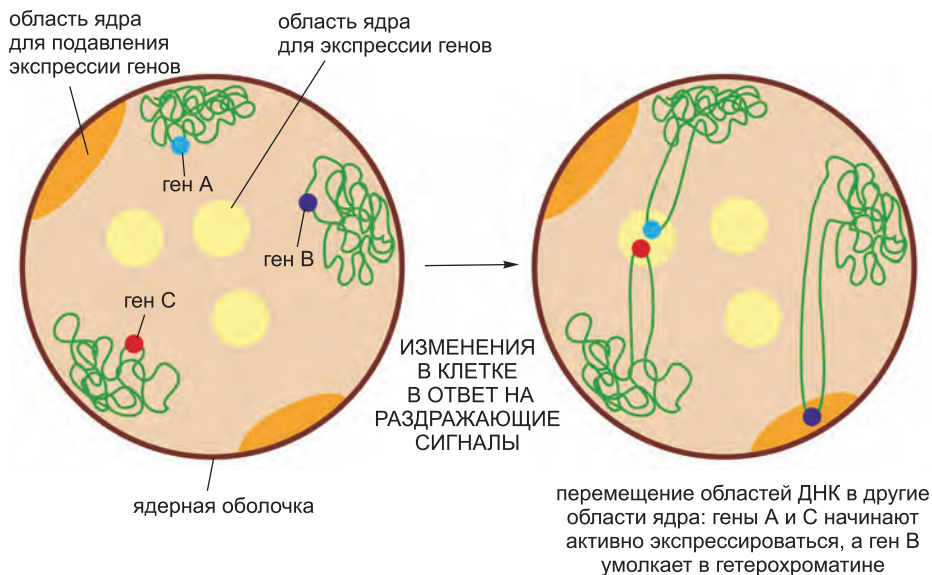


Рис. 4.66. Перемещение генов в различные области ядра при изменении уровней их экспрессии. Внутреннее пространство ядра весьма разнородно, и различные внутриядерные области, как известно, оказывают различное воздействие на экспрессию генов. Перемещения наподобие показанных на данном рисунке предположительно отражают изменения в средстве связывания между хроматином и молекулами РНК, окружающими ген, с различными внутриядерными областями. Похоже, что такое движение происходит за счет диффузии и не требует регуляции направления движения, поскольку каждая область хромосомы, будучи помечена способом, позволяющим отслеживать ее положение в живой клетке, как можно наблюдать, претерпевает постоянное беспорядочное движение.

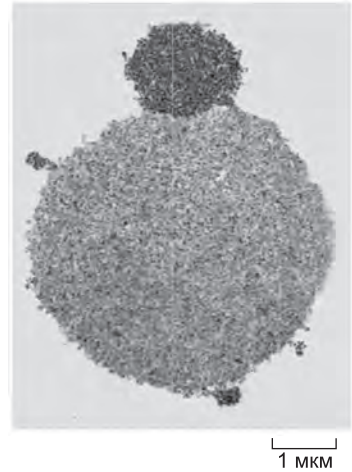
от 0,4 до 2 миллионов пар нуклеотидов в длину имеют вид компактных крапин в интерфазном ядре, когда их наблюдают с помощью флуоресцентной микроскопии с применением FISH или иных технологий. Однако та же самая ДНК, согласно наблюдениям, занимает большую территорию, когда ее гены экспрессируются, при этом первоначальной точкой на смену приходят продолговатые крапчатые структуры.

4.4.5. Хроматин способен перемещаться в особые участки ядра, чтобы варьировать в них экспрессию генов

Новые способы визуализации отдельных хромосом показали, что каждая из 46 интерфазных хромосом в клетке человека, как правило, занимает свою собственную обособленную территорию в пределах ядра (рис. 4.63). Однако картины наподобие изображенной на этом рисунке дают лишь среднестатистический взгляд на распределение ДНК в каждой хромосоме. Эксперименты, которые определяют местоположение определенных областей гетерохроматина в хромосоме, показывают, что часто они бывают тесно связаны с ядерной пластинкой, независимо от того, какую из хромосом мы наблюдаем. А ДНК-зонды, которые предпочтительно окрашивают богатые генами области хромосом человека, дают поразительную картину интерфазного ядра, которая предположительно отражает различные среднестатистические позиции активных и неактивных генов (рис. 4.64).

Разнообразие проведенных экспериментов различных типов позволило прийти

Рис. 4.67. Электронный микрофотоснимок, на котором показаны два распространенных фибриллярных ядерных субкомпартамента. Большой из представленных на рисунке шаров — тельце Кахаля. Маленький, более темный шар — скопление гранул промежуточного хроматина, которое называется крапинкой (см. также [рис. 6.49](#)). Эти «субъядерные органеллы» засняты в ядре ооцита *Xenopus*. (Заимствовано из К. Е. Handwerger and J. G. Gall, *Trends Cell Biol.* 16: 19–26, 2006. С любезного разрешения издательства Elsevier.)



к заключению, что положение гена внутри ядра изменяется, когда начинается его интенсивная экспрессия. Таким образом, область, которая становится интенсивно транскрибируемой, как часто находят, простирается за пределы своей хромосомной территории, как это имеет место в расширившейся петле ([рис. 4.65](#)). В главе 6 мы увидим, что запуск транскрипции — первый шаг в процессе экспрессии гена — требует сборки более чем 100 белков, и кажется вполне разумным, что она будет проис-



Рис. 4.68. Эксперимент, который показывает, что субъядерные органеллы хорошо проницаемы для макромолекул. На этих микрофотографиях представлены ядра живого ооцита: в верхнем ряду сравнивается флуоресценция внутренних пространств ядрышек, телец Кахаля и крапинок с флуоресценцией окружающей нуклеоплазмы — спустя 12 часов после того, как флуоресцентные декстраны отмеченной молекулярной массы были введены в нуклеоплазму. Яркость каждой органеллы отражает ее проницаемость, при этом наиболее проницаемая органелла — самая яркая. Для сравнения в нижнем ряду представлены полученные на обычном световом микроскопе микрофотографии тех же самых препаратов, при этом ядрышко на каждом поле выделено *коричневым цветом*. Тельца Кахаля, как можно видеть, более проницаемы, чем ядрышки. Однако количественный анализ показывает, что во все органеллы поступает большая доля декстрана, что относится и к наиболее крупным его молекулам. (Заимствовано из К. Е. Handwerger, J. A. Cordero and J. G. Gall, *Mol. Biol. Cell* 16: 202–211, 2005. С любезного разрешения American Society of Cell Biology.)

ходить наиболее быстро в тех областях ядра, которые обогащены этими белками в наибольшей степени.

В более общем виде перед нами предстает картина весьма неоднородного ядра, состоящего из различных в функциональном отношении областей, в которые части хромосом могут перемещаться, по мере того как в них протекают различные биохимические процессы, например, при изменении уровней экспрессии расположенных в них генов (рис. 4.66). Есть данные, что некоторые из таких ядерных областей помечены различными инозитфосфолипидами, что напоминает способ, которым те же липиды используются для обозначения отличий различных мембран в цитоплазме (см. рис. 13.11). Но к чему эти липиды прикрепляются внутри ядра — тайна, поскольку единственные известные обогащенные липидами среды — липидные бислои ядерной оболочки.

4.4.6. Сети макромолекул образуют набор различных биохимических сред внутри ядра

В главе 6 мы описываем функцию разнообразных субкомпарментов, которые существуют внутри ядра. Наиболее крупным и наиболее заметным из них является ядрышко — структура, уже в XIX столетии хорошо известная исследователям, использовавшим микроскопы (см. рис. 4.9). Области ядрышка состоят из об-

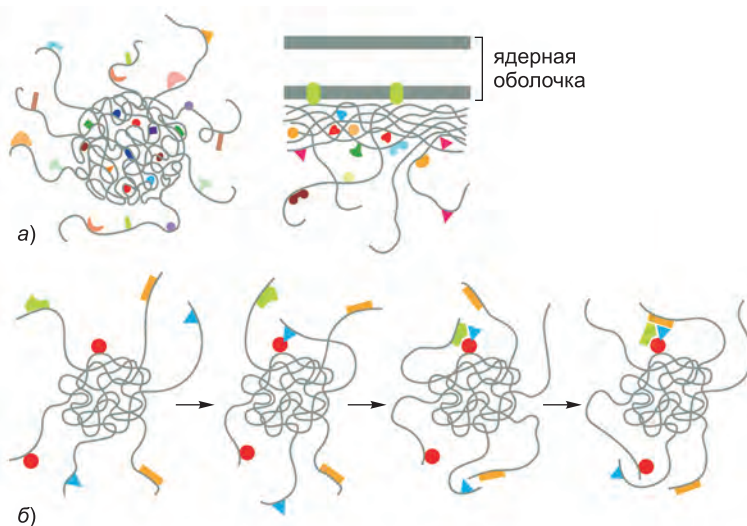
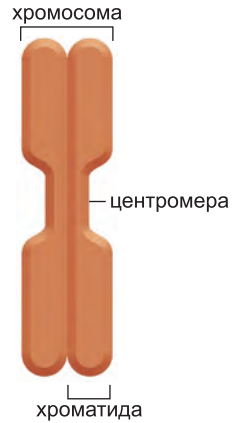


Рис. 4.69. Эффективная компартментализация без двухслойной мембраны. а) Схематическая иллюстрация организации шарообразной субъядерной органеллы (слева) и гипотетического компартмента с подобной организацией, расположенного сразу под оболочкой ядра (справа). В обоих случаях молекулы РНК и (или) белков (серые) объединяются с образованием высокопористых гелеобразных структур, которые содержат участки связывания для других специфических молекул белков и РНК (разноцветные объекты). б) Показано, как связывание выбранного набора молекул белков и РНК с длинными гибкими полимерными цепями, как в а, может формировать «плацдарм», на котором созданы все условия для ускорения реакций в компартментах ядра. Тип катализируемых реакций будет зависеть от специфических макромолекул, которые сосредоточиваются на этих участках. Конечно, ожидается, что в подобных компартментах всех остальных областей клетки реакции ускорятся таким же способом (см. также рис. 3.80, в).

Рис. 4.70. Типичная митотическая хромосома в метафазе. Каждая из сестринских хроматид содержит одну из двух идентичных дочерних молекул ДНК, созданных ранее в клеточном цикле путем репликации ДНК (см. также [рис. 17.26](#)).

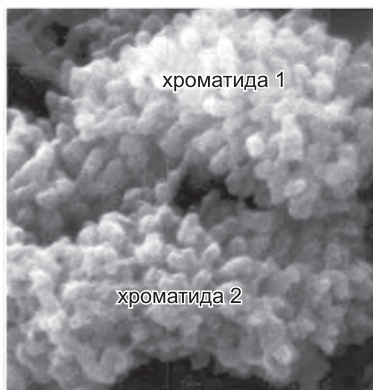


разованных молекулами РНК и белков сетей, окружающих транскрибируемые гены рибосомной РНК, и часто существуют в виде множественных ядрышек. Ядрышко представляет собой участок клетки для сборки и созревания рибосом, а также место протекания множества иных специализированных реакций.

В ядре присутствует также огромное разнообразие менее заметных органелл. Например, в большинстве растительных и животных клеток присутствуют шарообразные структуры, называемые тельцами Кахалья, и скопления гранул промежуточного хроматина ([рис. 4.67](#)). Подобно ядрышку, эти органеллы состоят из определенных молекул белка и РНК, что связываются друг с другом и образуют сети, которые являются хорошо проницаемыми для других молекул белка и РНК, взвешенных в окружающей нуклеоплазме ([рис. 4.68](#)).

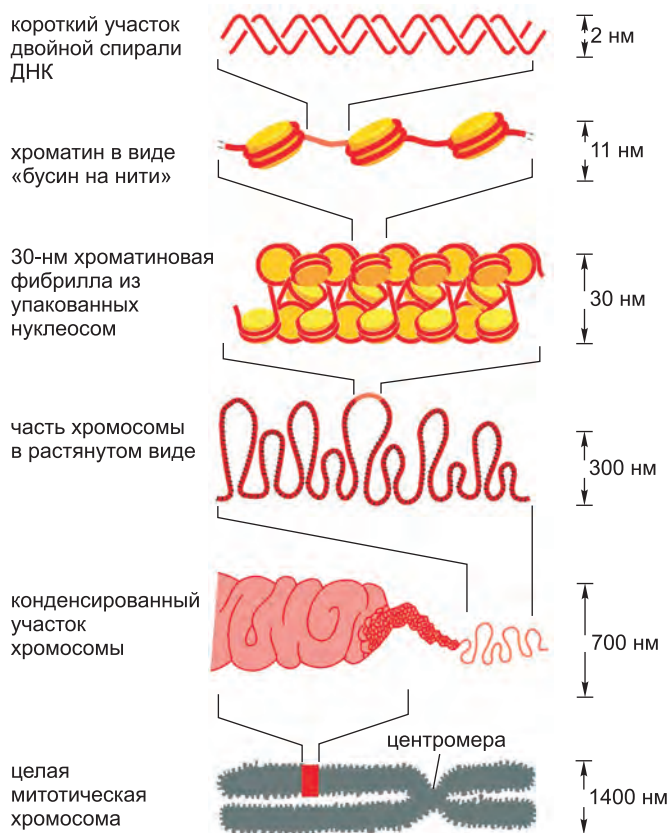
Структуры наподобие этих могут создавать различные биохимические среды путем обездвиживания избранных групп макромолекул, как это могут делать и другие сети из молекул белков и РНК, связанные с ядерными порами и ядерной оболочкой. В принципе, это позволяет с большой эффективностью преобразовывать молекулы, которые входят в эти пространства и поступают в подготовленные для них сложные пути прохождения реакций. Высокопроницаемые волокнистые сети такого вида, отделяя пространство реакции (см. [стр. 186](#)), проходящей в ядре, могут таким образом обеспечивать многие кинетические преимущества ([рис. 4.69, а](#)). Однако, в отличие от охваченных мембранами полостей в цитоплазме (обсуждаем в главе 12), такие ядерные субполости — не имеющие мембраны из двойного липидного слоя, — не могут ни концентрировать, ни исключать определенные маленькие молекулы.

Клетка имеет замечательную способность создавать или даже обустроить различные биохимические среды внутри ядра. Известные к настоящему времени данные облегчают понимание различных аспектов экспрессии генов, о чем мы поговорим в главе 6 (см. [рис. 6.49](#)). Подобно ядрышку, такие субполости, кажется, образуются только в случае необходимости и обеспечивают высокую локальную концентрацию множества различных ферментов и молекул РНК, необходимых для протекания конкретного процесса. Аналогичным образом, после повреждения ДНК



0,1 мкм

Рис. 4.71. Полученный растровой электронной микроскопией снимок области вблизи одного из концов типичной митотической хромосомы. Каждое узловидное выпячивание, как полагают, представляет собой кончик отдельного петельного домена. Обратите внимание, что на снимке отчетливо просматриваются две идентичные спаренные хроматиды (изображенные на [рис. 4.70](#)). (Займствовано из М. Р. Marsden and U. K. Laemmli, *Cell* 17: 849–858, 1979. С любезного разрешения издательства Elsevier.)



В ИТОГЕ: КАЖДАЯ МОЛЕКУЛА ДНК УПАКОВЫВАЕТСЯ В ФОРМУ МИТОТИЧЕСКОЙ ХРОСОМОМЫ И СТАНОВИТСЯ В 10 000 РАЗ КОРОЧЕ СВОЕГО РАЗВЕРНУТОГО СОСТОЯНИЯ

Рис. 4.72. Упаковка хроматина. Эта модель показывает некоторые из многочисленных гипотетических уровней упаковки хроматина, обуславливающих образование плотноупакованной митотической хромосомы.

облучением, наблюдается скопление ряда ферментов, необходимых для осуществления репарации ДНК, в обособленных центрах (очагах) в ядре, которые таким образом превращаются в своего рода «ремонтные заводы» (см. [рис. 5.60](#)). Вообще, ядра часто содержат сотни обособленных центров, представляющих собой «фабрики синтеза» РНК или ДНК.

По всей вероятности, все такие образования устроены по типу «связки», иллюстрируемому на [рис. 4.69, б](#), согласно которому длинные гибкие участки полипептидной цепи (или некоторого другого полимера) перемежаются с участками

связывания, на которых концентрируются многочисленные молекулы белков и (или) РНК, которые необходимы для катализа определенного процесса. Неудивительно, что такого рода связки, увеличивая скорости определенных реакций (например, см. [рис. 16.38](#)), используются клеткой для ускорения биологических процессов в цитоплазме.

Не существует ли некая внутриядерная структура, аналогичная клеточному скелету, на которой закреплены хромосомы и другие компоненты ядра? *Ядерный матрикс*, или *скелет* (scaffold), определяется как нерастворимый материал, остающийся в ядре после ряда биохимических операций. Многие из молекул белка и РНК, образующих этот нерастворимый материал, вероятно, ведут свое начало из недавно описанных фибриллярных компартментов ядра, тогда как другие имеют признаки белков, которые помогают формировать основу хромосомных петель или прикреплять хромосомы к другим структурам в ядре. Вопрос о том, имеются ли в ядре также и длинные нити, филаменты, образующие организованные пути, по которым компоненты ядра могут передвигаться — аналогичные тем, какие есть в цитоплазме, — все еще до конца не решен.

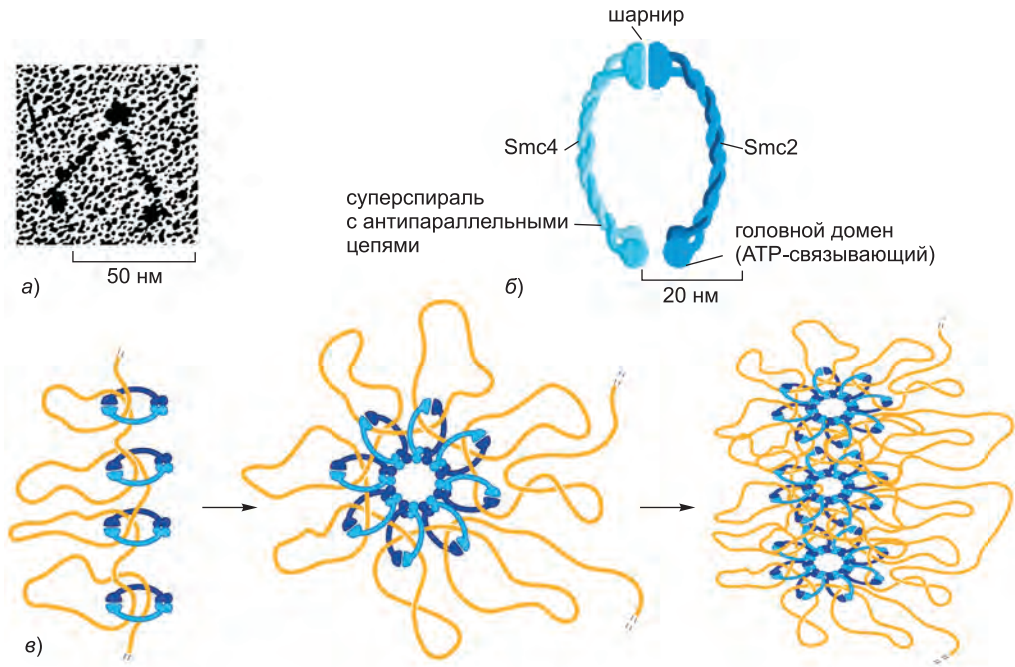


Рис. 4.73. SMC-белки в конденсинах. а) Электронные микрофотографии очищенного SMC-димера. б) Структура SMC-димера. Длинная центральная область этого белка представлена суперспиралью, состоящей из двух антипараллельных биспиралей (см. рис. 3.9) с подвижным шарниром посередине. в) Модель механизма, который SMC-белки в конденсинах могут использовать для компактизации хроматина. В действительности SMC-белки являются компонентами намного более крупного конденсинового комплекса. Было высказано предположение о том, что в клетке конденсины «смаывают» длинные нити петельных хроматиновых доменов (см. рис. 4.57). Таким образом, конденсины могли бы формировать несущий каркас, который поддерживает ДНК в высокоорганизованном состоянии в течение метафазы клеточного цикла. (Изображение а любезно предоставлено G. P. Erickson; изображения б и в переработаны из T. Hirano, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 311–322, 2006. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

4.4.7. Митотические хромосомы образованы из хроматина в его наиболее конденсированном состоянии

Обсудив динамичную структуру интерфазных хромосом, мы можем обратиться к митотическим хромосомам. Во время митоза хромосомы почти всех ядерных клеток становятся хорошо заметными в световой микроскоп, когда скручиваются в чрезвычайно уплотненные структуры. Такое уплотнение уменьшает длину типичной интерфазной хромосомы лишь десятикратно, но разительно изменяет облик хромосомы.

На рис. 4.70 изображена типичная митотическая хромосома на этапе метафазы митоза (стадии митоза представлены на рис. 17.3). Две молекулы дочерней ДНК, рожденные в ходе репликации ДНК во время интерфазы цикла деления клетки, по отдельности сворачиваются и образуют две сестринские хромосомы, или *сестринские хроматиды*, скрепленные друг с другом по центромерам (см. также рис. 4.50). Такие хромосомы обычно покрыты разнообразными молекулами,

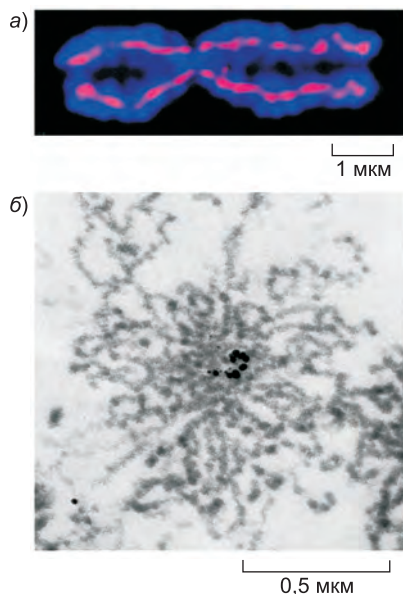


Рис. 4.74. Местоположение конденсина в сжатых митотических хромосомах. *а)* Полученный при помощи флуоресцентной микроскопии снимок хромосомы человека во время митоза, окрашенной антителом, которое выявляет местоположение конденсина. В хромосомах, которые столь высоко уплотнены, конденсин, как видно, сосредоточен в точечных структурах, расположенных на оси хромосомы. В подобных экспериментах показано, что аналогичное местоположение занимает и ДНК-топоизомераза II — фермент, который производит обратимые двунитевые разрезы в ДНК, что позволяет одной двойной спирали ДНК проходить через другую (см. [рис. 5.23](#)). *б)* Иммунозолотая электронная микроскопия показывает местоположение конденсина (*черные точки*). Здесь хроматида наблюдается в поперечном срезе, то есть ось хромосомы перпендикулярна плоскости бумаги. (Изображение *а* заимствовано из К. Maeshima and U. K. Laemmli, *Dev. Cell* 4: 467–480, 2003. С любезного разрешения издательства Elsevier. Изображение *б* любезно предоставлено U. K. Laemmli, опубликовано в К. Maeshima, M. Eltsov and U. K. Laemmli, *Chromosoma* 114: 365–375, 2005. С любезного разрешения издательства Springer.)

в том числе большим количеством РНК-белковых комплексов. После удаления этого покрова на электронных микрофотографиях видно, что каждая хроматида организована в петли хроматина, отходящие от центрального каркаса ([рис. 4.71](#)). Эксперименты с использованием гибридизации ДНК для обнаружения специфических последовательностей ДНК показывают, что порядок видимых структурных особенностей по длине митотической хромосомы по крайней мере грубо отражает порядок генов на молекуле ДНК. Таким образом, конденсацию митотической хромосомы можно рассматривать как заключительный уровень в иерархии упаковки хромосомы ([рис. 4.72](#)).

Компактизация хромосом во время митоза — высокоорганизованный и динамичный процесс, который служит по крайней мере двум важным целям. Во-первых, когда конденсация завершена (в метафазу), сестринские хроматиды «развязываются» и просто пребывают рядом. Таким образом, сестринские хроматиды могут легко отделиться, когда митотический аппарат начинает разводить их в разные стороны. Во-вторых, компактность хромосом предохраняет относительно хрупкие молекулы ДНК от разрыва, когда их растягивают по обособляющимся дочерним клеткам.

Конденсация интерфазных хромосом в митотические хромосомы начинается в ранней М-фазе и теснейшим образом сопряжено с протеканием клеточного цикла, о чем будет подробно рассказано в главе 17. Во время М-фазы экспрессия генов прекращается и над гистонами производятся специфические модификации, способствующие реорганизации хроматина при его уплотнении. В компактизации хроматина участвует класс белков, названных *конденсинами*, которые используют энергию гидролиза АТФ для осуществления спирализации обеих молекул ДНК интерфазной хромосомы и образования пары хроматид митотической хромосомы. Конденсины представляют собой крупные белковые комплексы, построенные из белковых димеров SMC: эти димеры образуются, когда два жестких продолго-

ватых белковых мономера соединяются своими «хвостами» и образуют шарнир, оставляя два шаровидных «головных» домена на другом конце — они связывают ДНК и гидролизуют АТФ (рис. 4.73). Будучи добавленными к очищенной ДНК, конденсины могут формировать крупные правосторонние петли в молекулах ДНК за счет реакции, которая требует АТФ. Хотя еще не известно, как они воздействуют на хроматин, модель «скручивания в кольцо», представленная на рис. 4.73, в, основана на том факте, что конденсины выступают главным структурным компонентом, который в конечном счете оказывается в стержне метафазных хромосом; при этом одна молекула конденсина приходится приблизительно на каждые 10 000 нуклеотидов ДНК (рис. 4.74). Когда конденсины экспериментально удаляются из клетки, уплотнение хромосомы по-прежнему происходит, но сам процесс идет неправильно.

Заключение

Хромосомы, как правило, разуплотнены во время интерфазы, так что особенности их структуры трудно зрительно отобразить. Известные исключения — специализированные хромосомы типа ламповых щеток в ооцитах позвоночных и политенные хромосомы в гигантских секреторных клетках насекомых. Исследования этих двух типов интерфазных хромосом предполагают, что каждая длинная молекула ДНК в хромосоме разделена на большое число обособленных доменов, организованных в виде петель хроматина, при этом каждая петля, вероятно, состоит из 30-нм хроматиновой фибриллы, которая компактизуется дальнейшей укладкой. Когда гены, содержащиеся в петле, экспрессируются, петля разворачивается и стягивается, что позволяет внутриклеточным машинам добраться до ДНК.

Интерфазные хромосомы занимают дискретные территории в ядре клетки; то есть они особо не переплетаются друг с другом. Большую часть интерфазных хромосом составляет эухроматин и, когда он не транскрибируется, вероятно, существует в виде плотно свернутой 30-нм фибриллы. Однако эухроматин прерывается участками гетерохроматина, где 30-нм фибриллы подвергнуты дополнительной упаковке, которая обычно придает им устойчивость к экспрессии генов. Гетерохроматин существует в нескольких формах, и некоторые из них располагаются в виде крупных блоков в центромерах и вокруг них, а также около теломер. Но гетерохроматин присутствует также и во многих других позициях хромосом, где он может выполнять задачу регулирования важных для развития организма генов.

Внутренняя среда ядра весьма динамична, причем гетерохроматин, часто размещенный вблизи оболочки ядра и петля хроматина, «выходит» за пределы территории на хромосоме, когда гены очень интенсивно экспрессируются. Это отражает существование ядерных компартментов, в которых протекание различных наборов биохимических реакций облегчается благодаря повышенной концентрации соответствующих молекул белков и РНК. Компоненты, участвующие в образовании компартмента, способны к самосборке в отдельные органеллы, такие как ядрышки или тельца Кахаля; они могут также быть прикреплены к стационарным структурам, таким как ядерная оболочка.

Во время митоза экспрессия генов приостанавливается, и все хромосомы принимают высококонденсированную конформацию в ходе процесса, который начинается в ранней М-фазе и обеспечивает упаковку двух молекул ДНК каж-

дой реплицированной хромосомы в виде двух отдельно свернутых хроматид. Этот процесс сопровождается модификациями гистонов, которые облегчают упаковку хроматина. Однако удовлетворительный исход этого упорядоченного процесса, который уменьшает линейные размеры всех молекул ДНК по сравнению с длиной их интерфазных форм еще в десять раз, возможен лишь в присутствии белков конденсинов.

4.5. Пути эволюции геномов

В этой главе мы рассмотрели структуру генов и способы их упаковки и обустройства в хромосомах. В этом заключительном параграфе мы приводим краткий обзор некоторых путей, которыми гены и геномы эволюционировали с течением времени и породили богатое разнообразие современных форм жизни на нашей планете. Секвенирование геномов произвело переворот в нашем понимании процесса молекулярной эволюции, раскрыв удивительное богатство информации о специфических семейственных узлах среди организмов, а так же осветив эволюционные механизмы в более широком ракурсе.

Возможно, нет ничего удивительного в том, что гены с подобными функциями можно встретить у самых разных живых существ. Но величайшим откровением за последние 25 лет стало открытие, что фактические нуклеотидные последовательности многих генов достаточно хорошо сохраняются со временем, так что **гомологичные** гены — то есть гены, которые являются подобными как в отношении их нуклеотидной последовательности, так и в плане их функции в силу происхождения от общего предка, — могут нередко быть идентифицированы, несмотря на огромные филогенетические расстояния. Например, несомненные гомологи многих генов человека легко обнаружить в таких организмах, как червь нематоды, плодовая мушка, дрожжи и даже бактерии. Во многих случаях сходство настолько близкое, что кодирующую белок часть гена дрожжей можно заменить ее гомологом от человека, при том что нас от дрожжей отделяет более миллиарда лет эволюции.

Как подчеркивалось в главе 3, распознавание подобия последовательностей стало главным инструментом для установления функции гена и белка. И хотя совпадение последовательностей не гарантирует подобия их функций, оно оказывается превосходным ключом к установлению функций. Таким образом, функцию тех генов человека, о которых не имеется никакой биохимической или генетической информация, часто возможно предсказать путем простого сравнения их нуклеотидных последовательностей с последовательностями соответствующих генов других организмов.

Вообще, последовательности генов более консервативны, чем структура генома в целом. Как мы видели ранее, другие особенности организации генома, такие как размер генома, число хромосом, порядок расположения генов по длине хромосом, обилие и размер интронов, а также количество повторов ДНК, как оказалось, сильно отличаются у разных организмов, как и число генов, имеющих в распоряжении особи того или иного вида.

Число генов лишь очень слабо согласуется с фенотипической сложностью организма (см. таблицу 1.1). Значительная часть увеличения числа генов, наблюдаемого с возрастанием биологической сложности, приходится на расширение семейств близкородственных генов — наблюдение, которое ставит дубликацию и расхождение генов на место главных эволюционных процессов. И в самом деле,

весьма вероятно, что все ныне существующие гены являются потомками — через процессы дупликации, расхождения и перераспределения сегментов гена — нескольких предковых генов, которые имелись в наличии у первых форм жизни.

4.5.1. Изменения генома вызваны сбоями нормальных механизмов копирования и поддержания ДНК

Клетки в зародышевой линии не имеют специализированных механизмов для внесения изменений в структуру своих геномов: вместо этого, эволюция зависит от аварий и ошибок, сопровождаемых обусловленной выживаемостью организмов. Большинство происходящих генетических изменений является всего лишь результатом отказов в функционировании нормальных механизмов, при помощи которых геномы копируются или восстанавливаются при повреждении, хотя перемещение элементов подвижной ДНК также играет заметную роль в этом деле. Как мы будем говорить в главе 5, механизмы, которые поддерживают последовательности ДНК, удивительно точны — однако они не совершенны. Например, благодаря сложным устройствам механизмов репликации ДНК и систем репарации ДНК, клетки могут передавать последовательности ДНК по наследству с невероятной точностью, и в одной линии родословной примерно только одна из тысячи пар нуклеотидов зародышевой линии изменяется случайным образом за каждый миллион лет. Даже в таком случае в популяции из 10 000 диплоидных особей каждая возможная замена нуклеотидов будет «опробована» приблизительно в 20 случаях на протяжении миллиона лет — короткий промежуток времени в масштабе эволюции видов.

Ошибки при репликации ДНК, рекомбинации ДНК или репарации ДНК могут вести или к простым изменениям в последовательности ДНК — типа замены одной пары оснований на другую, или к крупномасштабным перестройкам генома — типа делеций, дупликаций, инверсий и транслокаций ДНК из одной хромосомы в другую. Вдобавок к такого рода сбоям в генетических машинах важным источником изменения генов выступают различные элементы подвижной ДНК, которые будут описаны в главе 5 (см. таблицу 5.3, **стр. 318**). Такие подвижные элементы ДНК

Рис. 4.75. Филогенетическое дерево, показывающее отношения родства между человеком и человекообразными обезьянами, установленные на основании данных сравнения нуклеотидных последовательностей. Как отмечено, последовательности геномов всех четырех видов, по оценкам, отличаются от последовательности генома их последнего общего предка немногим более чем на 1,5%. Поскольку изменения происходят независимо в обеих расходящихся линиях родословной, постольку попарные сравнения показывают вдвое более сильное расхождение последовательностей от последнего общего предка. Например, сравнение человек–орангутан обычно дает расхождение последовательностей немногим более 3%, тогда как сравнение человек–шимпанзе показывает расхождение приблизительно 1,2%. (Переработано из F. C. Chen and W. H. Li. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 444–456, 2001. С любезного разрешения University of Chicago Press.)



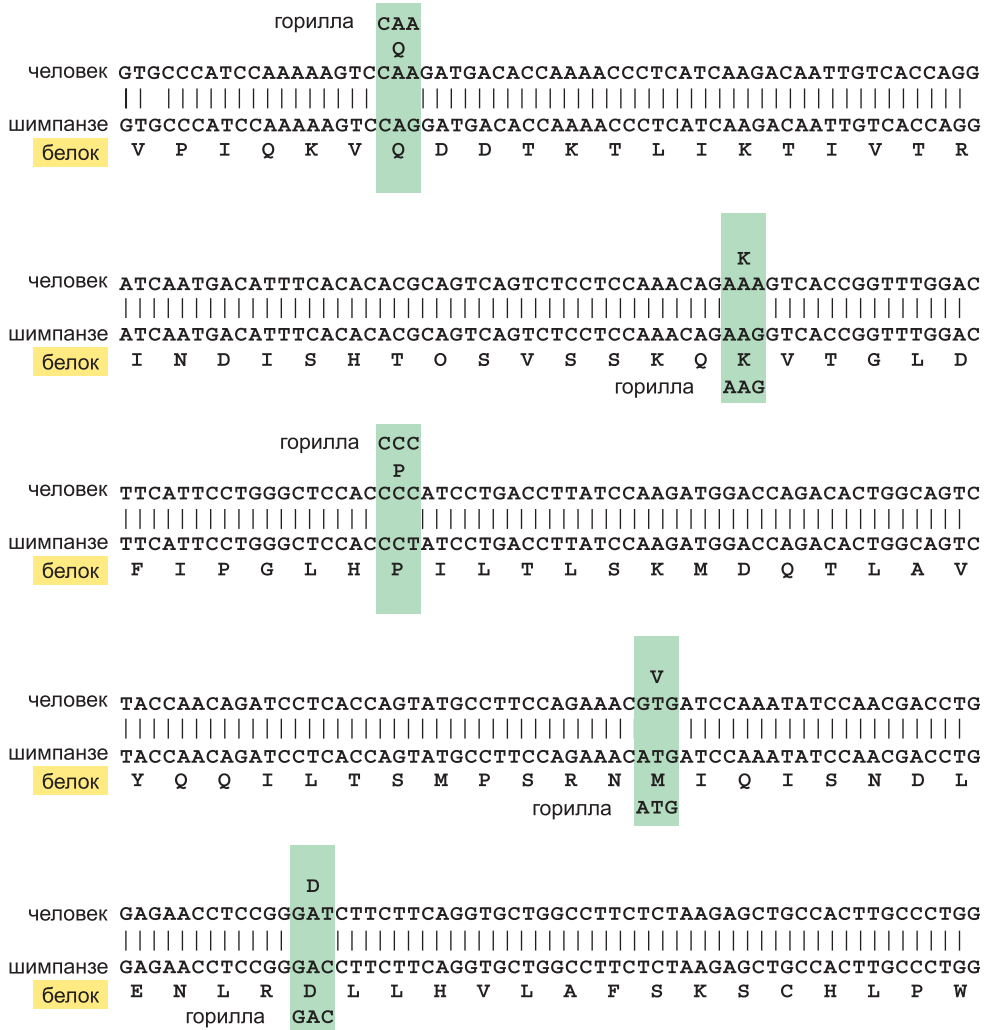


Рис. 4.76. Прослеживание предковой последовательности по данным сравнения последовательностей кодирующих областей генов лептина человека и шимпанзе. Лептин — гормон, который регулирует усвоение пищи и использование энергии в ответ на адекватность запасов жира. Как обозначено кодонами, помещенными в зеленые области, только по 5 нуклеотидам (из общего числа 441) отличаются между собой эти две последовательности. Более того, при анализе кодируемых этими нуклеотидными последовательностями аминокислотных последовательностей оказывается, что последовательности лептина человека и шимпанзе отличаются только в одной из этих 5 позиций. Для каждой из 5 различных нуклеотидных позиций обозначена также соответствующая последовательность у гориллы. В двух случаях последовательность гориллы согласуется с последовательностью человека, тогда как в трех случаях она согласуется с последовательностью шимпанзе.

Какова же была последовательность гена лептина у последнего общего предка? Эволюционная модель, которая стремится минимизировать число мутаций, предположительно произошедших в ходе эволюции генов человека и шимпанзе, предполагает, что последовательность лептина последнего общего предка была такой же, как последовательности у человека и шимпанзе, когда они согласуются; когда они не согласуются, модель использует последовательность гориллы в качестве конечного критерия. Для удобства приведены только первые 300 нуклеотидов кодирующих лептин последовательностей. Остальные 141 тождественны у человека и шимпанзе.

(*транспозоны*) представляют собой последовательности ДНК паразитов, которые заселили геномы и могут распространяться в их пределах. В процессе этого они зачастую нарушают функцию или изменяют регулирование существующих генов. При случае они могут даже создать в совокупности новые гены через слияние между последовательностями транспозонов и сегментами существующих генов. За длительные периоды времени эволюции транспозоны глубоко затронули структуру геномов. Фактически почти половина ДНК в геноме человека имеет распознаваемое подобие с известными последовательностями транспозонов, а это говорит о том, что эти последовательности являются следами свершившихся в прошлом событий транспозиции (см. [рис. 4.17](#)). Вполне очевидно, что даже еще более весомая доля нашего генома порождена событиями транспозиции, которые произошли так давно ($> 10^8$ лет), что связь этих последовательностей с транспозонами уже не удастся проследить.

4.5.2. Последовательности геномов организмов двух видов различаются пропорционально промежутку времени, в течение которого они эволюционировали независимо друг от друга

Различия между геномами видов, живущих сегодня, накопились за более чем 3 миллиарда лет. Не имея точной записи изменений, происходивших во времени, мы можем тем не менее восстановить процесс эволюции геномов на основании детального сравнения геномов современных организмов.

Основной инструмент сравнительной геномики — филогенетическое дерево. Простой пример — дерево, описывающее расхождение человека и человекообразных обезьян ([рис. 4.75](#)). Главнейшим субстратом для построения такого дерева служат данные по сравнению последовательностей белков или генов. Например, сравнения между последовательностями генов или белков человека и таковых у человекообразных обезьян обычно показывают наименьшее число различий между человеком и шимпанзе и наибольшее между человеком и орангутаном.

Для таких близкородственных организмов, как человек и шимпанзе, относительно легко восстановить последовательности генов вымершего последнего общего предка этих двух видов ([рис. 4.76](#)). Близкое подобие между генами человека и шимпанзе обусловлено главным образом коротким периодом времени, на котором происходило накопление мутаций в двух расходящихся линиях родословной, а не функциональными ограничениями, которые поддерживали последовательности в неизменном виде. Доводы в пользу этого представления основываются на том наблюдении, что даже последовательности ДНК, порядок нуклеотидов которых функционально не ограничен, — такие как последовательности, которые кодируют фибринопептиды (см. [стр. 264](#)), или третья позиция «синонимичных» кодонов (кодонов, определяющих одни и те же аминокислоты, см. [рис. 4.76](#)) — являются у человека и шимпанзе почти тождественными.

Для состоящих в гораздо менее близких отношениях организмов, как например, человек и курица (которые эволюционировали по отдельности на протяжении около 300 миллионов лет), консервативность последовательностей, обнаруживаемая в генах, связана главным образом с **очищающим отбором** (*purifying selection*; то есть отбором, который изымает из оборота особи, несущие в себе мутации, которые нарушают важные генетические функции), а не с недостаточным периодом времени для возникновения мутаций. В результате кодирующие белок, кодирующие

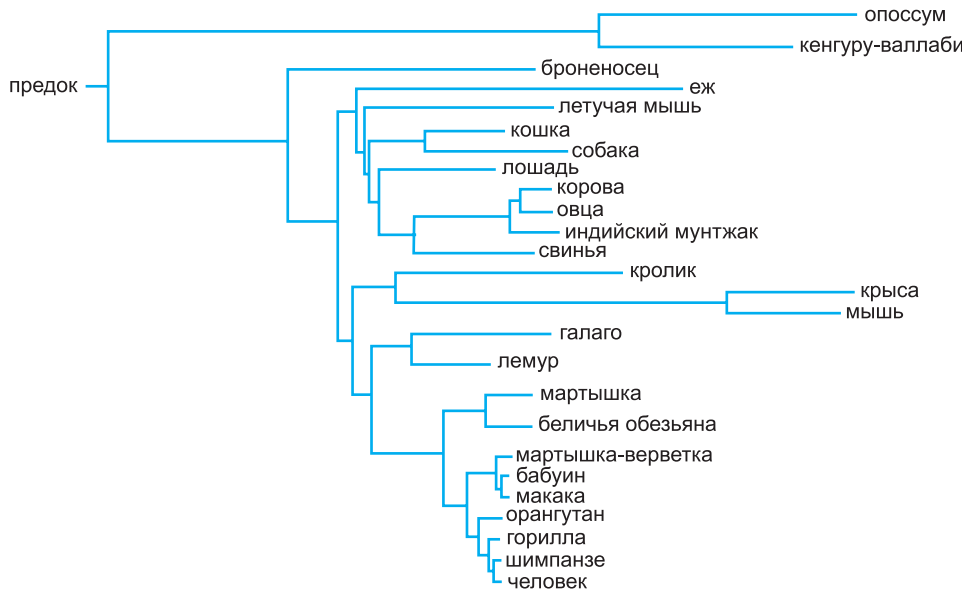


Рис. 4.77. Филогенетическое дерево, построенное для некоторых млекопитающих, геномы которых интенсивно изучаются. Длина каждой линии пропорциональна числу «нейтральных изменений» — то есть изменений нуклеотидов, наблюдаемых при отсутствии очищающего отбора. (Переработано из G. M. Cooper et al., *Genome Res.* 15: 901–913, 2005. С любезного разрешения Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

РНК и регуляторные последовательности в ДНК часто оказываются на удивление консервативными. Напротив, основные доли последовательностей ДНК в геномах человека и курицы разошлись из-за множественных мутаций столь далеко, что часто не удается выровнять их друг с другом.

4.5.3. Филогенетические деревья, построенные на основании сравнения последовательностей ДНК, позволяют проследить эволюционные отношения всех живых организмов

Объединение филогенетических деревьев, основанных на сравнениях молекулярных последовательностей, с палеонтологическими данными привело к воссозданию наилучшей из имеющихся картины эволюции современных форм жизни. Данные палеонтологии остаются важным в качестве источника абсолютных дат, основанных на распаде радиоизотопов в горных породах, в которых найдены окаменелости. Однако точное время расхождения видов трудно установить по окаменелостям, даже для видов, в окаменелостях которых четко различима морфология.

Такие объединенные филогенетические деревья предполагают, что изменения в последовательностях специфических генов или белков, как правило, происходят с почти постоянной частотой, хотя в отдельных линиях генеалогического древа жизни наблюдаются скорости, отличающиеся от нормы не менее чем вдвое. Как было упомянуто выше и еще будет сказано в главе 5, такие «молекулярные часы» бегут наиболее быстро и регулярно в последовательностях, которые не подвергаются очищающему отбору, как например, межгенные области, интронные участки,

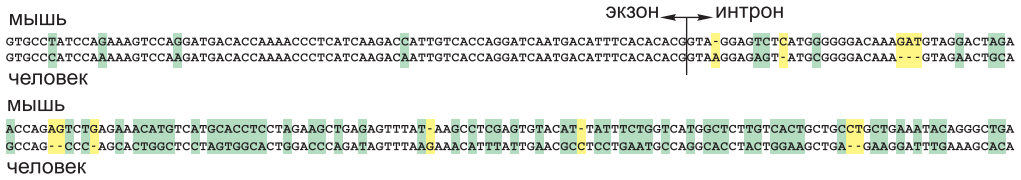


Рис. 4.78. Сравнение соответствующих участков гена лептина мыши и человека. Позиции, в которых последовательности отличаются заменой одного нуклеотида, помещены в *зеленые* прямоугольники, а позиции, которые отличаются добавлением или удалением нуклеотидов, окружены *желтым* полем. Обратите внимание, что кодирующая последовательность экзона намного более консервативна, чем смежная с ней последовательность интрона.

которые не подвергаются вырезанию или действию регуляторных сигналов, а также гены, которые были безвозвратно инактивированы мутацией (так называемые псевдогены). Такие часы бегут наиболее медленно в отношении последовательностей, которые подчинены сильным ограничениям со стороны их функции, — например, аминокислотные последовательности белков наподобие актина, которые участвуют в определенных взаимодействиях с большим числом других белков и чья структура поэтому заключена в жесткие конформационные рамки (см., например, [рис. 16.18](#)).

Иногда быстрое изменение наблюдается в ранее высококонсервативной последовательности. Как будет обсуждено позже в этой главе, такие эпизоды особенно интересны, потому что они, как думают, отражают периоды интенсивного положительного отбора мутаций, которые дали им преимущество при отборе в определенной последовательности поколений, где такое быстрое изменение произошло.

Молекулярные часы бегут со скоростями, которые определяются и частотой мутаций, и степенью очищающего отбора определенных последовательностей. Поэтому совершенно разная калибровка требуется для тех генов, что реплицируются и восстанавливаются различными системами в клетках. Что наиболее примечательно, у животных, к растениям это не относится, часы, основанные на функционально неограниченных последовательностях митохондриальной ДНК, бегут намного быстрее, чем часы, основанные на функционально неограниченных ядерных последовательностях; очевидно, это связано с необычайно высокой частотой мутаций в митохондриях животных.

Молекулярные часы имеют более точное разрешение по времени, чем летопись окаменелостей, и служат более надежным руководством для воссоздания подробной структуры филогенетических деревьев, чем классические методы построения деревьев, которые опираются на данные сравнительного анализа морфологии и развития разных видов. Например, точная связь между линиями человекообразных обезьян и человека не была окончательно установлена, пока в 1980-е гг. не было собрано достаточное количество данных о молекулярных последовательностях, на основании которых было построено дерево, представленное на [рис. 4.75](#). А при сравнении с огромными количеством последовательностей ДНК самых разных млекопитающих, определенных к настоящему времени, удастся получить намного более точные оценки наших с ними связей ([рис. 4.77](#)).

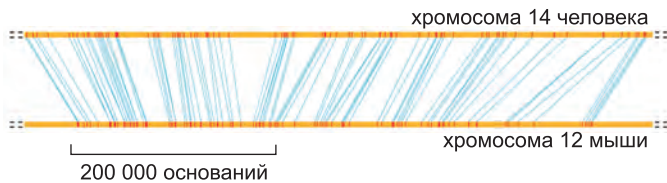


Рис. 4.79. Сравнение синтенической части геномов мыши и человека. Около 90 процентов этих двух геномов может быть выровнено таким способом. Обратите внимание, что, несмотря на идентичный порядок сопоставляемых индексных последовательностей (*красные метки*), в линии родословной мыши есть общие потери ДНК, которые рассеяны по всей области. Такого типа общие потери типичны для всех таких областей, и ими же объясняется тот факт, что геном мыши содержит на 14 процентов меньше ДНК, чем геном человека. (Переработано из Mouse Sequencing Consortium, *Nature* 420: 520–573, 2002. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

4.5.4. Сравнение хромосом человека и мыши показывает, каким образом расходятся структуры геномов

Как можно было ожидать, геномы человека и шимпанзе намного более похожи, чем геномы мыши и человека. Хотя размер геномов человека и мыши примерно одинаков и они содержат почти идентичные наборы генов, прошел более длительный период времени, за который могли накопиться изменения, — приблизительно 80 миллионов лет против 6 миллионов лет. Вдобавок к этому, как показано на [рис. 4.77](#), линии родословной грызунов (представленные крысой и мышью) имеют необычайно быстрые молекулярные часы. Следовательно, эти генеалогические линии отошли от линии родословной человека быстрее, чем можно было бы ожидать,

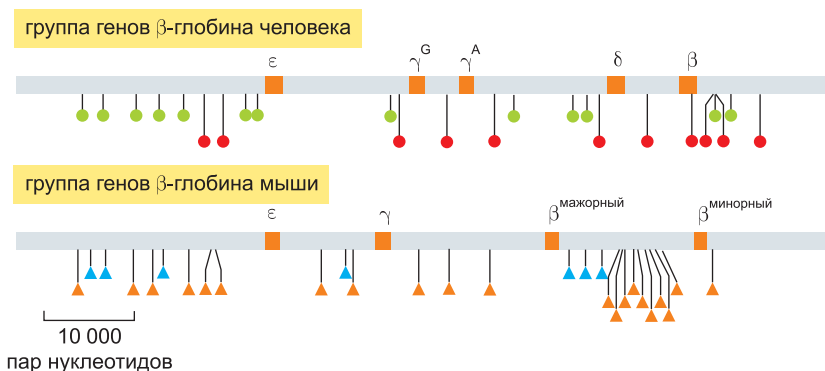


Рис. 4.80. Сравнение группы генов β-глобина в геномах человека и мыши с отмеченным местоположением подвижных генетических элементов. Этот отрезок генома человека содержит пять функциональных генов, подобных генам β-глобина (*оранжевый*); сопоставимая область из генома мыши имеет только четыре. Позиции последовательностей Alu человека обозначены зелеными кружками, а последовательностей L1 человека — красными кружками. Геном мыши содержит отличающиеся, но схожие подвижные генетические элементы: позиции элементов B1 (которые родственны последовательностям Alu человека) обозначены *синими треугольниками*, а позиции элементов L1 мыши (которые родственны последовательностям L1 человека) обозначены *оранжевыми треугольниками*. Отсутствие подвижных генетических элементов в структурных генах глобина может быть отнесено на счет очищающего отбора, который устранял всякую вставку, которая ставила бы под угрозу функцию гена. (Схему любезно предоставили Ross Hardinson и Webb Miller.)



Рис. 4.81. Северная рыба-собака *Fugu rubripes*. (Снимок любезно предоставил Вугарра Venkatesh.)

руководствуясь иными сведениями.

Как видно из сравнения последовательностей ДНК на **рис. 4.78**, мутация привела к значительному расхождению последовательностей между человеком и мышью во всех участках, которые не подпадают под юрисдикцию отбора, таких как большинство последовательностей нуклеотидов в интронах. Напротив, в сравнениях человек—шимпанзе почти все позиции последовательностей одинаковы попросту потому, что со времени жизни последнего общего предка прошло не так много времени для того, чтобы большое число изменений успело произойти.

В отличие от ситуации с человеком и шимпанзе, локальный порядок генов и общая организация хромосомы существенно различаются у человека и мыши. Согласно приближенным оценкам, в линиях человека и мыши произошло общим числом около 180 событий разрыва и воссоединения, с тех пор как эти два вида последний раз имели общего предка. В результате этого процесса, хотя у этих двух видов различия в числе хромосом остались небольшими (23 в гаплоидном геноме человека и 20 — у мыши), их общие структуры сильно отличаются. Тем не менее даже после интенсивной перетасовки генома остается много крупных блоков ДНК, в которых порядок генов одинаков у человека и у мыши. Такие отрезки сохранившегося порядка генов в хромосомах упоминаются как области *синтении*.

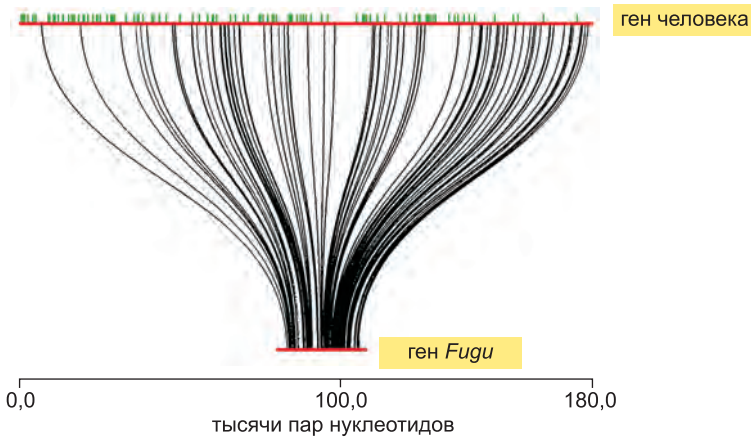


Рис. 4.82. Сравнение геномных последовательностей генов человека и *Fugu rubripes*, кодирующих белок гентингин. Оба гена (обозначены красным) содержат по 67 коротких экзонов, которые выравниваются друг с другом в соответствии 1:1; эти экзоны соединены изогнутыми линиями. Ген человека в 7,5 раз крупнее, чем ген *Fugu rubripes* (180 000 против 27 000 пар нуклеотидов). Разница в размерах обусловлена всецело более крупными интронами в гене человека. Большой размер интронов человека связан отчасти с присутствием ретротранспозонов, позиции которых отмечены зелеными вертикальными линиями; в интронах *Fugu rubripes* ретротранспозонов нет. У человека мутация гена гентингина вызывает заболевание хореей Гентингтона — наследственным расстройством, связанным с поражением клеток мозга. (Переработано из S. Waxendale et al., *Nat. Genet.* 10: 67–76, 1995. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

Неожиданный вывод из подробного сравнения полных последовательностей геномов мыши и человека, подтвержденный результатами последующих сравнений между геномами других позвоночных животных, состоит в том, что маленькие блоки последовательностей удаляются из геномов и добавляются в них удивительно быстрыми темпами. Так, если мы допускаем, что наш общий предок имел геном размером с геном человека (около 3 миллиардов пар нуклеотидов), то мышь должна была потерять в общей сумме приблизительно 45 процентов того генома в результате накопленных удалений за последние 80 миллионов лет, тогда как человек потерял около 25 процентов. Однако существенный вклад, который внесли приобретенные последовательности — за счет многих маленьких дупликаций хромосом и умножения транспозонов, — компенсировали эти удаления. В результате размер нашего генома не изменился относительно размера генома последнего общего предка человека и мыши, тогда как геном мыши уменьшился всего на 0,3 миллиарда нуклеотидов.

Хорошие данные о потере последовательностей ДНК маленькими блоками в ходе эволюции можно получить по итогам подробного сравнения большинства областей синтении в геномах мыши и человека. Сравнительное сжатие генома мыши может быть ясно прослежено по результатам таких сравнений, с общей потерей рассеянных по длинным отрезкам ДНК последовательностей, которые в ином случае являются гомологичными (рис. 4.79).

ДНК добавляется к геномам как путем спонтанной дупликации сегментов хромосом, которые содержат десятки тысяч пар нуклеотидов (что будет описано вскоре), так и посредством активной транспозиции (большинство событий транспозиции имеет характер дупликации, потому что исходная копия транспозона остается там, где она была, когда копия встраивается в новый участок; например, см. рис. 5.74). Поэтому сравнение последовательностей ДНК, происходящих от транспозонов, у человека и мыши легко показывает некоторые добавленные в геном последовательности (рис. 4.80).

По неизвестным причинам все млекопитающие имеют геномы размером около 3 миллиардов пар нуклеотидов, которые содержат почти идентичные наборы генов, даже при том что только порядка 150 миллионов пар нуклеотидов, кажется, находятся под специфичными для последовательности функциональными ограничениями.

4.5.5. Размер генома позвоночного отражает относительные скорости приобретения и потери ДНК в последовательности поколений

Теперь, когда мы знаем полную последовательность ряда геномов позвоночных, мы видим, что размер генома может изменяться в широких пределах, очевидно, без резкого эффекта на организм или число его генов. Таким образом, тогда как геномы мыши и собаки попадают в типичные для млекопитающих размерные рамки, курица имеет геном, который составляет лишь около трети генома человека (один миллиард пар нуклеотидов). В особенности примечательный пример организма с геномом аномального размера — северная рыба-собака *Fugu rubripes* (рис. 4.81), которая имеет крошечный для позвоночного геном (0,4 миллиарда пар нуклеотидов в сравнении с 1 миллиардом и более у многих других рыб). Небольшой размер генома *Fugu rubripes* обусловлен главным образом небольшим размером его интронов. А именно: интроны, равно как и другие некодирующие сегменты генома *Fugu rubripes*, не содержат ДНК-повторов, которые составляют большую долю геномов

наиболее хорошо изученных позвоночных животных. Тем не менее позиции интронов *Fugu rubripes* почти в совершенстве сохранились неизменными относительно соответствующих позиций в геномах млекопитающих (рис. 4.82).

Хотя вначале это и было необъяснимой загадкой, теперь мы имеем простое объяснение столь сильных различий в размере геномов между взаимно подобными организмами: поскольку все позвоночные испытывают непрерывный процесс потери ДНК и приобретения ДНК, размер генома попросту зависит от равновесия между этими противоположными процессами, действующими на протяжении миллионов лет. Предположим, например, что в генеалогической линии, ведущей к *Fugu*, скорость приобретения ДНК сильно замедлилась. За длительные периоды времени это могло привести к общему «вычищению» из генома этой рыбы тех последовательностей ДНК, потерю которых можно было допустить. В прошлом процесс очищающего отбора в линии родословной *Fugu rubripes* оставил те последовательности ДНК позвоночных, которые, наиболее вероятно, были функционально активными — всего 400 миллионов пар нуклеотидов ДНК, — очертив тем самым основную область интереса для ученых.

4.5.6. Мы способны реставрировать последовательности некоторых древних геномов

Геномы предковых организмов могут быть выведены абстрактно, но их никогда не удастся наблюдать своими глазами: никаких древних организмов сегодня уже нет. Хотя современный организм типа мечехвоста выглядит поразительно подобным окаменелым предкам, которые жили 200 миллионов лет назад, есть все основания полагать, что геном мечехвоста изменялся в течение всего того времени со скоростью, подобной наблюдаемой в других эволюционных линиях. Ограничения естественного отбора, должно быть, сохраняли ключевые функциональные свойства генома мечехвоста, чтобы отвечать морфологической устойчивости этого вида. Однако последовательности геномов показывают, что доля генома, сохраняемая очищающим отбором, невелика; следовательно, геном современного мечехвоста должен сильно отличаться от генома его вымерших предков, известных нам только по окаменелостям.

Есть ли какой-либо путь, позволяющий обойти эту проблему? Можем ли мы когда-либо надеяться расшифровать большие отрезки последовательности генома вымерших предков тех организмов, что живут сегодня? Для организмов, которые состоят в столь же близком родстве, сколь человек и шимпанзе, как мы убедились, это сделать нетрудно. В том случае, если мы хотим разобраться, какое из немногих различий между последовательностями ДНК человека и шимпанзе было унаследовано от нашего общего предка около 6 миллионов лет назад, можно использовать ссылку на последовательность ДНК гориллы (см. рис. 4.76). Чтобы восстановить последовательность ДНК предка, который стал родоначальником большого числа различных организмов, живущих сегодня, нужно сравнить одновременно последовательности ДНК многих видов — так ученые могут реставрировать последовательности ДНК, которые существовали много лет тому назад. Например, по полным последовательностям генома 20-ти современных млекопитающих, которые будут вскоре получены, ученые должны расшифровать большую часть последовательности генома жившего 100 миллионов лет назад млекопитающего бореоэутерии, которое дало начало таким разным видам, как собака, мышь, кролик, броненосец

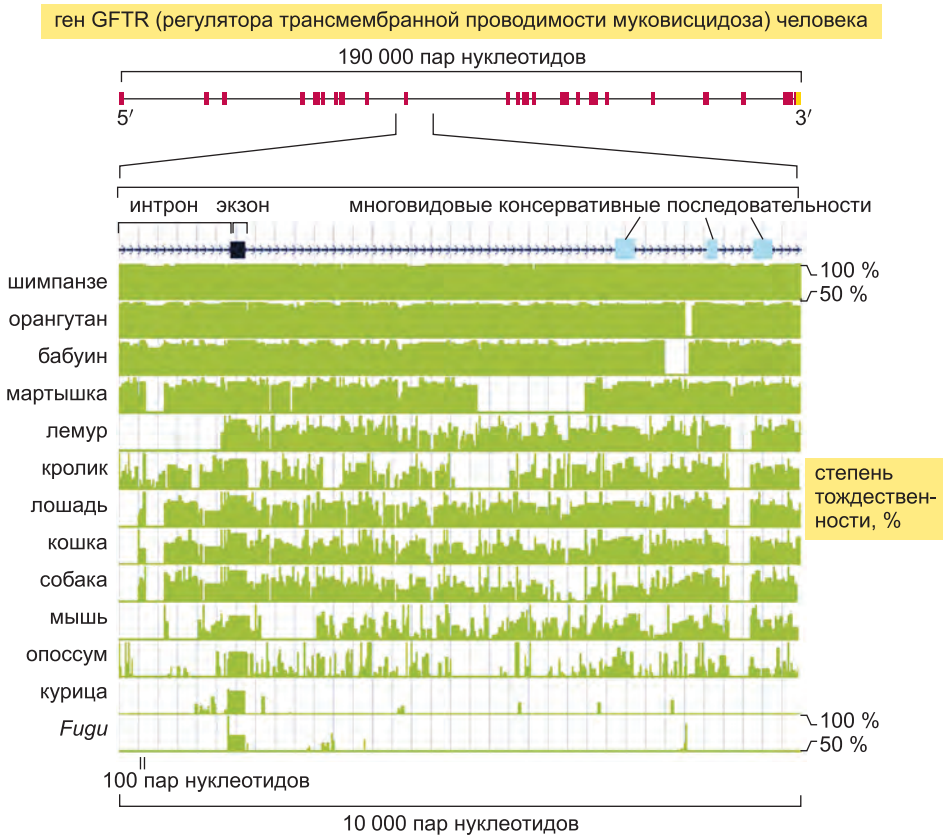


Рис. 4.83. Обнаружение многовидовых консервативных последовательностей. В данном примере последовательности геномов всех представленных организмов сравнивали, блоками по 25 нуклеотидов, с обозначенной областью и гена GFTR человека. Доля идентичности по синтетическим последовательностям для каждого организма отмечена зеленым. Вдобавок к этому, для обнаружения в пределах этой области наиболее высококонсервативных последовательностей среди последовательностей всех рассматриваемых организмов, был применен вычислительный алгоритм. Помимо экзона, показаны три других блока многовидовых консервативных последовательностей. Функции большинства таких последовательностей в геноме человека неизвестны. (Иллюстрацию любезно предоставил Eric D. Green.)

и человек (см. [рис. 4.77](#)). (Интересно, что в настоящее время удалось частично прочитать несколько геномов ископаемых организмов — неандертальца, мамонта, пещерного медведя. — *Прим.ред.*)

4.5.7. Сравнение последовательностей ДНК многих видов позволяет выявлять важные последовательности с неизвестной функцией

Огромное количество последовательностей ДНК, имеющееся в современных базах данных (более ста миллиардов пар нуклеотидов), представляет богатые залежи, которые ученые могут «разрабатывать», задаваясь самыми разными целями. Мы уже обсудили, как эта информация может быть использована для восстановления эволюционных путей, которые привели к современным организмам. Но сравнения

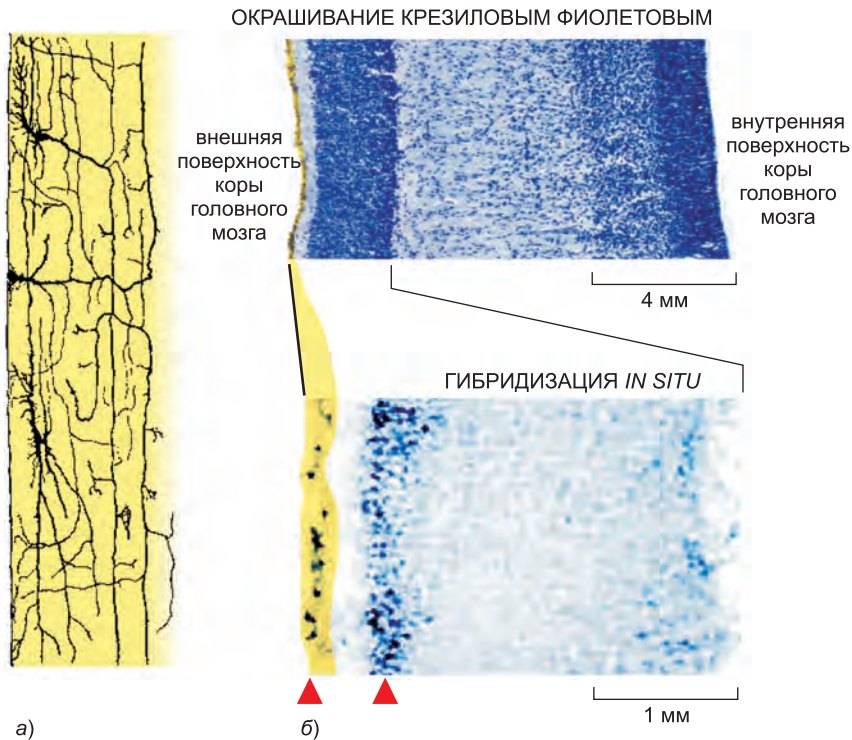


Рис. 4.84. Первичная характеристика нового гена, обнаруженного как изначально консервативная последовательность ДНК, которая быстро эволюционировала у людей. *а)* Выполненный Рамон-и-Кахалем рисунок внешней поверхности новой коры (неокортекс — прим.ред.) головного мозга человека с вырисованными на желтом фоне нейронами Кахаля–Ретциуса. *б)* Срезы ткани мозга эмбриона человека, показывающие часть коры; область, содержащая нейроны Кахаля–Ретциуса, выделена желтым. Верхняя фотография: краситель крезилловый фиолетовый. Нижняя фотография: гибридизация *in situ*. Красные стрелки показывают на клетки, которые вырабатывают РНК HAR1F, как обнаружено гибридизацией *in situ* (окрашены синим). HAR1F — новая некодирующая РНК, которая быстро эволюционировала в линии человека, исходящей от человекообразных обезьян. Нейроны Кахаля–Ретциуса вырабатывают эту РНК во время развития новой коры головного мозга. Результаты интригуют, потому что именно человеку свойственна большая новая кора головного мозга; поведение клеток при формировании этой коры представлено на [рис. 22.99](#). (Переработано из K. S. Pollard et al., *Nature* 443: 167–172, 2006. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

последовательностей также дают много ответов на вопросы о функционировании клеток и организмов. Возможно, самым замечательным открытием в этой области стало следующее: хотя лишь около 1,5 % генома человека кодирует белки, приблизительно в три раза большее количество (в общей сложности 5 % генома — см. таблицу 4.1, [стр. 206](#)) оказалось высококонсервативным в ходе эволюции млекопитающих. Эта масса консервативной последовательности наиболее ясно проявляется, когда мы выравниваем и сравниваем синтенные блоки ДНК многих различных видов. Таким способом могут быть легко идентифицированы так называемые *многовидовые консервативные последовательности* (multispecies conserved sequences) ([рис. 4.83](#)). В большинстве своем некодирующие консервативные последовательности, обнару-

женные этим способом, оказались относительно короткими, содержащими от 50 до 200 пар нуклеотидов. Строгая консервативность подразумевает, что они имеют важные функции, которые сохранялись очищающим отбором. Остается разгадать тайну этих функций. Часть консервативной последовательности, которая не кодирует белки, кодирует нетранслируемые молекулы РНК, которые, как известно, имеют важные функции, в чем мы убедимся в последующих главах. Другая доля некодирующей консервативной ДНК явно участвует в регулировании транскрипции смежных с ней генов, как будет показано в главе 7. Но мы еще не знаем, сколько консервативной ДНК может быть объяснено подобным образом, и львиная ее доля все еще лежит под покровом тайны. Разгадка этой тайны должна иметь глубокие последствия для медицины, и это показывает, как много нам еще предстоит узнать о биологии позвоночных.

Как молекулярным биологам взяться за такую проблему? Первый шаг — провести различие между консервативными областями, которые кодируют белок, и теми, которые его не кодируют, и затем, в числе последних — сосредоточиться на тех, которые еще не имеют какой-либо установленной функции, например, такой как кодирование молекул структурной РНК. Следующая задача состоит в том, чтобы обнаружить, молекулы каких белков или РНК связываются с этими таинственными последовательностями ДНК, как они упаковываются в хроматин и служат ли они когда-либо матрицами для синтеза РНК. В основном эта задача все еще находится за пределами наших возможностей, но главное — начало положено и сделаны некоторые замечательные подвижки. Одно из наиболее захватывающих открытий касается эволюционных изменений, которые сделали нас, людей, не похожими на всех остальных, — изменений, говорим мы, в последовательностях, которые оставались консервативными у наших близких родственников, но претерпели внезапно резкое изменение на эволюционном пути человека.

4.5.8. Ускоренные изменения в ранее консервативных последовательностях могут помочь разгадать основополагающие этапы эволюции человека

Как только в распоряжении ученых появились последовательности геномов сразу и человека, и шимпанзе, они стали искать изменения в последовательности ДНК, которые могли бы объяснить поразительные различия между нами и обезьяньей братией. При 3 миллиардах пар нуклеотидов, которые необходимо сравнить у обоих видов, это могло казаться непосильной задачей. Но работа была намного облегчена за счет ограничения поиска 35 000 точно определенных многовидовых консервативных последовательностей (в целом около 5 миллионов пар нуклеотидов), представляющих части генома, которые с наибольшей вероятностью важны с точки зрения функций. Хотя эти последовательности высококонсервативны, они не остаются абсолютно неизменными, и, когда вариант от одного вида сравнивается с вариантом от другого, обычно оказывается, что они разошлись в небольшой степени, напрямую соответствующей времени, прошедшему с момента жизни последнего общего предка. Однако в малой доле случаев можно заметить признаки внезапного эволюционного всплеска. Например, было обнаружено, что некоторые последовательности ДНК, которые были высококонсервативны у других видов млекопитающих, изменялись исключительно быстро в течение шести миллионов лет эволюции человека — после того как мы отклонились от шимпанзе. Такие *уско-*

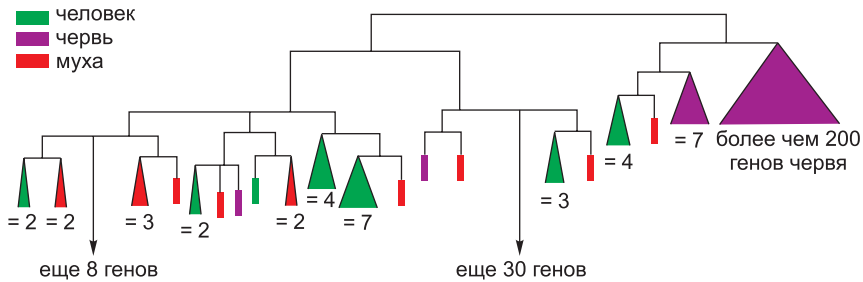


Рис. 4.85. Филогенетическое дерево, построенное на основе гипотетических белковых последовательностей всех ядерных рецепторов гормонов, кодируемых в геномах человека (*H. sapiens*), червя нематоды (*C. elegans*) и плодовой мушки (*D. melanogaster*). Треугольники представляют подсемейства белков, которые распространились в пределах отдельных эволюционных линий; ширина этих треугольников показывает число генов, кодирующих членов этих подсемейств. Цветные вертикальные полосы представляют одиночный ген. Не существует простой схемы истории дупликаций и дивергенций, которые привели к созданию семейств генов, кодирующих ядерные рецепторы в этих трех современных организмах. Семейство ядерных рецепторов гормонов описано на [рис. 15.14](#). Эти белки участвуют в передаче сигналов в клетках и в регулировании генов. (Переработано из International Human Genome Consortium, *Nature* 409: 860–921, 2001. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

ленно изменяющиеся у человека области (human accelerated region – HAR), как думают, отражают функции, которые были особенно важны для формирования наших полезных отличий.

В одном таком исследовании было идентифицировано приблизительно 50 таких участков, одна четверть из которых обнаружена вблизи генов, связанных с развитием нервной системы. Последовательность, подвергнувшаяся наиболее быстрому изменению (18 изменений между человеком и шимпанзе, по сравнению только с двумя изменениями между шимпанзе и курицей), была подвергнута дальнейшему изучению и, как установлено, кодирует молекулу 118-нуклеотидной некодирующей РНК, которая вырабатывается в коре головного мозга человека в решающий момент – во время развития этого органа ([рис. 4.84](#)). Хотя функция этой РНК, HAR1F, еще не установлена, это волнительное открытие вдохновляет на дальнейшие исследования, которые, будем надеяться, прольют свет на отличительные особенности мозга человека.

4.5.9. Дупликация генов — важнейший источник генетической новизны в ходе эволюции

Эволюция зависит от создания новых генов, а также от модификации уже существующих. Как это происходит? Когда мы сравниваем организмы, которые сильно отличаются по внешнему виду, — например, примата с грызуном или мышью с рыбой, — мы редко встречаем такие гены у одного вида, которые не имели бы гомологов у другого. Гены, не имеющие гомологичных аналогов, относительно малочисленны, даже когда мы сравниваем столь далеко разошедшиеся организмы, как млекопитающее и червь. С другой стороны, мы часто находим семейства генов, в которые у разных видов входит различное число членов. Чтобы создать такие семейства, гены неоднократно дублировались, и после этого копии эволюционно разошлись и приобрели новые функции, которые зачастую изменяются от одного вида к другому.

Здесь показаны гены, кодирующие ядерные рецепторы гормонов у человека, червя нематоды и плодовой мушки (рис. 4.85). Многие из подтипов таких ядерных рецепторов (называемых также внутриклеточными рецепторами) имеют близких гомологов у всех трех организмов, которые более подобны друг другу, чем другим входящим в семейство подтипам рецепторов, имеющихся у тех же видов. Поэтому большая часть функционального расхождения этого большого семейства генов, должно быть, предшествовала расхождению этих трех эволюционных линий. Впоследствии одна главная ветвь этого семейства генов подверглась обширному распространению только в линии червя. Подобные, но меньшего масштаба специфические для своих генеалогических линий распространения определенных подтипов заметны по всему эволюционному дереву семейства генов.

Дупликация генов происходит с высокой скоростью во всех эволюционных линиях, внося свой вклад в энергичный процесс приумножения ДНК, который мы обсуждали ранее. При доскональном изучении событий самопроизвольного дублирования у дрожжей обычно наблюдали дупликацию от 50 000 до 250 000 пар нуклеотидов, большинство которых повторялось тандемно. Они оказались результатом ошибок репликации ДНК, которые привели к неточному восстановлению участков двунитевых разрывов хромосом. Сравнение геномов человека и шимпанзе показывает, что, с того времени, когда эти два организма разошлись, сегментные дупликации добавляли около 5 миллионов пар нуклеотидов к каждому из геномов каждый миллион лет, при этом средний размер дупликации был около 50 000 пар нуклеотидов (однако, есть и в пять раз более крупные дупликации — как у дрожжей). Фактически, если вести счет нуклеотидам, события дупликации создали больше различий между нашими двумя видами, чем замены отдельных нуклеотидов.

4.5.10. Дуплицированные гены дивергируют

Основной вопрос в области эволюции генома касается судьбы недавно дуплицированных генов. В большинстве случаев предполагается, что на них воздействует незначительный или вообще нулевой отбор — по крайней мере первоначально, — чтобы поддерживать дуплицированное состояние; это связано с тем, что обе копии способны осуществлять одинаковые функции. Следовательно, многие события дупликации, по всей вероятности, сопровождались мутациями с потерей функции в одном или другом гене соответствующей пары. Такой цикл функционально восстановил бы состояние с одним геном, которое предшествовало дупликации. И в самом деле, известно много примеров в современных геномах, где можно видеть, что одна из копий дуплицированного гена стала безвозвратно инактивированной в результате многократных мутаций. Через какое-то время подобие последовательностей между таким **псевдогеном** и функционально активным геном, дублирование которого и произвело этот псевдоген, как можно ожидать, будет размываться за счет накопления большого числа мутаций в псевдогене — и их гомологическую связь в конечном счете будет невозможно определить.

Альтернативная судьба дупликаций генов — когда обе копии остаются функционально активными, но при этом расходятся (дивергируют) в отношении своих последовательностей и профилей экспрессии и, таким образом, начинают играть различные роли. Такой процесс «дублирования и расхождения», или дупликации и дивергенции, почти наверняка объясняет присутствие в биологически сложных организмах крупных семейств генов со схожими функциями и, как думают, играет

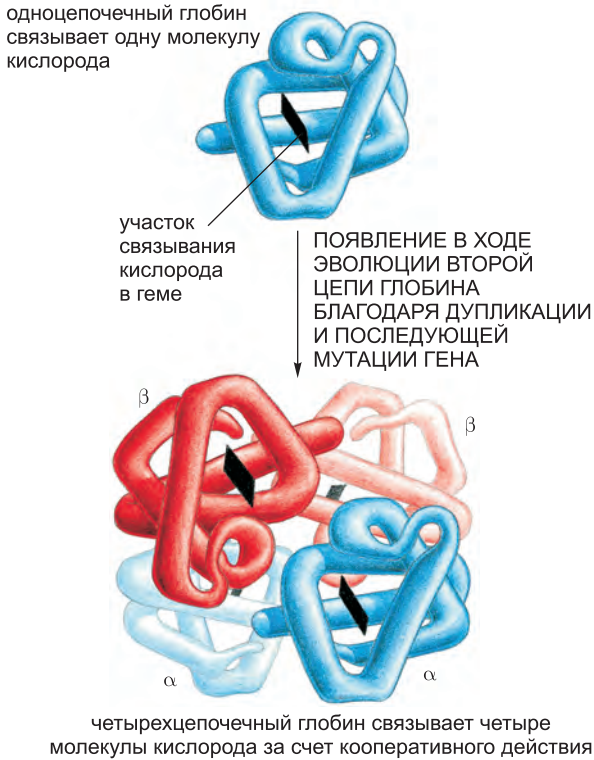


Рис. 4.86. Сравнение структур одноцепочечных и четырехцепочечных глобинов. Показанный четырехцепочечный глобин — гемоглобин, который представляет собой комплекс двух цепей α -глобина и двух цепей β -глобина. Одноцепочечный глобин, свойственный некоторым примитивным позвоночным, образует димер, который диссоциирует, когда связывает кислород, и представляет собой промежуточное звено в эволюции четырехцепочечного глобина.

определяющую роль в эволюции возрастающей биологической сложности. Просмотр многих различных геномов эукариот показывает, что вероятность того, что любой отдельно взятый ген подвергнется событию дупликации, которое распространится на большинство особей вида или даже на весь вид, равна приблизительно 1% на миллион лет.

Дупликация полных геномов демонстрирует особенно впечатляющие примеры цикла дупликации-расхождения. Дупликация целого генома может произойти весьма просто: все, что для этого требуется, — один круг репликации генома в зародышевой линии клеток без соответствующего деления клеток. Первоначально число хромосом просто удваивается. Такие резкие увеличения пloidности организма обычны, в особенности у грибов и растений. После дупликации целого генома все гены существуют в виде удвоенных копий. Однако если событие дупликации произошло столь давно, что прошло достаточно много времени для последующих изменений в структуре генома, то результаты ряда сегментных дупликаций, — происходящих в различные моменты времени — очень трудно отличить от конечного продукта дупликации полного генома. У млекопитающих, например, роль дупликации целого генома, в отличие от ряда происходящих по частям дупликаций сегментов ДНК, совершенно непонятна. Тем не менее совершенно ясно, что в далеком прошлом имело место большое число дупликации генов.

Анализ генома полосатого данио, в геноме которого либо случилась дупликация целого генома, либо произошел ряд более локальных дупликаций сотни миллионов лет назад, пролил немного света на процесс дупликации и расхождения генов. Хотя многие дубликаты генов полосатого данио, кажется, потеряны по причине мутаций, существенная доля — возможно, не менее 30–50% — отклонилась функционально, при том что обе копии остались активными. Во многих случаях наиболее очевидное функциональное различие между дублированными генами состоит в том, что они экспрессируются в разных тканях или на разных стадиях развития (см. [рис. 22.46](#)).

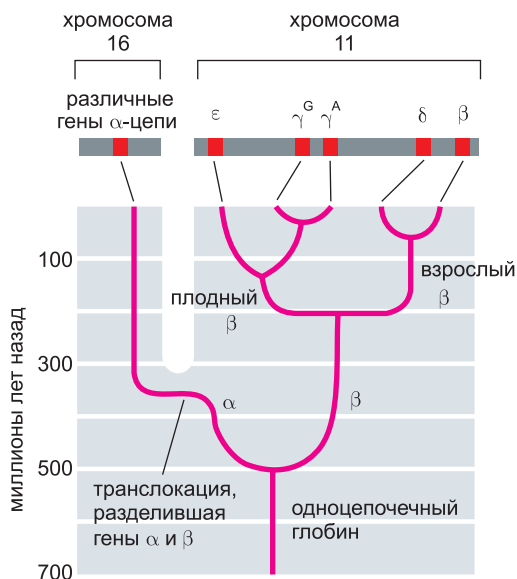


Рис. 4.87. Схема эволюции цепей глобина, переносящих кислород в крови животных. Схема сосредоточена на семействе генов β-подобного глобина. Относительно недавняя дупликация гена γ-цепи произвело γ^G и γ^A , которые являются свойственными плоду β-подобными цепями с тождественной функцией. Местоположение генов глобина в геноме человека показано в верхней части рисунка (см. также рис. 7.64).

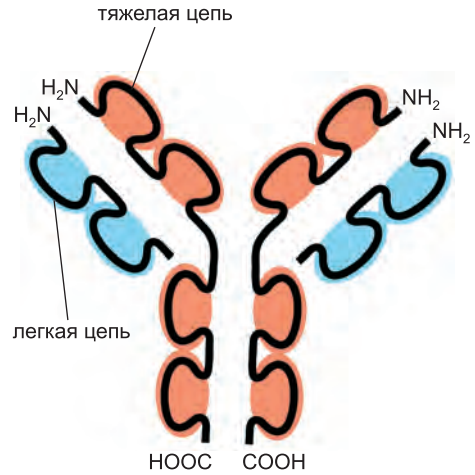
теряет экспрессию во второй ткани. После такого стечения обстоятельств обе копии гена должны будут обеспечивать полный набор функций, которые выполнялись в свое время одним-единственным геном; следовательно, обе копии будут теперь защищены от потери из-за инактивирующих мутаций. За более длительный период каждая из копий может впоследствии подвергнуться дальнейшим изменениям, посредством которых приобретет новые, специализированные свойства.

4.5.11. Эволюция семейства генов глобина показывает, какой вклад дупликация ДНК вносит в эволюцию организмов

Семейство генов глобина представляет особенно хороший пример того, как дупликация ДНК производит на свет новые белки, потому что история его эволюции была восстановлена с особенной тщательностью. Несомненные подобию в аминокислотной последовательности и структуре, наблюдаемые среди современных глобинов, указывают на то, что все они должны происходить от общего предкового гена, даже при том, что теперь некоторые из них кодируются далеко разнесенными генами в геноме млекопитающих.

Часть событий прошлого, которые произвели различные типы несущих кислород молекул гемоглобина, мы можем восстановить, рассматривая различные формы этого белка в организмах, пребывающих на различных ветвях филогенетического древа жизни. Молекула наподобие гемоглобина была необходима для того, чтобы многоклеточные животные могли вырасти до больших размеров, так как крупные животные уже не могли полагаться на простую диффузию кислорода через поверхность тела, чтобы адекватно снабжать свои ткани кислородом. Как следствие, подобные гемоглобину молекулы встречаются у всех позвоночных и многих беспозвоночных. Самая примитивная переносящая кислород молекула у животных — полипептидная цепочка глобина длиной приблизительно 150 аминокислот, которая обнаружена у многих морских червей, насекомых и примитивных рыб. Однако у более сложных позвоночных молекула гемоглобина состоит из цепей глобина двух видов. Кажет-

Рис. 4.88. Схематическое представление молекулы антитела (иммуноглобулина). Эта молекула представляет собой комплекс, состоящий из двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей. Каждая тяжелая цепь содержит четыре подобных ковалентно связанных домена, тогда как каждая легкая цепь содержит два таких домена. Каждый домен кодируется отдельным экзоном, и все экзоны, как думают, эволюционировали путем серии дупликаций единственного предкового экзона.



ся, что приблизительно 500 миллионов лет назад, во время продолжающейся эволюции рыб, произошла серия мутаций и дупликаций генов. Эти события утвердили два несколько различающихся гена глобина, кодирующих цепи α - и β -глобина в геномах всех особей. У

современных позвоночных каждая молекула гемоглобина представляет собой комплекс из двух α -цепей и двух β -цепей (рис. 4.86). Четыре кислород-связывающих участка в молекуле $\alpha_2\beta_2$ взаимодействуют между собой так, что при связывании и высвобождении кислорода в молекуле гемоглобина происходят кооперативные аллостерические изменения, благодаря чему такой гемоглобин связывает и выделяет кислород более эффективно, чем его одноцепочечный вариант.

Еще позже, во время эволюции млекопитающих, ген β -цепи, очевидно, подвергся дупликации и мутации и дал начало второй β -подобной цепи, которая синтезируется исключительно у плода. Получающаяся молекула гемоглобина имеет более высокое сродство к кислороду, чем гемоглобин взрослого, и, таким образом, способствует переносу кислорода от матери к плоду. Впоследствии ген новой β -подобной цепи снова был дублирован и мутирован и дал два новых гена — ϵ и γ ; сейчас ϵ -цепь продуцируется на более ранних стадиях развития плода (и образует $\alpha_2\epsilon_2$), чем γ -цепь, которая формирует $\alpha_2\gamma_2$. Еще позже, во время эволюции приматов, произошло дублирование гена β -цепи взрослого, что дало начало гену δ -глобина и, таким образом, второстепенной форме гемоглобина ($\alpha_2\delta_2$), которая обнаружена только у взрослых приматов (рис. 4.87).

Каждый из таких дублированных генов был видоизменен точечными мутациями, которые затрагивают свойства конечной молекулы гемоглобина, а также изменениями в регуляторных областях, которые определяют время и уровень экспрессии гена. В результате все эти глобины вырабатываются в различных количествах и в разные временные периоды развития человека (см. рис. 7.64, б).

Конечный результат процессов дупликации генов, в силу которых возникло все многообразие цепей глобина, ясно прослеживается на генах человека, произошедших от первоначального β -гена: они устроены в виде ряда гомологичных последовательностей ДНК, расположенных друг за другом и имеющих размеры в пределах 50 000 пар нуклеотидов. Подобная группа генов α -глобина расположена на отдельной хромосоме человека. Поскольку группы генов α - и β -глобина у птиц и млекопитающих находятся на отдельных хромосомах, а у лягушки *Xenopus* расположены вместе, считается, что событие хромосомной транслокации разделило эти две группы генов около 300 миллионов лет назад (см. рис. 4.87).

В группах генов α - и β -глобина есть несколько дублированных последовательностей ДНК глобина, которые являются не функционально активными генами, но псевдогенами. Они очень близки последовательностям с функционально активными генами, но были выведены из строя мутациями, которые препятствуют их экспрессии. Существование таких псевдогенов проясняет и делает очевидным тот факт, что, как и следует ожидать, далеко не каждая дупликация ДНК ведет к появлению нового функционально активного гена. Мы знаем также и то, что последовательности функционально неактивной ДНК долго не отвергаются, о чем свидетельствует большой избыток некодирующей ДНК, которой заполнены геномы млекопитающих.

4.5.12. Гены, кодирующие новые белки, могут быть результатом рекомбинации экзонов

Роль дупликации ДНК в эволюции не сводится только к распространению семейств генов. Это событие может происходить также и в меньшем масштабе и создавать отдельные гены, стягивая вместе короткие дублицированные сегменты ДНК. Белки, кодируемые генами, образованными таким способом, могут быть идентифицированы по наличию повторяющихся подобных белковых доменов, которые ковалентно связаны друг с другом в последовательность. Например, иммуноглобулины (рис. 4.88) и альбумины, а также и большинство фибриллярных белков (таких как коллагены), кодируются генами, которые эволюционировали посредством повторных дупликаций исходной последовательности ДНК.

В генах, которые эволюционировали таким способом, а также и во многих других генах каждый отдельный экзон часто кодирует отдельную единицу укладки белка, или домен. Считается, что организация кодирующих последовательностей ДНК в виде ряда таких экзонов, разделенных длинными интронами, во многом способствовала эволюции новых белков. Дупликации, необходимые для образования отдельного гена, кодирующего белок с повторяющимися доменами, могут, например, часто происходить путем разрыва и воссоединения ДНК в каких-нибудь позициях длинных интронов, лежащих по обе стороны от экзона; без интронов в исходном гене было бы лишь несколько участков, в которых рекомбинационный обмен между молекулами ДНК мог бы привести к дублированию домена. Благодаря возможности дублирования путем рекомбинации на многих потенциальных участках, а не только в нескольких, интроны увеличивают вероятность благоприятного события дупликации.

В более общем смысле можно сказать, что из последовательностей генома мы знаем, что различные части генов — как их отдельные экзоны, так и их регуляторные элементы, — служили модульными элементами, которые подвергались дупликации и перемещались по геному, в результате чего возникло величайшее многообразие живых существ. Так, например, многие современные белки скроены, подобно лоскутному одеялу, из доменов различного происхождения, что отражает их долгую историю эволюции (см. рис. 3.19).

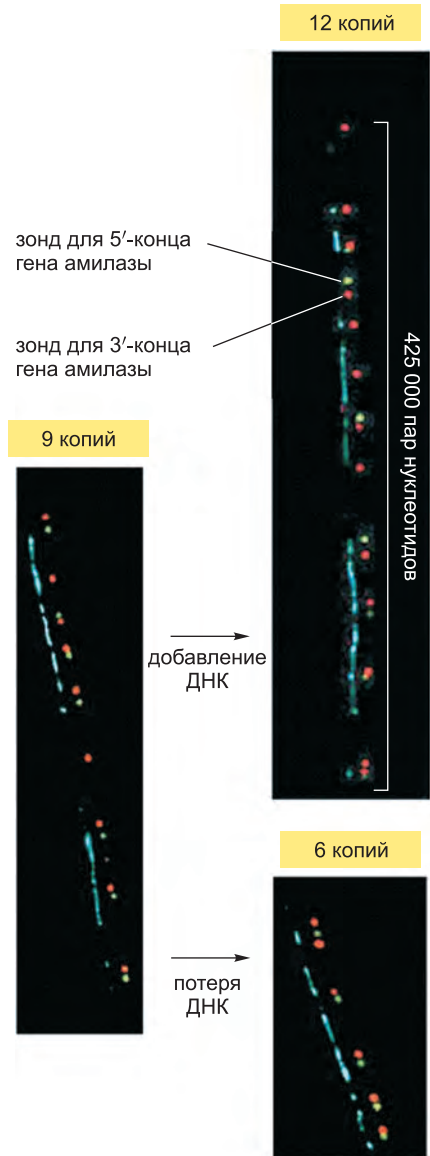
4.5.13. Нейтральные мутации часто распространяются и закрепляются в популяции с вероятностью, зависящей от размера популяции

При сравнении двух видов, которые расходились один от другого в течение миллионов лет, нет особой разницы, какие особи от каждого из этих видов под-

Рис. 4.89. Зрительное отображение частого типа полиморфизма среди людей. Около половины обследованных людей имело по девять копий гена амилазы (слева), который кодирует важный фермент, переваривающий крахмал. У других людей обнаружена или потеря ДНК, или дополнительная ДНК, что дало начало видоизмененной хромосоме, имеющей либо делецию (потеря), либо дупликацию (дополнение) в этой области. Чтобы получить эти изображения, растянутые волокна хроматина гибридизировали с окрашенными в разный цвет зондами, нацеленными на два конца гена амилазы, как и показано на рисунке. Синие линии обозначают общие пути хроматина. Они были определены вторым красителем и смещены на одну сторону для ясности картины. (Переработано на основе A. J. Lafrate et al., *Nat. Genet.* 36: 949–951, 2004. С великодушного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

лежат сравнению. Например, типичные последовательности ДНК человека и шимпанзе отличаются друг от друга примерно на 1 %. Напротив, когда одна и та же область генома отобрана от двух разных людей, различия, как правило, составляют менее 0,1 % (внутривидовый полиморфизм, например у дрозофилы, составляет примерно 1%, а у асцидий может достигать 10% — прим.ред.). У более отдаленно связанных организмов межвидовые различия затмевают внутривидовую изменчивость еще более впечатляюще. Однако каждое «закрепленное различие» между человеком и шимпанзе (иными словами, каждое различие, которое в настоящее время является характерным для всех или почти всех представителей обоих видов) возникло как новая мутация в геноме какой-то одной особи. Если размер популяции с внутривидовым скрещиванием особей, в которой произошла мутация, равен N , то начальная частота аллеля новой мутации будет равна $1/(2N)$ для диплоидного организма. Как столь редкая мутация становится закрепленной в популяции и, следовательно, становится характеристикой вида, а не конкретного отдельно взятого генома?

Ответ на этот вопрос зависит от функциональных последствий мутации. Если мутация оказывает весьма пагубное воздействие на организм, то она попросту будет изъята естественным отбором и, таким образом, не получит закрепления. (В самом крайнем случае особь, несущая в себе эту мутацию, умрет, не дав потомства.) Наоборот, редкие мутации, которые придают унаследовавшим их особям значительное преимущество в плане воспроизводства, могут быстро распространиться



в популяции. Поскольку людям свойственно половое размножение и при всяком образовании гаметы происходит генетическая рекомбинация (обсуждается в главе 5), геном каждого представителя, который унаследовал данную мутацию, будет представлять собой уникальную рекомбинационную мозаику сегментов, унаследованных от большого числа предков. Отобранная мутация, наряду с близлежащей последовательностью, — в конечном счете унаследованной от особи, в которой мутация произошла, — будет всего лишь одним из элементов в этой огромной мозаике.

Подавляющее большинство мутаций, которые не приносят вреда, не дают вместе с тем и никакой выгоды. Такие нейтральные для отбора мутации также могут распространяться и получать закрепление в популяции — и они вносят большой вклад в эволюционное изменение геномов. Их распространение не столь стремительно, как распространение редких чрезвычайно полезных мутаций. Процесс, которым такое нейтральное генетическое видоизменение передается последующим поколениям в идеализированной внутренне скрещивающейся популяции, может быть математически описан уравнениями, которые удивительно просты. Идеализированная модель, которая оказалась наиболее полезной для анализа генетической изменчивости у человека, основана на допущении о постоянном размере популяции и случайном скрещивании, а также о нейтральности мутаций для отбора. Хотя ни одно из первых двух допущений не подходит для описания истории популяции

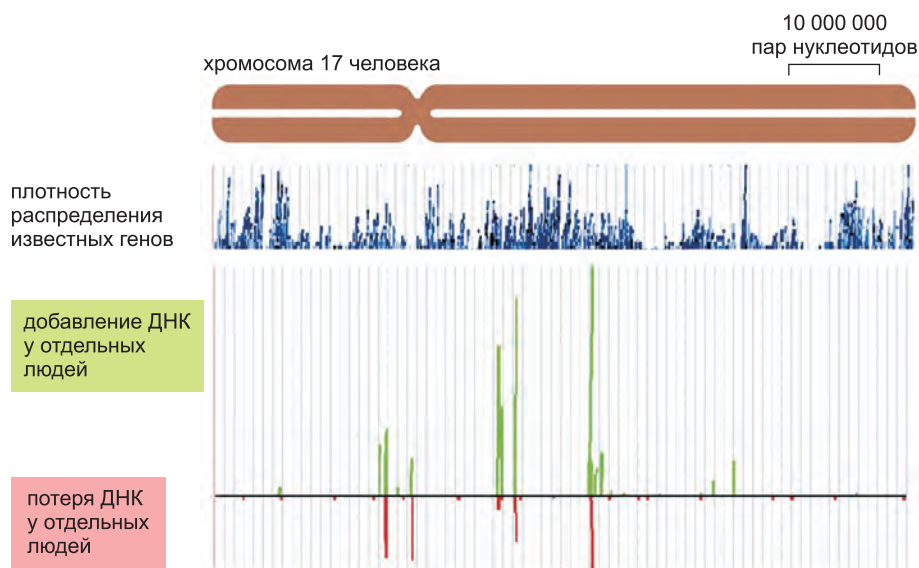


Рис. 4.90. Определение вариантов числа копий хромосомы 17 человека. Анализ на микрочипах ДНК позволяет определить число копий последовательностей ДНК по всей длине хромосомы. Проанализировав этим методом хромосому 17 у 100 человек, получили распределение приобретенной ДНК (зеленые полоски) и потерянной ДНК (красные полоски) в сравнении с произвольно выбранной опорной последовательностью. Самые короткие красные и зеленые полоски представляют единичное появление среди 200 исследованных хромосом, тогда как более длинные полоски указывают, что соответственно приобретение или потеря встречаются с большей частотой. Результаты показывают наличие областей, в которых данные видоизменения преимущественно происходят, как правило, к ним относятся либо участки, которые уже содержат блоки сегментных дупликаций, либо близлежащие к ним области. Многие видоизменения распространяются на известные гены. (Переработано из J. L. Freeman et al., *Genome Res.* 16: 949–961, 2006. С любезного разрешения Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

человека, они тем не менее служат удобной отправной точкой для анализа внутривидовой изменчивости.

Когда новая нейтральная мутация возникает в стационарной популяции размера N , в которой происходит случайное спаривание, вероятность того, что эта мутация в конечном счете станет закрепленной, приблизительно равна $1/(2N)$. Для тех мутаций, которые становятся закрепленными, среднее время закрепления приблизительно равно $4N$ поколений. Доскональный анализ данных о генетической изменчивости человека предполагает размер популяции предков приблизительно 10 000 в течение периода, когда текущая картина генетической изменчивости в основном устанавливалась. Для популяции, достигшей этого объема, вероятность того, что новая нейтральная для отбора мутация станет закрепленной, невелика ($5 \cdot 10^{-5}$), тогда как среднее время для закрепления будет порядка 800 000 лет (при допущении о 20-летнем сроке смены поколений). Таким образом, исходя из того что, как мы знаем, популяция человека выросла гигантскими темпами со времени развития земледелия около 15 000 лет назад, основная доля современного набора общих генетических вариантов человека отражает смесь вариантов, которые уже присутствовали задолго до этого времени — тогда, когда популяция человека была еще слишком мала, для того чтобы они могли распространиться среди всех ее членов.

4.5.14. Многое можно узнать, изучая изменчивость у людей

Даже при том что основная доля изменчивости среди современных людей происходит из изменчивости, имевшей место в сравнительно крошечной группе предков, число видоизменений очень велико. Одним важным источником изменчивости, о котором не было известно долгие годы, является наличие многочисленных дупликаций и удалений (делеций) крупных блоков ДНК. Согласно одной оценке, когда любой отдельно взятый человек сравнивается со стандартным опорным геномом, занесенным в базу данных, можно ожидать обнаружения примерно 100 различий, в том числе представленных длинными блоками последовательности. Одни из таких «вариаций числа копий» будут встречаться довольно часто (рис. 4.89), тогда как другие будут наличествовать только у меньшинства людей (рис. 4.90). В первичной выборке почти половина будет содержать известные гены. В ретроспективном ракурсе такой тип изменчивости неудивителен, учитывая историю эволюции геномов позвоночных, богатую приобретениями ДНК и потерями ДНК (например, см. рис. 4.79).

Внутривидовые видоизменения, которые были наиболее интенсивно охарактеризованы, — **полиморфизмы отдельных нуклеотидов** (single-nucleotide polymorphisms — SNP). Это попросту точки в последовательности генома, в которых одна весомая доля популяции человека имеет один нуклеотид, тогда как другая значительная доля имеет другой нуклеотид. Два генома человека, выбранных в популяции современного мира наугад, будут отличаться приблизительно в $2,5 \cdot 10^6$ таких участков (то есть на 1 из 1300 пар нуклеотидов). Как будет описано в кратком обзоре генетики в главе 8, картированные участки в геноме человека, которые являются **полиморфными**, — это означает, что есть достаточная вероятность (обычно более 1 %) того, что геномы двух индивидуумов будут отличаться на этом участке, — являются чрезвычайно полезными для проведения генетического анализа, в котором исследователь пытается связать определенные черты (фенотипы) с определенными последовательностями ДНК для медицинских или научных целей (см. стр. 560).

На фоне обычных полиморфизмов SNP-типа, унаследованных от наших доисторических предков, выделяются некоторые последовательности с исключительно высокой частотой мутаций. Впечатляющим примером служат СА-повторения, которые являются вездесущими в геноме человека и в геномах других эукариот. Последовательности с мотивом $(CA)_n$ реплицируются с относительно низкой точностью из-за проскальзывания, которое происходит между матричной и новосинтезированной нитями в ходе репликации ДНК; следовательно, точное значение n может изменяться в широком диапазоне от одного генома к другому. Такие повторы служат идеальными генетическими маркерами на основе ДНК, так как большинство людей гетерозиготны — несут два значения n в любом отдельном СА-повторе, унаследовав одну длину повтора (n) от своей матери, другую длину повтора — от своего отца. Поскольку величина n изменяется достаточно редко, так как в большинстве случаев передача СА-повторов от родителя к ребенку воспроизводится точно, потому изменения достаточно часты, для того чтобы поддерживать высокие уровни гетерозиготности в популяции человека. Поэтому эти и некоторые другие простые повторы, которые демонстрируют исключительно высокую изменчивость, обеспечивают основу для идентификации индивидов на основе анализа ДНК — при расследовании преступлений, тяжбах по установлению отцовства и других судебных процессах (см. [рис. 8.47](#)).

Тогда как большинство полиморфизмов SNP-типа и вариаций числа копий в последовательности генома человека, как думают, никак не влияет на фенотип, их набор, должно быть, отвечает почти что за все наследственные стороны индивидуальности человека. Мы знаем, что даже изменение одного-единственного нуклеотида, которое приводит к изменению одной аминокислоты в белке, может вызвать серьезную болезнь, как, например, в случае серповидно-клеточной анемии, которая обусловлена подобного рода мутацией гемоглобина. Мы знаем также и то, что доза гена — удвоение или ополовинивание числа копий некоторых генов — может иметь глубокое воздействие на развитие человека за счет изменения уровня продукта гена. Поэтому есть все основания предполагать, что некоторые из многих различий между любыми двумя индивидуумами будут оказывать существенные последствия на здоровье, физиологию и поведение человека, будь они полиморфизмами отдельных нуклеотидов или видоизменениями числа копий. Главная проблема в генетике человека состоит в необходимости научиться идентифицировать эти относительно немногочисленные видоизменения, которые являются функционально важными, на просторном фоне нейтральной изменчивости в геномах разных людей.

Заключение

Сравнения нуклеотидных последовательностей современных геномов произвели коренной переворот в нашем представлении об эволюции генома и гена. В силу чрезвычайно высокой

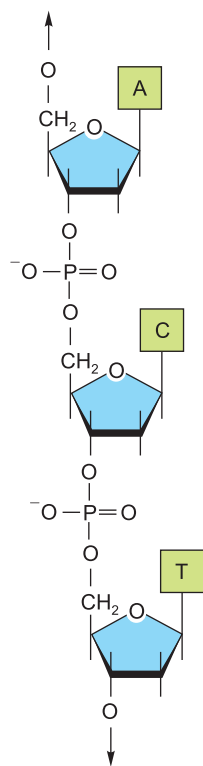


Рис. Q4.1. Тринуклеотид из внутренней части одной цепи ДНК (к задаче 4.7). Стрелки на концах нити ДНК указывают на то, что структура продолжается в обоих направлениях.

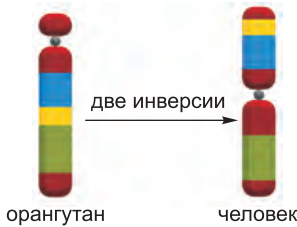


Рис. Q4.2. Хромосома 3 у орангутанов и человека (к задаче 4.9). По-разному окрашенные блоки указывают сегменты хромосом, которые были получены в ходе предшествующих слияний.

точности процессов репликации и репарации ДНК случайные ошибки в последовательностях нуклеотидов в геномах происходят настолько редко, что только приблизительно один нуклеотид из 1000 изменяется каждый миллион лет в любой отдельно взятой последовательности поколений. Поэтому неудивительно, что сравнение хромосом человека и шимпанзе — которых разделяет примерно 6 миллионов лет эволюции, — показывает очень немного изменений. Мало того что наши гены, по существу, одни и те же, но и их порядок на всех хромосомах почти одинаков. Хотя за минувшие 6 миллионов лет произошло значительное число сегментных дупликаций и сегментных делеций, но даже позиции подвижных генетических элементов, которые составляют основную долю нашей некодирующей ДНК, в большинстве своем не изменились.

При сравнении геномов двух менее родственных организмов — например, человека и мыши, отделенных друг от друга примерно 80 миллионами лет, — обнаружено намного больше изменений. Сегодня результаты работы естественного отбора заметны невооруженным глазом: проходя горнило очищающего отбора, жизненно важные последовательности нуклеотидов — как в регуляторных областях, так и в кодирующих последовательностях (последовательности экзонов) — были в высшей степени консервативны. Напротив, не представляющие особого значения последовательности (например, большая часть ДНК в интронах) изменились до такой степени, что точное выравнивание согласно родословной зачастую оказывается невозможным.

Благодаря очищающему отбору сравнение последовательностей геномов множества родственных видов является особенно действенным способом поиска последовательностей ДНК с жизненно важными функциями. Хотя около 5 % генома человека осталось консервативным в результате очищающего отбора, функции основной массы этой ДНК (десятки тысяч многовидовых консервативных последовательностей) продолжают оставаться необъяснимой тайной. Грядущие эксперименты по выяснению их функции должны преподать нам многое о биологии позвоночных.

Сравнение других последовательностей

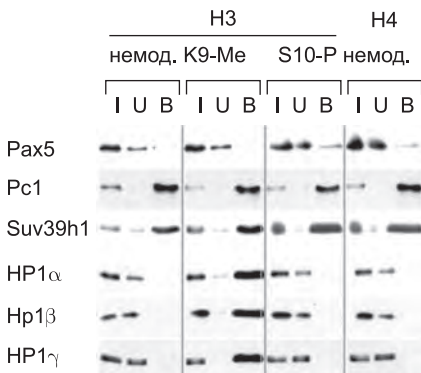


Рис. Q4.3. Анализ «pull-down», призванный определить специфичность связывания белков HP1 (к задаче 4.13). После разделения посредством электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия каждый белок слева был обнаружен при помощи иммуноблоттинга с использованием специфических антител. Для N-концевого пептида каждого гистона обозначены поступивший на анализ белок (I), несвязавшийся (U) и связавшийся с гранулами белок (B). (Переработано из M. Lachner et al., *Nature* 410: 116–120, 2001. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

показывает, что огромная генетическая сложность современных организмов обусловлена расширением древних семейств генов. Ясно, что главным источником генетической новизны в ходе эволюции была дупликация ДНК, сопровождающаяся дивергенцией последовательностей. Геномы любых двух человек будут отличаться друг от друга как из-за замен нуклеотидов (полиморфизмов отдельных нуклеотидов, или *SNP*), так и из-за унаследованных приобретений ДНК и потерь ДНК, которые влекут за собой изменения в числе копий. Понимание этих различий пойдет на пользу и медицине, и нашему осмыслению биологии человека.

Задачи

Какие утверждения являются верными? Обоснуйте свой ответ

4.1. У женщин имеется 23 различные хромосомы, а у мужчин — 24.

4.2. При сравнении ДНК родственных организмов, таких как человек и мышь, идентификация консервативных последовательностей ДНК облегчает поиск функционально значимых областей.

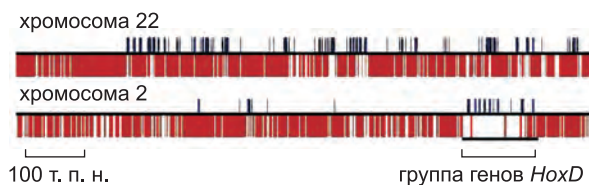


Рис. Q4.4. Подвижные генетические элементы и гены в областях протяженностью 1 млн. п. н. хромосом 2 и 22 (задача 4.14). Линии, которые направлены *вверх*, показывают экзоны известных генов. Линии, которые направлены *вниз*, показывают подвижные генетические элементы; они настолько многочисленны (образуя более 40% генома человека), что сливаются почти в сплошную полосу вне групп *Hox*. (Переработано на основе E. Lander et al., *Nature* 409: 860–921, 2001. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

4.3. Четыре стержневых гистона представляют собой относительно маленькие белки с очень высокой долей положительно заряженных аминокислот; положительный заряд помогает гистонам прочно связывать ДНК — независимо от ее нуклеотидной последовательности.

4.4. Нуклеосомы связывают ДНК настолько сильно, что не могут сдвинуться относительно позиций, в которых были изначально собраны.

4.5. Дупликация и расхождение генов, как думают, сыграло определяющую роль в эволюции все возрастающей биологической сложности.

Обсудите следующие проблемы

4.6. ДНК, выделенная из поражающего бактерии вируса M13, содержит 25% А, 33% Т, 22% С и 20% G. Не кажутся ли вам эти результаты необычными? Почему? Как вы могли бы объяснить эти значения?

4.7. На **рис. Q4.1** показан сегмент ДНК внутренней части одной цепи. Какова полярность этой ДНК в направлении сверху вниз?

4.8. ДНК человека содержит 20% С по молярности. Каковы молярные доли А, G и Т в процентах?

4.9. Хромосома 3 у орангутанов отличается от хромосомы 3 у человека двумя событиями инверсии (**рис. Q4.2**). Нарисуйте промежуточную хромосому, которая получилась в результате первой инверсии, и точно обозначьте сегменты, вошедшие в каждую из инверсий.

4.10. Исходя из допущения о том, что 30-нм хроматиновое волокно содержит приблизительно 20 нуклеосом (200 пар нуклеотидов на нуклеосому) на 50 нм длины, вычислите степень уплотнения ДНК на этом уровне структуры хроматина. Какая доля 10000-кратного уплотнения, которое происходит во время митоза, приходится на этот уровень упаковки ДНК?

4.11. В отличие от ацетилирования гистонов, которое всегда связано с активацией гена, метилирование гистонов может повлечь за собой как активацию, так и подавление транскрипции. Каким образом, согласно вашим предположениям, одна и та же модификация — метилирование — может опосредствовать различные биологические функции?

4.12. Почему хромосома с двумя центромерами (дидцентрическая хромосома) неустойчива? Разве дублирующая центромера не будет полезна для хромосомы, давая ей две возможности формировать кинетохор и прикрепиться к микротрубочкам во время митоза? Разве это не помогло бы гарантировать, что хромосома не будет оставлена без внимания в процессе митоза?

4.13. Белки HP1 (семейство белков, найденных в гетерохроматине) задействованы в заглушении генов и формировании структуры хроматина. Три белка, специфических для человека: HP1 α , HP1 β и HP1 γ , — делят между собой высококонсервативный хромодомен, который, как думают, определяет локализацию гетерохроматина. Для того чтобы определить, могут ли эти белки связываться с N-концом гистона H3, вы ковалентно присоединили к гранулам сорбента различные варианты N-концевого пептида H3: немодифицированного, Lys-9-диметилированного (K9-Me) или Ser-10-фосфорилированного (S10-P), — наряду с немодифицированным хвостом гистона H4. Такая конструкция позволяет вам инкубировать каждый вид полученных гранул с различными белками, смывать несвязавшиеся белки и затем элюировать связанные с гранулами белки для последующего анализа всех полученных фракций посредством вестерн-блоттинга. Результаты вашего «pull-down» анализа (разновидность аффинной хроматографии, очень похожая на метод соосаждения с антителами, или ко-иммунопреципитацию, но вместо антител в данном случае используется «bait» protein — «белок-наживка». — *Прим. ред.*) для белков HP1 представлены на **рис. Q4.3**, наряду с результатами для нескольких контрольных белков, в том числе Pax5 (регуляторного белка), принадлежащего к семейству polycomb белка Pcl, который, как известно, связывается с гистонами, и Suv39hl — гистонметилтрансферазы.

На основании этих результатов скажите, которые из проанализированных белков связываются с немодифицированными хвостами гистонов? Связывается ли какой-либо из белков HP1 и контрольных белков избирательно с модифицированными N-концевыми пептидами гистонов? Какая модификация гистонов, по вашим предсказаниям, могла бы быть обнаружена в гетерохроматине?

4.14. Подвижные части ДНК — подвижные генетические элементы, — которые встраиваются в хромосомы и накапливаются в ходе эволюции, составляют более 40% генома человека. Подвижные генетические элементы четырех типов: длинные рассеянные элементы (LINEs), короткие рассеянные элементы (SINEs), LTR-ретротранспозоны и ДНК-транспозоны — вставлены более или менее беспоря-

дочно всюду по геному человека. Эти элементы заметно реже встречаются в четырех группах генов гомеобокс: *НохА*, *НохВ*, *НохС* и *НохD*, как продемонстрировано на примере *НохD* на [рис. Q4.4](#), наряду с эквивалентной областью хромосомы 22, в которой отсутствует группа *Нох*. Каждая группа *Нох* имеет приблизительно 100 т.п.н. в длину и содержит от 9 до 11 генов, дифференциальная экспрессия которых вдоль передне-задней оси развивающегося эмбриона утверждает основное строение организма у людей (и у других животных). Почему, как вы полагаете, подвижные генетические элементы столь редки в группах *Нох*?

Литература

Общая

Hartwell L., Hood L., Goldberg M.L. et al. (2006) *Genetics: from Genes to Genomes*, 3rd ed. Boston: McGraw Hill.

Olson M. V. (2002) The Human Genome Project: a player's perspective. *J. Mol. Biol.* 319: 931–942.

Strachan T. & Read A. P. (2004) *Human Molecular Genetics*. New York: Garland Science.

Wolffe A. (1999) *Chromatin: Structure and Function*, 3rd ed. New York: Academic Press.

Структура и функции ДНК

Avery O. T., MacLeod C. M. & McCarty M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of *pneumococcal* types. *J. Exp. Med.* 79: 137–158.

Meselson M. & Stahl F. W. (1958) The replication of DNA in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44: 671–682.

Watson J. D. & Crick F. H. C. (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acids. *Nature* 171: 737–738.

Хромосомная ДНК и ее упаковка в хроматиновое волокно

Jin J., Cai Y., Li B. et al. (2005) In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem. Sci.* 30: 680–687.

Kornberg R. D. & Lorch Y. (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98: 285–294.

Li G., Levitus M., Bustamante C. & Widom J. (2005) Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. *Nature Struct. Mol. Biol.* 12: 46–53.

Lorch Y., Maier-Davis B. & Kornberg R. D. (2006) Chromatin remodeling by nucleosome disassembly *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 3090–3093.

Luger K., Mader A. W., Richmond R. K. et al. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251–260.

Luger K. & Richmond T. J. (1998) The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 140–146.

Malik H. S. & Henikoff S. (2003) Phylogenomics of the nucleosome *Nature Struct. Biol.* 10: 882–891.

Ried T., Schrock E., Ning Y. & Wienberg J. (1998) Chromosome painting: a useful art. *Hum. Mol. Genet.* 7: 1619–1626.

Robinson P. J. & Rhodes R. (2006) Structure of the 30 nm chromatin fibre: A

key role for the linker histone. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16: 1–8.

Saha A., Wittmeyer J. & Cairns B. R. (2006) Chromatin remodeling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 437–446.

Woodcock C. L. (2006) Chromatin architecture. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16: 213–220.

Регуляция на уровне структурной организации хроматина

Egger G., Liang G, Aparicio A. & Jones P. A. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429: 457–463.

Henikoff S. (1990) Position-effect variegation after 60 years. *Trends Genet* 6: 422–426.

Henikoff S & Ahmad K (2005) Assembly of variant histones into chromatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 133–153.

Gaszner M. & Felsenfeld G. (2006) Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nature Rev. Genet.* 7: 703–713.

Hake S. B. & Allis C. D. (2006) Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the “H3 barcode hypothesis.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 6428–6435.

Jenuwein T. (2006) The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS J.* 273: 3121–3135.

Martin C. & Zhang Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 838–849.

Mellone B., Erhardt S. & Karpen G. H. (2006) The ABCs of centromeres. *Nature Cell Biol.* 8: 427–429.

Peterson C. L. & Laniel M. A. (2004) Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* 14: R546–R551.

Ruthenburg A. J., Allis C. D. & Wysocka J. (2007) Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol. Cell* 25: 15–30.

Shahbazian M. D. & Grunstein M. (2007) Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 75–100.

Организация хромосом

Akhtar A. & Gasser S. M. (2007) The nuclear envelope and transcriptional control. *Nature Rev. Genet.* 8: 507–517.

Callan H. G. (1982) Lampbrush chromosomes. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B* 21: 417–448.

Chakalova L., Debrand E., Mitchel J. A. et al. (2005) Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. *Nature Rev. Genet.* 6: 669–678.

Cremer T., Cremer M., Dietzel S. et al. (2006) Chromosome territories – a functional nuclear landscape. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18: 307–316.

Ebert A., Lein S., Schotta G. & Reuter G. (2006) Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Chromosome Res.* 14: 377–392.

Fraser P. & Bickmore W. (2007) Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* 447: 413–417.

Handwerker K. E. & Gall J. G. (2006) Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends Cell Biol.* 16: 19–26.

Hirano T. (2006) At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 311–322.

5

Репликация, репарация и рекомбинация ДНК

Способность клеток поддерживать высокую упорядоченность в море вселенского хаоса зависит от точного дублирования огромного количества генетической информации, записанной в химической форме в виде ДНК. Этот процесс, названный *репликацией ДНК*, должен произойти прежде, чем клетка сможет произвести две генетически тождественные дочерние клетки. Поддержание порядка требует также неустанного надзора за этой генетической информацией и своевременного ее восстановления, потому что ДНК в клетках часто повреждается поступающими из окружающей среды химикатами и радиацией, а также перегревами и реакционноспособными молекулами, производимыми в самой клетке. В этой главе мы описываем белковые машины, которые реплицируют и восстанавливают ДНК клетки. Эти машины катализируют некоторые из самых быстрых и точных процессов, протекающих в клетках, и их механизмы во всем своем великолепии показывают изящество и эффективность химии клеток.

Тогда как непродолжительная жизнь клетки может зависеть от предотвращения изменений в ее ДНК, длительное выживание вида требует, чтобы последовательности ДНК могли изменяться в масштабе смены множества поколений. Несмотря на огромные усилия, которые клетки прилагают ради предохранения своей ДНК, эпизодические изменения в последовательностях ДНК все же происходят. С течением времени такие изменения становятся основой генетической изменчивости, на которую естественный отбор оказывает свое воздействие в ходе эволюции организмов.

Мы начинаем эту главу с краткого обсуждения изменений, которые происходят в ДНК при передаче из поколения в поколение. Затем мы обсудим механизмы клетки — репликации ДНК и репарации ДНК, — которые отвечают за сведение такого рода изменений к минимуму. Наконец, мы рассмотрим некоторые из наиболее интересных механизмов изменения последовательности ДНК, — это механизмы рекомбинации ДНК, в том числе и перемещение по хромосомам специфических последовательностей ДНК, названных подвижными генетическими элементами.

5.1. Сохранение последовательностей ДНК в ходе эволюции

Хотя, как только что было сказано, случайные генетические изменения способствуют длительному выживанию вида, для выживания отдельно взятой особи требуется высокая степень генетической стабильности. Лишь изредка процессы

поддержания неизменности ДНК клетки дают сбой, приводящий к необратимому изменению в ДНК. Такое изменение называют **мутацией**, и оно может привести к гибели организма, если произойдет в жизненно важной позиции последовательности ДНК.

5.1.1. Частоты мутаций чрезвычайно низки

Частота мутаций — частота, с которой в последовательностях ДНК происходят заметные изменения, — может быть определена непосредственно из экспериментов, проводимых над бактерией вроде *Escherichia coli* — объект, получивший постоянную прописку в нашем кишечном тракте и часто привлекаемый к лабораторным опытам (о чем было сказано в главе 1). В стенах лабораторий *E. coli* делится примерно один раз каждые 40 минут, и одна единственная клетка способна породить огромную популяцию — несколько миллиардов — менее чем за день. В такой популяции возможно обнаружить маленькую долю бактерий, которые перенесли повреждающую мутацию в определенном гене — если этот ген не требуется для выживания бактерии. Например, частота мутаций гена, необходимого клеткам для того, чтобы использовать сахар лактозу в качестве источника энергии, может быть определена, когда клетки выращиваются в присутствии иного сахара, например глюкозы. Доля поврежденных генов служит заниженной оценкой действительной частоты мутаций, потому что многие мутации, по природе своей, *молчащие* (например, те, что изменяют кодон, но при этом не сопровождаются заменой кодируемой им аминокислоты, или же те, что заменяют аминокислоту, но не затрагивают функцию белка, кодируемого поврежденным геном). С поправкой на такие молчащие мутации получается, что индивидуальный ген, который кодирует белок среднего размера ($\approx 10^3$ кодирующих пар нуклеотидов), накапливает мутацию (не обязательно такую, которая инактивировала бы белок) примерно один раз в приблизительно 10^6 поколениях клеток бактерий. Иначе говоря, частота мутаций в бактериях составляет приблизительно изменение 1 нуклеотида на 10^9 нуклеотидов в одном поколении клеток.

Недавно появилась возможность измерять частоту мутаций непосредственно в зародышевой линии клеток более сложных, воспроизводящихся половым путем организмах, например нематоды *C. elegans*. Этих червей, у которых время генерации составляет 4 суток, выращивали на протяжении многих поколений, используя свойственный им способ воспроизводства путем самооплодотворения (обсудим в главе 22). Затем определяли последовательности ДНК большой области генома для многих различных червей-потомков и сравнивали их с соответствующей последовательностью червя-прародителя. Этот анализ показал, что в среднем две новые мутации (главным образом короткие вставки и делеции) возникают в гаплоидном геноме очередного поколения. Если принять во внимание число делений клеток, необходимых для производства сперматозоидов и яйцеклеток, то частота мутаций окажется приблизительно равной 1 на 10^9 нуклеотидов за одно деление клетки — частота, поразительно схожая с таковой для размножающейся бесполом путем *E. coli*, описанной выше.

Прямое измерение частоты мутаций в зародышевой линии клеток млекопитающих сложнее, но косвенные оценки получить возможно. Один из способов состоит в сравнении аминокислотных последовательностей одного и того же белка у нескольких видов. Долю аминокислот, которые отличаются между любыми двумя видами, можно затем сравнить и оценить по числу лет, прошедших с момента расхождения

этой пары видов от их общего предка, что устанавливается по палеонтологическим данным. Прибегнув к этому методу, можно вычислить число лет, которое проходит в среднем, прежде чем наследуемое изменение в аминокислотной последовательности белка становится закрепленным в организме. Поскольку каждое такое изменение обычно отражает изменение одного нуклеотида в последовательности ДНК гена, кодирующего этот белок, постольку мы можем употребить эту величину для оценки среднего числа лет, необходимого для возникновения единичной устойчивой мутации в соответствующем гене.

Такие вычисления будут почти всегда существенно занижать действительную частоту мутаций, потому что многие мутации будут наносить урон функции белка и исчезать из популяции в силу естественного отбора, то есть в результате преимущественной гибели несущих такие мутации организмов. Но последовательность одного семейства белковых фрагментов, кажется, не имеет особого значения, благодаря чему гены, которые их кодируют, могут накапливать мутации без отбраковки естественным отбором. Это *фибринопептиды* — фрагменты длиной двадцать аминокислот, которые удаляются из молекулы, когда белок *фибриноген* активируется и образует *фибрин* во время свертывания крови. Так как функция фибринопептидов явно не зависит от последовательности аминокислот, они могут безболезненно переносить замены почти любых из имеющихся в их составе аминокислот. Поэтому сравнения последовательностей фибринопептидов могут быть использованы для оценки частоты мутаций в последовательности зародышевых клеток. Как было установлено по результатам этих исследований, типичный белок из 400 аминокислот претерпевает замену аминокислоты примерно один раз каждые 200 000 лет.

Другой способ оценки частоты мутаций у человека состоит в использовании секвенирования ДНК для сравнения соответствующих последовательностей нуклеотидов непосредственно у близкородственных видов в областях генома, которые, кажется, не несут жизненно важной информации. Как и следовало ожидать, такие сравнения дают оценки частоты мутаций, которые согласуются с полученными в результате опытов с фибринопептидами.

Бактерии *E. coli*, черви и человек сильно отличаются друг от друга как способами воспроизводства, так и временем жизни поколений. И все же, когда присутствующие им частоты мутаций нормализуют по единичному циклу репликации ДНК, они оказываются подобными: при каждом событии репликации ДНК изменяется примерно 1 нуклеотид на 10^9 нуклеотидов.

5.1.2. Для сохранения жизни в существующей форме частота мутаций должна быть низкой

Так как многие мутации пагубны, ни один вид не может позволить их быстрое накопление в клетках своих зародышей. Хотя наблюдаемая частота мутаций низка, она, как думают, все же ограничена числом жизненно важных белков, которые любой организм может кодировать, до, быть может, 50 000. Развивая этот довод, можно утверждать, что если бы частота мутаций была в десять раз выше, то этим ограничила бы организм до примерно 5000 генов первой необходимости. В таком случае эволюция была бы тоже ограничена — организмами значительно менее сложными, чем плодовая мушка.

Клетки воспроизводящегося половым путем организма подразделяются на два типа: **зародышевые клетки** и **соматические клетки**. Зародышевые клетки

передают генетическую информацию от родителя потомству; соматические клетки формируют тело организма (рис. 5.1). Мы убедились, что зародышевые клетки должны быть защищены от высокочастотных мутаций, чтобы поддерживать существование вида. Однако соматические клетки многоклеточных организмов тоже должны быть защищены от генетических изменений, чтобы предохранить каждую особь от порчи. Изменения нуклеотидов в соматических клетках могут дать начало видоизмененным клеткам, некоторые из которых, минуя естественный отбор, быстро разрастаются (пролиферируют) за счет остальной части организма. В крайнем случае результатом будет неконтролируемая пролиферация клеток, известная как рак — болезнь, которая ежегодно вызывает более 20 % смертельных случаев в Европе и Северной Америке. Эти летальные исходы обусловлены в значительной степени накоплением изменений в последовательностях ДНК соматических клеток (обсуждается в главе 23). Резкое возрастание частоты мутаций может вызвать катастрофическое увеличение заболеваемости раком за счет увеличения частоты, с которой возникают видоизмененные соматические клетки. Таким образом, как для сохранения вида с большим числом генов (устойчивость зародышевых клеток), так и для предотвращения рака, обусловленного мутациями в соматических клетках (устойчивость соматических клеток), многоклеточные организмы, как и мы с вами, зависят от удивительно высокой точности, с которой их последовательности ДНК реплицируются и сохраняются.

Заключение

Во всех клетках последовательности ДНК сохраняются и реплицируются с высокой точностью. Частота мутаций, равная приблизительно одному измененному нуклеотиду на 10^9 нуклеотидов при каждой репликации ДНК, примерно одинакова у таких разных организмов, как бактерии и человек. Благодаря столь поразительной точности последовательность генома человека (приблизительно

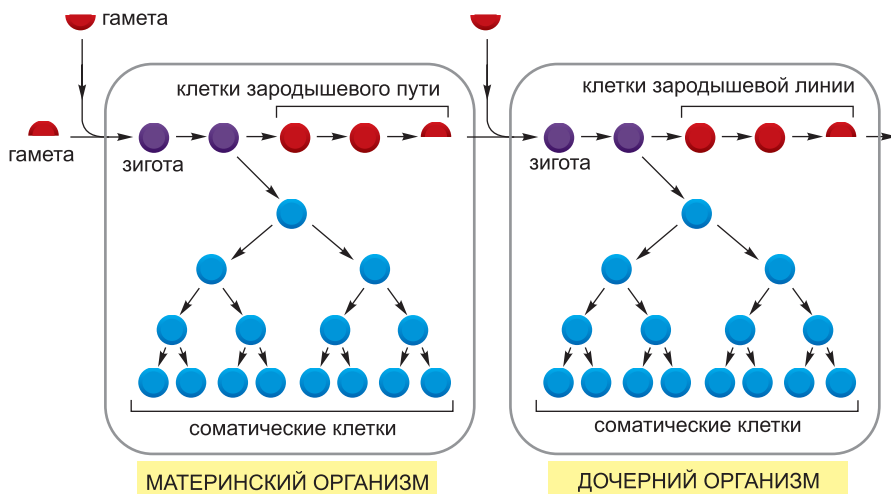


Рис. 5.1. Клетки зародышевой линии и соматические клетки выполняют в корне различные функции. В воспроизводящихся половым путем организмах клетки зародышевой линии (красные) передают генетическую информацию следующему поколению. Соматические клетки (синие), которые формируют тело организма, необходимы для выживания клеток зародышевой линии, но сами не оставляют никакого потомства.

$3 \cdot 10^9$ пар нуклеотидов) изменяется предположительно лишь на 3 нуклеотида при каждом делении клетки. Это позволяет большинству людей передавать точные генетические инструкции от одного поколения другому, равно как и избежать изменений в соматических клетках, которые могли бы привести к раку.

5.2. Механизмы репликации ДНК

Все организмы перед каждым делением клетки должны дублировать свою ДНК с исключительной точностью. В этом параграфе мы исследуем, как замысловатая «репликационная машина» достигает такой точности, причем при дублировании ДНК со скоростью до 1000 нуклеотидов в секунду.

5.2.1. В основе процессов репликации и репарации ДНК лежит принцип комплементарности оснований

Как уже было упомянуто в главе 1, *матричный синтез ДНК* — это механизм, используемый клеткой, чтобы копировать нуклеотидную последовательность одной цепи ДНК в комплементарную последовательность ДНК (рис. 5.2). Этот процесс связан с узнаванием каждого нуклеотида *матричной нити* ДНК (шаблоне) свободным (неполимеризованным) комплементарным нуклеотидом, и это требует отделения двух цепей спирали ДНК друг от друга. В результате такого разобщения донорные и акцепторные группы водородных связей, расположенные на образующих ДНК основаниях, становятся доступными для спаривания с соответствующими свободными нуклеотидами, из числа поступивших «в зону проведения работ», — для осуществления катализируемой ферментом полимеризации в новую цепь ДНК.

Первый полимеризующий нуклеотиды фермент, а именно **ДНК-полимераза**, был открыт в 1957 г. Тогда же было установлено, что свободные нуклеотиды, служащие субстратами для этого фермента, представлены дезоксирибонуклеозидтрифосфатами, а для их полимеризации в ДНК необходима одноцепочечная матрица ДНК. На рис. 5.3 и 5.4 представлен ступенчатый механизм такой реакции.

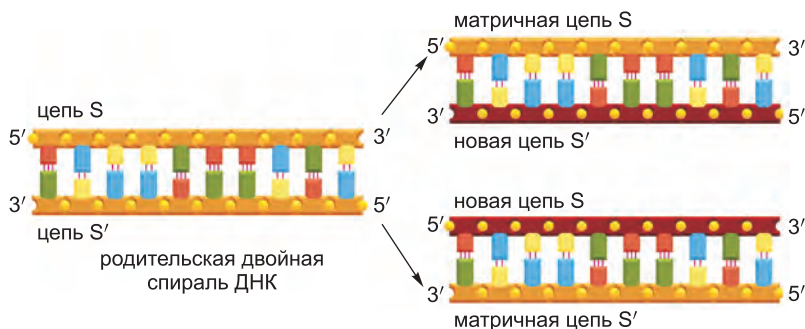


Рис. 5.2. Двойная спираль ДНК служит матрицей для своего собственного дублирования. Поскольку нуклеотид А спаривается лишь с Т, а G — только с С, каждая из цепей ДНК может служить матрицей, определяющей последовательность нуклеотидов в комплементарной ей нити путем спаривания оснований. Благодаря такому механизму двухцепочечная молекула ДНК может копироваться с большой точностью.

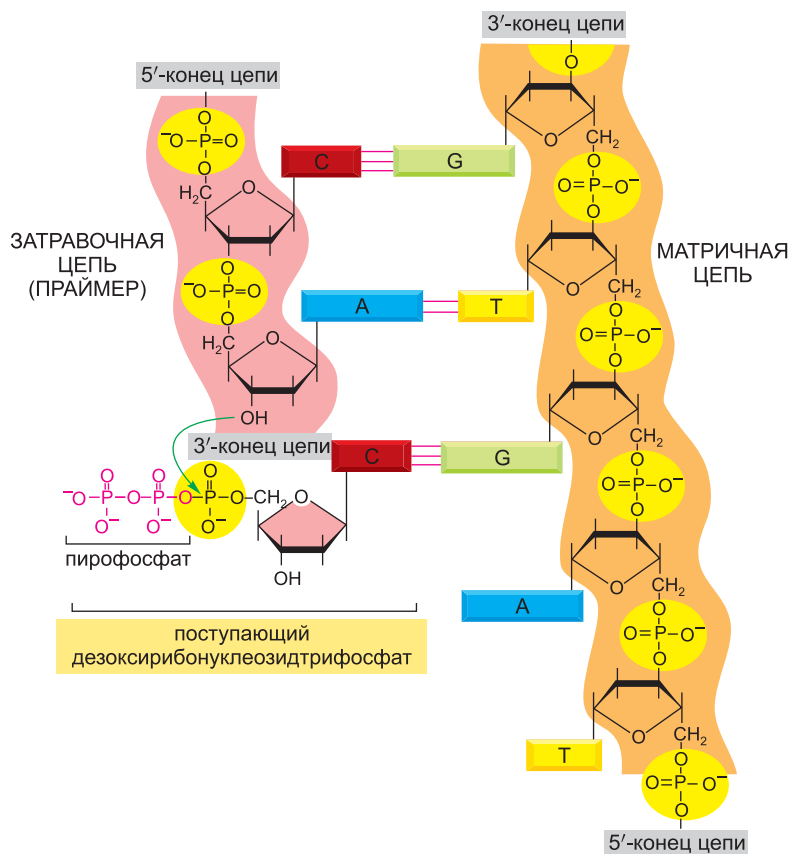


Рис. 5.3. Химия синтеза ДНК. Присоединение дезоксирибонуклеотида к 3'-концу полинуклеотидной цепи (*затравочная цепь*) — основополагающая реакция, посредством которой и синтезируется ДНК. Как показано на рисунке, спаривание оснований между подошедшим к «месту действия» дезоксирибонуклеозидтрифосфатом и существующей цепью ДНК (*матричная цепь*) определяет формирование новой цепи ДНК с комплементарной нуклеотидной последовательностью.

5.2.2. Репликационная вилка ДНК асимметрична

В ходе репликации ДНК в клетке каждая из двух исходных цепей ДНК служит матрицей для формирования полноразмерной новой цепи. Поскольку каждая из двух «дочерей» делящейся клетки наследует новую двойную спираль ДНК, содержащую одну исходную и одну новую цепи (**рис. 5.5**), говорят, что двойная спираль ДНК реплицируется ДНК-полимеразой «полуконсервативно». Как же свершается сие таинство?

Исследования, выполненные в начале 1960-х гг. на целых реплицирующихся хромосомах, показали наличие ограниченной зоны репликации, которая постепенно перемещается по двойной спирали родительской ДНК. В силу Y-образной формы этой активной области ее называют **репликационной, или репликативной, вилкой** (**рис. 5.6**). В зоне репликационной вилки многоферментный комплекс, который содержит ДНК-полимеразу, синтезирует ДНК обеих новых дочерних нитей.

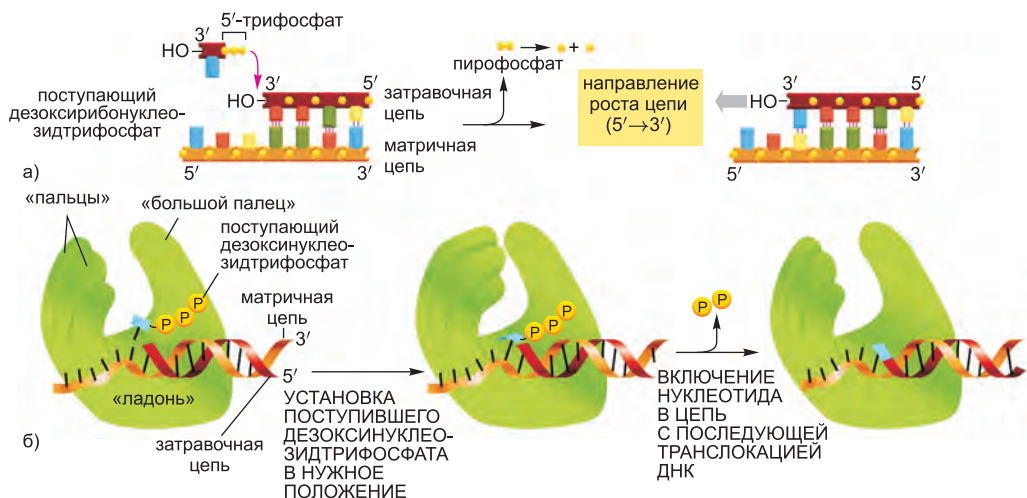


Рис. 5.4. Синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой. а) Как показано на рисунке, ДНК-полимераза катализирует пошаговое присоединение дезоксирибонуклеотида к 3'-ОН концу полинуклеотидной цепи, так называемой *затравочной цепи*, которая спарена со второй, *матричной цепью*. Новосинтезированная нить ДНК поэтому полимеризуется в направлении $5' \rightarrow 3'$, как показано на предыдущем рисунке. Поскольку каждый прибывающий дезоксирибонуклеозидтрифосфат должен спариться с матричной нитью, чтобы быть опознанным ДНК-полимеразой, постольку эта нить и определяет, который из четырех возможных дезоксирибонуклеотидов (А, С, G или Т) будет присоединен. Реакция осуществляется за счет значительного по величине благоприятного изменения свободной энергии, что обусловлено высвобождением пиррофосфата с последующим гидролизом до двух молекул неорганического фосфата.

б) Форма молекулы ДНК-полимеразы, определенная рентгеноструктурным анализом. Грубо говоря, ДНК-полимеразы напоминают правую руку, в которой ладонь, пальцы и большой палец¹ «загребают» ДНК и образуют активный участок. В изображенной последовательности правильное расположение прибывшего к месту действия дезоксирибонуклеозидтрифосфата побуждает пальцы полимеразы сомкнуться, что инициирует реакцию присоединения нуклеотида. Диссоциация пиррофосфата вызывает размыкание пальцев и перемещение (транслокацию) ДНК на один нуклеотид, так что активный участок полимеразы готов принять следующий дезоксирибонуклеозидтрифосфат.

Первоначально простейший механизм репликации ДНК представляли как непрерывное наращивание обеих новых цепей, нуклеотид за нуклеотидом, в репликационной вилке, по мере того как она перемещается от одного конца молекулы ДНК к другому. Но в силу антипараллельной ориентации двух цепей ДНК в двойной спирали (см. рис. 5.2) при таком механизме одна дочерняя нить должна была бы полимеризоваться в направлении $5' \rightarrow 3'$, а вторая — в направлении $3' \rightarrow 5'$. Для такой репликационной вилки потребовалось бы два разных типа фермента ДНК-полимеразы. Однако все множество ДНК-полимераз, которые открыты к настоящему времени, может осуществлять синтез лишь в направлении $5' \rightarrow 3'$.

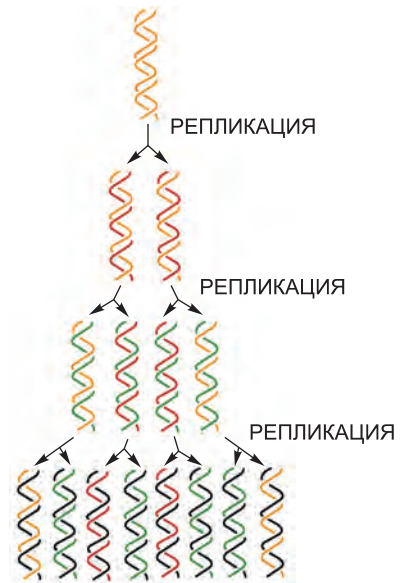
Как же в таком случае наращивается цепь ДНК в направлении $3' \rightarrow 5'$? Сначала ответ предложили на основании результатов эксперимента, выполненного в конце 1960-х гг. Исследователи добавили высокорadioактивный ^3H -тимидин к делящимся бактериям на несколько секунд, чтобы радиоактивная метка попала только в ДНК, реплицированную позже всех, в последний момент, то есть находящуюся сразу за

¹ Оригинальное название — наладонник. — Прим. пер.

Рис. 5.5. Полуконсервативный характер репликации ДНК. В одном цикле репликации каждая из двух цепей ДНК используется в качестве матрицы для образования комплементарной ей цепи ДНК. Поэтому исходные цепи остаются неизменными на протяжении многих поколений клеток.

репликационной вилкой. Этот эксперимент выявил кратковременно существующие фрагменты ДНК длиной 1000–2000 нуклеотидов, которые теперь широко известны как *фрагменты Оказаки*, в растущей репликационной вилке. (Позднее, подобные промежуточные продукты репликации были обнаружены и у эукариот, где они имеют длину всего лишь 100–200 нуклеотидов.) Показано, что фрагменты Оказаки полимеризуются только в направлении цепи 5' → 3' и присоединяются друг к другу после их синтеза с образованием длинных цепей ДНК.

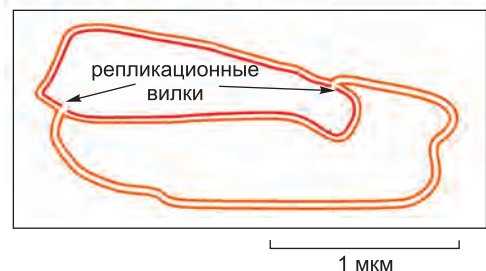
Репликационная вилка поэтому имеет асимметричную структуру (рис. 5.7). Дочерняя нить ДНК, которая синтезируется непрерывно, известна как **ведущая (лидирующая)**, или **опережающая, цепь**. Ее синтез немного опережает синтез дочерней нити, которая синтезируется с перерывами и известна как **отстающая**, или **запаздывающая, цепь**. В отстающей нити полимеризация нуклеотидов идет в направлении, встречном общему наращиванию цепи ДНК. Синтез этой нити прерывистым механизмом «обратных стежков» означает, что для репликации ДНК необходима лишь ДНК-полимераза типа 5' → 3'.



5.2.3. Высокую точность репликации ДНК обеспечивают несколько корректирующих механизмов

Как мы говорили выше, точность копирования ДНК в ходе репликации такова, что на каждые 10^9 скопированных нуклеотидов возникает не более 1 ошибки. Такая точность намного выше, чем можно было бы ожидать от точности комплементарного спаривания оснований. Стандартные

Рис. 5.6. Две репликационные вилки, движущиеся в противоположных направлениях по кольцевой хромосоме. Активная зона репликации ДНК перемещается последовательно по реплицируемой молекуле ДНК, создавая Y-образную структуру ДНК, известную как репликационная вилка: два плеча каждой Y-образной структуры суть две молекулы дочерней ДНК, а стембель Y-образной структуры есть спираль родительской ДНК. На этой схеме родительские нити **оранжевые**; новосинтезированные нити **красные**. (За предоставленную микрофотографию мы благодарим Jerome Vinograd.)



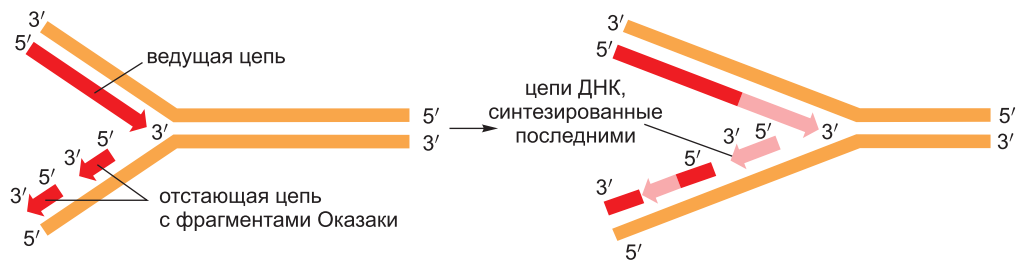


Рис. 5.7. Структура репликационной вилки ДНК. Поскольку обе цепи дочерней ДНК полимеризуются в направлении $5' \rightarrow 3'$, ДНК, синтезируемая на отстающей нити, должна изначально синтезироваться в виде ряда коротких молекул ДНК, названных *фрагментами Оказаки*. Фрагменты Оказаки синтезируются на отстающей нити последовательно, при этом чем они ближе к вилке, тем «новее».

комплементарные пары оснований (см. рис. 4.4) — не единственно возможные. Например, с маленькими изменениями в геометрии спирали между G и T в ДНК могут образовываться две водородные связи. Кроме того, кратковременно возникают редкие таутомерные формы четырех оснований ДНК в отношении 1 на 10^4 или 10^5 . Такие формы ошибочно образуют пару, не нарушая при этом геометрии спирали: например, редкая таутомерная форма С спаривается не с G, а с A.

Если бы ДНК-полимераза не предпринимала никаких специальных действий, когда происходит ошибочное спаривание между прибывшим дезоксирибонуклеозидтрифосфатом и матрицей ДНК, то в новую цепь ДНК зачастую включался бы ненадлежащий нуклеотид, что приводило бы к частому возникновению мутаций. Однако высокая точность репликации ДНК зависит не только от изначального спаривания оснований, но также и от нескольких «корректирующих» механизмов, которые последовательно работают над исправлением ошибочных пар, периодически возникающих в новом поколении ДНК.

Первый этап коррекции ДНК-полимераза выполняет непосредственно перед тем, как новый нуклеотид присоединяется к наращиваемой цепи. Наши знания об этом механизме получены в ходе исследований нескольких различных ДНК-полимераз, а в их числе и одной производимой бактериальным вирусом T7, который реплицируется в *E. coli*. Нужный нуклеотид имеет более высокое сродство к движущейся полимеразе, чем неверно выбранный, потому что правильное спаривание благоприятнее в энергетическом отношении. Более того, после связывания нуклеотида, но прежде чем нуклеотид ковалентно присоединится к растущей цепи, фермент должен претерпеть конформационное изменение, в результате которого его «пальцы» сжимаются вокруг активного участка (см. рис. 5.4). Поскольку такое изменение легче происходит при правильном, чем при неправильном спаривании оснований, это позволяет полимеразе выполнять «двойную проверку» точной геометрии пары оснований, прежде чем она решится катализировать присоединение нуклеотида к цепи.

Следующая исправляющая ошибки реакция, известная как *экзонуклеолитическая коррекция* (exonucleolytic proofreading), имеет место незамедлительно после тех редких случаев, когда неверный нуклеотид все-таки ковалентно присоединяется к растущей цепи. Ферменты ДНК-полимеразы являются чрезвычайно разборчивыми в отношении типов цепей ДНК, которые они удлиняют: они безапелляционно требуют заранее сформированного $3'$ -ОН-конца *затравочной цепи, или праймера* (primer strand), со спаренным с матрицей основанием (см. рис. 5.4). Те молекулы ДНК,

что несут некомplementарный (ошибочно спаренный) нуклеотид на 3'-ОН-конце затравочной цепи, не эффективны в качестве матрицы, потому что полимераза не может продолжить такую нить. Молекулы ДНК-полимеразы исправляют такую содержащую ошибку затравочную цепь с помощью особого каталитического участка (или в специальной субъединице, или в специальном домене молекулы полимеразы — в зависимости от полимеразы). Такая *корректирующая экзонуклеаза 3' → 5'* удаляет любые неспаренные остатки на конце затравки, продолжая это до тех пор, пока не будут удалены все ошибочно вставленные нуклеотиды, чтобы восстановить 3'-ОН-конец с комплементарным основанием, способный служить затравкой для синтеза ДНК. Таким образом, ДНК-полимераза работает как «самокорректирующийся» фермент, который устраняет свои собственные ошибки полимеризации по мере своего продвижения по ДНК (рис. 5.8 и 5.9).

Самокорректирующие свойства ДНК-полимеразы полностью зависят от наличия идеально спаренного с осно-

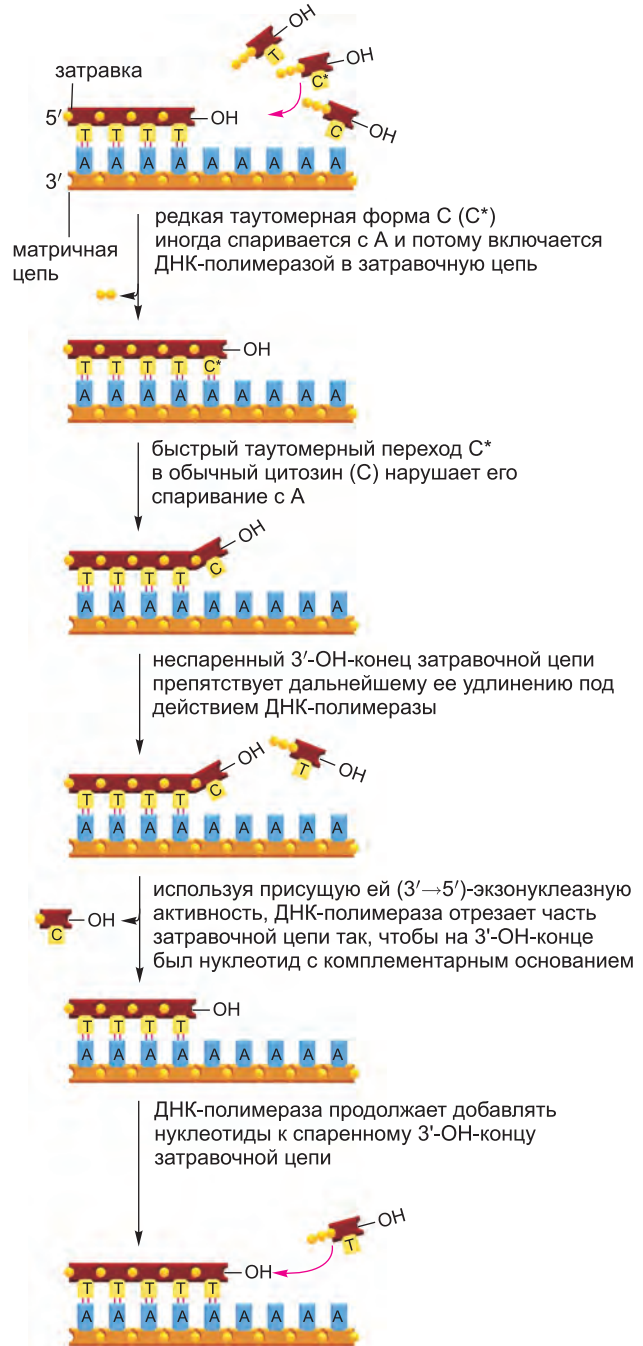


Рис. 5.8. Эксонуклеолитическая коррекция, выполняемая ДНК-полимеразой в ходе репликации ДНК. В данном примере несоответствие возникло из-за включения редкой неустойчивой таутоммерной формы С, обозначенной звездочкой. Но тот же корректирующий механизм способен исправлять любое ошибочное включение на растущем 3'-ОН-конце. Часть ДНК-полимеразы, которая удаляет ошибочно включенный нуклеотид, представляет собой специализированный фермент, относящийся к большому классу ферментов, известных как *эксонуклеазы*, которые отщепляют нуклеотиды с одного из концов полинуклеотидной цепи.

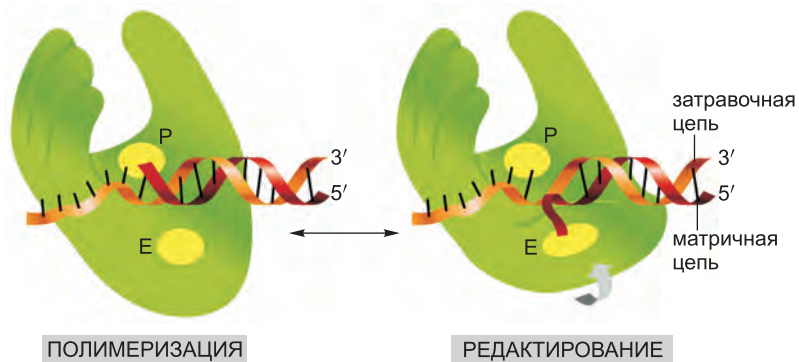


Рис. 5.9. Редактирование репликации ДНК-полимеразой. Общая схема структуры ДНК-полимеразы в комплексе с матрицей ДНК: в режиме полимеризации (*слева*) и в режиме редактирования (*справа*). Обозначены каталитический участок для экзонуклеолитической реакции (Е) и реакции полимеризации (Р). В режиме редактирования новосинтезированная ДНК кратковременно отходит от матрицы и полимераз претерпевает конформационное изменение, в результате которого редактирующий каталитический участок занимает другое местоположение, где и происходит удаление самого последнего из присоединенных нуклеотидов.

ванием конца затравки, и совершенно очевидно, что такой фермент не может начать синтез *de novo*. Напротив, ферменты РНК-полимеразы, участвующие в транскрипции генов, не нуждаются в таком эффективном экзонуклеолитическом корректирующем механизме: ошибки, возникающие при создании РНК, не передаются следующему поколению, и случайная дефектная молекула РНК, которая произведена, не имеет никакого значения в долгосрочной перспективе. Поэтому РНК-полимеразы способны начинать синтез новых полинуклеотидных цепей без затравки.

Как в процессе синтеза РНК, так и в самостоятельном процессе — трансляции последовательностей мРНК в последовательности белков — частота появления ошибок составляет около одной ошибки на каждые 10^4 событий полимеризации. Такой коэффициент ошибок в 100 000 раз больше, чем при репликации ДНК, в каком случае ряд корректирующих процессов обеспечивает необычайную точность работы (**таблица 5.1**).

Таблица 5.1. Три этапа, обеспечивающих высокую точность синтеза ДНК

ЭТАП РЕПЛИКАЦИИ	ЧИСЛО ОШИБОК НА НУКЛЕОТИД
Полимеризация в направлении $5' \rightarrow 3'$	1 на 10^5
Экзонуклеолитическая коррекция в направлении $3' \rightarrow 5'$	1 на 10^2
Направляемое цепью исправление ошибок спаривания	1 на 10^2
Итого	1 на 10^9

Примечание: третий этап — направляемое цепью исправление ошибок спаривания — описан ниже в этой главе.

5.2.4. Эффективное исправление ошибок возможно лишь при репликации ДНК в направлении 5' → 3'

Причина, по которой репликация ДНК происходит исключительно в направлении 5' → 3', объясняется, вероятно, необходимостью получения на выходе «качественного продукта». Если бы существовала ДНК-полимераза, которая присоединяла бы дезоксирибонуклеозидтрифосфаты в направлении 3' → 5', то активирующий трифосфат, необходимый для образования ковалентной связи, обеспечивал бы наращиваемый 5'-конец цепи, а не поступающий в оборот мононуклеотид. В таком случае ошибки полимеризации попросту не могли бы исправляться гидролизом, потому что голый 5'-конец цепи, созданный таким образом, немедленно завершил бы синтез ДНК (рис. 5.10). Поэтому исправить несоответствующее основание можно, только если оно было присоединено к 3'-концу цепи ДНК. Хотя механизм репликации ДНК, действующий по принципу «обратных стежков» (см. рис. 5.7), и кажется сложным, он сохраняет направление полимеризации 5' → 3', которое является неперенным условием экзонуклеолитической коррекции.

Несмотря на эти меры безопасности, направленные против ошибок репликации ДНК, ДНК-полимеразы иногда все же ошибаются. Однако, как мы увидим позже, клетки имеют еще один шанс исправить эти ошибки при помощи процесса, названного *направляемым цепью исправлением ошибок спаривания* (*strand-directed mismatch repair*). Однако, прежде чем подойти к обсуждению этого механизма, мы опишем белки других типов, которые «несут свою службу» в репликационной вилке.

5.2.5. Короткие молекулы РНК-затравок на отстающей цепи синтезирует специальный фермент

Для синтеза опережающей нити специальная затравка необходима только в начале репликации: как только репликационная вилка утвердит свое существование, ДНК-полимеразе непрерывно предоставляется конец цепи со спаренным основанием и на этот конец она добавляет новый нуклеотид. На отстающей же стороне вилки, однако, каждый раз, когда ДНК-полимераза заканчивает короткий отрезок ДНК фрагмента Оказаки (на который у нее уходит несколько секунд), она должна начать синтезировать совершенно новый фрагмент на участке, расположенном далее по ходу матричной цепи (см. рис. 5.7). Спаренную основаниями затравочную цепь, необходимую этой молекуле ДНК-полимеразы, производит специальный механизм. Этот механизм включает в себя фермент, названный **ДНК-праймазой**, который использует рибонуклеозидтрифосфаты для синтеза коротких **РНК-затравок** на отстающей нити (рис. 5.11). У эукариот такие затравки имеют длину около 10 нуклеотидов и собираются на отстающей нити с промежутками в 100–200 нуклеотидов.

Химическая структура РНК была представлена читателю в главе 1 и будет описана подробно в главе 6. Здесь же мы лишь заметим, что РНК весьма подобна ДНК по своей структуре. Нить РНК может образовывать пары оснований с нитью ДНК и формировать таким образом двойную спираль гибрида ДНК–РНК, — если эти две нуклеотидные последовательности комплементарны друг другу. Таким образом, синтез РНК-затравок направляется по тому же матричному принципу (по шаблону), что используется для синтеза ДНК. Поскольку РНК-затравка содержит должным образом спаренный комплементарный нуклеотид с группой 3'-ОН на одном из концов, постольку он может быть продолжен ДНК-полимеразой с этого конца

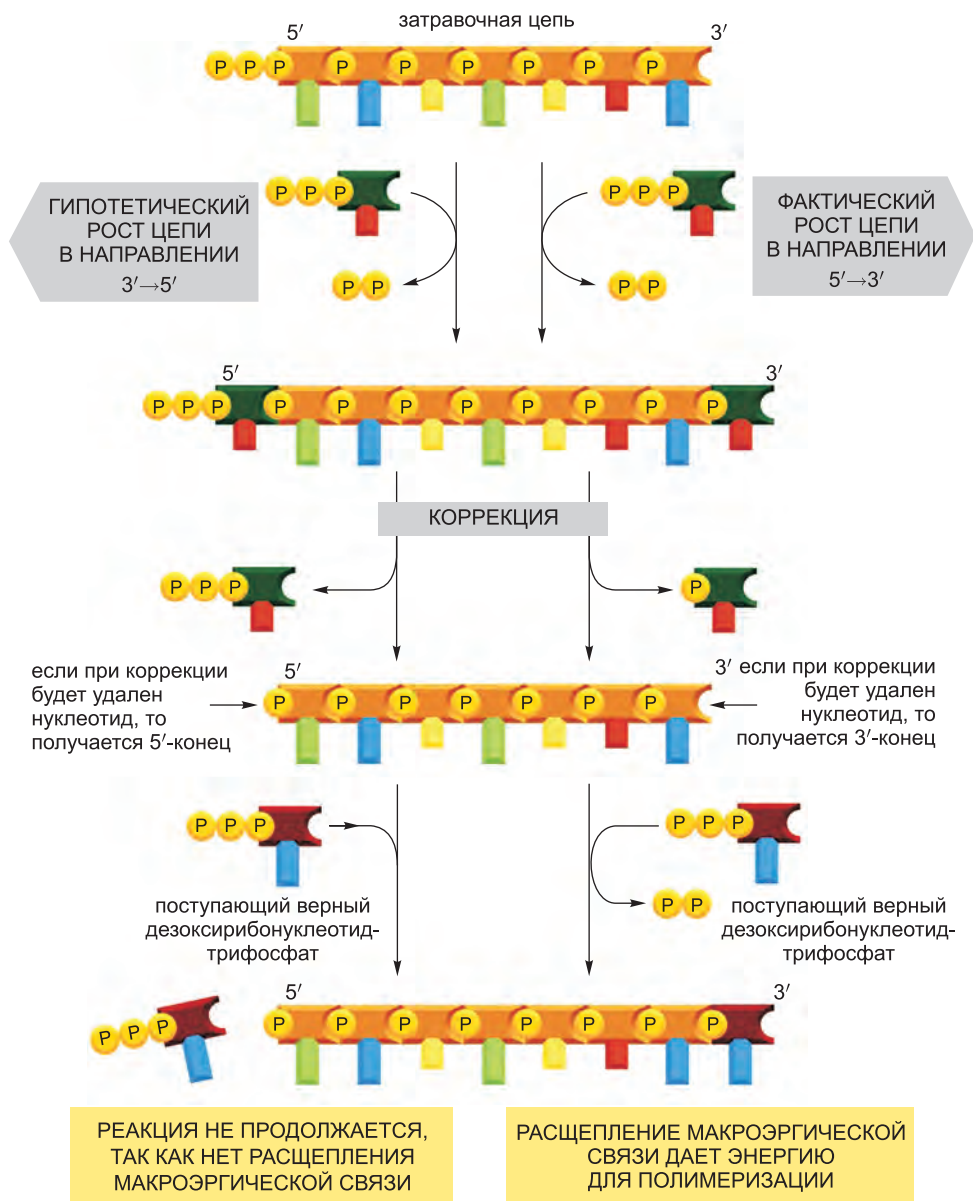
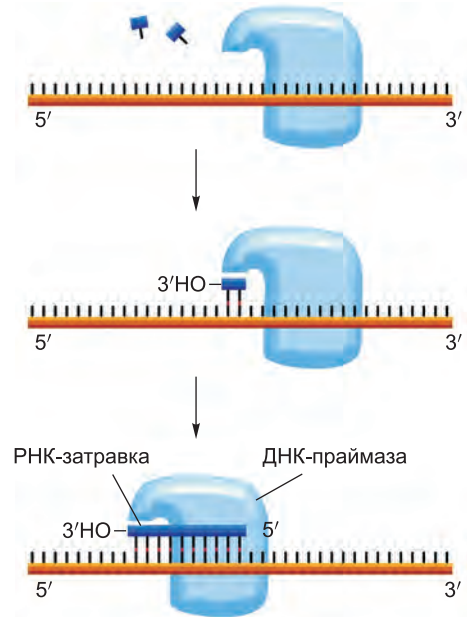


Рис. 5.10. Объяснение факта наращивания цепи ДНК в направлении $5' \rightarrow 3'$. Рост в направлении $5' \rightarrow 3'$, представленный справа, позволяет цепи продолжать расти, после того как ошибка в полимеризации удалена экзонуклеолитической коррекцией (см. рис. 5.8). Напротив, экзонуклеолитическая коррекция в гипотетической схеме полимеризации в направлении $3' \rightarrow 5'$, помещенной слева, блокировала бы дальнейшее удлинение цепи. Для удобства показана только затравочная нить двойной спирали ДНК.

и дать тем самым начало фрагменту Оказаки. Синтез каждого фрагмента Оказаки заканчивается, когда ДНК-полимераза наткнется на РНК-затравку, находящуюся на 5'-конце предыдущего фрагмента. Для того чтобы собрать непрерывную цепь ДНК из многочисленных фрагментов ДНК, синтезируемых на отстающей нити,

Рис. 5.11. Синтез РНК-затравки. Принципиальная схема реакции, катализируемой *ДНК-праймазой* — ферментом, который синтезирует короткие РНК-затравки на отстающей цепи, используя ДНК в качестве матрицы. В отличие от ДНК-полимеразы, этот фермент может начинать синтез новой полинуклеотидной цепи путем соединения двух нуклеозидтрифосфатов. Праймаза синтезирует короткий полинуклеотид в направлении $5' \rightarrow 3'$ и затем останавливается, предоставляя $3'$ -конец этой затравки в распоряжение ДНК-полимеразы.

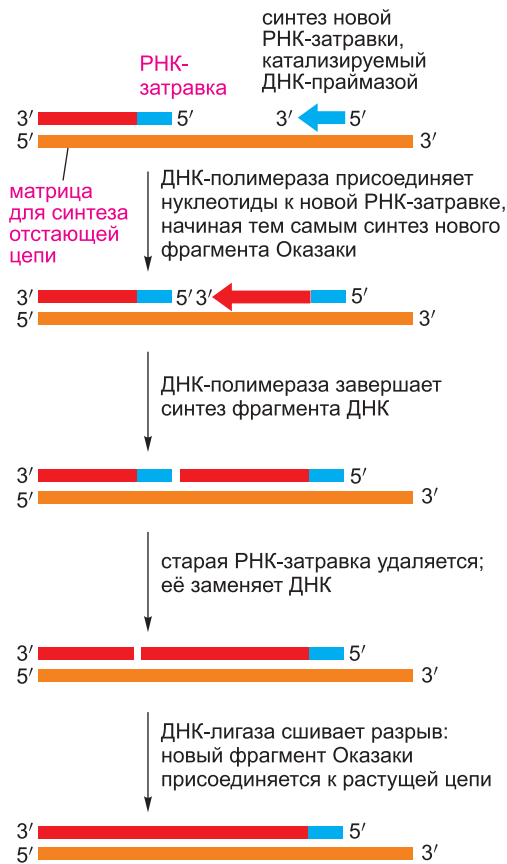


на выручку быстро приходит специальная система репарации ДНК — она вычищает старую РНК-затравку и заменяет ее последовательностью ДНК. После этого фермент, называемый **ДНК-лигазой**, сводит воедино $3'$ -конец нового фрагмента ДНК с $5'$ -концом предыдущего и завершает этим актом весь процесс (рис. 5.12 и 5.13).

По какой же причине недолговечной РНК-затравке могло быть отдано предпочтение перед ДНК-затравкой, которую не было бы надобности удалять? Довод, что самокорректирующаяся полимеразы не может начинать синтез цепей *de novo*, подразумевает также обратное: фермент, который начинает цепи сызнова, не может быть эффективен в плане самокоррекции. Таким образом, любой фермент, который начинает синтез фрагментов Оказаки, будет неизбежно делать относительно неточную копию (по крайней мере 1 ошибку на 10^5 нуклеотидов). Даже если копии, остающиеся в конечном продукте, составляли бы не более 5% всего генома (например, 10 нуклеотидов на 200-нуклеотидный фрагмент ДНК), то обусловленное этим возрастание общей частоты мутаций было бы огромным. Поэтому кажется весьма вероятным, что использование РНК, а не ДНК в качестве затравки дает клетке колоссальное преимущество: рибонуклеотиды в затравке автоматически помечаются как «подозрительные копии», чтобы их эффективно удалить и заменить.

5.2.6. Расплетать двойную спираль ДНК перед репликационной вилкой помогают специальные белки

Для планомерного протекания синтеза ДНК двойная спираль ДНК перед репликационной вилкой должна быть расплетена, с тем чтобы дезоксирибонуклеозидтрифосфаты могли образовывать пары оснований с матричной нитью. Однако двойная спираль ДНК очень устойчива в физиологических условиях; пары оснований закреплены на своих местах столь прочно, что необходимы температуры, близкие к точке кипения воды, чтобы разделить две комплементарные цепи в условиях *in vitro*. Поэтому, чтобы двойная спираль раскрылась и одноцепочечная ДНК стала доступной для копирования ДНК-полимеразой, необходимы особые белки. Они бывают двух типов: ДНК-хеликазы и белки, связывающие одноцепочечную ДНК.



хеликаза может раскручивать двойную спираль ДНК, двигаясь в направлении $5' \rightarrow 3'$ по одной нити или в направлении $3' \rightarrow 5'$ — по другой. Фактически существуют ДНК-хеликазы обоих типов. В наиболее хорошо изученных системах репликации бактерий хеликаза, движущаяся по матрице отстающей цепи в направлении $5' \rightarrow 3'$, кажется, исполняет главенствующую роль — причины этого станут нам ясны вскоре.

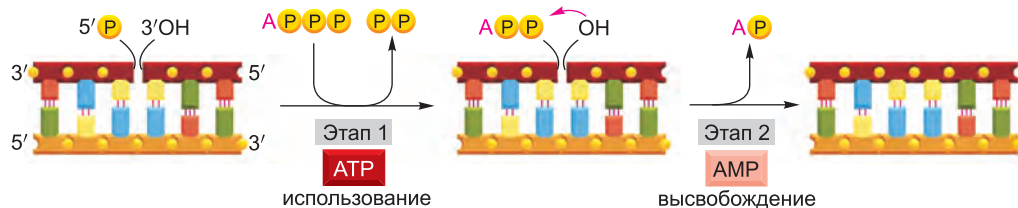


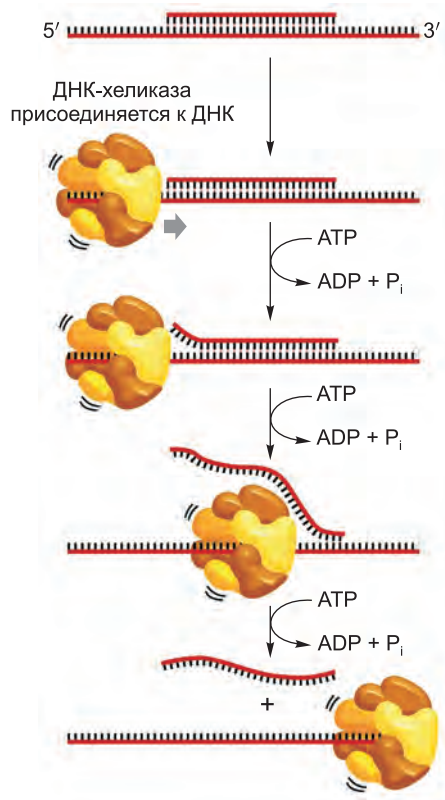
Рис. 5.13. Реакция, катализируемая ДНК-лигазой. Этот фермент «сшивает» разрыв фосфодиэфирной связи. Как показано на схеме, ДНК-лигаза использует молекулу АТФ, чтобы активировать $5'$ -конец в разрыве (шаг 1) перед образованием новой связи (шаг 2). Благодаря этому энергетически неблагоприятная реакция «сшивания» разрыва осуществляется за счет сопряжения с энергетически благоприятным процессом гидролиза АТФ.

Рис. 5.12. Синтез одного из многочисленных фрагментов ДНК на отстающей цепи. В клетках эукариот РНК-затравки синтезируются на отстающей цепи с промежутками, разделенными приблизительно 200 нуклеотидами, и каждая РНК-затравка имеет длину около 10 нуклеотидов. Такая затравка вычищается специальным ферментом репарации ДНК (РНКазой H), который распознает нить РНК в спирали РНК–ДНК и фрагментирует ее; после этого остаются бреши (gaps), которые заполняются с помощью ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы.

ДНК-хеликазы были сначала выделены как белки, которые гидролизуют АТФ при связывании с одноцепочечными ДНК. Как было описано в главе 3, гидролиз АТФ может циклически изменять форму молекулы белка, что позволяет белку производить механическую работу. ДНК-хеликазы используют этот принцип, чтобы быстро продвигаться по одинарной нити ДНК. Наталкиваясь на область двойной спирали, они продолжают продвигаться по своей цепи и таким образом расклинивают спираль со скоростью до 1000 пар нуклеотидов в секунду (рис. 5.14 и 5.15).

Две цепи ДНК имеют взаимно противоположную полярность, и, в принципе,

Рис. 5.14. Опыт для проверки ферментов ДНК-хеликаз. Короткий фрагмент ДНК отжигается с длинной цепью ДНК — чтобы сформировать небольшую область двойной спирали ДНК. Двойная спираль плавится по мере того, как хеликаза продвигается по одинарной нити ДНК, высвобождая короткий фрагмент ДНК в ходе реакции, для осуществления которой необходимо наличие и белка хеликазы, и АТФ. Быстрое скачкообразное движение хеликазы обеспечивается гидролизом связанных с ней молекул АТФ (см. рис. 3.77). Многие ДНК-хеликазы состоят из шести субъединиц, как это показано на схеме.



Белки, связывающие одноцепочечную ДНК (SSB-белки; single-strand DNA-binding proteins), также называемые *дестабилизирующими спираль белками*, связываются прочно и кооперативно с открытой одноцепочечной ДНК, не закрывая при этом оснований, которые поэтому остаются доступными для спаривания. Эти белки не способны сами расплести длинную спираль ДНК, но они содействуют хеликазам, стабилизируя раскрученную однонитевую конформацию. Кроме того, благодаря кооперативному связыванию они охватывают и распрямляют области однонитевой ДНК — матрицы отстающей цепи, таким образом предотвращая образование коротких двуспиральных шпилек, каковые легко образуются в одноцепочечной ДНК (рис. 5.16 и 5.17). Такие двуспиральные шпильки могут быть помехой синтезу ДНК, катализируемому ДНК-полимеразой.

5.2.7. Скользящее кольцо удерживает движущуюся ДНК-полимеразу на ДНК

В большинстве своем молекулы ДНК-полимеразы сами по себе успевали бы синтезировать лишь короткую цепочку нуклеотидов и сразу бы срывались с матрицы ДНК. Стремление быстро отделяться от молекулы ДНК позволяет молекуле ДНК-полимеразы, которая только что закончила синтезировать один фрагмент Оказаки на отстающей нити, вновь быстро быть пущенной в оборот и начать синтез следующего фрагмента Оказаки на той же нити. Такая высокая скорость диссоциации, однако, мешала бы полимеразе синтезировать длинные цепи ДНК в репликационной вилке, если бы не было вспомогательного белка, который выполняет роль регулирующего **скользящего зажима (sliding clamp)**. Этот зажим прочно удерживает полимеразу на ДНК, когда она передвигается, но отпускает ее, как только полимеразы наталкиваются на двухцепочечную область ДНК.

Каким образом скользящий зажим может препятствовать полимеразе диссоциировать и в то же время не создавать помех быстрому продвижению полимеразы по молекуле ДНК? Трехмерная структура белка-зажима, определенная с помощью рентгенодифракционного анализа, показывает, что он образует большое кольцо во-

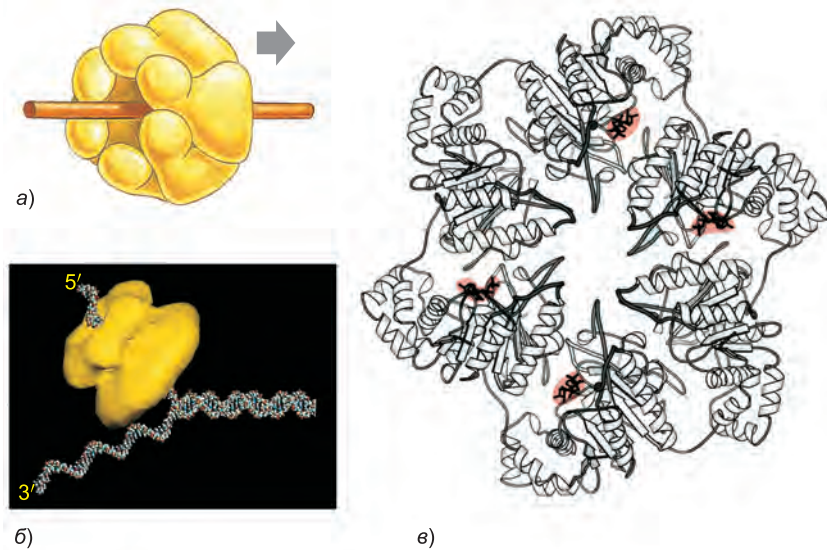


Рис. 5.15. Структура ДНК-хеликазы. а) Общая схема этого белка в виде гексамерного кольца. б) Схема, показывающая репликационную вилку ДНК и хеликазу в одном масштабе. в) Подробная структура репликационной хеликазы бактериофага Т7, определенная рентгенодифракционным анализом. Шесть идентичных субъединиц связывают и гидролизуют АТФ упорядоченным способом для продвижения этой молекулы подобно ротационному двигателю по одинарной нити ДНК, которая проходит через центральное отверстие. Красные области показывают расположение связанных с ферментом молекул АТФ. (Изображение б любезно предоставил Edward H. Egelman; иллюстрация в заимствована из M. R. Singleton et al., *Cell* 101: 589–600, 2000. С великодушного разрешения издательства Elsevier.)

крут двойной спирали ДНК. Одна сторона кольца связана позади ДНК-полимеразы, а все кольцо свободно скользит по ДНК вместе с перемещающейся полимеразой. Сборка зажима вокруг ДНК требует гидролиза АТФ, что осуществляет специальный белковый комплекс, **погрузчик, или установщик зажима (clump loader)**: он гидролизует АТФ, когда «насаживает» зажим на стыке заправки с матрицей (рис. 5.18).

На матрице опережающей нити движущаяся ДНК-полимераза прочно связана с зажимом, и так они остаются связанными долгое время. На матрице отстающей нити ДНК-полимераза также использует зажим, но каждый раз, достигая 5'-конца предыдущего фрагмента Оказаки, полимеразы освобождается от зажима и отделяется от матрицы. Далее эта молекула полимеразы связывается с новым зажимом, собранным на РНК-заправке следующего фрагмента Оказаки.

5.2.8. Белки в репликационной вилке действуют сообща, образуя настоящую репликационную машину

Хотя мы рассматривали репликацию ДНК так, как если бы она выполнялась смесью белков, работающих независимо один от другого, в действительности большинство белков объединено в крупный и упорядоченный мультиферментный комплекс, который быстро синтезирует ДНК. Этот комплекс может быть уподоблен крошечной швейной машине, состоящей из белковых узлов и приводимой в действие энергией, вырабатываемой посредством гидролиза нуклеозидтрифосфата. Подобно

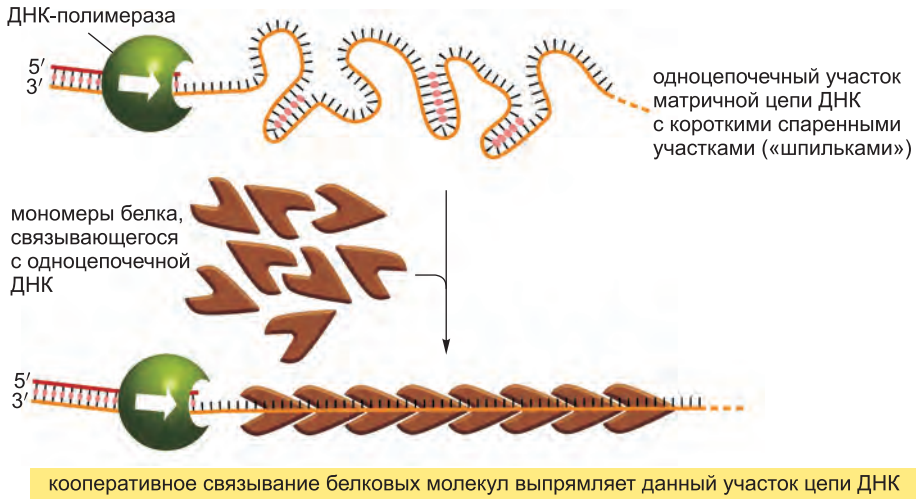


Рис. 5.16. Влияние белков, связывающих одноцепочечную ДНК (SSB-белков), на структуру одноцепочечной ДНК. Поскольку каждая молекула белка предпочитает связывать ДНК, будучи в контакте с другой молекулой белка, ранее уже связавшейся с ДНК, на одинарной цепи ДНК образуются длинные ряды этих белков. Такое *кооперативное связывание* выпрямляет матрицу ДНК и облегчает процесс полимеризации ДНК. «Шпильчатые спирали», показанные в структуре «голой» одонитовой ДНК, образуются в результате случайного спаривания между короткими взаимно комплементарными областями нуклеотидной последовательности; они подобны коротким спиральям, которые обычно формируются в молекулах РНК (см. рис. 1.6).

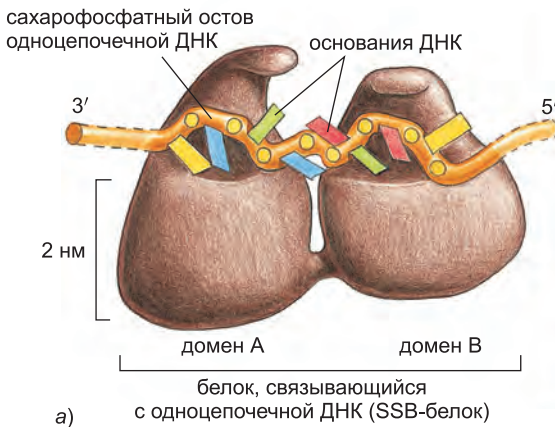


Рис. 5.17. Структура SSB-белка человека. а) Вид спереди двух связанных с ДНК доменов белка RPA, которые охватывают в целом восемь нуклеотидов. Обратите внимание, что в этом ДНК-белковом комплексе основания ДНК остаются на поверхности. б) Схема, показывающая трехмерную структуру, в которой цепь ДНК (красная) расположена перпендикулярно плоскости рисунка. (Изображение б заимствовано из A. Vochkarev et al., *Nature* 385: 176–181, 1997. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

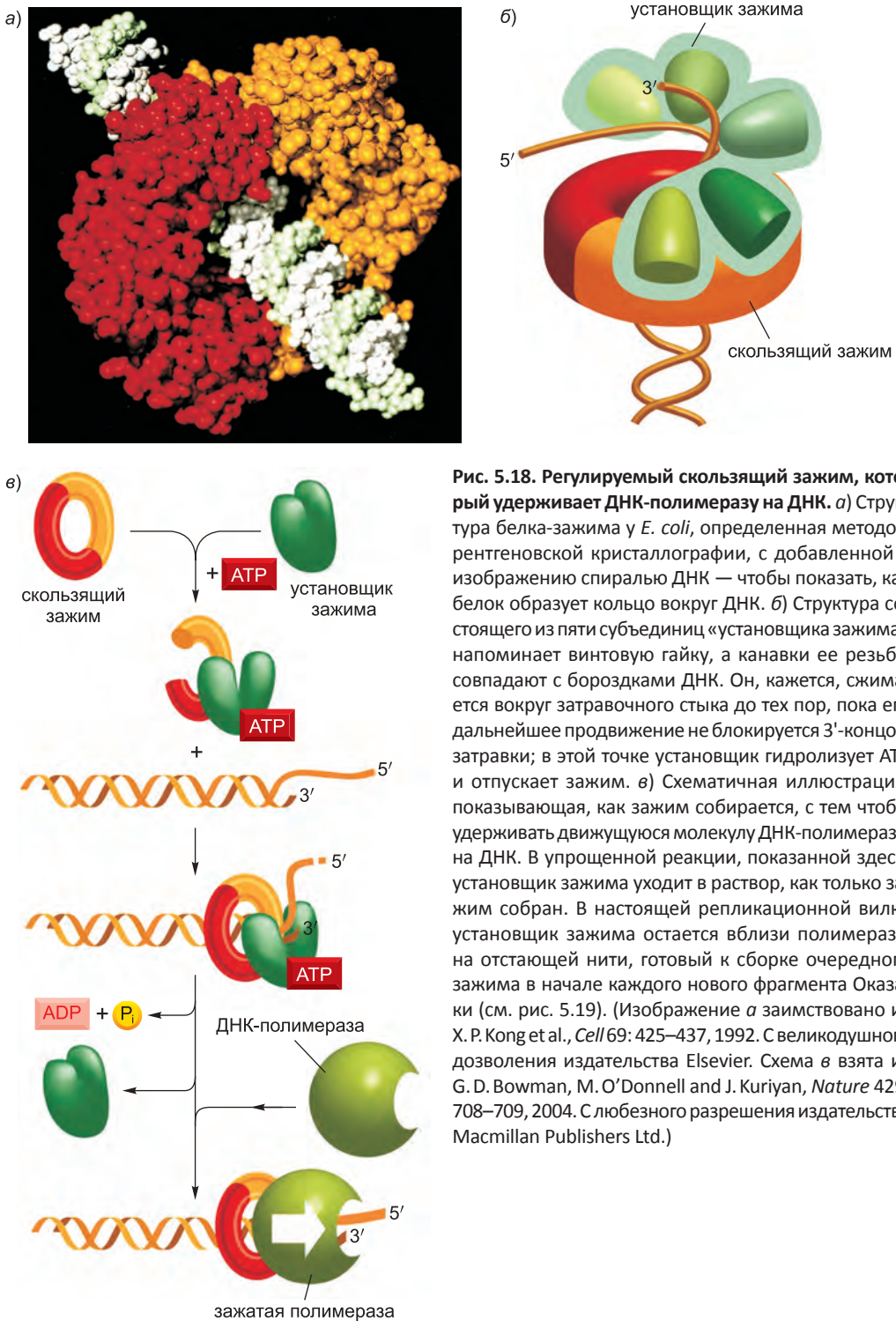


Рис. 5.18. Регулируемый скользящий зажим, который удерживает ДНК-полимеразу на ДНК. а) Структура белка-зажима у *E. coli*, определенная методом рентгеновской кристаллографии, с добавленной к изображению спиралью ДНК — чтобы показать, как белок образует кольцо вокруг ДНК. б) Структура состоящего из пяти субъединиц «установщика зажима» напоминает винтовую гайку, а канавки ее резьбы совпадают с бороздками ДНК. Он, кажется, сжимается вокруг затравочного стыка до тех пор, пока его дальнейшее продвижение не блокируется 3'-концом затравки; в этой точке установщик гидролизует АТФ и отпускает зажим. в) Схематичная иллюстрация, показывающая, как зажим собирается, с тем чтобы удерживать движущуюся молекулу ДНК-полимеразы на ДНК. В упрощенной реакции, показанной здесь, установщик зажима уходит в раствор, как только зажим собран. В настоящей репликационной вилке установщик зажима остается вблизи полимеразы на отстающей нити, готовый к сборке очередного зажима в начале каждого нового фрагмента Оказаки (см. рис. 5.19). (Изображение а заимствовано из Х. Р. Kong et al., *Cell* 69: 425–437, 1992. С великодушного дозволения издательства Elsevier. Схема в взята из G. D. Bowman, M. O'Donnell and J. Kuriyan, *Nature* 429: 708–709, 2004. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

швейной машине, репликационный комплекс, вероятно, остается неподвижным относительно своего непосредственного окружения; ДНК можно рассматривать как длинную полоску ткани, быстро протягиваемую через нее. Хотя репликационный комплекс наиболее интенсивно изучался у *E. coli* и нескольких из поражающих ее вирусов, у эукариот, как мы увидим чуть позже, работает во многом подобный комплекс.

На **рис. 5.19, а** представлена вся совокупность функций, совершаемых субъединицами репликационной машины. Находящаяся перед репликационной вилкой ДНК-хеликаза расплетает спираль ДНК. В самой вилке — одна на опережающей нити, другая на отстающей нити — работают две молекулы ДНК-полимеразы. Тогда как молекула ДНК-полимеразы на опережающей нити может работать непрерывно, молекула ДНК-полимеразы на отстающей нити должна начинать свою работу вновь и вновь через короткие промежутки времени, используя короткую РНК-затравку, тут же изготавливаемую молекулой ДНК-праймазы. Тесное сотрудничество всех этих белковых компонентов увеличивает эффективность репликации и становится возможным благодаря определенной укладке отстающей нити «петлей назад», как показано на **рис. 5.19, а**. Кроме того, такая организация облегчает установку зажима полимеразы при каждом цикле синтеза фрагмента Оказаки: установщик зажима и молекула ДНК-полимеразы на отстающей нити остаются на своих местах как часть белковой машины, даже когда они отделяются от своей матрицы ДНК. Репликационные белки, таким образом, связаны друг с другом в единый большой комплекс (полная молекулярная масса $> 10^6$ дальтон), что позволяет ДНК синтезироваться по обе стороны репликационной вилки согласованно и эффективно.

На отстающей нити реплицирующая ДНК машина оставляет позади себя ряд фрагментов Оказаки с незаделанными зазорами между ними, которые на своих 5'-концах все еще содержат РНК, которая затравливала их синтез. Эта РНК удаляется, и образующийся зазор заделывается ферментами репарации ДНК, которые работают позади репликационной вилки (см. **рис. 5.12**).

5.2.9. Ошибки репликации, которые допускает репликационная машина, удаляет направляемая цепью система исправления ошибок спаривания

Как было сказано ранее, бактерии наподобие *E. coli* способны делиться один раз каждые 40 минут, благодаря чему имеется возможность сравнительно легко проводить массовый анализ больших популяций, чтобы найти редкую мутантную клетку, видоизменившуюся в определенном процессе. Представители одного интересного класса мутантов содержат изменения в так называемых *генах-мутаторах*, которые значительно увеличивают частоту самопроизвольных мутаций. Не удивительно, что один такой мутант производит дефектную форму 3' → 5' корректирующей экзонуклеазы, которая является частью фермента ДНК-полимеразы (см. **рис. 5.8** и **5.9**). Мутантная ДНК-полимераза не может эффективно корректировать ДНК, и многие ошибки репликации, которые в ином случае были бы удалены, накапливаются в ДНК.

Изучение других мутантов *E. coli*, проявляющих аномально высокую частоту мутаций, выявило систему коррекции неправильного спаривания (mismatch proofreading system), которая удаляет ошибки репликации, допущенные полимеразой и пропущенные корректирующей экзонуклеазой. Такая **направляемая цепью**

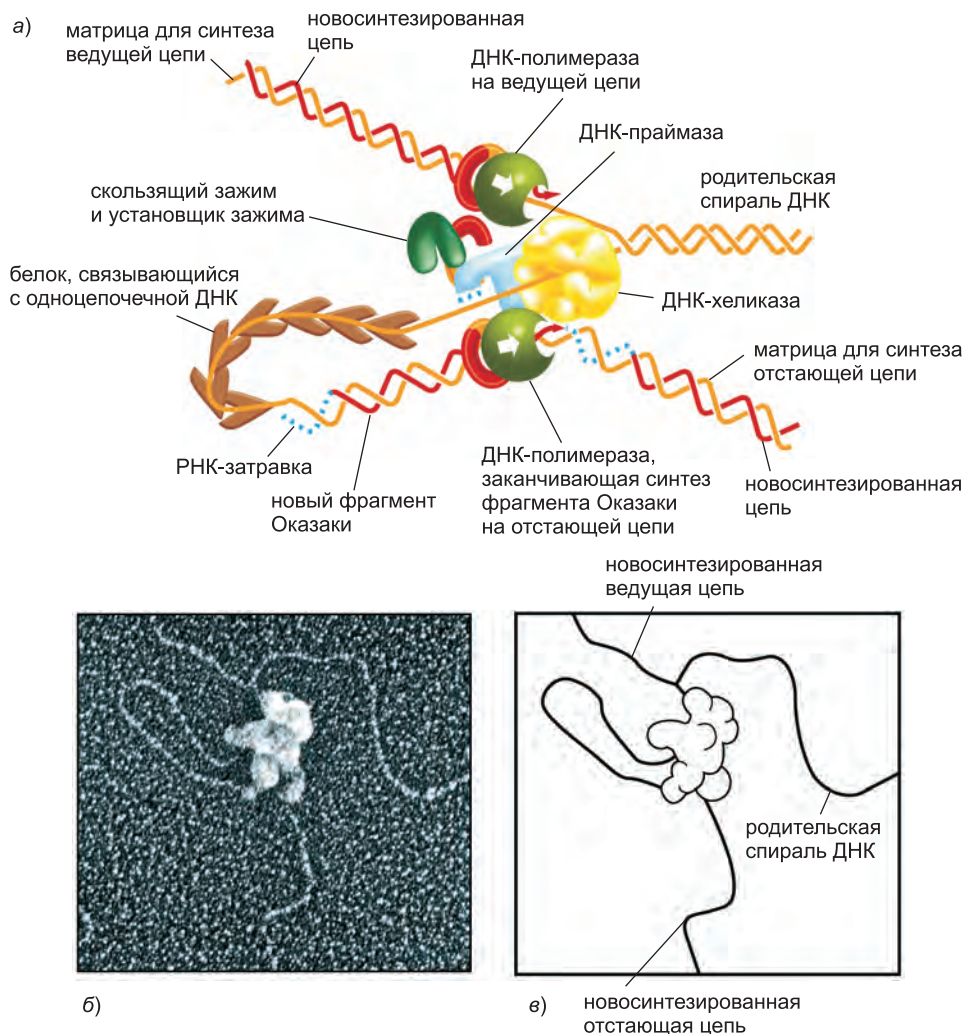


Рис. 5.19. Активная репликационная вилка. а) На этом схематическом рисунке показано взаимное расположение белков в репликационной вилке в процессе синтеза ДНК. ДНК отстающей нити свернулась, чтобы свести молекулу ДНК-полимеразы на отстающей нити в один комплекс с молекулой ДНК-полимеразы на опережающей нити. Кроме того, в результате такой укладки 3'-конец каждого законченного фрагмента ДНК-полимеразы на отстающей нити остается связанной с остальными репликационными белками, она может многократно использоваться для синтеза последовательных фрагментов Оказаки. На этой схеме она собирается выпустить заверченный ею фрагмент ДНК и перейти к РНК-затравке, которая будет синтезирована поблизости, что необходимо для начала следующего фрагмента ДНК. Дополнительные белки (не показаны) помогают удерживать различные белковые компоненты вилки вместе, что позволяет им работать как хорошо согласованная белковая машина. б) Электронный микроснимок, показывающий репликационную машину бактериофага Т4 в момент ее продвижения по матрице, когда она оставляет позади себя новосинтезированную ДНК. в) Интерпретация этой микросфотографии дана в эскизе: обратите особое внимание на петлю ДНК на отстающей нити. Очевидно, репликационные белки частично отделились от ДНК непосредственно перед репликационной вилкой во время подготовки этого препарата для электронной микроскопии. (Фотоснимок б любезно предоставлен Jack Griffith; см. P. D. Chastain et al., *J. Biol. Chem.* 278: 21276–21285, 2003.)

система исправления ошибок спаривания (strand-directed mismatch repair) выявляет потенциальные места искажений в спирали ДНК, что обусловлено плохой «подгонкой» оснований, некоплементарных друг другу.

Если бы такая корректирующая система попросту узнавала ошибки спаривания в недавно реплицированной ДНК и случайным образом исправляла один из двух несоответствующих друг другу нуклеотидов, то точно в половине случаев она ошибочно «исправляла» бы исходную матричную нить, приводя ее в соответствие ошибке, и, таким образом, средняя частота появления ошибок никак не снизилась бы. Чтобы быть эффективной, такая корректирующая система должна различать и удалять несоответствующий нуклеотид только на вновь синтезированной нити, в которой и произошла ошибка репликации.

У *E. coli* механизм различения нитей, используемый системой исправления ошибок спаривания, связан с метилированием определенных остатков А в ДНК. Метильные группы присоединяются ко всем остаткам А в последовательности GATC, но лишь по прошествии некоторого времени после включения А в новосинтезированную цепь ДНК. В результате последовательности GATC, которые еще не были метилированы, встречаются единственно лишь в новосинтезированных нитях сразу после репликационной вилки. Распознавание таких неметилированных последовательностей GATC позволяет в течение короткого периода отличать новые нити ДНК от старых, что и требуется для избирательного удаления ошибок, допущенных именно при репликации. Состоящий из трех этапов процесс включает в себя распознавание ошибки спаривания, вырезание сегмента ДНК, содержащего эту ошибку, из новосинтезированной нити и повторный синтез вырезанного сегмента с использованием старой нити в качестве шаблона. Такая направляемая нитью система корректировки еще в 100 раз уменьшает число ошибок, допущенных в ходе репликации ДНК (см. таблицу 5.1, **стр. 271**).

Подобная система коррекции ошибок спаривания несет свою службу и в клетках человека (**рис. 5.20**). Вся значимость этой системы для людей становится очевидной при взгляде на индивидумов, которые унаследовали одну дефектную копию гена исправления ошибок спаривания (наряду с функционально активным геном на другой копии хромосомы). Такие люди имеют выраженную предрасположенность к некоторым типам рака. Например, при разновидности рака ободочной кишки, называемого *наследственный неполипозный рак прямой и ободочной кишки (HNPCC)*, самопроизвольная мутация второго, функционально активного гена производит клон соматических клеток, которые, поскольку в них не выполняется коррекция неправильного спаривания, накапливают мутации необычайно быстро. Большинство видов рака возникает в клетках, которые накопили множественные мутации (см. рис. 20.11), и поэтому клетки, лишенные возможности исправлять ошибки репликации, имеют все основания стать злокачественными. К счастью, большинство из нас наследует обе доброкачественные копии гена, который кодирует белок коррекции неправильного спаривания; и это защищает нас, так как очень мала вероятность того, что в одной клетке мутируют сразу обе копии.

В клетках эукариот механизм распознавания новосинтезированной цепи от родительской матричной в месте неправильного спаривания не зависит от метилирования ДНК. И в самом деле, у некоторых эукариот — а в их числе дрожжи и дрозофила, — не происходит метилирования своей ДНК. Недавно синтезированная ДНК отстающей нити непродолжительное время имеет *надрезы* (прежде чем они будут защищены ДНК-лигазой), и биохимические эксперименты показывают, что такие

надрезы (называемые также *одноцепочечными разрывами*) являются сигналом, который нацеливает систему коррекции неправильного спаривания на должную нить (см. **рис. 5.20**). Логично предположить, что для работы такой системы также необходимо, чтобы вновь синтезированная ДНК на опережающей нити имела кратковременные надрезы — как это происходит, пока еще не ясно.

5.2.10. Спутывание ДНК во время репликации предотвращают ДНК-топоизомеразы

При продвижении репликационной вилки по двунитовой ДНК возникает проблема, которая получила название «проблемы закручивания» (winding problem) ДНК. Дело в том, что каждые 10 пар нуклеотидов, реплицированных в вилке, соответствуют одному полному обороту вокруг оси родительской двойной спирали; поэтому, для того чтобы репликационная вилка могла двигаться, вся хромосома перед вилкой должна была бы вращаться с большой скоростью (**рис. 5.21**). В случае

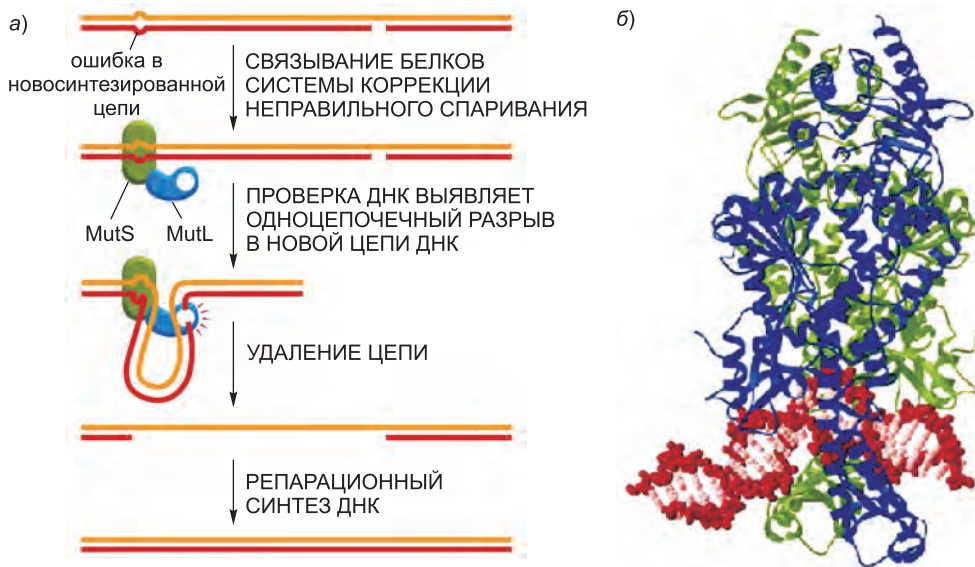


Рис. 5.20. Модель направляемого цепью исправления ошибок спаривания у эукариот. а) Два изображенных белка присутствуют как у бактерий, так и в клетках эукариот: MutS специфично связывается с комплементарными основаниями, тогда как MutL просматривает близлежащую ДНК на предмет наличия разрыва. Как только MutL находит разрыв, он запускает деградацию разорванной нити на всем протяжении несоответствия оснований по принципу комплементарности. Поскольку у эукариот разрывы главным образом возникают в пределах новореплицированных нитей ДНК, постольку ошибки репликации избирательно и удаляются. У бактерий механизм тот же самый, за исключением того, что дополнительный белок в комплексе (MutH) делает надрезы на неметилированных (а значит, недавно реплицированных) последовательностях GATC, таким образом начиная процесс, проиллюстрированный на данной схеме. б) Структура белка MutS, задача которого — убрать ошибки на ДНК. Этот белок представляет собой димер, который, как показано, захватывает двойную спираль ДНК, образуя петлю ДНК в области некомплементарных оснований. Кажется, что белок MutS «просматривает» ДНК, ища ошибки путем проверки наличия участков, которые могут быть легко согнуты в петлю, потому что составляющие ее основания не образуют нормальной комплементарной пары. (Изображение б заимствовано из G. Obmolova et al., *Nature* 407: 703–710, 2000. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

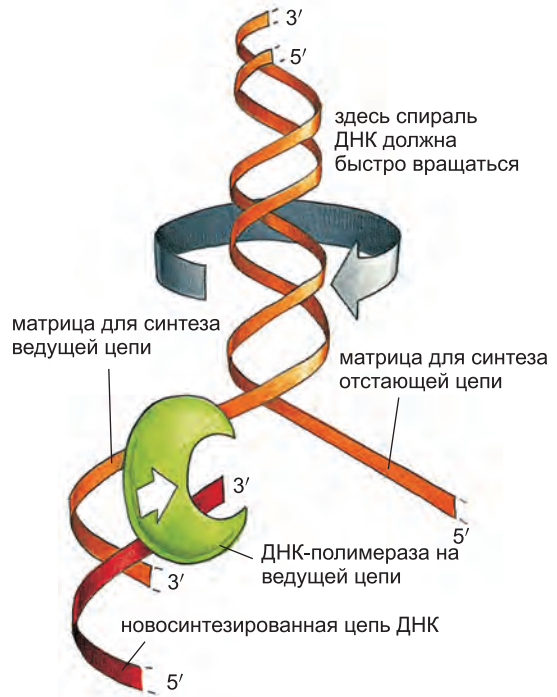
Рис. 5.21. Проблема закручивания ДНК, которая возникает в ходе репликации. У бактерий для продвижения репликационной вилки со скоростью 500 нуклеотидов в секунду родительская спираль ДНК перед этой вилкой должна вращаться с частотой 50 оборотов в секунду.

длинных хромосом это потребовало бы большого количества энергии, и поэтому тут используется альтернативная стратегия: в спирали ДНК образуется шарнир, который формируют белки, известные под названием **ДНК-топоизомераз**.

ДНК топоизомераза может рассматриваться как обратимая нуклеаза, которая сама ковалентно соединяется с фосфатом основной цепи ДНК и таким образом разрывает фосфодиэфирную связь в нити ДНК. Эта реакция обратима, и фосфодиэфирная связь вновь образуется, как только белок покидает «насиженное место».

Топоизомераза одного типа, названная *топоизомеразой I*, производит временный однонитевой разрез (или надраз); этот разрыв фосфодиэфирной связи в сахарофосфатном остове позволяет двум отрезкам спирали ДНК по обе стороны надреза свободно вращаться друг относительно друга, используя фосфодиэфирную связь в противоположной надрезу нити в качестве точки вращения (рис. 5.22). Любое напряжение в спирали ДНК будет осуществлять такое вращение в направлении, снижающем это напряжение. В результате репликация ДНК может идти своим чередом при вращении только короткого отрезка спирали — части, лежащей сразу перед вилкой. Поскольку ковалентная связь, которая соединяет белок ДНК-топоизомеразу с фосфатом в цепи ДНК, сохраняет в себе энергию расщепленной фосфодиэфирной связи, ее лигирование происходит быстро и не требует дополнительной энергетической подпитки. В данном отношении этот механизм воссоединения фосфодиэфирной связи отличается от такового, катализируемого ферментом ДНК-лигазой, о котором мы говорили раньше (см. рис. 5.13).

ДНК-топоизомераза второго типа, *топоизомераза II*, образует ковалентную связь одновременно с обеими цепями спирали ДНК, производя временный *двухцепочечный разрыв* в спирали. Эти ферменты активируются на хромосомах в участках, где две двойные спирали пересекают друг друга. Как только молекула топоизомеразы II связывается с таким участком пересечения, она тут же использует гидролиз АТФ, чтобы эффективно выполнить следующий набор реакций: 1) обратимо разорвать одну двойную спираль, чтобы создать в ней «ворота»; 2) заставить вторую, близлежащую, двойную спираль пройти через эти «ворота» и 3) после этого запечатать разрыв («закрыть ворота») и отделиться от ДНК (рис. 5.23). Таким вот



один конец двойной спирали ДНК не способен вращаться относительно другого ее конца



Рис. 5.22. Обратимая реакция надрезания ДНК, катализируемая ферментом ДНК-топоизомеразой I эукариот. Как показано, эти ферменты на короткий момент образуют одну-единственную ковалентную связь с ДНК; благодаря этому становится возможным свободное вращение ДНК вокруг ковалентных связей сахарофосфатного остова, сцепленного с синим фосфатом.

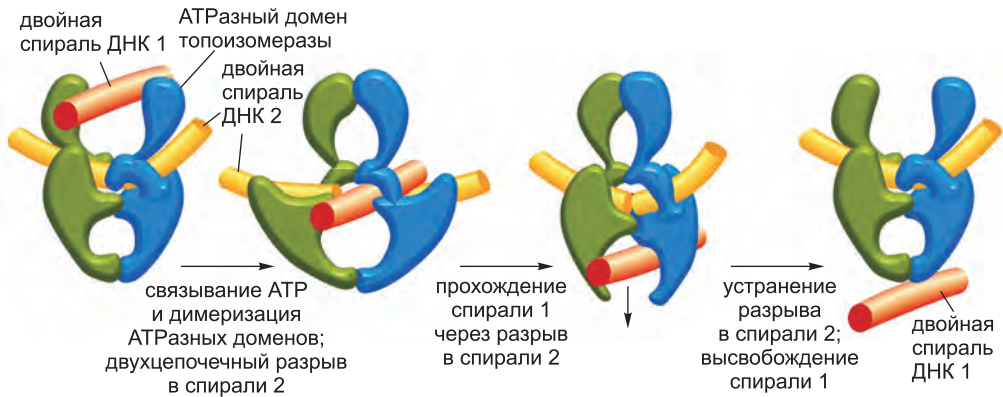


Рис. 5.23. Модель механизма действия топоизомеразы II. Как показано на схеме, связывание АТР с двумя АТРазными доменами вызывает их димеризацию и обеспечивает протекание представленных реакций. Поскольку один цикл этой реакции может произойти в присутствии негидролизуемого аналога АТР, постольку гидролиз АТР, как думают, необходим только для перезарядки фермента в каждом новом цикле реакции. Эта модель основана на данных структурного анализа фермента в сочетании с результатами биохимических экспериментов. (Переработано из J. M. Berger, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 26–32, 1998. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

образом ДНК-топоизомеразы типа II могут эффективно разделять два сцепленных кольца ДНК (рис. 5.24).

Та же реакция предотвращает также серьезные проблемы спутывания ДНК, которые в противном случае возникали бы в ходе репликации ДНК. Эту функцию прекрасно иллюстрируют мутантные клетки дрожжей, которые производят вместо нормальной топоизомеразы II вариант, который инактивируется при температуре выше 37 °С. Когда мутантные клетки нагревают до этой температуры, их дочерние хромосомы остаются переплетенными после репликации ДНК и не могут отделиться одна от другой. Огромную пользу топоизомеразы II как инструмента для распутывания хромосом сможет в полной мере оценить лишь тот, кому хоть раз приходилось биться над неожиданно объявившейся на рыболовной леске «бородой», не имея ножниц под рукой.

5.2.11. Репликация ДНК у эукариот и бактерий в основе своей схожа

Львиная доля наших познаний о репликации ДНК изначально получена в ходе исследований, проведенных на выделенных из бактерий и бактериофагов очищенных мультиферментных системах, способных реплицировать ДНК *in vitro*. Развитие таких систем в 1970-е гг. во многом обязано предшествующим исследованиям по выделению мутантов из огромного разнообразия отвечающих за репликацию генов; такие мутанты использовались для идентификации и очистки соответствующих репликационных белков. Первая система репликации у млекопитающих, которая в точности реплицировала ДНК *in vitro*, была описана в середине 1980-х гг., а мутации в генах, кодирующих почти все компоненты репликационной системы, к настоящему времени выделены и проанализированы у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В результате многое стало известно о тонких особенностях репликации ДНК у эукариот, и теперь ясно, что фундаментальные особенности репликации ДНК — геометрия репликационной вилки и использование мультиферментной белковой

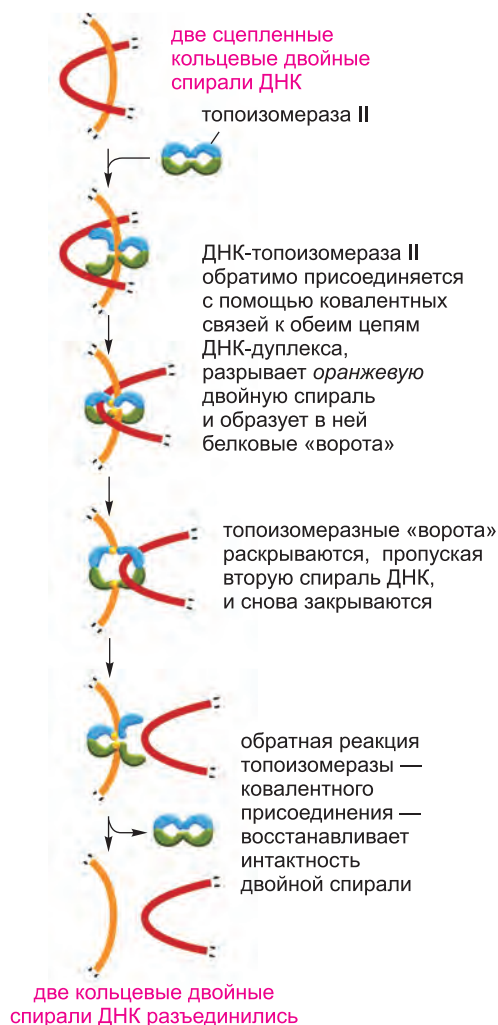


Рис. 5.24. Процесс разделения двух кольцевых молекул ДНК, катализируемый ДНК-топоизомеразой II. Для распутывания своей ДНК клетки прибегают к любым ухищрениям. В отличие от топоизомераз типа I, ферменты типа II используют гидролиз АТФ, а некоторые бактериальные варианты могут создавать дополнительное напряжение в ДНК. Сфера действия топоизомераз типа II в основном ограничена растущими клетками эукариот; отчасти по этой причине они стали популярными мишенями при разработке противораковых препаратов.

репликационной машины — оставались консервативными на всем протяжении долгого эволюционного процесса, который разделил бактерий и эукариот.

В репликационных машинах эукариот больше белковых компонентов, чем в их аналогах у бактерий, даже при том что основные функции у них одни и те же. Так, например, у эукариот белок, связывающий одноцепочечную ДНК (SSB-белок) образован из трех субъединиц, тогда как у бактерий в этом белке — только одна субъединица. Точно так же ДНК-праймаза эукариот входит в многосубъединичный фермент, который содержит также ДНК-полимеразу и называется ДНК-полимеразой- α -праймазой. Этот белковый комплекс начинает каждый фрагмент Оказаки на отстающей нити с РНК-затравки и затем продолжает РНК-затравку коротким отрезком ДНК. В этой точке в игру входят две главные репликационные полимеразы

эукариот, δ и ϵ , и довершают все фрагменты Оказаки, вместе с тем продлевая и опережающую нить. Как в точности задачи синтеза опережающей и отстающей нити распределяются между этими двумя ДНК-полимеразами, еще не понятно.

Как мы увидим в следующем параграфе, репликационные машины эукариот должны справляться с дополнительной трудностью — это репликация ДНК на нуклеосомах — повторяющихся структурных единицах хромосом, о которых мы говорили в главе 4. Нуклеосомы расположены на ДНК с промежутками примерно в 200 пар нуклеотидов, чем может объясняться, почему у эукариот новые фрагменты Оказаки синтезируются на отстающей нити с интервалами в 100–200 нуклеотидов, а не в 1000–2000 нуклеотидов, как у бактерий. Нуклеосомы могут также служить барьерами, которые замедляют движение молекул ДНК-полимеразы, и это может быть причиной того, что у эукариот репликационные вилки перемещаются со скоростью, составляющей приблизительно лишь одну десятую скорости бактериальных репликационных вилок.

Заключение

Репликация ДНК происходит в Y-образной структуре, получившей название репликационной вилки. Фермент самокорректирующаяся ДНК-полимераза катализирует полимеризацию нуклеотидов в направлении $5' \rightarrow 3'$, копируя матричную цепь ДНК с поразительной точностью. Поскольку две цепи двойной спирали ДНК антипараллельны, синтез ДНК в направлении $5' \rightarrow 3'$ может происходить непрерывно только на одной из цепей репликационной вилки (на ведущей, или опережающей, цепи). На отстающей (или запаздывающей) цепи синтезируются короткие фрагменты ДНК по типу «обратных стежков». Поскольку самокорректирующаяся ДНК-полимераза не способна начинать новую цепь, для синтеза фрагментов ДНК на отстающей цепи сначала синтезируются короткие молекулы РНК-затравок, которые впоследствии вычищаются и заменяются на ДНК.

Для репликации ДНК необходима согласованная работа многих белков. К ним относятся: 1) ДНК-полимераза и ДНК-праймаза, необходимые для катализа полимеризации нуклеозидтрифосфатов; 2) ДНК-хеликазы и белки, связывающие одноцепочечную ДНК (SSB-белки), помогающие расплести спираль ДНК — чтобы она могла быть скопирована; 3) ДНК-лигаза и фермент, которому «поручена» деградация РНК-затравок, — чтобы сшивать дискретно синтезируемые фрагменты ДНК на отстающей нити; и 4) ДНК-топоизомеразы, призванные помочь разрешить проблемы закрученности спирали и спутывания ДНК. Многие из этих белков связываются друг с другом в репликационной вилке и образуют очень эффективную «репликационную машину», через которую согласуются действия и перемещения отдельных компонентов в пространстве.

5.3. Запуск и завершение репликации ДНК в хромосомах

Мы познакомились с тем, как набор репликационных белков быстро и точно производит две дочерние двойные спирали ДНК позади репликационной вилки. Но как все эти репликационные машины собираются с самого начала и как репликационные вилки создаются на молекуле двухцепочечной ДНК? В этом параграфе мы обсуждаем, как клетки запускают (инициируют) репликацию ДНК и как они тщательно регулируют этот процесс, чтобы гарантировать его протекание не только в надлежащих позициях на хромосоме, но также и в должные периоды жизни клетки. Мы обсуждаем также несколько специальных проблем, которые репликационным машинам приходится преодолевать в клетках эукариот. В их числе необходимость реплицировать чрезвычайно длинные молекулы ДНК в хромосомах эукариот, равно как и сложность копирования молекул ДНК, которые связаны в тесные комплексы с гистонами в нуклеосомах.

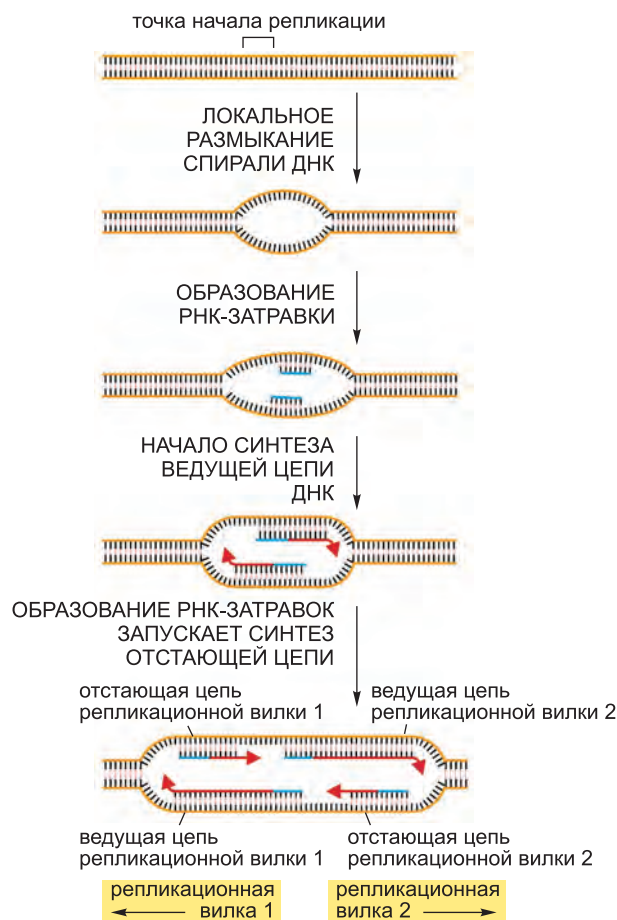
5.3.1. Синтез ДНК начинается в точках начала репликации

Как сказано ранее, двойная спираль ДНК обычно очень стабильна: две цепи ДНК надежно сцеплены друг с другом многочисленными водородными связями, образованными между основаниями обеих цепей. Чтобы быть использованной в качестве матрицы, двойная спираль должна быть расплетена и обе цепи отделены одна от другой, с тем чтобы неспаренные основания оказались снаружи. Как мы увидим, процесс репликации ДНК начинается специальными *инициаторными*

белками (*initiator proteins*), которые связываются с двухцепочечной ДНК и расклинивают две нити, разрывая водородные связи между основаниями.

Позиции, в которых спираль ДНК изначально раскрывается, называют **точками начала репликации (replication origin; рис. 5.25)**. В простых клетках наподобие бактерий или дрожжей точки начала репликации задаются последовательностями ДНК из нескольких сотен пар нуклеотидов. Эта последовательность ДНК содержит и короткие последовательности, которые распознаются инициаторными белками, и отрезки ДНК, которые особенно легко расплетаются. Мы видели на рис. 4.4, что пара оснований А–Т скреплена меньшим числом водородных связей, чем пара оснований G–C. Поэтому ДНК, обогащенную парами оснований А–Т, относительно легко разъединить, и области ДНК, обогащенные парами А–Т, обычно встречаются в точках начала репликации.

Хотя основной процесс запуска репликационной вилки, изображенный на рис. 5.25, в основе своей одинаков у бактерий и эукариот, самый способ, которым этот процесс выполняется и регулируется, отличается у этих двух групп организмов. Сначала мы рассмотрим более простой и лучше изученный пример — бактерий, а затем обратимся к более сложной ситуации, имеющей место у дрожжей, млекопитающих и прочих эукариот.



5.3.2. Хромосомы бактерий, как правило, имеют единственную точку начала репликации ДНК

Геном *E. coli* заключен в единственную кольцевую молекулу ДНК размером $4,6 \cdot 10^6$ пар нуклеотидов. Репликация ДНК начинается в единственной точке начала репликации, и две образовавшиеся репликационные вилки движутся (со скоростью около 500–1000 нуклеотидов в секунду) в противоположном направлении, пока не встретятся — примерно на полпути по кольцу хромосомы (рис. 5.26).

Рис. 5.25. При запуске репликационной вилки образуется репликационный глазок. На данной схеме представлены основные этапы запуска репликационных вилочек в точках начала репликации. Структура, образуемая на последнем этапе, в которой обе цепи родительской спирали ДНК отделены друг от друга и служат матрицами для синтеза ДНК, называется *репликационным глазком*.

Рис. 5.26. Репликация ДНК бактериального генома. У *E. coli* на дублирование своего генома размером $4,6 \cdot 10^6$ пар нуклеотидов уходит около 40 минут. Для простоты фрагменты Оказаки на отстающей нити не показаны. Что происходит, когда обе репликационные вилки сходятся друг с другом в конце цикла репликации, еще до конца не ясно, хотя операция демонтажа репликационных машин предусмотрена в общем процессе.

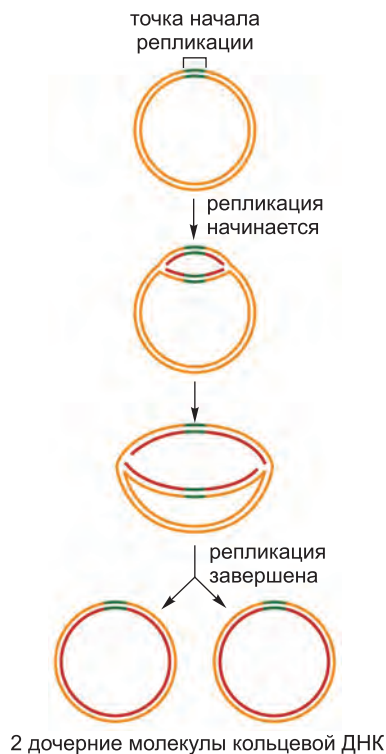
Единственная точка, в которой *E. coli* может управлять репликацией ДНК, — это инициация: после того как вилки будут собраны в точке начала репликации, синтез ДНК идет с относительно постоянной скоростью до тех пор, пока репликация не будет завершена. Поэтому неудивительно, что запуск репликации ДНК тщательно регулируется. Процесс начинается, когда многочисленные копии инициаторных белков связываются с определенными участками в точке начала репликации, вклиниваются в ДНК, которая теперь обвивает их, и таким образом формируют крупный ДНК-белковый комплекс. Затем к этому комплексу присоединяется ДНК-хеликаза, связанная с установщиком спирали; хеликаза размещается вокруг соседней одинарной нити ДНК, основания которой оказались экспонированными в ходе сборки комплекса инициаторный белок — ДНК. Установщик хеликазы похож на установщика зажима, с которым мы встречались выше; но у него есть дополнительная обязанность — поддерживать хеликазу в неактивной форме, пока она не будет должным образом установлена на зачаточную репликационную вилку. Будучи установлена, хеликаза начинает раскручивать ДНК, открыв достаточно одноцепочечной ДНК для того, чтобы праймаза синтезировала РНК-затравку, которая положит начало ведущей цепи (рис. 5.27). За этими событиями быстро следует сборка остальных белков и образование двух репликационных вилок; при этом белковые комплексы движутся относительно точки начала репликации в противоположных направлениях. Эти белковые машины продолжают синтезировать ДНК до тех пор, пока вся матрица ДНК за каждой из вилок не окажется реплицированной.

У *E. coli* взаимодействие инициаторного белка с точкой начала репликации тщательно регулируется, при этом инициация происходит только в том случае, если у бактерии достаточно питательных веществ для совершения полного цикла репликации. Под контролем находится не только активность инициаторного белка, но и точка начала репликации, которая только что пребывала в «периоде невозбудимости» (refractory period), который напрямую связан с задержкой в метилировании недавно синтезированных А-нуклеотидов. Дальше инициация репликации блокируется, пока все такие А-нуклеотиды не будут метилированы (рис. 5.28).

У *E. coli* взаимодействие инициаторного белка с точкой начала репликации тщательно регулируется, при этом инициация происходит только в том случае, если у бактерии достаточно питательных веществ для совершения полного цикла репликации. Под контролем находится не только активность инициаторного белка, но и точка начала репликации, которая только что пребывала в «периоде невозбудимости» (refractory period), который напрямую связан с задержкой в метилировании недавно синтезированных А-нуклеотидов. Дальше инициация репликации блокируется, пока все такие А-нуклеотиды не будут метилированы (рис. 5.28).

5.3.3. В хромосомах эукариот множество точек начала репликации

Мы познакомились с тем, как у бактерий в единственной точке начала репликации появляются две репликационные вилки, которые движутся в противоположных



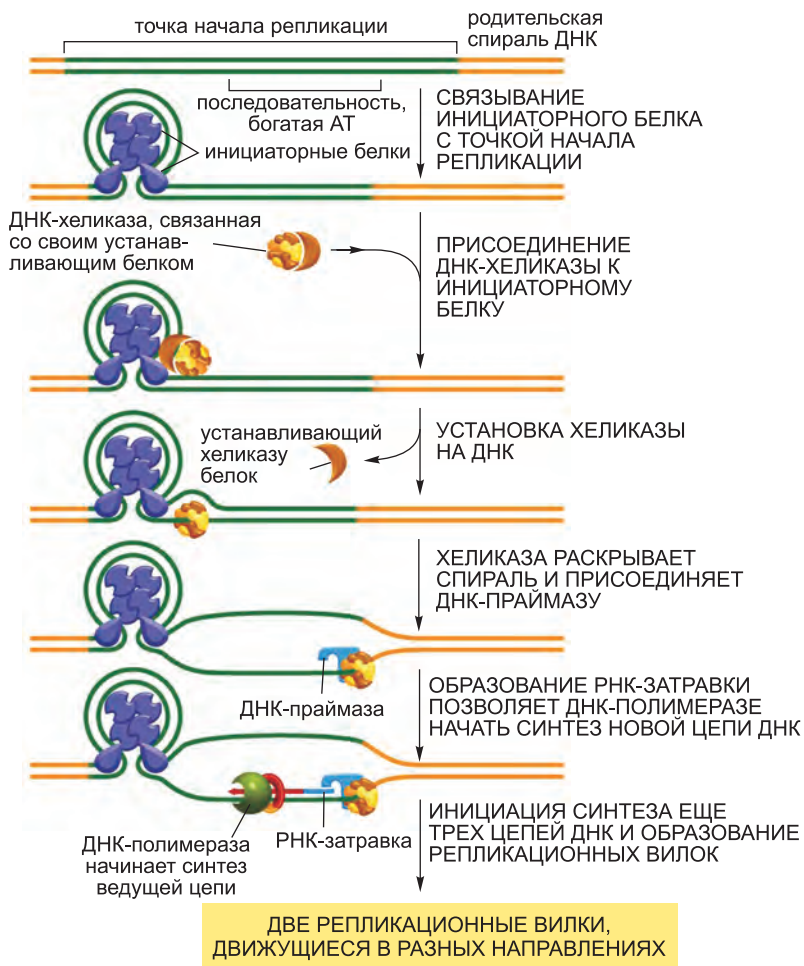


Рис. 5.27. Белки, которые запускают репликацию ДНК у бактерий. Представленный механизм был установлен в ходе экспериментов *in vitro*, проведенных с использованием смесей высокоочищенных белков. При репликации ДНК *E. coli* главный инициаторный белок, хеликаза и праймаза представлены, соответственно белками DnaA, DnaB и DnaG. На первом этапе несколько молекул инициаторного белка связываются со специфическими последовательностями ДНК в точке начала репликации с образованием компактной структуры, в которой ДНК обвита вокруг белка. Затем хеликаза вводится в игру устанавливающим хеликазу белком (белок DnaC), который ингибирует хеликазу, пока она не будет должным образом установлена в точку начала репликации. Устанавливающий хеликазу белком, таким образом, оберегает хеликазу от случайного взаимодействия с другими одноцепочечными отрезками ДНК в геноме бактерии. При содействии белка, связывающего одноцепочечную ДНК (не показан), установленная хеликаза расплетает ДНК, тем самым позволяя праймазе войти в свои права и синтезировать затравку для ведущей цепи ДНК. На последующих этапах (не показаны) запускаются три дополнительные цепи ДНК, и в конечном счете собираются две полноценные репликационные вилки.

направлениях, удаляясь от начальной точки, пока вся ДНК в единственной кольцевой хромосоме не будет реплицирована. Бактериальный геном небольшой, и две такие репликационные вилки могут справиться с его дублированием приблизительно

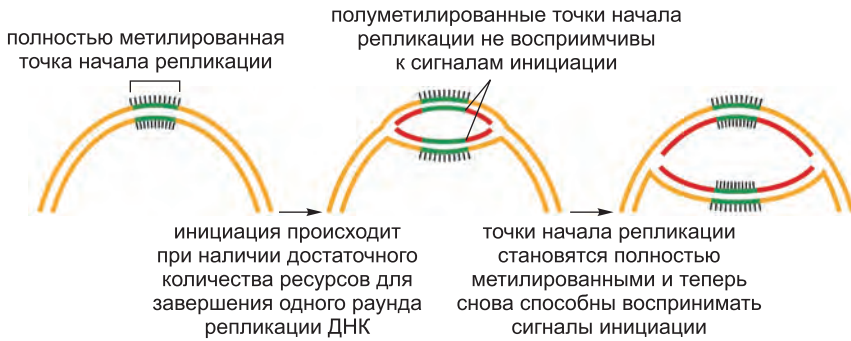


Рис. 5.28. У *E. coli* задержка метилирования точки начала репликации — это период невозбудимости для запуска ДНК. Метилирование ДНК происходит в последовательностях GATC, 11 из которых обнаружены в точке начала репликации (и охватывают приблизительно 250 пар нуклеотидов). В метилированном состоянии точка начала репликации связана с белком-ингибитором (Seq A, не показан), который блокирует доступ инициаторных белков к этому участку ДНК. В конечном счете (спустя приблизительно 20 минут после запуска репликации) метилированные наполовину точки начала репликации полностью метилируются ферментом ДНК-метилазой; после этого белок Seq A отделяется. За метилирование всех имеющихся у *E. coli* последовательностей GATC отвечает один-единственный фермент — метилаза *Dam*. Задержка в метилировании после репликации последовательностей GATC у *E. coli* используется также системой коррекции ошибок спаривания — для распознавания недавно синтезированной нити ДНК от родительской; так что значимые для такого случая последовательности GATC рассеяны по всей хромосоме и не связаны белком Seq A.

за 40 минут. Намного больший размер большинства хромосом эукариот требует какой-то иной стратегии — которая обеспечит их своевременную репликацию.

Метод определения общей схемы репликации хромосом эукариот разработан в начале 1960-х гг. Культуру клеток человека выращивают в течение короткого времени в присутствии ^3H -тимидина, так что ДНК, синтезированная в течение этого периода, несет радиоактивную метку. Затем клетки бережно лизируют и ДНК штрихом наносят на поверхность предметного стекла, покрытую фотографической эмульсией. Проявление эмульсии дает картину распределения меченой ДНК методом, известным под названием *авторадиографии*. Время радиоактивного мечения подбирают таким образом, чтобы обе репликационные вилки успели продвинуться по ДНК на несколько микрометров, — тогда реплицированная ДНК в световом микроскопе будет видна в виде полосок из серебряных зерен, хотя сама молекула ДНК слишком тонка, чтобы быть заметной. Таким образом, с помощью данной методики можно определить и скорость, и направление движения репликационной вилки (рис. 5.29). По скорости, с которой следы реплицируемой ДНК растут в длину с увеличением времени мечения, темпы движения репликационных вилок оценивают примерно в 50 нуклеотидов в секунду. Это приблизительно одна десятая скорости продвижения бактериальных репликационных вилок, что, быть может, отражает повышенную сложность реплицирования ДНК, плотно упакованной в хроматин.

Среднего размера хромосома человека содержит одну линейную молекулу ДНК размером приблизительно 150 миллионов пар нуклеотидов. На репликацию такой молекулы ДНК от начала до конца в единственной репликационной вилке, движущейся со скоростью 50 нуклеотидов в секунду, ушло бы 0,02 секунды на нуклеотид $\times 150 \cdot 10^6$ нуклеотидов = $3,0 \cdot 10^6$ секунд (приблизительно 800 часов).

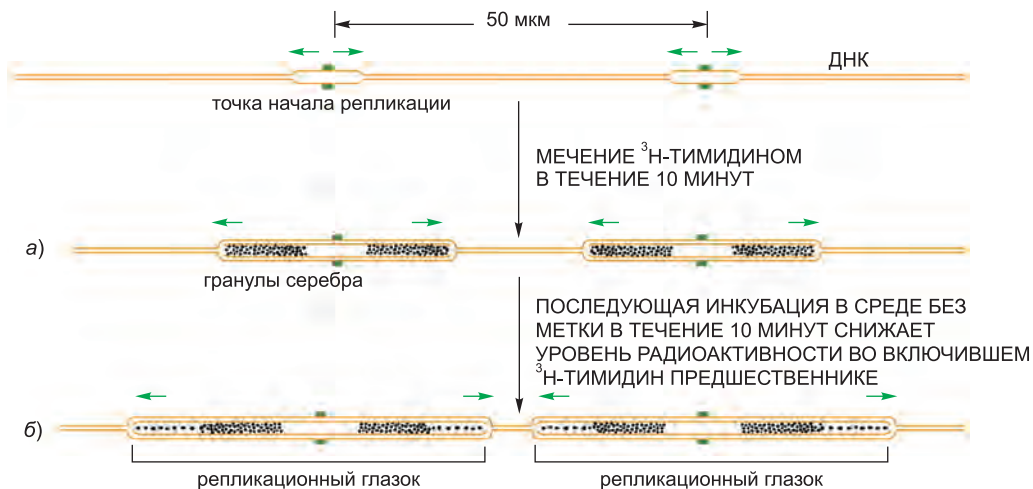


Рис. 5.29. Экспериментальное доказательство схемы, согласно которой репликационные вилки образуются и движутся по хромосомам эукариот. Новая ДНК, синтезируемая в культуре клеток человека, кратковременно метилась в среде высокорadioактивного тимидина (^3H -тимидина). *а*) В этом эксперименте клетки лизировали и ДНК «растягивали» на предметном стекле, которое затем покрывали фотографической эмульсией. По прошествии нескольких месяцев эмульсию проявили, и на том месте, где была нанесена радиоактивная ДНК, появилась полоска гранул серебра. Дабы облегчить интерпретацию автордиограммы, на этом рисунке показана только *коричневая* ДНК; немеченая ДНК в таких экспериментах невидима. *б*) Этот эксперимент проведен так же, но дополнен дальнейшей инкубацией в среде без метки — чтобы в результате дальнейшей репликации получить дополнительную ДНК, с более низким уровнем радиоактивности. Как видно на изображении *б*, в парах темных следов серебряное зерно сходит на нет в противоположных направлениях, что свидетельствует о двунаправленном движении вилок от центральной точки начала репликации, где образуется репликационный глазок (см. рис. 5.25). Репликационная вилка, как думают, останавливается только тогда, когда встречается с репликационной вилкой, движущейся во встречном ей направлении, или когда достигает конца хромосомы; таким вот образом вся ДНК в конечном счете реплицируется.

Поэтому, как и следовало ожидать, только что описанные автордиографические эксперименты показывают, что по каждой хромосоме эукариот одновременно движется множество репликационных вилок.

Дальнейшие эксперименты этого типа показали следующее. 1) Точки начала репликации, как правило, активируются кластерами, названными *репликационными единицами*, которые могут включать в себя 20–80 точек. 2) Новые репликационные единицы, по-видимому, активируются в разные периоды клеточного цикла, пока вся ДНК не будет реплицирована (к этому моменту мы еще вернемся позже). 3) В пределах репликационной единицы отдельные точки начала репликации разделены между собой промежутками в 30 000–250 000 пар нуклеотидов. 4) Как и у бактерий, репликационные вилки эукариот образуются парами и создают репликационный глазок, по мере того как они движутся в противоположных направлениях, удаляясь от общей начальной точки и останавливаясь только тогда, когда они столкнутся лоб в лоб с репликационной вилкой, движущейся во встречном направлении (или когда достигнут конца хромосомы). Таким вот образом на каждой хромосоме независимо друг от друга работают многочисленные репликационные вилки и при этом создают две полноценные дочерние спирали ДНК.

5.3.4. У эукариот репликация ДНК происходит только на одном этапе жизненного цикла клетки

Во время быстрого роста бактерии непрерывно реплицируют свою ДНК и могут начать новый круг репликации еще до завершения предыдущего. В противоположность им репликация ДНК в большинстве эукариотических клеток происходит только в течение определенной части цикла деления клетки, названной *фазой синтеза ДНК*, или **S-фазой** (рис. 5.30). В клетке млекопитающих S-фаза обычно продолжается около 8 часов; в клетках более простых эукариот, например дрожжей, S-фаза может занимать не более 40 минут. К ее окончанию каждая хромосома реплицирована с образованием двух полных копий, которые остаются соединенными одна с другой своими центромерами до начала *M-фазы* (M означает *митоз*), которая вскоре наступает. В главе 17 мы описываем систему управления, которая держит под контролем клеточный цикл, и объясняем, почему для входа в каждую очередную фазу этого цикла нужно, чтобы клетка успешно завершила предыдущую фазу.

В следующих пунктах мы разберем, как координируется репликация хромосомы во время S-фазы клеточного цикла.

5.3.5. Различные области одной и той же хромосомы реплицируются на разных этапах S-фазы

В клетках млекопитающих на полную репликацию ДНК в области, расположенной между двумя точками начала репликации, должно, как правило, уходить лишь около часа (учитывая скорость перемещения репликационной вилки и наибольшие расстояния, измеренные между точками начала репликации). И все же S-фаза в клетке млекопитающих обычно длится примерно 8 часов. Это подразумевает, что не все точки начала репликации активируются одновременно и что ДНК в каждой репликационной единице (которая, как мы упоминали ранее, содержит группу из приблизительно 20–80 точек начала репликации) реплицируется в течение только малой части всего временного периода S-фазы.

Случайным ли образом активируются различные репликационные единицы, или различные области генома реплицируются в заданном порядке? Один из возможных способов ответить на этот вопрос — это использовать аналог тимидина, бром-дезоксисуридин (BrdU), для мечения недавно синтезированной ДНК в синхронизированных популяциях клеток, добавляя его через короткие промежутки времени на протяжении всей S-фазы. Позже, во время M-фазы, те области митотических

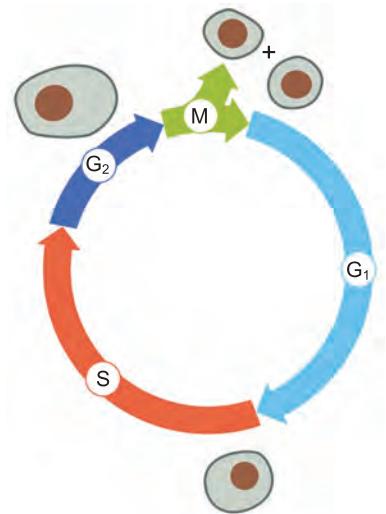


Рис. 5.30. Четыре последовательных фазы стандартного клеточного цикла у эукариот. Во время G₁-, S- и G₂-фаз клетка непрерывно растет. Во время M-фазы рост останавливается, ядро делится, и клетка делится надвое. Репликация ДНК ограничена той частью клеточного цикла, которая называется S-фазой. G₁ — промежуток между M-фазой и S-фазой; G₂ — промежуток между S-фазой и M-фазой.

хромосом, которые включили BrdU в свою ДНК, могут быть идентифицированы по изменившемуся окрашиванию или в реакции с анти-BrdU-антителами. Результаты показывают, что разные области каждой хромосомы реплицируются во время S-фазы в воспроизводимом порядке (рис. 5.31). Более того, как и ожидали, анализ репликационных вилок, наблюдаемых на автордиограммах ДНК (см. рис. 5.29), показал, что хронометраж репликации охватывает обширные области хромосомы.

Теперь существуют намного более тонкие методы для того, чтобы отслеживать запуск репликации ДНК и наблюдать движение репликационных вилок ДНК в клетках. Эти подходы основаны на использовании микрочипов ДНК — сеток размером с почтовую марку, усеянных десятками тысяч фрагментов известной последовательности ДНК. Как мы увидим подробно в главе 8, каждый отдельный фрагмент ДНК помещен в уникальную позицию на микроматрице и целые геномы могут таким образом быть представлены в четком порядке. Если образец ДНК из группы клеток, пребывающих в S-фазе, разбить на сегменты и гибридизовать на микрочипе, представляющем геном этого организма, то может быть определено количество каждой последовательности ДНК. Поскольку сегмент генома, который был реплицирован, будет содержать вдвое больше ДНК, чем нереплицированный сегмент, запуск репликационной вилки и движение вилки можно точно проследить таким способом (рис. 5.32). Хотя этот метод обеспечивает намного более высокую точность, полученные с его помощью результаты согласуются со многими из тех выводов, которые сделаны по итогам предшествующих исследований.

5.3.6. Высококонденсированный хроматин реплицируется поздно, тогда как гены в менее уплотненном хроматине, как правило, реплицируются рано

Кажется, что порядок активации точек начала репликации зависит отчасти от структуры хроматина, в котором эти точки пребывают. В главе 4 мы узнали, что гетерохроматин представляет собой особенно уплотненное состояние хромати-

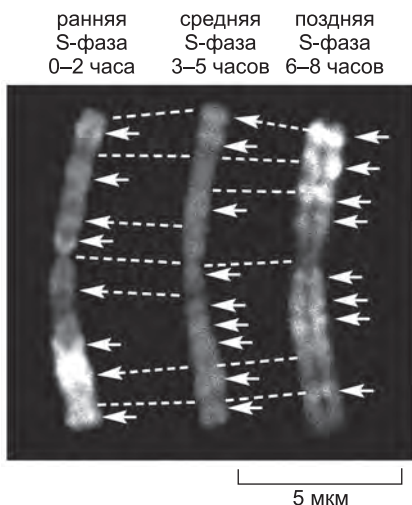


Рис. 5.31 Разные области хромосомы реплицируются в разные периоды S-фазы. На этих оптических микрофотографиях показаны окрашенные митотические хромосомы, в которых реплицирующаяся ДНК дифференциально метилась в течение разных заданных интервалов предшествующей S-фазы. В этих экспериментах клетки сначала выращивали в присутствии BrdU (аналога тимидина) и при отсутствии тимидина — с целью равномерного мечения ДНК. Затем эти клетки кратковременно инкубировали в среде с тимидином при отсутствии BrdU во время ранней, средней или поздней S-фазы. Поскольку ДНК, синтезируемая в присутствии тимидина, представляет собой двойную спираль с тимидином в одной нити и BrdU — в другой, то она окрашивается темнее, чем остальная ДНК (которая имеет BrdU в обеих нитях), видимая в виде яркой полосы (*стрелки*) на этих негативах. Штриховые линии соединяют соответствующие позиции на трех идентичных копиях представленной хромосомы. (Снимок любезно предоставлен Elton Stubblefield.)

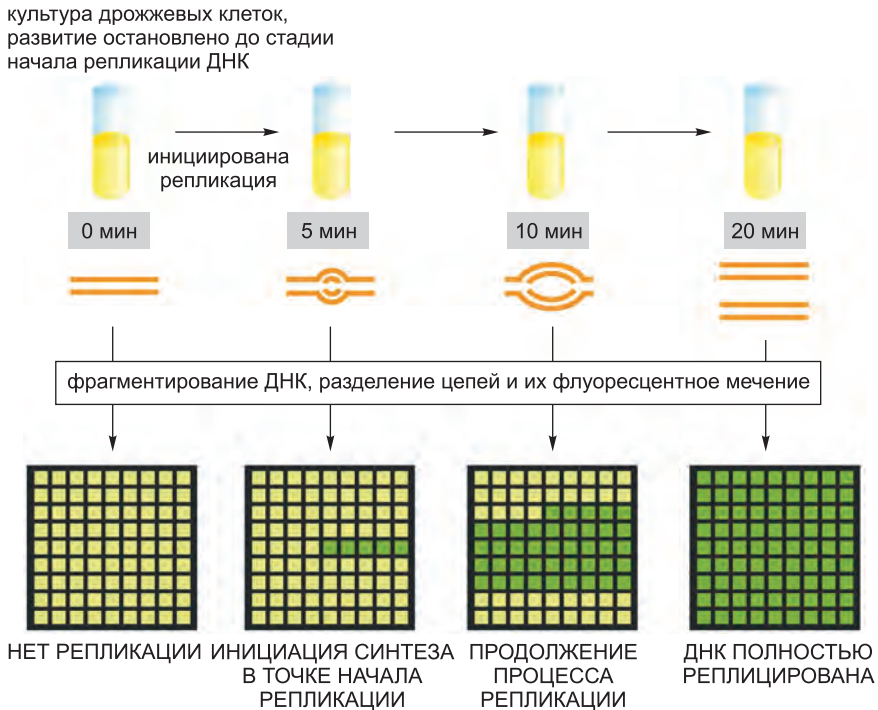


Рис. 5.32. Применение микрочипов ДНК для отслеживания образования и продвижения репликационных вилок в геноме почкующихся дрожжей. Для этого эксперимента популяция клеток синхронизируется, так что все они начинают репликацию в одно и то же время. ДНК выделяют и гибридизируют на микрочипе; ДНК, которая была реплицирована однократно, дает гибридационный сигнал (*темно-зеленые квадратики*) вдвое интенсивнее, чем сигнал нереплицированной ДНК (*светло-зеленые квадратики*). Пятна на этих микроматрицах представляют следующие по порядку последовательности на сегменте хромосомы дрожжей, расположенные слева направо, сверху вниз. Здесь показано только 81 пятно, но настоящие матрицы содержат десятки тысяч последовательностей, которые охватывают полный геном дрожжей. Как можно заметить, репликация начинается в некоторой точке и развивается в двух направлениях. Для простоты здесь показана только одна точка начала репликации. В клетках дрожжей репликация начинается в сотнях точек, разбросанных по всему геному.

на, тогда как эухроматин упакован менее плотно, что, очевидно, необходимо для осуществления транскрипции. Гетерохроматин, как правило, реплицируется очень поздно во время S-фазы, а это предполагает, что хронометраж репликации увязан с упаковкой ДНК в хроматине. Данное предположение подтверждается анализом двух X-хромосом в клетке женской особи млекопитающего. При том что обе эти хромосомы содержат, по существу, одни и те же последовательности ДНК, одна активна для транскрипции ДНК, а другая — не активна (обсуждается в главе 7). Почти вся неактивная X-хромосома конденсирована в гетерохроматин, и ее ДНК реплицируется во время поздней S-фазы. Ее активный гомолог менее уплотнен и реплицируется на всем протяжении S-фазы.

Эти данные говорят о том, что в первую очередь реплицируются те области генома, где хроматин наименее уплотнен. Репликационные вилки, кажется, движутся с сопоставимыми скоростями на всем протяжении S-фазы, так что степень

уплотнения хромосомы, видимо, влияет на время запуска репликационных вилок, а не на скорость их продвижения после формирования.

5.3.7. У простейшего эукариота — почкующихся дрожжей — точками начала репликации служат вполне определенные последовательности ДНК

Пронаблюдая картину репликации хромосом эукариот, которая происходит с использованием многочисленных точек начала репликации, каждая из которых активизируется в определенный момент S-фазы клеточного цикла, мы обращаем наш взор на самую природу этих точек начала репликации. Ранее в этой главе мы узнали, что точки начала репликации точно определены у бактерий как специфические последовательности ДНК, которые привлекают инициаторные белки, которые затем собирают реплицирующие ДНК машины. По аналогии можно было бы ожидать, что в хромосомах эукариот точки начала репликации тоже будут представлены специфическими последовательностями ДНК.

У эукариот поиск последовательностей ДНК, которые несут всю информацию, необходимую для задания точки начала репликации, увенчался успехом при исследовании почкующихся дрожжей *S. cerevisiae*. Для их идентификации были изобретены действенные методы отбора, в которых используют мутантные клетки дрожжей с повреждением того или иного жизненно важного гена. Такие клетки способны выжить в избирательной среде, только если будут обеспечены ДНК, которая несет функционально активную копию поврежденного гена. Если кольцевая бактериальная плаزمида, содержащая этот ген, будет введена в мутантные клетки дрожжей непосредственно, то она не будет способна реплицироваться, потому что ей недостает функционально активной точки начала репликации. Однако если в такую плазмиду встраивать случайные фрагменты ДНК дрожжей, то те редко встречающиеся плазмиды, которым довелось заполучить точку начала репликации дрожжей, будут способны реплицироваться. Клетки дрожжей, которые несут в себе такие плазмиды, способны пролиферировать, потому что они снабжены значимым для жизни геном в такой форме, что его можно реплицировать и передавать клеткам потомства (рис. 5.33). Последовательность ДНК, идентифицированная по ее присутствию в плазмиде, выделенной из таких выживших клеток дрожжей, была названа *автономно реплицирующейся последовательностью (Ars)*. Было показано, что в большинстве своем эти последовательности являются истинными хромосомными точками начала репликации, и тем самым обоснованность стратегии, принятой для их поиска, была доказана.

Для почкующихся дрожжей было установлено местоположение каждой точки начала репликации на каждой хромосоме. Конкретная хромосома, представленная на рис. 5.34, — хромосома III дрожжей *S. cerevisiae* — есть одна из мельчайших из известных хромосом, с длиной менее 1/100 от длины типичной хромосомы человека. Ее главные точки начала репликации разнесены в среднем на 30 000 пар нуклеотидов; такая плотность точек должна позволить этой хромосоме реплицироваться приблизительно за 10 минут, если все они активизируются одновременно. Как было упомянуто ранее, у млекопитающих точки начала репликации отстоят один от другого значительно дальше, обычно на 100 000–250 000 пар нуклеотидов.

В ходе генетических экспериментов над *S. cerevisiae* были проверены последствия удаления различных точек начала репликации на хромосоме III. Удаление

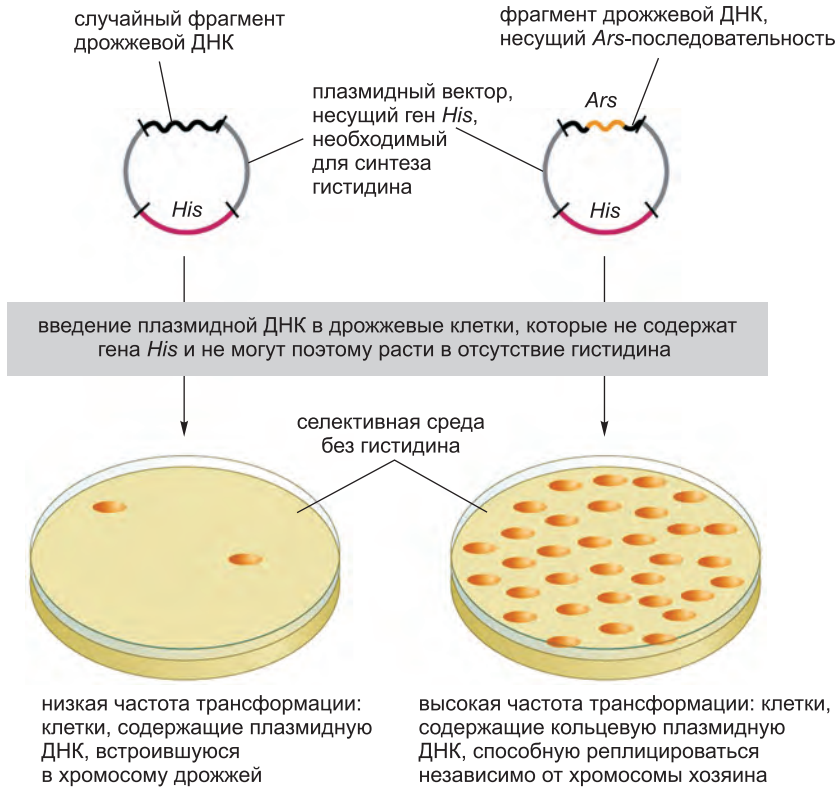


Рис. 5.33. Стратегия, принятая для идентификации последовательностей ДНК, достаточных для запуска репликации. Каждую из последовательностей ДНК дрожжей, идентифицированную этим способом, назвали автономно реплицирующейся последовательностью (*Ars*), так как она позволяет плазмиде, которая ее содержит, реплицироваться в клетке-хозяине без необходимости включения ее в хромосому клетки-хозяина.

нескольких из них оказывает небольшое воздействие, потому что репликационные вилки, которые начинают свой путь в соседних точках начала репликации, могут продолжить его в те области, которым недостает своих собственных начальных точек. Однако удаление большего числа точек начала репликации ведет к потере хромосомы при делении клеток, потому что в таком случае она реплицируется слишком

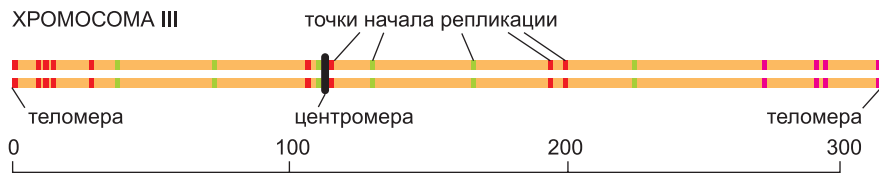


Рис. 5.34. Точки начала репликации ДНК на хромосоме III дрожжей *S. cerevisiae*. Эта хромосома, одна из наименьших среди известных хромосом эукариот, несет в общем 180 генов. Как показано на рисунке, она содержит 19 точек начала репликации, хотя они используются с разной эффективностью. Те, что окрашены красным, обычно используются менее 10 % времени, тогда как те, что отмечены зеленым, работают в течение 90 % времени S-фазы.

медленно. Многие эукариоты несут избыточное число точек начала репликации, возможно, чтобы гарантировать своевременную репликацию полного генома, даже если некоторые точки начала репликации не справятся со своей задачей.

5.3.8. У эукариот с точками начала репликации связывается большой многосубъединичный комплекс

Минимальная последовательность ДНК, необходимая для того, чтобы направлять запуск репликации ДНК у дрожжей *S. cerevisiae*, была определена путем анализа все более и более мелких фрагментов ДНК в эксперименте, очерченном на рис. 5.33. Было установлено, что любая последовательность ДНК, которая может служить точкой начала репликации, содержит: 1) участок связывания крупного, многосубъединичного инициаторного белка, названного **ORC (origin recognition complex)**, что означает **комплекс узнавания точки начала репликации**, 2) отрезок ДНК, обогащенный нуклеотидами А и Т (и поэтому легко расплетаемый), и 3) по крайней мере один участок связывания белков, которые способствуют привлечению ORC к точке начала репликации ДНК (рис. 5.35). У бактерий, как только инициаторный белок должным образом свяжется с точкой начала репликации, сборка репликационных вилок следует более или менее автоматически. У эукариот ситуация сильно отличается из-за глубокой проблемы, связанной с реплицированием хромосом с огромным числом точек начала репликации (согласно оценке, 400 — у дрожжей и 10 000 — у человека, например). При таком числе мест, в которых можно начать репликацию, как регулируется этот процесс, причем так, чтобы гарантировать копирование всей ДНК один и только один раз?

Ответ заключается в самом способе, которым комплекс ORC, будучи связан с точкой начала репликации, последовательно активируется и дезактивируется. Эту тему мы обсудим подробно в главе 17, когда будем рассматривать клеточные машины, лежащие в основе цикла деления клетки. Взаимодействие ORC—точка начала репликации сохраняется на протяжении всего клеточного цикла, диссоциация происходит только на короткое время — незамедлительно после репликации ДНК самой точки начала репликации, — а ее активность регулируют другие белки, которые связываются с этим комплексом. В их числе мы видим ДНК-хеликазу и два белка-установщика хеликазы, Cdc6 и Cdt1, которые собираются на комплексе ORC—ДНК, в итоге в каждой точке начала репликации во время G_1 -фазы формируется *предрепликационный комплекс* (рис. 5.36). Переход клетки из G_1 - в S-фазу



Рис. 5.35. Точка начала репликации у дрожжей. Эта принадлежащая дрожжам точка начала репликации (идентифицирована при помощи процедуры, обрисованной на рис. 5.33) содержит приблизительно 150 пар нуклеотидов и имеет участок связывания ORC и участок связывания Abf1 — вспомогательного белка, который облегчает прикрепление ORC. Все точки начала репликации содержат участки ORC-связывания, но вспомогательные белки в разных точках начала репликации различаются. Большинство точек начала репликации, подобно изображенному на этом рисунке, содержат еще и отрезок ДНК, который достаточно легко расплетается.

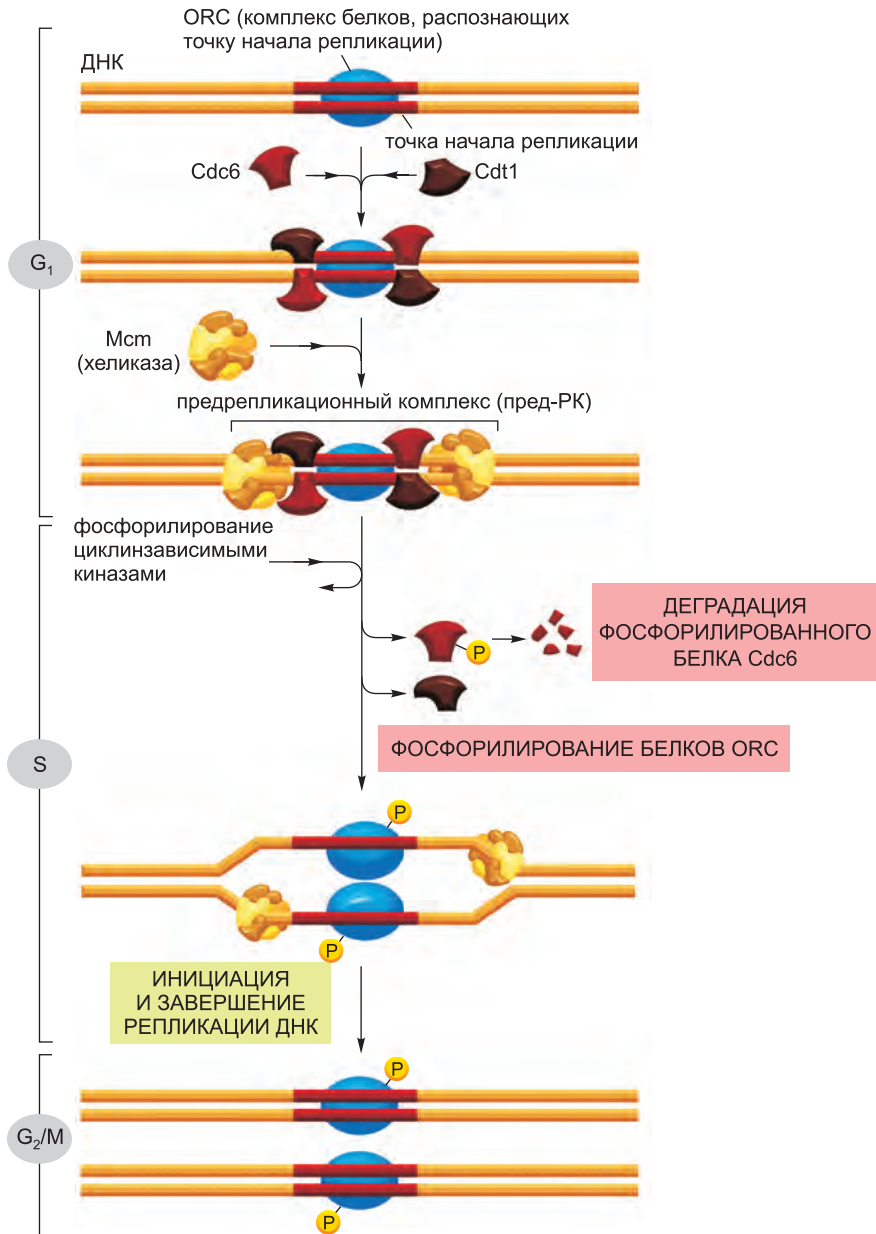


Рис. 5.36. Механизм запуска (инициации) репликации ДНК у эукариот. Этот механизм гарантирует, что каждая точка начала репликации будет активирована только один раз в одном клеточном цикле. Точка начала репликации может быть использована только в том случае, если на этом участке ДНК во время G_1 -фазы сформируется предрепликационный комплекс. В начале S -фазы циклинзависимые киназы фосфорилируют различные репликационные белки, вызывая и разборку предрепликационного комплекса, и запуск репликации ДНК. Новый предрепликационный комплекс не сможет сформироваться в точке начала репликации до тех пор, пока клетка в очередной раз не вступит в G_1 -фазу.

запускается активацией протеинкиназ (Cdk), что влечет за собою отсоединение устанавливающих хеликазу белков, активацию хеликазы, раскручивание ДНК точки начала репликации и установку остальных репликационных белков, в том числе ДНК-полимераз (см. рис. 5.36).

Протеинкиназы, которые запускают репликацию ДНК, одновременно предотвращают сборку новых предрепликационных комплексов, пока следующая М-фаза не приведет полный цикл в исходное положение (подробностей ради можно обратиться к **стр. 1067–1069**). Такая стратегия обеспечивает единственный удобный момент для формирования предрепликационных комплексов (G_1 -фаза, когда активность Cdk низка) и второй момент для их активации и последующего демонтажа (S-фаза, когда активность Cdk высока). Поскольку эти две фазы клеточного цикла взаимно исключают друг друга и наступают в предписанном порядке, каждая точка начала репликации может запускаться один и только один раз в течение цикла деления клетки.

5.3.9. Идентификация последовательностей ДНК, определяющих запуск репликации у млекопитающих, оказалась нелегким делом

По сравнению с ситуацией у почкующихся дрожжей определение последовательностей ДНК, которые задают начальные точки репликации у прочих эукариот, далось гораздо труднее. Недавно, однако, удалось идентифицировать специфические последовательности ДНК у человека — каждая несколько тысяч пар нуклеотидов в длину, что достаточно, чтобы служить точками начала репликации. Эти точки продолжают функционировать, будучи перенесены (методами рекомбинации ДНК) в иные области хромосомы, если при этом они попадают в область, где хроматин относительно разуплотнен. Одна из таких точек начала репликации принадлежит к группе генов β -глобина. При нормальном положении этого участка в геноме его функция зависит главным образом от отдаленных последовательностей ДНК (**рис. 5.37**). Как сказано в главе 7, такая отдаленная ДНК необходима для экспрессии всех генов в группе β -глобина, а ее влияние и на транскрипцию, и на функцию точки начала репликации может объяснять длительный период разуплотненности структуры ее хроматина.

У человека для запуска репликации необходим ORC, гомологичный таковому в клетках дрожжей. Многие из числа других белков, которые участвуют в процессе инициации репликации у дрожжей, аналогичным образом играют центральные роли

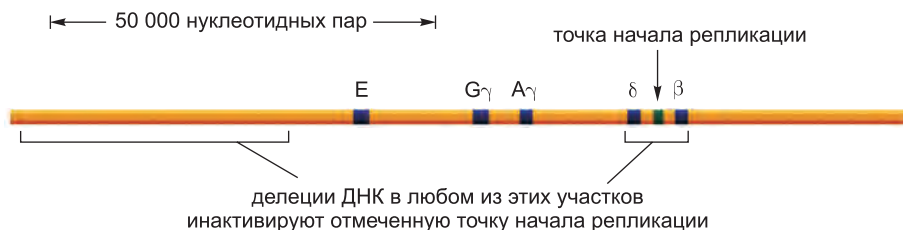


Рис. 5.37. Делеции, которые инактивируют точку начала репликации у человека. Эти две делеции встречаются по отдельности у двух индивидов, которые страдают *талассемией* — нарушением, обусловленным отсутствием экспрессии одного или нескольких генов из представленного на схеме кластера генов β -глобина. У обоих делетированных мутантов ДНК в этой области реплицируется вилками, которые начинаются в точках начала репликации вне кластера генов β -глобина.

в этом процессе у человека. Поэтому кажется весьма вероятным, что у дрожжей и у человека механизмы запуска репликации окажутся в общих чертах схожими. Однако участки связывания белкового комплекса ORC, кажется, у человека менее специфичны, нежели у дрожжей, чем можно объяснить тот факт, что точки начала репликации в геноме человека очерчены менее четко. Фактически структура хроматина, а не последовательность ДНК может играть основную роль в определении точек начала репликации у млекопитающих. Таким образом, как и во многих других областях цитобиологии, у дрожжей механизм запуска репликации ДНК наигрывает яркий лейтмотив, ведущий свое начало от самых истоков жизни, а у человека исполняет искусную вариацию на эту извечную тему.

5.3.10. За репликационной вилкой собираются новые нуклеосомы

Есть несколько дополнительных моментов в репликации ДНК, которые свойственны эукариотам. Как было сказано в главе 4, хромосомы эукариот состоят из примерно равных частей ДНК и белка. Поэтому дублирование хромосомы требует не только репликации ДНК, но также и синтеза и сборки новых хромосомных белков на ДНК позади каждой репликационной вилки. Хотя мы далеки от понимания этого процесса во всех тонкостях, но уже начинаем постигать, как дублируется фундаментальная единица упаковки хроматина — нуклеосома. Для создания новых нуклеосом в каждом клеточном цикле клетке требуется большое количество нового гистонного белка, приблизительно равное по массе новосинтезированной ДНК. По этой причине организмы большинства эукариот обладают множественными копиями гена каждого гистона. Клетки позвоночных, например, имеют около 20 копий наборов генов, в большинстве своем содержащих гены, которые кодируют все пять гистонов (H1, H2A, H2B, H3 и H4).

В отличие от большинства белков, которые синтезируются непрерывно на всем протяжении интерфазы, гистоны синтезируются главным образом в S-фазу, когда уровень гистонной мРНК возрастает примерно в пятьдесят раз (и в результате увеличенной транскрипции, и в результате уменьшенной деградации мРНК). Молекулы мРНК основных гистонов деградируют в течение нескольких минут, когда синтез ДНК останавливается в конце S-фазы. Механизм зависит от особых свойств 3'-концов этих молекул мРНК, о чем будет сказано подробнее в главе 7. И наоборот, сами гистонные белки на удивление устойчивы и могут существовать в течение всей жизни клетки. Тесная связь между синтезом ДНК и синтезом гистонов, кажется, отражает механизм обратной связи, который контролирует уровень свободных гистонов, — чтобы гарантировать, что количество производимых гистонов в точности соответствует количеству новосинтезируемой ДНК.

По мере своего продвижения репликационная вилка должна так или иначе миновать родительские нуклеосомы. Проводимые *in vitro* опыты показывают, что аппарат репликации обладает удивительной способностью (которая пока недостаточно изучена) проходить через родительские нуклеосомы, не снимая их с ДНК. Однако, для того чтобы эффективно реплицировать хромосомы в клетке, нужны белки перестройки хроматина (о которых мы говорили в главе 4), которые стабилизируют стык ДНК–гистон. При помощи таких комплексов репликационные вилки могут эффективно преодолевать даже области высококонденсированного гетерохроматина.

Когда репликационная вилка пробирается через хроматин, в большинстве своем старые гистоны остаются связанными с ДНК и рассредоточиваются по до-

черным спиральям ДНК позади репликационной вилки. Но так как количество ДНК удвоилось, для завершения укладки ДНК в хроматин необходимо равное количество новых гистонов. Старые и новые гистоны сочетаются любопытным образом. Когда нуклеосома пересекается репликационной вилкой, гистоновый октамер, кажется, разбивается на тетрамер НЗ–Н4 и два димера Н2А–Н2В (см. рис. 4.26). Тетрамер НЗ–Н4 остается связанным с ДНК и распределяется случайным образом между одним и другим дочерними дублетами, но димеры Н2А–Н2В высвобождаются из ДНК. Свежесобранные тетрамеры НЗ–Н4 добавляются к новосинтезированной ДНК, чтобы заполнить «пустоты», а затем, для довершения нуклеосом, добавляются, опять же наугад, димеры Н2АВ — половина которых из «старой гвардии», а половина — из новой (рис. 5.38).

Для упорядоченной и быстрой комплектации ДНК вслед за движущейся репликационной вилкой новыми тетрамерами НЗ–Н4 и димерами Н2А–Н2В требуются **гистоновые шапероны** («молекулярные сопровождающие» гистонов, называемые также *факторами сборки хроматина*). Такие многосубъединичные комплексы связываются с сильно основными гистонами и отправляют их на поприще сборки только в том случае, если этого требуют обстоятельства. Эти гистоновые шапероны, вместе со своими «ношами», направляются к недавно реплицированной ДНК посредством специфического взаимодействия с присущим эукариотам скользящим зажимом, названным PCNA (см. рис. 5.38, б). Такие зажимы располагаются на ДНК позади движущихся репликационных вилок и пребывают там достаточно долго, чтобы гистоновые шапероны успели выполнить поставленные перед ними задачи.

5.3.11. Механизмы дублирования хромосом эукариот гарантируют наследование профиля модификации гистонов

Из главы 4 мы узнали, что гистоны подвергаются ковалентным модификациям многих типов и что профили таких модификаций могут нести важную информацию относительно судьбы будущей ДНК. На интуитивном уровне совершенно невозможно понять, для чего нужно стирать эти схемы при каждом делении клетки: ведь, так как эта информация закодирована в гистонных белках, а не в ДНК, для ее сбережения и дублирования необходимы специальные механизмы. Мы с вами уже знаем, что гистоновые тетрамеры НЗ–Н4 распределяются случайным образом по двум дочерним хромосомам, которые появляются вслед за движущейся репликационной вилкой. Хвосты, а также другие области гистонов НЗ и Н4, могут быть интенсивно модифицированы (см. рис. 4.39), и, таким образом, каждая дочерняя хромосома засеивается крупицами памяти о родительской схеме модификации гистонов НЗ и Н4.

Как только сборка нуклеосомы позади репликационной вилки заканчивается, родительские схемы модификации тетрамеров НЗ–Н4 могут быть закреплены при помощи ферментов модификации гистонов, входящих в состав комплексов чтения-записи, которые опознают тот же тип модификации, что производят сами (рис. 5.39).

Верное дублирование схем модификации гистонов может служить основой многих примеров *эпигенетического наследования*, при котором наследуемое изменение в фенотипе клетки происходит без изменения нуклеотидной последовательности ДНК. К теме эпигенетики мы возвратимся в главе 7, когда будем рассматривать вопрос о том, как «решения», принимаемые родительской клеткой, «помнят» клетки ее потомства много поколений спустя.

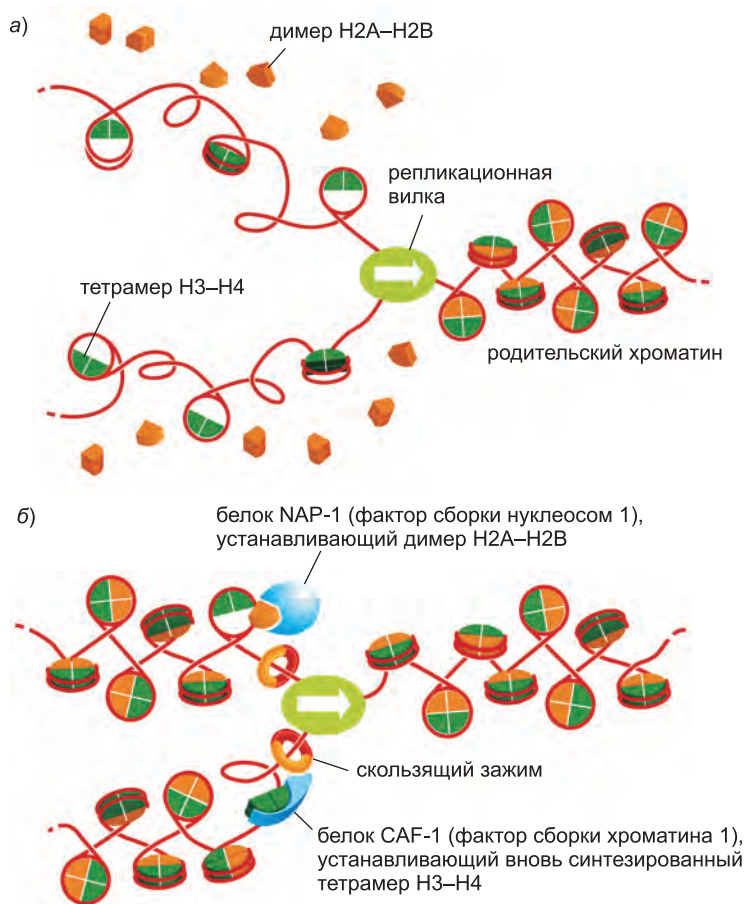


Рис. 5.38. Размещение родительских и новосинтезированных гистонов позади репликационной вилки эукариот. а) По всей видимости, распределение родительских тетрамеров H3–H4 по молекулам дочерней ДНК случайное и наследуется приблизительно поровну. Напротив, димеры H2A–H2B высвобождаются из ДНК при прохождении репликационной вилки. б) Гистоновые шапероны (NAP1 и CAF1) восстанавливают полный комплект гистонов в дочерних молекулах. Хотя некоторые дочерние нуклеосомы содержат только родительские гистоны или только недавно синтезированные гистоны, в большинстве своем они суть гибриды старых и новых. (Переработано из J. D. Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 5th ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004.)

5.3.12. Концы хромосом реплицируются теломеразой

Мы с вами уже знаем, что синтез отстающей нити в репликационной вилке происходит прерывисто по механизму «обратных стежков» с образованием коротких фрагментов ДНК. Этот механизм сталкивается с особой проблемой, когда репликационная вилка достигает конца линейной хромосомы: на самом конце линейной молекулы ДНК нет места для размещения РНК-затравки, необходимой для начала последнего фрагмента Оказаки.

Бактерии решают эту проблему «концов репликации», обзаведшись кольцевыми молекулами ДНК вместо хромосом (см. рис. 5.27). Эукариоты решают ее гениаль-

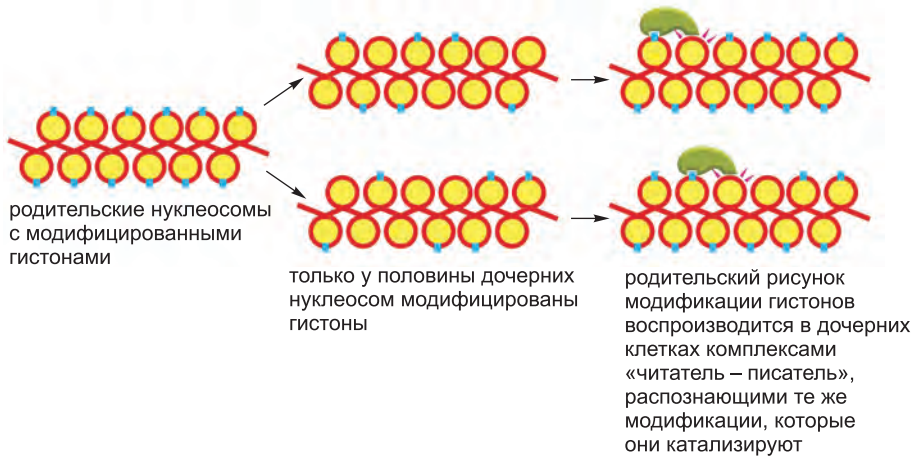


Рис. 5.39. Стратегия, посредством которой родительские схемы модификации гистонов H3 и H4 могут быть унаследованы дочерними хромосомами. Хотя маловероятно, что этот механизм распространяется на все модификации гистонов, он определенно относится к некоторым из них (см. рис. 4.51). Например, ряд гистонметилазных комплексов специфически распознает N-концевые гистонные хвосты, которые были до этого метилированы на том же участке, который эта метилаза модифицирует.

ным способом: на концах хромосом у них есть специализированные нуклеотидные последовательности, которые включены в структуры, названные теломерами (см. главу 4). Теломеры содержат много тандемных повторов короткой последовательности, которая похожа у таких разных организмов, как протисты, грибы, растения и млекопитающие. У человека последовательность повторяющейся единицы имеет вид GGGTTA и повторяется примерно тысячу раз в каждой теломере.

Последовательности теломерной ДНК узнают специфичные к такой последовательности ДНК-связывающие белки, которые привлекают фермент, названный **теломеразой**, который и пополняет запас этих последовательностей при каждом делении клетки. Теломераза распознает конец существующей повторяющейся последовательности теломерной ДНК и продолжает его в направлении 5' → 3', используя для синтеза новых копий повтора матрицу РНК, которая является компонентом самого фермента (рис. 5.40). Ферментативная часть теломеразы напоминает другие *обратные транскриптазы* — ферменты, которые синтезируют ДНК, используя матрицу РНК (см. рис. 5.72). После продления родительской цепи ДНК теломеразой репликация отстающей нити на конце хромосомы может быть довершена обычными ДНК-полимеразами, использующими эти продолжения в качестве матриц для синтеза комплементарной нити (рис. 5.41).

Только что описанный механизм, прибегнув к помощи нуклеазы, которая съедает 5'-конец, гарантирует, что 3'-конец ДНК в каждой теломере всегда будет более длинным, чем 5'-конец, с которым он спарен так, что односторонний конец выдается наружу (см. рис. 5.41). Этот выступающий конец, как было показано, загибается петлей назад, просовывает свой односторонний конец в спираль ДНК теломерной повторяющейся последовательности и образует *t-петлю* (рис. 5.42). В самых общих чертах эта реакция напоминает встраивание цепи (strand invasion) во время гомологичной рекомбинации, обсуждаемой ниже, и она, возможно, эволюционировала из этих древних рекомбинационных систем. Т-петли дают нормальные

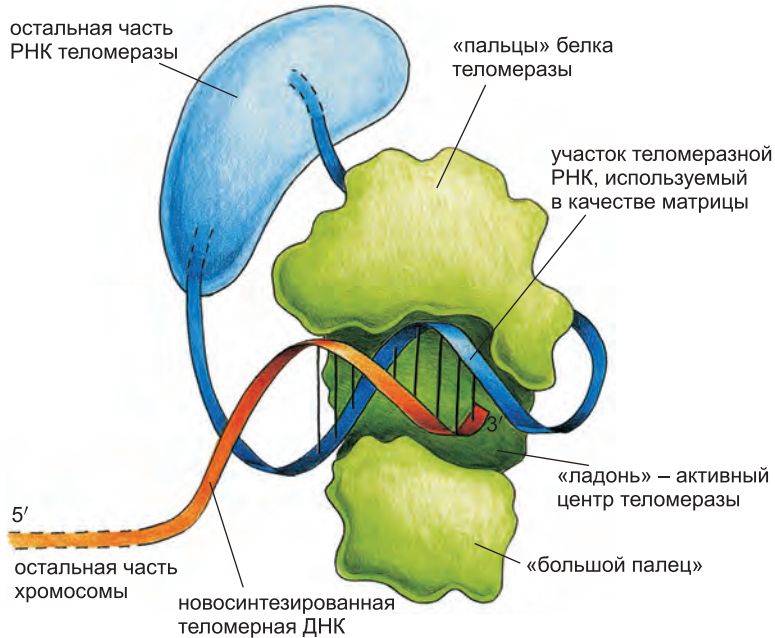


Рис. 5.40. Структура части теломеразы. Теломераза представляет собой крупный комплекс белок–РНК. РНК (*синим*) содержит матричную последовательность для синтеза новых теломерных повторов ДНК. Сама реакция синтеза выполняется доменом обратной транскриптазы, входящим в состав белка (показан *зеленым*). Обратная транскриптаза — это специальная форма фермента полимеразы, которая использует матрицу РНК для синтеза нити ДНК; теломераза уникальна тем, что все время несет свою собственную матрицу РНК. Теломераза имеет также несколько вспомогательных белковых доменов (не показаны), которые необходимы для правильной сборки фермента на концах хромосом. (Перерисовано из J. Lingner and T. R. Cech, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 226–232, 1998. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

концы хромосом с уникальной структурой, которая защищает их от ферментативной деградации и четко отличает их от концов разорванных молекул ДНК, которые клетка быстро репаррует (см. рис. 5.51).

5.3.13. Длина теломеры регулируется и на уровне клеток, и на уровне организма

Поскольку процессы, которые удлиняют и сокращают каждую теломерную последовательность, уравновешены лишь приблизительно, конец хромосомы содержит переменное число теломерных повторов. Неудивительно, что эксперименты показывают, что клетки, которые неограниченно делятся (например, клетки дрожжей), имеют гомеостатические механизмы, поддерживающие число таких повторов в пределах ограниченного диапазона (**рис. 5.43**).

В соматических клетках человека теломерные повторы, предположительно, обеспечивают каждую клетку счетным механизмом, который помогает предотвратить неограниченную пролиферацию клеток во взрослых тканях. В самой простой форме эта теория утверждает, что наши соматические клетки рождаются с полным комплектом теломерных повторов. Некоторые стволовые клетки, особенно в тех

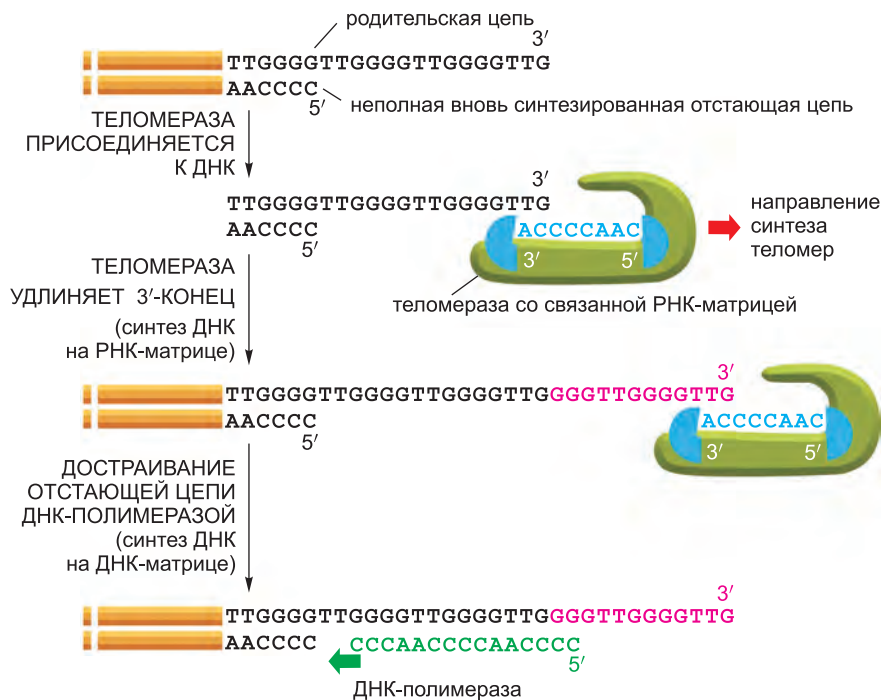
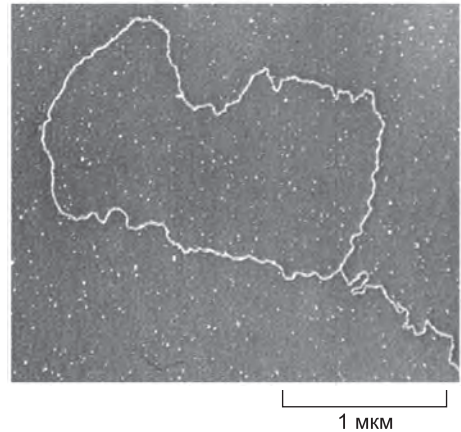


Рис. 5.41. Репликация теломер. Представленные здесь реакции показывают, как синтезируются повторяющиеся G-обогащенные последовательности, которые образуют концы хромосом (теломеры) в организмах самых разных эукариот. 3'-конец родительской нити ДНК продолжается посредством РНК-направленного синтеза ДНК; это позволяет достроить спаренную с родительской, но еще незавершенную цепь дочерней ДНК в направлении от ее 5'-конца. Эта неполная, отстающая нить, как предполагается, завершается ДНК-полимеразой α , которая несет ДНК-праймазу в качестве одной из своих субъединиц. Приведенная в назидание теломерная последовательность присуща ресничной инфузории *Tetrahymena*, на которой эти реакции и были открыты.

тканях, что должны восполняться на протяжении всей жизни, — например, в костном мозге или коже, — сохраняют полную теломеразную активность. Однако в клетках многих других типов уровень теломеразы снижается, и фермент не вполне поспевает за дублированием хромосом. Такие клетки при каждом делении теряют по 100–200 нуклеотидов в каждой теломере. По смене многих клеточных поколений клетки потомства унаследуют дефектные хромосомы (потому что их концы не смогут полностью реплицироваться) и, следовательно, навсегда выйдут из клеточного цикла и прекратят делиться — этот процесс был назван *репликационным старением клеток* (обсудим его в главе 17). Теоретически, такой механизм мог бы послужить залогом от безудержной пролиферации аномальных клеток в тканях организма и таким образом мог бы уберечь нас от рака.

Гипотеза о том, что длина теломеры служит своего рода «измерительной шкалой» для отсчета делений клетки и, таким образом, регулирует время ее жизни, была проверена несколькими способами. Для некоторых типов клеток человека, выращенных в культуре тканей, результаты экспериментов подтверждают такую теорию. Фибробласты человека обычно пролиферируют приблизительно в течение 60 делений клеток в культуре, прежде чем наступит их репликационное старение.

Рис. 5.42. Т-петля на конце хромосомы млекопитающих. Электронный микрофотоснимок ДНК на конце интерфазной хромосомы человека. Хромосома была зафиксирована, депротенинизирована и искусственно утолщена перед анализом. Наблюдаемая на данном снимке петля составляет приблизительно 15 000 пар нуклеотидов в длину. Встраивание одностороннего 3'-конца в дуплексы повторов с образованием t-петли, как думают, выполняется и поддерживается специализированными белками. (Заимствовано из J. D. Griffith et al., *Cell* 97: 503–514, 1999. С любезного разрешения издательства Elsevier.)



Подобно большинству других соматических клеток человека, фибробласты дают только низкие уровни теломеразы, и их теломеры постепенно укорачиваются с каждым очередным делением. Когда фибробластам обеспечивали дополнительную теломеразу путем вставки активного гена теломеразы, длина теломеры поддерживалась и многие клетки после этого продолжали нескончаемо делиться. Так что кажется очевидным, что в некоторых клетках человека укорочение теломер может вести счет числу делений клетки и запускать репликационное старение.

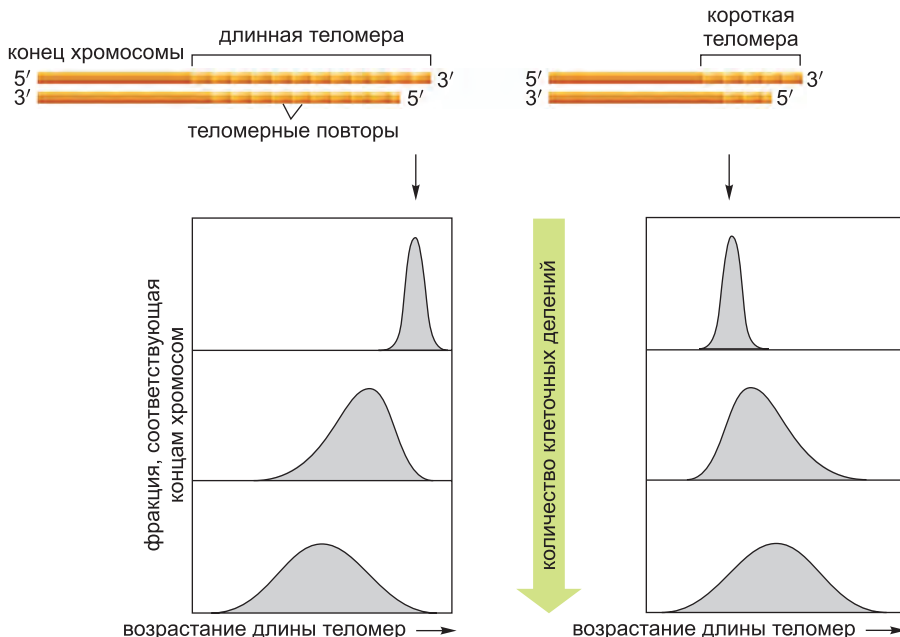


Рис. 5.43. Опыт, свидетельствующий о том, что клетки дрожжей контролируют длину своих теломер. В этом эксперименте теломеру на одном конце определенной хромосомы искусственно делали или длиннее (слева), или короче (справа) средней. После многих делений клеток на хромосоме восстанавливалась средняя длина теломеры и распределение длин, типичное для других хромосом в клетке дрожжей. Предполагают наличие подобного механизма обратной связи, управляющего длиной теломер, в клетках зародышевой линии животных.

Было высказано предположение о том, что такого типа контроль за клеточной пролиферацией важен для поддержания архитектуры ткани и отвечает, так или иначе, также за старение животных, в том числе и нас с вами. Эти идеи проверены на трансгенных мышцах, у которых полностью отсутствует теломераза. Теломеры в хромосомах мыши приблизительно в пять раз длиннее, чем теломеры человека, и поэтому мыши должны давать потомство на протяжении трех и более поколений, прежде чем их теломеры сократятся до нормальной для человека длины. Возможно, именно поэтому первые поколения мышей развиваются нормально. Однако в следующих поколениях мыши последовательно накапливают все большее число дефектов в некоторых интенсивно пролиферирующих тканях. Вдобавок к этому такие мыши показывают признаки преждевременного старения и имеют выраженную предрасположенность к образованию опухолей. В этих и других отношениях эти мыши напоминают людей с генетическим заболеванием, которое называется *врожденным дискератозом*. Индивиды, пораженные этой болезнью, несут одну функционально активную и одну неактивную копии гена теломеразной РНК; они имеют преждевременно укорачивающиеся теломеры и обычно умирают от прогрессирующей атрофии костного мозга. Кроме того, у них развивается рубцевание легкого и цирроз печени, а также отклонения различных эпидермальных структур, в том числе кожи, волосяных фолликулов и ногтей.

Вышеупомянутые наблюдения демонстрируют, что управление пролиферацией клеток путем укорачивания теломер представляет определенный риск для организма, потому что не все клетки, которые начинают терять концы своих хромосом, прекратят делиться. Некоторые, несомненно, становятся генетически неустойчивыми, но продолжают делиться, давая начало видоизмененным клеткам, которые могут привести к раку. Таким образом, можно усомниться в том, что наблюдаемая в большинстве соматических клеток человека супрессия (down-regulation) теломеразы дает эволюционное преимущество, как полагают те, кто постулирует, что укорочение теломер защищает нас от рака и других болезней, обусловленных безудержным делением клеток.

Заключение

Белки, которые запускают репликацию ДНК, связываются с последовательностями ДНК в точке начала репликации (origin) и катализируют образование репликационного глазка (replication bubble) с двумя движущимися в противоположных направлениях репликационными вилками. Процесс начинается с образования комплекса инициаторный белок–ДНК, который впоследствии устанавливает ДНК-хеликазу на матрицу ДНК. Затем присоединяются другие белки и довершают образование многоферментной «репликационной машины», которая катализирует синтез ДНК в каждой репликационной вилке.

У бактерий и некоторых простых эукариот точки начала репликации задаются специальными последовательностями ДНК, которые имеют длину всего лишь несколько сот пар нуклеотидов. У прочих эукариот, таких как человек, последовательности, специфически определяющие точку начала репликации ДНК, кажется, выражены менее четко и могут охватывать несколько тысяч пар нуклеотидов.

Бактерии обычно имеют единственную точку начала репликации в кольцевой хромосоме. При скоростях вилки до 1000 нуклеотидов в секунду они могут реплицировать свой геном менее чем за час. Репликация ДНК эукариот проис-

ходит только в одной части клеточного цикла — в S-фазе. У эукариот репликационная вилка движется в 10 раз медленнее, чем у бактерий, и, для того чтобы успеть провести репликацию намного более длинных хромосом за время S-фазы, которая в клетках человека обычно длится в течение 8 часов, требуется целый сонм точек начала репликации. Различные точки начала репликации в таких хромосомах эукариот активируются в определенной последовательности, устанавливаемой отчасти структурой хроматина, при этом наиболее уплотненные области хроматина обычно начинают репликацию в последнюю очередь. После того как репликационная вилка прошла, структура хроматина воссоздается путем добавления новых гистонов к старым, которые напрямую наследуются каждой молекулой дочерней ДНК. Механизм дублирования хромосом позволяет передавать дочерним хромосомам родительские схемы модификации гистонов, тем самым обеспечивая средство эпигенетического наследования.

Эукариоты решают проблему репликации концов своих линейных хромосом при помощи специализированной концевой структуры — теломеры, — поддерживаемой специальным полимеризующим нуклеотиды ферментом, названным теломеразой. Теломераза продолжает одну из нитей ДНК на конце хромосомы, используя матрицу РНК, которая является неотъемлемой частью самого фермента, синтезируя многократно повторяющуюся последовательность ДНК, которая обычно простирается на тысячи пар нуклеотидов на каждом конце хромосомы.

5.4. Репарация ДНК

Поддержание генетической стабильности, что необходимо организму для выживания, требует не только чрезвычайно точного механизма репликации ДНК, но также и механизмов исправления многих случайных повреждений, которые непрерывно происходят в ДНК. В большинстве своем такие самопроизвольные изменения в ДНК кратковременны, потому что они незамедлительно исправляются набором процессов, которые в совокупности называют **репарацией ДНК**. Из тысяч случайных изменений, возникающих каждый день в ДНК клетки человека — в силу воздействия высокой температуры, нарушений обмена веществ, излучений различной природы и действия веществ из окружающей среды, — лишь немногие накапливаются в виде мутаций в последовательности ДНК. Так, теперь мы знаем, что менее одного из 1000 случайных изменений нуклеотидов в ДНК заканчивается постоянной мутацией; все остальные с необыкновенной эффективностью устраняются службой репарации ДНК.

Значение механизма репарации ДНК огромно, судя по одному только объему вложений, которые клетки пускают на ферменты «залечивания» ДНК. Например, анализ геномов бактерий и дрожжей показал, что несколько процентов кодового объема этих организмов отведены исключительно функциям репарации ДНК. О важности этих механизмов свидетельствует также повышающаяся частота мутаций, которая следует за инактивацией генов репарации ДНК. Многие белки репарации ДНК и гены, что их кодируют, — которые, как мы теперь знаем, работают в самых разных организмах, включая и человека, — были первоначально идентифицированы у бактерий при выделении и исследовании мутантов, которые показывали повышенную частоту мутаций или возросшую чувствительность к повреждающим ДНК агентам.

Недавно проведенные исследования по выяснению последствий сниженной способности к репарации ДНК у людей позволили связать многие болезни человека именно с этой проблемой ([таблица 5.2](#)).

Таблица 5.2. Некоторые наследственные заболевания, связанные с дефектами в системе репарации ДНК

НАЗВАНИЕ	ФЕНОТИП	ЗАТРОНУТЫЙ ФЕРМЕНТ ИЛИ ПРОЦЕСС
мутации генов MSH2, 3, 6; MLH1; PMS2	колоректальный рак	исправление ошибок спаривания
пигментная ксеродерма (XP), типы А-С XP-вариант	рак кожи, повышенная чувствительность к УФ-лучам, неврологические расстройства повышенная чувствительность к УФ-лучам, рак кожи	эксклюзивная репарация нуклеотидов синтез «через повреждения» ДНК-полимеразой η
атаксия-телеангиэктазия (АТ)	лейкемия, лимфома, повышенная чувствительность к γ -лучам, нестабильность генома	белок АТМ, протеинкиназа, активируемая двухцепочечными разрывами ДНК
мутации гена BRCA2	рак молочной железы, яичников и предстательной железы	репарация с помощью гомологичной рекомбинации
синдром Вернера	преждевременное старение, склонность к злокачественным новообразованиям, нестабильность генома	акцессорные 3'-экзонуклеаза и ДНК-хеликаза
синдром Блума	склонность к злокачественным новообразованиям, задержка роста, нестабильность генома	акцессорная ДНК-хеликаза для репликации
анемия Фанкони, типы А-С	врожденные пороки развития, лейкемия, нестабильность генома	репарация межцепочечных поперечных сшивков ДНК
46 BR пациент	гиперчувствительность к повреждающим ДНК агентам, нестабильность генома	ДНК-лигаза I

Так, до этого мы уже говорили, что дефекты в гене, который обычно работает на устранение ошибок спаривания, возникающих при репликации ДНК, у человека могут привести к наследственной предрасположенности к некоторым видам рака, причина чему — повышенная частота мутаций. В случае другой болезни человека, *пигментной ксеродермы* (xeroderma pigmentosum; XP), пораженные индивиды чрезвычайно чувствительны к ультрафиолетовому излучению из-за неспособности репарировать некоторые продукты ДНК, образующиеся в результате фотореакции. Этот дефект обуславливает рост частоты мутаций, что ведет к серьезным повреждениям кожи и повышенной подверженности некоторым видам рака.

5.4.1. Без репарации спонтанные повреждения ДНК быстро изменили бы ее последовательность

Хотя ДНК и является устойчивым материалом, как того требует задача сохранения генетической информации, она представляет собой сложную органическую молекулу, которая подвержена, даже при нормальных условиях в клетке, самопроизвольным изменениям, которые приводили бы к мутациям, не будь устраняемы ([рис. 5.44](#)). Например, ДНК каждой клетки человека теряет прибли-

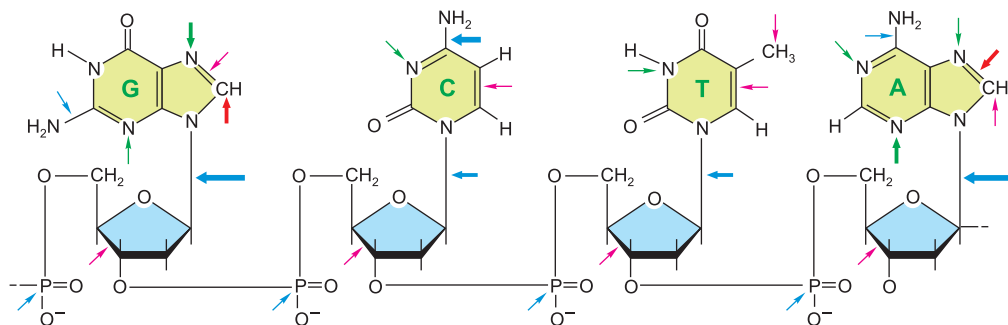


Рис. 5.44. Спонтанно происходящие модификации нуклеотидов, после которых, по всей вероятности, требуется репарация ДНК. На каждом нуклеотиде показаны участки, которые, как известно, подвержены модификации при спонтанном окислительном повреждении (красные стрелки), гидролитическом воздействии (синие стрелки) и неконтролируемом метилировании донором метильной группы S-аденозилметионином (зеленые стрелки), при этом толщина стрелок отражает относительную частоту каждого такого случая. (На основе Т. Lindahl, *Nature* 362: 709–715, 1993. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

зительно 5000 пуриновых оснований (аденин и гуанин) каждый день, потому что их N-гликозильные связи с дезоксирибозой гидролизуются, — самопроизвольная реакция, названная *апуринизацией*, или *депуринизацией*. Точно так же самопроизвольное *дезаминирование* цитозина до урацила происходит в ДНК с частотой приблизительно 100 оснований в одной клетке за день (рис. 5.45). Вдобавок к

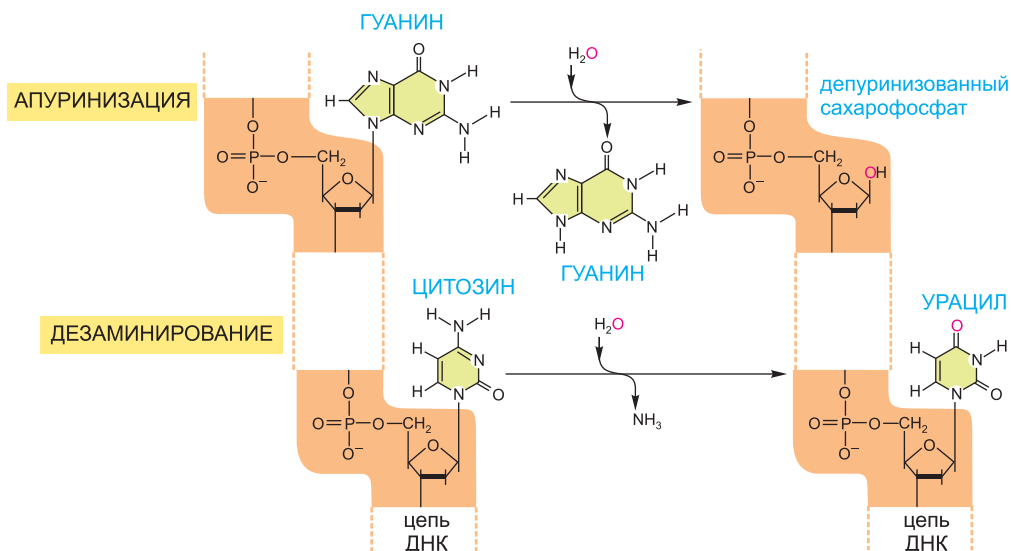


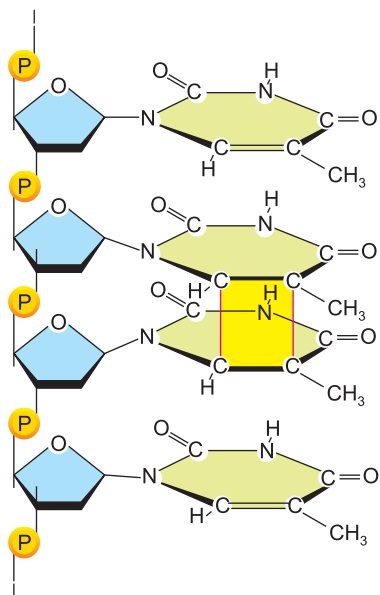
Рис. 5.45. Апуринизация и дезаминирование. Это две наиболее часто встречающиеся спонтанные химические реакции, которые, как известно, создают серьезные повреждения ДНК в клетках. Депуринизация может высвободить гуанин (показан здесь), а также аденин из ДНК. Реакция дезаминирования преобразует цитозин в видоизмененное основание ДНК — урацил (показан здесь), дезаминирование происходит также и по другим основаниям. Эти реакции обычно имеют место в двухцепочечной ДНК; для удобства на схеме показана только одна цепь.

этому, основания ДНК время от времени повреждаются в ходе столкновений с реакционно активными продуктами обмена веществ, производимыми в клетке (в том числе активные формы кислорода) или под воздействием химикатов из окружающей среды. Кроме того, ультрафиолетовое излучение от Солнца может спровоцировать образование ковалентной связи между двумя смежными пиримидиновыми основаниями в ДНК с образованием, например, тиминовых димеров (рис. 5.46). Если такие изменения останутся неисправленными, то, как можно ожидать, в большинстве своем при репликации ДНК они приведут или к удалению одной либо нескольких пар оснований, или к подмене пары оснований в дочерней цепи ДНК (рис. 5.47). В таком случае эти мутации будут распространяться по следующим поколениям клеток. Такая высокая частота случайных изменений в последовательности ДНК имела бы катастрофические последствия для организма.

5.4.2. Двойная спираль ДНК легко реставрируется

Устроенная в виде двойной спирали структура ДНК идеально подходит для восстановления в первоначальном виде, потому что несет в себе две отдельные копии всей генетической информации — по одной в каждой из двух цепей. Таким образом, когда одна цепь повреждается, комплементарная сохраняет неповрежденную копию той же самой информации, и эта копия обычно используется для восстановления правильных последовательностей нуклеотидов в поврежденной нити.

Признаком значимости двухцепочечной спирали для безопасного хранения генетической информации служит ее повсеместное использование всеми клетками; только отдельные маленькие вирусы используют в качестве своего генетического материала одноцепочечную ДНК или РНК. Процессы репарации, описанные в этом параграфе, не могут работать с такими нуклеиновыми кислотами, и, будучи повреждены, одноцепочечные геномы, таким образом, имеют очень высокий шанс на появление измененного нуклеотида. Кажется, что только организмы с крошечными геномами (и поэтому крошечными мишенями для повреждения ДНК) могут позволить себе хранить свою генетическую информацию в молекуле, отличной от двойной спирали ДНК.



5.4.3. Различные повреждения ДНК устраняются разными способами

Клетки имеют многочисленные способы репарации своей ДНК, предполагающие использование разных ферментов, которые действуют на повреждения различных видов. На рис. 5.48 показано два из наиболее распространенных способа. В обоих случаях повреждение вырезается, первоначальная последовательность ДНК восстанавливается ДНК-

Рис. 5.46. Наиболее распространенный случай тиминового димера. Повреждения данного типа происходят в ДНК клеток, подвергшихся ультрафиолетовому облучению (как например, от солнечного света). Подобный димер образуется между любыми двумя соседними пиримидиновыми основаниями (остатки С или Т) в ДНК.

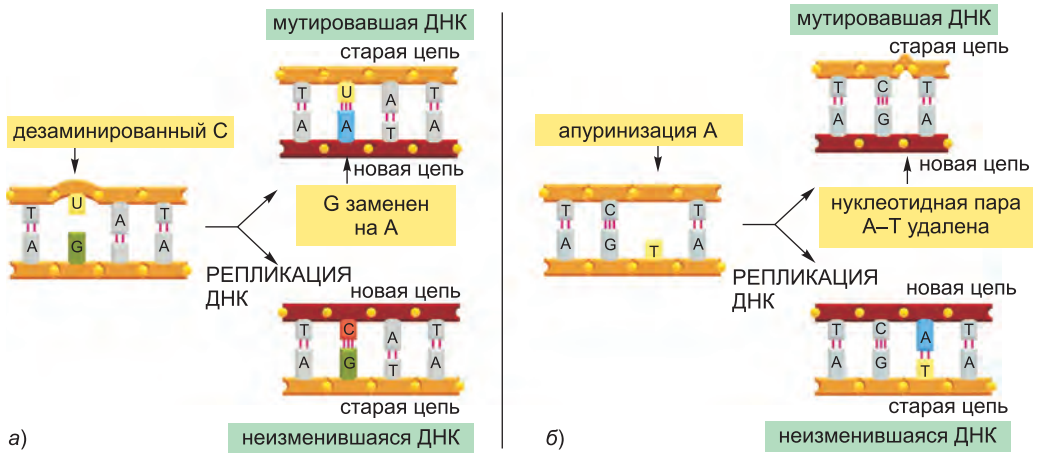


Рис. 5.47. Как химические модификации нуклеотидов вызывают мутации. а) Деаминирование цитозина, если не будет исправлено, приводит к замене одного основания другим при репликации ДНК. Как показано на рис. 5.45, при деаминировании цитозина получается урацил. Урацил отличается от цитозина по особенностям образования комплементарных пар и предпочтительно спаривается с аденином. Машины репликации ДНК поэтому вставляют в новую нить аденин, когда встречают урацил на матричной нити. б) Апуринизация может привести к потере пары нуклеотидов. Когда репликационные машины встречаются на матричной нити отсутствующий пурин, они могут перескочить к следующему полноценному нуклеотиду, как показано на этом рисунке, и в новосинтезированной нити, таким образом, появляется делеция. При репликации ДНК мутации возникают и вследствие многих других видов ДНК-повреждений ДНК (см. рис. 5.44), если те остались неисправленными.

полимеразой, которая использует неповрежденную нить в качестве матрицы, и остающийся разрыв в двойной спирали «заделывается» ДНК-лигазой (см. рис. 5.13).

Эти два способа отличаются механизмами, используемыми для удаления, повреждения из ДНК. Первый способ, названный **репарация вырезанием оснований (base excision repair)**, вовлекает батарею ферментов, называемых *ДНК-гликозилазами*, каждый из которых может распознавать в ДНК определенный тип видоизмененного основания и катализировать его гидролитическое удаление. Существует по крайней мере шесть типов таких ферментов, в том числе те, что удаляют дезаминированные С, дезаминированные А, различные типы алкилированных или окисленных оснований, основания с открытыми кольцами и основания, в которых двойная углерод-углеродная связь была случайно преобразована в углерод-углеродную одинарную связь. Как видоизмененное основание обнаруживается в двойной спирали? Ключевой шаг — опосредствованное ферментом «выпячивание наружу» («flipping out») видоизмененного нуклеотида из спирали, что позволяет ДНК-гликозилазе исследовать основание «со всех сторон» на предмет повреждений (рис. 5.49). Думается, что эти ферменты путешествуют по ДНК, выставляя основания из спирали, — чтобы оценить их статус. Как только фермент находит и распознает поврежденное основание, он отщепляет его от сахара.

«Недостающий зуб», созданный действием ДНК-гликозилазы, опознается ферментом, названный *AP-эндонуклеазой* (аббревиатура AP означает *апуриновая* или *апиридиновая*, приставка *эндо* показывает, что данная нуклеаза расщепляет внутренние, а не концевые звенья полинуклеотидной цепи). Этот фермент рас-

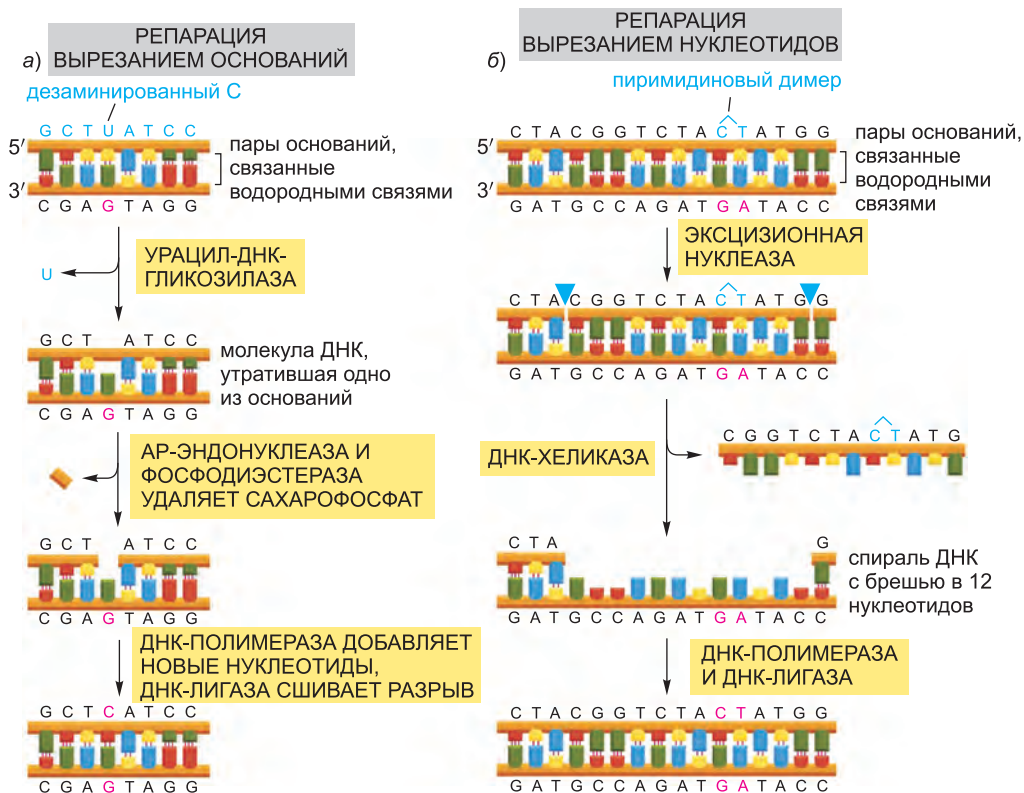


Рис. 5.48. Сравнение двух основных способов репарации ДНК. а) *Репарация вырезанием оснований.* Этот способ начинается с ДНК-гликозилазы. Здесь фермент урацил-ДНК-гликозилаза удаляет спонтанно дезаминированный цитозин из ДНК. После действия этой гликозилазы (или иной ДНК-гликозилазы, которая распознает иной вид повреждения) сахарофосфат с отсутствующим основанием вырезается последовательным действием АР-эндонуклеазы и фосфодиэстеразы. (Те же самые ферменты начинают тут же восстановление депуринизированных участков.) Затем брешь из единственного нуклеотида заделывается ДНК-полимеразой и ДНК-лигазой. В конечном итоге на место U, который появился в результате спонтанного дезаминирования, обратно становится С. АР-эндонуклеаза так названа потому, что она узнает любой участок в спирали ДНК, который содержит сахар дезоксирибозу с отсутствующим основанием; такие участки могут возникнуть либо в силу потери пурина (апуриновые участки), либо вследствие потери пиримидина (апиримидиновые участки). б) *Репарация вырезанием нуклеотидов.* У бактерий, после того как мультиферментный комплекс распознает повреждение типа пиримидинового димера (см. рис. 5.46), с каждой стороны повреждения производится разрез, и ассоциированная с комплексом ДНК-хеликазы удаляет вырезанную часть поврежденной нити. «Машина репарации вырезанием» у бактерий оставляет после себя брешь из 12 нуклеотидов, что показано на рисунке. У человека, как только поврежденная ДНК опознана, хеликаза «вербует» для местного раскручивания двойной спирали ДНК. Затем нуклеаза вырезания входит в зону действия и расщепляет связи по обе стороны повреждения, оставляя после себя брешь приблизительно из 30 нуклеотидов. Машины репарации вырезанием нуклеотидов у бактерий, и у человека могут распознавать и репарировать множество различных видов ДНК-повреждений.

щепляет фосфодиэфирную основную цепь, после чего повреждение удаляется и получившаяся прореха заделывается (см. рис. 5.48, а). Депуринизация, наиболее частый тип повреждений ДНК, также лишает основания сахар дезоксирибозу.

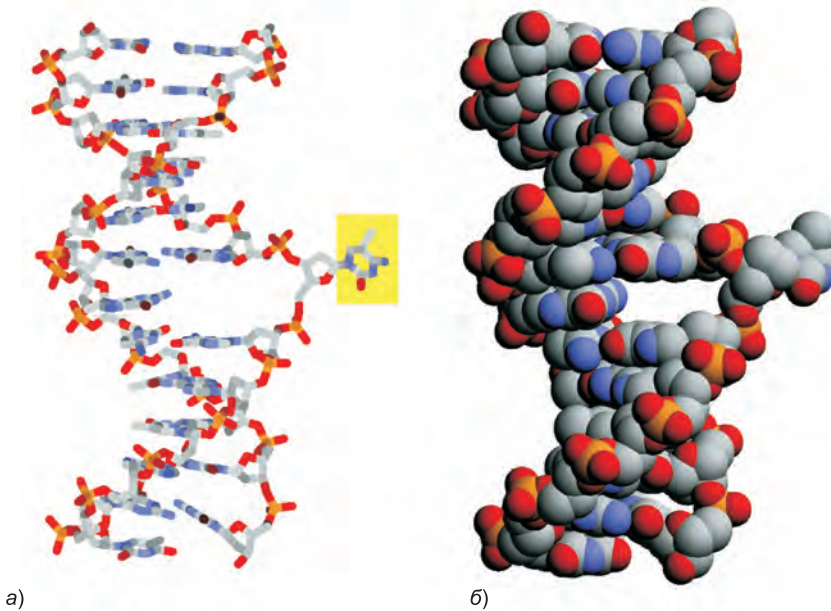


Рис. 5.49. Узнавание необычного нуклеотида в ДНК в ходе «выпячивания оснований» (base-flipping). Ферменты из семейства ДНК-гликозилаз специфически узнают основания в показанной конформации. Каждый из этих ферментов расщепляет гликозильную связь, которая соединяет специфически узнаваемое основание (*желтое*) с сахаром основной цепи, и удаляет это основание из ДНК. *а)* Стержневая модель; *б)* объемная модель.

Депуринизация начинается прямо с действия с AP-эндонуклеазы, за чем следуют процессы, представленные в нижней части схемы на рис. 5.48, *а*.

Второй основной путь называют **репарацией вырезанием нуклеотидов, или эксцизией (nucleotide excision repair)**. Этот механизм может устранять повреждения, обусловленные почти любым существенным изменением в структуре двойной спирали ДНК. К таким «объемным повреждениям» относятся ковалентные связи, образовавшиеся в основаниях ДНК в результате их взаимодействия с крупногабаритными углеводородами (например, канцерогенным соединением бензопиреном), а также друг с другом: пиримидиновые основания под действием солнечного света могут образовывать димеры Т–Т, Т–С и С–С. При этом способе репарации крупный мультиферментный комплекс просматривает ДНК на предмет всякого искажения в двойной спирали, а не какого-либо специфического видоизменения основания. Как только объемное повреждение найдено, он расщепляет фосфодиэфирную связь в сахарофосфатном остове «неправильной» нити по обе стороны от искажения (в этом процессе участвуют эксцизионные гидролазы, поэтому такое вырезание нуклеотидов иногда называют «эксцизией». — *Прим. ред.*), и ДНК-хеликаза удаляет однонитевой олигонуклеотид, содержащий обнаруженное повреждение. Затем эта большая брешь, образовавшаяся в спирали ДНК, заделывается ДНК-полимеразой и ДНК-лигазой (рис. 5.48, *б*).

Альтернативой процессам репарации путем вырезания оснований и нуклеотидов выступает прямое химическое исправление повреждения ДНК, и эта стра-

тегия используется для быстрого удаления некоторых особо мутагенных или цитотоксических повреждений. Например, поврежденный продукт алкилирования O⁶-метилгуанин исправляется путем удаления его метильной группы прямым переносом ее на остаток цистеина в самом репарирующем белке, который разрушается в ходе реакции. В другом примере метильные группы в продуктах алкилирования: 1-метиладенине и 3-метилцитозине — «выжигаются» железозависимой деметилазой с высвобождением формальдегида из метилированной ДНК и восстановлением нативного основания.

5.4.4. Сопряжение процесса репарации ДНК с транскрипцией гарантирует исправность наиболее значимой для клетки части ДНК

Вся содержащаяся в клетке ДНК находится под постоянным контролем на предмет наличия повреждений, и механизмы репарации, которые мы описали, несут свое «дежурство» во всех частях генома. Однако клетки имеют способ направлять процессы репарации ДНК к тем последовательностям, которые особенно срочно востребованы. Они делают это, связывая РНК-полимеразу — фермент, который транскрибирует ДНК в РНК на первом этапе экспрессии генов, — с исправлением поврежденной ДНК. РНК-полимераза застопоривается в местах повреждения ДНК и с помощью сопряженных с ней белков направляет машины репарации к таким участкам. У бактерий, гены коих относительно коротки, застопоренная РНК-полимераза может отделиться от ДНК, ДНК репарируется и ген транскрибируется снова — с самого начала. У эукариот, гены коих могут быть чрезвычайно длинны, используется более сложная реакция, призванная «придержать» РНК-полимеразу, отремонтировать повреждение и затем повторно запустить полимеразу.

Сопряженная с транскрипцией репарация работает по механизмам вырезания оснований, вырезания нуклеотидов и прочими репарирующими машинами, чтобы, случись повреждение, незамедлительно направить все необходимое к самым важным последовательностям ДНК клетки, и именно к тем, которые экспрессируются в данный момент. Что примечательно, репарация данного типа — процесс, специфичный к матричной цепи транскрибируемой ДНК; другая цепь исправляется с той же скоростью и эффективностью, что и ДНК, которая вообще не транскрибируется. Сопряженная с транскрипцией репарация особенно важна для человека, потому что в каждый момент времени транскрибируется лишь малая доля нашего генома. Важность этого механизма можно проследить на индивидах с синдромом Кокейна — заболевания, которое вызвано дефектом сопряженной с транскрипцией репарации. Эти больные страдают замедлением роста, отклонениями в строении скелета, прогрессирующей атрофией нервной системы и повышенной чувствительностью к солнечному свету. Большинство этих проблем, как думают, является результатом остановки (застопоривания) молекул РНК-полимеразы — раз и навсегда — на участках повреждений ДНК, которые расположены в областях жизненно важных генов.

5.4.5. Как особенности структуры, так и химические свойства оснований ДНК облегчают выявление повреждений

Двойная спираль ДНК, кажется, оптимально устроена для репарации. Как было отмечено выше, она содержит резервную копию всей генетической информации. Что не менее важно, самое естество четырех входящих в состав ДНК оснований

обуславливает очень четкие различия между неповрежденными и поврежденными основаниями. Например, каждое возможное событие дезаминирования в ДНК дает «неестественное» основание, которое может быть непосредственно опознано и удалено специфической ДНК-гликозилазой. Гипоксантин, например, является простейшим пуриновым основанием, способным к специфическому спариванию с С, но гипоксантин есть прямой продукт дезаминирования А (рис. 5.50, а). Добавление второй аминогруппы к гипоксантину дает G, который не может образоваться из А путем самопроизвольного дезаминирования и продукт дезаминирования которого (ксантин) аналогичным образом уникален.

Как будет рассказано в главе 6, РНК, как думают, в эволюционном масштабе времени служила генетическим материалом еще до ДНК, и кажется весьма вероятным, что генетический код изначально закладывался в четыре нуклеотида: А, С, G и U. На этой почве возникает вопрос: почему U в РНК заменен в ДНК на Т (который есть не что иное, как 5-метил-U). Как мы могли убедиться, спонтанное дезаминирование С преобразует его в U, но это событие в достаточной мере обезвреживается урацил-ДНК-гликозилазой. Однако, если бы ДНК содержала U в качестве естественного основания, то системе репарации было бы сложно отличать дезаминированный С от естественного U.

Особая ситуация возникает в ДНК позвоночных, где некоторые нуклеотиды С метилированы в специфических последовательностях С-G, ассоциированных с неактивными генами (обсуждаем в главе 7). Спонтанное дезаминирование таких метилированных нуклеотидов С дает естественный нуклеотид Т (рис. 5.50, б), который, как получается, образует «неправильную» пару с G в противоположной нити ДНК. Чтобы помочь репарировать дезаминированные метилированные нуклеотиды С, специальная ДНК-гликозилаза распознает неправильную пару оснований Т-G и удаляет Т. Однако этот механизм репарации ДНК, должно быть, малоэффективен, потому что метилированные нуклеотиды С служат распространенной мишенью для мутаций в ДНК позвоночных. Поразительно, но при том что только около 3% нуклеотидов С в ДНК человека подвергается метилированию, мутации в таких метилированных нуклеотидах составляют приблизительно одну треть из числа всех единичных мутаций, которые выявлены у индивидов с наследственными болезнями.

5.4.6. В критических ситуациях в репарации ДНК участвуют специальные ДНК-полимеразы

Если ДНК клетки серьезно повреждена, то механизмы репарации, которые мы обсудили, зачастую оказываются недостаточно эффективными для того, чтобы справиться с нарушением. В таких случаях иная стратегия пускается в ход — та, что сопряжена с определенным риском для клетки. Очень точные репликационные ДНК-полимеразы останавливаются, когда наталкиваются на поврежденную ДНК, и в критических ситуациях клетки используют многоцелевые, но менее точные резервные полимеразы для репликации по поврежденной ДНК.

Клетки человека содержат более 10 таких ДНК-полимераз, некоторые из которых могут распознавать повреждения ДНК определенного типа и специфично добавлять нуклеотид, необходимый для восстановления изначальной последовательности. Остальные работают на уровне «верного предположения», особенно когда основание матрицы сильно повреждено. Эти ферменты не такие точные, как типичные репликационные полимеразы, копирующие типичную последовательность ДНК.

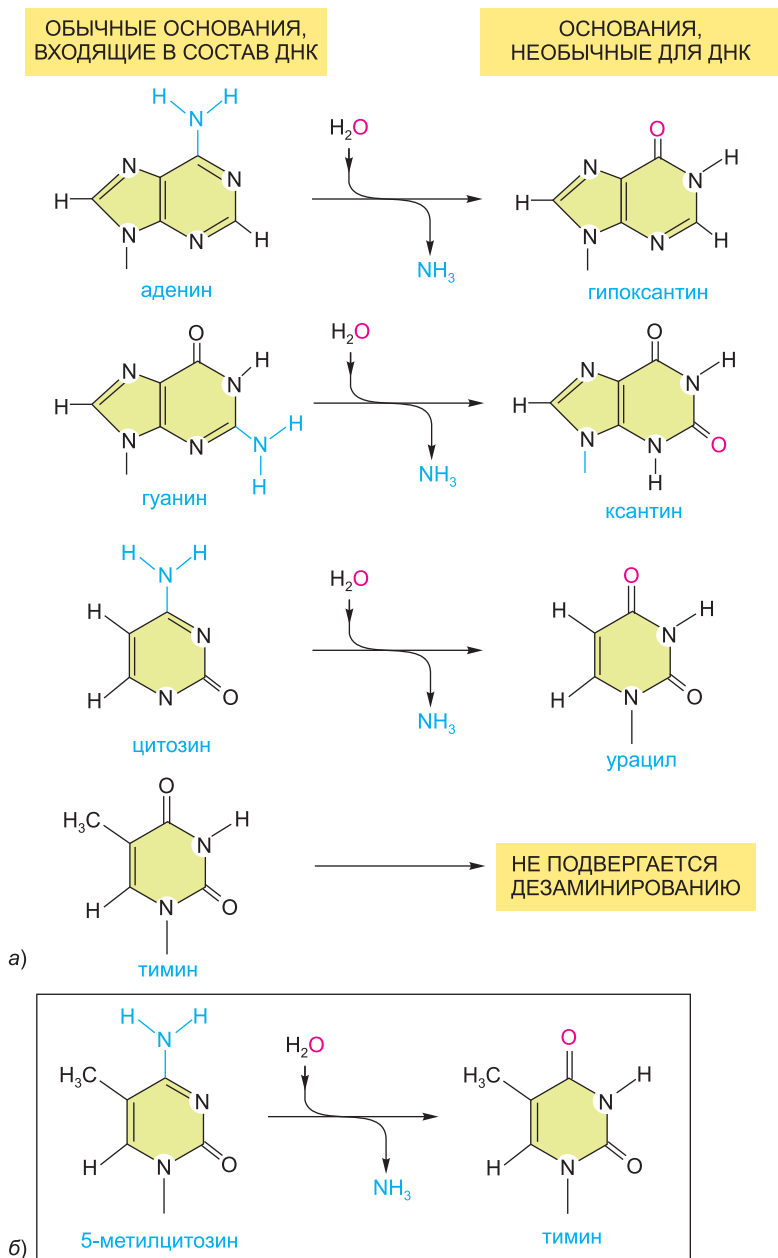


Рис. 5.50. Деаминация нуклеотидов ДНК. В каждом случае атом кислорода, который присоединяется к основанию в ходе этой реакции с участием воды, окрашен красным. а) Продукты спонтанного деаминации нуклеотидов А и Г в ДНК, распознаются как неправильные и, таким образом, легко узнаются и исправляются. Деаминация С в У было представлено также на рис. 5.45; Т не имеет аминогруппы, которая могла бы быть удалена. б) Около 3% нуклеотидов С в ДНК позвоночных метилированы, выполняя задачу регуляции экспрессии генов (обсудим в главе 7). Когда такой нуклеотид, 5-метил-С, случайно деаминируется, образуется естественный нуклеотид Т. Однако этот Т будет спарен с Г на противоположной нити, а это не будет соответствовать правильной, комплементарной, паре оснований.

Прежде всего, резервным полимеразам недостает функции экзонуклеолитической коррекции; кроме того, многие из них гораздо менее разборчивы, чем репликационная полимеразы, в плане выбора нуклеотида, который необходимо включить в первую очередь. Возможно, по этой причине молекуле каждой такой полимеразы дан шанс добавить только один или несколько нуклеотидов. Хотя подробности этих заворачивающих реакций все еще в стадии изучения, они предоставляют нам изящное свидетельство трогательной заботы, с которой организмы поддерживают целостность своей ДНК.

5.4.7. Репарация двухцепочечных разрывов проходит эффективно

Особенно опасны повреждения ДНК, при которых обе цепи двойной спирали разрываются, не оставляя неповрежденной матричной нити, которая могла бы обеспечить точность репарации. Ионизирующее излучение, ошибки репликации, окислители, а также иные продукты обмена веществ, производимые в самой клетке, вызывают разрывы подобного рода. Если бы такие повреждения оставались неустранимыми, то они вскоре привели бы к дроблению хромосом на фрагменты меньшей длины и к потере генов при делении клетки. Однако в кузнице эволюции были выкованы два разных механизма, призванных исправлять повреждения такого рода (рис. 5.51). Наиболее просто для понимания **негомологичное соединение концов (nonhomologous end-joining)**, при котором концы разрыва попросту сводятся и воссоединяются лигированием ДНК, обычно с потерей одного или нескольких нуклеотидов на участке соединения (рис. 5.52). Такой механизм соединения концов, который можно было бы счесть сработанным «на скорую руку» решением для устранения двунитевых разрывов, весьма распространен в соматических клетках млекопитающих. Хотя на участке поломки неизбежно появляется изменение в последовательности ДНК (мутация), благодаря тому что малая доля генома млекопитающих кодирует белки, этот механизм является, очевидно, приемлемым решением проблемы воссоединения разорванных хромосом. К тому времени, когда человек достигает возраста 70 лет, типичная соматическая клетка содержит более 2000 таких «шрамов», рассеянных по всему ее геному и показывающих места, в которых ДНК была не совсем точно репарирована путем негомологичного соединения концов. Как было сказано ранее, специализированная структура теломер предотвращает ошибочное распознавание естественных концов хромосом в качестве разорванной ДНК для дальнейшей репарации.

В новореплицированной ДНК устранение двухцепочечных разрывов происходит намного более точно (рис. 5.51, б). Здесь при репарации ДНК в качестве матрицы используется сестринская хроматида. Эта реакция является примером *гомологичной рекомбинации (homologous recombination)*, и мы рассмотрим ее механизм позже в этой главе. Большинство организмов для устранения двунитевых разрывов в ДНК использует и негомологичное соединение концов, и гомологичную рекомбинацию. У человека преобладает негомологичное соединение концов; гомологичная рекомбинация используется только во время репликации ДНК и вскоре после нее (в S- и G₂-фазах), когда сестринские хроматиды могут служить матрицами.

5.4.8. Повреждение ДНК задерживает ход клеточного цикла

Как мы только что убедились, клетки содержат многочисленные ферментные системы, которые способны распознавать и устранять повреждения ДНК многих

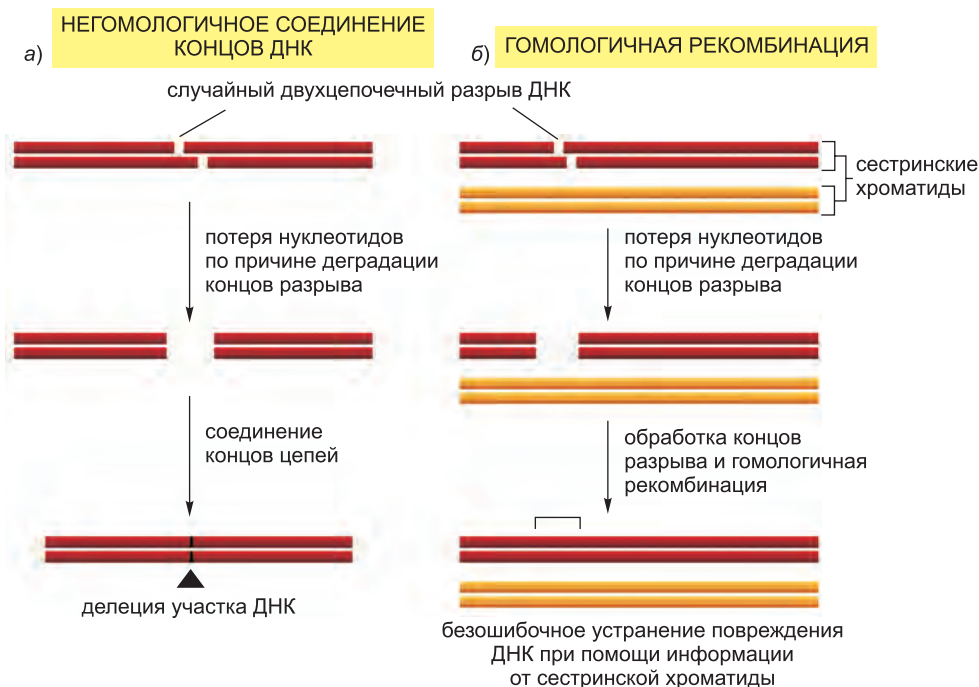


Рис. 5.51. Два разных способа устранения двухцепочечных разрывов. а) Негомологичное соединение концов изменяет первоначальную последовательность ДНК при репарации разорванной хромосомы. Эти изменения могут быть или в форме делеций (как показано), или в виде коротких вставок. б) Устранение двухцепочечных разрывов гомологичной рекомбинацией осуществить сложнее, но при репарации данного типа воссоздается оригинальная последовательность ДНК. Такой механизм обычно имеет место после того, как ДНК была дублирована, но прежде, чем клетка разделится надвое. Подробно цепь реакций гомологичной рекомбинации будет обсуждаться позже (см. рис. 5.61).

типов. Ввиду важности поддержания целостной, неповрежденной ДНК из поколения в поколение клетки эукариот имеют дополнительный механизм, который максимизирует эффективность имеющихся в их распоряжении ферментов репарации ДНК: он задерживает ход клеточного цикла, пока репарация ДНК не будет завершена. Как подробно описывается в главе 17, планомерный ход клеточного цикла поддерживается с помощью *контрольных точек (checkpoints)*, которые гарантируют строгую последовательность протекания очередных этапов без их взаимного наложения. В нескольких из таких контрольных точек клеточный цикл приостанавливается в случае обнаружения поврежденной ДНК. Так, в клетках млекопитающих наличие повреждения ДНК может блокировать переход из G_1 - в S-фазу, может замедлить S-фазу после ее начала и может блокировать переход из S-фазы в M-фазу. Такие задержки облегчают репарацию ДНК, предоставляя время, необходимое для полного завершения «ремонтных работ».

Повреждение ДНК индуцирует также усиленный синтез некоторых ферментов репарации ДНК. Важность специальных сигнальных механизмов, которые реагируют на повреждение ДНК, становится очевидной при взгляде на фенотип людей, которые рождены с дефектами в гене, который кодирует белок *ATM*. У этих индивидов развивается синдром Луи-Бар, или *атаксия-телеангиэктазия (AT; ataxia*

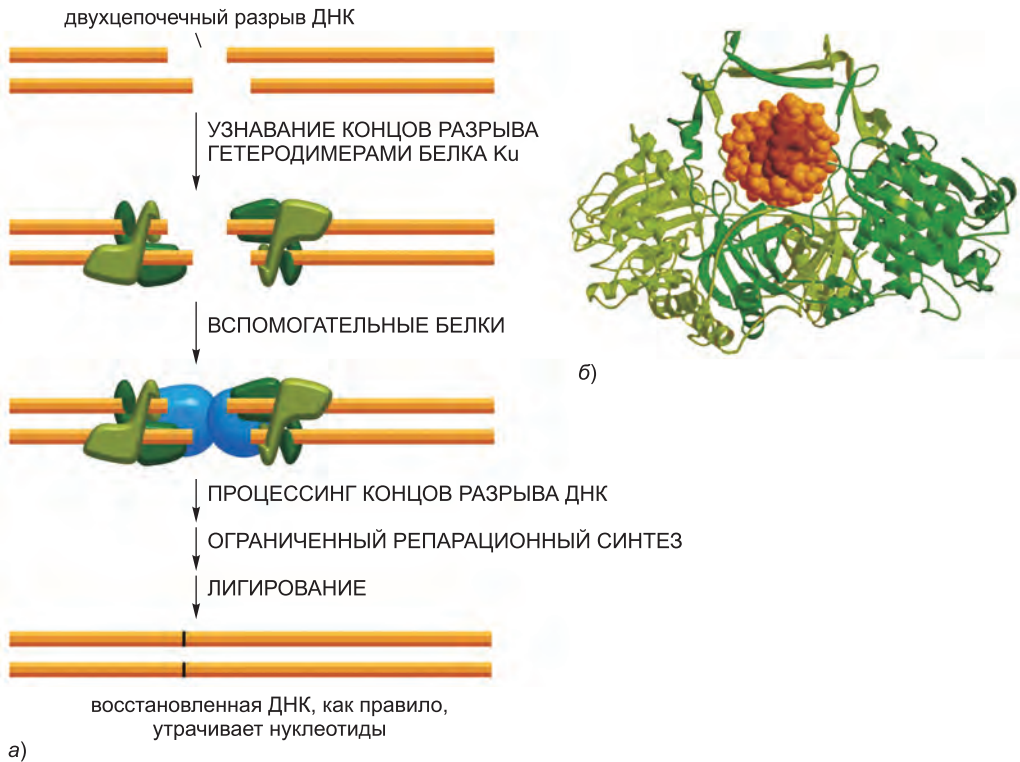


Рис. 5.52. Негомологичное соединение концов. а) Главную роль играет белок Ku — гетеродимер, который зажимает концы разорванной хромосомы. Вспомогательные белки, показанные здесь, необходимы для удержания разорванных концов в непосредственной близости, пока они процессируются и в конечном итоге соединяются ковалентно. б) Трехмерная структура гетеродимера Ku, связанного с концом двухцепочечного фрагмента ДНК. Белок Ku необходим также для реанжировки V(D)J — специфического процесса рекомбинации, посредством которого в развивающихся В- и Т-клетках создается разнообразие антител и рецепторов Т-клеток (обсуждается в главе 25). Механизмы реанжировки V(D)J и негомологичного соединения концов имеют много общего, но первый основан на специфических двуниевых разрывах, преднамеренно производимых клеткой. (Изображение б заимствовано из J. R. Walker, R. A. Corpina and J. Goldberg, *Nature* 412: 607–614, 2001. С великодушного дозволения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

telangiectasia), — заболевание, которое проявляется в атрофии нервной системы, предрасположенности к раку и нестабильности генома. Белок ATM — крупная киназа, необходимая для выработки внутриклеточных сигналов, которые дают отклик на многие типы спонтанного повреждения ДНК, и поэтому индивиды с дефектами в этом белке страдают от последствий неустраненных повреждений ДНК.

Заключение

Генетическая информация может сохраняться неизменной в последовательностях ДНК только потому, что богатый набор ферментов репарации ДНК непрерывно сканирует ДНК и заменяет любые поврежденные нуклеотиды. Репарация ДНК большинства типов зависит от наличия отдельной копии генетической информации в каждой из двух цепей двойной спирали ДНК. Поэтому спонтанное повреждение в одной из цепей может быть вырезано ферментом

репарации, и исправленная нить будет повторно синтезирована с учетом информации, заключенной в неповрежденной нити.

Большинство повреждений в основаниях ДНК удаляется одним из двух основных способов репарации. При вырезании оснований видоизмененное основание удаляется ферментом ДНК-гликозилазой, за чем следует вырезание оголенного сахарофосфата. При репарации вырезанием нуклеотидов маленький сегмент цепи ДНК, окружающий повреждение, удаляется из двойной спирали ДНК в виде олигонуклеотида. В обоих случаях прореха, остающаяся в спирали ДНК, заполняется последовательным действием ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы, использующих в качестве матрицы неповрежденную нить ДНК. Повреждения ДНК некоторых типов могут быть устранены при помощи иной стратегии — прямого химического исправления повреждения, которое осуществляется специализированными белками репарации.

Другие критические системы восстановления — основанные либо на негомологичном соединении концов, либо на гомологичной рекомбинации, — «затывают» случайные двуниевые разрывы, которые появляются в спирали ДНК. В большинстве клеток повышенный уровень повреждений ДНК вызывает задержку клеточного цикла, в чем задействован механизм контрольных точек; такая задержка гарантирует, что повреждение ДНК будет устранено до начала деления клетки.

5.5. Гомологичная рекомбинация

В двух предыдущих параграфах мы обсуждали механизмы, которые позволяют сохранять последовательности ДНК в клетках, от поколения к поколению, практически неизменными. В этом параграфе мы глубже исследуем один из таких механизмов — гомологичную рекомбинацию. Хотя гомологичная рекомбинация определяюще важна для точного устранения двуниевых разрывов (см. рис. 5.51, б) и повреждений ДНК других типов, она, как мы увидим, может также перестраивать последовательности ДНК. Такие перестройки часто видоизменяют конкретные варианты генов, присутствующие в отдельном геноме, равно как и хронометраж, и уровень их экспрессии. Для любой популяции генетическая изменчивость, обусловленная этим и другими типами генетической рекомбинации, — определяюще важный процесс, направленный на облегчение эволюции организмов в ответ на изменения в окружающей среде.

5.5.1. Гомологичная рекомбинация находит в клетке множество применений

При гомологичной рекомбинации (известной также как *общая рекомбинация*) имеет место генетический обмен между парой гомологичных последовательностей ДНК, то есть последовательностей ДНК, подобных или идентичных по последовательности нуклеотидов. Гомологичная рекомбинация служит множеству целей в клетке, но три направления действия имеют первостепенное значение. Наиболее распространенное ее применение состоит в точном устранении двухцепочечных разрывов, с которым мы ознакомились в предыдущем параграфе (рис. 5.51, б). Хотя двухцепочечные разрывы могут образоваться в результате действия радиации и химически активных веществ, многие представляют собой продукты застопорива-

ния или разрушения репликационных вилок ДНК. Это применение гомологичной рекомбинации существенно для каждой пролиферирующей клетки, потому что аварии происходят почти при каждом цикле репликации ДНК.

Самые разные события могут повлечь за собой поломку репликационной вилки в ходе процесса репликации. Рассмотрим только один пример: одноцепочечный разрыв ДНК сразу перед репликационной вилкой. Когда вилка достигает этого повреждения, она разваливается и дает одну разорванную и одну интактную дочерние хромосомы. Однако ряд реакций рекомбинации, который может начаться с процесса *вторжения (внедрения) цепи*, или *инвазии (strand invasion)* и запустить синтез ДНК ДНК-полимеразами, может безупречно восстановить разорванную хромосому (рис. 5.53).

Вдобавок к этому гомологичная рекомбинация используется для обмена генетической информацией между двумя различными хромосомами — чтобы создать новые сочетания последовательностей ДНК в каждой из хромосом. Потенциальная эволюционная «выгода» от такого типа смещения генов заключается в том, что оно создает серию новых, возможно выгодных, сочетаний генов. Во время мейоза у грибов, растений и животных гомологичная рекомбинация играет также важную механическую роль, которая заключается в обеспечении точного расхождения хромосом. В этом параграфе мы рассматриваем лишь универсальные задачи гомологичной рекомбинации, к которым относят устранение повреждений ДНК и опосредование генетического обмена. Бо-

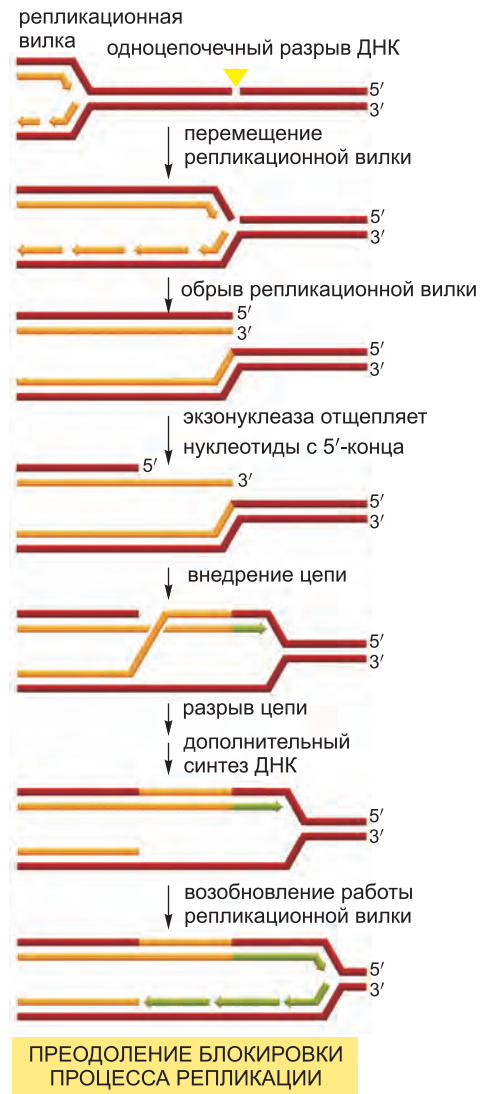


Рис. 5.53. Восстановление разорванной репликационной вилки при помощи гомологичной рекомбинации.

Когда движущаяся репликационная вилка наталкивается на одноцепочечный разрыв, она разрушается, но может быть восстановлена гомологичной рекомбинацией. Как показано на схеме, для начала процесса внедрения цепи (инвазии цепи) требуется свободный 3'-конец, который образуется под действием нуклеазы, гидролизующей комплементарную нить с 5'-конца. Затем, как только произошла инвазия, начинается рекомбинация, что детально представлено в последующих рисунках. Стрелки показывают 3'-концы нитей ДНК. Зеленым цветом отмечены цепи новосинтезированной ДНК — они которые синтезированы после того, как репликационная вилка была разрушена. Обратите внимание, что в этом механизме вилка минует участок разрыва на исходной матрице, используя неповрежденную копию этого участка в качестве матрицы. (Переработано из М. М. Cox, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 98: 8173–8180, 2001. С любезного разрешения National Academy of Science.)

лее специализированная — механическая — функция, которая проявляется при расхождении хромосом во время мейоза, будет обсуждена в главе 21.

5.5.2. Фундаментальные механизмы гомологичной рекомбинации, общие для всех клеток

Существующее представление о гомологичной рекомбинации как о критически важном механизме репарации ДНК во всех клетках развивалось медленно на почве ее первоначального открытия как ключевого компонента в специализированном процессе мейоза в растениях и животных. После открытия, что гомологичная рекомбинация происходит также и в менее сложных одноклеточных организмах, интерес цитобиологов к ее исследованию значительно возрос. Таким образом, большая часть того, что мы знаем о биохимии генетической рекомбинации, была изначально получена в ходе исследования бактерии, особенно *E. coli*, и поражающих ее вирусов, равно как и в итоге экспериментов над простыми эукариотами наподобие дрожжей. При работе с такими организмами, обладающими коротким временем смены поколений и относительно маленькими геномами, появилась возможность получать большой набор мутантов с дефектами в происходящих в них процессах рекомбинации. Затем в каждом мутанте идентифицировали видоизмененный белок и в конечном счете изучили его биохимические свойства. Позже близких родственников этих белков обнаружили и детально охарактеризовали у дрозофилы, мышей и человека. Эти исследования показывают, что фундаментальные процессы, которые катализируют гомологичную рекомбинацию, общие для всех клеток, о чем мы сейчас и поговорим.

5.5.3. Гомологичная рекомбинация направляется комплементарными взаимодействиями между основаниями двух гомологичных ДНК-дуплексов

Отличительный признак гомологичной рекомбинации — то, что она происходит только между двухцепочечными ДНК, которые имеют обширные области подобия (гомологии) последовательностей. Неудивительно, что в основе этого требования лежит спаривание оснований; и два дуплекса ДНК, которые претерпевают гомологичную рекомбинацию, «берут пробу» последовательности ДНК друг у друга, вовлекая в спаривание на протяженных участках основания одной из нитей одного дуплекса ДНК и основания комплементарной ей нити из другого дуплекса. Для успешного протекания гомологичной рекомбинации соответствие не обязательно должно быть полным, но должно, по крайней мере, быть очень близким.

В своей простейшей форме взаимодействие такого типа спаривания оснований может быть симитировано в пробирке — когда двойной спирали ДНК предоставляют возможность образоваться вновь из предварительно разделенных одиночных цепей. Этот процесс, названный *ренатурацией ДНК (renaturation)*, или **гибридизацией (hybridization)**, происходит в том случае, если в результате редкого случайного столкновения совместятся комплементарные последовательности нуклеотидов в двух соответствующих друг другу одинарных цепях ДНК и в силу этого между ними сформируется короткий отрезок двойной спирали. Этот относительно медленный шаг зарождения спирали сопровождается очень быстрым шагом «застегивания молнии», когда область двойной спирали распространяется, чтобы максимально увеличить число спаренных оснований (**рис. 5.54**).



Рис. 5.54. Гибридизация ДНК. Двойные спирали ДНК формируются повторно из отдельных цепей в ходе реакции, которая зависит от случайного столкновения двух комплементарных цепей ДНК. Подавляющее большинство таких столкновений не будет продуктивным, как это показано слева, но некоторые, хотя и немногочисленные, дают короткую область, в которой сформировались комплементарные пары оснований (зарождение, или нуклеация, спирали). Затем быстрое «застегивание» ведет к формированию полной двойной спирали. Таким вот методом «проб и ошибок» цепь ДНК находит себе комплементарного партнера даже среди миллионов несоответствующих ей цепей ДНК.

Для образования новой двойной спирали таким способом необходимо, чтобы отжигаемые нити находились в открытой, развернутой конформации. По этой причине реакции гибридизации *in vitro* выполняют или при высокой температуре, или в присутствии органического растворителя типа формамида; в таких условиях «расплавляются» короткие шпильчатые спирали, которые образуются в результате взаимодействий между комплементарными основаниями в пределах одной цепи, и в результате замыкаются сами на себя. Большинство клеток не может пережить такие жесткие условия и, вместо этого, использует белки, связывающие одноцепочечную ДНК (см. [стр. 273](#)) для разрушения шпильчатых спиралей. Белки, связывающие одноцепочечную ДНК, важны для репликации ДНК (как описано ранее), а также для гомологичной рекомбинации; они связываются сильно и кооперативно с сахарофосфатным остовом всех одноцепочечных областей ДНК и удерживают их в растянутой конформации с выставленными наружу основаниями (см. рис. 5.16 и 5.17). В такой растянутой конформации одинарная нить ДНК может эффективно взаимодействовать с комплементарными основаниями, либо с молекулами нуклеозидтрифосфата (при репликации ДНК), либо с комплементарным отрезком другой одинарной цепи ДНК (как часть процесса генетической рекомбинации).

В результате гибридизации ДНК создается область спирали, образованная цепями, которые происходят от двух разных молекул ДНК. Формирование такой области, известной как *гетеродуплекс*, является важным этапом в любом процессе гомологичной рекомбинации. Поскольку львиная доля ДНК в клетке двухцепочечная, «пробирочная» модель гибридизации ДНК не может в полной мере объяснить, как этот процесс происходит в клетке. Действительно, для запуска гомологичной рекомбинации между двумя двухцепочечными молекулами ДНК с подобными последовательностями нуклеотидов необходимы специальные механизмы. Крайне

важными участниками этих механизмов являются белки, которые позволяют осуществлять гибридизацию ДНК в клетке посредством *вторжения цепи (инвазии цепи)* — спаривания области одноцепочечной ДНК с комплементарной цепью в другой двойной спирали ДНК, — как мы опишем далее.

5.5.4. Белок RecA и его гомологи способствуют спариванию одинарной цепи ДНК с гомологичной областью двойной спирали ДНК

Поскольку широкомасштабные комплементарные взаимодействия пар оснований не могут произойти между двумя неповрежденными двойными спиралями ДНК, постольку гибридизация ДНК, которая является критически важной для гомологичной рекомбинации, может начаться только после того, как цепь ДНК из одной спирали освободится от спаривания с комплементарной ей нитью и, таким образом, ее нуклеотиды станут доступными для комплементарного взаимодействия со второй спиралью ДНК. В примере, который был ранее представлен на рис. 5.53, такая свободная одинарная нить образуется, когда репликационная вилка упирается в разрыв на ДНК, разваливается (создавая новый двунилевой конец), и экзонуклеаза деградирует 5'-конец разрыва, оставляя неспаренным его 3'-конец. В других приложениях гомологичной рекомбинации одностранные области создаются подобными этому способами, о чем мы поговорим позже.

На одинарную цепь на 3'-конце ДНК воздействует несколько специализированных белков, которые направляют ее инвазию в дуплекс гомологичной ДНК. Первым по важности идет **белок RecA** (его название у *E. coli*) и его гомолог **Rad51** (его название в организмах практически всех эукариот) (рис. 5.55). Подобно белку, связывающему одноцепочечную ДНК, белок RecA связывается прочно и в виде протяженных кооперативных кластеров на одноцепочечной ДНК, образуя таким образом нуклеопротеидный филамент. Поскольку каждый мономер RecA имеет более одного участка связывания с ДНК, постольку нить из белков RecA может удерживать одноцепочечную ДНК и двойную спираль ДНК вместе (рис. 5.56). Такое взаимное расположение позволяет белку RecA катализировать многоступенчатую реакцию *синапсиса ДНК*, которая происходит между двойной спиралью ДНК и гомологичной областью одностранный ДНК. На первом этапе белок RecA переплетает одностраничную ДНК с дуплексом ДНК независимым от собственной последовательности образом. Затем одинарная нить ДНК «ищет» в дуплексе гомологичные последовательности. В точности не известно, как именно происходят этот поиск и окончательное опознавание оснований, но они могут вовлекать кратковременное образование комплементарных пар между основаниями одинарной нити и основаниями, выпячиваемыми наружу из дуплекса ДНК (см. рис. 5.49). Как только гомологичная последовательность будет найдена и ее местоположение установлено, происходит инвазия: одиночная нить вытесняет одну из нитей дуплекса, по мере того как она образует обычные пары оснований с другой нитью. В конечном итоге образуется **гетеродуплекс** — область двойной спирали ДНК, образованная комплементарным взаимодействием оснований двух цепей ДНК, которые изначально были частями двух разных молекул ДНК (см. рис. 5.56).

Поиск гомологии и вторжение одинарной нити в дуплекс ДНК суть ключевые реакции, которые запускают гомологичную рекомбинацию. Они требуют, в дополнение к RecA-подобным белкам и белкам, связывающим одноцепочечную ДНК, наличия нескольких белков со специализированными функциями. Например, белок

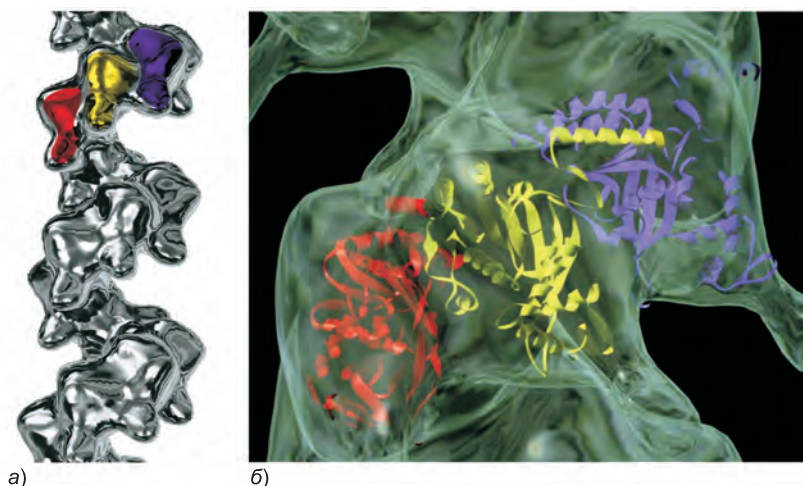


Рис. 5.55. Структура филаментов, образованных из белков RecA и Rad51 и ДНК. а) Белок Rad51 — присутствующий человеку гомолог белка RecA бактерий — связан с однотяжевой ДНК. Три следующих друг за другом белковых мономера в этом спиральном филаменте окрашены. б) Короткий сегмент RecA-филамента: с изображением филамента, строение которого было определено электронной микроскопией, совмещена трехмерная структура белка RecA. На один виток спирали приходится около шести мономеров RecA, удерживающих 18 нуклеотидов одноцепочечной ДНК, которая растянута белком. Точная конфигурация ДНК в этой структуре не известна. (Изображение а любезно предоставил Edward Egelman; снимок б заимствован из X. Yu et al., *J. Mol. Biol.* 283: 985–992, 1998. С благосклонного разрешения издательства Academic Press.)

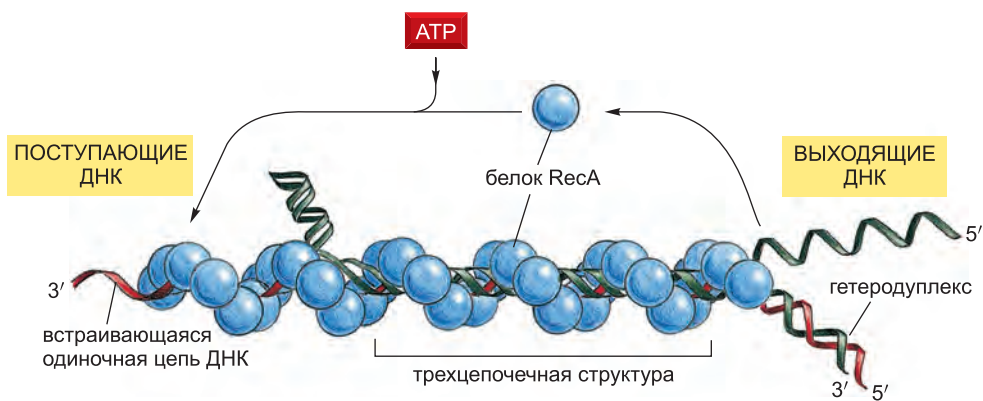


Рис. 5.56. Синапсис ДНК, катализируемый белком RecA. Проводимые *in vitro* эксперименты показывают, что между одиночной цепью ДНК (красной), покрытой белком RecA (синий), и двойной спиралью ДНК (зеленый) образуются комплексы нескольких типов. Сначала это не спаренный основаниями комплекс, который преобразуется в «сцепленную молекулу», как только гомологичная последовательность обнаружена. Этот комплекс динамичен и раскручивает гетеродуплекс ДНК (одна нить зеленая, вторая — красная) плюс вытесненную из исходной спирали единичную нить (зеленая). Таким образом, структура, показанная на этой схеме, перемещается влево, втягивая «входящие ДНК» и выпуская «выходящие ДНК». (Переработано из S. C. West, *Annu. Rev. Biochem.* 61: 603–640, 1992. С любезного разрешения Annual Reviews.)

Rad52 вытесняет белки однонитевого связывания, обеспечивая тем самым посадку молекул Rad51, и, кроме того, индуцирует отжиг комплементарных одинарных цепей (рис. 5.57).

Короткая гетеродуплексная область формируется в том месте, где вторгшаяся одиночная нить спарилась с комплементарной ей в дуплексе ДНК, и часто значительно увеличивает свою протяженность в ходе процесса, названного миграцией точки ветвления, о котором мы сейчас и поговорим.

5.5.5. Миграция точки ветвления может как расширять гетеродуплексные области, так и высвободить новосинтезированную ДНК в виде одиночной цепи

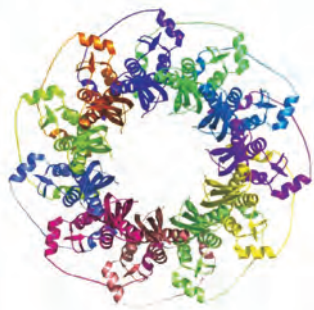
Как только реакция инвазии произошла, точка обмена нитями («точка ветвления») может передвигаться посредством процесса, названного *миграцией точки ветвления* (*branch migration*) (рис. 5.58). В ходе этой реакции неспаренная область одной из одиночных цепей вытесняет спаренную область другой одиночной цепи, перемещая точку ветвления без изменения общего числа пар оснований ДНК. Хотя самопроизвольная миграция точки ветвления может происходить, она совершается одинаково в обоих направлениях, так что в общем точка продвигается совсем ненамного (рис. 5.58, а). Однако специализированные ДНК-хеликазы могут катализировать однонаправленную миграцию точки ветвления, легко образуя область гетеродуплексной ДНК, которая может насчитывать тысячи пар оснований в длину (рис. 5.58, б).

В аналогичной реакции синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой, может приводить в действие процесс однонаправленной миграции точки ветвления, посредством которого новосинтезированная ДНК вытесняется в виде одиночной нити, имитируя способ, которым новосинтезированная цепь РНК высвобождается РНК-полимеразой. Такая форма синтеза ДНК, кажется, используется в нескольких процессах гомологичной рекомбинации, в том числе и в процессах устранения двухцепочечных разрывов, которые будут описаны далее.

5.5.6. Гомологичная рекомбинация может безупречно репарировать двухцепочечные разрывы ДНК

Ранее в этой главе мы обсуждали внушающие ужас проблемы, создаваемые двухцепочечными разрывами в ДНК, и увидели, что клетки могут устранять такие разрывы двумя путями. Негомологичное

а)



б)

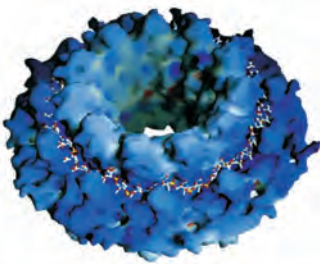


Рис. 5.57. Структура части белка Rad52. а) Эта баранкоподобная структура состоит из 11 субъединиц. б) Однонитевая ДНК «уложена» внутри глубокой бороздки, идущей вдоль поверхности белка. Основания ДНК выставлены наружу. Предположительно, такая конфигурация опосредует отжиг двух комплементарных одинарных цепей. (Займствовано из M. R. Singleton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13492–13497, 2002. С любезного разрешения National Academy of Sciences.)

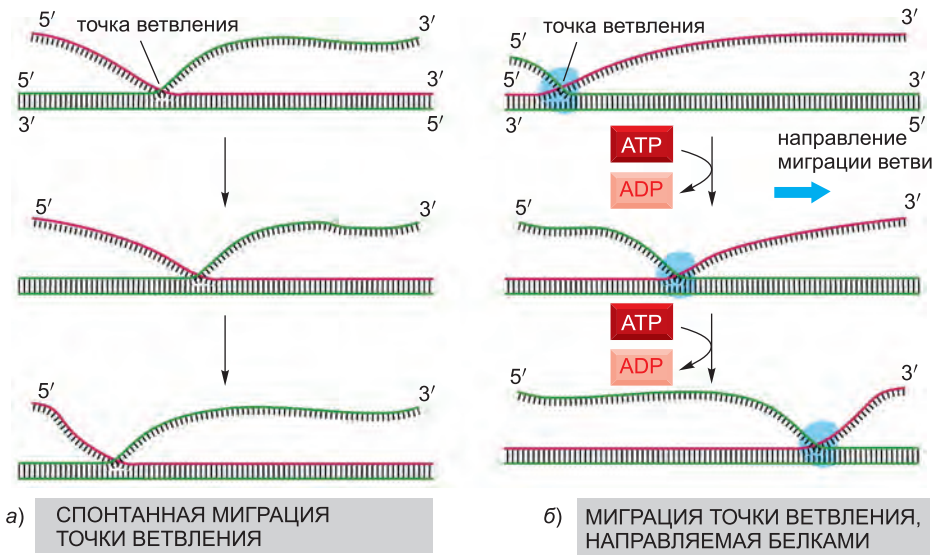


Рис. 5.58. Два типа миграции точки ветвления, происходящих в молекулах ДНК в *in vitro* экспериментах. а) Спонтанная миграция точки ветвления представляет собой процесс возвратно-поступательного случайного блуждания, и поэтому ее продвижение в масштабе длинных расстояний совсем небольшое. б) Направляемая белками миграция точки ветвления требует энергии и перемещает точку ветвления с постоянной скоростью в одном направлении.

соединение концов (см. рис. 5.51) происходит без участия матрицы и создает мутацию на участке, в котором два дуплекса ДНК сцеплены. Кроме того, ее действием могут быть по оплошности сведены воедино сегменты из двух разных хромосом и тем самым осуществлены хромосомные транслокации, многие из которых имеют серьезные последствия для клетки. В отличие от негомологичного соединения концов, гомологичная рекомбинация может со всей точностью устранять двунитевые разрывы без какой-либо потери или видоизменения нуклеотидов на участке восстановительных работ (рис. 5.59). В большинстве клеток опосредствованное рекомбинацией устранение двунитевых разрывов происходит только после того, как клетка реплицирует свою ДНК, и поэтому один из ближайших дочерних дуплексов ДНК может служить матрицей для восстановления второго.

Гомологичная рекомбинация может быть использована также для устранения повреждений ДНК многих других типов, благодаря чему она выступает, возможно, наиболее универсальным механизмом репарации ДНК из имеющихся в арсенале клетки; «многоцелевой» характер рекомбинационного восстановления, вероятно, и объясняет причину, по которой его механизм и белки, что приводят его в действие, оставались консервативными практически во всех клетках на Земле.

5.5.7. Клетки тщательно регулируют степень использования гомологичной рекомбинации для репарации ДНК

Хотя гомологичная рекомбинация ловко решает проблему точного исправления двунитевых разрывов и повреждений ДНК других типов, она вместе с тем представляет определенную опасность для клетки и поэтому должна жестко регу-

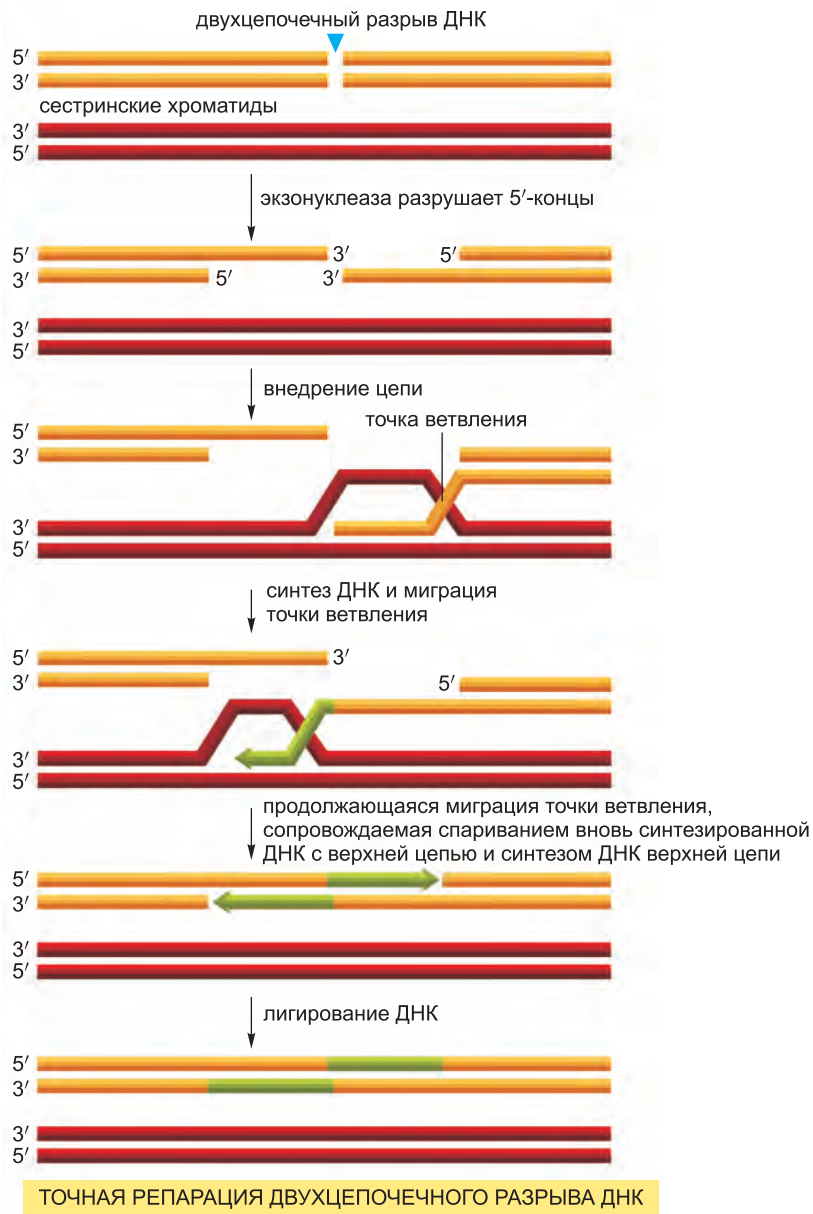
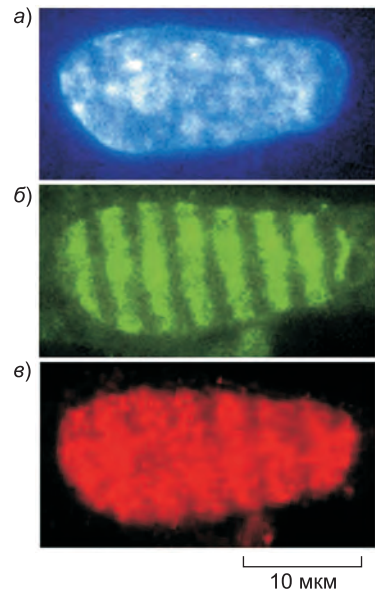


Рис. 5.59. Механизм устранения двухцепочечного разрыва посредством гомологичной рекомбинации. Это предпочтительный метод устранения двуниевых разрывов ДНК, которые возникают вскоре после того, как ДНК была реплицирована и две сестринские хроматиды все еще скреплены одна с другой. В этом процессе участвуют многие из тех же белков, что и в представленном на рис. 5.53, и протекает он через те же основные промежуточные шаги. Вообще, гомологичная рекомбинация может быть расценена как гибкий ряд реакций, точный путь протекания коих отличается от случая к случаю. Например, длина восстановительной «заплаты» может изменяться в широких пределах в зависимости от степени 5'-процессинга, миграции точки ветвления и синтеза новой ДНК. (См. M. McVey, J. LaRocque, M. D. Adams, and J. Sekelsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 15694–15699, 2004.)

лироваться. Например, последовательность ДНК в одном хромосомном гомологе может стать функционально неактивной при «ремонте» ее с использованием другого хромосомного гомолога в качестве матрицы. *Потеря гетерозиготности* такого типа часто оказывается решающим моментом в формировании раковых образований (о чем будет сказано подробнее в главе 20), и клетки имеют (еще плохо изученные) специальные механизмы, чтобы минимизировать ее. Хотя потеря гетерозиготности относительно редка в нормальных клетках, ее можно рассматривать как нежелательный побочный эффект многофункциональности гомологичной рекомбинации.

Другой тип «надзора» над рекомбинационной репарацией, который встречается почти во всех клетках эукариот, предотвращает основанную на рекомбинации «репарацию» при отсутствии повреждения ДНК. Ферменты, которые катализируют рекомбинационную репарацию, у эукариот обычно вырабатываются на относительно высоких уровнях и рассредоточиваются по всему ядру. В ответ на повреждение ДНК они быстро направляются к участкам повреждения и в конечном счете образуют «ремонтные фабрики», на которых устраняются многие повреждения ДНК (рис. 5.60). Такая срочная мобилизация белков репарации к поврежденной ДНК четко управляется клеткой и требует ряда вспомогательных белков. Два из них, белки *Brca1* и *Brca2*, были впервые обнаружены в связи с тем, что мутации в их генах приводят к резкому повышению частотности рака молочной железы. В то же время удаление белка, необходимого для гомологичной рекомбинации (такого как белок человека Rad51), убьет клетку, а видоизменение в любом вспомогательном белке может снизить эффективность репарации. Как результат — накопление повреждений ДНК может, в небольшой доле клеток, положить начало раку. Белок *Brca2* связывается с белком Rad51, предотвращая его полимеризацию на ДНК и

Рис. 5.60. Эксперимент, демонстрирующий быструю мобилизацию белков репарации к местам двухцепочечных разрывов ДНК. Фибробласты человека подвергали рентгеновскому облучению с целью создания двухцепочечных разрывов ДНК. Прежде чем рентгеновские лучи ударили по клеткам, их пропустили через микроскопическую сетку с поглощающими рентгеновские лучи «полосками», расположенными через 1 мкм друг от друга. В результате образовалась полосчатая картина повреждения ДНК, позволившая сравнить поврежденную и неповрежденную ДНК в одном и том же ядре. а) Вся ДНК в ядре фибробласта, окрашенном красителем DAPI. б) Участки синтеза новой ДНК, проявляющиеся за счет включения BrdU¹ (аналога тимина) и последующего окрашивания связанными с FITC² антителами к BrdU. в) Скопление комплексов Mre11 в местах повреждения ДНК, наблюдаемое с помощью красителя Texas-red, конъюгированного с антителами к субъединице Mre11. Высказано предположение, что комплекс Mre11 изначально распознает двунитевые разрывы в клетке, а затем мобилизует дополнительные белки для «залечивания» разрывов путем гомологичной рекомбинации (см. рис. 5.59). Препараты а, б и в обрабатывали красителями спустя 30 минут после облучения. (Заимствовано из В. Е. Nelms et al., *Science* 280: 590–592, 1998. С любезного разрешения издательства AAAS.)



¹ 5-бромдезоксисуридин. — Прим. пер.

² Флуоресцеинизотиоцианат. — Прим. пер.

таким образом поддерживая его в неактивной форме. Полагают, что белок Bgsa2 помогает быстро доставлять белок Rad51 к участкам повреждения и, будучи на месте, отпускать последний уже в активной форме.

В главе 20 мы увидим, что и слишком большой, и слишком малый уровни гомологичной рекомбинации у людей могут приводить к раку: первый — через увеличенную потерю гетерозиготности, а последний — через увеличенную частоту мутаций, вызванную неэффективностью репарации ДНК. Ясно, что в горниле эволюции был выкован чувствительный механизм, который держит этот процесс под контролем на неповрежденной ДНК и в то же время позволяет ему действовать эффективно и быстро при повреждении ДНК.

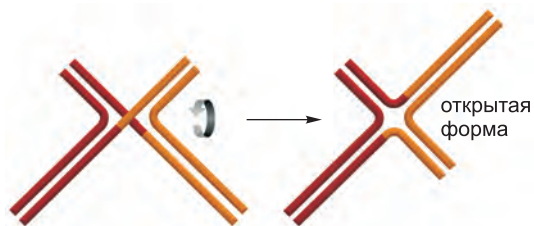
Бактерии тоже тщательно регулируют деятельность ферментов, отвечающих за рекомбинацию и репарацию ДНК, но это происходит главным образом путем управления уровнями их концентраций внутри клетки. В ответ на серьезное повреждение ДНК у *E. coli* увеличивается транскрипция многих ферментов репарации ДНК — как часть так называемой *реакции SOS*, или *SOS-ответа*. В их числе ферменты репарации, работающие по механизму вырезания нуклеотидов; исправляющие ошибки ДНК-полимеразы, которые умеют использовать поврежденную ДНК в качестве матрицы; и белки, которые опосредствуют гомологичную рекомбинацию.

Исследования мутантных бактерий с нарушением различных составляющих реакции SOS показывают, что недавно синтезированные белки имеют два эффекта. Во-первых, как и следовало ожидать, индукция таких дополнительных ферментов репарации ДНК повышает выживаемость клетки после повреждения ДНК. Во-вторых, несколько из индуцируемых белков кратковременно увеличивают частоту мутаций, повышая число ошибок, допускаемых при копировании последовательностей ДНК. Эти ошибки обусловлены производством ДНК-полимераз низкой точности, которые могут эффективно использовать поврежденную ДНК в качестве матрицы для синтеза ДНК. Тогда как такое «подверженное ошибкам» восстановление ДНК может быть губительно для отдельных клеток бактерий, в долгосрочной перспективе оно, по-видимому, является преимуществом, потому что производит в популяции бактерий всплеск генетической изменчивости, который увеличивает вероятность появления мутантной клетки, более приспособленной к выживанию в изменившейся окружающей среде.

5.5.8. В ходе гомологичной рекомбинации часто образуются структуры Холлидея

Гомологичную рекомбинацию можно рассматривать как серию взаимосвязанных реакций, которая использует вторжение одинарной нити, миграцию точки ветвления и ограниченный синтез ДНК для обмена ДНК между двумя двойными спиральями с подобными друг другу последовательностями нуклеотидов. Обсудив вклад гомологичной рекомбинации в точность репарации поврежденной ДНК, теперь мы обратимся к ней как к средству создания молекул ДНК с новой последовательностью. В ходе этого процесса часто образуется специальный промежуточный продукт ДНК, который содержит четыре нити ДНК, поделенные между двумя спиральями ДНК. В этом ключевом промежуточном продукте, известном как **структура Холлидея (Holliday junction)**, а процесс называют *обменом с перекрещиванием цепей (cross-stranded exchange)*, две двойных спирали ДНК перекрестно обмениваются

Рис. 5.61. Структура Холлидея. Изначально образуемую структуру обычно изображают двумя перекрещивающимися (внутренними) нитями и двумя неперекрещивающимися (внешними) нитями. В результате изомеризации структуры Холлидея образуется открытая, симметричная структура. Это форма, с которой связаны белки RuvA и RuvB (см. рис. 5.62). Структура Холлидея была названа по имени ученого, который впервые предположил ее образование.



партнерами. Структура Холлидея может принимать множество конформаций, и специальный набор рекомбинационных белков связывается с открытым, симметричным изомером и таким образом стабилизирует его (рис. 5.61). Используя энергию гидролиза АТФ для координирования реакций миграции двух ветвей, эти белки могут быстро перемещать точку, в которой соединены обе спирали ДНК, по этим двум спиральям (рис. 5.62).

Четырехцепочечные структуры ДНК, образующиеся в ходе гомологичной рекомбинации, присутствуют в клетках лишь кратковременно. Таким образом, чтобы восстановить две отдельные спирали ДНК и, следовательно, завершить процесс рекомбинации, цепи, соединяющие эти две спирали в структуре Холлидея, должны в конечном счете быть разрезаны, каковой процесс был назван *разрешением* (*resolution*). У бактерий, где мы понимаем этот процесс лучше всего, специализированная эндонуклеаза (названная RuvC) расщепляет структуру Холлидея, оставляя надрезы в ДНК, которые ДНК-лигаза может легко заделать. Однако во время мейотических процессов, в ходе которых у эукариот образуются зародышевые

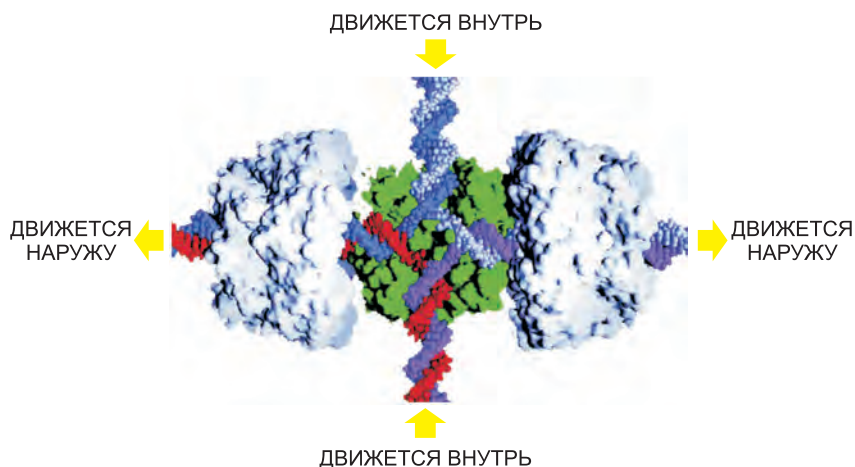


Рис. 5.62. Ферментативно катализируемая миграция точки двойного ветвления в структуре Холлидея. У *E. coli* тетрамер белка RuvA (зеленый) и два гексамера белка RuvB (бледно-серый) связаны с открытой формой структуры. Белок RuvB, который напоминает гексамерные хеликазы, принимающие участие в репликации ДНК (рис. 5.15), использует энергию гидролиза АТФ для быстрого перемещения точки перекреста спаренных спиралей ДНК, расширяя тем самым гетеродуплексную область, как показано на рисунке. (Изображение любезно предоставлено P. Artymiuk; переработано из S. C. West, *Cell* 94: 699–701, 1998. С благосклонного разрешения издательства Elsevier.)

клетки (у животных это сперматозоиды и яйцеклетки), механизмы «разрешения», по-видимому, намного сложнее.

Как будет сказано в главе 21, интенсивная гомологичная рекомбинация происходит как неотъемлемая часть процесса, посредством которого хромосомы распределяются по зародышевым клеткам в ходе мейоза. Результатом таких событий рекомбинации являются как *кроссинговер*, или *перекрест* (*crossing over*), хромосом, так и *конверсия генов* (*gene conversion*), дающие гибридные хромосомы, которые содержат генетическую информацию и от материнских, и от отцовских гомологов (рис. 5.63, а).

Как мы увидим в дальнейшем, во время мейоза и кроссинговер, и конверсия генов генерируются механизмами гомологичной рекомбинации, которые, в сущности, напоминают те, что используются для устранения двухцепочечных разрывов.

5.5.9. Мейотическая рекомбинация запускается запрограммированным двухцепочечным разрывом

Гомологичная рекомбинация во время мейоза начинается с решительного шага: специализированный белок (названный Spo11 у почкующихся дрожжей) разрывает обе цепи двойной спирали ДНК в одной из рекомбинирующих хромосом. После реакции Spo11 с ДНК этот белок, подобно топоизомеразе, остается ковалентно связанным с разорванной ДНК (см. рис. 5.22). Затем специализированная нуклеаза быстро процессирует концы, связанные белком Spo11, снимая его с них и оставляя выступающие одноцепочечные 3'-концы. В этой точке происходит серия одноцепочечных инвазий и миграций точки ветвления, которые обычно дают промежуточный продукт, состоящий из двух близко расположенных структур Холлидея и часто называемый двойным переходом Холлидея (рис. 5.64).

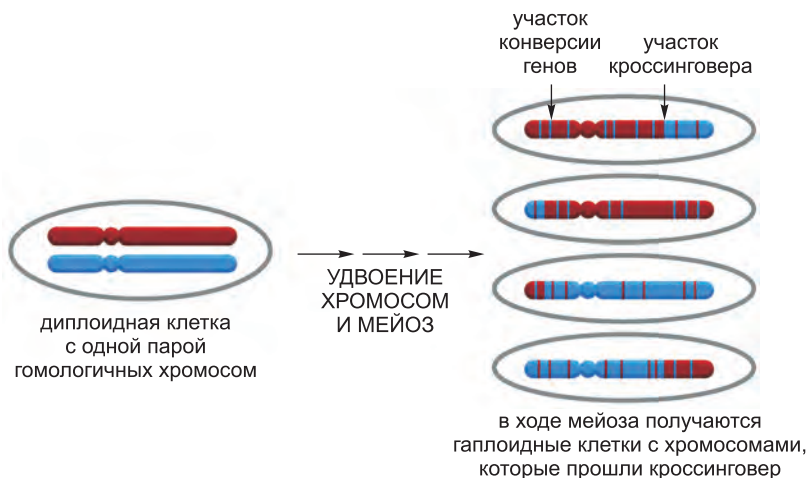


Рис. 5.63. Кроссинговер хромосом в процессе мейоза. Мейоз — процесс, посредством которого диплоидная клетка дает начало четырем гаплоидным зародышевым клеткам, как будет описано подробнее в главе 21. В ходе мейоза образуются зародышевые клетки, в которых отцовская и материнская генетическая информация (красный и синий) была перераспределена в результате кроссинговера хромосом. Кроме того, появляется много коротких областей конверсии генов, как показано на рисунке.

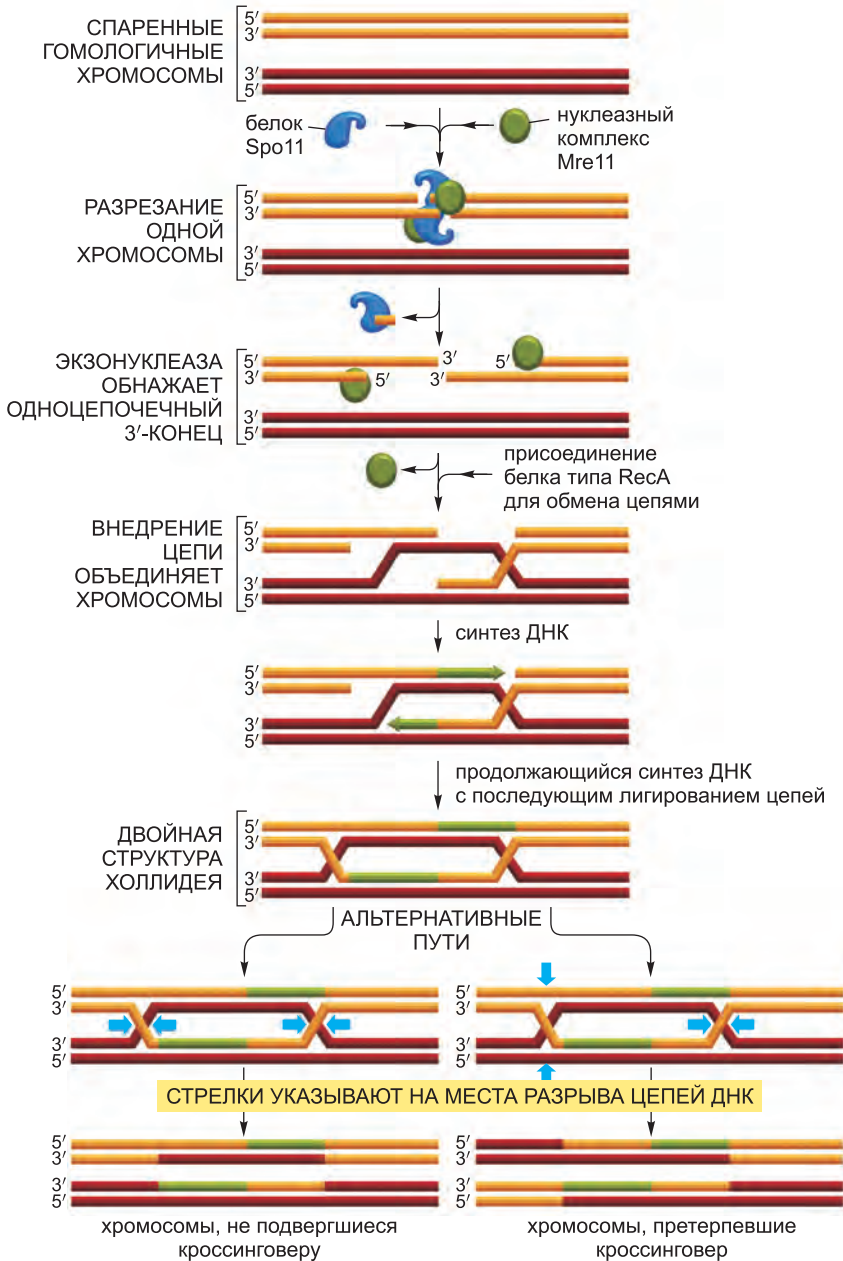


Рис. 5.64. Гомологичная рекомбинация в процессе мейоза может привести к кроссоверу. После того как специфический для мейоза белок Spo11 и комплекс Mre11 разорвут дуплекс ДНК и процессируют концы, гомологичная рекомбинация проходит через двойную структуру Холлидея. Многие последовательные операции, в результате которых происходит кроссинговер хромосом в процессе мейоза, напоминают те, которые используются клеткой для устранения двухцепочечных разрывов (рис. 5.59). Однако в мейозе этот процесс тесно сопряжен с другими мейотическими событиями и направляется белками, такими как Spo11, которые вырабатываются только в мейотических клетках.

Хотя в мейозе используются некоторые из тех же самых белков, что функционируют при устранении двунитевых разрывов, здесь эти белки направляются несколькими специфическими для мейоза белками, с тем чтобы они выполняли свои задачи несколько иначе, в силу чего они выдают иные промежуточные продукты ДНК (ср. рис. 5.59 и рис. 5.64). Другое важное отличие заключается в том, что в мейозе рекомбинация происходит предпочтительно между материнскими и отцовскими хромосомными гомологами, а не между новореплицированными, идентичными дуплексами ДНК, которые сводятся в пару в ходе устранения двунитевых разрывов.

Существует два разных способа разрешения двойной промежуточной структуры Холлидея, они представлены на рис. 5.64. В концептуально простейшем случае («без кроссинговера») пары пересекающихся цепей разрезаются в обоих структурах Холлидея одинаковым способом, в результате чего обе спирали отделяются друг от друга в неизменной форме — за исключением области между двумя структурами Холлидея (см. рис. 5.64, слева; в этой области каждая из спиралей содержит короткий гетеродуплексный участок, смежный с гомодуплексным участком, созданным за счет синтеза ДНК). Если, с другой стороны, оба Холлидеева перехода разрешаются диаметрально противоположным образом (один расщепляется в изначальной паре пересекающихся цепей, а второй — на непересекающихся цепях), то исход имеет намного более глубокие последствия. При разрешении такого типа («кроссинговером») части каждой хромосомы, лежащие выше и ниже от этих двух структур Холлидея, меняются местами, в результате чего образуются две рекомбинантные хромосомы — продукты кроссинговера (см. рис. 5.64, справа. Иногда эти хромосомы называют «кроссоверами» или «кроссоверными хромосомами» — от англ. «crossovers». — *Прим. ред.*)

Относительно немногие из опосредствованных белком Spo11 двунитевых разрывов ведут к кроссинговеру; большинство (90% у человека, например) разрешается без него. Еще не известно, как этот выбор осуществляется, но вполне очевидно, что он происходит рано — в процессе рекомбинации, еще до образования структур Холлидея. Относительно немногочисленные продукты кроссинговера, которые все же образуются, распределяются по хромосомам таким образом, что их присутствие в одном положении так или иначе ингибирует кроссинговер в соседних областях. Этот любопытный, но плохо изученный регуляторный механизм, названный *контролем кроссинговера* (*crossover control*), возможно, гарантирует приблизительно равномерное распределение участков кроссинговера по хромосомам. У многих организмов во время каждого события мейоза возникает примерно два участка кроссинговера на хромосому — по одному на каждом плече. Как будет сказано подробнее в главе 21, эти области играют важную роль на уровне механики — они участвуют в правильном расхождении хромосом в процессе мейоза.

Разрешается ли мейотическое событие рекомбинации кроссинговером или обходится без него, рекомбинационная машина оставляет позади себя *гетеродуплексную область*, в которой цепь от отцовского гомолога комплементарно спарена с основаниями цепи от материнского гомолога (рис. 5.65). В таких гетеродуплексных областях, которые часто простираются на тысячи пар нуклеотидов, допустима небольшая доля некомплемтарных пар оснований. В мейозе из-за множества событий, происходящих без кроссинговера, эти гетеродуплексные области образуют в зародышевых клетках разбросанные участки, в которых короткие последовательности ДНК из одного гомолога были вставлены в другой гомолог.

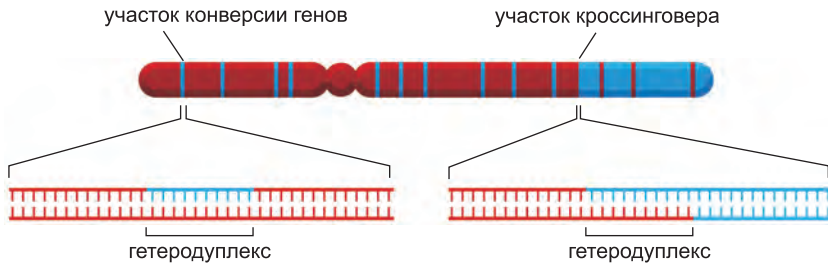


Рис. 5.65. Гетеродуплексы, образованные во время мейоза. Гетеродуплексная ДНК присутствует на участках рекомбинации, которые разрешаются либо путем кроссинговера, либо без него.

И во всех случаях помечаются участки потенциальной *конверсии генов*, то есть участки, в которых четыре гаплоидные хромосомы, образованных в ходе мейоза, содержат три копии короткой последовательности ДНК из одного гомолога и только одну копию этой последовательности из другого гомолога (см. рис. 5.63), что мы сейчас поясним.

5.5.10. Гомологичная рекомбинация часто приводит к конверсии генов

Все воспроизводящиеся половым путем организмы подчиняются фундаментальному закону генетики, согласно которому каждый родитель вносит равный генетический вклад в потомство, наследующее один полный набор ядерных генов от отца и один их полный набор от матери. В основе этого закона лежит очень точное распределение хромосом по зародышевым клеткам (яйцеклеткам и сперматозоидам), которое происходит во время мейоза. Таким образом, когда диплоидная клетка подвергается мейозу, чтобы произвести четыре гаплоидные зародышевые клетки (обсудим это в главе 21), точно половина генов, распределенных по этим четырем клеткам, должна быть материнской (гены, которые диплоидная клетка унаследовала от своей матери), а вторая половина — отцовской (гены, которые диплоидная клетка унаследовала от своего отца). В некоторых организмах (грибы, например) возможно воссоздать и проанализировать все четыре гаплоидные гаметы, произведенные из единственной клетки в процессе мейоза. При исследовании таких организмов обнаружены редкие случаи, когда распределение генов нарушает стандартные законы генетики. Временами, например, мейоз дает три копии материнского варианта гена и только одну копию отцовского аллеля (см. рис. 5.63). Альтернативные варианты одного и того же гена называют **аллелями**, а отклонение от их ожидаемого распределения в процессе мейоза получило название **конверсии гена или геновой конверсии (gene conversion)**. Генетические исследования показывают, что только маленькие отрезки ДНК обычно подвергаются конверсии генов и во многих случаях изменяется только часть гена.

Конверсия генов может быть обусловлена несколькими процессами, происходящими в клетке. Во-первых, синтез ДНК, который сопровождает ранние этапы гомологичной рекомбинации, будет давать области двойной структуры Холлидея, в которых на одном гомологе присутствуют три копии последовательности (см. *зеленые нити* в нижней части рис. 5.64); эти области и будут образовывать участки конверсии генов. Кроме того, если две цепи, из которых состоит гетеродуплексная

область, не содержащая идентичных последовательностей нуклеотидов, то появятся неправильно спаренные основания. Эти ошибки могут быть исправлены имеющейся у клетки системой исправления ошибок спаривания, описанной ранее (см. рис. 5.20). Однако когда система «коррекции» используется во время рекомбинации, она не делает никакого различия между отцовской и материнской нитями и будет случайным образом выбирать, какую из цепей ей репарировать. Следствием такого ремонта будет один утраченный аллель, зато второй будет представлен двумя экземплярами (рис. 5.66), что приведет к фактическому «преобразованию» (конверсии) одного аллеля в другой. Таким образом, конверсию генов, поначалу расцениваемую как мистическое отклонение от правил генетики, можно считать прямым следствием работы механизмов гомологичной рекомбинации и репарации ДНК.

5.5.11. Система исправления ошибок спаривания предотвращает беспорядочную рекомбинацию между двумя мало соответствующими друг другу последовательностями ДНК

Итак, мы узнали, что гомологичная рекомбинация полагается на спаривание комплементарных (или почти комплементарных) цепей ДНК, которые изначально принадлежали разным дуплексам ДНК. Но чем определяется необходимая точность их соответствия? Это особенно важно для событий рекомбинации, которые разрешаются кроссинговером. Например, геном человека содержит много наборов близкородственных последовательностей ДНК, и если бы кроссинговер мог происходить между всеми ими, то в клетке попросту наступил бы хаос.

Хотя мы до конца не понимаем, как клетки предотвращают нежелательный кроссинговер, мы все же знаем, что компоненты той же системы исправления ошибок спаривания, которая устраняет ошибки репликации (см. рис. 5.20) и «замешана в историях» с конверсией генов (см. рис. 5.66), выполняют еще одну функцию — прерывать генетическую рекомбинацию между плохо соответствующими друг другу последовательностями ДНК. Думается, что система исправления ошибок обычно распознает ошибочно спаренные основания при первичном обмене

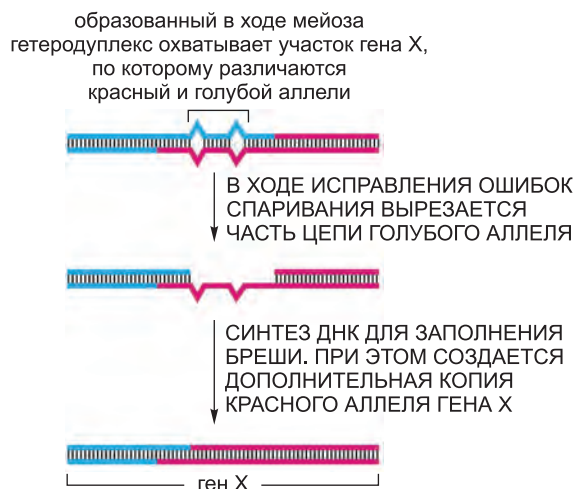


Рис. 5.66. Конверсия генов, обусловленная исправлением ошибок спаривания. В этом процессе на участках гомологичной рекомбинации между материнской и отцовской хромосомами образуется гетеродуплекс-ДНК. Если материнская и отцовская последовательности ДНК слегка различны, то гетеродуплексная область будет включать несколько некомплементарных пар оснований, которые могут впоследствии быть исправлены машинами устранения ошибок спаривания в ДНК (см. рис. 5.20). Такая «корректировка» может «стереть» нуклеотиды или на отцовской, или на материнской нити. Следствием же устранения ошибок спаривания будет конверсия, обнаруживаемая как отклонение от расхождения равного числа копий материнских и отцовских аллелей, которое обычно происходит в мейозе.

цепями, и — если несоответствия значительные — предотвращает последующие этапы (особенно миграцию точки ветвления), ведущие к кроссинговеру. Такой тип рекомбинационной коррекции, как думают, предотвращает события беспорядочной рекомбинации, которые в ином случае превратили бы весь геном человека в неприглядную мешанину (рис. 5.67). Высказывается предположение (хотя оно и спорно), что рекомбинационная коррекция помогает сохранять целостность видов, особенно среди бактерий, блокируя генетический обмен между близкородственными видами. Например, геномы *E. coli* и *Salmonella typhimurium* на 80% идентичны по нуклеотидным последовательностям, и все же этот коррекционный шаг блокирует рекомбинацию между их геномами.

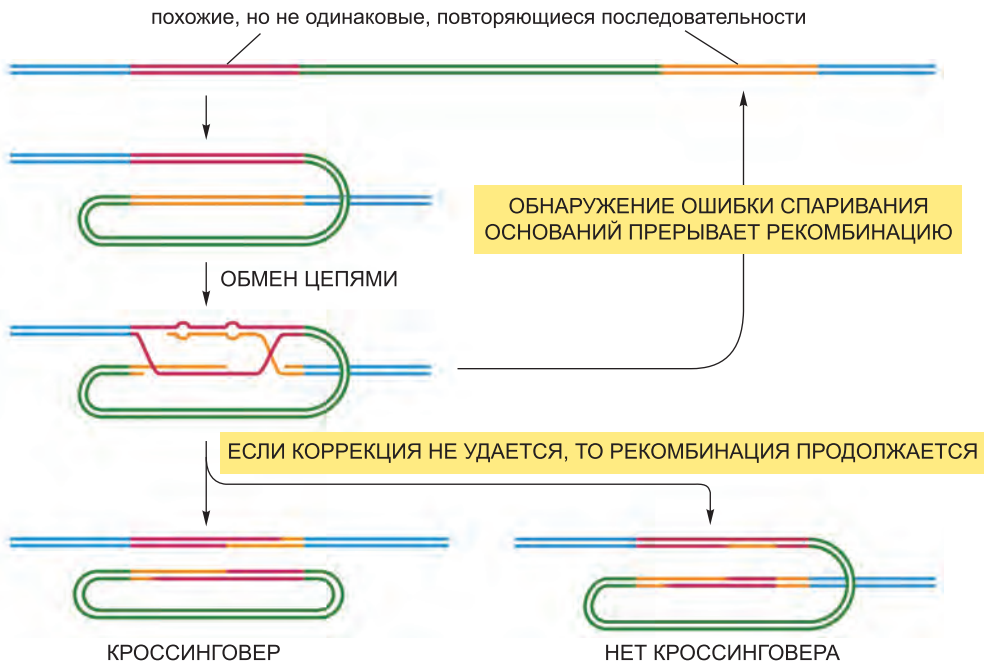


Рис. 5.67. Механизм, который при общей рекомбинации предотвращает дестабилизацию генома, содержащего повторяющиеся последовательности. Компоненты системы исправления ошибок спаривания, изображенные схематично на рис. 5.20, имеют дополнительную функцию: распознавать «неправильные пары» и предотвращать неудачные рекомбинации. Если такой рекомбинации дать полную свободу, то она приведет к делециям (слева) или конверсии генов (справа), и тогда информация одного из исходных повторов будет утрачена.

Заключение

Гомологичная рекомбинация (называемая также общей рекомбинацией) выражается в переносе генетической информации между сегментами двух двойных спиралей ДНК с подобной последовательностью нуклеотидов. Этот процесс важен для безошибочного исправления повреждения хромосом во всех клетках, а также при кроссинговере хромосом, происходящем во время мейоза. Событие рекомбинации направляется специализированным набором белков. Хотя рекомбинация может произойти в любом месте молекулы ДНК, необходимым условием начала рекомбинационных событий является наличие комплементар-

ных взаимодействий, происходящих на обширных участках между цепями двух двойных спиралей ДНК, вовлекаемых в рекомбинацию.

В процессе мейоза гомологичная рекомбинация начинается с двухцепочечных разрывов, которые «преднамеренно допускаются» на каждой хромосоме. Эти разрывы процессируются в одноцепочечные 3'-концы, которые в ходе реакции, катализируемой белками семейства RecA, вторгаются в гомологичный партнерский дуплекс ДНК. Далее миграция точки ветвления, сопровождаемая ограниченным синтезом ДНК, ведет к формированию четырехцепочечных структур, известных как двойные структуры Холлидея. Каждая реакция рекомбинации заканчивается, когда эти промежуточные продукты «разрешаются» перерезанием ДНК. Результатом могут быть или две хромосомы, образовавшиеся в ходе кроссинговера (то есть хромосомы, в которых ДНК по обе стороны от участка спаривания происходит из двух разных гомологов), или две хромосомы, не претерпевшие кроссинговер. В последнем случае две образовавшиеся хромосомы идентичны двум исходным гомологам — за исключением незначительного изменения последовательности ДНК на самом участке рекомбинации. В отличие от ситуации в мейозе, реакции гомологичной рекомбинации, которые безусловно устраняют двухцепочечные разрывы, редко заканчиваются кроссинговером.

5.6. Транспозиция и консервативная сайт-специфическая рекомбинация

Мы познакомились с тем, как посредством гомологичной рекомбинации между сегментами ДНК происходят перестройки, которые могут закончиться обменом последовательностями ДНК между хромосомами. Однако порядок генов на взаимодействующей хромосоме, как правило, остается неизменным в ходе гомологичной рекомбинации, поскольку условием протекания этого процесса является высокая степень подобия участвующих в этом процессе последовательностей. В данном параграфе мы описываем рекомбинацию двух совершенно иных типов: **транспозицию** (называемую также *транспозиционной рекомбинацией*) и **консервативную сайт-специфическую рекомбинацию (conservative site-specific recombination)**, которым не требуется протяженных областей гомологии ДНК. События рекомбинации этих двух типов могут видоизменить порядок генов на хромосоме и обусловить необычные типы мутаций, которые привносят новую информацию в геномы.

Транспозиция и консервативная сайт-специфическая рекомбинация главным образом нацелены на перемещение широкого разнообразия специализированных сегментов ДНК, собирательно нареченных *подвижными, или мобильными, генетическими элементами (mobile genetic elements)*, из одной позиции генома в другую. Мы увидим, что подвижные генетические элементы могут варьировать по размеру: от нескольких сотен до десятков тысяч пар нуклеотидов — и каждый из них обычно несет уникальный набор генов. Нередко один из таких генов кодирует специализированный фермент, который катализирует перемещение только этого элемента и таким образом делает рекомбинацию этого типа возможной.

Практически все клетки содержат подвижные генетические элементы (упоминаемые в неофициальных кругах как *jumping gene*, то есть «прыгающие гены»). Как объясняется в главе 4, в эволюционных масштабах они оказали глубокое воздействие на оформление современных геномов. Например, почти половина генома

человека ведет свое начало от таких элементов (см. рис. 4.17). С течением времени случайные мутации видоизменили их нуклеотидные последовательности, и в результате лишь немногие из многочисленных копий этих элементов в нашей ДНК все еще активны и способны совершать «прыжки». Остальные суть не что иное, как «молекулярные окаменелости», существование которых открывает перед нами поразительную картину истории нашей собственной эволюции.

Подвижные генетические элементы часто рассматривают как молекулярных паразитов (их называют также «эгоистичной ДНК»), которые продолжают существовать, потому что клетки не могут избавиться от них; они, несомненно, близки к тому, чтобы превзойти по объему наш собственный геном. Однако подвижные элементы ДНК могут давать клетке и определенные преимущества. Например, гены, которые они несут, иногда полезны, как, скажем, в случае устойчивости к антибиотикам в клетках бактерий, о чем мы побеседуем чуть позже. Перемещение подвижных генетических элементов создает также многие из генетических вариантов, от которых зависит эволюция, потому что вдобавок к собственному «передвижничеству» подвижные генетические элементы эпизодически перестраивают соседствующие с ними последовательности генома хозяина. Так, спонтанные мутации, наблюдаемые у дрозофилы, человека и прочих организмов, нередко происходят из-за переместившихся подвижных генетических элементов. Тогда как подавляющее большинство таких мутаций будет губительно для организма, некоторые приведут к повышенной приспособляемости и определенно будут распространяться по всей популяции. Почти наверняка многое из того разнообразия жизни, которое нас окружает, берет начало от перемещения подвижных генетических элементов.

В этом параграфе мы представляем на суд читателей подвижные генетические элементы и описываем механизмы, которые позволяют им передвигаться по геному. Мы увидим, что некоторые из таких элементов движутся через механизмы транспозиции, а иные — путем консервативной сайт-специфической рекомбинации. Мы начнем с транспозиции, так как известно намного больше примеров передвижения такого рода.

5.6.1. Посредством транспозиции подвижные генетические элементы могут быть встроены в любую последовательность ДНК

Подвижные элементы, которые перемещаются посредством транспозиции, называют **транспозонами (transposons)** или **транспонируемыми элементами (transposable elements)**. При транспозиции специальный фермент, обычно кодируемый самим транспозоном и именуемый *транспозазой*, действует на специфичную последовательность ДНК на обоих концах транспозона, побуждая его к встраиванию в новый целевой участок ДНК. В большинстве своем транспозоны лишь умеренно избирательны в выборе целевого участка и могут поэтому самовстраиваться во многие разные позиции генома. В частности, нет никакого общего требования наличия гомологии между концами «прыткого» элемента и целевой последовательностью. Большинство транспозонов перемещается лишь изредка. У бактерий, где возможно точно измерить частоту, транспозоны обычно передвигаются один раз на 10^5 клеточных генераций. В большинстве случаев транспозиция представляет собой редкий стохастический процесс, за исключением одного момента, часто связанного с прохождением репликационной вилки.

На основе своей структуры и механизма транспозиции транспозоны могут быть разбиты на три больших класса: *ДНК-транспозоны (DNA-only transposons)*,

ретровирус-подобные ретротранспозоны (*retroviral-like retrotransposons*) и неретровирусные ретротранспозоны (*nonretroviral retrotransposons*). Каждый класс будет рассмотрен подробно ниже. Общие сведения о различиях между ними при желании можно найти в [таблице 5.3](#).

5.6.2. ДНК-транспозоны для перемещения используют как механизм вырезания-вставки, так и механизм репликации

ДНК-транспозоны преобладают в геномах бактерий и отвечают главным образом за развитие устойчивости к антибиотикам в штаммах бактерий. Когда антибиотики, например пенициллин и стрептомицин, стали общедоступными в 1950-е гг., большинство болезнетворных для человека бактерий было восприимчиво к ним. Пятьдесят лет спустя ситуация совершенно изменилась — антибиотики наподобие пенициллина (и его современных производных) более не действуют на многие современные штаммы бактерий, в том числе и вызывающие гонорею и бактериальную пневмонию. За развитие устойчивости к антибиотикам главным образом ответственны гены, которые кодируют инактивирующие антибиотик ферменты, — а их несут транспозоны ([рис. 5.68](#)). Хотя эти подвижные элементы могут перемещаться только

Таблица 5.3. Три основных класса мобильных генетических элементов

ОПИСАНИЕ КЛАССА И ЕГО СТРУКТУРЫ	СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПЕРЕДВИЖЕНИЯ В ГЕНОМЕ	СПОСОБ ПЕРЕМЕЩЕНИЯ В ГЕНОМЕ	ПРИМЕРЫ
транспозоны, встречающиеся только в ДНК			
 короткие инвертированные повторы на каждом конце	транспозаза	перемещается в виде фрагмента ДНК либо при вырезании и вставке в геном, либо при репликации	P-элемент (дрозофила) Ac-Ds (кукуруза) Tn3 и Tn10 (E.coli) Tam3 (львиный зев)
ретровирусные ретротранспозоны			
 прямые длинные повторы (LTRs) на каждом конце	обратная транскриптаза и интеграз	перемещается путем образования промежуточной формы РНК, синтезируемой с промотора в LTR	Сор1а (дрозофила) Ту1 (дрожжи) ТНЕ1 (человек) Bs1 (кукуруза)
неретровирусные ретротранспозоны			
 полиА на 3'-конце РНК-транскрипта; 5'-конец часто усечен	обратная транскриптаза и эндонуклеаза	перемещается путем образования промежуточной формы РНК, синтезируемой с соседнего промотора	F-element (дрозофила) L1 (человек) Cin4 (кукуруза)

Примечание. Длина этих элементов колеблется от 1000 до примерно 12000 п. н. В состав каждого семейства входит много различных элементов, в таблице приведены лишь немногие из них. Кроме мобильных элементов, некоторые вирусы тоже могут встраиваться в хромосому клетки-хозяина и включаться с использованием механизмов транспозиции. Такие вирусы относятся к первым двум классам транспозонов.

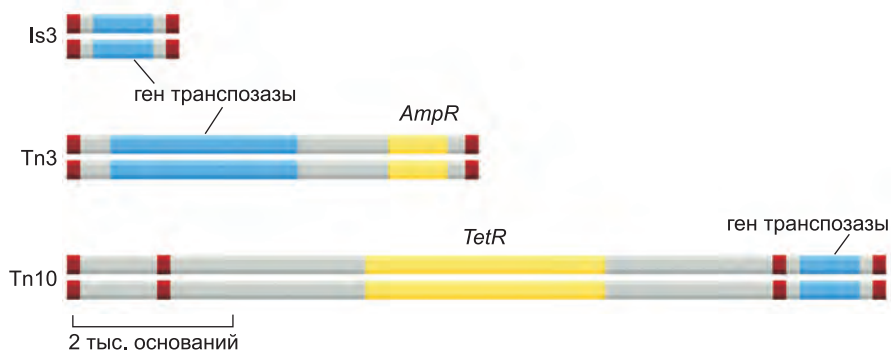


Рис. 5.68. Три из множества ДНК-транспозонов, обнаруженных у бактерий. Каждый из этих подвижных элементов ДНК содержит ген, кодирующий *транспозазу* — фермент, который осуществляет, по крайней мере, часть реакций разрыва и соединения ДНК, необходимых для перемещения этого элемента. Каждый транспозон несет также короткие последовательности ДНК (обозначенные *красным*), которые распознаются только транспозазой, кодируемой этим элементом, и необходимы для передвижения этого элемента. Кроме того, два из трех показанных на рисунке подвижных элементов несут гены, которые кодируют ферменты, инактивирующие антибиотики ампициллин (*AmpR*) и тетрациклин (*TetR*). Транспонируемый элемент Tn10, показанный на нижней схеме, как думают, эволюционировал от случайной «посадки» двух намного более коротких подвижных элементов по обе стороны гена устойчивости к тетрациклину: повсеместное применение тетрациклина как антибиотика привело к отбору бактерий, распространяющих этот транспозон в популяциях бактерий.

в пределах клеток, которые и так уже их содержат, они могут быть перенесены из одной клетки в другую посредством иных механизмов, известных под общим названием горизонтального переноса генов (рис. 1.23). Попав в новую клетку, транспозон может встроиться в ее геном и неизменно передаваться всем клеткам-потомкам посредством обычных процессов репликации ДНК и деления клеток.

ДНК-транспозоны, названные так, потому что во время своего передвижения они существуют только в форме ДНК, способны перебазироваться из донорного участка в целевой участок или путем *транспозиции «вырезания и вставки»* (*cut and past transposition*), или посредством *репликативной транспозиции* (*replicative transposition*). По причине концептуальной простоты первой, сначала мы обсудим именно ее механизм. Процесс начинается, когда каждая из специальных коротких последовательностей ДНК, которые «помечают» оба конца подвижного элемента, связывает молекулу транспозазы. Эти две молекулы транспозазы сходятся друг с другом и образуют мультимерную «транспозому», которая образует петлю ДНК, совмещающая оба конца подвижного элемента (рис. 5.69). После этого транспозаза производит разрезы в основании петли и удаляет элемент полностью из его исходной хромосомы, образуя центральный промежуточный продукт в процессе транспозиции (рис. 5.70). Чтобы завершить перемещение ДНК, транспозаза катализирует прямое внедрение обоих концов ДНК подвижного элемента в целевую молекулу ДНК, разрывая две фосфодиэфирные связи в последней и создавая две новые в момент объединения подвижного элемента с целевой ДНК. Поскольку эта реакция соединения ДНК начинается и заканчивается одним и тем же числом фосфодиэфирных связей, она может происходить без «поставки» дополнительной энергии. В следующей главе мы увидим, что того же самого типа перестройка

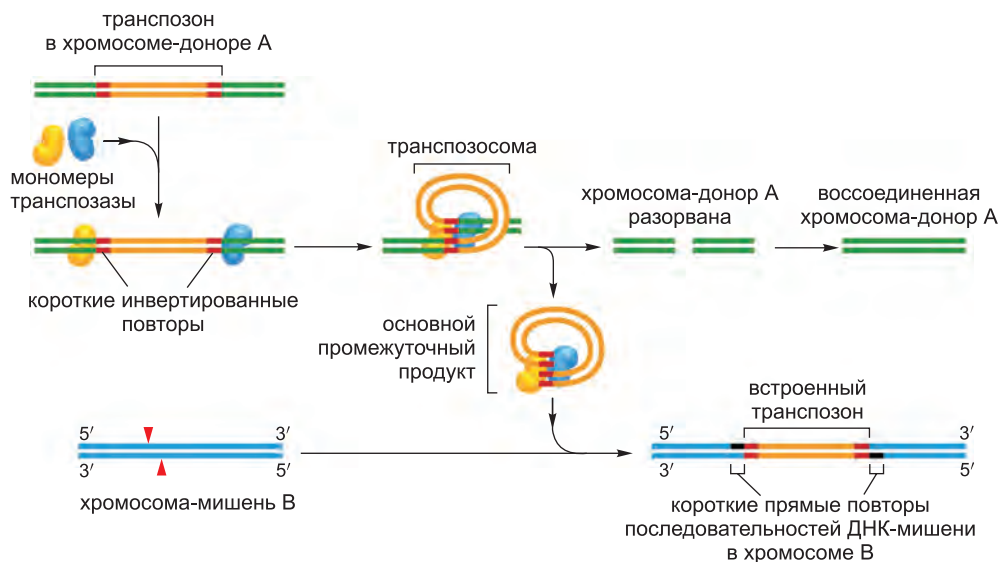


Рис. 5.69. Транспозиция по механизму вырезания и вставки. ДНК-транспозоны могут быть идентифицированы в хромосомах по «последовательностям инвертированных повторов ДНК» (красным) на их концах. Эти последовательности, которые могут быть не длиннее 20 нуклеотидов, представляют собой все, что необходимо для транспозиции зажатой между ними ДНК определенным ферментом — транспозазой, — тесно связанным с этим подвижным элементом. Перемещение способом вырезания и вставки ДНК-транспонируемого элемента из одного участка хромосомы в другой начинается, когда транспозаза сводит две инвертированные последовательности ДНК друг с другом, формируя петлю ДНК. Встраивание в целевую хромосому, катализируемое транспозазой, происходит на случайном участке — посредством создания ступенчатых разрезов в хромосоме-мишени (красные стрелки). После реакции транспозиции одонитевые промежутки, образовавшиеся в результате ступенчатых разрывов, устраняются ДНК-полимеразой и ДНК-лигазой (черный). В результате участок вставки «помечается» коротким прямым повтором целевой последовательности ДНК, как показано на рисунке. Хотя разрыв в донорной хромосоме (зеленая) устраняется, этот процесс часто видоизменяет последовательность ДНК, создавая мутацию на участке, с которого был вырезан транспонируемый элемент (не показана).

фосфодиэфирных связей (названная *перэтерификацией*) лежит в основе другого фундаментального процесса молекулярной биологии — сплайсинга РНК.

Поскольку разрывы, производимые в двух цепях ДНК-мишени, ступенчатые (красные стрелки на рис. 5.69), ДНК-продукт первоначально содержит два коротких одонитевых отрезка, по одному на каждом из концов вставленного транспозона. ДНК-полимераза и ДНК-лигаза клетки-хозяина заполняют и запечатывают эти бреши, на чем и завершается процесс рекомбинации. В результате этого происходит короткое дублирование целевой последовательности ДНК на участке вставки; такие примыкающие, или фланкирующие, с обеих сторон последовательности прямых повторов, длина которых различна у разных транспозонов, служат удобными «метками» свершившихся событий транспозиции.

Когда прибегающий к механизму вырезания и вставки ДНК-транспозон удаляется из своего первоначального местоположения, на его месте в хромосоме остается «дыра». Такая рана может быть полностью залечена рекомбинационным устранением двухцепочечных разрывов (см. рис. 5.59), при условии, что хро-

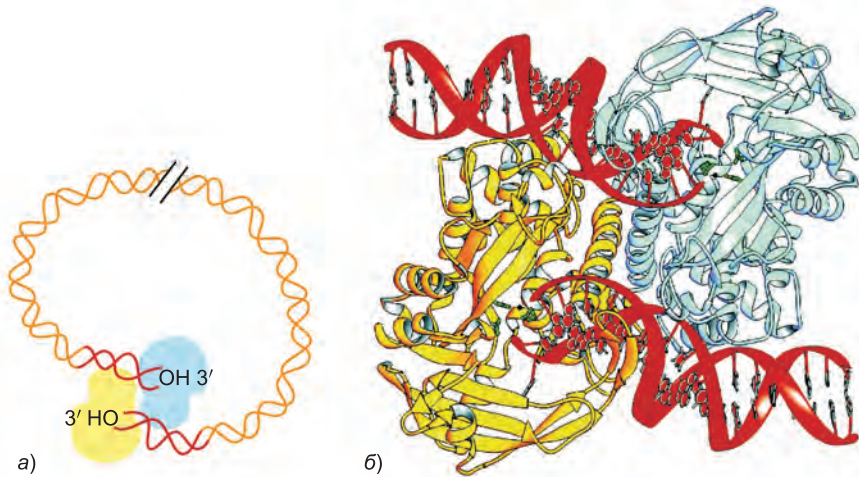


Рис. 5.70. Структура главного промежуточного продукта, образуемого транспозазой «вырезания и вставки». а) Схематичное представление общей структуры. б) Детальная структура транспозазы, удерживающей два конца ДНК, 3'-ОН-группы которой подготовлены для взаимодействия с целевой хромосомой. Один домен транспозазы распознает последовательность ДНК на конце транспозона, тогда как другой домен «руководит всей химической кухней» разрыва и воссоединения ДНК (Изображение б заимствовано из D. R. Davies et al., *Science* 289: 77–85, 2000. С любезного разрешения издательства AAAS.)

мосома реплицирована совсем недавно и в наличии имеется точная копия этой еще неповрежденной хозяйской последовательности. В таком случае процесс устранения разрывов восстановит транспозон в его первоначальной позиции. Как альтернатива — в диплоидных организмах поврежденная хромосома может быть отремонтирована рекомбинационным способом с использованием хромосомного гомолога; в этом случае транспозон не будет водружен на прежнее место, но на участке репарации может произойти потеря гетерозиготности. Как третья возможность, реакция негомологичного соединения концов может запечатать зазор; в этом случае последовательность ДНК, которая первоначально окружала транспозон, видоизменяется, и на хромосомном участке, из которого этот транспозон был вырезан, возникает мутация (см. рис. 5.52).

Что примечательно, тот же механизм вырезания и вставки, что используется для вырезания из ДНК транспозонов, обнаружен в развивающихся иммунных системах позвоночных животных, где он используется в катализе перестроек ДНК, лежащих в основе многообразия антител и разнообразия Т-клеточных рецепторов. Известный под названием *V(D)J-рекомбинации*, этот процесс будет обсужден в главе 25. Встречающаяся только у позвоночных *V(D)J-рекомбинация* представляет собой сравнительно недавно появившуюся эволюционную новинку, но она, как полагают, эволюционировала от намного более древних транспозонов «вырезания и вставки».

Некоторые ДНК-транспозоны перемещаются механизмом, названным *репликативной транспозицией*. В этом случае ДНК транспозона реплицируется в ходе транспозиции: одна копия остается на первоначальном участке, тогда как другая встраивается в новую позицию в хромосоме. Хотя используемый в этом случае

механизм более сложен, он тесно связан с только что описанным механизмом вырезания и вставки; на самом деле, некоторые транспозоны могут передвигаться обоими способами.

5.6.3. Некоторые вирусы используют механизм транспозиции для переноса своего генетического материала в хромосомы клетки-хозяина

Некоторые вирусы относят к подвижным генетическим элементам, потому что они используют механизмы транспозиции для интегрирования своих геномов в геном клетки-хозяина. Однако, в отличие от транспозонов, такие вирусы кодируют и белки, упаковывающие их генетическую информацию в вирусные частицы, которые могут инфицировать другие клетки. Многие из вирусов, которые встраиваются в хромосому хозяина, делают это, используя один из первых двух механизмов, приведенных в таблице 5.3. Действительно, большая часть наших знаний об этих механизмах получена в ходе исследований конкретных вирусов.

Вирус, который заражает бактерию, известен как **бактериофаг (bacteriophage)**. *Бактериофаг Ми* для интеграции своего генома в геном клетки-хозяина использует не только основанную на ДНК транспозицию, но также и репликативную транспозицию для реплицирования своего генома. Транспозиция играет ключевую роль также в жизненном цикле многих других вирусов. Наибольшего внимания заслуживают **ретровирусы (retroviruses)**, к которым относится и вирус AIDS (СПИД) человека, HIV (ВИЧ). Вне клетки ретровирус существует в виде одноцепочечного РНК-генома, упакованного в белковый капсид вместе с кодируемым вирусом ферментом **обратной транскриптазой**. Во время процесса инфицирования вирусная РНК вводится в клетку и конвертируется в молекулу двухцепочечной ДНК — благодаря действию этого важнейшего фермента, который способен полимеризовать ДНК как на матрице РНК, так и на матрице ДНК (**рис. 5.71** и **5.72**). В термине *ретровирус* отмечена способность такого вируса обращать вспять закономерный поток генетической информации, который обычно направлен от ДНК к РНК (см. рис. 1.5).

Как только обратная транскриптаза произвела на свет молекулу двухцепочечной ДНК, специфические последовательности вблизи обоих ее концов удерживаются вместе кодируемой вирусом транспозазой, называемой *интегразой*. Интегразы создают активированные 3'-ОН-концы вирусной ДНК, которые могут непосредственно взаимодействовать с молекулой ДНК-мишени через механизм, подобный используемому ДНК-транспозонами — вырезания и вставки (**рис. 5.73**). Фактически, доскональные исследования трехмерных структур транспозаз бактерий и интегразы HIV выявили поразительное сходство этих ферментов, даже при том, что их аминокислотные последовательности далеко разошлись друг от друга.

5.6.4. Ретровирус-подобные ретротранспозоны напоминают ретровирусы, но у них отсутствует белковая оболочка

Большое семейство транспозонов, называемых **ретровирус-подобными ретротранспозонами** (retroviral-like retrotransposons; см. таблицу 5.3), перемещается в хромосомы и из хромосом за счет механизма, который идентичен используемому ретровирусами. Такие подвижные элементы встречаются в разных организмах: у дрожжей, мух и млекопитающих; в отличие от вирусов, им не свойственна способность покидать хозяйскую клетку, и они передаются всем потомкам этой клетки

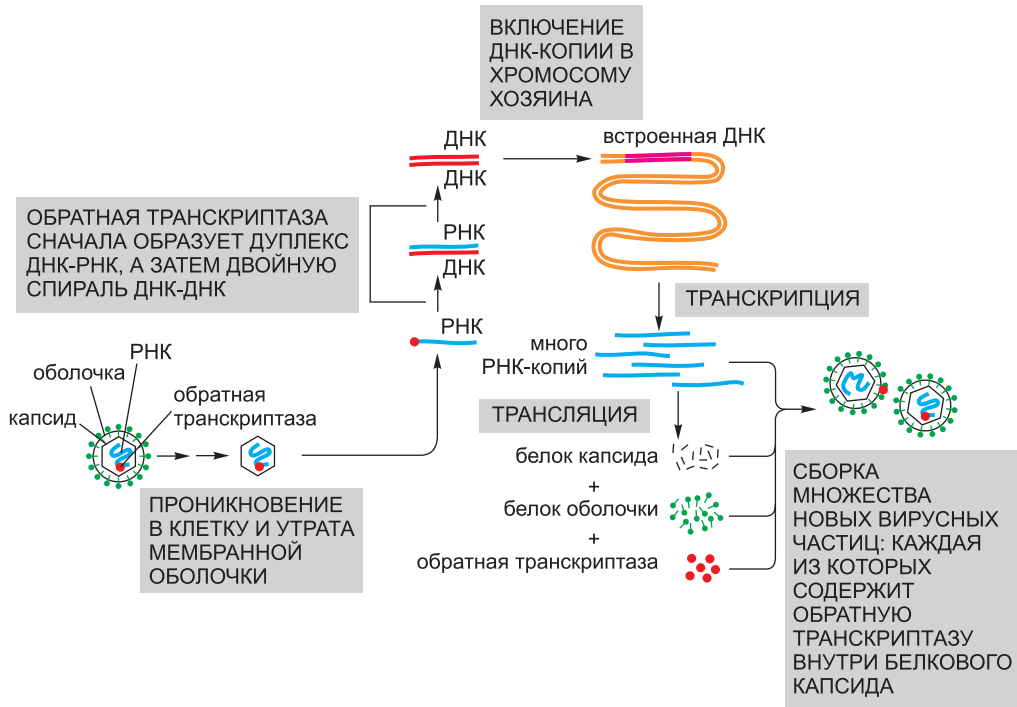


Рис. 5.71. Жизненный цикл ретровируса. Геном ретровируса состоит из молекулы РНК длиной около 8500 нуклеотидов; в каждой вирусной частице обычно упакованы две такие молекулы. Фермент обратная транскриптаза сначала делает ДНК-копию молекулы вирусной РНК, а затем и вторую нить ДНК, таким образом производя копию РНК-генома вируса в виде двухцепочечной ДНК. Затем кодируемый вирусом фермент интегразы катализирует встраивание этой двойной спирали ДНК в хромосому хозяина (см. рис. 5.73). Такое встраивание необходимо для синтеза новых молекул вирусной РНК РНК-полимеразой клетки-хозяина — ферментом, который транскрибирует РНК на матрице ДНК (обсудим в главе 6).

через нормальный процесс репликации ДНК и деления клеток. Первый шаг в их транспозиции — транскрипция транспозона целиком с получением РНК-копии подвижного элемента, который обычно имеет длину несколько тысяч нуклеотидов. Этот транскрипт, который транслируется клеткой-хозяином как обычная матричная РНК, кодирует фермент обратную транскриптазу. Этот фермент синтезирует двухцепочечную ДНК-копию молекулы РНК через образование промежуточного продукта — гибрида РНК-ДНК, что в точности зеркально отражает ранние стадии инфицирования ретровирусами (см. рис. 5.71). Как и у ретровирусов, молекула линейной двухцепочечной ДНК после этого встраивается в участок на хромосоме, прибегнув к содействию фермента интегразы, который также кодируется подвижным элементом (см. рис. 5.73).

5.6.5. Большая доля генома человека состоит из неретровирусных ретротранспозонов

Значительная часть многих хромосом позвоночных состоит из повторяющихся последовательностей ДНК. В хромосомах человека такие повторы в большинстве

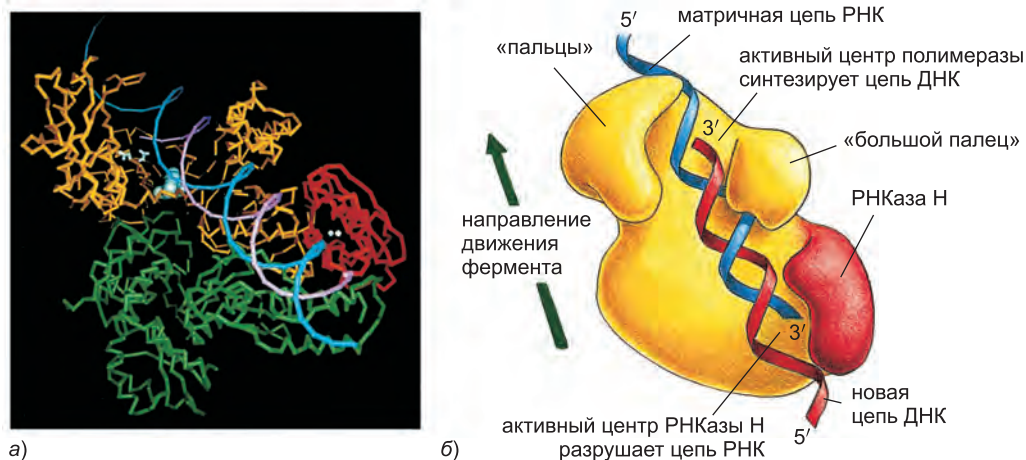


Рис. 5.72. Обратная транскриптаза. а) Трехмерная структура фермента из HIV (вируса СПИД человека), определенная с помощью рентгеновской кристаллографии. б) Модель, показывающая работу фермента на матрице РНК. Обратите внимание, что домен полимеразы (желтый на изображении б) имеет ковалентно присоединенный домен РНКазы Н (Н означает «гибридный») (красный), который деградирует нить РНК в гибридной спирали РНК–ДНК. Это действие помогает полимеразе превращать первоначальную гибридную спираль в двойную спираль ДНК (Изображение а любезно предоставлено Tom Steitz; изображение б переработано из L. A. Kohlstaedt et al., *Science* 256: 1783–1790, 1992. С великодушного разрешения издательства AAAS.)

своем представлены мутированными и усеченными версиями **неретровирусных ретротранспозонов (nonretroviral retrotransposons)**, относящихся к третьему главному типу транспозонов (см. таблицу 5.3). Хотя большинство таких транспозонов неподвижно, немногие сохранили способность передвигаться. Относительно недавно установлены перемещения элемента *L1* (иногда называемого LINE, или long interspersed nuclear element), часть из которых вызывает болезни человека; например, особый тип гемофилии обусловлен вставкой элемента *L1* в ген, кодирующий белок свертывания крови (фактор VIII) (см. рис. 6.25).

Неретровирусные ретротранспозоны встречаются во многих организмах и перемещаются при помощи совершенно иного механизма — для которого требуется комплекс эндонуклеазы и обратной транскриптазы. Как показано на **рис. 5.74**, в случае неретровирусных ретротранспозонов РНК и обратная транскриптаза в событии рекомбинации участвуют непосредственно и играют гораздо большую роль, чем в случае ретровирус-подобных ретротранспозонов, описанных выше.

Анализ последовательности генома человека показал, что большая часть неретровирусных ретротранспозонов — например, многочисленные копии элемента *Alu*, члена семейства SINE (short interspersed nuclear elements), — не несет своих собственных генов эндонуклеазы или обратной транскриптазы. Однако им удалось успешно размножиться и стать главными компонентами нашего генома, предположительно, захватывая (и переманивая на свою сторону) ферменты, кодируемые другими транспозонами.

Элементы *L1* и *Alu*, кажется, размножились в геноме человека сравнительно недавно (**рис. 5.75**). Так, например, мышь содержит последовательности, близкородственные элементам *L1* и *Alu*, но их размещение в хромосомах мыши отличается

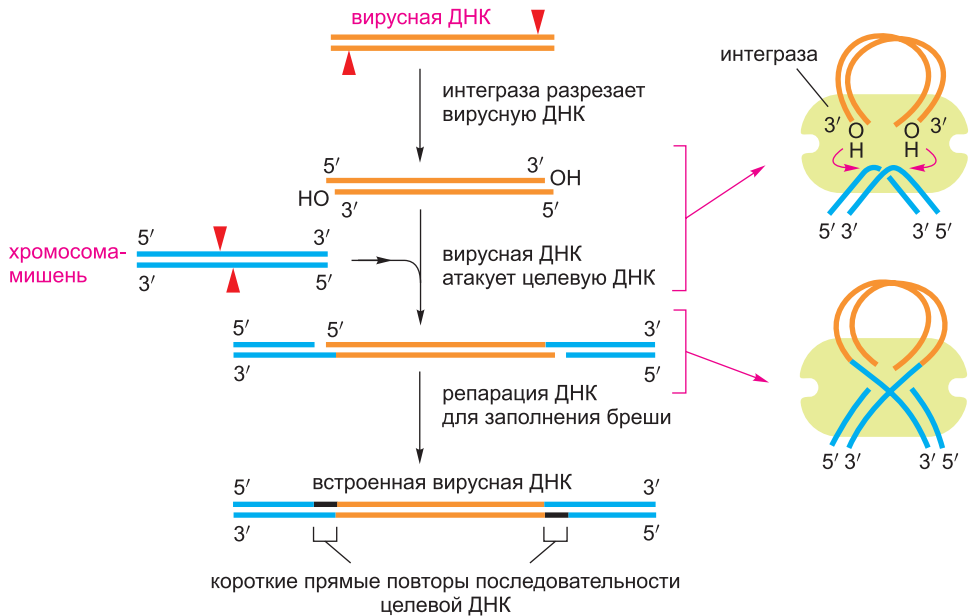


Рис. 5.73. Транспозиция, осуществляемая либо ретровирусом (типа HIV), либо ретровирус-подобным ретротранспозоном. Процесс начинается с молекулы двухцепочечной ДНК (оранжевая), синтезируемой обратной транскриптазой (см. рис. 5.71). На начальном этапе фермент интегразы формирует петлю ДНК и разрезает одну нить на каждом конце последовательности вирусной ДНК, высвобождая новые 3'-ОН-группы. Затем каждый из таких 3'-ОН-концов напрямую атакует фосфодиэфирную связь на противоположных цепях произвольно выбранного участка на хромосоме-мишени (красные стрелки на синей ДНК). Тем самым осуществляется встраивание последовательности вирусной ДНК в хромосому-мишень, при этом по обе стороны от встроеного сегмента остаются короткие прорехи, которые заполняются в ходе процессов репарации ДНК. В связи с использованием механизма «залатывания прорех» (подобно такому же при транспозиции «вырезанием и вставкой») с обеих сторон встроеного в ДНК сегмента остаются короткие повторы целевой ДНК (черные).

от такового в хромосомах человека (см. рис. 4.80). Вместе взятые LINE и SINE составляют приблизительно 40% генома человека (см. рис. 4.17).

5.6.6. В геномах различных организмов преобладают разные транспонируемые элементы

Итак, мы описали транспонируемые элементы нескольких типов: 1) ДНК-транспозоны, передвижение которых основано на реакциях разрыва и соединения ДНК; 2) ретровирус-подобные ретротранспозоны, которые тоже передвигаются посредством разрыва и соединения ДНК, но здесь ключевая роль, как матрицы для изготовления катализатора рекомбинации ДНК, принадлежит РНК; и 3) неретровирусные ретротранспозоны, в которых РНК-копия подвижного элемента является основным звеном для включения подвижного элемента в ДНК-мишень, ибо служит прямой матрицей для события обратной транскрипции с затравкой на целевой ДНК.

Что интересно, в геномах различных организмов преобладают транспозоны разного типа. Например, подавляющее большинство транспозонов бактерий

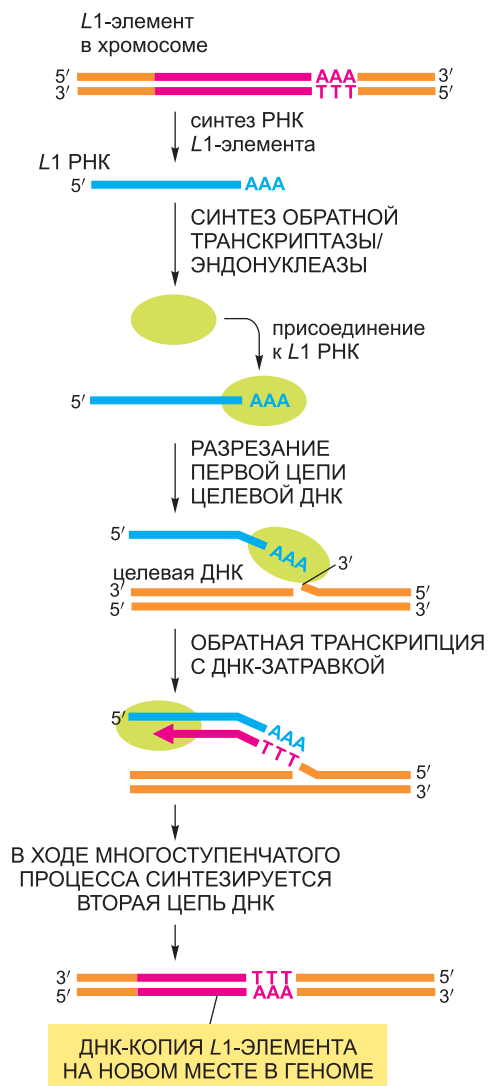


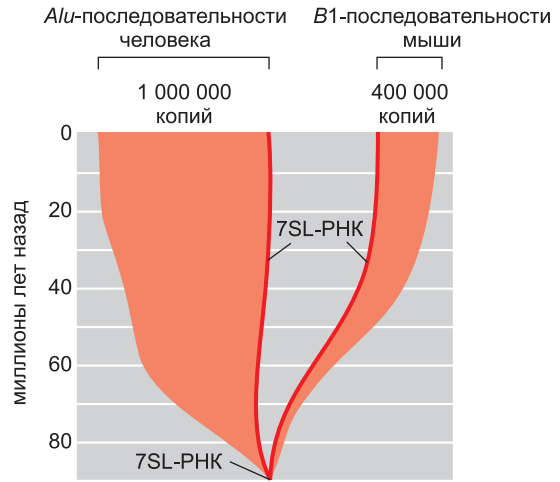
Рис. 5.74. Транспозиция неретровирусного ретро-транспозона. Транспозиция подвижного элемента *L1* (красный) начинается, когда эндонуклеаза элемента *L1*, присоединенная к *L1* обратной транскриптазе (зеленый овал) и *L1* РНК (синяя), надрезает целевую ДНК в точке, где произойдет встраивание. В результате этого расщепления в ДНК-мишени высвобождается 3'-ОН-конец, который затем используется как затравка для этапа обратной транскрипции. В итоге создается представленная одноцепочечной ДНК копия подвижного элемента, которая ковалентно связана с целевой ДНК. В ходе последующих реакций на одноцепочечной ДНК синтезируется новая копия; в результате получается двухцепочечная ДНК элемента *L1*, которая встроена на участке первоначального надреза.

представлено только ДНК-типами, в число которых затесалась лишь малая горстка, относящаяся к неретровирусным ретро-транспозонам. У дрожжей главные подвижные элементы, которые обнаружены, — ретровирус-подобные ретротранспозоны. У дрозофилы встречаются транспозоны ДНК, ретровирусные и неретровирусные. Наконец, геном человека содержит транспозоны всех трех типов, но, как мы покажем ниже, истории их эволюции разительно отличаются одна от другой.

5.6.7. Последовательности генома раскрывают приблизительные временные рамки перемещения транспонируемых элементов

«историческую сводку» о деятельности транспозонов во временном масштабе эволюции. На основании скрупулезного сравнения нуклеотидных последовательностей приблизительно 3 миллионов «останков» транспонируемых элементов в геноме человека стало возможным в общих чертах восстановить передвижения транспозонов в геномах наших предков за последние несколько сотен миллионов лет. Например, ДНК-транспозоны, кажется, были очень активны задолго до расхождения людей и обезьян Старого Света (25–35 миллионов лет назад); но, поскольку они постепенно накапливали инактивирующие мутации, то пребывали с тех пор в дремлющем состоянии в генеалогической линии человека. Аналогично, хотя наш геном засорен остатками ретровирус-подобных транспозонов, ни один из них не проявляет видимой активности. Только одно семейство ретровирус-подобных ретротранспозонов, как полагают, перекочевало в геном человека после расхождения человека и шимпанзе приблизительно 6 миллионов лет назад. Неретровирусные ретротранспозоны также

Рис. 5.75. Распространение обогащенных элементами *Alu* и *B1* последовательностей, встречающихся в геномах соответственно человека и мыши. Обе эти транспонируемые последовательности ДНК, как думают, начали свой эволюционный путь от гена 7SL PHK, который кодирует SRP PHK (см. рис. 12.39). Исходя из их позиций в этих двух геномах и подобия последовательностей этих часто повторяющихся элементов, можно заключить, что главное увеличение числа копий, кажется, происходило независимо у мыши и у человека (см. рис. 4.80). (Переработано на основе P. L. Deininger and G. R. Daniels, *Trends Genet.* 2: 76–80, 1986, с любезного разрешения издательства Elsevier, и на основе International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* 409: 860–921, 2001, с великодушного дозволения издательства Macmillan Publishers Ltd.)



являются древними, но, в отличие от остальных типов, некоторые все еще перемещаются в нашем геноме, как было упомянуто ранее. Например, по оценкам, *de novo* передвижение элемента *Alu* наблюдается один раз на каждые 100–200 человеческих поколений. Передвижки неретровирусных ретротранспозонов ответственны за малую, но существенную долю новых мутаций в геноме человека — возможно, две мутации из каждой тысячи.

Ситуация у мышей во многом отличается. Хотя геномы мыши и человека содержат примерно одинаковую плотность транспозонов этих трех типов, ретротранспозоны двух типов все еще активно транспонируются в геноме мыши и берут на себя ответственность за появление около 10 % новых мутаций.

Хотя мы только начинаем понимать, как именно передвижение транспозонов сформировало геномы современных млекопитающих, предполагается, что всплески активности транспозонов послужили причиной определяющих событий видообразования в процессе расхождения эволюционных линий млекопитающих от общего предка — процесс, который начался приблизительно 170 миллионов лет назад. На данный момент мы можем лишь задаваться вопросом о том, сколько наших исключительно человеческих «достоинств» возникло как результат деятельности многочисленных подвижных генетических элементов в прошлом, останки которых сегодня разбросаны по нашим хромосомам.

5.6.8. Консервативная сайт-специфическая рекомбинация может привести к обратимой перестройке ДНК

Механизм рекомбинации иного рода, известный как *консервативная сайт-специфическая рекомбинация*, опосредствует перестройки подвижных элементов ДНК других типов. В этом способе разрыв и соединение происходят на двух специальных участках, по одному на каждой из взаимодействующих молекул ДНК. В зависимости от позиций и относительных ориентаций этих двух участков рекомбинации может произойти встраивание ДНК, вырезание ДНК или инверсия

ДНК (рис. 5.76). Консервативная сайт-специфическая рекомбинация осуществляется специализированными ферментами, которые разрывают и воссоединяют две двойные спирали ДНК в специфических последовательностях на каждой из молекул ДНК. Та же ферментативная система, которая соединяет две молекулы ДНК, может часто вновь их обособить, точно восстанавливая последовательность двух исходных молекул ДНК (см. рис. 5.76, а).

Несколько особенностей отличает консервативную сайт-специфическую рекомбинацию от транспозиции. Во-первых, консервативная сайт-специфическая рекомбинация требует наличия специализированных последовательностей (сайтов) как на донорной, так и на акцепторной ДНК (отсюда термин «сайт-специфическая»). Эти последовательности содержат опознавательные участки для специфической рекомбиназы, которая «берется» за катализ перестройки. В отличие от сайт-специфической рекомбинации, при транспозиции требуется только наличие специализированной последовательности; для большинства транспозонов последовательность акцепторной ДНК не важна. Во-вторых, механизмы реакции в основе своей различны. Рекомбиназы, которые катализируют консервативную сайт-специфическую рекомбинацию, напоминают топоизомеразы — в том смысле, что они образуют кратковременные высокоэнергетические ковалентные связи с ДНК и используют эту энергию для завершения перестроек ДНК. Таким образом, все фосфатные связи, которые разрываются во время события рекомбинации, восстанавливаются по его завершении (отсюда термин «консервативная»). Транспозиция, напротив, основана на реакции переэтерификации, в ходе которой не образуется промежуточного звена в виде

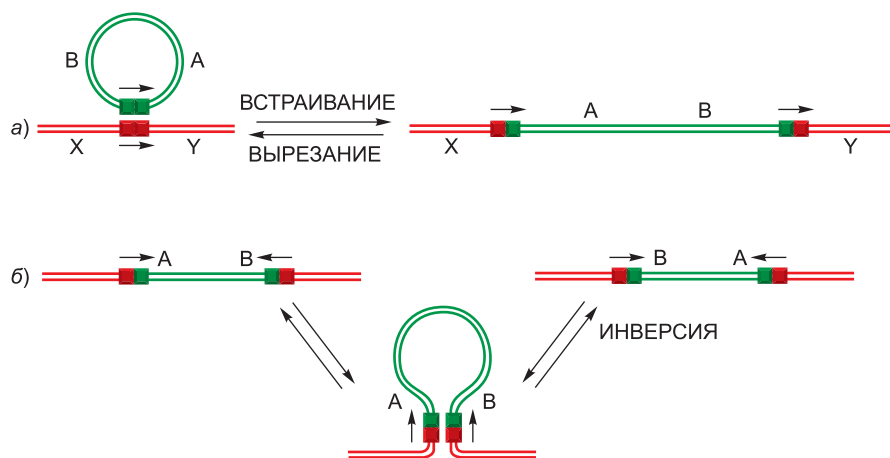


Рис. 5.76. Перестройки ДНК двух типов, которые происходят при консервативной сайт-специфической рекомбинации. Единственное отличие между реакциями на схемах а и б кроется в относительной ориентации двух коротких участков ДНК (обозначенных стрелками), в которых происходит событие сайт-специфической рекомбинации. а) В ходе реакции интеграции кольцевая молекула ДНК может быть включена во вторую молекулу ДНК; посредством обратной реакции (вырезания) она может высвободиться и вновь образовать первоначальное кольцо ДНК. Многие бактериальные вирусы «входят» в хромосомы хозяина и «выходят» из них таким вот способом (см. рис. 5.77). б) Консервативная сайт-специфическая рекомбинация может также инвертировать определенный сегмент ДНК в хромосоме. Хорошо известный пример инверсии ДНК посредством сайт-специфической рекомбинации наблюдается в бактерии *Salmonella typhimurium*, которая часто бывает причиной пищевого отравления у людей; инверсия сегмента ДНК изменяет тип жгутика, который продуцируется этой бактерией (см. рис. 7.64).

ковалентно связанных ДНК и белка. Этот процесс оставляет в ДНК одонитевые пробелы, которые должны быть вновь заштопаны ДНК-полимеразой и ДНК-лигазой — ферментами, которые требуют энергетической подпитки, поступающей от гидролиза нуклеотидов.

5.6.9. Консервативная сайт-специфическая рекомбинация была открыта на бактериофаге λ

Вирус бактерий, *бактериофаг λ* , — первый подвижный ДНК-элемент, который был разобран по всем «биохимическим статьям». Когда этот вирус попадает в клетку, он направляет синтез кодируемого вирусом фермента рекомбиназы, названного *λ -интегразой*. Этот фермент опосредует ковалентное присоединение вирусной ДНК к хромосоме бактерии, в результате чего вирус становится частью этой хромосомы и реплицируется автоматически — как часть ДНК хозяина. Процесс рекомбинации начинается, когда несколько молекул белка интегразы прочно связываются со специфической последовательностью ДНК на кольцевой хромосоме бактериофага, наряду с несколькими белками хозяина. После этого такой ДНК-белковый комплекс может связаться в участке прикрепления на ДНК бактериальной хромосомы, сводя хромосому бактерии с хромосомой бактериофага воедино. Затем интеграза катализирует требуемые реакции разрезания и зашивания, каковые имеют место в процессе рекомбинации. Из-за короткой области гомологии последовательностей в двух объединяемых последовательностях в этой точке обмена формируется крошечное гетеродуплексное сочленение (рис. 5.77).

Тот же вариант механизма сайт-специфической рекомбинации задействован при высвобождении ДНК бактериофага λ с участка ее интеграции на хромосоме *E. coli* — в ответ на определенные сигналы, — чтобы она стремительно размножилась в бактериальной клетке (рис. 5.78). Вырезание катализируется комплексом фермента интегразы и хозяйских факторов² со вторым белком бактериофага, эксцизионазой (эксцизионная гидролаза; вырезает сегменты ДНК из хромосом. — *Прим. ред.*), который производится вирусом, только когда клетка его хозяина претерпевает стресс, — в таком случае в интересах бактериофага покинуть клетку хозяина и снова размножаться в виде вирусной частицы.

5.6.10. Консервативная сайт-специфическая рекомбинация может быть использована для включения и выключения генов

Когда участки, специфично узнаваемые ферментом консервативной сайт-специфической рекомбинации, инвертируются в своей ориентации, последовательность ДНК между ними инвертируется, а не вырезается (см. рис. 5.76). Многие бактерии используют такую инверсию последовательности ДНК для регулирования экспрессии определенных генов — например, собирая активный ген из разделенных кодирующих сегментов. Преимущество регулирования такого типа состоит в том, что оно наследуется напрямую, так как новое «обустройство» ДНК автоматически передается дочерним хромосомам при делении клетки. Мы встретим характерный пример такого использования консервативной сайт-специфической рекомбинации в главе 7 (см. рис. 7.64).

Консервативные сайт-специфические рекомбиназы бактерий также стали мощ-

² Встраивания. — *Прим. перев.*

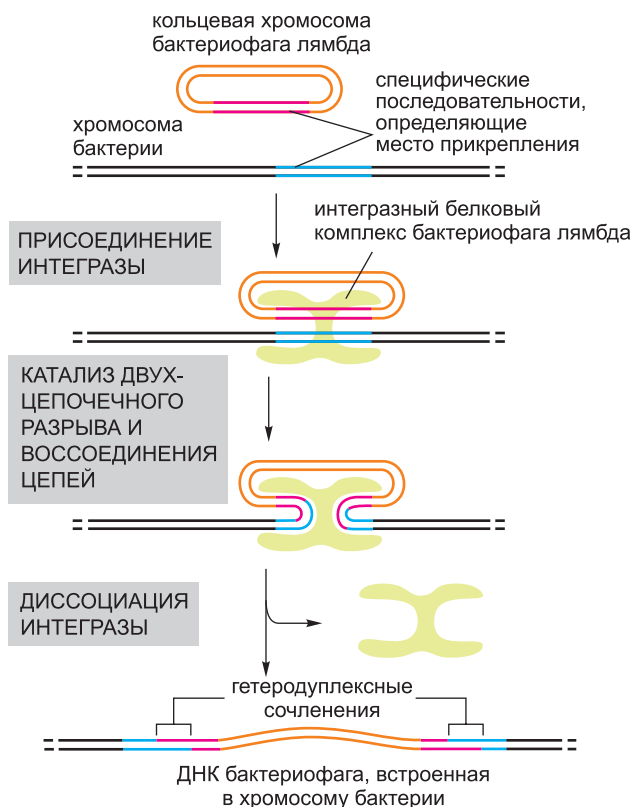


Рис. 5.77. Встраивание кольцевой хромосомы ДНК бактериофага λ в хромосому бактерии. В данном примере консервативной сайт-специфической рекомбинации фермент λ -интеграза связывается со специфичной последовательностью ДНК, определяющей участок (сайт) его прикрепления на каждой хромосоме, делает разрезы, в которые встраивается короткая гомологичная последовательность ДНК. После этого интеграза раскручивает партнерские цепи и вновь заживает их, образуя гетеродуплексное сочленение длиной в семь пар нуклеотидов. В общей сложности требуется четыре реакции (разрыва и соединения нитей); для каждой из них энергия расщепленной фосфодиэфирной связи запасается в ковалентных связях, образующихся в переходном состоянии между ДНК и ферментом, так что для заделывания нити ДНК не требуется присутствия АТФ или ДНК-лигазы.

ными инструментами в руках ученых в области клеточной биологии и биологии развития. Чтобы выяснить роль определенного гена и белка в сложных многоклеточных организмах, с помощью методов генной инженерии получают мышей, несущих ген, кодирующий фермент сайт-специфической рекомбинации плюс тщательно разработанную конструкцию ДНК-мишени с участками, специфически узнаваемыми этим ферментом. В нужный момент времени ген, кодирующий этот фермент, можно активировать и тем самым перестроить последовательность ДНК-мишени. Такие перестройки широко используются для делетирования заданного гена в определенной ткани мыши (рис. 5.79). Эта методология особенно полезна в тех случаях, когда интересующий ген играет определяющую роль на ранних стадиях развития многих тканей и его полное удаление из зародышевой линии вызвало бы смерть в самом начале эмбриогенеза. Та же стратегия может быть использована

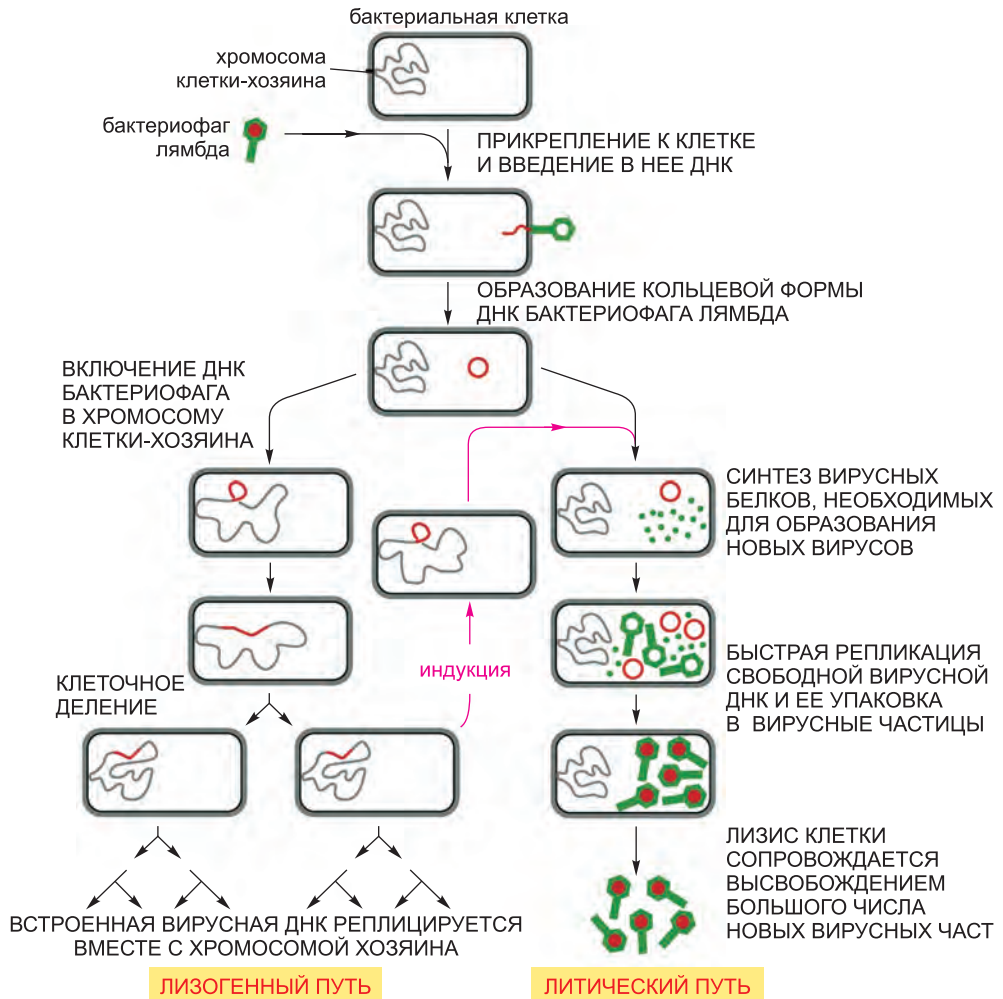


Рис. 5.78. Жизненный цикл бактериофага λ . Представленный здесь двухцепочный ДНК-геном бактериофага λ содержит 50 000 пар нуклеотидов и кодирует 50–60 различных белков. Когда ДНК бактериофага λ попадает в клетку, оба ее конца соединяются с образованием молекулы кольцевой ДНК. Этот бактериофаг может размножаться в *E. coli* или литическим способом, который уничтожает клетку, или же входит в латентное состояние профага (лизогенный путь). При повреждении клетки, несущей профага λ , происходит активация литического пути: профага выходит из хромосомы хозяина и переходит к литическому росту (красные стрелки). Как вход ДНК бактериофага λ в бактериальную хромосому, так и выход из нее совершаются консервативной сайт-специфической рекомбинацией, катализируемой ферментом λ -интегразой (см. рис. 5.77).

также и при неадекватной экспрессии любого заданного гена в интересующей ткани; в данном случае целенаправленное делетирование позволит присоединить сильный промотор транскрипции к интересующему гену. Имея такой инструмент под рукой, можно, в принципе, определить действие любого белка в любой ткани организма животного.

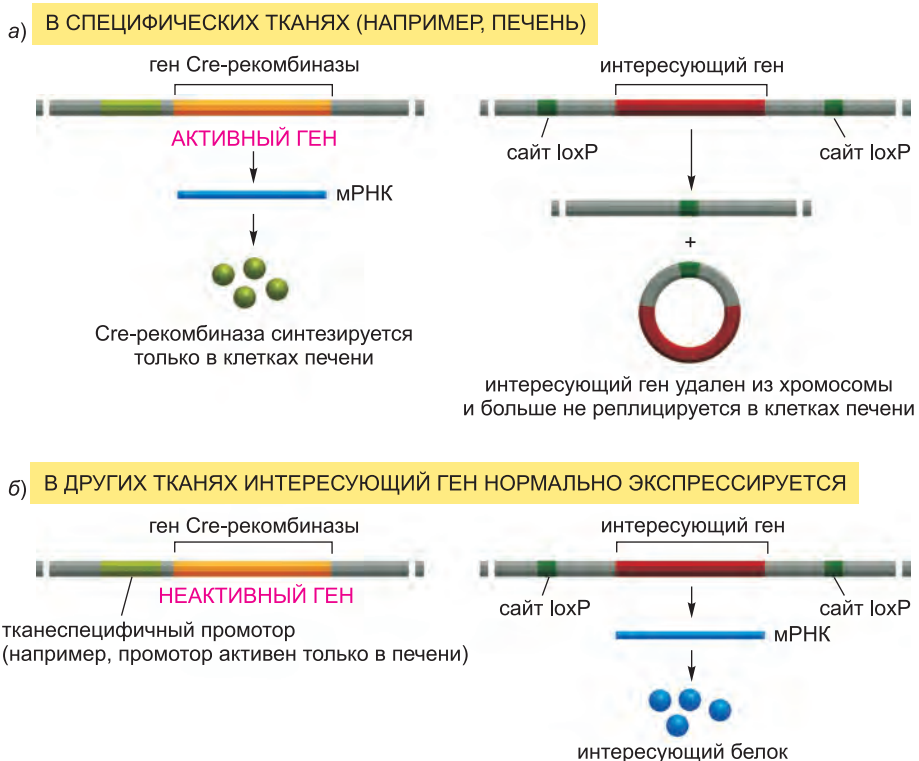


Рис. 5.79. Как синтезируемый бактерией фермент консервативной сайт-специфической рекомбинации может быть использован для удаления заданных генов из определенных тканей мыши. Этот подход требует встраивания двух специально сконструированных молекул ДНК в зародышевую линию животного. Первая содержит ген рекомбиназы (в данном случае рекомбиназа Cre бактериофага P1) под контролем тканеспецифического промотора, что гарантирует экспрессию этой рекомбиназы только в этой ткани. Вторая молекула ДНК содержит интересующий нас ген, фланкированный участками (в данном случае участками loxP), узнаваемыми данной рекомбиназой. Мышь проектируется таким образом, чтобы у нее была единственная копия этого гена. Поэтому если рекомбиназа экспрессируется только в печени, то, значит, интересующий нас ген будет удален там и только там.

Как будет описано в главе 7, известно много тканеспецифических промоторов; более того, многие из этих промоторов активны только в определенные моменты развития организма. Таким образом, возможно изучать последствия делетирования определенных генов на разных стадиях развития каждой ткани.

Заключение

Геномы почти всех организмов содержат подвижные генетические элементы, которые могут передвигаться из одной позиции генома в другую путем либо транспозиции, либо консервативной сайт-специфической рекомбинации. В большинстве случаев такое перемещение носит случайный характер и происходит с очень низкой частотностью. К подвижным генетическим элементам относят транспозоны, которые передвигаются в пределах одной клетки (и ее потомков), плюс те вирусы, геномы которых могут встраиваться в геномы их клеток-хозяев.

Известно три класса транспозонов: ДНК-транс-позоны, ретровирус-подобные ретротранспозоны и неретровирусные ретротранспозоны. Все они,

кроме последних, имеют близких родственников среди вирусов. Хотя вирусы и транспонируемые элементы можно рассматривать как клеточных паразитов, многие из новых последовательностей ДНК, которые были созданы событиями сайт-специфической рекомбинации, порождали генетическую изменчивость, так необходимую для эволюции клеток и организмов.

Задачи

Какие утверждения являются верными? Обоснуйте свой ответ

5.1. В вашем теле нет двух клеток с тождественной нуклеотидной последовательностью.

5.2. У *E. coli*, репликационная вилка которой перемещается со скоростью 500 п. н. в секунду, ДНК перед вилкой должна вращаться со скоростью почти 3000 оборотов в минуту.

5.3. Когда двунаправленные репликационные вилки от смежных точек начала репликации встречаются, ведущая цепь всегда сталкивается с отстающей цепью.

5.4. Все механизмы репарации ДНК основаны на наличии в клетке двух копий генетической информации — по одной в каждой из двух гомологичных хромосом.

Обсудите следующие проблемы

5.5. Чтобы определить воспроизводимость результатов измерений частоты мутаций, вы проводите следующий эксперимент. Вы засеиваете каждую из 10 культур одной-единственной бактерией *E. coli* и позволяете культурам расти, пока каждая не будет содержать 10^6 клеток, а затем измеряете в каждой культуре число клеток, которые несут мутацию в интересующем вас гене. Вас настолько удивили предварительные результаты, что вы повторили эксперимент, дабы подтвердить оные. Оба набора результатов дают картину чрезвычайно высокой изменчивости, как показано в **таблице Q5.1**. При том что мы полагаем частоту мутаций постоянной, по какой причине, согласно вашим предположениям, имеет место столь разительное различие значений частотности мутантных клеток в разных культурах?

5.6. Ферменты репарации ДНК предпочтительно исправляют «несоответствующие» основания на недавно синтезированной цепи ДНК, используя старую цепь ДНК как матрицу. Если бы «несоответствия» устранялись без учета того, какая из цепей ДНК будет служить матрицей, то могла бы такая система устранения ошибок спаривания уменьшить число ошибок репликации? Привела бы такая неразборчивая система исправления ошибок к меньшему числу мутаций, большему числу мутаций или к тому же числу мутаций, что наблюдалось бы без репарации вообще? Поясните ваши ответы.

5.7. Если ДНК-полимераза требует «совершенной» затравки, спаренной по всем правилам, для присоединения следующего нуклеотида, то как же так полу-

Таблица Q5.1. Частота появления мутантных клеток в многочисленных культурах (задача 5.5)

ЭКСПЕРИМЕНТ	КУЛЬТУРА (мутантные клетки/ 10^6 клеток)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	4	0	257	1	2	32	0	0	2	1
2	128	0	1	4	0	0	66	5	0	2

чается, что ошибочные нуклеотиды «избегают» действия полимеразы и становятся субстратами для ферментов исправления ошибок спаривания?

5.8. Лаборатория, к которой вы присоединились, изучает жизненный цикл вируса животных, который использует кольцевую двухцепочечную ДНК в качестве носителя генома. Ваш план состоит в том, чтобы определить местоположение точки (точек) начала репликации и выяснить, протекает ли репликация в одном или обоих направлениях от точки начала (однонаправленная или двунаправленная репликация). Чтобы достичь своей цели, вы выделили реплицирующиеся молекулы, расщепили их нуклеазой рестрикции, которая разрезает геном вируса на одном участке, получили линейную молекулу из кольцевой и стали изучать получившиеся молекулы с помощью электронного микроскопа. Часть молекул, которые вы наблюдали, представлена схематично на **рис. Q5.1**. (Учтите, что с помощью электронного микроскопа невозможно отличить ориентацию одной молекулы ДНК от другой.)

Завтра вы должны представить ваши выводы остальным сотрудникам лаборатории. Как вы ответите на два вопроса, поставленные перед вами вашим руководителем? 1) В данном геноме имеется одна уникальная точка начала репликации или их несколько? 2) Репликация однонаправленная или двунаправленная?

5.9. Если вы сравниваете частотность шестнадцати возможных динуклеотидных последовательностей в клетках *E. coli* и человека, то вы не увидите никаких поразительных различий, за исключением одного динуклеотида — 5'-CG-3'. Частотность динуклеотидов CG в геноме человека значительно ниже, чем у *E. coli*, и значительно ниже, чем ожидаемая случайно. По какой причине, вы полагаете, динуклеотид CG недостаточно представлен в геноме человека?

5.10. С возрастом соматические клетки, как думают, накапливают геномные «шрамы» в результате неточной репарации двухцепочечных разрывов путем негомологичного соединения концов (NHE). Оценки, основанные на частотности разрывов в первичных фибробластах человека, предполагают, что к 70-летнему возрасту каждая соматическая клетка человека может нести около 2000 обусловленных NHE мутаций из-за неточностей в ходе репарации. Если бы эти мутации были распределены случайным образом по всему геному, то сколько генов, по вашему мнению, было бы повреждено? Считаете ли вы, что в таком случае функция клетки будет подорвана? Почему? (Предположите, что определяюще важную информацию несут 2% генома: 1,5% кодирующего и 0,5% регуляторного.)

5.11. Нарисуйте двойную структуру Холлидея, которая образовалась бы в результате вторжения обоих концов разрушенного дуплекса в неповрежденный гомологичный дуплекс, показанный на **рис. Q5.2**. Пометьте левый конец каждой цепи в структуре Холлидея знаком 5' или 3', с тем чтобы их связи с родительским и рекомбинантным дуплексами были ясны. Укажите, как использовался бы синтез ДНК для заполнения одноцепочечных брешей в вашей двойной структуре Холлидея.

5.12. Почему случается так, что рекомбинация между подобными, но нетождественными повторами создает



Рис. Q5.1. Родительская и реплицирующиеся формы вируса животных (к задаче 5.8).

Рис. Q5.2. Расщепленный дуплекс с одонитевыми хвостами, готовыми вторгнуться в неповрежденный гомологичный дуплекс (к задаче 5.11).



проблему клеткам человека? Как система устранения ошибок спаривания защищает нас от таких событий рекомбинации?

Литература

Общая

Biological Response to DNA Damage (2000) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 65.

Brown T. A. (2002) *Genomes 2*, 2nd ed. New York: Wiley-Liss.

Friedberg E. C., Walker G. C., Siede W. et al. (2005) *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington, DC: ASM Press.

Hartwell L., Hood L., Goldberg M. L. et al. (2006) *Genetics: from Genes to Genomes*. Boston: McGraw Hill.

Stent G. S. (1971) *Molecular Genetics: An Introductory Narrative*. San Francisco: WH Freeman.

Watson J., Baker T., Bell S. et al. (2004) *Molecular Biology of the Gene*, 5th ed. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Сохранение последовательностей ДНК в ходе эволюции

Cooper G. M., Brudno M., Stone E. S. et al. (2004) Characterization of evolutionary rates and constraints in three mammalian genomes. *Genome Res.* 14: 539–548.

Crow J. F. (2000) The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nature Rev. Genet.* 1: 40–47.

Hedges S. B. (2002) The origin and evolution of model organisms. *Nature Rev. Genet.* 3: 838–849.

King M. C., Wilson A. C. (1965) Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science* 188: 107–16.

Механизмы репликации ДНК

Alberts B (1998) The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* 92: 291–294.

Dillingham M. S. (2006) Replicative helicases: a staircase with a twist. *Curr. Biol.* 16: R844–R847.

Indiani C. & O'Donnell M. (2006) The replication clamp-loading machine at work in the three domains of life. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 751–761.

Kornberg A. (1960) Biological synthesis of DNA. *Science* 131: 1503–1508.

Li J. J. & Kelly T. J. (1984) SV40 DNA replication *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6973.

Meselson M. & Stahl F. W. (1958) The replication of DNA in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44: 671–682.

Modrich P. & Lahue R. (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 101–133.

Mott M. L. & Berger J. M. (2007) DNA replication initiation: mechanisms and

regulation in bacteria. *Nature Rev. Microbiol.* 5: 343–354.

O'Donnell M. (2006) Replisome architecture and dynamics in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 281: 10653–10656.

Okazaki R., Okazaki T., Sakabe K. et al. (1968) Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59: 598–605.

Raghuraman M.K., Winzler E.A., Collingwood D. et al. (2001) Replication dynamics of the yeast genome. *Science* 294: 115–121.

Rao P.N. & Johnson R.T. (1970) Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* 225: 159.

Wang J.C. (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 430–440.

Инициация и завершение репликации ДНК в хромосомах

Chan S.R. & Blackburn E.H. (2004) Telomeres and telomerase. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Bio. Sci.* 359: 109–121.

Costa S. & Blow J.J. (2007) The elusive determinants of replication origins. *EMBO Rep.* 8: 332–334.

Groth A., Rocha W. & Almouzni G. (2007) Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 128: 721–733.

Machida Y.J., Hamlin J.L. & Dutta A. (2005) Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell* 123: 13–24.

O'Donnell M. & Kuriyan J. (2005) Clamp loaders and replication initiation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16: 35–41.

Robinson N.P. & Bell S.D. (2005) Origins of DNA replication in the three domains of life. *FEBS J.* 272: 3757–3766.

Smogorzewska A. & de Lange T. (2004) Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 177–208.

Репарация ДНК

Barnes D.E., & Lindahl T. (2004) Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu. Rev. Genet.* 38: 445–476.

Harrison J.C. & Haber J.E. (2006) Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu. Rev. Genet.* 40: 209–235.

Heller R.C. & Marians K.J. (2006) Replisome assembly and the direct restart of stalled replication. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 932–43.

Lieber M., Ma Y. et al. (2003) Mechanism and regulation of human nonhomologous DNA end-joining. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 712–720.

Lindahl T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709–715.

Prakash S. & Prakash L. (2002) Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair. *Genes. Dev.* 16: 1872–1883.

Sancar A., Lindsey-Boltz L.A. et al. (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 39–85.

Svejstrup J.Q. (2002) Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 21–29.

Wyman C. & Kanaar R. (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu. Rev. Genet.* 40: 363–383.

Гомологичная рекомбинация

Adams M.D., McVey M. & Sekelsky J.J. (2003) *Drosophila* BLM in double-strand break repair by synthesis-dependent strand annealing. *Science* 299:265–267.

Cox M.M. (2001) Historical overview: searching for replication help in all of the rec places. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8173–8180.

Holliday R. (1990) The history of the DNA heteroduplex. *BioEssays* 12: 133–142.

Lisby M., Bartow J.H. et al. (2004) Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* 118: 699–713.

McEachem M.J. & Haber J.E. (2006) Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 111–135.

Michel B., Grompone G. et al. (2004) Multiple pathways process stalled replication forks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 12783–12788.

Szostak J.W., Orr-Weaver T.K., Rothstein R.J. et al. (1983) The double-strand break repair model for recombination. *Cell* 33: 25–35.

West S.C. (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 435–445.

Транспозиция и сайт-специфическая рекомбинация

Campbell A.M. (1993) Thirty years ago in genetics: prophage insertion into bacterial chromosomes. *Genetics* 133: 433–438.

Comfort N.C. (2001) From controlling elements to transposons: Barbara McClintock and the Nobel Prize. *Trends Biochem. Sci.* 26: 454–457.

Craig N.L. (1996) Transposition, in *Escherichia coli* and *Salmonella*, pp. 2339–2362. Washington, DC: ASM Press.

Gottesman M. (1999) Bacteriophage lambda: the untold story. *J. Mol. Biol.* 293: 177–180.

Grindley N.D., Whiteson K.L. & Rice P.A. (2006) Mechanisms of site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 567–605.

Varmus H. (1988) Retroviruses. *Science* 240: 1427–1435.

Zickler D. & Kleckner N. (1999) Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* 33: 603–754.

6

Клеточные механизмы считывания генома: путь от ДНК к белку

Лишь после открытия структуры ДНК в начале 1950-х гг. стало ясно, что содержащаяся в клетках наследственная информация закодирована в нуклеотидной последовательности ДНК. С тех пор мы поднялись в понимании этого процесса на поразительную высоту. За эти пятьдесят лет мы узнали полные последовательности геномов многих организмов, в том числе и человека. Следовательно, теперь мы располагаем огромным количеством информации, необходимой для создания сложного организма — наподобие нас с вами. Пределы наследственной информации, необходимой для жизни, ограничены биохимическими и структурными особенностями клеток — так, что биология сложна отнюдь не до бесконечности.

В этой главе мы объясняем, как клетки расшифровывают и используют информацию, заложенную в их геномах. Многие стали известны о том, как генетические инструкции, написанные алфавитом только из четырех «букв» — четырех различных нуклеотидов ДНК, — направляют процесс формирования бактерии, плодовой мушки или человека. Однако нам все еще предстоит немало узнать о том, как информация, сберегаемая в геноме организма, воплощается в самой что ни на есть простейшей одноклеточной бактерии с 500 генами, уже не говоря о том, как она направляет развитие человека с его примерно 25 000 генов. Мы все еще не выбрались из глубин неведения; поэтому следующее поколение молекулярных биологов ожидает множество увлекательных приключений.

Проблемы, с которыми сталкиваются клетки при расшифровке геномов, можно оценить, обозрев малую часть генома плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (рис. 6.1). Большая часть закодированной в ДНК информации, хранимой в этом и иных геномах, определяет линейный порядок — читай «последовательность» — аминокислот в каждом белке, производимом в организме. Как было сказано в главе 3, последовательность аминокислот, в свою очередь, предписывает каждому белку модель укладки, чтобы из него вышла молекула своеобразной формы с неповторимыми химическими характеристиками. Когда клетка синтезирует определенный белок, она должна точно расшифровать соответствующую область генома. Дополнительная информация, закодированная в ДНК генома, в точности предписывает, в какой момент времени в жизни организма и в клетках какого типа тот или иной ген должен быть экспрессирован в белок. Поскольку белки служат основными составляющими клеток, постольку расшифровка генома определяет не только размер, форму, биохимические свойства и поведение клеток, но также и отличительные особенности всех форм жизни на планете Земля.

Разумно было бы предположить, что хранящаяся в геномах информация устроена упорядоченным образом — наподобие словаря или телефонной книги. Однако, хотя геномы некоторых бактерий и кажутся вполне сносно организованными, геномы большинства многоклеточных организмов, хотя бы у представленной нами в качестве примера дрозофилы, на удивление неупорядоченны. Маленькие крупницы кодирующей ДНК (то есть ДНК, которая кодирует белки) перемежаются протяженными массивами, по-видимому, «бессодержательной» ДНК. Некоторые участки генома несут много генов, а другие совершенно их не содержат. Белки, которые в клетке работают в тесной связи друг с другом, часто кодируются генами, расположенными на разных хромосомах, а соседствующие гены обычно кодируют белки, которые имеют мало общего друг с другом. Поэтому расшифровка геномов отнюдь не простое дело. Даже при помощи мощных компьютеров исследователям все еще сложно окончательно определить местонахождение начала и конца гена в последовательностях ДНК сложных геномов, а тем более предсказать для каждого гена время его экспрессии в течение жизни данного организма. Хотя последовательность ДНК генома человека известна, вероятно, потребуются по крайней мере десятилетие, чтобы идентифицировать все гены и определить точные аминокислотные последовательности белков, производимых с их помощью. А клетки в нашем организме делают все это по тысяче раз в секунду!

Геномная ДНК не управляет синтезом белка «самолично», а использует для этого РНК в качестве посредника. Когда у клетки возникает надобность в некотором белке, последовательность нуклеотидов соответствующей части безмерно длинной молекулы ДНК в хромосоме сначала копируется в РНК (этот процесс называется *транскрипцией*). Именно эти РНК-копии сегментов ДНК и служат непосредственными матрицами, направляющими синтез белка (процесс, названный *трансляцией*) по надлежащей канве. Поэтому поток генетической информации в клетках направлен от ДНК к РНК и далее — к белку (рис. 6.2). Клетки всех живых организмов — от бактерий до человека — экспрессируют свою генетическую информацию таким образом; и этот фундаментальный принцип назван *центральной догмой* молекулярной биологии.

Несмотря на универсальность центральной догмы, на пути, по которому информация перетекает из ДНК в белки, встречаются разные «развязки». На главной из них в клетках эукариот РНК-транскрипты, прежде чем им будет дозволено выйти из ядра и претерпеть трансляцию в белок, подвергаются в ядре серии «обрабатывающих» операций (называются процессингом), в число которых входит и *сплайсинг РНК*. Такой поэтапный процессинг может коренным образом изменить «значение» молекулы РНК и поэтому крайне важен для понимания механизма считывания геномов в клетках эукариот. Наконец, хотя в этой главе мы сосредоточили внимание на продуцировании белков, кодируемых геномом, мы знаем, что конечным продуктом многих генов является РНК. Подобно белкам, многие из таких РНК сворачиваются в точные трехмерные структуры, которые выполняют структурные, каталитические и регуляторные функции в клетке.

Мы начинаем эту главу с первого этапа процесса расшифровки генома: с транскрипции, в ходе которой из геномной ДНК образуется молекула РНК. Затем мы проследим за судьбой этой молекулы РНК в клетке и завершим наш путь на молекуле правильно свернутого белка. В конце главы мы поговорим о том, каким образом могла принятая ныне весьма сложная схема хранения, транскрипции и

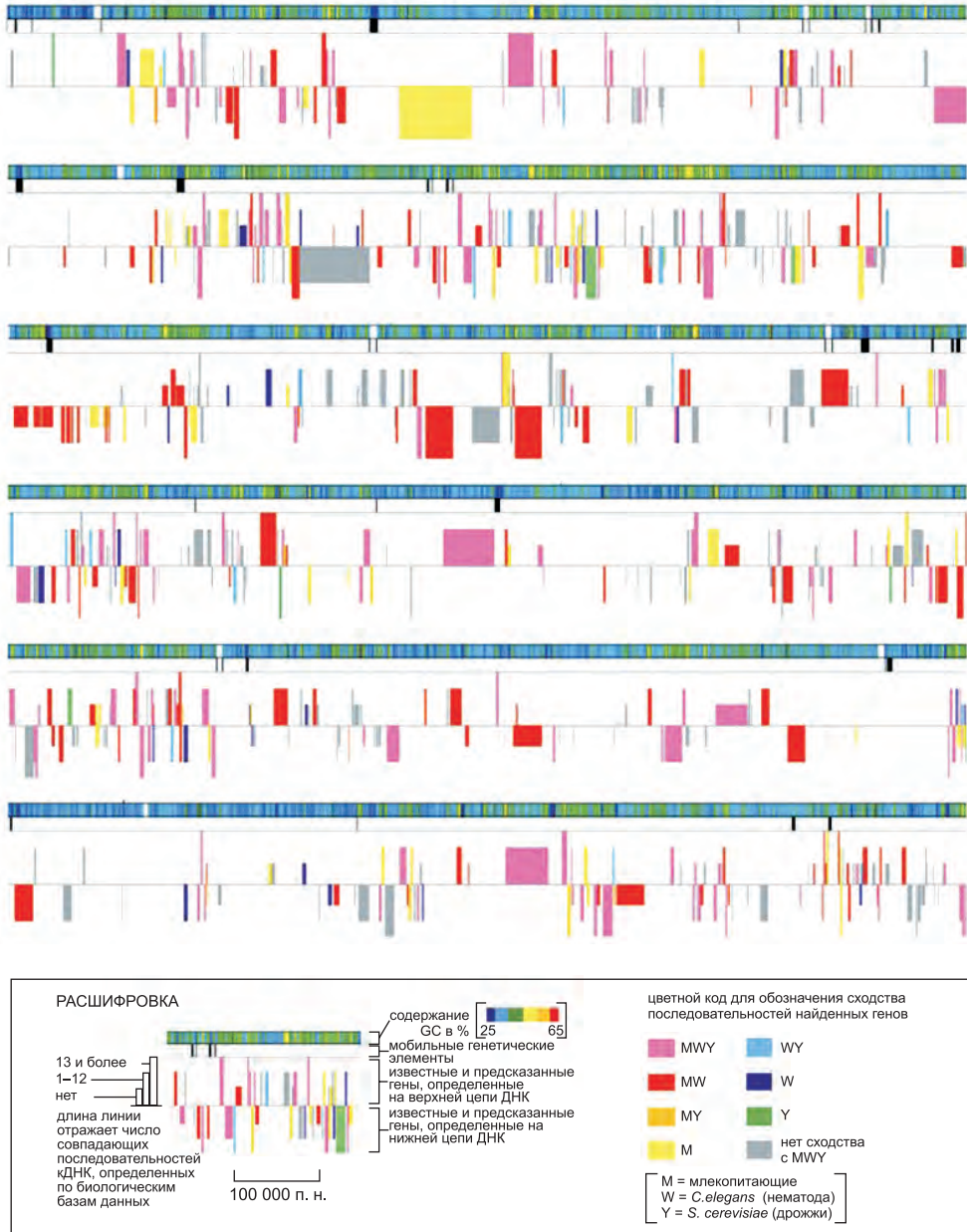


Рис. 6.1. (страница напротив) Схематичное описание части хромосомы 2 генома плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. На этом рисунке представлено приблизительно 3% полного генома дрозофилы в виде шести последовательных сегментов. Как указано в расшифровке, символические обозначения следует истолковывать следующим образом: **черные вертикальные линии** различной толщины — местоположения транспонируемых элементов, при этом более толстыми полосками отмечены группы таких элементов; **цветные прямоугольники** — гены (как известные, так и предсказанные), закодированные в одной нити ДНК (прямоугольники *над* средней линией), и гены, закодированные в другой нити (прямоугольники *под* средней линией). Длина каждого характеризующего свой ген прямоугольника включает

трансляции информации возникнуть на базе более простых систем, существовавших на самых ранних этапах эволюции клетки.

6.1. От ДНК к РНК

Транскрипция и трансляция — средства, которыми клетки считывают и экспрессируют генетические инструкции, записанные в генах. Поскольку с одного и того же гена может быть «изготовлено» множество тождественных копий РНК, а каждая молекула РНК может направлять синтез многочисленных идентичных молекул белка, клетки в случае необходимости могут быстро синтезировать большое количество белка. Но каждый ген может, кроме того, транскрибироваться и транслироваться с различной эффективностью, что позволяет клетке делать огромные количества некоторых белков и ничтожно малые — других (рис. 6.3). Более того, как мы увидим в следующей главе, клетка может изменять (или регулировать) экспрессию каждого из своих генов согласно текущим потребностям — чаще всего путем управления «объемом выработки» своей РНК.

6.1.1. Определенные части последовательности ДНК транскрибируются в молекулы РНК

Первый шаг, предпринимаемый клеткой для считывания необходимой части своих генетических инструкций, состоит в копировании определенного участка нуклеотидной последовательности своей ДНК — гена — в нуклеотидную последовательность РНК. Содержащаяся в РНК информация, хотя и перекопирована в иную химическую форму, по-прежнему записана, по сути, тем же языком, каким она была описана в ДНК, — языком последовательности нуклеотидов. Отсюда и название **транскрипция (transcription)**.

Подобно ДНК, РНК представляет собой линейный полимер, состоящий из субъединиц нуклеотидной природы четырех различных типов, связанных друг с другом фосфодиэфирными связями (рис. 6.4). Химически она отличается от ДНК по двум параметрам: 1) нуклеотиды в РНК суть *рибонуклеотиды*, то есть они содержат сахар рибозу (отсюда название *рибонуклеиновая кислота*), а не дезоксирибозу; 2) хотя, подобно ДНК, РНК содержит основания аденин (А), гуанин (G) и цитозин (С), она содержит основание урацил (U) вместо тимина (Т) в ДНК. Поскольку U, подобно Т, может спариваться посредством водородных связей с А (рис. 6.5), постольку свойства комплементарного спаривания оснований, описанные

и его экзоны (кодирующая белок ДНК) и его интроны (некодирующая ДНК) (см. рис. 4.15), а его высота пропорциональна числу известных кДНК, которые соответствуют этому гену. (Как будет описано в главе 8, молекулы кДНК суть ДНК-копии молекул мРНК, и большие коллекции нуклеотидных последовательностей кДНК размещены в различных базах данных; чем больше совпадений между их последовательностями, тем выше достоверность того, что предсказанный ген транскрибируется в РНК и является, таким образом, подлинным геном.) Цвет каждого приписанного к своему гену прямоугольника указывает, известен ли близкородственный ген у других организмов. Например, MWY означает, что данный ген имеет близких родственников у млекопитающих, у червя нематоды *Caenorhabditis elegans* и у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. MW указывает, что этот ген имеет близких родственников у млекопитающих и червя, но не у дрожжей. *Радужная полоса* показывает долю пар оснований G-C; во многих различных геномах эта величина поразительно отличается для различных областей генома; происхождение и значение такой варибельности пока не ясны. (Изображение заимствовано из M. D. Adams et al., *Science* 287: 2185–2195, 2000. С любезного разрешения издательства AAAS.)

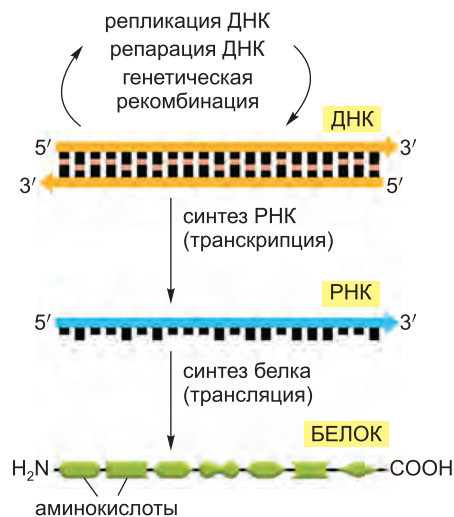


Рис. 6.2. Путь от ДНК к белку. Поток генетической информации от ДНК к РНК (транскрипция) и от РНК к белку (трансляция) бурлит во всех живых клетках.

для ДНК в главах 4 и 5, распространяются также и на РНК (в РНК G спаривается с C, а A спаривается с U). Мы находим также и другие типы пар оснований в РНК: например, G время от времени создает пару с U.

Хотя эти химические различия и незначительны, ДНК и РНК весьма сильно отличаются по общей структуре. Тогда как ДНК всегда находится в клетках в виде двухцепочечной спирали, РНК одноцепочечная. Поэтому цепь РНК может сложиться в определенную конфигурацию — точно так же как полипептидная цепь сворачивается в конечную форму

белка (рис. 6.6). Как мы увидим позже в этой главе, способность сворачиваться в сложные трехмерные структуры позволяет некоторым молекулам РНК брать на себя требующие особой точности структурные и каталитические функции.

6.1.2. В результате транскрипции синтезируется РНК, комплементарная одной из цепей молекулы ДНК

Находящаяся в клетке РНК получена в ходе транскрипции ДНК — процесса, который в некотором роде подобен процессу репликации ДНК, рассмотренному нами в главе 5. Транскрипция начинается с раскрытия и раскручивания маленькой части двойной спирали ДНК — чтобы выставить наружу основания на обеих цепях ДНК. Затем одна из двух цепей двойной спирали ДНК употребляется как матрица

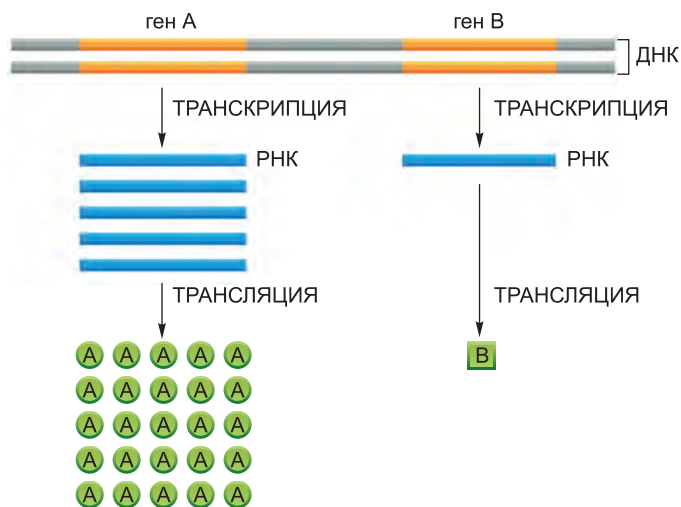


Рис. 6.3. Гены могут экспрессироваться с разной эффективностью. В данном примере ген А транскрибируется и транслируется намного более эффективно, чем ген В. Это позволяет клетке производить белка А намного больше, чем белка В.

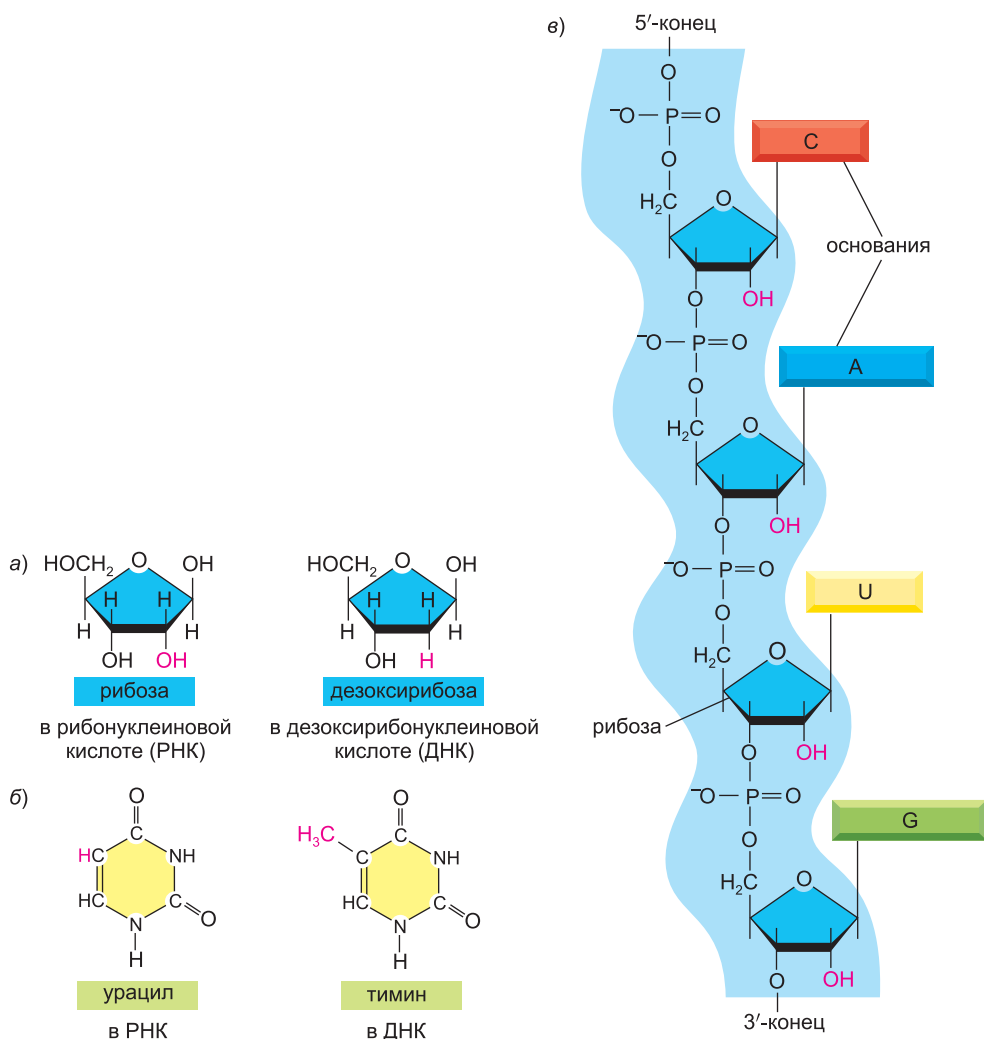


Рис. 6.4. Химическая структура РНК. а) РНК содержит сахар рибозу, которая отличается от сахара дезоксирибозы, сахара ДНК, наличием дополнительной группы $-\text{OH}$. б) РНК содержит основание урацил, который отличается от тимина, эквивалентного основания в ДНК, отсутствием группы $-\text{CH}_3$. в) Короткий отрезок РНК. Фосфодиэфирные химические связи между нуклеотидами в РНК такие же, что и в ДНК.

для синтеза молекулы РНК. Как и при репликации ДНК, нуклеотидная последовательность цепи РНК определяется комплементарным спариванием оснований между поступающими нуклеотидами и матрицей ДНК. Когда обнаруживается хорошее соответствие, подаваемый рибонуклеотид ковалентно связывается с наращиваемой цепью РНК в ходе ферментативно катализируемой реакции. Поэтому цепь РНК, произведенная транскрипцией, — *транскрипт* — удлиняется на один нуклеотид за раз и имеет последовательность нуклеотидов, в точности комплементарную цепи ДНК, используемой в качестве матрицы (рис. 6.7).

Однако транскрипция отличается от репликации ДНК несколькими важными моментами. В отличие от недавно образованной нити ДНК, цепь РНК не оста-

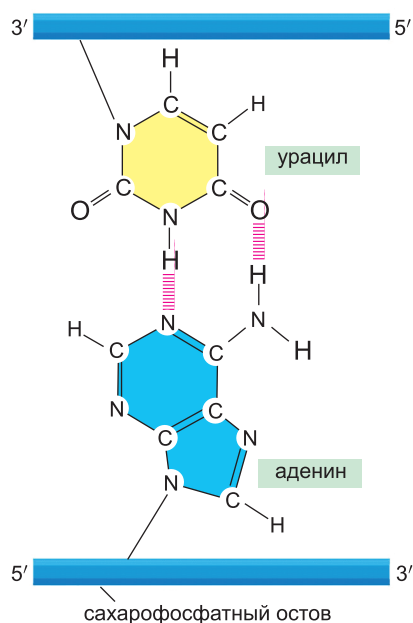


Рис. 6.5. Урацил образует комплементарную пару с аденином. Отсутствие метильной группы в У никак не влияет на спаривание оснований; таким образом, пара оснований У–А очень похожа на пару оснований Т–А (см. рис. 4.4).

ется связанной водородными связями с ДНК-матрицей. Вместо этого, сразу же позади области, в которой присоединяются рибонуклеотиды, цепь РНК вытесняется и спираль ДНК воссоздается. Таким образом, молекулы РНК, произведенные транскрипцией, сходят с матрицы ДНК в виде одинарных цепей. Кроме того, поскольку они копируются только с ограниченной области ДНК, молекулы РНК намного короче молекул ДНК. Молекула ДНК в хромосоме человека может достигать длины 250 миллионов пар нуклеотидов; напротив, большинство молекул РНК включает не более нескольких тысяч нуклеотидов, а многие значительно короче.

Ферменты, которые выполняют транскрипцию, называют **РНК-полимеразами (RNA-polymerases)**. Подобно ДНК-полимеразе, которая катализирует репликацию ДНК

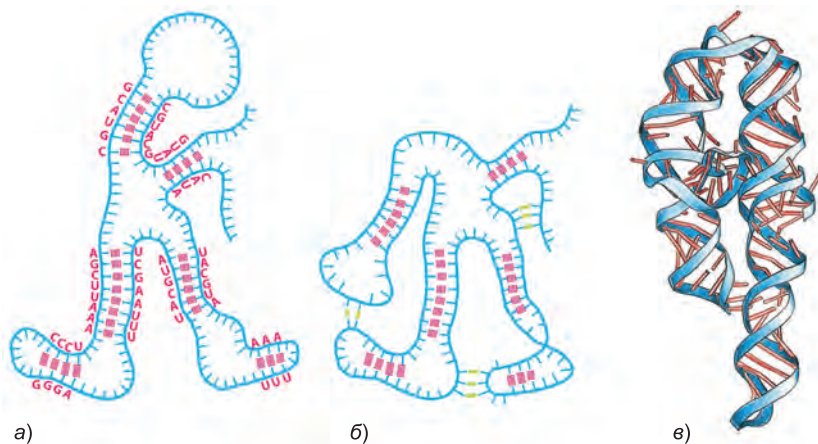
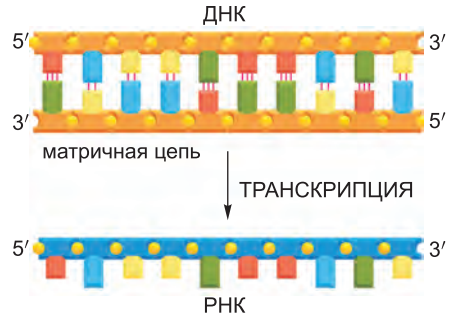


Рис. 6.6. РНК способна сворачиваться с образованием характерных структур. РНК по большей части одноцепочечная, но она часто содержит короткие участки нуклеотидов, которые могут образовывать классические пары оснований с комплементарными последовательностями, находящимися в каком-либо ином месте той же самой молекулы. Такие взаимодействия, наряду с дополнительными взаимодействиями, возникающими между нетрадиционно спаренными основаниями, позволяют молекуле РНК сворачиваться в трехмерную структуру, которая определяется ее нуклеотидной последовательностью. *а)* Схема свернутой структуры РНК, на которой показаны только взаимодействия между классическими парами оснований. *б)* Структура, которая образована взаимодействием как между классически комплементарными основаниями (красные), так и между «нетрадиционными» (зеленые) парами. *в)* Структура нативной РНК: часть интрона группы I (см. рис. 6.3б). Каждая классическая пара оснований обозначена «ступенькой лесенки» в двойной спирали. Основания в других конфигурациях обозначены отдельными перекладинами.

Рис. 6.7. В результате транскрипции ДНК образуется одноцепочечная молекула РНК, комплементарная одной из цепей ДНК.



(мы обсудили это в главе 5), РНК-полимеразы катализируют образование фосфодиэфирных связей, посредством которых нуклеотиды соединяются друг с другом и образуют линейную цепь. РНК-полимераза движется по ДНК скачкообразно, раскручивая спираль ДНК непосредственно перед активным участком полимеризации, с тем чтобы выставить наружу новую область матричной цепи для комплементарного спаривания оснований. Таким вот путем наращиваемая цепь РНК продолжается, нуклеотид за нуклеотидом, в направлении $5' \rightarrow 3'$ (рис. 6.8). Субстратами служат нуклеозидтрифосфаты (АТФ, СТР, УТР и ГТР); как и при репликации ДНК, гидролиз высокоэнергетических связей обеспечивает энергию, необходимую для осуществления реакции в прямом направлении (см. рис. 5.4).

Практически незамедлительное высвобождение цепи РНК с ДНК-матрицы в ходе синтеза означает, что может быть сделано множество копий РНК с одного и того же гена за относительно короткое время, так как синтез следующих молекул РНК начинается прежде, чем первая РНК будет закончена (рис. 6.9). Когда молекулы РНК-полимеразы почти вплотную — буквально по пятам — следуют друг за другом, то каждая из них движется со скоростью около 20 нуклеотидов в секунду (скорость, достигнутая эукариотами) и за один час с одного гена может быть синтезировано более тысячи транскриптов.

Хотя РНК-полимераза катализирует, по сути, ту же химическую реакцию, что и ДНК-полимераза, есть некоторые важные различия между действиями этих двух ферментов. Во-первых, что наиболее очевидно, РНК-полимераза катализирует реакцию присоединения рибонуклеотидов, а не дезоксирибонуклеотидов. Во-вторых, в отличие от ДНК-полимераз, реплицирующих ДНК, РНК-полимеразы способны начинать цепь РНК без заправки. Возможно, это отличие связано с тем, что транскрипция совсем не обязательно должна быть столь же точной, сколь репликация ДНК (см. таблицу 5.1, стр. 271). В отличие от ДНК, РНК не является постоянным хранилищем генетической информации в клетках. РНК-полимеразы делают примерно одну ошибку на каждые 10^4 нуклеотидов, копируемых в РНК-форму (по сравнению с частотой ошибок процесса прямого копирования ДНК-полимеразой — приблизительно одна на 10^7 нуклеотидов), и последствия появления ошибки в ходе транскрипции РНК намного менее значимы, чем таковые при репликации ДНК.

Хотя РНК-полимеразы далеко не так точны, как ДНК-полимеразы, которые реплицируют ДНК, они тем не менее имеют скромный корректирующий механизм. Если к растущей цепи РНК добавляется неправильный рибонуклеотид, то полимераза может отступить назад и активный участок фермента может выполнить реакцию вырезания, которая напоминает реакцию, обратную полимеризации, — за исключением того, что здесь вместо пирофосфата используется вода и высвобождается нуклеозидмонофосфат.

Учитывая, что и ДНК- и РНК-полимеразы осуществляют направляемую матрицей полимеризацию нуклеотидов, можно было бы ожидать, что ферменты этих

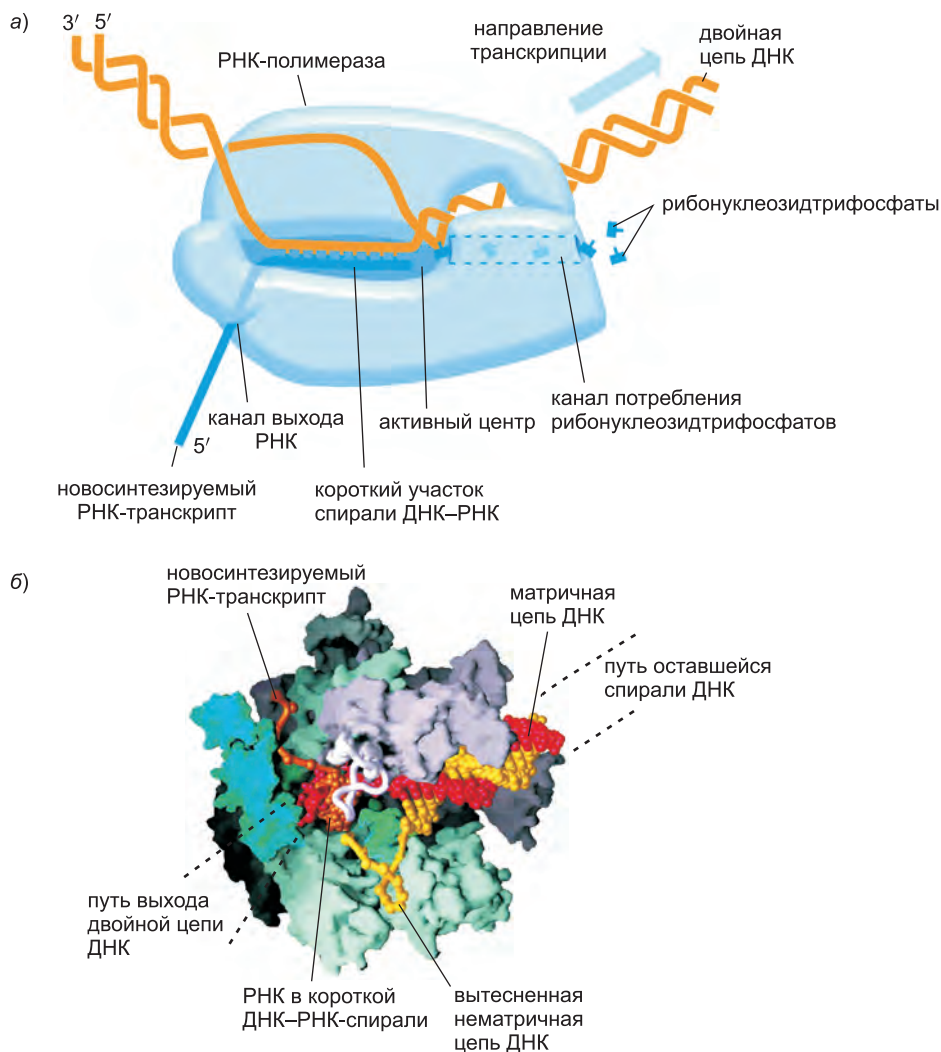


Рис. 6.8. ДНК транскрибируется ферментом РНК-полимеразой. *а)* РНК-полимераза (бледно-голубая) скачкообразно передвигается по ДНК, раскручивая спираль ДНК в своем активном участке. По мере продвижения полимеразы добавляет нуклеотиды (представленные как *маленькие формочки в виде буквы «Т»*) один за другим к цепи РНК на участке полимеризации, используя оголенную нить ДНК в качестве матрицы. Таким образом, РНК-транскрипт представляет собой комплементарную копию одной из двух цепей ДНК. Короткая область спирали ДНК-РНК (приблизительно девять пар нуклеотидов в длину) поэтому формируется лишь на миг, и «окно» спирали ДНК-РНК потому перемещается по ДНК вместе с полимеразой. Нуклеотиды поступают в активный центр в виде рибонуклеозидтрифосфатов (АТР, УТР, СТР и GТР), и энергия, запасенная в их межфосфатных связях, служит движущей силой реакции полимеризации (см. рис. 5.4). *б)* Структура РНК-полимеразы бактерий, определенная методом рентгеновской кристаллографии. Четыре различные субъединицы, обозначенные разными цветами, и составляют эту РНК-полимеразу. Нить ДНК, используемая в качестве матрицы, — *красная*, а нематричная нить — *желтая*. (Изображение *а* переработано на основе рисунка, любезно предоставленного Robert Landick; структура *б* — великодушный шар Seth Darst.)



Рис. 6.9. Транскрипция двух генов, наблюдаемая в электронный микроскоп. На микрофотографии видно множество молекул РНК-полимеразы, одновременно транскрибирующих тот или иной из двух смежных генов. Молекулы РНК-полимеразы выглядят как ряд точек вдоль молекулы ДНК с прикрепленными к ней новосинтезированными транскриптами (тонкие нити). Молекулы РНК (рибосомные РНК), показанные в этом примере, не транслируются в белок, а напрямую используются как компоненты рибосом — машин, на которых происходит трансляция. Частица на 5'-конце (свободном конце) каждого транскрипта рРНК, как полагают, представляет собой зачаток рибосомы. По длинам новосинтезированных транскриптов можно сделать вывод, что молекулы РНК-полимеразы ведут транскрипцию слева направо. (Снимок любезно предоставил Ulrich Scheer.)

двух типов имеют некую структурную аналогию. Однако рентгенокристаллографические исследования ферментов обоих типов показывают, что, кроме наличия определяюще важного иона Mg^{2+} в каталитическом участке, они практически не имеют ничего общего. Действительно, ферменты, осуществляющие направляемую матрицей полимеризацию нуклеотидов, кажется, появились независимо друг от друга во время ранней эволюции клеток. Одна эволюционная линия привела к современным ДНК-полимеразам и обратным транскриптазам, с которыми мы ознакомились в главе 5, а также к нескольким односубъединичным РНК-полимеразам вирусов. Другая линия дала все современные клеточные РНК-полимеразы (**рис. 6.10**), о которых мы говорим в этой главе.

6.1.3. Клетки производят РНК нескольких типов

Большинство генов, заложенных в ДНК клетки, определяет аминокислотную последовательность белков; молекулы РНК, которые копируются с этих генов (и которые в конечном счете направляют синтез белков), называют молекулами **информационной**, или **матричной, РНК (мРНК; messenger RNA)**. Конечным продуктом меньшинства генов, однако, является сама РНК. Тщательный анализ полной последовательности ДНК генома дрожжей *S. cerevisiae* позволил открыть более 750 генов (несколько больше, чем 10% общего числа генов дрожжей), которые производят РНК в качестве своего конечного продукта. Такие молекулы РНК, подобно белкам, служат ферментативными и структурными компонентами в самых разных процессах, протекающих в клетке. В главе 5 мы встретились с одной из таких РНК — матрицей, заключенной в фермент теломеразу. Хотя многие из таких некодирующих РНК все еще хранят свою тайну, мы увидим в этой главе, что молекулы *малой ядерной РНК (snРНК; small nuclear RNA)* направляют сплайсинг пре-мРНК с целью образования мРНК, что молекулы *рибосомной РНК (рРНК)* образуют каркас (core) рибосом и что молекулы *транспортной РНК (тРНК; transfer RNA)* служат адапторами, которые подбирают аминокислоты и

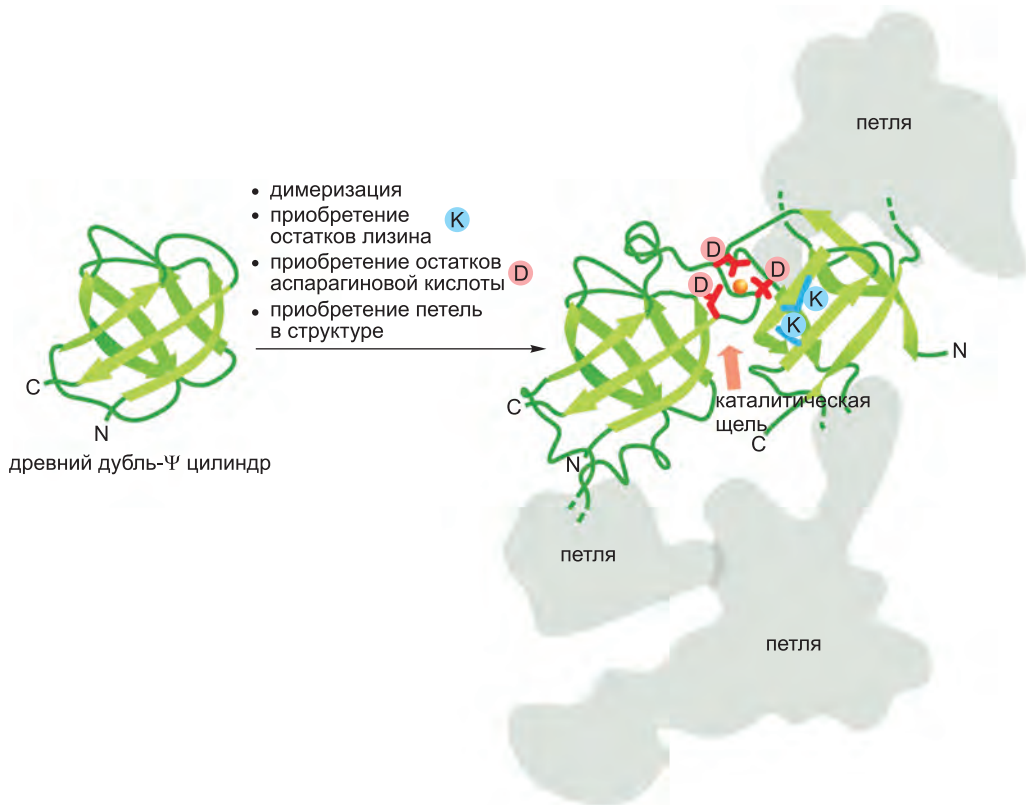


Рис. 6.10. Эволюция современных клеточных РНК-полимераз. Согласно этой гипотезе, РНК-полимеразы эволюционировали от древнего белкового домена, называемого дубль-ψ цилиндром. Определяющие эволюционные этапы, как думают, включают димеризацию домена, вставку больших полипептидных «петель», приобретение двух критически важных лизинов, необходимых для расположения матрицы, и приобретение трех остатков аспарагиновой кислоты, требуемых для связывания иона магния в активном участке. Эта схема изображает эволюцию двух самых больших субъединиц РНК-полимеразы, которые образуют активный участок фермента. Здесь показаны структуры β- и β'-субъединиц фермента *E. coli*, но соответствующие субъединицы фермента эукариот состоят с ними в близком родстве. (Переработано из L. M. Iyer, E. V. Koonin and L. Aravind, *BMC Struct. Biol.* 3: 1, 2003.)

удерживают их в положенном месте на рибосоме для включения в белковую цепь. Наконец, в главе 7 мы увидим, что молекулы *микроРНК* (*miРНК*; *microRNA*) и молекулы *короткой интерферирующей РНК* (*siРНК*; *small interfering RNA*) служат ключевыми регуляторами экспрессии генов эукариот (таблица 6.1).

Каждый транскрибированный сегмент ДНК называют *единицей транскрипции* (*transcription unit*). У эукариот единица транскрипции, как правило, несет информацию только с одного гена и поэтому кодирует либо одну молекулу РНК, либо один-единственный белок (или группу родственных белков, если сплайсинг первичного РНК-транскрипта происходит не одним, а несколькими способами — с получением разных молекул мРНК). У бактерий набор смежных генов часто транскрибируется в виде отдельной единицы; производимая молекула мРНК поэтому несет информацию для нескольких различных белков.

Таблица 6.1. Основные виды РНК, синтезируемые в клетке

ВИД РНК	ФУНКЦИЯ
мРНК	матричные, или информационные, РНК; кодируют белки
рРНК	рибосомные РНК; формируют структурный каркас рибосомы и катализируют синтез белка
тРНК	транспортные РНК; центральные участники процесса синтеза белка, выступающие в качестве адапторов между мРНК и аминокислотами
snРНК	малые ядерные РНК; участвуют во множестве ядерных процессов, включая сплайсинг пре-мРНК
snoРНК	малые ядрышковые РНК; используются для процессинга и химической модификации рРНК
scaРНК	малые РНК Кахаля; используются для модификации snoРНК и snРНК
miРНК	микроРНК; регулируют экспрессию генов, обычно блокируя трансляцию отдельных мРНК
siРНК	малые интерферирующие РНК; выключают экспрессию генов, управляя деградацией отдельных мРНК и образованием компактных хроматиновых структур
другие некодирующие РНК	действуют в различных клеточных процессах, включая синтез теломера, инактивацию X-хромосомы и транспорт белков в ЭР

В целом, РНК составляет несколько процентов сухой массы клетки. Основная доля РНК в клетках представлена рРНК; мРНК составляет лишь 3–5 % от общего содержимого РНК в типичной клетке млекопитающих. Совокупность молекул мРНК состоит из десятков тысяч различных видов, и в каждой клетке имеется в среднем только 10–15 молекул каждого вида мРНК.

6.1.4. Сигналы, закодированные в ДНК, сообщают РНК-полимеразе, где следует начинать и где останавливать транскрипцию

Для точной транскрипции гена РНК-полимераза должна распознать, в каком месте генома начинать и в каком — завершать свою работу. Способ, которым РНК-полимеразы выполняют эти задачи, несколько отличается у бактерий и эукариот. Поскольку эти процессы у бактерий проще, с них мы и начнем наш познавательный вояж.

Инициация транскрипции — особенно важный шаг в экспрессии генов, потому что это главная точка, в которой клетка осуществляет регуляцию в отношении того, какие белки нужно синтезировать и какими темпами. У бактерий основной фермент (кор-фермент) РНК-полимераза представляет собой многосубъединичный комплекс, который синтезирует РНК, используя матрицу ДНК в качестве направляющей. Вспомогательная субъединица, называемая *фактором* σ , соединяется с кор-ферментом и помогает ему в чтении заложенных в ДНК сигналов, которые «сообщают» ему, откуда начинать транскрибирование (рис. 6.11). В совокупности фактор σ и кор-фермент известны под названием **холофермент РНК-полимеразы (RNA polymerase holoenzyme)**; этот комплекс слабо удерживается на бактериальной ДНК при их столкновении друг с другом, и холофермент имеет обыкновение быстро скользить по длинной молекуле ДНК — пока не отделится снова. Однако, когда холофермент полимеразы входит в область двойной спирали ДНК, называемую **промотором (promoter)**, — специфическую последовательность нуклеотидов, отмечающую отправную точку для синтеза РНК, — полимеразы прочно связывается с этой ДНК. Холофермент полимеразы с помощью фактора σ опознает промоторную

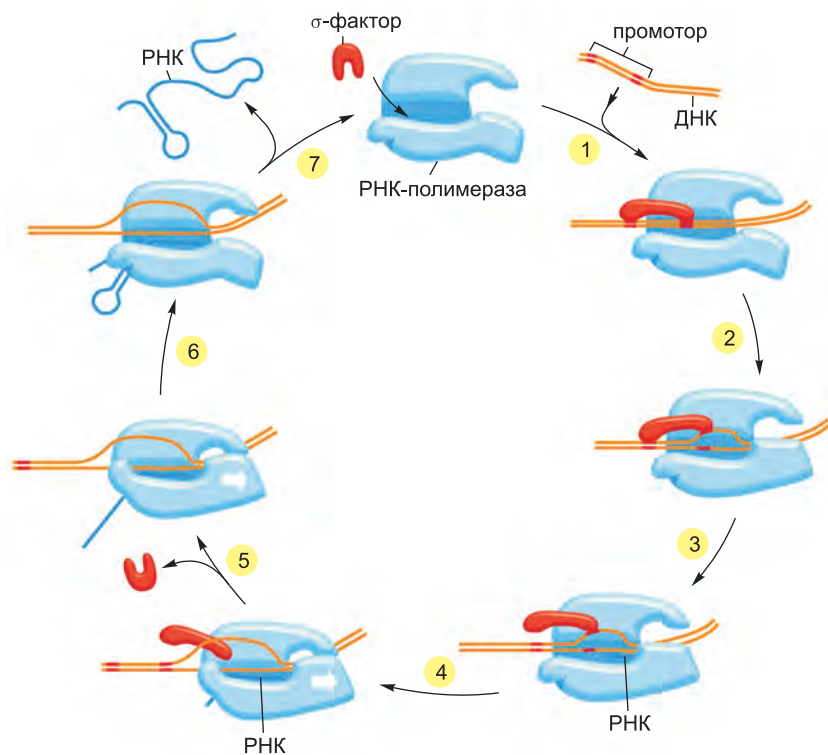


Рис. 6.11. Цикл транскрипции РНК-полимеразы бактерий. На этапе 1 холофермент РНК-полимеразы (кор-фермент полимеразы плюс фактор σ) собирается и затем находит промотор (см. рис. 6.12). Полимераза раскручивает ДНК в той позиции, с которой должна начаться транскрипция (этап 2) и начинает транскрибирование (этап 3). Этот начальный синтез РНК (иногда называемый «абортивная инициация») характеризуется довольно низкой эффективностью. Однако, как только РНК-полимераза синтезирует приблизительно 10 нуклеотидов РНК, она «порывает свои связи» с промотором ДНК и ослабляет, а в конечном счете разрывает свои контакты с фактором σ . Тогда полимераза переключается в режим элонгации (продолжения) синтеза РНК (этап 4), перемещаясь по ДНК (на этой схеме — вправо). Во время режима элонгации (этап 5) РНК-полимераза работает с высокой производительностью, причем она покидает матрицу ДНК и высвобождает новотранскрибированную РНК только тогда, когда ей встречается сигнал терминации (этапы 6 и 7). Сигналы терминации, как правило, закодированы в ДНК, и многие из них функционируют, образуя такую структуру в РНК, которая дестабилизирует связь полимеразы с РНК (этап 7). У бактерий все молекулы РНК синтезируются РНК-полимеразой одного типа, и цикл, изображенный на данном рисунке, поэтому относится как к синтезу молекул мРНК, так и структурных и каталитических РНК. (Переработано на основе рисунка, любезно переданного нам Robert Landick.)

последовательность ДНК, наводя специфические контакты с частями оснований, которые выставлены на внешней стороне спирали (этап 1 на рис. 6.11).

После того как холофермент РНК-полимеразы таким способом прочно свяжется с промотором ДНК, он раскрывает двойную спираль — чтобы выставить короткий участок нуклеотидов на каждой цепи (этап 2 на рис. 6.11). В отличие от реакции ДНК-хеликазы (см. рис. 5.14), такое ограниченное раскрытие спирали не требует энергии гидролиза АТФ. Вместо этого, и полимераза, и ДНК подвергаются обратимым структурным изменениям, которые вводят их в состояние,

энергетически более благоприятное, чем состояние первоначального связывания. В раскрученной ДНК одна из двух открывшихся цепей становится матрицей для комплементарного спаривания оснований поступающих рибонуклеотидов, два из которых соединяются полимеразой друг с другом — чтобы начать цепь РНК (шаг 3 на рис. 6.11). После того как первые десять или около того нуклеотидов РНК будут синтезированы (относительно неэффективный процесс, в течение которого полимеразы синтезируют и отбрасывают короткие олигомеры РНК), кор-фермент разрывает свои взаимодействия с промоторной ДНК, ослабляет свои взаимодействия с фактором σ и начинает перемещаться вперед по ДНК, синтезируя РНК (этапы 4 и 5 на рис. 6.11). Так элонгация цепи продолжается (со скоростью приблизительно 50 нуклеотидов в секунду для бактериальных РНК-полимераз) до тех пор, пока фермент не сталкивается со вторым сигналом на ДНК, стоп-сигналом, который называют **терминатором (terminator)**; будет описан ниже), на котором полимеразы останавливаются и высвобождают как новообразованную цепь РНК, так и матрицу ДНК (этап 7 на рис. 6.11). После того как кор-фермент полимеразы освобождается на терминаторе, он повторно связывается со свободным фактором σ и образует холофермент, который снова может начать процесс транскрипции.

Процесс инициации транскрипции сложен и требует, чтобы холофермент РНК-полимеразы и ДНК претерпели ряд конформационных изменений. Мы можем рассматривать эти изменения как раскрытие ДНК и размещение ее в активном участке, что сопровождается последовательной «утяжкой» фермента вокруг ДНК и РНК, чтобы гарантировать, что он не отделится от них прежде, чем закончит транскрибировать ген. Если РНК-полимераза отделится преждевременно, то она не сможет возобновить синтез, но должна будет начать его снова на промоторе.

Как терминаторы ДНК останавливают элонгацию? Для большинства генов бактерий стоп-сигнал состоит из строки пар нуклеотидов А–Т с предшествующей ей последовательностью ДНК, обладающей двойной симметрией, которая, будучи транскрибирована в РНК, сворачивается в структуру «шпильки» путем уотсон-криковского спаривания оснований (см. рис. 6.11). Когда полимеразы транскрибируют терминатор, то образование шпильки может способствовать «вытягиванию» РНК-транскрипта из активного участка. Гибрид ДНК–РНК в активном участке, который скрепляется в терминаторе преимущественно парами оснований U–A (менее стабильные, чем пары оснований G–C, потому что в них две, а не три водородные связи на пару оснований), недостаточно прочен, чтобы удержать РНК, и поэтому диссоциирует, вызывая освобождение полимеразы от ДНК (этап 7 на рис. 6.11). Таким образом, в некотором отношении при терминации транскрипции, кажется, структурные переходы, которые произошли во время инициации, обращаются вспять. Кроме того, процесс терминации служит примером лейтмотива этой главы: укладка РНК в определенные структуры влияет на многие этапы расшифровки генома.

6.1.5. И сигналы начала транскрипции, и сигналы ее окончания гетерогенны по нуклеотидным последовательностям

Как мы только что убедились, процессы инициации и терминации транскрипции включают в себя сложный ряд структурных переходов в молекулах белка, ДНК и РНК. Зачастую распознавание закодированных в ДНК сигналов, которые задают эти переходы, представляет для исследователей трудную задачу.

Действительно, сравнение множества различных бактериальных промоторов показывает удивительную степень разнообразия. Тем не менее все они содержат родственные последовательности, отражающие отчасти те черты ДНК, которые напрямую распознаются фактором σ . Такие общие особенности часто сводятся в форму *консенсусной последовательности* (consensus nucleotide sequence; **рис. 6.12**).

Консенсусную последовательность нуклеотидов получают путем сравнения множества последовательностей с одинаковой основной функцией и последующего расчета наиболее часто встречающихся нуклеотидов в каждой позиции. Поэтому она служит итоговой, или усредненной, последовательностью для большого числа индивидуальных нуклеотидных последовательностей.

Последовательности ДНК индивидуальных бактериальных промоторов, таким образом, определяют их силу (число событий инициации на данном промоторе в единицу времени). Эволюционные процессы подстроили каждый из них таким образом, чтобы он «запускал» транскрипцию столь часто, сколь это необходимо, и так создали широкий ассортимент промоторов. Промоторы для генов, которые кодируют распространенные белки, намного сильнее, чем приписанные к генам, которые кодируют минорные белки, — и именно в нуклеотидных последовательностях промоторов кроются эти различия.

Подобно бактериальным промоторам, последовательности терминаторов транскрипции также заменяются в широком диапазоне, с потенциалом к формированию простой шпильчатой структуры РНК, что является самой важной их общей особенностью. Так как такой потенциал присущ фактически неограниченному числу нуклеотидных последовательностей, терминаторные последовательности еще более разнообразны, чем промоторные.

Мы обсудили бактериальные промоторы и терминаторы немного подробнее, чтобы проиллюстрировать важный момент, относящийся к анализу последовательностей геномов. Хотя мы многое знаем о бактериальных промоторах и терминаторах и можем строить консенсусные последовательности, которые подытоживают их наиболее яркие особенности, разнообразие их нуклеотидных последовательностей мешает точно определять их местонахождение путем непосредственного анализа нуклеотидной последовательности генома. Еще более трудно определить местонахождение аналогичных последовательностей в геномах эукариот, отчасти из-за «избыточности» ДНК, в них заложенной. Часто нам бывает нужна дополнительная информация, часть которой можно получить при проведении экспериментальных исследований, чтобы определить местонахождение и точно интерпретировать короткие сигналы ДНК, содержащиеся в геномах.

Так как ДНК двухцепочечная, с любого гена, в принципе, могут быть транскрибированы две разные молекулы РНК, если каждую из двух цепей ДНК использовать как матрицу. Однако ген, как правило, имеет только один промотор, и, поскольку нуклеотидная последовательность промотора асимметрична (см. **рис. 6.12**), полимераза может связаться с соответствующим участком ДНК только в одной ориентации. Полимераза синтезирует РНК в направлении $5' \rightarrow 3'$ и может поэтому транскрибировать только одну из цепей, охватываемых геном (**рис. 6.13**). Последовательности геномов показывают, что цепь ДНК, используемая как матрица для синтеза РНК, меняется от гена к гену — в зависимости от местоположения и ориентации промотора (**рис. 6.14**).

Рассмотрев транскрипцию у бактерий, мы теперь обратимся к ситуации в мире эукариот, где синтез молекул РНК происходит намного сложнее.

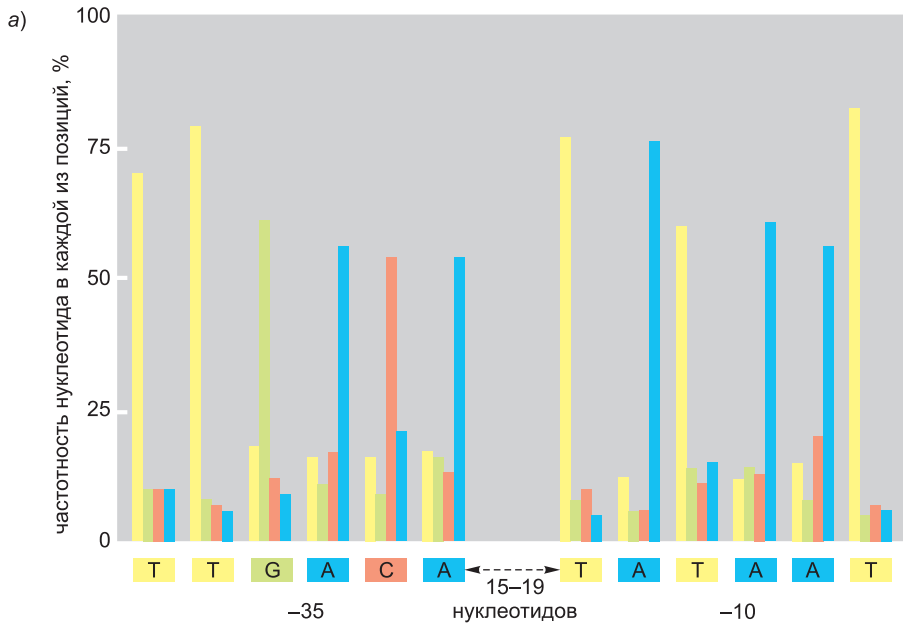
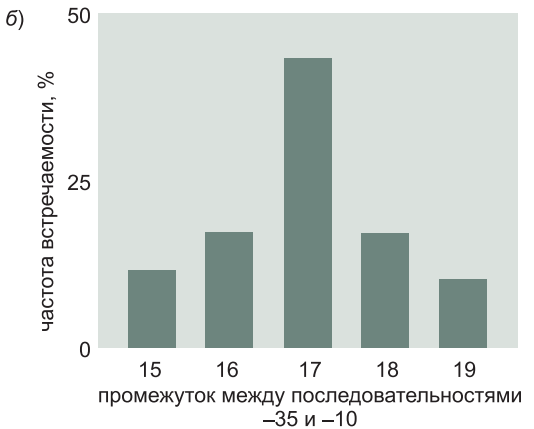


Рис. 6.12. Консенсусная последовательность в основном классе промоторов *E. coli*. а) Данные промоторы характеризуются двумя гексамерными последовательностями ДНК, последовательностью -35 и последовательностью -10, названными так по их приблизительному местоположению относительно точки начала транскрипции (обозначаемой +1).

Для удобства показана последовательность нуклеотидов одинарной цепи ДНК; в действительности РНК-полимераза распознает промотор как двухцепочечную ДНК. На основании сравнения 300 промоторов приведены частоты четырех стандартных нуклеотидов в каждой позиции в гексамерах -35 и -10. Консенсусная последовательность, показанная под диаграммой, отражает самый распространенный нуклеотид, встречающийся в каждой позиции в выборке промоторов. Между последовательностями нуклеотидов в гексамерах -35 и -10 в промоторах существенного подобия не обнаружено. б) Распределение интервала между гексамерами -35 и -10 в промоторах *E. coli*.

Информация, сообщаемая на этих двух диаграммах, относится к промоторам *E. coli*, которые распознаются РНК-полимеразой и основным σ -фактором (обозначаемым σ^{70}). Как мы увидим в следующей главе, бактерии имеют также и минорные, или альтернативные, факторы σ , каждый из которых узнает свою особую промоторную последовательность. Некоторые особенно сильные промоторы, узнаваемые РНК-полимеразой и фактором σ^{70} , имеют дополнительную последовательность, расположенную выше (на этом рисунке — *левее*) гексамера -35 и распознаваемую другой субъединицей РНК-полимеразы.



6.1.6. Инициация транскрипции у эукариот требует множества различных белков

В отличие от бактерий, которые располагают РНК-полимеразой одного типа, в ядрах эукариот встречается три таких фермента: *РНК-полимераза I*, *РНК-*

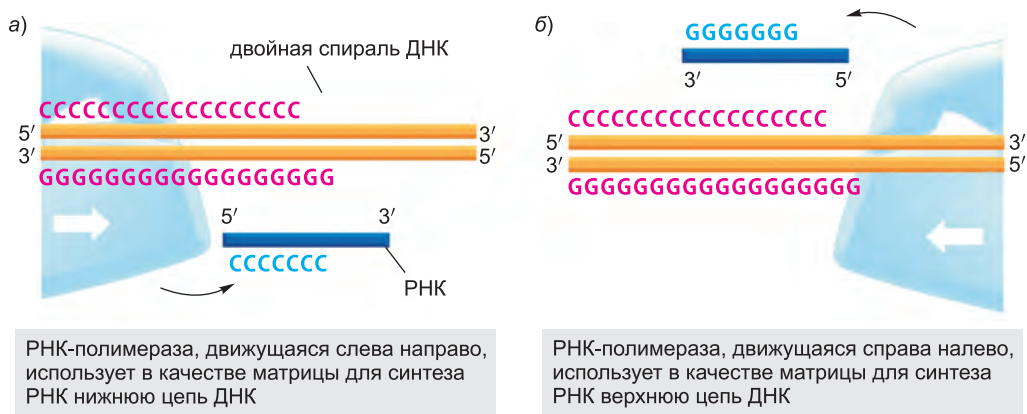


Рис. 6.13. Важность ориентации РНК-полимеразы. Цепь ДНК, служащая матрицей, транскрибируется в направлении $3' \rightarrow 5'$. Таким образом, направление движения РНК-полимеразы определяет, которая из двух нитей ДНК будет служить матрицей для синтеза РНК, как показано на изображениях *а* и *б*. Направление полимеразы, в свою очередь, определяется ориентацией промоторной последовательности — участка, на котором РНК-полимераза начинает транскрипцию.

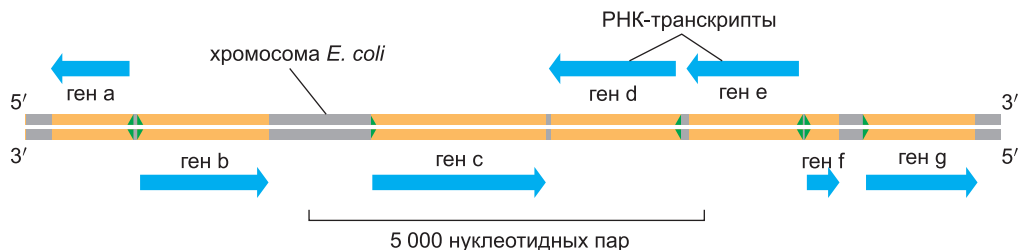


Рис. 6.14. Направления транскрипции на коротком сегменте бактериальной хромосомы. Одни гены транскрибируются с использованием одной цепи ДНК как матрицы, тогда как другие транскрибируются с другой цепи ДНК. Направление транскрипции определяется промотором в начале каждого гена (*зеленые стрелки*). На этой схеме показано приблизительно 0,2% (9 000 пар оснований) хромосомы *E. coli*. Гены, транскрибируемые *слева направо*, используют нижнюю цепь ДНК в качестве матрицы; те же, что транскрибируются *справа налево*, используют в качестве матрицы верхнюю цепь.

полимераза II и *РНК-полимераза III*. Эти три полимеразы структурно подобны друг другу (и ферменту бактерий) и включают в себя некоторые общие субъединицы, но транскрибируют гены разного типа (*таблица 6.2*). РНК-полимеразы I и III транскрибируют гены, кодирующие транспортную РНК, рибосомную РНК и различные малые РНК. РНК-полимераза II транскрибирует большинство генов, включая все те, которые кодируют белки, — и поэтому наше последующее обсуждение будет сосредоточено на этом ферменте.

Хотя РНК-полимераза II эукариот структурно очень похожа на бактериальную РНК-полимеразу (*рис. 6.15*), есть несколько важных различий в способе действия этих ферментов у бактерий и эукариот, два из них мы разберем прямо сейчас:

1. Тогда как при инициации *in vitro* бактериальной РНК-полимеразе требуется только один дополнительный белок (σ -фактор), РНК-полимеразы эукариот

Таблица 6.2. Три типа РНК-полимераз эукариот

ТИП ПОЛИМЕРАЗЫ	ТРАНСКРИБИРУЕМЫЕ ГЕНЫ
РНК-полимераза I	гены 5,8S, 18S и 28S рРНК
РНК-полимераза II	все гены, кодирующие белок, а также гены snoРНК, miРНК, siРНК и большинство генов snРНК
РНК-полимераза III	гены тРНК, 5S РНК, некоторые гены snРНК и гены других малых РНК

Примечание. Молекулы рРНК получают название согласно присущим им значениям величины S, которые отражают скорость их седиментации при ультрацентрифугировании. Чем больше значение S, тем крупнее молекула рРНК.

требуют множества дополнительных белков, в совокупности именуемых *общими (иногда их называют основными) факторами транскрипции*.

2. У эукариот процесс инициации транскрипции обязательно связан с упаковкой ДНК в нуклеосомы и в хроматиновые структуры более высокого порядка — особенности, которых нет в хромосомах бактерий.

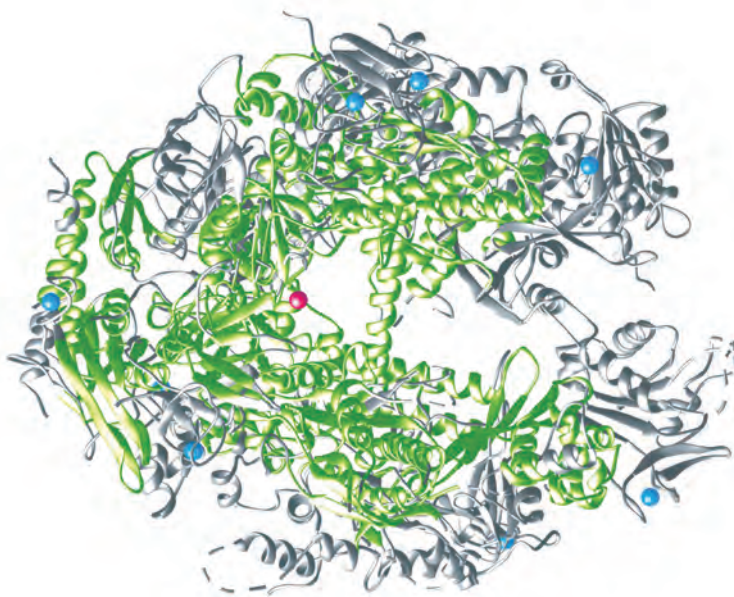


Рис. 6.15. Структурное подобие между РНК-полимеразой бактерий и РНК-полимеразой II эукариот. Области этих двух РНК-полимераз, характеризующиеся подобной структурой, показаны *зеленым*. Полимераза эукариот крупнее, чем фермент бактерий (12 субъединиц вместо 5), и содержит некоторые дополнительные области (отмечены *серым*). *Синие* шарики — атомы цинка, которые служат структурными составляющими полимераз, а *красный* шарик — атом магния, расположенный в активном участке, где и происходит полимеризация (на самом деле ионы цинка и ионы магния). РНК-полимеразы всех современных клеток (бактерий, архей и эукариот) состоят в близком родстве, тем самым свидетельствуя о том, что основные составляющие этого фермента уже были на своем месте до расхождения этих трех главных ветвей древа жизни. (Структура любезно предоставлена Р. Cramer и R. Kornberg.)

6.1.7. Для работы РНК-полимеразы II нужны общие факторы транскрипции

Общие факторы транскрипции (general transcription factors) помогают правильно располагать РНК-полимеразу эукариот на промоторе, содействуют разобщению двух цепей ДНК — чтобы обеспечить место начала транскрипции — и помогают освободить РНК-полимеразу от промотора в режиме элонгации, как только транскрипция началась. Эти белки являются «общими», потому что они необходимы почти что во всех промоторах, используемых РНК-полимеразой II, и входят в набор взаимодействующих белков; они именуются *TFII* (что означает фактор транскрипции для полимеразы II) и обозначаются как TFIIB, TFIID и так далее. В широком смысле, общие факторы транскрипции эукариот выполняют функции, эквивалентные таковым σ -фактора у бактерий; и в самом деле, части TFIIF имеют ту же трехмерную структуру, что и соответствующие части σ .

На **рис. 6.16** показано, как общие факторы транскрипции собираются на промоторах, используемых РНК-полимеразой II, а в **таблице 6.3** подытожены их функции. Процесс сборки начинается, когда общий фактор транскрипции TFIID связывается с короткой двухцепочечной последовательностью ДНК, преимущественно состоящей из нуклеотидов Т и А. По этой причине такая последовательность известна под названием последовательность ТАТА, или **ТАТА-бокс**, а субъединица TFIID, которая узнает ее, была названа TBP (ТАТА-box binding protein; связывающийся с блоком ТАТА белок). ТАТА-бокс обычно расположен на 25 нуклеотидов выше участка начала транскрипции. О начале транскрипции сигнализирует отнюдь не только последовательность ДНК (**рис. 6.17**), но для большинства промоторов полимеразы II именно этот сигнал самый значимый. Связывание TFIID вызывает сильное искажение последовательности ДНК в районе ТАТА-бокса (**рис. 6.18**). Это искажение, как думают, служит физическим ориентиром для определения

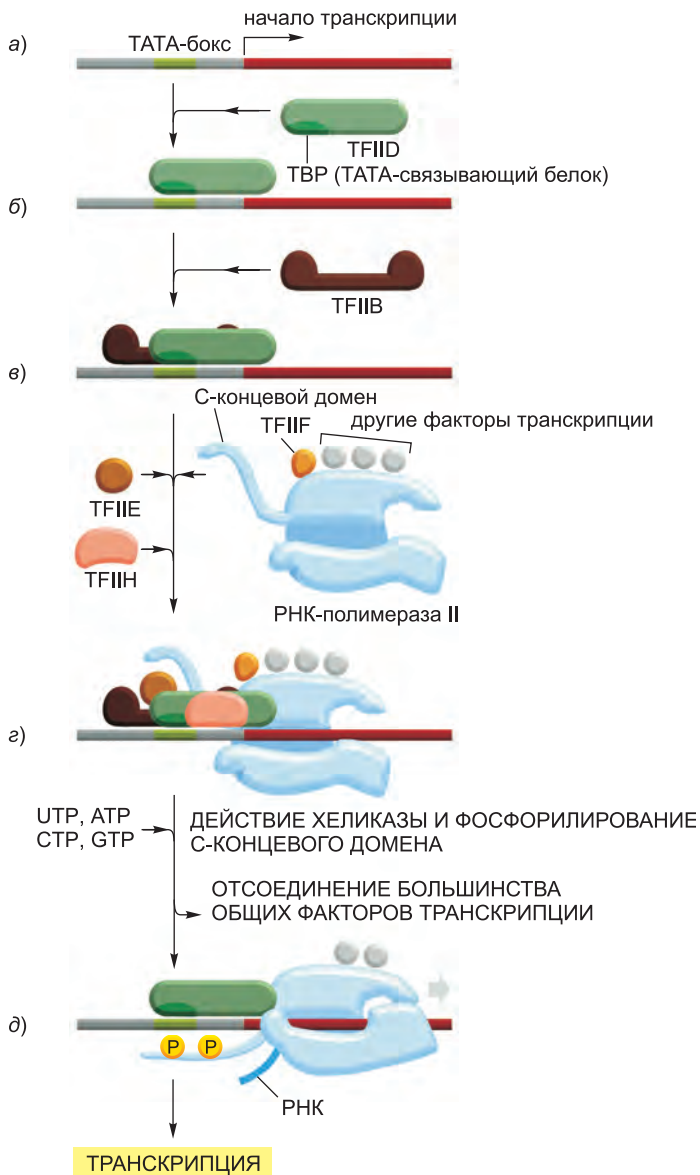
Таблица 6.3. Общие факторы транскрипции, необходимые для ее инициации РНК-полимеразой II эукариот

НАЗВАНИЕ	ЧИСЛО СУБЪЕДИНИЦ	РОЛЬ В ИНИЦИИИ ТРАНСКРИПЦИИ
TFIID		
субъединица TBR	1	распознает ТАТА-бокс
субъединицы TAF	~11	распознает другие последовательности ДНК вокруг точки начала транскрипции; регулирует связывание ДНК с помощью TBR
TFIIB	1	распознает BRE-элемент в промоторах; точно ориентирует РНК-полимеразу на сайт инициации транскрипции
TFIIF	3	стабилизирует взаимодействие РНК-полимеразы с TBR и TFIIB; помогает привлечь TFIIE и TFIIH
TFIIE	2	привлекает и регулирует TFIIH
TFIIH	9	расплетает ДНК в точке начала транскрипции; фосфорилирует Ser5 С-концевого домена РНК-полимеразы; высвобождает РНК-полимеразу с промотора

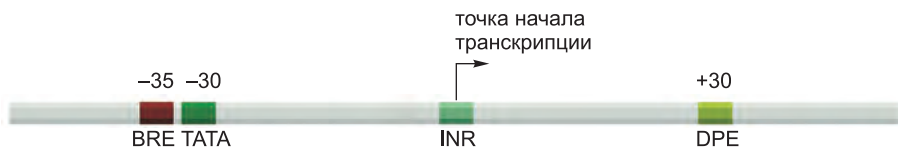
Примечание: TFIID состоит из TBR и примерно 11-ти дополнительных субъединиц, называемых TAFs (TBR-associated factors; связанными с TBR факторы). CTD — С-концевой домен (C-terminal domain).

Рис. 6.16. Инициация транскрипции гена эукариот РНК-полимеразой II.

Чтобы начать транскрипцию, РНК-полимеразе требуется несколько общих факторов транскрипции. *а*) Промотор содержит последовательность ДНК, называемую ТАТА-боксом, которая расположена на расстоянии 25 нуклеотидов от сайта инициации транскрипции. *б*) Через свою субъединицу ТВР TFIIID распознает и связывает ТАТА-боксы, что впоследствии обеспечивает смежное связывание TFIIБ. *в*) Для простоты искажение ДНК, производимое связыванием TFIIID (см. рис. 6.18), не показано. *г*) Остальные общие факторы транскрипции, а также и сама РНК-полимераза, собираются на промоторе. *д*) После этого TFIIН использует АТР, чтобы расклинить двойную спираль ДНК в точке начала транскрипции, локально выставляя наружу матричную нить. Наряду с этим, TFIIН фосфорилирует РНК-полимеразу II, изменяя ее конформацию так, что полимераза освобождается от общих факторов и может начать стадию элонгации транскрипции. Как показано на схеме, участок фосфорилирования представляет собой длинный С-концевым полипептидный хвост, называемый также С-концевым доменом (СТД), который как бы выставлен из молекулы полимеразы. Представленная на рисунке схема сборки составлена по результатам экспериментов, проводимых *in vitro*, и точный порядок, в котором общие факторы транскрипции собираются на промоторах, может изменяться от гена к гену *in vivo*. Общие факторы транскрипции в ходе эволюции сохранили высокую консервативность; некоторые из них, свойственные клеткам человека, могут быть заменены в биохимических экспериментах с соответствующими факторами, присущими простым дрожжам.



местоположения активного промотора в безбрежном пространстве генома, при этом последовательности ДНК с обеих сторон искажения сводятся вместе, чтобы подготовить тем самым площадку для последующих этапов сборки белков. Затем собираются другие факторы, наряду с РНК-полимеразой II, и образуют полноцен-



элемент	консенсусная последовательность	общий фактор транскрипции
BRE	G/C G/C G/A C G C C	TFIIB
TATA	T A T A A/T A A/T	TBP
INR	C/T C/T A N T/A C/T C/T	TFIID
DPE	A/G G A/T C G T G	TFIID

Рис. 6.17. Консенсусные последовательности вблизи точек начала транскрипции РНК-полимеразой II эукариот. Указаны названия консенсусных последовательностей (*первый столбец*) и узнающие их общие факторы транскрипции (*последний столбец*). Буква N обозначает любой нуклеотид, а два нуклеотида, разделенные косой чертой, указывают на равную вероятность нахождения каждого из них в обозначенной позиции. В действительности каждая консенсусная последовательность есть усеченное представление гистограммы наподобие изображенной на рис. 6.12.

Для большинства точек начала транскрипции РНК-полимеразой II присутствуют только две или три из четырех приведенных последовательностей. Например, многие промоторы для полимеразы II содержат последовательность TATA-бокса, но те, у которых ее нет, обычно содержат «сильную» последовательность INR. Хотя в большинстве своем последовательности ДНК, которые влияют на инициацию транскрипции, расположены выше точки начала транскрипции, немногие, такие как показанная на рисунке DPE, локализируются в пределах транскрибируемой области.

ный комплекс инициации транскрипции (transcription initiation complex; см. рис. 6.16). Наиболее сложно организованным общим фактором транскрипции является TFIIN. Состоящий из 9 субъединиц, он почти такого же размера, как сама РНК-полимераза II, и, как мы увидим вскоре, выполняет несколько ферментативных функций, необходимых для инициации транскрипции.

После образования инициаторного комплекса транскрипции на промоторной ДНК РНК-полимераза II должна получить доступ к матричной цепи в точке начала транскрипции. Фактор TFIIN, который содержит ДНК-хеликазу как одну из своих субъединиц, делает этот шаг возможным, гидролизуя АТФ и раскручивая ДНК, и тем самым открывая матричную нить. Затем РНК-полимераза II, подобно бактериальной полимеразе, остается на промоторе и синтезирует короткие отрезки РНК, пока не претерпит ряд конформационных изменений, которые позволяют ей отойти от промотора и вступить в фазу элонгации транскрипции. Ключевой шаг в этом переходе — присоединение фосфатных групп к «хвосту» РНК-полимеразы (известному как CTD, или С-концевой домен). У человека CTD состоит из 52 тандемных 7-аминокислотных повторов и выступает из основной структуры РНК-полимеразы. Во время инициации транскрипции серин, расположенный в пятой позиции повтора (Ser5), фосфорилируется фактором TFIIN, который содержит протеинкиназу в другой из своих субъединиц (см. рис. 6.16, *г* и *д*). Полимераза может теперь отделиться от группы общих факторов транскрипции. В ходе этого

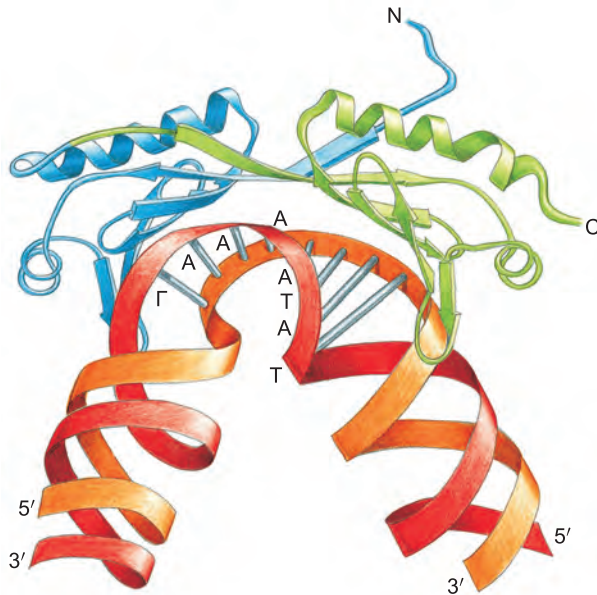


Рис. 6.18. Трехмерная структура ТВР (связывающегося с ТАТА-боксом белка) на связанной им ДНК. ТВР — субъединица общего фактора транскрипции TFIID, которая отвечает за узнавание и связывание последовательности ТАТА-бокса в ДНК (красная). Уникальный изгиб ДНК, вызываемый ТВР, — два перегиба в двойной спирали, разделенных частично раскрученной ДНК, — может служить ориентиром, который помогает привлекать другие общие факторы транскрипции. ТВР представляет собой единичную полипептидную цепь, свернутую в два весьма подобных домена (синий и зеленый). (Переработано на основе J. L. Kim et al., *Nature* 365: 520–527, 1993. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

процесса она претерпевает ряд конформационных изменений, которые усиливают ее взаимодействие с ДНК, и приобретает новые белки, которые позволяют ей транскрибировать длинные последовательности, причем в некоторых случаях — в течение многих часов, не отделяясь от ДНК.

Как только полимеразы II начала элонгацию РНК-транскрипта, большинство общих факторов транскрипции освобождается от ДНК, так что они опять готовы для начала следующего цикла транскрипции с новой молекулой РНК-полимеразы. Как мы увидим вскоре, фосфорилирование хвоста РНК-полимеразы II обеспечивает также и ее «загрузку» компонентами процессирующих РНК машин, т.е. такое размещение этих компонентов, которое удобно для модификации новотранскрибированной РНК по мере ее выхода из полимеразы.

6.1.8. Полимеразе II требуются также активатор, медиатор и модифицирующие хроматин белки

Исследования поведения РНК-полимеразы II и принятых в ее «свиту» общих факторов транскрипции, проведенные в экспериментах *in vitro* на очищенных матрицах ДНК, позволили построить только что описанную модель инициации транскрипции. Однако, как обсуждалось в главе 4, в клетках эукариот ДНК упакована в нуклеосомы, которые, сверх этого, организованы в хроматиновые

структуры более высокого порядка. В результате запуск транскрипции в клетке эукариот более сложен и требует еще большего числа белков, чем при использовании очищенной ДНК. Во-первых, регулирующие экспрессию генов белки, известные как *активаторы транскрипции* (*transcriptional activators*), должны связаться с определенными последовательностями ДНК и помочь привлечь РНК-полимеразу II к точке начала транскрипции (рис. 6.19). Роль активаторов мы обсудим в главе 7, потому что они составляют один из главных инструментов, используемых клеткой для регулирования экспрессии генов. Здесь же мы просто отмечаем, что для инициации транскрипции в эукариотической клетке необходимо их наличие на ДНК. Во-вторых, у эукариот для запуска транскрипции *in vivo* требуется присутствие белкового комплекса, известного как *медиатор*, который позволяет активаторным белкам взаимодействовать должным образом с полимеразой II и с общими факторами транскрипции. Наконец, в эукариотической клетке для инициации транскрипции обычно необходимы локально стянутые модифицирующие хроматин ферменты, в том числе комплексы перестройки хроматина и гистон-модифицирующие ферменты.

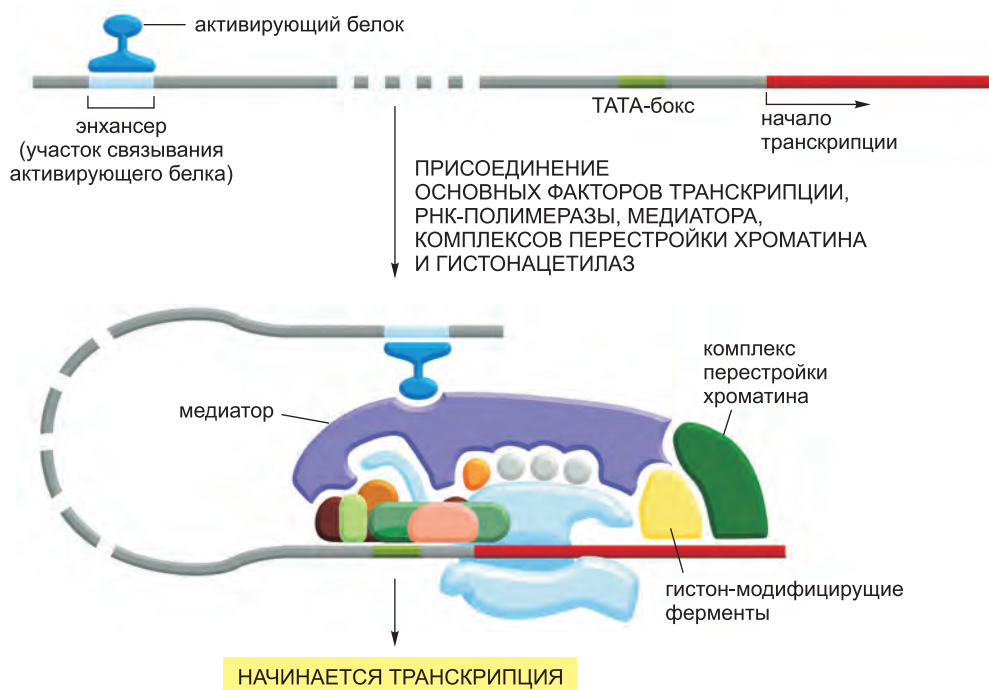


Рис. 6.19. Инициация транскрипции РНК-полимеразой II в ядерной клетке. Инициация транскрипции *in vivo* требует присутствия белков-активаторов транскрипции. Как описано в главе 7, эти белки связываются с определенными короткими последовательностями ДНК. Хотя на схеме показан только один активаторный белок, в случае типичного гена эукариот их много: все вместе они определяют скорость и профиль транскрипции гена. Иногда действуя на расстоянии нескольких тысяч пар нуклеотидов (обозначены штриховой полосой), такие регуляторные белки помогают РНК-полимеразе, общим факторам транскрипции и медиатору собраться на промоторе. Вдобавок к этому активаторы привлекают АТФ-зависимые комплексы перестройки хроматина и гистонацетилазы. Как было сказано в главе 4, установленное «по умолчанию» состояние хроматина — вероятно, 30-нм филаменты (см. рис. 4.22); и это, скорее всего, та форма ДНК, на которой начинается транскрипция. Для простоты она не показана на рисунке.

Как обсуждалось в главе 4, ферменты обоих типов делают ДНК, находящуюся в хроматине, более доступной и тем самым облегчают сборку на ДНК машины инициации транскрипции. В главе 7 мы еще вернемся к роли этих ферментов в инициации транскрипции.

Как показано на рис. 6.19, большое число белков (много более 100 отдельных субъединиц) должно собраться в точке начала транскрипции, чтобы запустить ее в клетке эукариот. Порядок сборки этих белков, кажется, не следует по предписанному пути; скорее, он отличается от гена к гену. И в самом деле, некоторые из этих разных белковых комплексов могут взаимодействовать друг с другом вдали от ДНК и устанавливаться на ДНК в виде предварительно собранных субансамблей. Чтобы начать транскрибирование, РНК-полимераза II должна высвободиться из этого большого комплекса белков; в дополнение к тем этапам, которые описаны на рис. 6.16, еще часто требуется протеолиз белка-активатора *in situ*. Мы вернемся к некоторым из этих вопросов в главе 7, когда будем обсуждать, как клетки эукариот могут регулировать процесс инициации транскрипции.

6.1.9. В ходе элонгации транскрипции в молекуле ДНК возникает напряжение, обусловленное ее свехспирализацией

Лишь только начав транскрипцию, РНК-полимераза не скользит плавно по молекуле ДНК: скорее, она перемещается рывками, делая паузу на одних последовательностях и быстро транскрибируя другие. Занятые продолжением цепей РНК-полимеразы, как бактерий, так и эукариот, связаны с рядом *факторов элонгации* — белков, которые уменьшают вероятность того, что РНК-полимераза отделится прежде, чем достигнет конца гена. Эти факторы обычно связываются с РНК-полимеразой вскоре после инициации транскрипции и помогают полимеразам продвигаться по самым разным последовательностям ДНК — по всем, которые встречаются в генах. По мере своего продвижения по матрице ДНК РНК-полимеразы эукариот должны также преодолевать еще одно препятствие — структуру хроматина; и им, как правило, содействуют АТФ-зависимые комплексы перестройки хроматина (см. **стр. 215–216**). Такие комплексы могут двигаться вместе с полимеразой или могут просто «отыскивать и выручать» случайно застопоренную полимеразу. Вдобавок к этому некоторые факторы элонгации, связанные с РНК-полимеразой эукариот, облегчают транскрипцию через нуклеосомы, не требуя для этого дополнительной энергии. Еще не совсем понятно, как им этого удается, но такие белки могут кратковременно вытеснять димеры H2A-H2B из стержня нуклеосомы, заставляя их, пока полимеразы проходят через данную нуклеосому.

Есть еще одно препятствие для элонгирующих полимераз, как бактериальных, так и эукариотических. Перед тем как обсудить эту проблему, мы должны сначала рассмотреть хитрое свойство, характерное для двойной спирали ДНК и названное **свехспирализацией ДНК (DNA supercoiling)**. Свехспирализация ДНК представляет собой конформацию, которую ДНК принимает в ответ на свехспиральное натяжение; и наоборот, формирование различных петель или суперспиралей в дуплексе ДНК может создать такое напряжение. На **рис. 6.20** представлены топологические аспекты свехспирализации ДНК. На каждый оборот в двойной спирали ДНК приходится примерно 10 пар нуклеотидов. Представим спираль, оба конца которой закреплены друг относительно друга (как это имеет место в кольце ДНК, например, бактериальной хромосомы или в сильно затянутой петле, в каковой

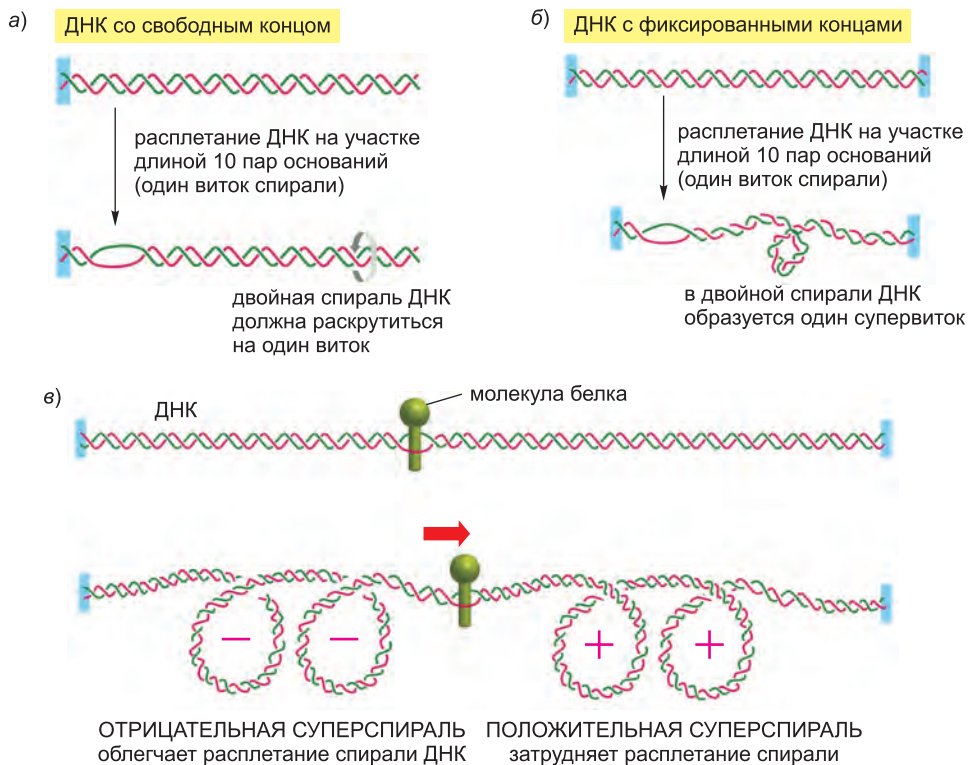


Рис. 6.20. Сверхспиральное натяжение в ДНК вызывает скручивание ДНК в суперспираль. а) В случае молекулы ДНК с одним свободным концом (или надрывом в одной нити и шарниром в другой) двойная спираль ДНК закручивается на один оборот на каждые 10 пар открывающихся нуклеотидов. б) Если вращению что-либо препятствует, то в ДНК вносится сверхспиральное натяжение из-за раскрытия спирали. Один из способов аккомодации этого натяжения состоял бы в том, чтобы увеличить винтовой шаг с 10 до 11 пар нуклеотидов на виток в остающейся двойной спирали; однако спираль ДНК сопротивляется такой деформации подобно пружине и предпочитает снимать сверхспиральное натяжение, закручиваясь в суперспиральные петли. В результате одна суперспираль ДНК образуется в двойной спирали ДНК на каждые 10 пар открываемых нуклеотидов. Сверхспираль, образованная в этом случае, — положительная суперспираль. в) Суперспирализация ДНК вызвана прохождением белка через двойную спираль ДНК. Два конца ДНК, показанные здесь, не способны вращаться свободно друг относительно друга, а молекула белка тоже, согласно нашему допущению, не может свободно вращаться наряду со своим перемещением. При таких условиях движение белка обуславливает накопление избыточных витков в спирали ДНК впереди белка и их дефицит позади, как это показано на рисунке.

форме, как думают, она существует в хромосомах эукариот). В таком случае раскручивание каждых 10 пар нуклеотидов будет компенсироваться формированием одного большого супервитка ДНК. Формирование такой сверхспирали энергетически благоприятно, потому что оно восстанавливает нормальный шаг двойной спирали в остающихся спаренных основаниями областях, которые иначе должны были бы сжаться из-за закрепленных концов.

РНК-полимераза также создает сверхспиральное натяжение, когда она движется по отрезку ДНК, который закреплен по концам (см. рис. 6.20, в). Поскольку движущаяся полимераза не может быстро вращаться (и такое вращение неправдо-

подобно в силу размера РНК-полимераз и присоединенных к ним транскриптов), потому она создает положительное сверхспиральное натяжение в ДНК перед собой и отрицательное винтовое натяжение позади себя. Эукариотам эта ситуация, как думают, дает определенное преимущество: положительное сверхспиральное натяжение перед полимеразой затрудняет раскрытие спирали ДНК, но такое натяжение должно облегчать распаковывание ДНК в нуклеосомах, поскольку освобождение ДНК от гистонового стержня помогает снять положительное сверхспиральное натяжение.

Любой белок, который продвигается по цепи ДНК в двойной спирали, как правило, создает сверхспиральное натяжение. У эукариот ферменты ДНК-топоизомеразы быстро устраняют такое сверхспиральное натяжение (см. **стр. 278**). Но у бактерий специализированная топоизомераза, называемая *ДНК-гиразой*, подпитываясь энергией гидролиза АТФ, непрерывно переводит сверхспирали в спирали ДНК и тем самым поддерживает постоянство натяжения ДНК. Это *отрицательные сверхспирали* — в них направление намотки обратно тому, которое возникает при *положительной сверхспирализации*, которая формируется при раскрытии (расплетании) любой области спирали ДНК (см. рис. 6.20, б). Всякий раз, когда в бактериальной ДНК расплетается какая-либо область спирали, отрицательная сверхспирализация ДНК снимается, снижая сверхспиральное натяжение. ДНК-гираза, следовательно, делает раскрытие спирали ДНК у бактерий энергетически благоприятным по сравнению с раскрытием спирали ДНК в отсутствие свехскрученности. По этой причине ДНК-гираза обычно облегчает те генетические процессы у бактерий — в том числе и инициацию транскрипции бактериальной РНК-полимеразой, — которые требуют раскрытия спирали (см. рис. 6.11).

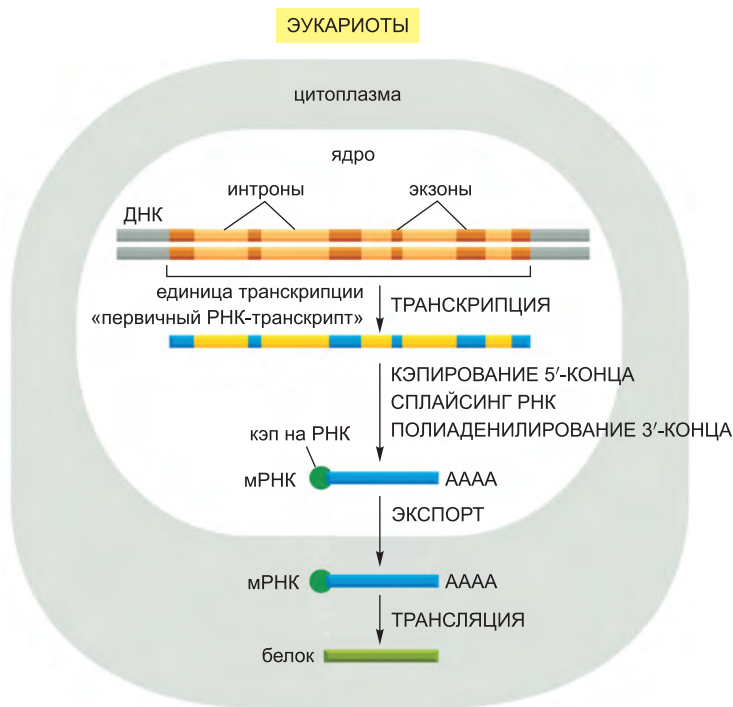
6.1.10. У эукариот элонгация транскрипции тесно связана с созреванием РНК

Как мы могли убедиться, молекулы бактериальной мРНК синтезируются исключительно путем пуска и остановки РНК-полимеразы в определенных местах генома. У эукариот ситуация совершенно иная. В частности, транскрипция есть только первый из нескольких этапов, необходимых для получения мРНК. Другие ключевые этапы — ковалентная модификация концов РНК и удаление *интронных последовательностей* (*intron sequences*), которые изымаются из внутренних областей РНК-транскрипта в ходе процесса *сплайсинга РНК* (*RNA splicing*; **рис. 6.21**).

У эукариот модифицируются оба конца молекул мРНК: *кэпированием* (*capping*) 5'-конца и *полиаденилированием* (*polyadenylation*) 3'-конца (**рис. 6.22**). Такие «специальные» концы позволяют клетке оценивать, присутствуют ли оба конца молекулы мРНК (и записанная информация поэтому целостна), прежде чем она экспортирует последовательность РНК из ядра и транслирует ее в белок. Сплайсинг РНК соединяет друг с другом различные части кодирующей белок последовательности и наделяет высшие эукариоты способностью синтезировать несколько различных белков с одного и того же гена.

Искусный механизм сопрягает все вышеназванные этапы процессинга РНК с элонгацией транскрипции. Как было упомянуто ранее, ключевой шаг в инициации транскрипции РНК-полимеразой II — фосфорилирование хвоста РНК-полимеразы II, названного СТД (С-концевой домен). Это фосфорилирование осу-

а)



б)

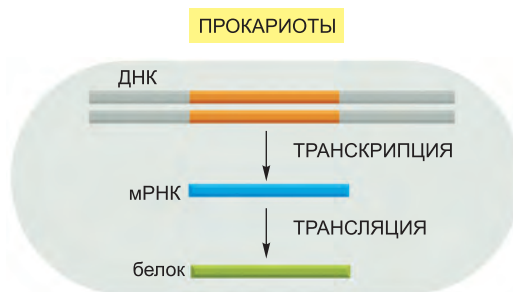


Рис. 6.21. Краткий обзор этапов пути «от гена к белку» у эукариот и бактерий. Конечный уровень белка в клетке зависит от эффективности каждого этапа и от скорости деградации молекул белка и РНК. *а)* В клетках эукариот молекула РНК, полученная в ходе транскрипции, содержит как кодирующие (экзоны), так и некодирующие (интроны) последовательности. Прежде чем РНК может быть транслирована в белок, оба ее конца модифицируются, интроны «изымаются» посредством ферментативно катализируемой реакции сплайсинга РНК и получающаяся в результате мРНК переносится из ядра в цитоплазму. Хотя на этом рисунке этапы процессинга РНК изображены как следующие друг за другом, в порядке очереди, в действительности они могут происходить одновременно. Например, присоединение РНК-кэпа и сплайсинг обычно начинаются до завершения транскрипции. Из-за сопряжения между транскрипцией и процессингом РНК первичные транскрипты — молекулы РНК, которые теоретически производились бы, если бы не было процессинга, — обнаруживаются очень редко. *б)* У прокариот производство мРНК намного проще. 5'-конец молекулы мРНК синтезируется в ходе инициации транскрипции, а 3'-конец — в ходе терминации. Поскольку клетки прокариот не имеют ядра, транскрипция и трансляция происходят в общей полости. Фактически трансляция бактериальной мРНК часто начинается до завершения ее синтеза.

существляется постепенно, по мере того как РНК-полимераза начинает транскрипцию и продвигается по ДНК. Оно не только помогает РНК-полимеразе II отделиться от других белков, находящихся в точке начала транскрипции, но также и позволяет

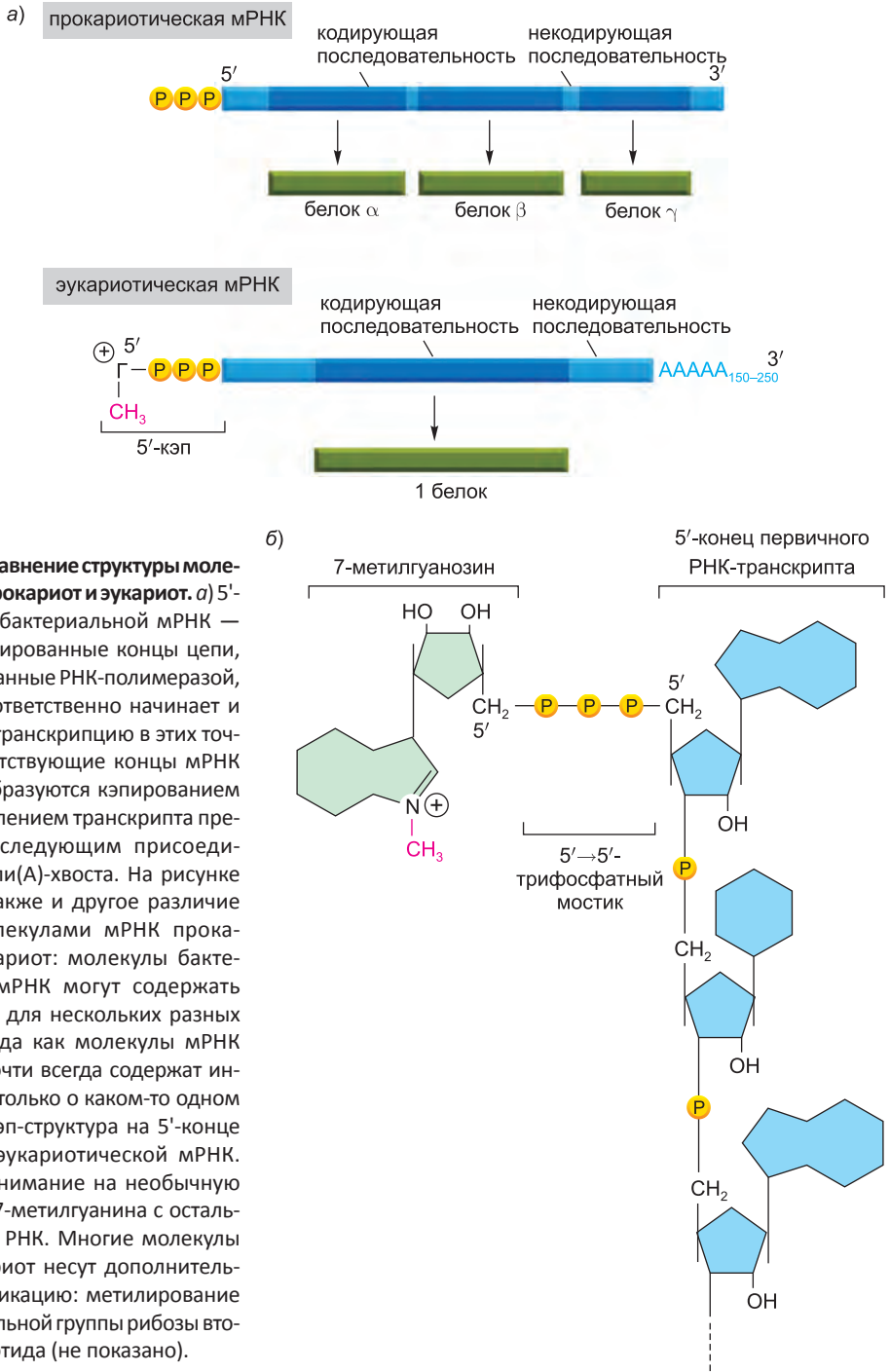


Рис. 6.22. Сравнение структуры молекул мРНК прокариот и эукариот. а) 5'- и 3'-концы бактериальной мРНК — немодифицированные концы цепи, синтезированные РНК-полимеразой, которая соответственно начинает и завершает транскрипцию в этих точках. Соответствующие концы мРНК эукариот образуются экпированием 5' и расщеплением транскрипта премРНК с последующим присоединением поли(А)-хвоста. На рисунке показано также и другое различие между молекулами мРНК прокариот и эукариот: молекулы бактериальной мРНК могут содержать инструкции для нескольких разных белков, тогда как молекулы мРНК эукариот почти всегда содержат информацию только о каком-то одном белке. б) Кэп-структура на 5'-конце молекулы эукариотической мРНК. Обратите внимание на необычную 5'→5' связь 7-метилгуанина с остальной частью РНК. Многие молекулы мРНК эукариот несут дополнительную модификацию: метилирование 2'-гидроксильной группы рибозы второго нуклеотида (не показано).

новому набору белков связываться с хвостом РНК-полимеразы, чтобы выполнить свои функции во время элонгации транскрипции и созревания РНК. Как будет сказано далее, некоторые из таких белков процессинга, кажется, «перепрыгивают» с хвоста полимеразы на появляющуюся молекулу РНК, чтобы начать ее «обработку», как только она появится из РНК-полимеразы. Таким образом, мы можем рассматривать РНК-полимеразу II, работающую в режиме элонгации, как фабрику РНК, которая и транскрибирует ДНК в РНК, и процессирует РНК, которую производит (рис. 6.23). Полностью вытянутый STD почти в 10 раз длиннее, чем остальная часть РНК-полимеразы, и, по сути, он служит привязью, удерживающей поблизости «свору» разношерстных белков, пока они не будут пущены в дело. Именно эта стратегия — увеличения скорости последовательных реакций — обычно наблюдается в клетке (см. рис. 4.69 и 16.38).

6.1.11. Первая модификация пре-мРНК эукариот — кэпирование РНК

Как только РНК-полимераза II произвела приблизительно 25 нуклеотидов РНК, 5'-конец новой молекулы РНК модифицируется путем присоединения кэп-

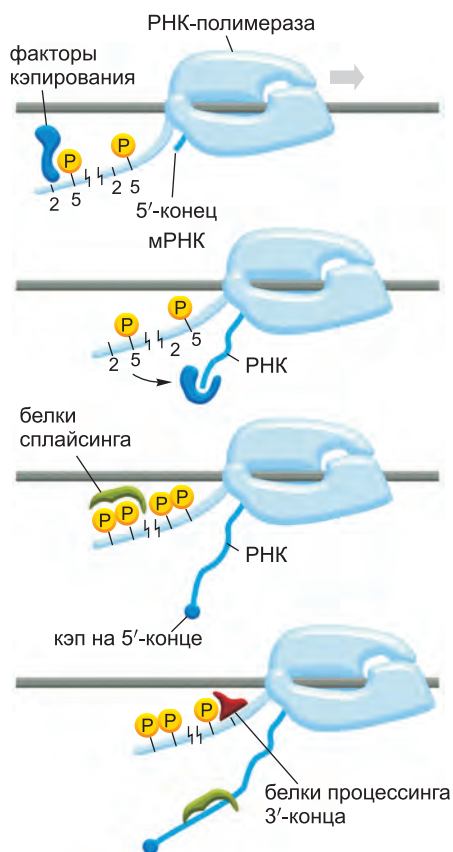


Рис. 6.23. РНК-полимераза II эукариот как «фабрика РНК». Поскольку полимераза транскрибирует ДНК в РНК, она несет на своем хвосте белки, процессирующие пре-мРНК, которые переносятся в надлежащее время на появляющуюся РНК. Хвост, известный как STD, содержит 52 tandemных повтора 7-аминокислотной последовательности (52 гептаповтора); в каждом из повторов есть два серина. Белки, кэпирующие РНК, сначала связываются с хвостом РНК-полимеразы, когда она фосфорилируется по серину 5 гептаповтора на поздней стадии процесса инициации транскрипции (см. рис. 6.16). Эта стратегия гарантирует эффективность кэпирования 5'-конца молекулы РНК, выходящей из РНК-полимеразы. По мере того как полимераза продолжает транскрибировать, ее хвост интенсивно фосфорилируется в позициях серина 2 киназой, связанной с пребывающей в режиме элонгации полимеразой, и в конечном счете дефосфорилируется в позициях серина 5. Эти более поздние модификации привлекают к движущейся полимеразе белки, осуществляющие сплайсинг и процессинг 3'-конца РНК, а размещаются они так, чтобы воздействовать на новосинтезированную РНК — как только она появится из РНК-полимеразы. Существует много ферментов процессинга РНК, и не все они сопутствуют полимеразе. При сплайсинге РНК, например, хвост несет только несколько важнейших компонентов; будучи перенесены на молекулу РНК, они служат очагом зародышеобразования для остальных компонентов. Когда РНК-полимераза II завершает транскрипцию гена, она освобождается от ДНК, растворимые фосфатазы удаляют с ее хвоста фосфаты, и она может снова начать транскрипцию. Начать синтез РНК на промоторе может только дефосфорилированная форма РНК-полимеразы II.

структуры, которая представляет собой модифицированный нуклеотид гуанина (см. рис. 6.22, б). Реакцию кэпирования выполняют три фермента, действующие последовательно один за другим: один (фосфатаза) удаляет фосфат с 5'-конца новосинтезированной РНК, другой (гуанилтрансфераза) присоединяет GMP при помощи обратной связи (5'-5' вместо 5'-3') и третий (метилтрансфераза) присоединяет метильную группу к этому гуанозину (рис. 6.24). Поскольку все три фермента связываются с хвостом РНК-полимеразы, фосфорилированным в позиции серина 5 (модификация, осуществленная фактором TFIIH во время инициации транскрипции), постольку они готовы модифицировать 5'-конец возникающего транскрипта, как только он появляется из полимеразы.

5'-метил-кэп помечает 5'-конец молекул мРНК эукариот, и этот ориентир помогает клетке отличать молекулы мРНК от молекул РНК других типов, находящихся в клетке. Например, РНК-транскрипты РНК-полимераз I и III «не увенчаны» кэп-структурами отчасти потому, что этим полимеразам недостает STD. В ядре кэп связан с белковым комплексом, называемым СВР (cap-binding protein; кэп-связывающий комплекс), который, как мы обсудим в последующих пунктах, обеспечивает должный процессинг и надлежащий экспорт РНК. 5'-метил-кэп играет важную роль также и при трансляции молекул мРНК в цитозоле, о чем мы поговорим ближе к концу этой главы.

6.1.12. В ходе сплайсинга из недавно транскрибированной пре-мРНК удаляются последовательности интронов

Как сообщалось в главе 4, кодирующие белок последовательности генов эукариот обычно прерываются вклинивающимися некодирующими последовательностями (интронами). Открытая в 1977 г., эта особенность генов эукариот вызвала удивление у ученых, которые до того времени были знакомы лишь с бактериальными генами, обычно состоящими из непрерывного сегмента кодирующей ДНК, непосредственно транскрибируемого в мРНК. В отличие от них, гены эукариот, как было обнаружено, разбиты на маленькие части кодирующей последовательности — *экспрессируемые последовательности*, или **экзоны (exons)**, — прерываемые намного более длинными *вклинивающимися последовательностями*,

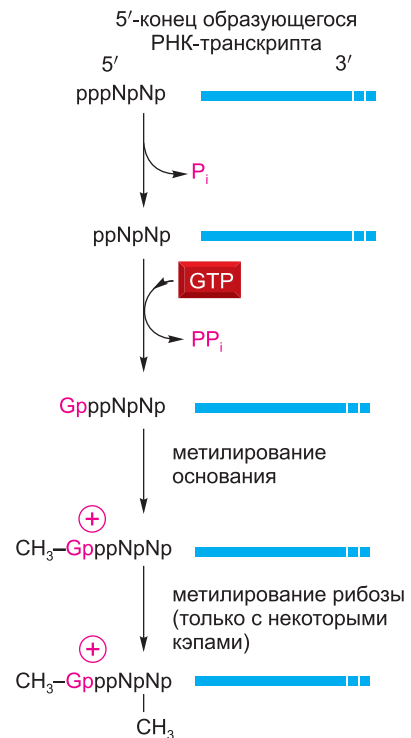


Рис. 6.24. Реакции, которые приводят к образованию кэп-структуры на 5'-конце каждой молекулы РНК, синтезированной РНК-полимеразой II. В своей окончательной форме кэп содержит новую 5'-5' связь между положительно заряженным остатком 7-метилG и 5'-концом РНК-транскрипта (см. рис. 6.22, б). Буква N обозначает любой из четырех рибонуклеотидов, хотя нуклеотид, с которого начинается цепь РНК, обычно представлен пурином (А или G). (Составлено на основании А. J. Shatkin, *BioEssays* 7: 275–277, 1987. С любезного разрешения ICSU Press.)

или **интронами (introns)**; таким образом, кодирующая часть гена эукариот часто составляет лишь малую долю полной длины гена (**рис. 6.25**).

В РНК транскрибируются и последовательности интронов, и последовательности экзонов. Последовательности интронов удаляются из новосинтезированной РНК в ходе процесса «сращивания», или **сплайсинга, РНК (RNA splicing)**. По большей части сплайсинг РНК, происходящий в клетках, направлен на производство мРНК, и наше обсуждение этого процесса сосредоточено на этом так называемом сплайсинге молекулы мРНК-предшественника (или пре-мРНК). Только после процессинга 5'- и 3'-концов и сплайсинга такую РНК можно назвать мРНК.

В ходе каждого события сплайсинга удаляется один интрон, проходя через две последовательные реакции переноса фосфорила, известные под названием реакции трансэтерификации; при удалении интрона два экзона соединены им наподобие «лассо» (**рис. 6.26**). Так как число высокоэнергетических фосфатных связей остается неизменным, эти реакции могли бы, в принципе, протекать и без гидролиза нуклеозидтрифосфата. Однако машина, которая катализирует сращивание пре-мРНК, сложна: состоит из 5 вспомогательных молекул РНК и не менее 200 белков и гидролизует много молекул АТФ за одно событие сплайсинга. Такое дополнительное усложнение ситуации гарантирует, что сплайсинг будет точным и в то же время достаточно гибким для того, чтобы «справиться» с огромным разнообразием интронов, встречающихся в типичной эукариотической клетке.

Может показаться, что удалять большое число интронов в ходе сплайсинга РНК расточительно. В попытке объяснить, почему это происходит, ученые обратили внимание на то, что взаимное расположение интронов и экзонов, по всей видимости, способствовало появлению новых и полезных белков по временной шкале эволюции. Так, благодаря присутствию многочисленных интронов в ДНК при генетической рекомбинации удается легко сочетать экзоны разных генов (см.

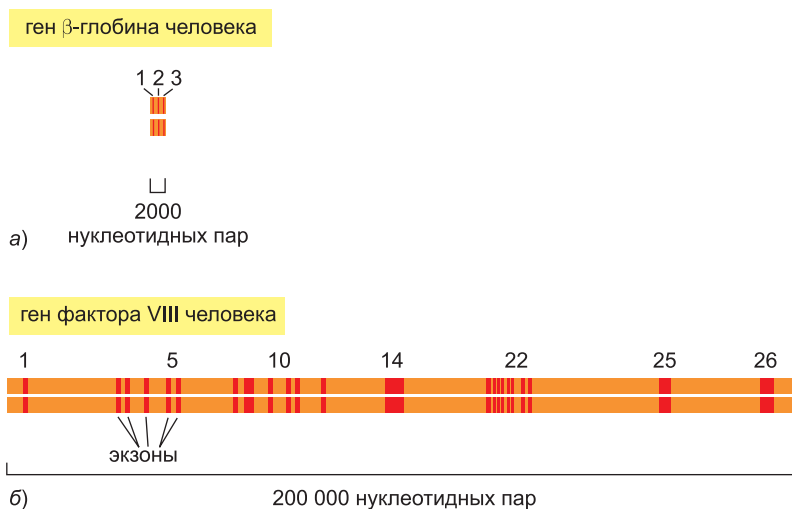


Рис. 6.25. Структура двух генов человека, показывающая взаимное расположение экзонов и интронов. а) Относительно маленький ген β-глобина, который кодирует одну из субъединиц переносящего кислород белка гемоглобина, содержит 3 экзона (см. также рис. 4.7). б) Намного более крупный ген фактора VIII содержит 26 экзонов; он кодирует белок (Фактор VIII), который играет определенную роль в процессе свертывания крови. Самая распространенная форма гемофилии обусловлена мутациями в этом гене.

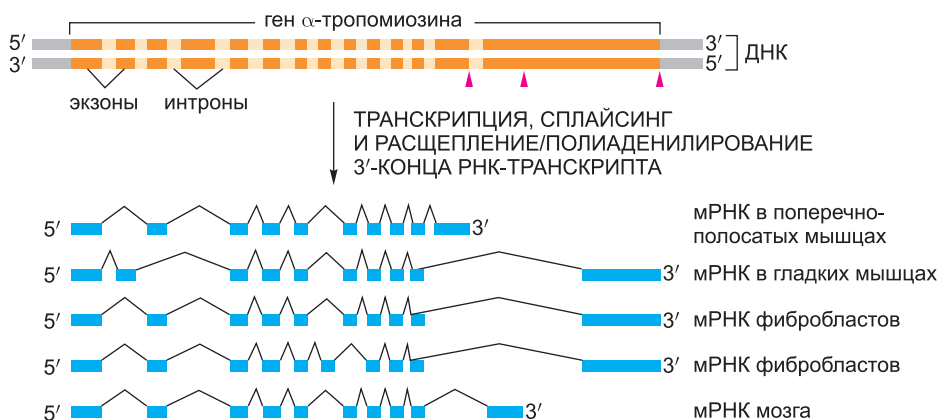


Рис. 6.27. Альтернативный сплайсинг гена α -тропомиозина крысы. α -тропомиозин представляет собой суперспирализованный белок (см. рис. 3.9), который регулирует сокращение в мышечных клетках. Первичный транскрипт может быть сплайсирован различными способами, как показано на рисунке, и дать разные молекулы мРНК, которые затем приведут к разным вариантам белка. Некоторые схемы сплайсинга являются специфическими для определенных типов клеток. Например, α -тропомиозин, синтезируемый в поперечнополосатой мышечной ткани, отличается от того, который синтезируется с того же гена в гладкой мускулатуре. Красными стрелками в верхней части рисунка отмечены те участки, где происходит расщепление и присоединение поли-А с формированием 3'-концов зрелых молекул мРНК.

кодирующий потенциал своих геномов. К этой идее мы будем снова возвращаться в этой главе и в следующей, но сначала нам нужно описать клеточные машины, которые выполняют эту фантастическую задачу.

6.1.13. Последовательности нуклеотидов сигнализируют о том, где происходит сплайсинг

Механизм сплайсинга пре-мРНК, представленный на рис. 6.26, подразумевает, что сплайсинговая машина должна распознавать три части молекулы РНК-предшественника: 5'-сайт сплайсинга, 3'-сайт сплайсинга и точку ветвления в последовательности интрона, которая формирует основу вырезаемого «лассо». Не удивительно, что каждый участок имеет консенсусную последовательность нуклеотидов, которая остается подобной от интрона к интрону и наделяет клетку «метками» для обозначения участка, где происходит сплайсинг (рис. 6.28). Однако такие консенсусные последовательности относительно коротки и могут характеризоваться высокой степенью изменчивости; как мы увидим вскоре, клетка использует еще дополнительную информацию, чтобы точно выбрать для каждой молекулы РНК, где должен произойти сплайсинг.

Высокая изменчивость консенсусных последовательностей сплайсинга бросает особый вызов ученым, пытающимся расшифровать последовательности геномов. Размеры интронов колеблются в пределах примерно от 10 нуклеотидов до более чем 100 000 нуклеотидов, и выбор точных границ каждого интрона представляет собой сложную задачу даже при использовании мощных компьютеров. Возможность альтернативного сплайсинга создает дополнительные проблемы для предсказания белковых последовательностей исключительно по последовательности генома. Эта трудность — один из главных барьеров на пути к идентификации всех генов в

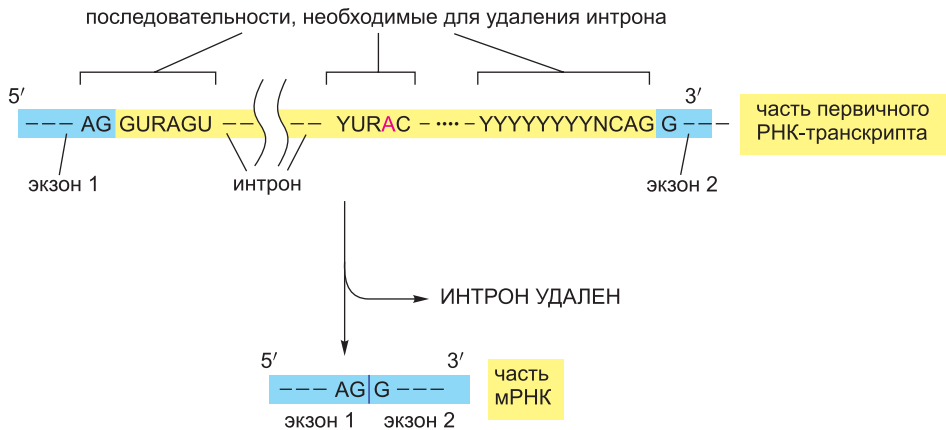


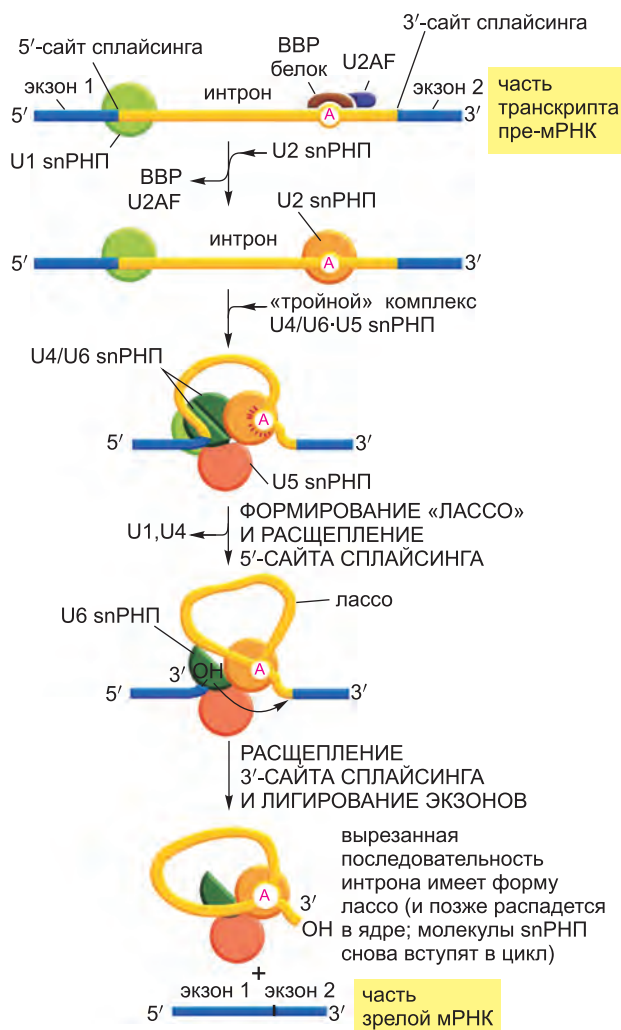
Рис. 6.28. Консенсусные последовательности нуклеотидов в молекуле РНК, которые сигнализируют «начало» и «конец» большинства интронов в геноме человека. Только три показанных блока последовательностей нуклеотидов необходимы для удаления последовательности интрона; остальная часть интрона может быть занята любыми нуклеотидами. Здесь А, G, U и С — стандартные нуклеотиды РНК; R обозначает пурины (А или G); а Y отмечает пиримидины (С или U). Выделенный красным А образует точку ветвления «лассо», образующегося в ходе сплайсинга. Только GU в начале интрона и AG в его конце суть инвариантные нуклеотиды консенсусных последовательностей сплайсинга. Остальные позиции (даже точку ветвления А) могут занимать несколько разных нуклеотидов, хотя предпочтение все же отдается указанным здесь. Расстояние между этими тремя консенсусными последовательностями сплайсинга на РНК изменяется в широких пределах; однако расстояние между точкой ветвления и 3'-границей сплайсинга обычно намного короче, чем расстояние между 5'-границей сплайсинга и точкой ветвления.

полной последовательности генома и это одна из главных причин, ограничивающих наши знания о числе генов в геноме человека.

6.1.14. Сплайсинг РНК выполняет сплайсосома

В отличие от тех этапов «производства» мРНК, которые мы обсудили, основные операции сплайсинга РНК выполняют молекулы РНК, а не белки. Специализированные молекулы РНК узнают нуклеотидные последовательности, которые определяют, где должен произойти сплайсинг, а также участвуют в химических процессах сплайсинга. Такие молекулы РНК относительно коротки (менее 200 нуклеотидов каждая), и в основной форме сплайсинга пре-мРНК участвует пять из них (U1, U2, U4, U5 и U6). Известные под названием **малых ядерных РНК, snРНК (small nuclear RNAs)**, они связаны в комплексы по крайней мере с семью белковыми субъединицами каждая и образуют snРНП (малые ядерные рибонуклеопротеиды). Такие snРНП формируют ядро **сплайсосомы** — огромного ансамбля молекул РНК и белков, который выполняет сплайсинг пре-мРНК в клетке.

Сплайсосома представляет собой сложную и динамичную машину. В системах *in vitro* несколько компонентов сплайсосомы собирается на пре-мРНК и по мере протекания реакции сплайсинга новые компоненты входят в нее, в то время как те, что уже выполнили свои задачи, «выбрасываются за борт» (рис. 6.29). Однако многие ученые полагают, что в клетке сплайсосома — это присутствующая подвижная сборка всех компонентов, — захватывающая, сращивающая и высвобождающая РНК как согласованная единица и претерпевающая значительные перестройки при



U1 snRNP образует комплементарные пары с 5'-границей сплайсинга (см. рис. 6.30, а), а BVP (branch-point binding protein; белок, связывающийся с точкой ветвления) и U2AF (вспомогательный фактор U2) узнают участок точки ветвления.

U2 snRNP вытесняет BVP и U2AF и образует комплементарные пары с консенсусной последовательностью участка точки ветвления (см. рис. 6.30, б).

В реакцию вступает «тройка» U4/U6·U5 snRNP. В этом тройном snRNP U4 и U6 snRNP прочно удерживаются вместе взаимодействиями пар оснований. Последующие перестройки создают активный участок сплайсосомы и размещают соответствующие части субстрата пре-мРНК для первой фосфорилтрансферазной реакции.

Происходит еще несколько РНК-РНК перестроек, в результате которых разрываются связи, образованные парами оснований U4/U6, и U6 snRNP заменяет U1 на 5'-границе сплайсинга (см. рис. 6.30, а), с тем чтобы образовать активный участок для второй фосфорилтрансферазной реакции, которой и завершается сплайсирование.

Рис. 6.29. Механизм сплайсинга пре-мРНК. Сплайсинг РНК катализируется комплексом snRNP (изображен в виде цветных кругов) вместе с другими белками (большинство из которых не показано) — все они, вместе взятые, и составляют сплайсосому. Сплайсосома распознает сигналы сплайсинга на молекуле пре-мРНК, сводит оба конца интрона друг с другом и обеспечивает ферментативную активность на двух этапах реакции (см. рис. 6.26).

каждом событии сплайсинга. В ходе реакции сплайсинга распознавание 5'-участка сращивания, участка точки ветвления и 3'-границы сплайсинга выполняется в значительной степени за счет спаривания оснований между молекулами snRNP и консенсусными последовательностями в субстрате — пре-мРНК (рис. 6.30). В ходе реакции сплайсинга сплайсосома подвергается нескольким сдвигам, при которых один набор комплементарных взаимодействий оснований разрывается, а другой образуется на его месте. Например, U1 замещается на U6 на 5'-границе сплайсинга (см. рис. 6.30, а). Такого типа перестройки РНК-РНК (при которых образование

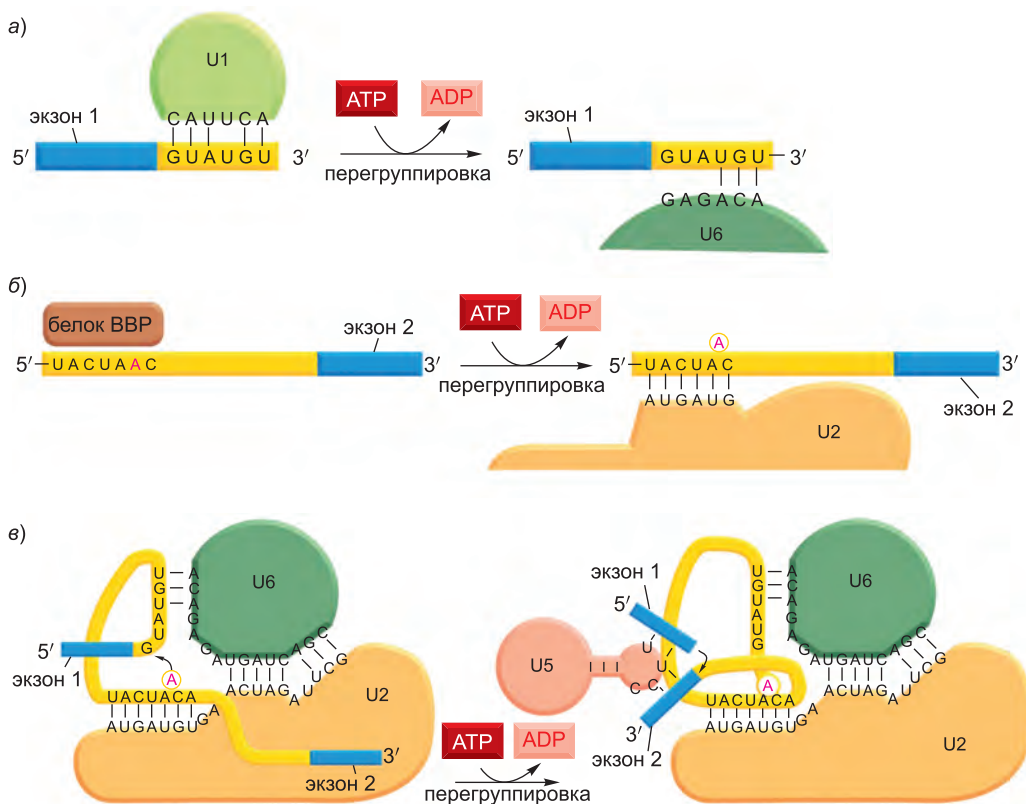


Рис. 6.30. Некоторые перегруппировки, которые происходят в сплайсосоме при сплайсинге пре-мРНК.

На этой схеме представлены любопытные моменты работы сплайсосомы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, у которой вовлеченные в сплайсинг последовательности нуклеотидов несколько отличаются от таковых в клетках человека. а) Обмен U1 snРНК на U6 snРНК происходит перед первой реакцией переноса фосфорильной группы (см. рис. 6.29). Для такого обмена требуется, чтобы 5'-сайт сплайсинга был считан двумя разными snРНК, что тем самым повышает точность выбора сплайсосомой 5'-сайта сплайсинга. б) Сайт точки ветвления сначала узнается BBP, а затем U2 snРНК; как в случае а, такая стратегия «проверки и перепроверки» обеспечивает повышенную точность выбора участка. Связывание U2 с точкой ветвления вынуждает соответствующий неспаренный аденин (красный) выйти из спаренной области и таким образом активирует его для реакции с 5'-сайтом сплайсинга (см. рис. 6.29). Это, в сочетании с узнаванием при помощи BBP, и есть тот путь, которым сплайсосома точно выбирает аденин, который должен в конечном счете сформировать точку ветвления. в) После того как первая реакция переноса фосфорильной группы (слева) произошла, ряд перестроек сводит эти два экзона вместе — для второй реакции переноса фосфила (справа). Молекулы snРНК и размещают «реагенты» должным образом, и обеспечивают (или все, или часть) каталитические участки для этих двух реакций. U5 snРНК присутствует в сплайсосоме до того момента, как эта перестройка произойдет; для простоты она была изъята из левой модели структуры. Как сказано в тексте, все перегруппировки РНК–РНК, показанные на этом рисунке (равно как и другие, которые происходят в сплайсосоме, но не показаны), требуют участия дополнительных белков и гидролиза АТФ.

одного РНК–РНК взаимодействия требует разрыва другого) происходят несколько раз в течение реакции сплайсинга. Это обеспечивает проверку и перепроверку последовательностей РНК прежде, чем произойдет химическая реакция, — и таким образом повышается точность сплайсинга.

6.1.15. Для выполнения сложного ряда РНК-РНК перегруппировок сплайсосома использует гидролиз АТФ

Хотя гидролиз АТФ не требуется для химии РНК-сплайсинга *per se*, он необходим для сборки и перестроек сплайсосомы. Некоторые из вспомогательных белков, которые составляют сплайсосому, используют энергию гидролиза АТФ для разрыва существующих взаимодействий РНК–РНК, чтобы на их «обломках» могли образоваться новые. Фактически, все этапы, показанные ранее на рис. 6.29, — кроме посадки ВВР на участок точки ветвления и U1 snРНК на 5'-сайт сплайсинга, — требуют гидролиза АТФ и участия дополнительных белков. Для успешного протекания одного события сплайсинга необходимо участие не менее 200 белков, если учесть и те, что образуют snРНК.

Нуждающиеся в гидролизе АТФ перегруппировки РНК–РНК, которые имеют место в сплайсосоме, происходят как в самих snРНК, так и между snРНК и субстратом пре-мРНК. Одна из наиболее важных функций таких перестановок — обустройство активного каталитического участка сплайсосомы. Стратегия создания активного участка только после сборки и перестройки участвующих в сплайсинге компонентов на субстрате пре-мРНК представляет собой особенно эффективный способ предотвращения непредсказуемого сплайсинга.

Возможно, самая удивительная особенность сплайсосомы — природа самого каталитического участка: он в основном (если не исключительно) образован из молекул РНК вместо белков. В последнем параграфе этой главы мы в общих чертах обсуждаем структурные и химические свойства РНК, которые позволяют ей выполнять катализ; здесь нам будет достаточно лишь упомянуть, что U2 и U6 snРНК в сплайсосоме формируют точную трехмерную структуру РНК, которая совмещает 5'-сайт сплайсинга в пре-мРНК с сайтом точки ветвления и, вероятно, выполняет первую реакцию трансэтерификации (см. рис. 6.30, в). Подобным же образом 5'- и 3'-границы сплайсинга сводятся воедино (событие, требующее участия U5 snРНК), с тем чтобы облегчить вторую реакцию трансэтерификации.

По завершении химической части сплайсинга, snРНК остаются связанными с «лассо». Выпутывание этих snРНК из «лассо» (и отделение их друг от друга) зависит от следующего ряда РНК–РНК перестроек, для чего необходим гидролиз АТФ, — в результате snРНК возвращаются к своей первоначальной конфигурации, так что они снова могут быть вовлечены в новый цикл реакций. При завершении процесса сплайсосома направляет набор белков для связывания их с мРНК около позиции, прежде занимаемой интроном. Названные в совокупности *комплексом соединения экзонов (EJC; exon junction complex)*, эти белки отмечают участок успешно прошедшего события сплайсинга и, как мы увидим позже в этой главе, влияют на последующую судьбу этой мРНК.

6.1.16. Прочие особенности пре-мРНК и ее синтеза помогают объяснить принципы выбора истинных сайтов сплайсинга

Как мы увидели, последовательности интронов сильно разнятся по размерам, а некоторые составляют даже более 100 000 нуклеотидов. Если бы выбор участка сплайсинга определялся исключительно snРНК, работающими на первичной, свободной от белков молекуле РНК, то следовало бы ожидать, что ошибки — такие как пропуск экзона и использование «скрытых» сайтов сплайсинга, — будут возникать очень часто (рис. 6.31). Однако встроенные в сплайсосомы механизмы «обеспечения



Рис. 6.31. Два типа ошибок сплайсинга. а) Пропуск экзона. б) Выбор скрытого сайта сплайсинга. Скрытые сигналы сплайсинга — нуклеотидные последовательности РНК, которые близко напоминают истинные сигналы сплайсинга.

качества» укомплектованы двумя дополнительными системами, которые увеличивают точность сплайсинга. Первая есть просто следствие ранних стадий сплайсинга, происходящих, когда молекулы пре-мРНК синтезируются РНК-полимеразой II. В ходе транскрипции фосфорилированный хвост РНК-полимеразы несет несколько компонентов сплайсосомы (см. рис. 6.23), и эти компоненты переносятся непосредственно с полимеразы на РНК по мере ее синтеза. Эта стратегия помогает клетке отслеживать интроны и экзоны: например, snРНК, которые собираются на 5'-сайте сплайсинга, изначально встречаются только с одним 3'-сайтом сплайсинга, так как участки, расположенные ниже, еще не синтезированы к тому времени. Транскрипция, согласованная со сплайсингом, особенно важна для предотвращения пропуска истинных экзонов.

Стратегия, названная *определением экзона (exon definition)*, представляет собой другой способ, которым клетки выбирают правильные сайты сплайсинга. Размер экзонов, как правило, является намного более постоянным, чем размер интронов, и, несмотря на широкое разнообразие организмов эукариот, составляет в среднем около 150 пар нуклеотидов (рис. 6.32). Согласно представлению об определении экзона сплайсинг-выполняющая машина первоначально отыскивает относительно одинаковые по размеру последовательности экзонов. По мере продвижения синтеза РНК группа дополнительных компонентов (в особенности белки SR, названные так потому, что они содержат домен, обогащенный серином и аргинином) собирается на последовательностях экзонов и помогает «отметить» каждый 3'- и 5'-сайт сплайсинга, начиная с 5'-конца РНК (рис. 6.33). Эти белки, в свою очередь, привлекают к участию U1 snРНК, которая отмечает нижележащую границу экзона, и U2AF, который определяет вышележащую границу. Специфически маркируя экзоны таким способом и при этом извлекая выгоду из относительно однородного размера экзонов, клетка увеличивает точность, с которой она размещает первичные компоненты сплайсинга на синтезируемой РНК, и тем самым помогает избежать сплайсинга скрытых сайтов. Каким образом белки SR отличают последовательности экзонов от последовательностей интронов, до конца еще не понятно; однако известно, что некоторые из SR-белков связываются предпочтительно с определенными последовательностями экзонов, названными *усилителями*, или *энхансерами сплайсинга (splicing enhancers)*. В принципе, так как для кодирования данной аминокислоты может быть использован любой из соответствующих ей кодонов, есть свобода выбора при формировании нуклеотидной последовательности экзона — с целью обеспечить участок связывания белка SR, не затрагивая при этом последовательности аминокислот, кодируемой этим экзоном.

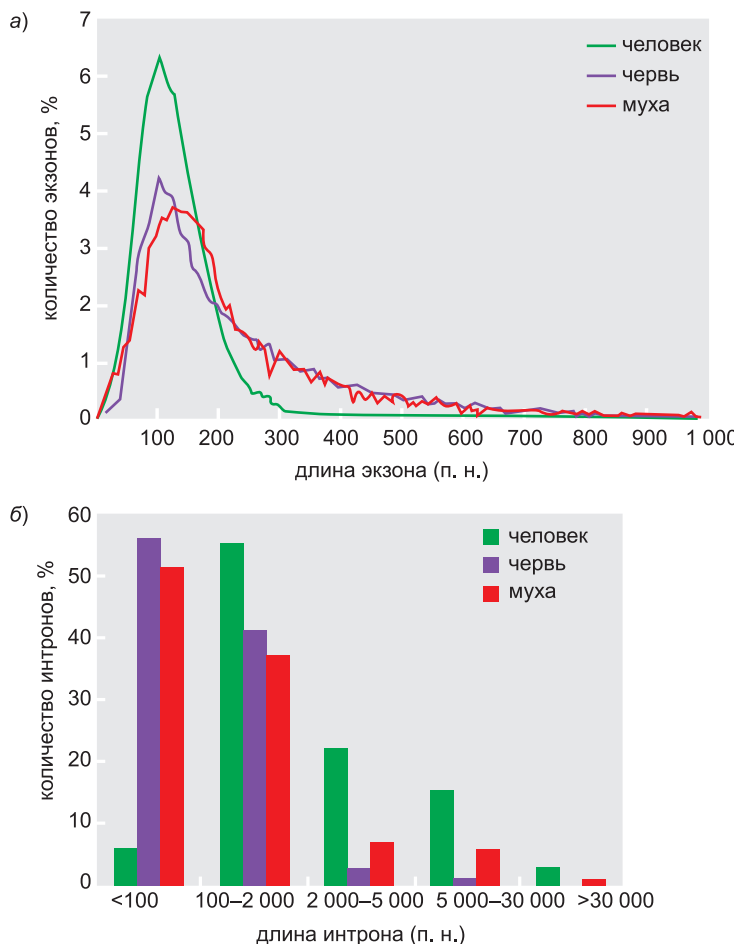


Рис. 6.32. Колебания длины интронов и экзонов в геномах человека, червя и мухи. а) Распределение размеров экзонов. б) Распределение размеров интронов. Обратите внимание, что длина экзонов намного более однородна, чем длина интронов. (Переработано на основе данных из International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* 409: 860–921, 2001. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

Как маркировка границ экзонов и интронов, так и сборка сплайсосомы начинается на молекуле РНК — когда РНК-полимераза все еще элонгирует 3'-конец РНК. Однако химическая часть сплайсинга в действительности может происходить намного позже. Такая задержка означает, что последовательности интронов не обязательно удаляются из молекулы пре-мРНК в том порядке, в котором они расположены в цепи РНК. Это означает также и то, что, хотя сборка сплайсосомы сопутствует процессу транскрипции, реакции сплайсинга иногда происходят посттранскрипционно — то есть после того как молекула пре-мРНК полностью готова.

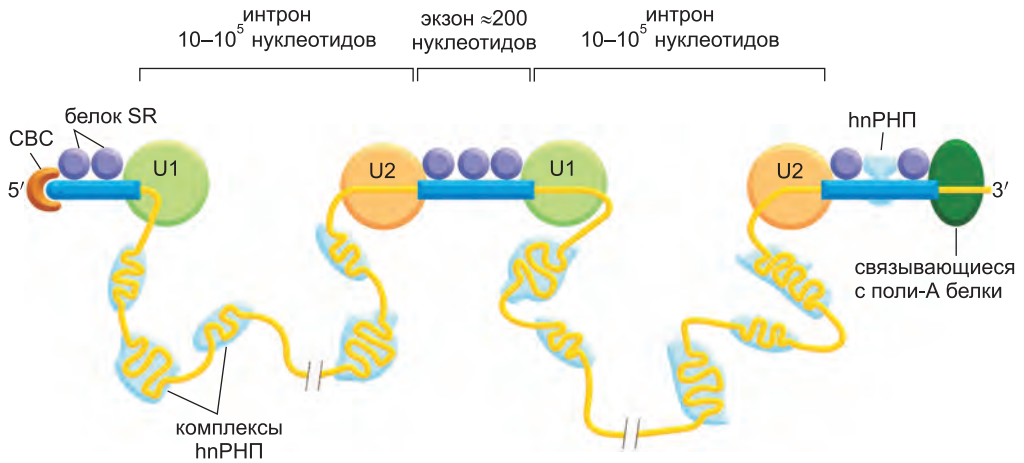


Рис. 6.33. Концепция определения экзона. Согласно одному предположению, SR-белки связываются с каждой последовательностью экзона в пре-мРНК и таким образом помогают проводить молекулы snРНК к истинным интрон-экзонным границам. Такое разграничивание экзонов SR-белками происходит сотранскрипционно, начинаясь с CBC (комплекс посадки на кэп) на 5'-конце. Как показано на рисунке, в пре-мРНК последовательности интронов, а они могут быть чрезвычайно длинными, упакованы в комплексы hnРНК (гетерогенного ядерного рибонуклеопротеида), которые уплотняют их в более удобные для манипуляций структуры и, возможно, маскируют скрытые сайты сплайсинга. Предполагают, что белки hnРНК предпочтительно связываются с последовательностями интронов и это помогает сплайсосоме отличать интроны от экзонов. Однако, как показано на схеме, по крайней мере некоторые белки hnРНК связываются также и с последовательностями экзонов. (Переработано из R. Reed, *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 340–345, 2000. С благосклонного разрешения издательства Elsevier.)

6.1.17. Второй набор snРНК сплайсирует минорную фракцию последовательностей интронов у животных и растений

Простые эукариоты, такие как дрожжи, имеют только один набор snРНК, которые выполняют весь сплайсинг пре-мРНК. Однако более сложные эукариоты типа мух, млекопитающих и растений имеют второй набор молекул snРНК, которые направляют сплайсинг небольшой фракции их интронных последовательностей. Эта минорная форма сплайсосомы распознает иной набор последовательностей РНК на 5'- и 3'-границах сплайсинга и в точке ветвления; ее называют *сплайсосомой U12-типа* (*U12-type spliceosome*) ввиду причастности к ней U12 snРНК (рис. 6.34, а). Несмотря на узнавание иных нуклеотидных последовательностей, snРНК в этой сплайсосоме налаживают те же виды взаимодействий типа РНК–РНК с пре-мРНК и друг другом, что и основные snРНК (рис. 6.34, б). Хотя, как мы убедились, компоненты мажорных сплайсосом перемещаются вместе с РНК-полимеразой II, когда она транскрибирует гены, это может быть и не так для сплайсосомы U12. Возможно, что опосредствованный U12 сплайсинг таким образом задерживается во времени и это дает клетке способ срегулировать сплайсинг нескольких сотен генов, экспрессия которых невозможна без привлечения этой сплайсосомы. Ряд молекул мРНК млекопитающих содержит смесь интронов, некоторые удаляются главной сплайсосомой, а другие — минорной сплайсосомой, и было высказано предположение о том, что такой принцип позволяет осуществлять альтернативный сплайсинг по особо сложным схемам.

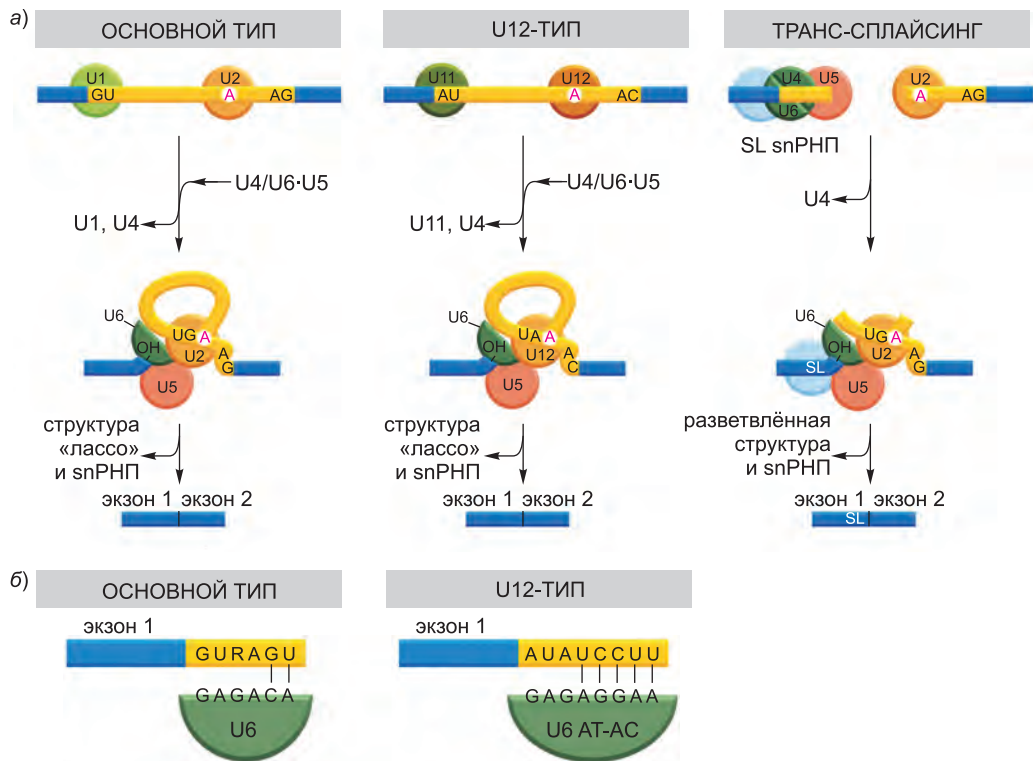


Рис. 6.34. Общая схема механизмов, используемых в трех типах РНК-сплайсинга. а) Сплайсосомы трех типов. Основная сплайсосома (слева), сплайсосома типа U12 (посередине) и транс-сплайсосома (справа) показаны в двух стадиях сборки. Интроны, удаляемые сплайсосомой типа U12, имеют иной набор консенсусных последовательностей нуклеотидов, чем удаляемые основной сплайсосомой. У человека, согласно оценкам, 0,1 % интронов удаляется сплайсосомой типа U12. При транс-сплайсинге, который у человека не происходит, реакции подвергаются SL snРНП, потому что сегмент SL snРНК становится первым экзонам зрелой мРНК. б) И мажорный U6 snРНП, и U6 snРНП, специфичный для сплайсосомы U12-типа, узнают 5'-границу сплайсинга, но делают это с использованием разных наборов взаимодействующих пар оснований. На рисунке представлены последовательности из генома человека. (Переработано на основе Y.T. Yu et al., *The RNA World*, pp. 487–524. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.)

У нескольких представителей эукариот выявлена особенная разновидность сплайсинга, получившая название **транс-сплайсинга (trans-splicing)**. К таким организмам относятся одноклеточные трипаносомы — простейшие животные, которые вызывают у людей африканскую сонную болезнь — и используемый как экспериментальная модель многоклеточный организм — червь нематода. При транс-сплайсинге экзоны из двух разных РНК-транскриптов соединяются друг с другом и образуют молекулу зрелой мРНК (см. рис. 6.34, а). Трипаносомы производят все свои молекулы мРНК этим способом, тогда как у нематоды транс-сплайсинг отвечает лишь примерно за 1 % молекул мРНК. В обоих случаях один и тот же экзон сращивается с 5'-концом многих разных РНК-транскриптов, произведенных клеткой; таким образом, все продукты транс-сплайсинга имеют один и тот же 5'-экзон и разные 3'-экзоны. Многие из тех же видов молекул snРНП, работающих на по-

прище обычного сплайсинга, задействованы в этой реакции, хотя транс-сплайсинг использует уникальный spRNP (названный SL, spliced leader, РНП), который и вносит в транскрипты общий экзон (см. рис. 6.34).

Мы даже не представляем, для чего эти несколько организмов используют транс-сплайсинг; однако можно предположить, что общий 5'-экзон может помогать в трансляции мРНК. Так, молекулы мРНК, произведенные в ходе транс-сплайсинга нематод, кажется, транслируются с особенно высокой эффективностью.

6.1.18. РНК-сплайсинг удивительно пластичен

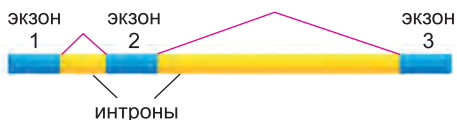
Мы увидели, что выбор участков сплайсинга зависит от таких особенностей транскрипта пре-мРНК, как сродство «машины» сплайсинга к трем сигналам на РНК (5'- и 3'-границам сплайсинга и точке ветвления), сотранскрипционная сборка сплайсосомы и «бухгалтерия», лежащая в основе определения экзона. Мы не знаем, насколько точно происходит сплайсинг в норме, потому что, как увидим позже, существует несколько систем контроля его «качества», которые быстро уничтожают молекулы мРНК, сращивание которых идет неправильно. Однако нам известно, что по сравнению с другими этапами экспрессии гена сплайсинг необычайно пластичен. Например, мутация в последовательности нуклеотидов, критически важной для вырезания какого-либо конкретного интрона, не обязательно препятствует вырезанию этого интрона бесповоротно. Вместо этого мутация обычно порождает новую схему сплайсинга (рис. 6.35). Чаще всего экзон попросту пропускается (рис. 6.35, б). В других случаях мутация обуславливает эффективное использование скрытого сайта сплайсинга (рис. 6.35, в). Очевидно, сплайсирующие машины эволюционировали таким образом, чтобы выбирать наилучшую из возможных схем границ сплайсинга, и если оптимальная схема повреждена мутацией, то они будут искать следующую по оптимальности схему и так далее. Такая гибкость процесса сплайсинга РНК предполагает, что изменения в профилях сплайсинга, вызываемые случайными мутациями, были важной составляющей эволюции генов и организмов.

Пластичность сплайсинга РНК также означает, что клетка может регулировать схему РНК-сплайсинга. Ранее в этом параграфе мы говорили о том, что альтернативный сплайсинг может дать начало различным белкам, получаемым из одного и того же гена. Некоторые примеры альтернативного сплайсинга носят конститутивный характер — то есть альтернативно сплайсированные молекулы мРНК постоянно производятся клетками организма. Однако во многих случаях клетка регулирует схемы сплайсинга таким образом, что в разное время и в различных тканях производятся разные формы данного белка (см. рис. 6.27). В главе 7 мы вернемся к этому вопросу и обсудим некоторые характерные примеры регулируемого РНК-сплайсинга.

6.1.19. Катализируемый сплайсосомой РНК-сплайсинг, вероятно, эволюционировал от механизмов самосплайсинга

Когда сплайсосома была открыта, она озадачила молекулярных биологов рядом вопросов. Почему молекулы РНК, а не белка, выполняют важную роль опознавания участков сплайсинга и составляют химическую основу самого процесса сплайсинга? Почему используется промежуточный продукт — лассо-подобная структура, а не очевидная более простая альтернатива: сведение 5'- и 3'-сайтов сплайсинга друг с другом за один шаг, за чем следовало бы их прямое расщепление и воссоединение?

а) ПЕРВИЧНЫЙ ТРАНСКРИПТ РНК НОРМАЛЬНОГО β -ГЛОБИНА ВЗРОСЛЫХ



нормальная мРНК состоит из трех экзонов

в) ЕДИНИЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НУКЛЕОТИДОВ, ПРИВОДЯЩИЕ К РАЗРУШЕНИЮ НОРМАЛЬНЫХ САЙТОВ СПЛАЙСИНГА, АКТИВИРУЮТ СКРЫТЫЕ САЙТЫ СПЛАЙСИНГА



мРНК с удлинненным экзонам 3

б) ЕДИНИЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НУКЛЕОТИДОВ, ПРИВОДЯЩИЕ К РАЗРУШЕНИЮ НОРМАЛЬНЫХ САЙТОВ СПЛАЙСИНГА, ВЫЗЫВАЮТ ПРОПУСК ЭКОНА



мРНК с пропущенным экзонам 2

г) ЕДИНИЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НУКЛЕОТИДОВ, ПРИВОДЯЩИЕ К СОЗДАНИЮ НОВЫХ САЙТОВ СПЛАЙСИНГА, ВЫЗЫВАЮТ ВСТАВКУ НОВЫХ ЭКЗОНОВ



мРНК с дополнительным экзонам, вставленным между экзонами 2 и 3

Рис. 6.35. Неправильный процессинг первичного РНК-транскрипта β -глобина у людей, страдающих β -талассемией. В представленных примерах заболевание вызвано мутациями в участках сплайсинга (черные стрелки), которые обнаружены в геномах пораженных недугом пациентов. Темно-синие полосы обозначают три нормальные последовательности экзонов; красные линии отмечают 5'- и 3'-границы сплайсинга. Голубые полосы отображают новые последовательности нуклеотидов, включенные в конечную молекулу мРНК в результате мутации. Обратите внимание, что когда мутация занимает нормальный участок сплайсинга, оставив, таким образом, другой участок сплайсинга без партнера, то экзон пропускается; либо один или несколько близлежащих скрытых участков сплайсинга используются в качестве участка-партнера, как на схемах в и г. (Переработано отчасти из S. H. Orkin, *The Molecular Basis of Blood Diseases* [G. Stamatoyannopoulos et al., eds.], pp. 106–126. Philadelphia: Saunders, 1987.)

Ответы на эти вопросы описывают предполагаемый эволюционный путь, который прошла сплайсосома.

Как было вскользь упомянуто в главе 1 (и будет сказано подробнее в заключительном параграфе этой главы), весьма вероятно, что на заре эволюции клетки использовали молекулы РНК, а не белков в качестве главных катализаторов и хранили они свою генетическую информацию в последовательностях РНК, а не ДНК. Катализируемые РНК реакции сплайсинга, возможно, играли важную роль в этих доисторических клетках. Живым свидетельством этого служат некоторые интроны *самосплайсирующейся РНК* (self-splicing RNA; то есть последовательности интронов в РНК, вырезание которых может происходить в отсутствие белков или любых других молекул РНК), встречающиеся, например, в генах ядерных рРНК ресничной инфузории *Tetrahymena*, в нескольких генах бактериофага Т4 и в некоторых генах митохондрий и хлоропластов.

Самосплайсирующаяся последовательность интрона может быть идентифицирована в пробирке: при инкубации очищенной РНК, молекула которой содержит последовательность интрона, можно наблюдать реакцию сплайсинга. Подобным образом можно выделить два основных класса самосплайсирующихся последовательностей интронов. *Последовательности интронов группы I* начинают реакцию сплайсинга, связывая нуклеотид G с последовательностью интрона; этот G таким

путем активируется с образованием группы, которая атакует и разрывает первую из фосфодиэфирных связей, расщепляемых в ходе сплайсинга (связь в 5'-сайте сплайсинга). В *последовательностях интронов группы II* особо реакционно-способный остаток А в последовательности интрона выступает в роли атакующей группы, которая и индуцирует образование промежуточной лассо-подобной структуры. Во всем остальном пути протекания реакций самосплайсирующихся последовательностей интронов двух типов одинаковы. Оба, как предполагается, представляют собой «пережитки» очень древних механизмов (рис. 6.36).

Для реакций самосплайсинга этих двух типов нуклеотидная последовательность интрона имеет определяющее значение; РНК интрона сворачивается в определенную трехмерную структуру, в результате чего 5'- и 3'-границы сплайсинга сводятся вместе, обеспечивая тем самым точное расположение реакционно-активных групп для выполнения необходимых химических манипуляций (см. рис. 6.6, в). Поскольку химическая подоплека реакций сплайсинга очень похожа, было высказано предположение о том, что механизм сплайсинга пре-мРНК, присущий сплайсосоме, начал свой эволюционный путь от механизма самосплайсинга II группы. Согласно этому представлению, когда сплайсосомные snРНК взяли на себя структурные и химические роли интронов II группы, строгие ограничения по составу, наложенные на последовательности интронов, исчезли, что послужило значительному увеличению числа различных РНК, которые могут быть подвергнуты сплайсингу.

6.1.20. У эукариот 3'-конец молекул мРНК формируют РНК-процессирующие ферменты

Как мы объясняли ранее, 5'-конец пре-мРНК, синтезируемый РНК-полимеразой II, кэпируется почти сразу после того, как он выходит из РНК-полимеразы. Далее, по мере того как полимеразы продолжает свое передвижение по гену, сплайсосома собирается на РНК и очерчивает границы экзонов и интронов. Длинный С-концевой хвост РНК-полимеразы координирует эти процессы, передавая кэпирующие и сплайсирующие компоненты непосредственно на РНК по мере ее выхода из фермента. Как мы увидим в этом пункте, когда РНК-полимераза II достигает конца гена, подобный механизм обеспечивает надлежащую обработку и 3'-конца пре-мРНК.

Как можно было бы ожидать, позиция 3'-конца в каждой молекуле мРНК, в конечном счете, определяется сигналом, закодированным в геноме (рис. 6.37). Такие сигналы транскрибируются в РНК, когда РНК-полимераза II перешагивает через них, и тогда они опознаются (как РНК) рядом РНК-связывающих белков и РНК-процессирующих ферментов (рис. 6.38). Два мультисубъединичных белка, названных CstF (cleavage stimulation factors; фактор стимуляции расщепления) и CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor; фактор специфичности расщепления и полиаденилирования), имеют особое значение. Оба эти белка «путешествуют» на хвосте РНК-полимеразы и переходят на требующую обработки последовательность 3'-конца молекулы РНК, когда та появляется из РНК-полимеразы.

Как только CstF и CPSF свяжутся со специфическими последовательностями нуклеотидов на появляющейся молекуле РНК, к ним собираются вспомогательные — чтобы создать 3'-конец мРНК. Сначала РНК расщепляется (см. рис. 6.38). Затем фермент, названный поли-А-полимеразой (РАР), добавляет по одному приблизительно 200 нуклеотидов А к 3'-концу, образовавшемуся в процессе расщепле-

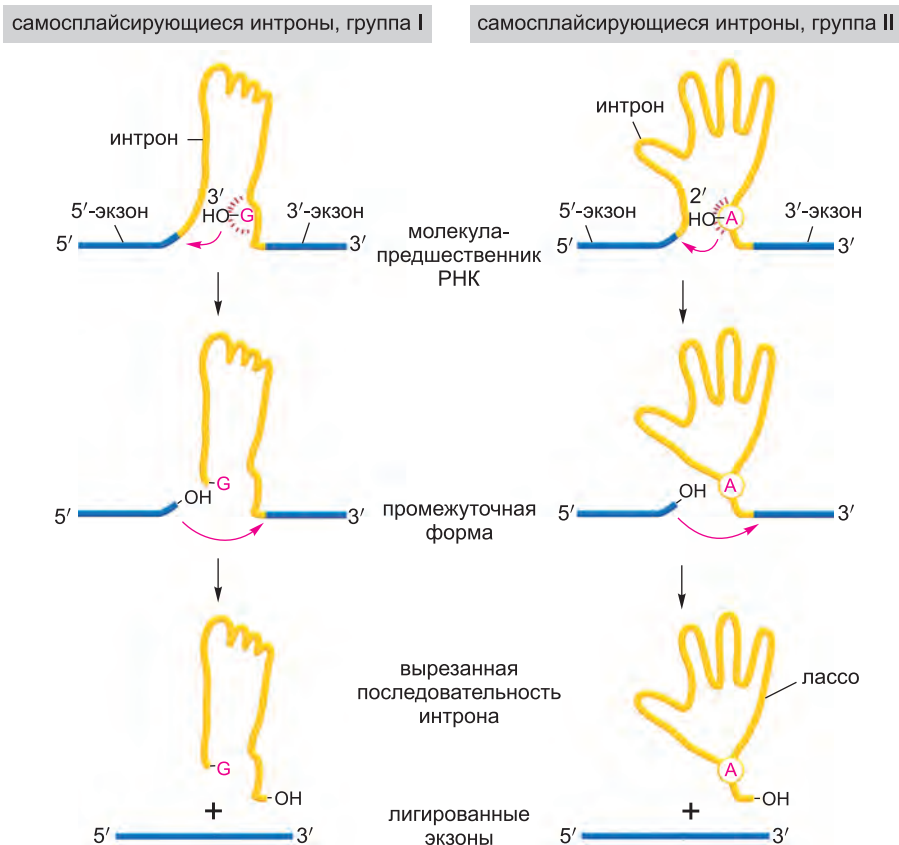


Рис. 6.36. Два известных класса самосплайсирующихся последовательностей интронов. Рисунок подчеркивает подобия между этими двумя механизмами. Оба обычно прибегают к помощи белков клетки, которые ускоряют реакцию, но катализ тем не менее опосредствуется РНК в последовательности интрона. Последовательности интронов группы I связывают свободный нуклеотид G со специфическим участком РНК — чтобы инициировать сплайсинг; тогда как последовательности интронов группы II используют для той же цели отличающийся особой реакционной способностью нуклеотид А, находящийся в самой последовательности интрона. Оба типа реакций самосплайсинга требуют, чтобы интрон находился в крайне специфичной трехмерной структуре, которая обеспечивает необходимое каталитическое действие (см. рис. 6.6). Механизм, используемый последовательностями интронов группы II, высвобождает интрон в виде лассо-подобной структуры и очень напоминает процесс сплайсинга пре-мРНК, катализируемого сплайсосомой (сравните с рис. 6.29). В клетках эукариот основную нагрузку в ходе РНК-сплайсинга выполняет сплайсосома, а самосплайсирующиеся РНК представляют собой необычные случаи. (Переработано на основе T. R. Cech, *Cell* 44: 207–210, 1986. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

ния. Предшественником этих добавляемых нуклеотидов служит АТФ, и образуются связи того же типа, 5'–3', что и при обычном синтезе РНК (см. рис. 6.4). В отличие от обычных РНК-полимераз, поли-А-полимераза не нуждается в матрице; поэтому как таковой поли-А-«хвост» молекул мРНК эукариот не закодирован в геноме. По мере синтеза поли-А-«хвоста», белки, названные поли-А-связывающими белками, собираются на нем и действием плохо понятого механизма определяют конечную длину хвоста. Когда мРНК переходит из ядра в цитозоль, некоторые

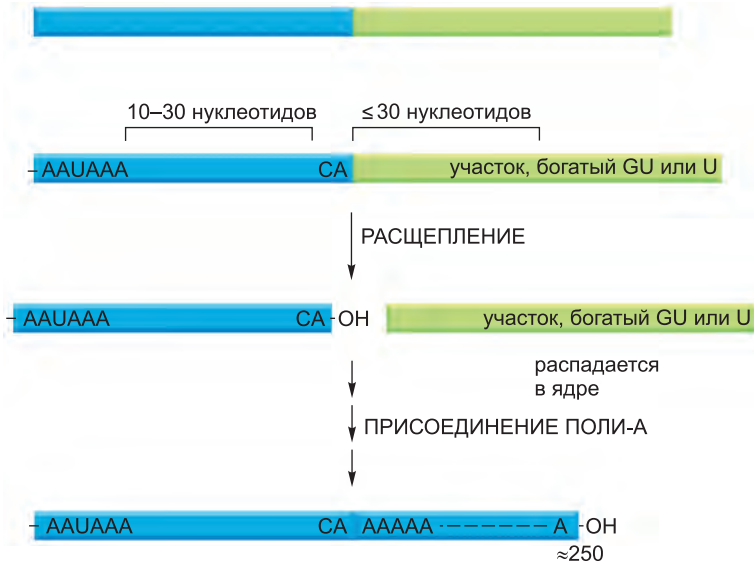


Рис. 6.37. Консенсусные нуклеотидные последовательности, которые направляют расщепление и полиаденилирование в ходе формирования 3'-конца эукариотической мРНК. Эти последовательности закодированы в геноме; специфические белки распознают их после того, как они транскрибированы в РНК. Гексамер AAUAAA связан CPSF, обогащенный GU элемент за пределами участка расщепления связан CstF (см. рис. 6.38), а последовательность CA связана третьим фактором, необходимым на стадии расщепления. Подобно другим консенсусным последовательностям нуклеотидов, рассмотренным в этой главе (см. рис. 6.12), последовательности, показанные на рисунке, представляют разнообразие отдельных сигналов к расщеплению и полиаденилированию.

поли-А-связывающие белки остаются связанными с хвостом и помогают направлять синтез белка на рибосоме, в чем мы убедимся далее в этой главе.

После того как 3'-конец молекулы пре-мРНК эукариот будет расщеплен, РНК-полимераза II продолжит транскрипцию — в некоторых случаях на сотни нуклеотидов. Но в скором времени она ослабит «захват» матрицы и транскрипция завершится. Так как эта синтезируемая РНК со стороны 5'-конца является продуктом расщепления 3'-конца мРНК, она на выходе из полимеразы не будет иметь 5'-кэпа; а такая незащищенная РНК быстро деградируется экзонуклеазой 5' → 3', которая переносится на хвосте полимеразы. Вполне очевидно, что в конечном счете именно эта деградация РНК и вынуждает РНК-полимеразу отделяться от ДНК.

6.1.21. Зрелые мРНК эукариот селективно экспортируются из ядра

Итак, мы проследили планомерный ход синтеза и процессинга эукариотических пре-мРНК в ядре клетки. Однако эти события создают особую проблему для ядерных клеток, особенно в сложных организмах, в генах которых интроны значительно длиннее экзонов. Из всей синтезируемой пре-мРНК только малая доля — зрелая мРНК — находит себе дальнейшее применение в клетке. Остальная часть: вырезанные интроны, обрывки РНК и некачественно обработанные молекулы пре-мРНК — не только бесполезна, но даже и потенциально опасна. Как в таком случае клетка выбирает относительно редкие молекулы зрелых мРНК, которые

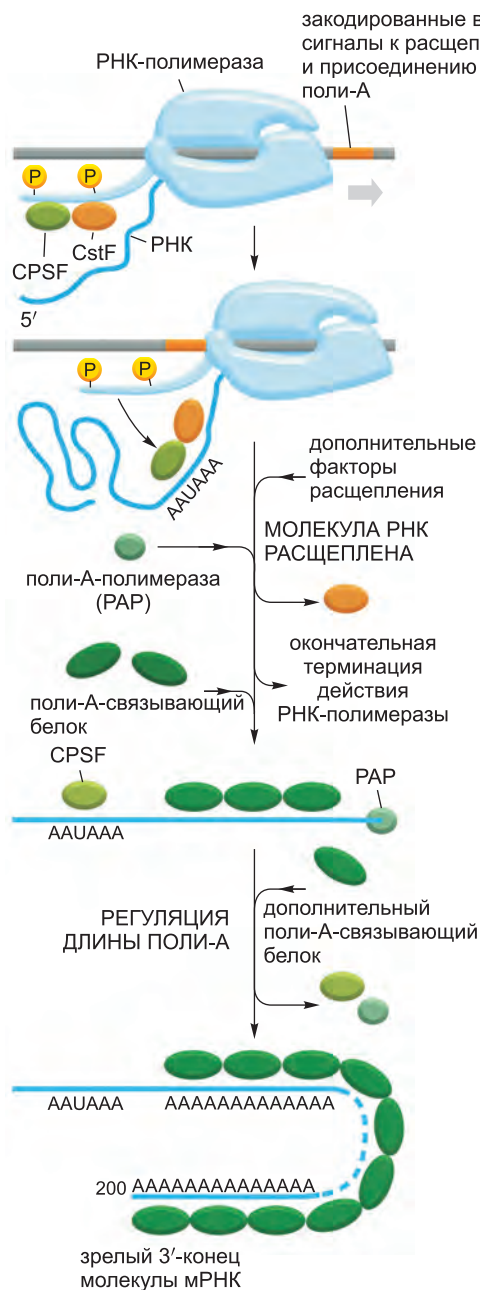


Рис. 6.38. Некоторые из основных этапов формирования 3'-конца мРНК эукариот. Этот процесс у эукариот намного сложнее, чем у бактерий, где РНК-полимераза просто останавливается на терминирующем сигнале и высвобождает 3'-конец своего транскрипта наряду с матрицей ДНК (см. рис. 6.11).

она желает приберечь на будущее, из чудовищной массы отходов процесса обработки РНК?

Ответ кроется в том, что во время процессинга молекула РНК теряет одни белки и приобретает другие — и таким образом знаменует успешное завершение каждой стадии. Например, мы уже знаем, что приобретение кэп-связывающих комплексов, комплексов соединения экзонов (ЕКС) и поли-А-связывающих белков отмечают соответственно завершение кэпирования, сплайсинга и прикрепления поли-А. Должным образом завершённую молекулу мРНК отличает также и отсутствие на ней определенных белков. Например, присутствие snРНК всякий раз указывает на неполноту или неправильно прошедший сплайсинг. Только в том случае, когда белки, находящиеся на молекуле мРНК, все вместе показывают, что процессинг прошел успешно, мРНК экспортируется из ядра в цитозоль, где может быть транслирована в белок. Неправильно процессированные молекулы мРНК и другие «отходы», состоящие из обрывков РНК, остаются в ядре, где в конечном счете деградируются ядерной **экзосомой (exosome)** — крупным белковым комплексом, внутренняя часть которого обогащена правильно процессированными 3' →

5' РНК-экзонуклеазами. Таким образом, клетки эукариот экспортируют в цитоплазму только полезные молекулы РНК, а от «отходов» избавляются в ядре.

Из всех белков, которые собираются на молекулах пре-мРНК по мере их появления из транскрибирующих РНК-полимераз, наиболее обильно представлены hnРНК (гетерогенные ядерные рибонуклеопротеиды) (см. рис. 6.33). Некоторые из этих белков (у человека их обнаружено около 30 разновидностей) раскручивают

спиленные спирали на РНК, так что сигналы сплайсинга и прочие имеющиеся на РНК сигналы могут считываться намного легче. Другие белки предпочтительно упаковывают РНК, входящую в состав очень длинных интронных последовательностей, которые часто встречаются в генах сложных организмов. Так что эти белки могут выполнять важную задачу — отличать зрелую мРНК от «мусора», остающегося после ее обработки.

Успешно обработанные молекулы мРНК проводятся через **ядерные поровые комплексы** (NPCs; nuclear pore complexes) — водные каналы в ядерной мембране, которые напрямую соединяют нуклеоплазму и цитозоль (рис. 6.39). Маленькие молекулы (менее 50 000 дальтон) могут свободно диффундировать сквозь такие каналы. Однако в большинстве своем заполняющие клетки макромолекулы, а в их числе и молекулы мРНК в комплексе с белками, являются слишком громоздкими, чтобы протиснуться сквозь каналы, не прибегая для этого к специальному процессу. Клетка использует энергию, чтобы активно транспортировать такие макромолекулы через ядерные поровые комплексы в обоих направлениях.

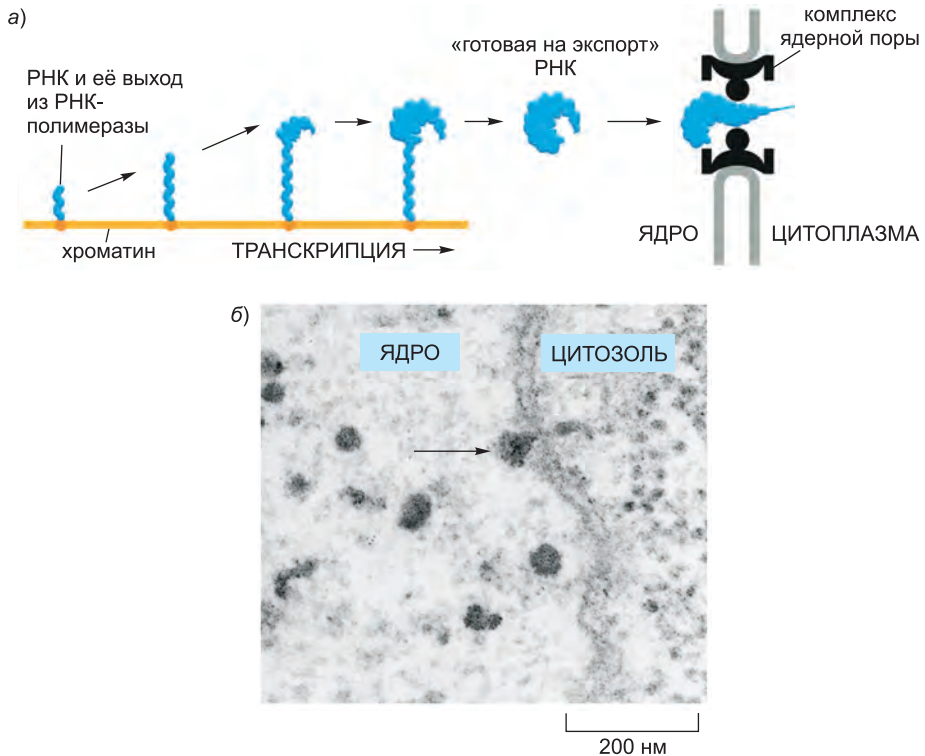


Рис. 6.39. Транспорт крупной молекулы мРНК через ядерный поровый комплекс. а) Созревание молекулы мРНК по мере ее синтеза РНК-полимеразой и упаковка разнообразными ядерными белками. на этом рисунок изображена РНК, которой (из-за ее многократности) необычайно богата клетка, — это мРНК колец Бальбиани. Рисунок основан на полученных методами электронной микроскопии фотоснимках, один из которых представлен на виде б. Кольца Бальбиани встречаются в клетках некоторых насекомых. (Изображение а переработано на основе В. Daneholt, *Cell* 88: 585–588, 1997. С любезного разрешения издательства Elsevier; микротомоснимок заимствован из В. J. Stevens and H. Swift, *J. Cell Biol.* 31: 55–77, 1966. С великодушного дозволения The Rockefeller University Press.)

Как мы объясним подробно в главе 12, макромолекулы перемещаются через ядерные поровые комплексы *рецепторами ядерного, или ядерно-цитоплазматического, транспорта (nuclear transport receptors)*, которые, в зависимости от «паспортных данных» макромолекулы, «выпроваживают» ее из ядра в цитоплазму или, наоборот, помогают ей «пробраться» внутрь. Для осуществления экспорта мРНК на ней должен быть установлен специфический рецептор ядерного транспорта; эта операция, по крайней мере у некоторых организмов, протекает совместно с расщеплением и полиаденилированием 3'-конца. Как только транспортный рецептор поможет провести молекулу РНК через ядерный поровый комплекс, он отделяется от мРНК, возвращается в ядро и экспортирует новую молекулу мРНК (рис. 6.40).

Экспорт мРНК-белковых комплексов из ядра можно наблюдать в электронный микроскоп на примере необычайно «обильной» мРНК, транскрибируемой с генов колец Бальбиани насекомых. По мере транскрибирования этих генов новообразованная РНК, как можно видеть, упаковывается белками, в том числе hnРНК, белками SR и компонентами сплайсосомы. Такой РНК-белковый комплекс претерпевает ряд структурных переходов, вероятно, отражающих операции обработки РНК, которые в конечном итоге приводят к образованию дугообразного волокна (см. рис. 6.39). Это дугообразное волокно перемещается через нуклеоплазму, входит в ядерный поровый комплекс (первым проходит ее 5'-кэп) и подвергается следующему ряду структурных переходов по мере своего продвижения через пору. Эти и другие наблюдения показывают, что пре-мРНК-белковые и мРНК-белковые комплексы суть динамичные структуры, которые приобретают и теряют многочисленные специфические белки в ходе синтеза, процессинга и экспорта РНК (см. рис. 6.40).

Как мы увидели, одни из этих белков отмечают различные этапы созревания мРНК; другие белки, осаждающие мРНК, пока она все еще находится в ядре, могут повлиять на дальнейшую судьбу РНК после ее переноса в цитозоль. Таким

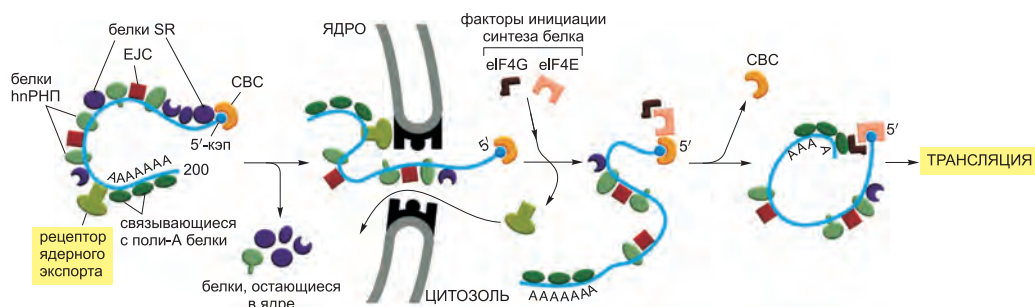


Рис. 6.40. Схематическое изображение готовой к экспорту молекулы мРНК и ее переноса через ядерную пору. Как показано на схеме, одни белки путешествуют вместе с мРНК, когда она проходит через пору, тогда как другие остаются в ядре. Ядерный рецептор экспорта для молекул мРНК представляет собой белковый комплекс, который размещается на ней после того, как мРНК была правильно сплайсирована и полиаденилирована. Когда мРНК экспортируется в цитозоль, рецептор экспорта отделяется от этой мРНК и импортируется обратно в ядро, где может быть вновь использован. Сразу после того как мРНК покидает ядро и до потери кэп-связывающего комплекса (CVC), она подвергается заключительной проверке, названной *нонсенс-опосредованным распадом (nonsense-mediated decay)*, который будет описан позже в этой главе. Пройдя это испытание, мРНК продолжает сбрасывать ранее связанные с ней белки и приобретать новые, прежде чем сможет эффективно транслироваться в белок. EJC — комплекс соединения экзонов.

образом, и устойчивость мРНК в цитозоле, и эффективность ее трансляции в белок, и ее конечное местоназначение в цитозоле — все это может быть определено белками, приобретенными в ядре и оставшимися связанными с РНК после того, как она оставит ядро. Мы обсудим эти вопросы в главе 7, когда обратимся к посттранскрипционной регуляции экспрессии генов.

Мы увидели, что в клетке синтез и процессинг РНК тесно связаны между собой, и можно ожидать, что экспорт из ядра так или иначе связан с этими двумя процессами. Хотя, как можно наблюдать, молекулы РНК колец Бальбиани движутся через нуклеоплазму и далее выходят через ядерные поры; другие молекулы мРНК, кажется, синтезируются и процессируются в непосредственной близости к ядерным поровым комплексам. В таких случаях, которые могут относиться к большинству генов эукариот, синтез, процессинг и перенос мРНК — все эти процессы, кажется, сильно сопряжены между собой; таким образом, можно считать, что мРНК выходит из ядерной поры, как недавно изготовленный автомобиль сходит со сборочной линии. Позже в этой главе мы увидим, что клетка проводит дополнительную проверку качества каждой РНК, прежде чем допустить ее к эффективной трансляции в белок.

Перед тем как обсудить, что происходит с молекулами мРНК после того, как они оставляют ядро, мы вкратце рассмотрим, как происходит синтез и процессинг молекул некодирующей РНК. Хотя известно много других примеров, мы остановимся на молекулах рРНК, которые чрезвычайно важны для трансляции молекул мРНК в белок.

6.1.22. В ядре синтезируется и созревает и много некодирующих РНК

На долю РНК в клетке млекопитающих приходится несколько процентов ее сухой массы; из них лишь около 3–5% составляет мРНК. Все остальное — это не успевшие деградировать последовательности интронов, но большая часть находящейся в клетках РНК выполняет структурные и каталитические функции (см. таблицу 6.1, **стр. 336**). Наиболее обильно представлены в клетках рибосомные РНК (рРНК), составляющие приблизительно 80% РНК в быстро делящихся клетках. Как мы покажем позже в этой главе, эти РНК формируют каркас рибосомы. В отличие от бактерий, у которых одна-единственная РНК-полимераза синтезирует все находящиеся в распоряжении клетки РНК, эукариоты имеют отдельную, специализированную полимеразу, РНК-полимеразу I, которая предназначена для создания молекул рРНК. РНК-полимераза I подобна в структурном отношении РНК-полимеразе II, рассмотренной нами ранее; однако отсутствие С-концевого хвоста в полимеразе I помогает объяснить тот факт, что ее транскрипты не кэпированы и не полиаденилированы. Как было упомянуто ранее, это и помогает клетке проводить различие между некодирующими РНК и молекулами мРНК.

Поскольку многократные циклы трансляции каждой молекулы мРНК могут значительно приумножить производство молекул белка, постольку многие из тех белков, что пребывают в клетке в большом количестве, могут быть синтезированы с генов, которые присутствуют в виде одной-единственной копии на гаплоидный геном. Напротив, РНК-компоненты рибосомы являются конечными продуктами гена, и растущая клетка млекопитающих должна синтезировать приблизительно по 10 миллионов копий каждого типа рибосомной РНК в каждом поколении клеток,

чтобы построить свои 10 миллионов рибосом. Клетка способна произвести адекватные количества молекул рибосомной РНК только потому, что она содержит множественные копии **генов рРНК**, которые кодируют рибосомные РНК (**рРНК**). Даже *E. coli* нужно семь копий генов рРНК, чтобы обеспечить свои потребности в рибосомах. В гаплоидном наборе клетки человека содержится приблизительно 200 копий генов рРНК, распределенных маленькими кластерами на пяти разных хромосомах (см. рис. 4.11), тогда как клетки лягушки *Xenopus* содержат приблизительно 600 копий генов рРНК на гаплоидный геном в виде единого кластера на одной хромосоме (**рис. 6.41**).



Рис. 6.41. Транскрипция тандемно расположенных генов рРНК, наблюдаемая в электронный микроскоп. Отчетливо видно чередование транскрибируемых генов и нетранскрибируемых спейсерных участков. Изображение генов рРНК при более высоком увеличении представлено на рис. 6.9. (Заимствовано из V.E. Foe, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42: 723–740, 1978. С разрешения Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

У эукариот четыре типа рРНК, каждый присутствует в виде одной копии на одну рибосому. Три из этих четырех типов рРНК (18S, 5,8S и 28S) произведены путем химической модификации и расщепления единой крупной молекулы рРНК-предшественника (**рис. 6.42**); четвертый (5S РНК) синтезируется с отдельного генного кластера иной полимеразой (РНК-полимеразой III) и не требует химической модификации.

Обширные химические модификации происходят в 13000-нуклеотидном предшественнике рРНК, прежде чем молекулы рРНК будут вырезаны из него и упакованы в рибосомы. В число таких модификаций входит метилирование около 100 нуклеотидов по позиции 2'-ОН рибозы и изомеризация 100 нуклеотидов уридин в псевдоуридин (**рис. 6.43, а**). Функциональная роль этих модификаций еще не известна во всех подробностях, но многие из них, вероятно, помогают на этапах сворачивания и сборки молекул рРНК в их окончательную форму, а некоторые могут слегка изменять функции рибосом. Каждая модификация осуществляется в определенной позиции рРНК-предшественника. Эти позиции задаются примерно 150 направляющими РНК, или «гид-РНК» (guide RNAs), которые размещаются в нужных положениях за счет спаривания с основаниями рРНК-предшественника и таким образом подводят РНК-модифицирующие ферменты к надлежащим позициям

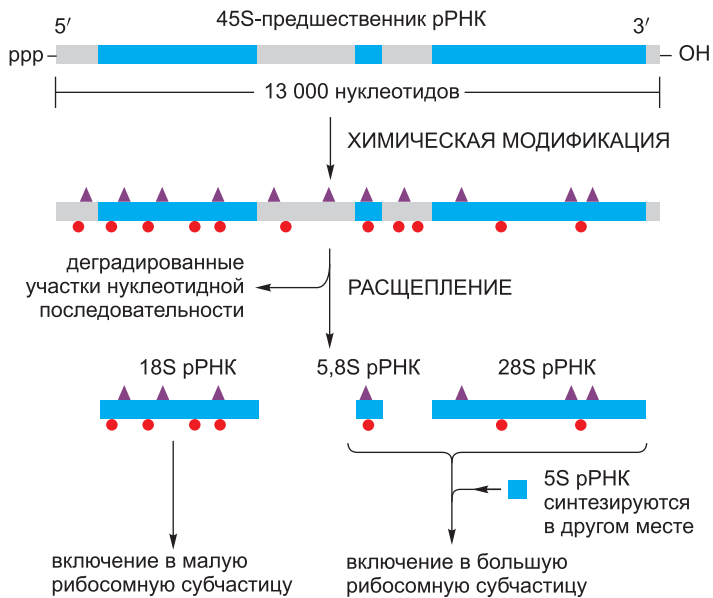


Рис. 6.42. Химическая модификация и нуклеолитический процессинг молекулы 45 S предшественника эукариотической рРНК с образованием трех рибосомных РНК. Два типа химической модификации (обозначены разными цветами, как и на рис. 6.43) предшественника рРНК происходят до его расщепления. Почти половина последовательностей нуклеотидов в этом рРНК-предшественнике отбрасывается и подвергается деградации в ядре. Рибосомные РНК называют согласно присущей им величине S, которая отражает скорость их седиментации при ультрацентрифугировании. Чем больше величина S, тем крупнее рРНК.

(рис. 6.43, б). Другие направляющие РНК способствуют расщеплению предшественников рРНК на зрелые рРНК, вероятно, путем наведения конформационных изменений в предшественнике, в результате чего участки расщепления становятся открытыми для нуклеаз. Все эти направляющие РНК имеют «членство в солидном клубе» молекул РНК, именуемых **малыми ядрышковыми РНК (spoРНК; small nucleolar RNAs)**, названными так потому, что такие РНК выполняют свои функции в субкомпартементе ядра, называемом ядрышком. Многие spoРНК закодированы в интронах других генов, в особенности тех, что кодируют рибосомные белки. Поэтому они синтезируются РНК-полимеразой II и процессируются из вырезанных последовательностей интронов.

Недавно идентифицировано несколько spoРНК-подобных видов РНК, которые синтезируются только в клетках мозга. Они, как полагают, направляют модификацию молекул мРНК, а не рРНК, и, по всей вероятности, представляют новый, но плохо изученный тип регуляторного механизма генной экспрессии.

6.1.23. Ядрышко — фабрика по производству рибосом

При наблюдении ядерной клетки в световой микроскоп наиболее отчетливо видимой структурой является ядрышко, находящееся в ядре. Вследствие этого оно столь скрупулезно исследовалось первыми цитологами, что типичный обзорный труд за 1898 г. мог пестреть ссылками аж на 700 источников. Сейчас нам известно, что ядрышко — участок процессинга молекул рРНК и их сборки в субчастицы рибосом.

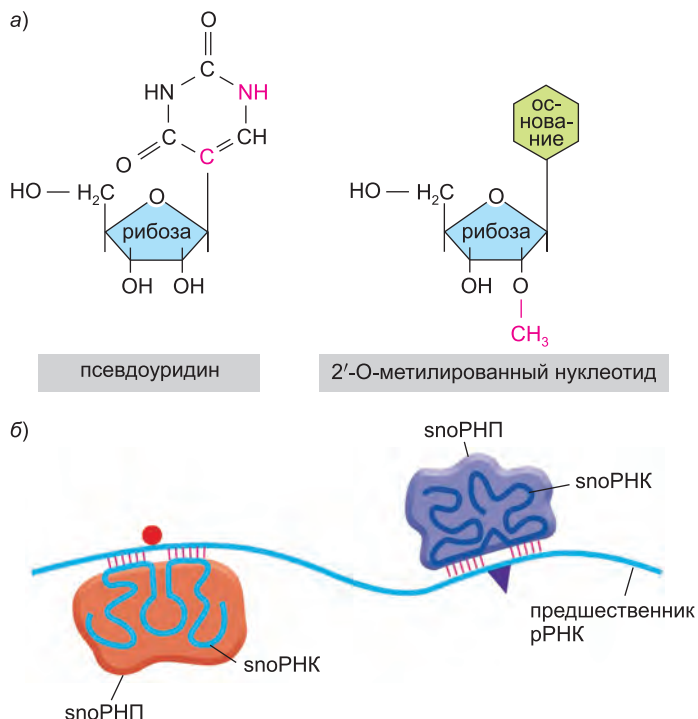


Рис. 6.43. Модификации предшественника рРНКс помощью направляющих РНК. а) После синтеза рРНК происходят две отчетливые ковалентные модификации; отличия от изначально включенных в цепь нуклеотидов отражены *красным* цветом атомов. Псевдоуридин представляет собой изомер уридина; основание «повернуто» относительно сахара. б) Как показано, молекулы snoРНК определяют участки модификации путем спаривания оснований с комплементарными последовательностями на предшественнике рРНК. Молекулы snoРНК связаны с белками, и такие комплексы называют snoРНП. Молекулы snoРНП содержат и направляющие последовательности, и ферменты, которые модифицируют рРНК.

В отличие от многих главных органелл клетки, ядрышко не охвачено мембраной (**рис. 6.44**); вместо этого, оно представляет собой огромную совокупность макромолекул, в которую входят: сами гены рРНК, предшественники рРНК, зрелые рРНК, рРНК-процессирующие ферменты, snoРНП, рибосомные белки и частично собранные рибосомы. Плотное скопление всех этих компонентов предположительно способствует быстрому и гладкому протеканию сборки рибосом.

Основную партию в химическом и структурном ансамблях ядрышка исполняют молекулы РНК разных видов, что наводит на мысль о том, что оно, возможно, эволюционировало от древней структуры, находящейся в клетках, где господствовала власть РНК-катализа. В современных клетках важную роль в формировании ядрышка играют также и гены рРНК. В диплоидной клетке человека гены рРНК распределены по 10 кластерам, расположенным у концов пяти различных пар хромосом (см. рис. 4.11). Во время интерфазы эти 10 хромосом вносят свой вклад в ядрышко петлями ДНК (содержащими гены рРНК); во время М-фазы, когда хромосомы уплотняются, ядрышко исчезает. Наконец, в телофазный период митоза, когда хромосомы возвращаются к своему полурассредоточенному состоянию, концы этих 10 хромосом объединяются и ядрышко вновь образуется (**рис. 6.45** и **6.46**).

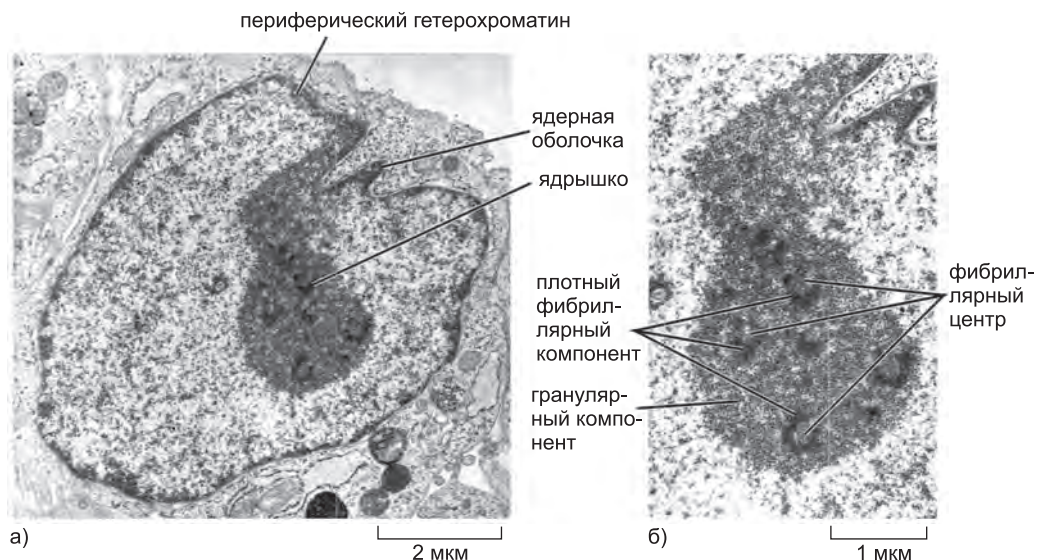


Рис. 6.44. Электронный микрофотоснимок тонкого среза ядрышка в фибробласте человека; в ядрышке видны три разные зоны. а) Снимок всего ядра в целом. б) Высокоразрешающее изображение ядрышка. Полагают, что транскрипция генов рРНК происходит между фибриллярным центром и плотным фибриллярным компонентом и что процессинг молекул рРНК и их сборка в две субъединицы рибосомы протекает в направлении от плотного фибриллярного компонента к окружающим его гранулярным компонентам. (Снимки любезно предоставлены E. G. Jordan и J. McGovern.)

Для этого процесса необходима транскрипция генов рРНК РНК-полимеразой I. Как можно ожидать, размер ядрышка отражает число рибосом, производимых клеткой. Поэтому его размер варьирует в очень широких пределах в разных клетках и может изменяться в одной и той же клетке, занимая до 25% от всего объема ядра в тех клетках, что заняты производством необычно больших количеств белка.

Сборка рибосомы — сложный процесс, самые важные особенности которого приведены на [рис. 6.47](#). Вдобавок к своей важной роли в биогенезе рибосом, ядрышко служит также местом, где производятся другие РНК и собираются другие РНК-белковые комплексы. Например, U6 snРНК, который выполняет свою задачу в пре-мРНК-сплайсинге (см. [рис. 6.29](#)), состоит из одной молекулы РНК и, по крайней мере, семи белков. Перед окончательной сборкой в U6 snРНК молекула U6 snРНК в ядрышке химически модифицируется с помощью snoРНК. Другие важные РНК-белковые комплексы, к коим мы отнесем теломеразу (мы с ней встречались в главе 5) и частицу узнавания сигнала (которую мы обсудим в главе 12), как полагают, тоже собираются в ядрышке. Наконец, молекулы тРНК (транспортных РНК), которые несут аминокислоты для синтеза белка, процессируются тоже там; подобно генам рРНК, те, что кодируют молекулы тРНК, сгруппированы в ядрышке. Таким образом, ядрышко можно рассматривать как большую фабрику, на которой многие различные некодирующие РНК транскрибируются, процессируются и собираются вместе с белками, образуя в итоге все наблюдаемое нами многообразие рибонуклеопротеидных комплексов.

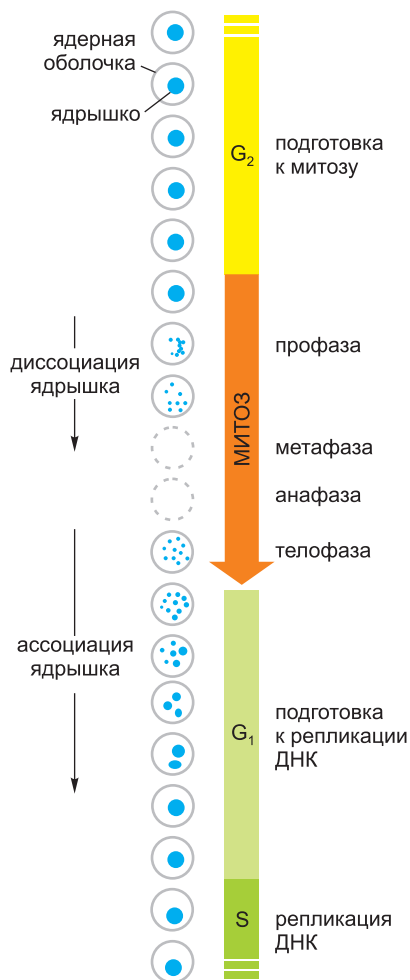


Рис. 6.45. Внешний вид ядрышка в клетке человека изменяется на разных стадиях клеточного цикла. На этой схеме представлено только ядро клетки. В большинстве клеток эукариот ядерная оболочка распадается во время митоза, что показано штриховыми окружностями.

6.1.24. Ядро содержит множество различных субъядерных структур

Хотя ядрышко — самая заметная структура в ядре, несколько других ядерных телец тоже обнаружено и исследовано (рис. 6.48). К ним относятся тельца Кахалья (названы по имени ученого, который впервые описал их в 1906 г.), GEMS (Gemini of Cajal body; близнецы телец Кахалья) и кластеры интерхроматиновых гранул (называемые также «крапинками»). Подобно ядрышку, все эти ядерные структуры не имеют мембран и достаточно динамичны; их появление, вероятно, связано с плотным скоплением белковых и РНК-компонентов, участвующих в синтезе, сборке и хранении макромолекул, а также в экспрессии генов. Тельца Кахалья и GEMS схожи друг с другом и часто объединяются в пары, дрейфующие в ядре; еще до конца не ясно, представляют ли они разные или тождественные структуры. Они, наиболее вероятно, служат местами, в которых молекулы snРНК и sРНК подвергаются ковалентным модификациям и заключительной сборке вместе с белками. Группа направляющих РНК, названных *малыми РНК телец Кахалья* (*small Cajal RNAs; scaРНК*), путем спаривания осно-

ваний выбирает участки для этих модификаций. Тельца Кахалья и GEMS могут также быть участками, в которых snРНК возвращаются в оборот и находящиеся в них молекулы РН «исходное состояние» после перестроек, происходивших во время сплайсинга (см. стр. 352). Напротив, скопления интерхроматиновых гранул, предположительно, служат запасниками полностью созревших snРНК и прочих компонентов РНК-процессинга, которые готовы к использованию для производства мРНК (рис. 6.49).

Ученым пришлось преодолеть много трудностей, чтобы установить функции этих маленьких субъядерных структур, отчасти потому, что их облик отличается у разных организмов и может резко изменяться на протяжении клеточного цикла или при изменениях в окружающей клетку среде. По большей части прогресс, происходящий в наши дни, зависит от генетических средств — наблюдения воздействий спланированных мутаций в опытных организмах или самопроизвольных мутаций у людей. В качестве одного примера скажем, что GEMS содержат белок SMN (survival of motor neurons; выживания двигательных нейронов). Некоторые мутации гена, кодирующего этот белок, являются причиной наследственной спин-

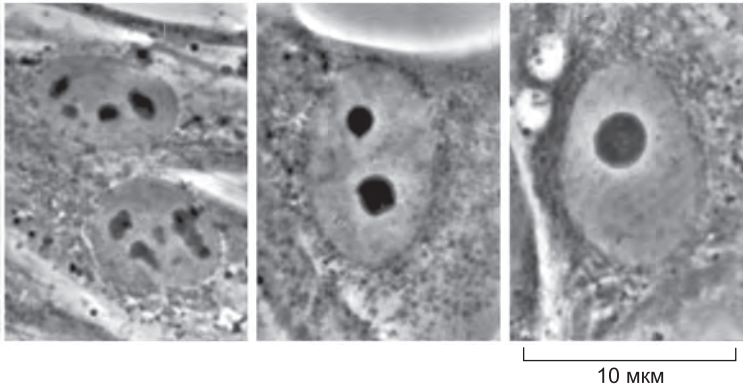


Рис. 6.46. Слияние ядрышек. На этих полученных при помощи светового микроскопа снимках фибробластов человека, выращенных в культуре, показаны различные этапы слияния ядрышек. После митоза каждая из 10 хромосом человека, несущих группу генов рРНК, начинает формировать крошечное ядрышко, но они быстро соединяются по мере их роста и образуют единое большое ядрышко, характерное для многих клеток в период интерфазы. (Снимки любезно предоставлены E. G. Jordan и J. McGovern.)

номозговой мышечной атрофии — болезни человека, характеризующейся потерей двигательной способности мышц. Эта болезнь, кажется, обусловлена нарушением производства snРНК. Более полная потеря snРНК, вероятнее всего, окажется смертельной.

Ввиду столь важного значения ядерных субдоменов в процессинге РНК следовало бы ожидать, что пре-мРНК-сплайсинг будет происходить в специфическом участке ядра, поскольку для его протекания требуются многочисленные РНК- и белковые компоненты. Однако сборка занимающихся сплайсингом компонентов на пре-мРНК сопряжена с транскрипцией, или происходит сотранскрипционно; таким образом, сплайсинг должен происходить на многих участках хромосомы. Хотя типичная клетка млекопитающих может экспрессировать порядка 15 000 генов, транскрипция и сплайсинг РНК могут быть ограничены несколькими тысячами участков в ядре. Сами эти участки являются очень динамичными и, вероятно, появляются в результате объединения компонентов транскрипции и сплайсинга, с тем чтобы создать маленькие «сборочные линии» с высокой локальной концентрацией этих компонентов. Кластеры интерхроматиновых гранул — которые содержат резервы РНК-процессирующих компонентов — часто наблюдаются рядом с участками транскрипции, они всегда готовы обеспечить полноценное снабжение процесса. Таким образом, ядро видится нам высокоорганизованным и разбитым на специализированные субдомены, при этом snРНК, snoРНК и другие ядерные компоненты перемещаются между ними в организованном порядке сообразно с потребностями клетки (см. рис. 6.48; также см. рис. 4.69).

Заключение

Прежде чем начнется синтез того или иного белка, должна быть транскрибирована соответствующая молекула мРНК. Бактерии содержат РНК-полимеразу (фермент, который выполняет транскрипцию ДНК в РНК) одного типа. Этот фермент запускает транскрипцию на промоторе, синтезирует

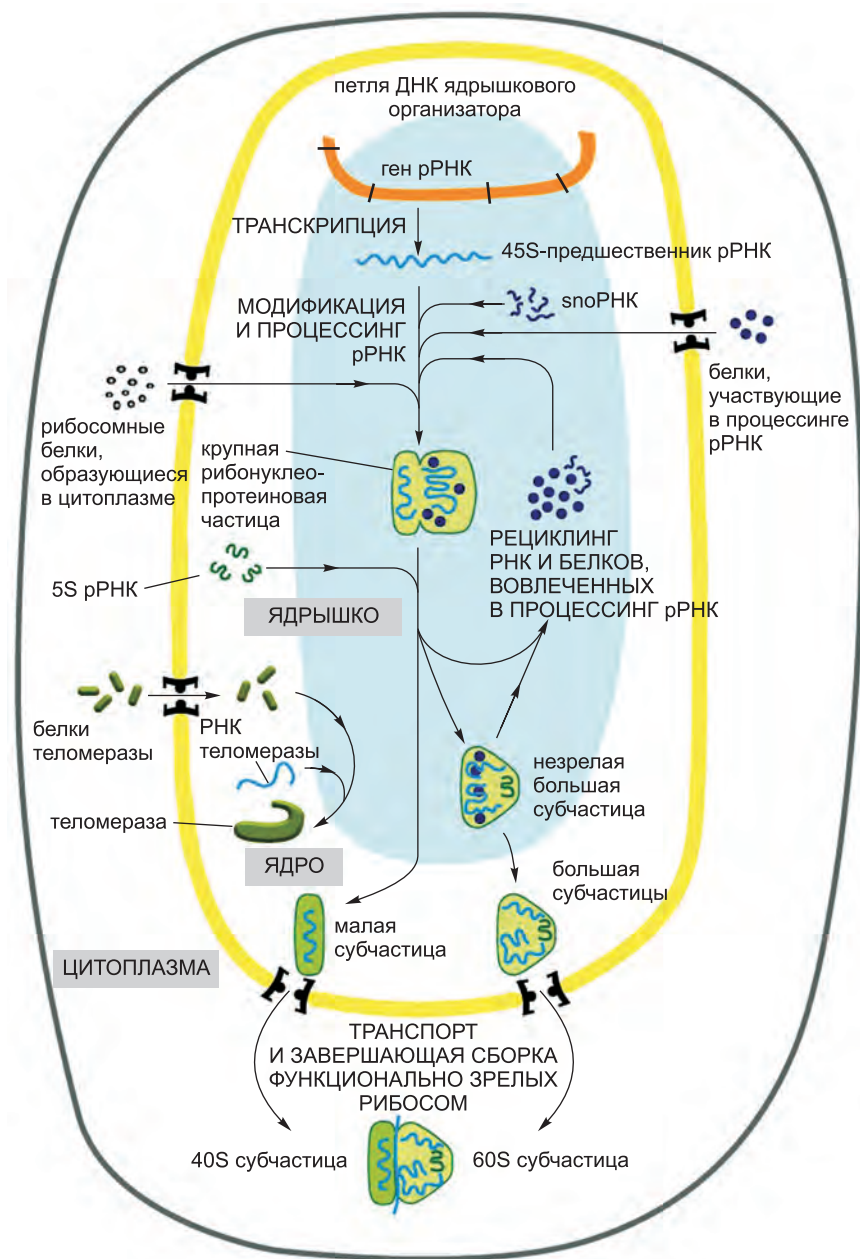


Рис. 6.47. Функция ядрышка, а именно: синтез рибосом и прочих рибонуклеопротеидов. Предшественник рРНК размером 45S упакован в большой рибонуклеопротеид, содержащий много рибосомных белков, импортированных из цитоплазмы. В то время как эта частица остается в ядрышке, одни части добавляются, а другие отбрасываются по мере ее процессирования в незрелые большую и малую субчастицы рибосомы. Две такие субчастицы рибосомы, как думают, достигают своей окончательной функционально активной формы только тогда, когда каждая из них в отдельности переносится через ядерные поры в цитоплазму. Другие рибонуклеопротеидные комплексы, в том числе изображенная на данной схеме теломераза, также собираются в ядрышке.

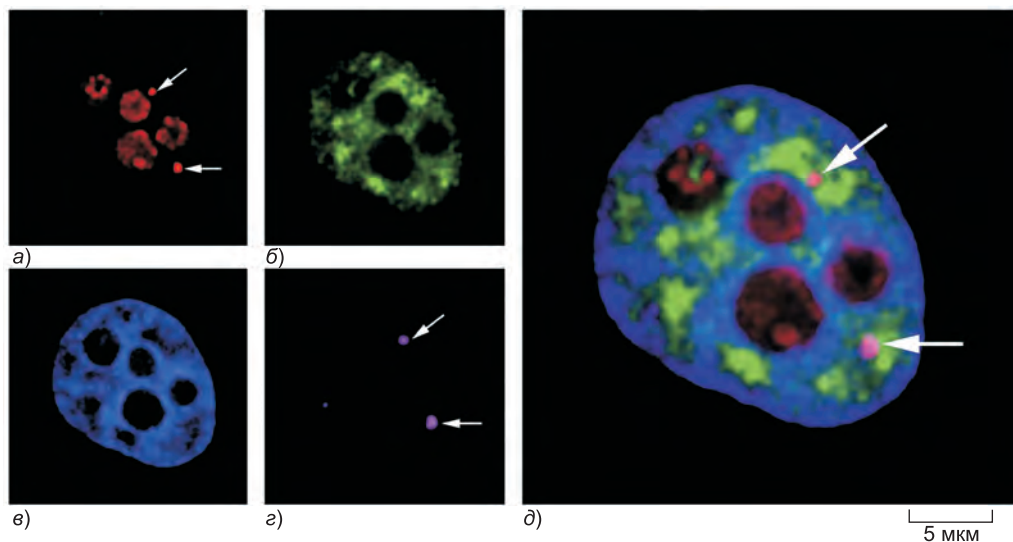


Рис. 6.48. Наглядное представление некоторых крупных ядерных тел. а–г) Микрофотографии одного и того же ядра клетки человека, причем препараты обработаны таким образом, чтобы в каждом из них проявился определенный набор ядерных структур. д) Все четыре изображения, увеличенные и наложенные друг на друга. а) Показана локализация белка фибрилларина (компонент нескольких видов snRNP), который присутствует и в ядрышках, и в тельцах Кахаля (последние обозначены стрелками). б) Показаны кластеры интерхроматиновых гранул, или «крапинок», обнаруженных путем использования антител к белку, участвующему в сплайсинге пре-мРНК. в) Препарат окрашен так, чтобы выявить основную массу хроматина. г) Показано местоположение белка коилина, который присутствует в тельцах Кахаля (стрелки; см. также рис. 4.67). (Заимствовано из J. R. Swedlow and A. I. Lamond, *Gen. Biol.* 2: 1–7, 2001. С любезного разрешения BioMed Central. За микрофотоснимки мы благодарим Judith Sleeman.)

РНК элонгацией цепи, останавливает транскрипцию на терминаторе и высвобождает и матрицу ДНК, и законченную молекулу мРНК. В клетках эукариот процесс транскрипции намного сложнее, и поэтому у них три РНК-полимеразы: I, II и III, — которые эволюционно родственны друг другу и бактериальной полимеразе.

РНК-полимераза II синтезирует мРНК эукариот. Этот фермент требует ряда вспомогательных белков — общих факторов транскрипции — для инициации транскрипции на очищенной матрице ДНК и еще больше белков (включая комплексы перестройки хроматина и гистон-модифицирующие ферменты) для инициации транскрипции на хроматиновых матрицах в клетке.

В период фазы элонгации транскрипции возникающая РНК подвергается событиям процессинга трех типов: специальный нуклеотид присоединяется к ее 5'-концу (кэпирование), последовательности интронов удаляются из внутренних частей молекулы РНК (сплайсинг) и формируется 3'-конец РНК (расщепление и полиаденилирование). Каждый из этих процессов запускается белками, которые путешествуют вместе с РНК-полимеразой II, связавшись с участками на ее длинном, выступающем наружу С-конце. Необычность сплайсинга состоит в том, что многие из его ключевых шагов выполняются специализированными молекулами РНК, а не белками. Правильно процессированные молекулы мРНК

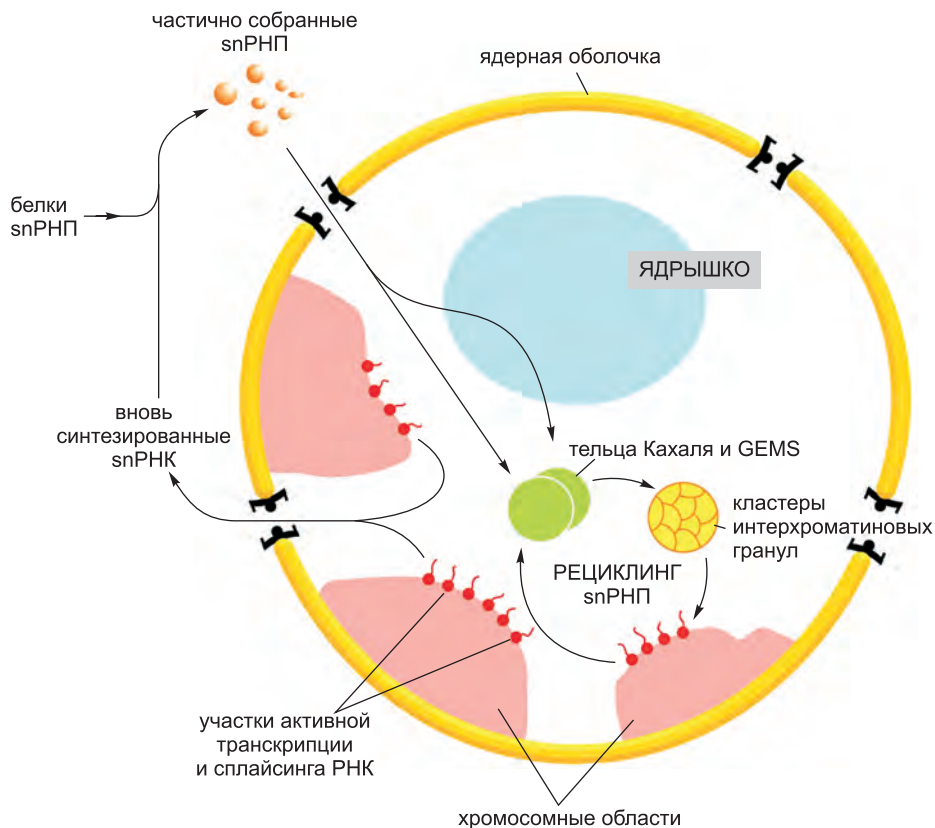


Рис. 6.49. Схематическое представление субъядерных структур. Типичное ядро позвоночного содержит несколько телец Кахаля, которые, предположительно, служат участками, где snРНК и snoРНК подвергаются заключительным модификациям. Скопления интерхроматиновых гранул, предположительно, являются местами хранения полностью зрелых snРНК. Типичное ядро позвоночных имеет 20–50 скоплений интерхроматиновых гранул.

После своего первичного синтеза молекулы snРНК экспортируются из ядра, чтобы подвергнуться обработке 5'- и 3'-концов и быть собранными вместе с семью общими белками snРНК (названными белками Sm). Эти комплексы импортируются обратно в ядро, и snРНК подвергаются заключительной модификации молекулами snoРНК в тельцах Кахаля. Кроме того, snoРНК химически модифицируют U6 snРНК в ядрышке. Места активной транскрипции и сплайсинга (приблизительно 2 000–3 000 участков в одном ядре позвоночных) соответствуют «перихроматиновым фибриллам», наблюдаемым в электронный микроскоп. (Переработано из J. D. Lewis and D. Tollervy, *Science* 288: 1385–1389, 2000. С любезного разрешения издательства AAAS.)

проходят через ядерные поровые комплексы в цитозоль, где транслируются в белок.

Конечным продуктом некоторых генов является РНК. У эукариот такие гены обычно транскрибируются или РНК-полимеразой I, или РНК-полимеразой III. РНК-полимераза I производит рибосомные РНК. После синтеза в виде большого предшественника молекулы пре-рРНК подвергаются химической модификации, расщеплению и уже в виде рРНК — сборке в две рибосомные субъединицы. Все эти процессы происходят в ядрышке — обособленной субъ-

дерной структуре, которая помогает процессировать также и некоторые РНК-белковые комплексы меньшего размера. Дополнительные субъядерные структуры (включая тельца Кахала и кластеры интерхроматиновых гранул) служат участками, в которых компоненты, вовлеченные в процессинг РНК, собираются, хранятся и вновь запускаются в оборот.

6.2. От РНК к белку

В предыдущем параграфе мы узнали, что конечным продуктом некоторых генов являются сами молекулы РНК — такие как входящие в состав snРНК и рибосом. Однако в большинстве своем находящиеся в клетке гены производят молекулы мРНК, которые служат посредниками на пути к белкам. В этом параграфе мы изучим вопрос о том, как клетка преобразует заложенную в молекуле мРНК информацию в молекулу белка. Это «чудо перевода» было в центре внимания биологов в конце 1950-х гг., когда задача его разгадки называлась «проблемой кодирования»: как информация в линейной последовательности нуклеотидов РНК переводится, или транслируется, в линейную последовательность из набора совершенно инородных в химическом отношении единиц — аминокислот в белках? Этот занимательный вопрос будоражил умы ученых того времени. Перед ними была тайнопись, задуманная природой, которую по прошествии более чем 3 миллиардов лет эволюции мог, наконец, расшифровать один из ее продуктов — человек. И действительно, не только сам код был взломан шаг за шагом, но и в году 2000-м структура сложнейшей машины, при помощи которой клетки считывают этот код, — рибосомы — была, наконец, определена с точностью до отдельных атомов.

6.2.1. Последовательность мРНК «расшифровывается» группами по три нуклеотида

Как только мРНК будет получена в ходе транскрипции и процессинга, информация, заложенная в ее нуклеотидной последовательности, может быть использована для синтеза белка. Транскрипцию можно легко понять как средство передачи информации: так как ДНК и РНК в химическом и структурном отношении подобны, ДНК может служить прямой матрицей для синтеза РНК за счет комплементарного спаривания оснований. Как буквально означает термин *транскрипция*², ее можно представить как переписывание начертанного рукой сообщения, скажем, в машинописный текст. Сам язык и форма сообщения не изменяются, а употребляемые в первом и втором случаях символы весьма схожи.

Напротив, преобразование информации из формы РНК в форму белка представляет собой «перевод», или **трансляцию (translation)**, информации на другой язык, в котором применяются совершенно иные символы. Более того, поскольку в мРНК существует только 4 разных нуклеотида, а в белке 20 различных типов аминокислот, никак нельзя считать, что такой перевод основан на прямом соответствии между нуклеотидами в РНК и аминокислотами в белке. Нуклеотидная последовательность гена, через посредничество мРНК, транслируется в аминокислотную последовательность белка при помощи правил, которые в своей совокупности известны как **генетический код (genetic code)**. Этот код был расшифрован в начале 1960-х гг.

² От лат. *transcriptio* — переписывание. — Прим. перев.

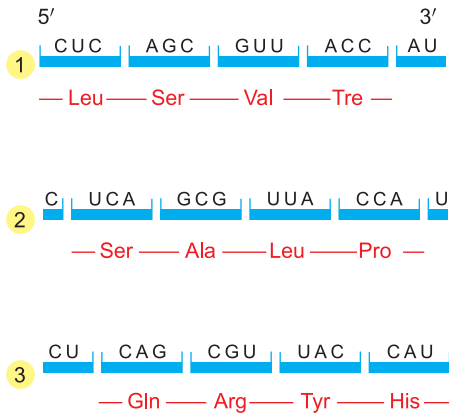


Рис. 6.51. Три возможные рамки считывания при синтезе белка. В процессе трансляции последовательности нуклеотидов (*синяя*) в последовательность аминокислот (*красная*) нуклеотидная последовательность молекулы мРНК считывается в направлении от 5'-конца к 3'-концу последовательными группами по три нуклеотида. Поэтому, в принципе, одна и та же последовательность РНК может «описывать» три совершенно разные последовательности аминокислот — в зависимости от выбранной рамки считывания. Однако в действительности только одна из таких рамок считывания служит «ключом к настоящему сообщению».

молекул-адапторов, которые могут распознавать кодон и связываться и с кодоном, и — другим участком их поверхности — с аминокислотой. Такие стыковочные переходники представлены набором маленьких молекул РНК, известных под именем **транспортных РНК (тРНК; transport RNA)**, около 80 нуклеотидов длиной каждая.

Ранее в этой главе мы обнаружили, что молекулы РНК могут складываться в точные трехмерные структуры, и молекулы тРНК являют нам яркий пример такой способности. Четыре коротких сегмента свернутой тРНК являются двухцепочечными, за счет чего образуется молекула, напоминающая собой клеверный лист, если ее изобразить схематично (**рис. 6.52**). Например, последовательность 5'—GCUC—3' в одной части полинуклеотидной цепи может достаточно сильно взаимодействовать с последовательностью 5'—GAGC—3' в другой области той же молекулы. Такой трилистник подвергается дальнейшему фолдингу с образованием компактной L-образной структуры, которая скрепляется в таком виде дополнительными водородными связями между различными областями молекулы.

Две области неспаренных нуклеотидов, расположенные на двух концах L-образной молекулы, имеют определяюще важное значение для участия тРНК в синтезе белка. Одна из этих областей образует **антикодон (anticodon)** — группу из трех последовательных нуклеотидов, которая спаривается с комплементарным ей кодоном в молекуле мРНК. Другая — короткая одноцепочечная область на 3'-конце молекулы; это участок, в котором аминокислота, соответствующая данному кодону, прикрепляется к тРНК.

В предыдущем пункте мы убедились, что генетический код избыточен, то есть одна и та же аминокислота может быть «записана» несколькими разными кодонами (поэтому генетический код называют *вырожденным*; см. рис. 6.50). Эта избыточность подразумевает, что либо для многих аминокислот есть не одна, а несколько тРНК, либо некоторые молекулы тРНК могут спариваться основаниями не

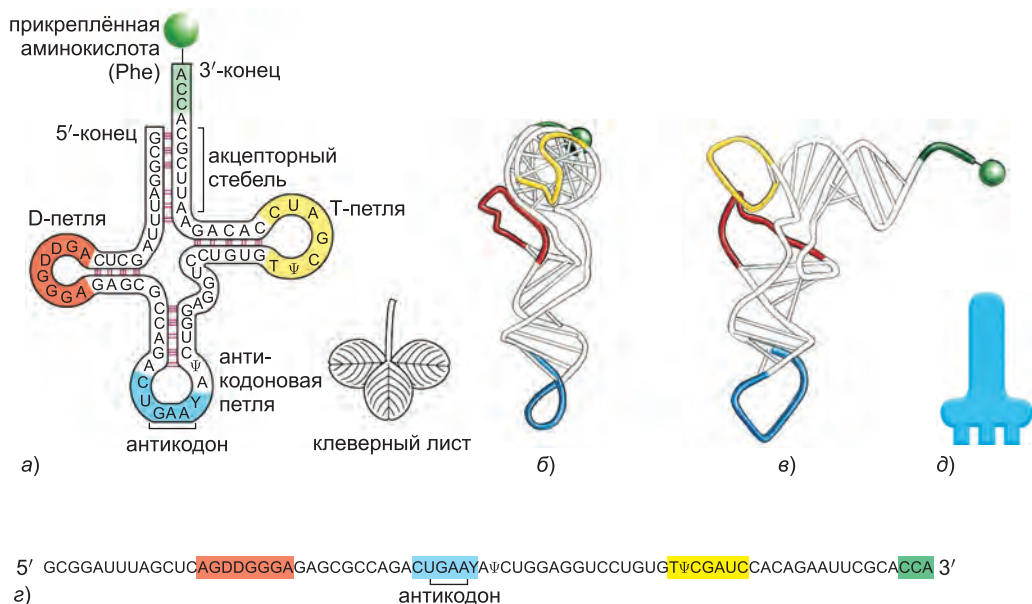
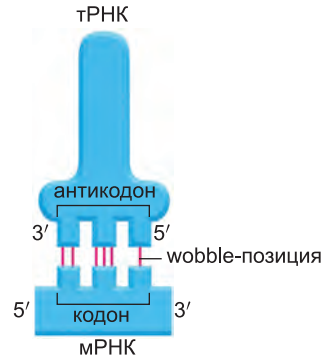


Рис. 6.52. Молекула тРНК. тРНК, специфичная к аминокислоте фенилаланину (Phe), изображена различными способами. а) Структура «клеверного листа», показывающая комплементарное спаривание оснований (красные линии), которые создают в молекуле двухцепочечные области. Антикодон представляет собой последовательность из трех нуклеотидов, которая спаривается с основаниями кодона в мРНК. Аминокислота, соответствующая паре кодон–антикодон, прикреплена к 3'-концу тРНК. Молекулы тРНК содержат некоторые необычные основания, которые создаются путем химической модификации тРНК после ее синтеза. Например, основания, обозначенные буквами ψ (псевдоуридин — см. рис. 6.43) и D (дигидроуридин — см. рис. 6.55), являются производными урацила. б и в) Проекция L-образной молекулы представлены на основании данных рентгеноструктурного анализа. Хотя эта схема показывает тРНК для аминокислоты фенилаланина, все остальные тРНК обладают подобной структурой. г) Линейная последовательность нуклеотидов молекулы, с цветной кодировкой, общей для изображений а, б и в. д) Символическое изображение тРНК, которое мы используем в этой книге.

с одним, а с несколькими кодонами. Фактически верны оба варианта. Некоторые аминокислоты имеют более одной тРНК, а некоторые тРНК устроены таким образом, что требуют точного спаривания оснований только в первых двух позициях кодона и толерантны к неоднозначности соответствия, или раскачиванию (*wobble*), в третьей позиции (рис. 6.53). Такое нестрогое спаривание оснований объясняет, почему столь многочисленные альтернативные кодоны для какой-либо одной аминокислоты отличаются только своим третьим нуклеотидом (см. рис. 6.50). У бактерий неоднозначное соответствие при спаривании оснований позволяет соотнести 20 аминокислот с 61 кодоном при «посредничестве» лишь 31 вида молекул тРНК. Однако точное число разных видов тРНК отличается у организмов разных биологических видов. Например, человек имеет почти 500 генов тРНК, но в их числе представлено лишь только 48 разных антикодонов.

Рис. 6.53. Неоднозначное соответствие при спаривании оснований между кодонами и антикодонами. Если нуклеотид, стоящий в первом столбце, находится в третьем, или «раскачанном» положении кодона (*wobble*-позиция), он может спариться основанием с любым из нуклеотидов, поставленных во второй столбец. Так, например, когда инозин (I) находится в *wobble*-позиции антикодона тРНК, тРНК может распознать любой из трех разных кодонов у бактерий и любой из двух кодонов у эукариот. Инозин в молекулах тРНК образуется в результате дезаминирования гуанина (см. рис. 6.55) — химической модификации, которая происходит в тРНК после ее синтеза. Неканонические пары оснований, а в их числе и те, что образуются с инозином, обычно «слабее», чем канонические пары оснований. Обратите внимание, что спаривание оснований кодон–антикодон является более строгим в позициях 1 и 2 кодона: в них допускаются только классические пары оснований. Различия во взаимодействиях между парами оснований в *wobble*-позиции, наблюдаемые между бактериями и эукариотами, возможно, проистекают из тонких структурных различий между бактериальными и эукариотическими рибосомами — молекулярными машинами, которые выполняют синтез белка. (Переработано на основе С. Guthrie and J. Abelson в *The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression*, стр. 487–528. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.)



бактерии

основание в <i>wobble</i> -позиции кодона	возможные основания антикодона
U	A, G или I
C	G или I
A	U или I
G	C или U

эукариоты

основание в <i>wobble</i> -позиции кодона	возможные основания антикодона
U	A, G или I
C	G или I
A	U
G	C

6.2.3. Прежде чем выйти из ядра, молекулы тРНК ковалентно модифицируются

Подобно большинству других видов РНК эукариот, молекулы тРНК ковалентно модифицируются, прежде чем им будет позволено выйти за пределы ядра. Молекулы тРНК эукариот синтезируются РНК-полимеразой III. И у бактерий, и у эукариот молекулы тРНК обычно синтезируются в виде более крупных тРНК-предшественников, которые затем нарезаются на зрелые тРНК. Кроме того, некоторые тРНК-предшественники (как у бактерий, так и у эукариот) содержат интроны, которые должны быть вычленены. Эта реакция сплайсинга химически отличается от сплайсинга пре-мРНК; вместо того чтобы производить промежуточное звено в виде лассо, сплайсинг тРНК осуществляется по механизму «вырезания и вставки», который катализируется белками (рис. 6.54). Нарезание и сращивание требуют, чтобы тРНК-предшественник был правильно свернут в свою трилистниковидную конфигурацию. Поскольку неправильно сложенные тРНК-предшественники не смогут быть и правильно процессированы, реакции нарезания и сращивания, как думают, служат в некотором роде операциями проверки качества выпускаемых партий молекул тРНК.

Все молекулы тРНК химически модифицируются — почти 1 из 10 нуклеотидов в каждой зрелой молекуле тРНК оказывается видоизмененной версией стандартного

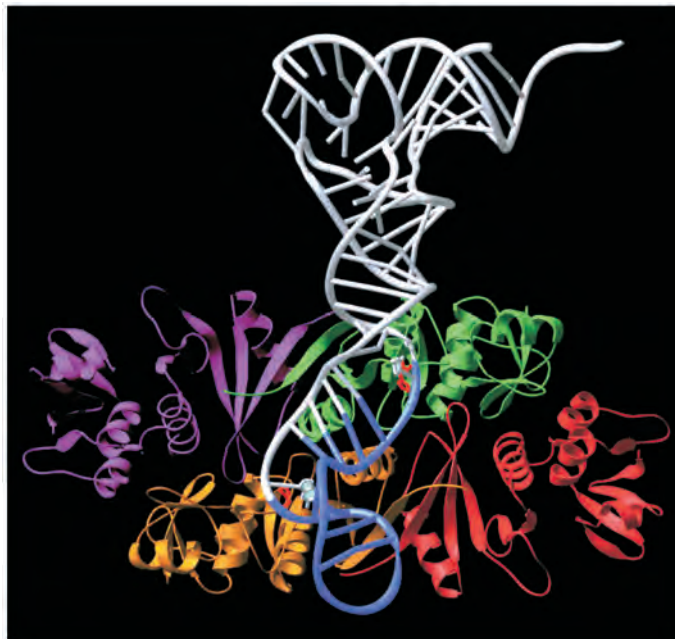
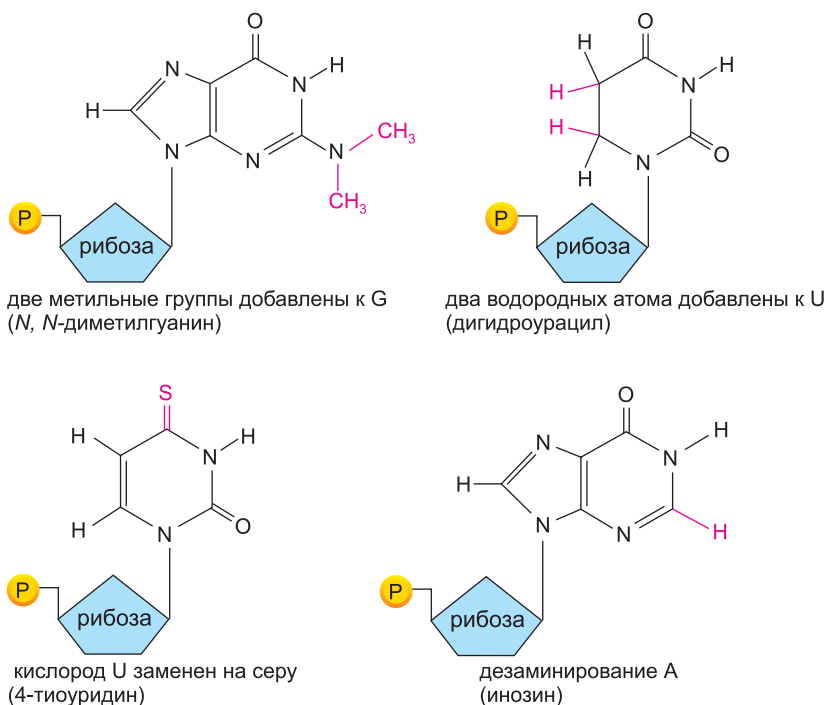


Рис. 6.54. Структура тРНК-сплайсирующей эндонуклеазы, состыкованной с тРНК-предшественником. Эндонуклеаза (фермент из четырех субъединиц) удаляет из тРНК интрон (синий). Затем второй фермент, многофункциональная тРНК-лигаза (не показана), соединяет обе половины тРНК друг с другом. (Изображение любезно предоставлено Hong Li, Christopher Trotta и John Abelson.)

рибонуклеотида G, U, C или A. Известно более 50 различных типов модификаций тРНК; некоторые из них представлены на рис. 6.55. Отдельные из модифицированных нуклеотидов — в особенности инозин, образующийся в результате дезаминирования аденозина, — затрагивают конформацию и свойства спаривания оснований антикодона и тем самым облегчают опознавание соответствующего кодона мРНК молекулой тРНК (см. рис. 6.53). Другие — влияют на точность, с которой тРНК присоединяется к верной аминокислоте.

6.2.4. Специфические ферменты прикрепляют каждую аминокислоту к соответствующей ей молекуле тРНК

Итак, мы узнали, что для считывания генетического кода в ДНК клетки производят ряд различных тРНК. Теперь мы посмотрим, как каждая молекула тРНК соединяется с одной аминокислотой из 20, которая является «предназначенной ей парой». Распознавание и прикрепление правильной аминокислоты зависит от ферментов, названных **аминоацил-тРНК-синтетазами (aminoacyl-t-RNA synthetases)**, которые ковалентно связывают каждую аминокислоту с соответствующим набором молекул тРНК (рис. 6.56 и 6.57). В большинстве клеток для каждой аминокислоты имеется отдельный фермент синтетаза (то есть всего 20 различных синтетаз); одна прикрепляет глицин ко всем тРНК, которые узнают кодоны, задающие глицин; другая — аланин ко всем тРНК, которые узнают кодоны для аланина, и так далее. Однако многие бактерии имеют менее 20 синтетаз, и один и тот же фермент синтетаза отвечает за прикрепление более чем одной аминокислоты к соответствующим тРНК. В подобных случаях одна синтетаза размещает идентичную аминокислоту на тРНК двух разных типов, только одна из которых имеет антикондон, который соответствует данной аминокислоте. Затем второй фермент химически модифицирует каждую «ошибочно» присоединенную аминокислоту, так что она приводится



две метильные группы добавлены к G
(N, N-диметилгуанин)

два водородных атома добавлены к U
(дигидроурацил)

кислород U заменен на серу
(4-тиоуридин)

дезаминирование A
(инозин)

Рис. 6.55. Некоторые необычные нуклеотиды, встречающиеся в молекулах тРНК. Эти нуклеотиды получают путем ковалентной модификации обычных нуклеотидов после их включения в цепь РНК. Два других типа модифицированных нуклеотидов изображены на рис. 6.43. В большинстве молекул тРНК около 10 % нуклеотидов представлены модифицированными вариантами (см. рис. 6.52).

в соответствие антикодону той тРНК, с которой ковалентно связана.

Катализируемая синтетазой реакция, в ходе которой аминокислота присоединяется к 3'-концу тРНК, есть одна из многих реакций, сопряженных с высвобождающей энергию гидролизом АТФ (см. **стр. 79–81**), в результате которой образуется высокоэнергетическая связь между тРНК и аминокислотой. Энергия этой связи используется на более позднем этапе, в синтезе белка, для ковалентного связывания аминокислоты с наращиваемой полипептидной цепью.

Ферменты аминоацил-тРНК-синтетазы и молекулы тРНК одинаково важны в процессе декодирования (**рис. 6.58**). Это было установлено при помощи эксперимента, в ходе которого одна аминокислота (цистеин) была химически преобразована в другую аминокислоту (аланин) после того, как она уже была присоединена к специфичной ей тРНК. Когда молекулы таких «гибридных» аминоацил-тРНК были использованы для синтеза белка в бесклеточной системе, неправильная аминокислота была вставлена во всех точках цепи белка, в которых та тРНК была использована. Хотя, как мы увидим, клетки имеют несколько механизмов проверки качества, чтобы избежать такого рода неполадок; результаты эксперимента свидетельствуют о том, что генетический код транслируется двумя наборами посредников, работающих последовательно один после другого. Каждый из них с большой специфичностью приводит в соответствие поверхность одной молекулы с поверхностью другой, и именно через их совместное действие пролегает связь

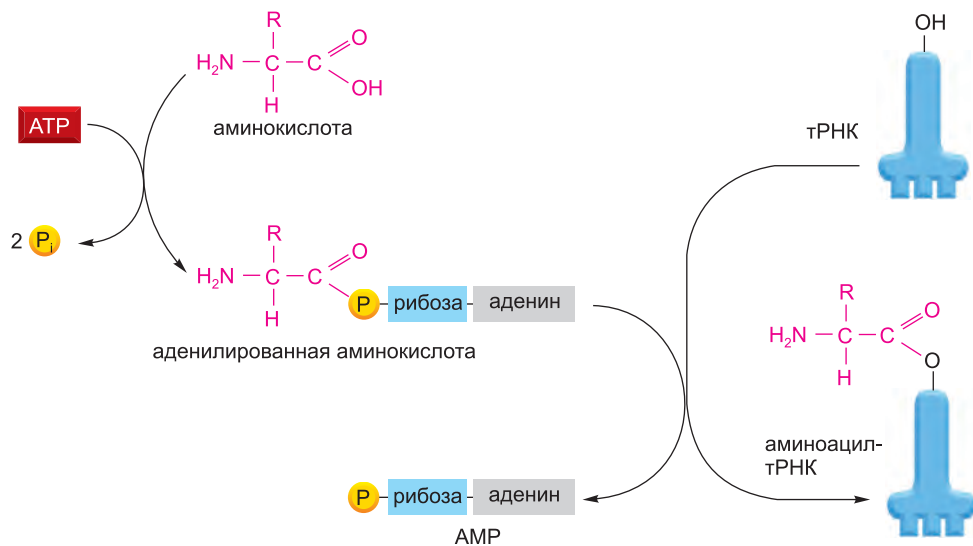


Рис. 6.56. Активация аминокислот. Аминокислота активируется для синтеза белка ферментом аминоксил-тРНК-синтетазой за два этапа. Как показано на схеме, все аминокислоты присоединяются к своим молекулам тРНК высокоэнергетической связью за счет энергии гидролиза АТФ. Аминокислота сначала активируется путем прямого соединения ее карбоксильной группы со звеном АМР с образованием *аденилированной аминокислоты*; связывание с АМР, обычно неблагоприятная реакция, осуществляется за счет гидролиза молекулы АТФ, которая и отдает АМР. Не оставляя фермент синтетазу, связанная с АМР карбоксильная группа аминокислоты затем переносится на гидроксильную группу сахара на 3'-конце молекулы тРНК. Посредством такого переноса аминокислота через активированную эфирную связь присоединяется к тРНК и образует конечную молекулу аминоксил-тРНК. Фермент синтетаза не показан на этой схеме.

между каждой последовательностью из трех нуклеотидов в молекуле мРНК — то есть каждого кодона — со специфической для него аминокислотой.

6.2.5. Редактирование РНК-синтетазами гарантирует точность

Несколько механизмов, работающих вместе, гарантируют, что тРНК-синтетаза связывает каждую тРНК с верной аминокислотой. Сначала синтетаза должна выбрать правильную аминокислоту — и большинство синтетаз делают это при помощи двухступенчатого механизма. Во-первых, правильная аминокислота имеет наиболее высокое сродство к «карману» активного участка своей синтетазы, а посему предпочитается остальным 19-ти. В частности, аминокислоты, которые крупнее надлежащей, эффективно изымаются из активного участка. Однако точно различить между собой две подобные аминокислоты, такие как изолейцин и валин (которые отличаются только метильной группой), весьма проблематично для одноступенчатого механизма распознавания. После того как аминокислота ковалентно связана с АМР, происходит второй этап «опознания» (см. рис. 6.56). Когда тРНК связывается с синтетазой, она пытается втолкнуть аминокислоту во второй карман синтетазы, точные размеры которого исключают правильную аминокислоту, но допускают введение близкородственных аминокислот. Как только аминокислота попадает в этот «редактирующий карман», ее связь с АМР гидролизуется (или связь с самой тРНК, если связь аминоксил-тРНК уже образовалась к тому времени) и она вы-

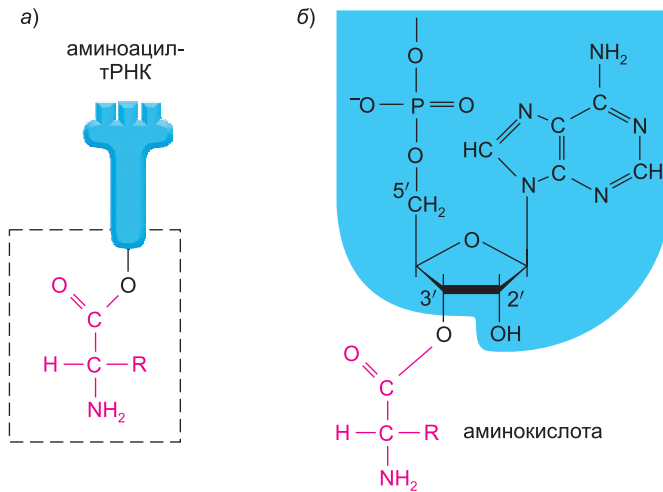


Рис. 6.57. Структура связи в комплексе аминоксил–тРНК. Карбоксильный конец аминокислоты образует эфирную связь с рибозой. Поскольку гидролиз этой эфирной связи сопряжен с большим благоприятным изменением свободной энергии, постольку аминокислота, удерживаемая таким образом, как говорят, активируется. *а*) Схематичное изображение структуры. Аминокислота связана с нуклеотидом на 3'-конце молекулы тРНК (см. рис. 6.52). *б*) Фактическая структура, соответствующая изображению *а*. Известно два главных класса ферментов синтетаз: одни связывают аминокислоту непосредственно с группой 3'-ОН рибозы, а другие связывают ее сначала с группой 2'-ОН. В последнем случае аминокислота передвигается в положение 3' в ходе последующей реакции трансэтерификации. Как и на рис. 6.56, «R-группа» обозначает боковую цепь аминокислоты.

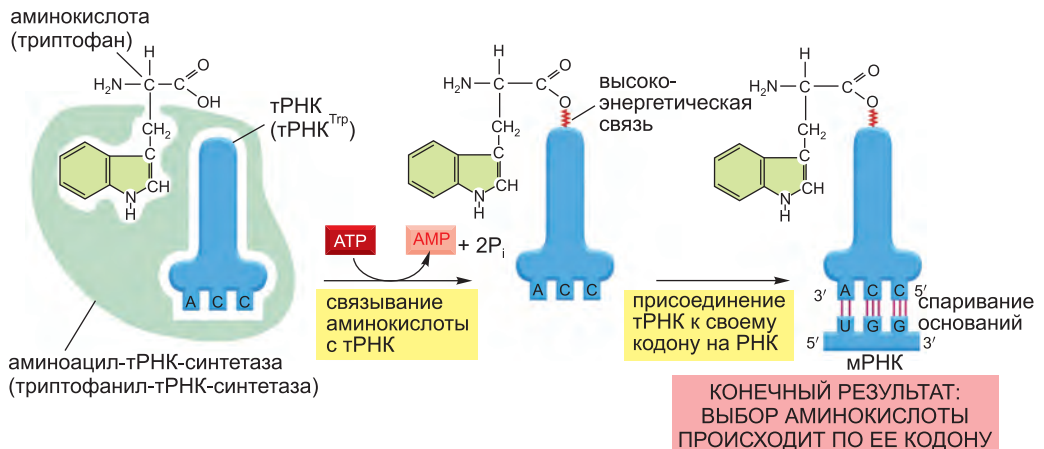


Рис. 6.58. Генетический код транслируется с помощью двух действующих друг за другом адапторов. Первый адаптор — аминоксил-тРНК-синтетаза, которая присоединяет специфическую аминокислоту к соответствующей ей тРНК; вторым адаптором служит сама молекула тРНК, антикодон которой образует комплементарные пары оснований с соответствующим кодоном мРНК. Ошибка в одном из этапов привела бы ко включению в белковую цепь неверной аминокислоты. В представленной череде событий аминокислота триптофан (Трп) выбрана кодоном UGG на мРНК.

свобождается из фермента. Такое гидролитическое редактирование, которое похоже на экзонуклеолитическую корректуру, осуществляемую ДНК-полимеразами (рис. 6.59), повышает общую точность «заправки» тРНК приблизительно до одной ошибки на 40 000 образованных связей.

тРНК-синтетаза должна также распознавать набор верных тРНК, и значительная структурная и химическая комплементарность между синтетазой и тРНК позволяет синтетазе вести опознание по разным категориям признаков тРНК (рис. 6.60). В большинстве своем тРНК-синтетазы непосредственно узнают соответствующий антикодон тРНК; такие синтетазы содержат три смежных нуклеотид-связывающих кармана, каждый из которых по форме и заряду комплементарен нуклеотиду в антикодоне. Для других синтетаз ключевым определителем опознания служит последовательность нуклеотидов акцепторного стебля. Однако в большин-

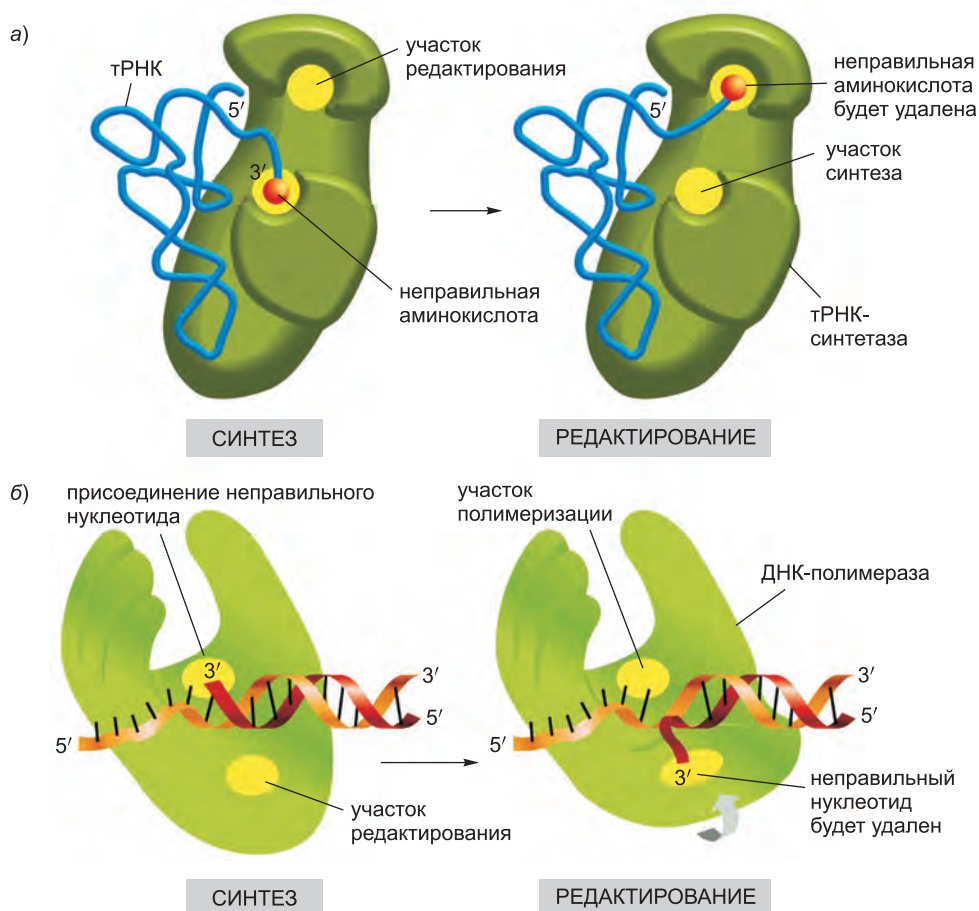
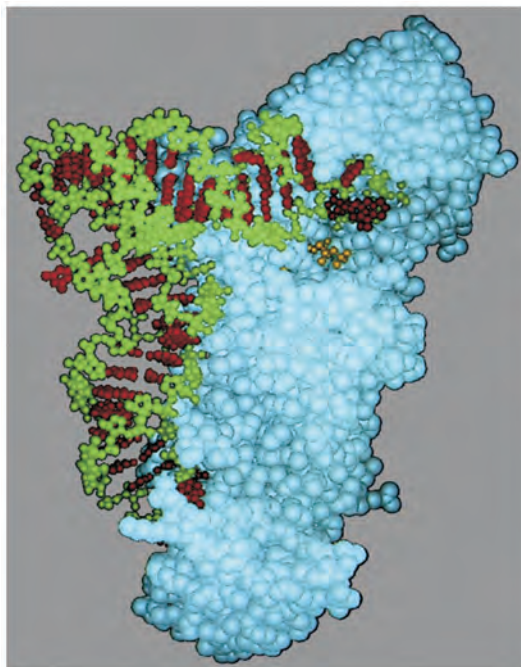


Рис. 6.59. Гидролитическое редактирование. а) тРНК-синтетазы устраняют свои собственные ошибки путем гидролитического редактирования ошибочно присоединенных аминокислот. Как описано в тексте, правильная аминокислота отвергается редактирующим участком. б) Процесс исправления ошибок, выполняемый ДНК-полимеразой, в некоторых чертах похож на редактирование тРНК-синтетаз; однако он отличается тем, что процесс удаления строго зависит от неправильного спаривания с матрицей (см. рис. 5.8).

Рис. 6.60. Узнавание молекулы тРНК ее аминоксил-тРНК-синтетазой. В приведенной здесь тРНК (тРНК^{Gln}) специфические нуклеотиды в антикодоне (внизу), и в акцептирующем аминокислоту плече позволяют ферменту синтетазе (синяя) опознать ее как правильную тРНК. Связанная молекула АТР окрашена в желтый цвет. (За иллюстрацию благодарим Tom Steitz.)



стве случаев синтетазы «считывает» нуклеотиды в нескольких различных позициях тРНК.

6.2.6. Аминокислоты присоединяются к С-концу нарастающей полипептидной цепи

Теперь, зная, что аминокислоты сначала присоединяются к молекулам тРНК, мы можем обратить наш взор на механизм, который соединяет аминокислоты друг с другом на определенном этапе создания белка.

Фундаментальная реакция синтеза белка — образование пептидной связи между карбоксильной группой на конце нарастающей полипептидной цепи и свободной аминогруппой подошедшей аминокислоты. Следовательно, белок синтезируется ступенчато в направлении с N-конца к С-концу. В течение всего процесса нарастающий карбоксильный конец полипептидной цепи остается активированным благодаря его ковалентной связи с молекулой тРНК (образуя пептидил-тРНК). Каждое присоединение очередной аминокислоты разрушает эту ковалентную высокоэнергетическую связь, но незамедлительно заменяет ее тождественной связью на аминокислоте, добавленной самой последней (рис. 6.61). Таким образом, каждая присоединяемая аминокислота приносит с собой энергию активации для присоединения следующей аминокислоты, а не энергию для ее собственного присоединения — пример полимеризации по типу «нарастания с головы», описанному на рис. 2.68.

6.2.7. Записанная в мРНК информация расшифровывается в рибосомах

Синтез белков осуществляется в соответствии с информацией, которую несут молекулы мРНК. Чтобы поддерживать правильную рамку считывания и гарантировать точность (примерно 1 ошибка на каждые 10 000 аминокислот), синтез белка происходит в сложной каталитической машине — **рибосоме (ribosome)**, состоящей из более чем 50-ти различных белков — *рибосомных белков (ribosomal proteins)* — и нескольких молекул РНК — **рибосомных РНК (рРНК; ribosomal RNA)**. Типичная клетка эукариот содержит миллионы рибосом в цитоплазме (рис. 6.62). Субчастицы рибосом эукариот собираются в ядрышке, когда новотранскрибированные и модифицированные рРНК связываются с рибосомными белками, которые заблаговременно переносятся в ядро после их синтеза в цитоплазме. Затем

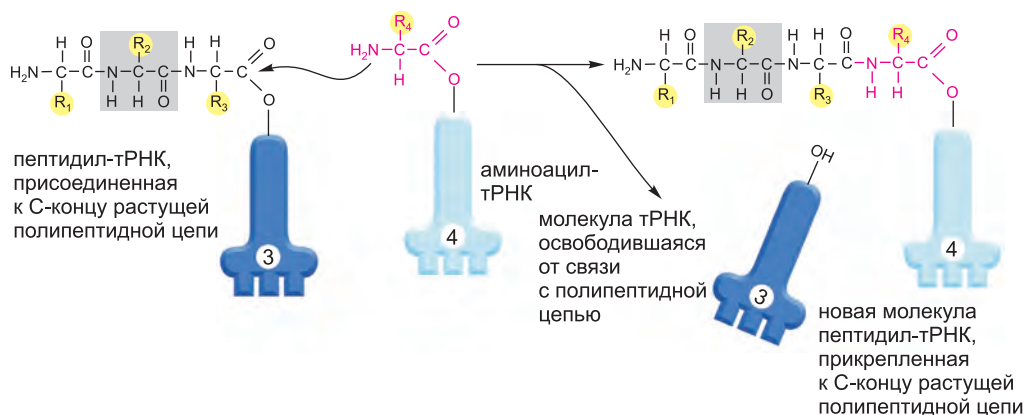


Рис. 6.61. Включение аминокислоты в белковую цепь. Полипептидная цепь растет путем последовательного присоединения аминокислот к ее С-концу. Образование каждой пептидной связи энергетически благоприятно, потому что наращиваемый С-конец заранее активирован ковалентным присоединением молекулы тРНК. Связь пептидил-тРНК, которая активирует растущий конец, регенерируется в ходе каждого акта присоединения. Боковые цепи аминокислот обозначены знаками R_1 , R_2 , R_3 и R_4 ; в качестве ориентира взята вторая аминокислота полипептидной цепи, все атомы которой оттенены серым фоном. На рисунке изображено присоединение четвертой аминокислоты (красной) к растущей цепи.

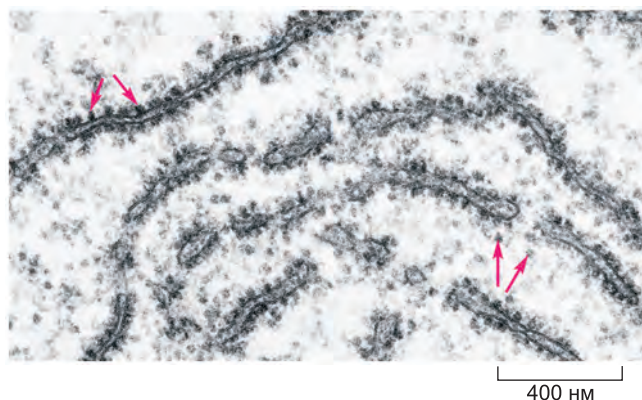


Рис. 6.62. Рибосомы в цитоплазме эукариотической клетки. На этом электронном микротомоснимке показан тонкий срез небольшой области цитоплазмы. Рибосомы выглядят как черные точки (указаны красными стрелками). Одни свободно плавают в цитозоле; другие привязаны к мембранам эндоплазматической сети. (За присланный микротомоснимок от всей души благодарим Daniel S. Friend.)

две рибосомные субчастицы экспортируются в цитоплазму, где объединяются в одно целое и начинают синтезировать белки.

Рибосомы эукариот и прокариот имеют подобное строение и функции. И те и другие состоят из одной большой и одной малой субчастиц, которые пригнаны одна к другой и образуют полную рибосому массой несколько миллионов дальтон (рис. 6.63). Малая субчастица служит каркасом, на котором молекулы тРНК могут быть точно сопоставлены с кодонами мРНК (см. рис. 6.58), тогда как большая субчастица катализирует образование пептидных связей, которыми аминокислоты связываются между собой в полипептидную цепь (см. рис. 6.61).

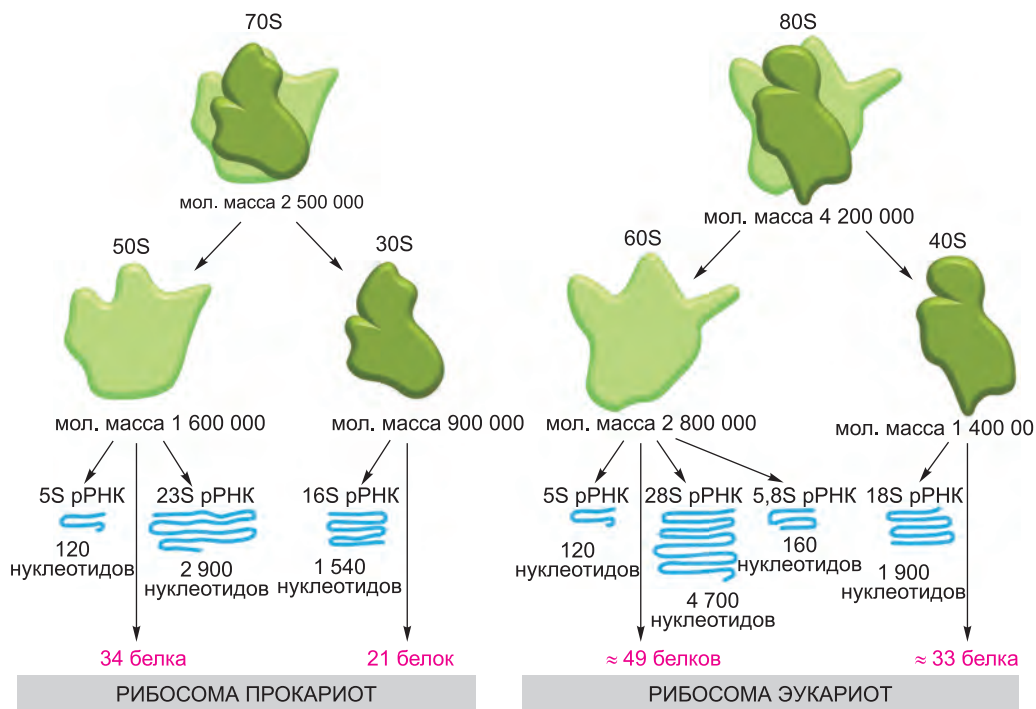


Рис. 6.63. Сравнение рибосом прокариот и эукариот. Несмотря на различия в числе и размере рРНК и белков, входящих в состав рибосом прокариот и эукариот, рибосомы имеют почти одинаковую структуру и работают подобным образом. Хотя молекулы 18S и 28S рРНК рибосомы эукариот содержат много нуклеотидов, отсутствующих у их бактериальных «коллег», эти нуклеотиды присутствуют в виде множественных вставок, которые образуют дополнительные домены и особо не изменяют базовую структуру рРНК.

Если рибосома не занята активным синтезом белков, то обе ее субчастицы отделены одна от другой. Они объединяются друг с другом на молекуле мРНК, обычно около ее 5'-конца, — чтобы начать синтез белка. Далее мРНК протягивается сквозь рибосому; по мере того как ее кодоны входят в сердцевину (кор) рибосомы, последовательность нуклеотидов мРНК транскрибируется в последовательность аминокислот, используя в качестве адапторов тРНК, устанавливающие все аминокислоты в правильной последовательности на конце наращиваемой полипептидной цепи. Когда попадает стоп-кодон, рибосома высвобождает завершённый белок и две ее субчастицы вновь отделяются одна от другой. Эти субчастицы могут быть использованы в дальнейшем — чтобы начать синтез какого-либо иного белка на какой-нибудь другой молекуле мРНК.

Рибосомы работают с замечательной эффективностью: за одну секунду одна эукариотическая рибосома присоединяет к полипептидной цепи примерно 2 аминокислоты; рибосомы бактериальных клеток работают еще быстрее: со скоростью около 20 аминокислот в секунду. Как рибосоме, подобно искуснейшему балетмейстеру, удастся скоординировать множество действий, необходимых для эффективной трансляции? Рибосома содержит четыре участка связывания молекул РНК: один предназначен для мРНК, а три (названные А-сайтом, Р-сайтом и Е-сайтом) — для

молекул тРНК (рис. 6.64). Молекула тРНК прочно удерживается в А- и Р-сайтах, только если ее антикодон образует комплементарные пары оснований с кодоном (с допуском «раскачиваний») на молекуле мРНК, протягиваемой сквозь рибосому (рис. 6.65). А- и Р-участки расположены достаточно близко друг к другу, так что обе втиснутые в них молекулы тРНК могут образовать комплементарные пары оснований с двумя смежными кодонами на молекуле мРНК. Эта особенность рибосомы позволяет придерживаться верной рамки считывания на мРНК.

Сразу после инициации синтеза белка каждая новая аминокислота добавляется к растущей цепи в цикле реакций, состоящем из четырех основных шагов: связывание тРНК, образование пептидной связи, транслокация (перемещение) большой субчастицы и транслокация малой субчастицы. В результате двух ступеней транслокации вся рибосома передвигается по мРНК на три нуклеотида и готова начать следующий цикл (рис. 6.66). Наше описание процесса элонгации цепи начинается

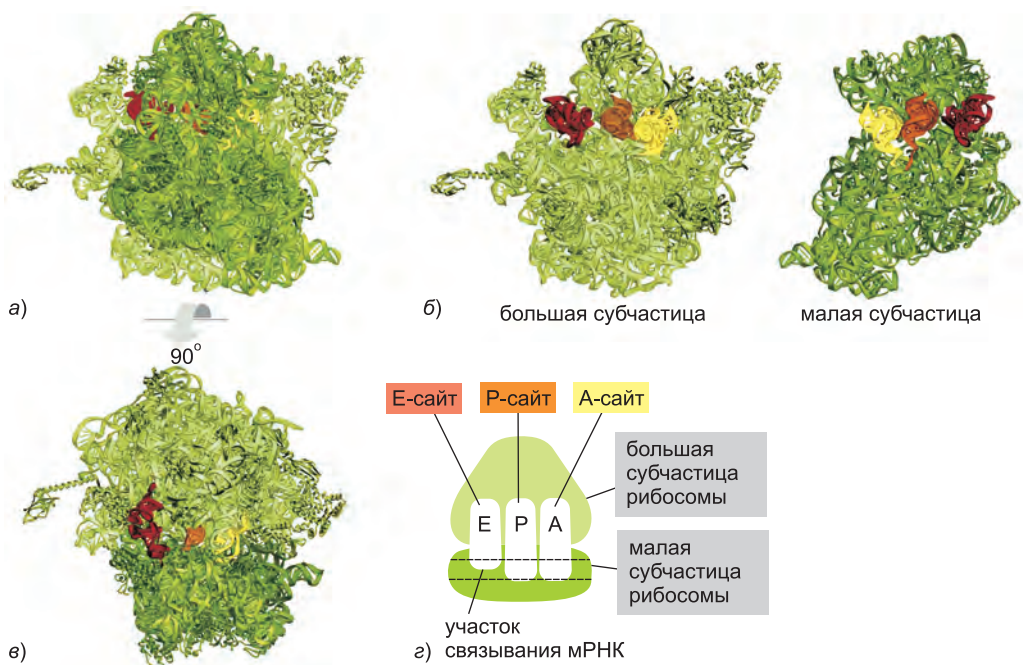


Рис. 6.64. РНК-связывающие сайты рибосомы. Каждая рибосома имеет один участок связывания мРНК и три участка связывания тРНК: А-, Р- и Е-сайты (соответственно сокращения названий: аминоацил-тРНК (А), пептидил-тРНК (Р), и выход (Е; по-англ. *выход* — *exit*. — Прим. перев.)). а) Бактериальная рибосома, обращенная малой субчастицей к читателю (темно-зеленая), а большой субъединицей — от него (светло-зеленая). Показаны и молекулы рРНК, и рибосомные белки. Молекулы тРНК показаны связанными в Е-участке (красная), Р-участке (оранжевая) и А-участке (желтая). Хотя здесь все три участка связывания тРНК показаны занятыми, в ходе процесса синтеза белка не более двух из этих участков, как думают, содержат молекулы тРНК в каждый момент времени (см. рис. 6.66). б) Большая и малая субчастицы рибосомы, расположенные так, как если бы рибосома на изображении а была раскрыта точно книга. в) Рибосома с изображения а, повернутая на 90° и обращенная большой субчастицей вверх и малой — вниз. г) Схематичное представление рибосомы (в той же ориентации, что и на виде в, которое будет использовано в последующих рисунках). (Изображения а, б, и в переработаны из М. М. Yusupov et al., *Science* 292: 883–896, 2001. С любезного разрешения издательства AAAS; выражаем свою благодарность Albion Baucom и Harry Noller.)

Рис. 6.65. Путь мРНК (синяя) через малую субчастицу рибосомы. Ориентация та же, что и на правом изображении рис. 6.64, б. (Благодарим Harry F. Noller, рисунок основан на данных из G. Z. Yusopova et al., *Cell* 106: 233–241, 2001. С любезного разрешения издательства Elsevier.)



в тот момент, когда несколько аминокислот уже связано друг с другом и в Р-сайте рибосомы находится молекула тРНК, ковалентно связанная с концом растущего полипептида. В шаге 1 тРНК, несущая следующую аминокислоту для цепи, связывается с А-участком рибосомы, образуя пары оснований с размещенным там кодоном мРНК, так что Р- и А-сайты содержат смежно связанные тРНК. В шаге 2 карбоксильный конец полипептидной цепи освобождается от тРНК в Р-сайте (путем разрыва высокоэнергетической связи между тРНК и ее аминокислотой) и соединяется со свободной аминогруппой аминокислоты, связанной с тРНК в А-сайте, образуя новую пептидную связь. Эта определяющая синтез белка реакция катализируется *пептидилтрансферазой* (*peptidyl transferase*), содержащейся в большой субчастице рибосомы. В шаге 3 большая субчастица смещается относительно мРНК, удерживаемой малой субчастицей, и таким образом переводит акцепторные стебли двух молекул тРНК в Е- и Р-сайты большой субчастицы. В шаге 4, в результате очередной цепи конформационных изменений, малая субчастица и связанная с ней мРНК перемещаются в точности на три нуклеотида, благодаря чему рибосома приходит в исходное состояние и может принять следующую «связку» аминоацил-тРНК. Далее повторяется шаг 1 с «новоподошедшей» молекулой аминоацил-тРНК и так далее.

Такой четырехзвенный цикл повторяется всякий раз, когда аминокислота добавляется к полипептидной цепи, — по мере того как цепь растет от аминок- к карбоксильному концу.

6.2.8. Факторы элонгации продвигают трансляцию дальше и повышают ее точность

Основной цикл удлинения полипептида, изображенный в общих чертах на рис. 6.66, имеет еще одну особенность, благодаря которой трансляция осуществляется особенно эффективно и точно. Два *фактора элонгации* входят в рибосому и покидают ее в ходе каждого цикла: каждый из них гидролизует GTP до GDP и претерпевает конформационные изменения во время этого процесса. У бактерий эти факторы названы EF-Tu и EF-G, а у эукариот — EF1 и EF2. При некоторых условиях *in vitro* рибосомы могут синтезировать белки без помощи этих факторов элонгации и не требовать гидролиза GTP, но такой синтез будет очень медленным, неэффективным и неточным. Сопряжение движимых гидролизом GTP конформа-

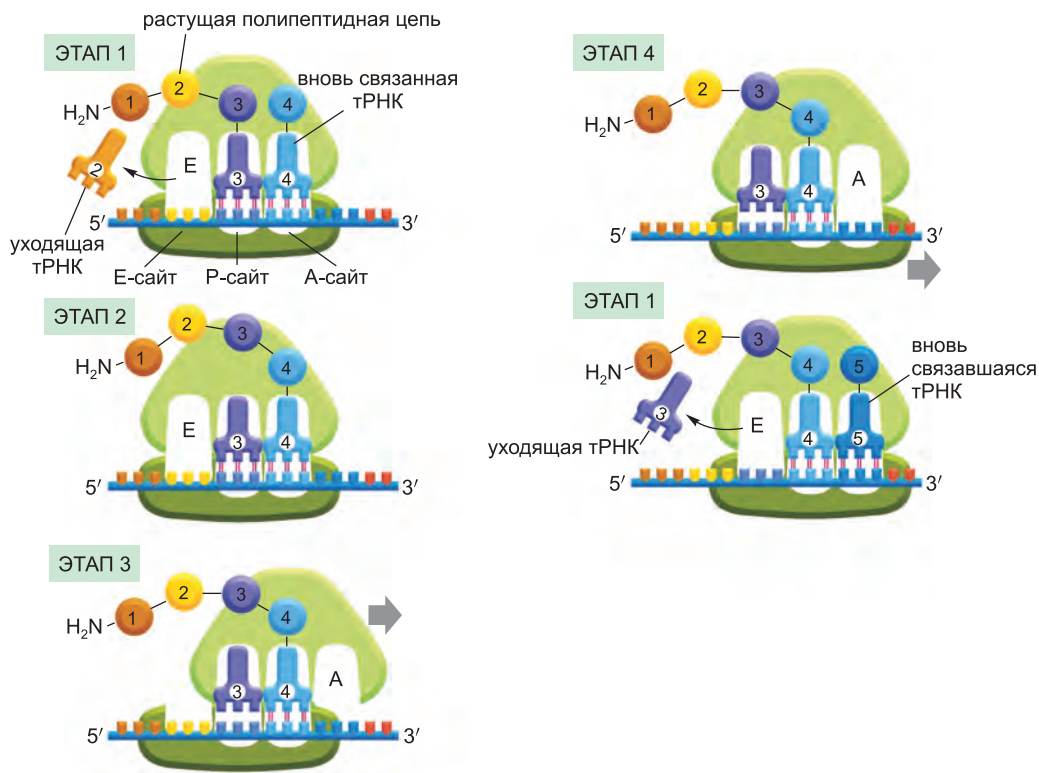


Рис. 6.66. Трансляция молекулы мРНК. Каждая аминокислота, прибавляемая к продолжаемому концу полипептидной цепи, выбирается путем комплементарного спаривания оснований между антикодоном на связанной с нею молекуле тРНК и следующим кодоном в цепи мРНК. Поскольку пару оснований с каждым отдельно взятым кодоном может образовать молекула тРНК только одного из многих типов тРНК, находящихся в клетке, кодон определяет конкретную аминокислоту, которая будет добавлена к наращиваемой полипептидной цепи. Представленный на схеме четырехступенчатый цикл повторяется снова и снова на протяжении синтеза белка. На этапе 1 молекула аминоксил-тРНК связывается со свободным А-участком рибосомы, а использованная молекула тРНК высвобождается из Е-участка. На этапе 2 образуется новая пептидная связь. На этапе 3 большая субчастица смещается относительно малой (транслоцируется), в силу чего обе молекулы тРНК оказываются в гибридных участках: одна — в Р большой субчастицы и А малой; вторая — в Е большой субчастицы и Р малой. На этапе 4 малая субчастица транслоцируется по рибосоме, увлекая за собой и связанную с ней мРНК, на расстояние трех нуклеотидов. Данный шаг «переустанавливает» рибосому с абсолютным пустым А-участком в состоянии готовности к связыванию следующей молекулы аминоксил-тРНК. Как обозначено на схеме, мРНК транслируется в направлении 5' → 3', и сначала синтезируется N-концевая часть белка, а в каждом последующем цикле одна аминокислота прибавляется к С-концу полипептидной цепи.

ционных изменений в факторах элонгации с переходами между различными состояниями в рибосоме чрезвычайно ускоряет синтез белка. Хотя такие состояния рибосомы еще до конца не поняты, они почти наверняка вовлекают в перестройку структуры РНК в рибосомном коре. Циклы связывания с факторами элонгации, гидролиза GTP и диссоциации гарантируют, что все такие изменения происходят в направлении «вперед», с тем чтобы трансляция могла проходить эффективно

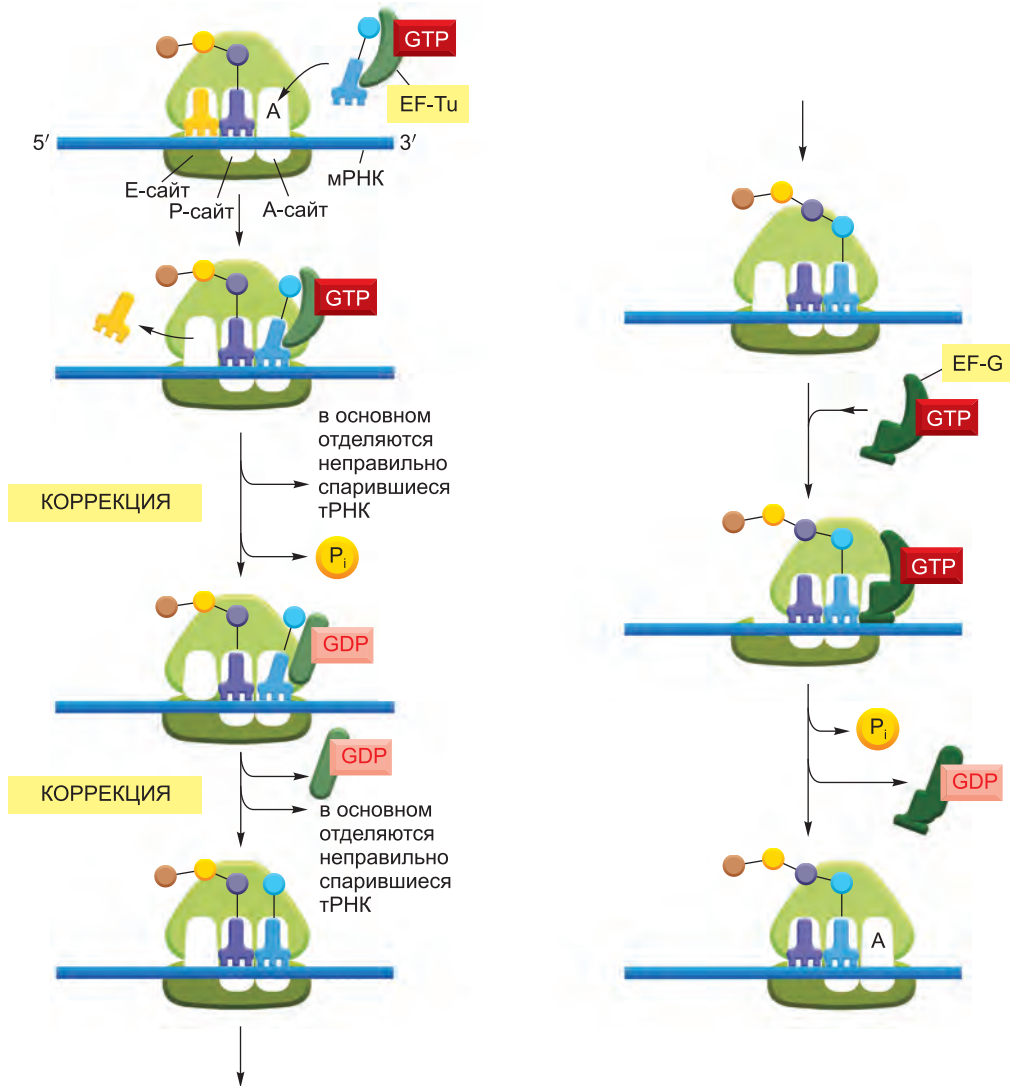


Рис. 6.67. Подробная схема цикла трансляции. Краткая схема трансляции, представленная на рис. 6.66, развернута с целью показать роль двух факторов элонгации: EF-Tu и EF-G, — которые ведут трансляцию в прямом направлении. Как объясняется в тексте, EF-Tu обеспечивает также две возможности корректировать соответствие кодон–антикодон. Таким образом, неправильно спарившиеся тРНК избирательно выбраковываются, и точность трансляции повышается.

(рис. 6.67).

Как было показано ранее, EF-Tu одновременно связывает GTP и молекулы аминоксил-тРНК (см. рис. 3.74). Кроме помощи по продвижению трансляции вперед, EF-Tu (EF1 у эукариот) увеличивает точность трансляции в нескольких аспектах. Во-первых, когда EF-Tu препровождает подаваемую к рибосоме аминоксил-тРНК, он проверяет, является ли соответствие тРНК–аминокислота верным. Как именно это происходит, точно не известно. Согласно одному представ-

лению, правильные соответствия тРНК—аминокислота обладают узкоспецифичным средством к EF-Tu, что позволяет EF-Tu разбираться, хотя и грубо, во множестве различных комбинаций аминокислота—тРНК и избирательно подхватывать по пути в рибосому только правильные связки. Во-вторых, EF-Tu отслеживает первичное взаимодействие между антикодоном подходящей аминоацил-тРНК и кодоном мРНК в А-участке. Молекулы аминоацил-тРНК «изогнуты», будучи связаны с GTP-формой EF-Tu; такая изогнутая конформация допускает спаривание кодона, но препятствует включению аминокислоты в наращиваемую полипептидную цепь. Однако, если соответствие кодон—антикодон оказывается верным, то рибосома быстро запускает гидролиз молекулы GTP, по свершении чего EF-Tu рвет свои узы с тРНК и отделяется от рибосомы, позволяя тем самым молекуле тРНК жертвовать свою аминокислоту на благо синтеза белка. Но как оценивается собственно «правильность» соответствия кодон—антикодон? Столь тонкую задачу выполняет сама рибосома при помощи основанного на РНК механизма. рРНК малой субъединицы рибосомы образует ряд водородных связей с парой кодон—антикодон, что позволяет определить ее правильность (рис. 6.68). По сути, рРНК обертывается вокруг пары кодон—антикодон, и ее окончательное замыкание — которое происходит только тогда, когда там находится верный антикодон, — запускает гидролиз GTP. Примечательно, что такой механизм «вынужденного соответствия» способен различать верные и неверные взаимодействия типа кодон—антикодон, несмотря на действие правил «нестроного спаривания оснований», подытоженных на рис. 6.53. На основании данного примера, равно как и сплайсинга РНК, можно получить представление о в высшей степени сложных формах молекулярного узнавания, которого удается достичь лишь исключительно с привлечением РНК.

Только что описанные взаимодействия EF-Tu, тРНК и рибосомы дополняют определяюще важными корректирующими операциями процесс синтеза белка на начальном этапе выбора тРНК. Но после того как GTP гидролизуется, а EF-Tu отделится от рибосомы, у нее есть дополнительная возможность предотвратить попадание неправильной аминокислоты в наращиваемую цепь. Сразу за гидролизом GTP следует короткая временная пауза — пока аминокислота, принесенная тРНК, занимает свое положение в рибосоме. Эта задержка во времени короче для правильных пар кодон—антикодон, чем для ошибочных. Более того, неправильно сопоставленные тРНК отделяются скорее, чем правильно связанные, потому что взаимодействие первых с кодоном оказывается более слабым. Таким образом,

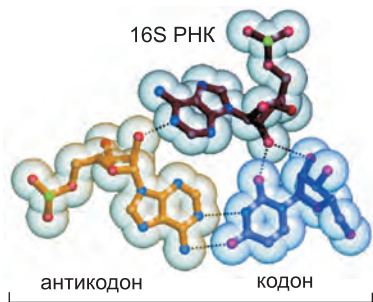


Рис. 6.68. Распознавание правильных кодон-антикодоновых пар молекулой рРНК малой субчастицы рибосомы. Показано взаимодействие между нуклеотидом рРНК малой субчастицы и первой парой должным образом спаренных нуклеотидов кодона с антикодоном; подобные взаимодействия происходят между остальными нуклеотидами рРНК и второй, а также третьей позициями в паре кодон—антикодон. Молекула рРНК малой субчастицы может образовывать такую сеть водородных связей только с правильно сопряженными парами кодон—антикодон. Как поясняется в тексте, такое отслеживание пар кодон—антикодон, осуществляемое рРНК малой субчастицы, повышает точность синтеза белка. (Заимствовано из J. M. Ogle et al., *Science* 292: 897–902, 2001. С любезного разрешения издательства AAAS.)

большинство неправильно связанных молекул тРНК (а также и значительное число правильно связанных молекул) покидают рибосому, не будучи востребованными в синтезе белка. Все эти этапы коррекции вместе взятые, в основном, и отвечают за 99,99%-ю точность рибосомы при трансляции РНК в белок.

6.2.9. Рибосома представляет собой рибозим

Рибосома — крупный комплекс, состоящий на две трети из РНК и на одну треть из белка. Определение в 2000 г. полной трехмерной конформации ее большой и малой субчастиц — главный успех современной структурной биологии. Полученные результаты подтверждают предыдущие данные о том, что именно молекулы рРНК — а не белки, — отвечают за общую структуру рибосомы, за ее способность располагать молекулы тРНК на мРНК и за ее каталитическое действие в отношении образования ковалентных пептидных связей. Рибосомные РНК свернуты в очень компактные, точные трехмерные структуры, которые формируют компактное ядро, или каркас (кор), рибосомы и определяют ее форму в целом (рис. 6.69).

В совершенную противоположность главенствующему положению молекул рРНК, занявших все центральные позиции, рибосомные белки обычно находят себе пристанище на периферии или ютятся в прогалинах и расселинах между свернутыми молекулами РНК (рис. 6.70). Некоторые из этих белков запускают вытянутые участки своей полипептидной цепи на короткие расстояния по каналам в каркасе РНК (рис. 6.71). Главная роль рибосомных белков, кажется, состоит в стабилизации каркаса РНК при сохранении возможности изменений в конформации рРНК, которые необходимы ей для катализа эффективного синтеза белка. Эти белки, вероятно, помогают также и в первичной сборке молекул рРНК, которые образуют рибосомный каркас.

Мало того, что А-, Р- и Е-участки связывания молекул тРНК формируются главным образом рибосомными РНК, каталитический сайт образования пептидных связей тоже сформирован из РНК, поскольку ближайшая аминокислота отстоит от него более чем на 1,8 нм.

Это открытие явилось полной неожиданностью для биологов, потому что, в отличие от белков, РНК не содержит легко ионизируемых функциональных групп, которые могут быть использованы для катализа замысловатых реакций типа образования пептидной связи. Более того, ионы металлов, которые часто используются молекулами РНК для катализа химических реакций (о чем мы поговорим позже в этой главе), не были обнаружены в активном участке рибосомы. Полагают, что, вместо этого, 23S рРНК формирует сильно структурированный карман, который при помощи сети водородных связей точно ориентирует два реагента (растущую пептидную цепь и аминоацил-тРНК) и таким образом значительно ускоряет их ковалентное соединение. Вдобавок к этому тРНК, находящаяся в Р-сайте, входит в активный участок, предоставляя функционально активную группу ОН, которая непосредственно участвует в катализе. Этот механизм может гарантировать, что катализ произойдет только тогда, когда тРНК будет должным образом размещена в рибосоме.

Молекулы РНК, которые обладают каталитической активностью, известны под названием **рибозимов (ribozymes)**. Ранее в этой главе мы видели, как другие рибозимы действуют в реакциях самосплайсинга (например, см. рис. 6.36). В заключительном параграфе этой главы мы рассмотрим вопрос о том, какое значение способность молекул РНК быть катализаторами различных реакций могла иметь

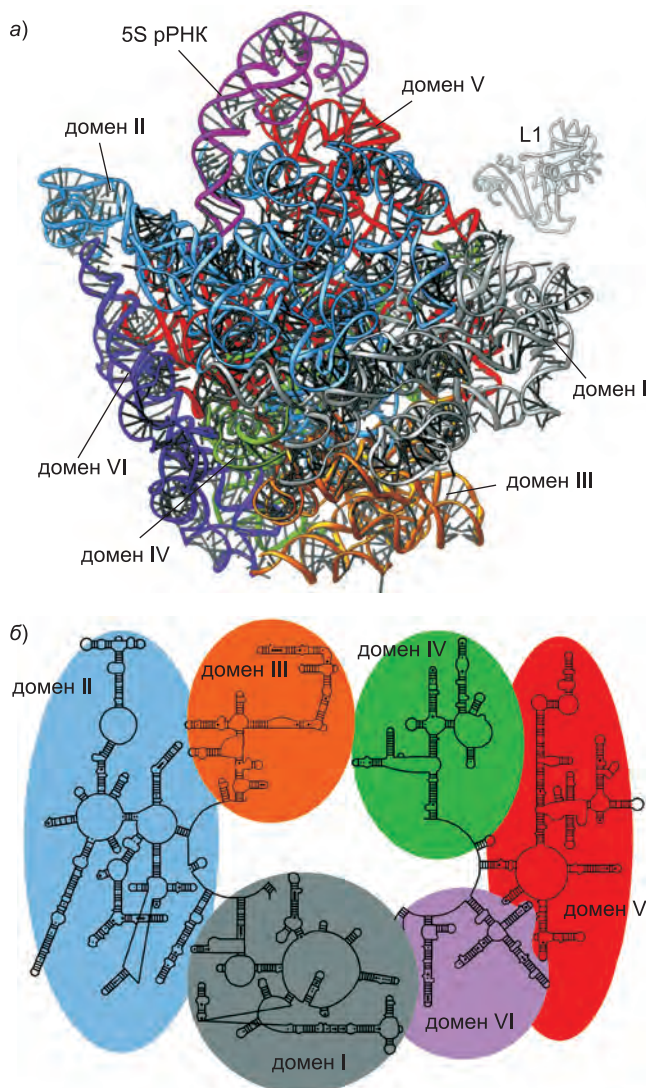


Рис. 6.69. Структура молекул рРНК в большой субчастице бактериальной рибосомы, установленная при помощи рентгеноструктурного анализа. а) Трехмерные конформации молекул рРНК (5S и 23S) большой субчастицы, в которых они находятся в составе рибосомы. Также показана одна из белковых субъединиц рибосомы (L1) в качестве ориентира, так как она образует характерное выпячивание на рибосоме. б) Схематичное представление вторичной структуры 23S рРНК с обширной сетью спаренных участков. Структура была разделена на шесть доменов, цвета которых соответствуют таковым на изображении а. Схема вторичной структуры сильно упрощена, чтобы представить структуру наиболее наглядно — насколько это возможно — в двух измерениях. Для этого в цепь РНК внесено несколько разрывов, хотя в действительности 23S рРНК представляет собой единую молекулу РНК. Например, нуклеотидная цепь главной части домена III плавно переходит в домен IV, хотя в соответствующем месте на схеме и зияет промежуток. (Переработано на основе N. Van et al., *Science* 289: 905–920, 2000. С любезного разрешения издательства AAAS.)

подозревать, что именно молекулы РНК, а не белка, были первыми катализаторами в живых клетках. Если это так, то рибосома с ее РНК-ядром может быть реликтом давно минувших дней в истории жизни — когда синтез белка эволюционировал в клетках, где было почти полное господство рибозимов.

6.2.10. Последовательности нуклеотидов в мРНК сигнализируют о том, где следует начинать синтез белка

Запуск (инициация) и завершение (терминация) трансляции придают особенности циклу элонгации трансляции, описанному выше. Участок мРНК, на котором начинается синтез белка, является особенно важным, так как он устанавливает рамку считывания на всю длину матрицы. Ошибка на один нуклеотид на этом этапе так или

на этапе ранней эволюции живых клеток. Пока же мы просто обращаем внимание, что есть серьезное основание

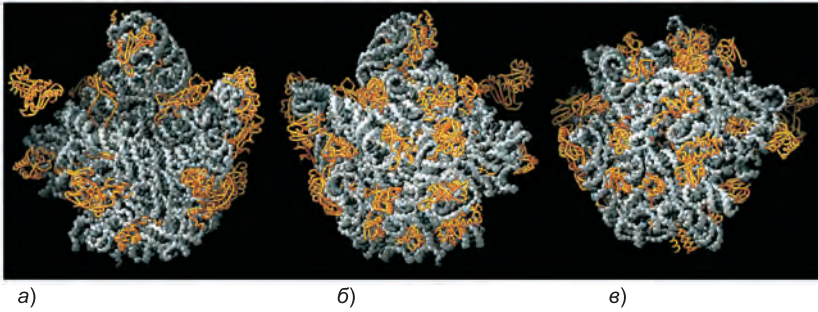
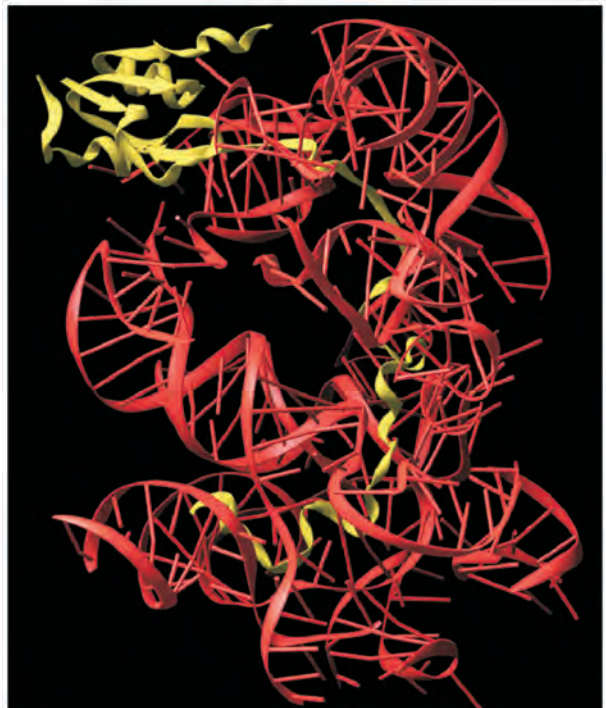


Рис. 6.70. Расположение белковых компонентов в большой субчастице бактериальной рибосомы. Молекулы рРНК (5 S и 23 S) показаны серым, а белки большой субчастицы (27 из 31 общего числа) — золотым цветом. Для удобства в белковых структурах изображен только полипептидный остов. а) Поверхность соприкосновения с малой субчастицей представлена в том же ракурсе, что и на виде б) рис. 6.64. б) Противоположная сторона относительно представленной на виде а) получена вращением вида а) на 180° вокруг вертикальной оси. в) Дальнейшее небольшое вращение вида б) по диагональной оси позволяет видеть в центре структуры канал выхода пептида. (Займствовано из N. Van et al., *Science* 289: 905–920, 2000. С любезного разрешения издательства AAAS.)

иначе приведет к неправильному считыванию всех последующих кодонов матрицы и в конечном счете — к синтезу функционально неактивного белка с искаженной последовательностью аминокислот. Стадия инициации важна также и потому, что для большинства генов это последний пункт, в котором клетка может решить: нужно ли транслировать эту мРНК и синтезировать этот белок; таким образом, скорость инициации есть одна из детерминант скорости, с которой синтезируется любой белок. В главе 7 мы увидим, что клетки используют несколько механизмов регулирования инициации трансляции.

Трансляция мРНК начинается с кодона AUG, и для пуска трансляции необходима специальная тРНК. Такая **инициаторная тРНК (initiator tRNA)** всег-

Рис. 6.71. Структура белка L15 в большой субчастице бактериальной рибосомы. Глобулярный домен белка лежит на поверхности рибосомы, а вытянутая область проникает вглубь РНК-каркаса рибосомы. Белок L15 показан в желтом цвете, а часть РНК-каркаса рибосомы — в красном. (Займствовано из D. Klein, P. V. Moore и Т. А. Steitz, *J. Mol. Biol.* 340: 141–147, 2004. С любезного разрешения издательства Academic Press.)



да несет аминокислоту метионин (у бактерий используется модифицированная форма метионина — формилметионин), так что в итоге у всех недавно синтезированных белков N-конец — конец белка, который синтезируется первым, — начинается с метионина. Позже этот первый метионин обычно удаляется специальной протеазой. Факторы инициации могут специфически узнавать инициаторную тРНК, потому что она имеет последовательность нуклеотидов, отличающуюся от таковой у тРНК, которая в ходе трансляции занята переносом метионина.

У эукариот комплекс инициаторная тРНК–метионин (Met–тРНК_и) сначала устанавливается на малую субчастицу рибосомы наряду с дополнительными белками, названными **эукариотическими факторами инициации (eukaryotic initiation factors, eIFs)** (рис. 6.72). Из всех имеющихся в клетке пар аминокил–тРНК, только нагруженная метионином инициаторная тРНК способна прочно связаться с малой субчастицей рибосомы еще до образования полной рибосомы — и она связывается непосредственно с Р-сайтом. Затем малая субчастица рибосомы связывается с 5'-концом молекулы мРНК, которая опознается по 5'-кэпу и двум связанным с ней факторам инициации eIF4E (который непосредственно связывается с кэпом) и eIF4G (см. рис. 6.40). После этого малая субчастица рибосомы продвигается вперед по молекуле мРНК (в направлении 5' → 3') в поисках первого кодона AUG. Вспомогательные факторы инициации, которые действуют подобно подпи-тываемым энергией гидролиза АТФ хеликазам, облегчают продвижение рибосомы через вторичные структуры РНК. В 90 % молекул мРНК трансляция начинается на кодоне AUG, встретившимся малой субчастице первым. В этой точке факторы инициации диссоциируют, позволяя тем самым большой субчастице рибосомы войти в комплекс и довершить сборку рибосомы. Инициаторная тРНК все еще связана с Р-сайтом и нисколько не претендует на свободный А-сайт. Так что синтез белка готов к запуску (см. рис. 6.72).

Нуклеотиды, находящиеся в непосредственной близости от стартового участка эукариотических мРНК, влияют на эффективность узнавания кодона AUG в ходе вышеописанного процесса сканирования. Если такой опознавательный участок сильно отличается от консенсусной последовательности (5'–ACCAUGG–3'), то сканирующие рибосомные субчастицы иногда будут игнорировать первый кодон AUG в мРНК и перескакивать с него на второй или третий AUG-кодон. Клетки часто используют это явление, известное как «просмотр с размытием», для того, чтобы с одной и той же молекулы мРНК производить два и более белков, отличающихся своими N-концами. Благодаря этому с некоторых генов один и тот же белок может быть синтезирован в двух вариантах, например, с сигнальной последовательностью на N-конце или без нее, — так что в зависимости от наличия/отсутствия сигнального пептида полученный белок будет направлен в один из двух разных компартментов клетки.

Бактерии имеют иной механизм выбора стартового кодона. Молекулы мРНК бактерий не несут кэп на 5'-конце, с помощью коих они могли бы сигнализировать рибосоме, где следует начинать поиск отправной точки трансляции. Вместо этого каждая бактериальная мРНК содержит специфический сайт посадки рибосомы (известный также как последовательность Шайна–Дальгарно, названная так по имени открывших ее исследователей) — он расположен несколькими нуклеотидами выше кодона AUG, с которого должна начаться трансляция. Эта последовательность нуклеотидов, в консенсусной форме 5'–AGGAGGU–3', образует пары оснований с 16S рРНК малой субчастицы рибосомы, чтобы должным образом разместить

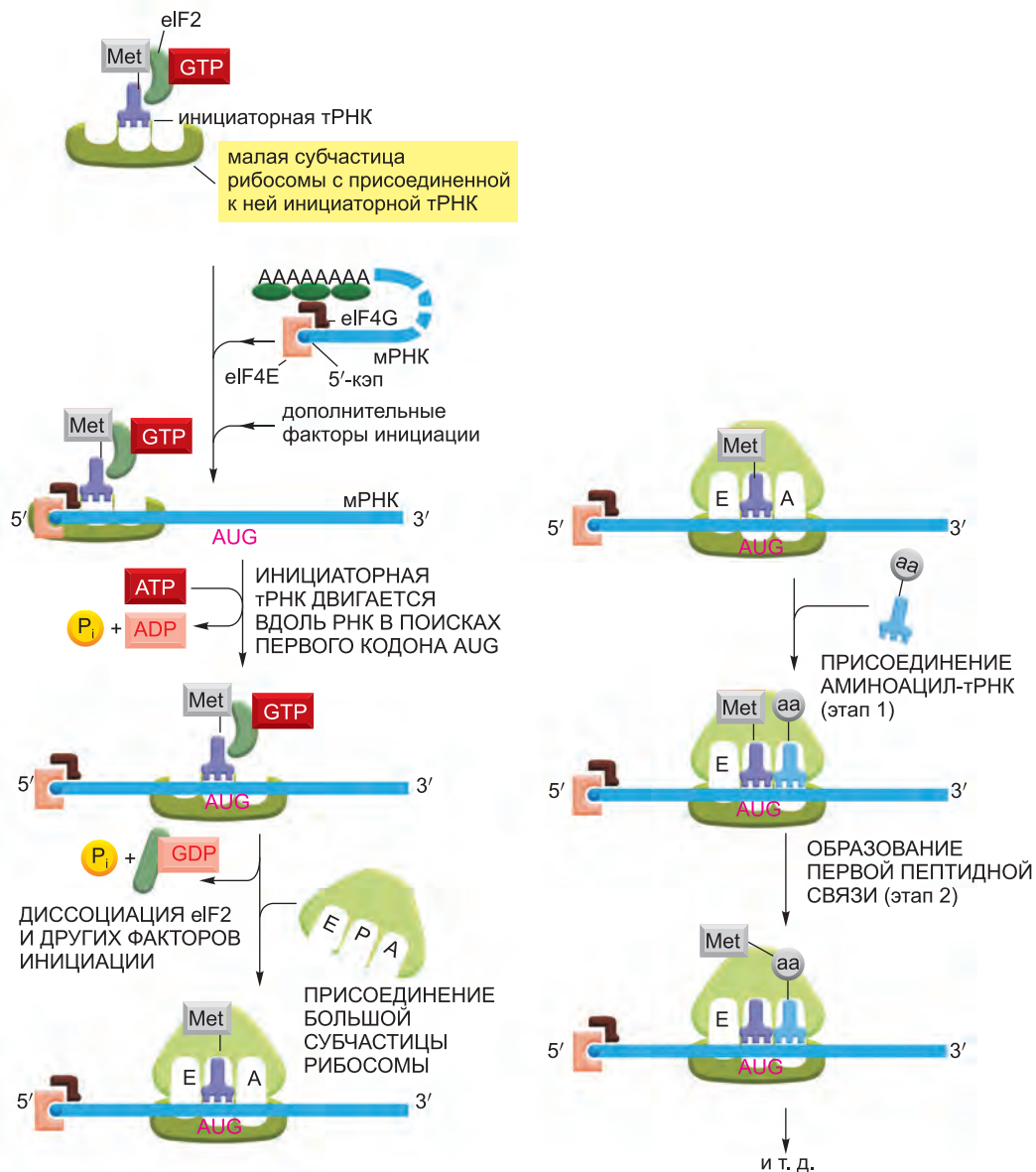


Рис. 6.72. Инициация синтеза белка у эукариот. Показаны только три из многих факторов инициации трансляции, требуемых для этого процесса. Для эффективного запуска трансляции необходимо также, чтобы поли-А хвост мРНК был связан с поли-А-связывающими белками, которые, в свою очередь, взаимодействуют с eIF4G. Таким способом аппарат трансляции удостоверяется, что перед инициацией трансляции оба конца мРНК интактны (см. рис. 6.40). Хотя на рисунке показано только одно событие гидролиза GTP, известно, что происходит и второе — непосредственно перед объединением большой и малой субчастиц рибосомы.

инициаторный кодон AUG на рибосоме. Набор факторов инициации трансляции «дирижирует» этими взаимодействиями, равно как и последующим водружением большой рибосомной субчастицы, что и завершает сборку рибосомы.

В отличие от эукариотической, рибосома бактерий может, следовательно, легко собираться прямо на стартовых кодонах, которые лежат на протяжении всей молекулы мРНК, при условии, что сайт посадки рибосомы предшествует ему на расстоянии нескольких нуклеотидов. В результате молекулы мРНК бактерий часто являются *полицистронными* — то есть они кодируют несколько различных белков, каждый из которых транслируется с одной и той же молекулы мРНК (рис. 6.73). В отличие от своих бактериальных аналогов, мРНК эукариот, как правило, кодирует лишь один-единственный белок.

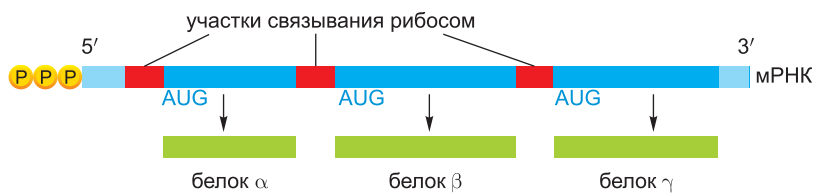


Рис. 6.73. Структура типичной бактериальной мРНК. В отличие от эукариотических рибосом, которым обычно нужен кэп на 5'-конце, рибосомы прокариот иницируют трансляцию на рибосом-связывающих сайтах (последовательностях Шайна–Дальгарно), которые могут быть расположены где угодно на молекуле мРНК. Данная особенность рибосом позволяет бактериям синтезировать с одной молекулы мРНК не один, а несколько различных белков.

6.2.11. Стоп-кодона отмечают конец трансляции

О конце кодирующего белок сообщения говорит присутствие одного из трех *стоп-кодонов* (UAA, UAG или UGA) (см. рис. 6.50). Они не распознаются тРНК и не кодируют никакой аминокислоты, но, вместо этого, служат для рибосомы сигналом к остановке трансляции. С любой рибосомой, в А-участке которой находится стоп-кодон, связываются белки, известные под названием *факторов терминации трансляции* (иногда их называют *факторами высвобождения* — от англ. *release factors* — Прим. ред.), которые вынуждают рибосомальную пептидилтрансферазу катализировать присоединение к пептидил-тРНК молекулы воды вместо аминокислоты (рис. 6.74). Эта реакция высвобождает карбоксильный конец растущей полипептидной цепи от связи с молекулой тРНК, и так как только эта связь обычно удерживает растущий полипептид в рибосоме, завершенная белковая цепь незамедлительно выскальзывает в цитоплазму. После этого рибосома освобождается от мРНК и разделяется на большую и малую субчастицы, которые могут собраться на этой или какой-то другой молекуле мРНК, дабы приступить к новому раунду синтеза белка.

Факторы терминации трансляции являются нам пример *молекулярной мимикрии* (*molecular mimicry*), посредством которой макромолекула одного типа напоминает по форме какую-либо молекулу с совсем неродственными химическими свойствами. В данном случае трехмерная структура факторов терминации (состоящих полностью из белка) напоминает формой и распределением заряда молекулу тРНК (рис. 6.75). Такая мимикрия формы и заряда помогает им проникать в А-участок рибосомы и

Рис. 6.74. Заключительный этап синтеза белка. Трансляция завершается закреплением фактора терминации на А-участке, в котором находится стоп-кодон. Завершенный полипептид высвобождается, претерпевая череду реакций, которые требуют дополнительных белков и гидролиза GTP (не показано), а рибосома диссоциирует на две субчастицы.

вызывать терминацию трансляции.

Во время трансляции новоявленный полипептид проходит по крупному, заполненному водой туннелю (приблизительно $10 \times 1,5$ нм) в большой субчастице рибосомы (см. рис. 6.70, в). Стенки этого туннеля, выложенные преимущественно 23S рРНК, представляют собой мозаику из крошечных гидрофобных поверхностей, уложенных на более пространном гидрофильном фоне. Такая структура не комплементарна никакому пептиду и поэтому сродни тефлоновой покрытию, по которому полипептидная цепь может с легкостью скользить. Размеры туннеля предполагают, что создаваемые белки в основном бесструктурны на тот момент, когда они проходят через рибосому, хотя некоторые α -спиральные области белка могут формироваться еще до выхода из рибосомного туннеля. По оставлению рибосомы недавно синтезированный белок должен принять соответствующую ему трехмерную конформацию, чтобы выполнять предназначенную ему функцию в клетке; позже в этой главе мы обсудим и то, как происходит фолдинг новосинтезированного белка. Ну а сначала мы опишем несколько дополнительных особенностей самого процесса трансляции.

6.2.12. Белки собираются на полирибосомах

Синтез большинства белковых молекул занимает от 20 секунд до нескольких минут. Однако в течение этого очень короткого периода на каждой транслируемой молекуле мРНК обыкновенно происходит множество событий инициации трансляции. Как только предшествующая рибосома оттранслирует достаточно нуклеотидной последовательности, чтобы сойти

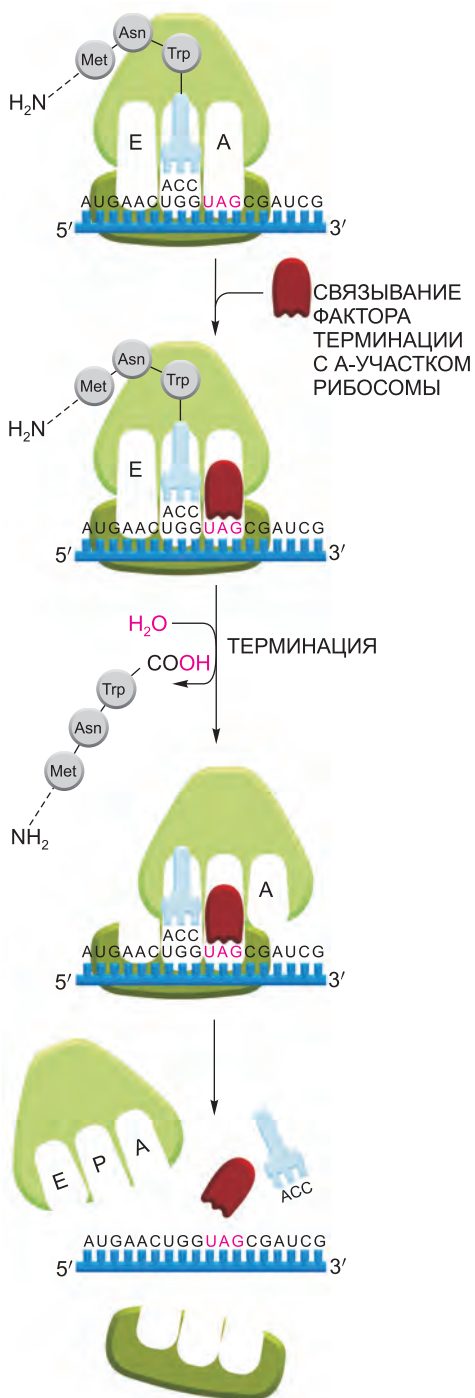




Рис. 6.75. Структура фактора терминации трансляции eRF1 человека, и его сходство с молекулой тРНК. Белок помещен *слева*, а тРНК — *справа*. (Займствовано из Н. Song et al., *Cell* 100: 311–321, 2000. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

с дистанции, 5'-конец мРНК тут же «заправляется» в новую рибосому. Поэтому транслируемые молекулы мРНК обычно встречаются в форме *полирибосом* (или *полисом*) — крупных цитоплазматических ансамблей, состоящих из нескольких рибосом, отстоящих друг от друга не более чем на 80 нуклеотидов, на одной молекуле мРНК (**рис. 6.76**). Такие мультиплетные события инициации позволяют клетке производить намного больше молекул белка за данное время, чем она могла бы, если бы синтез каждого следующего белка мог бы быть начат только по завершении синтеза всех предыдущих.

И бактерии, и эукариоты используют полисомы, а также прибегают к дополнительным стратегиям для лучшего увеличения общей скорости синтеза белка. Поскольку мРНК бактерий не нуждается в процессинге и доступна для рибосомы, уже во время «изготовления» рибосомы могут садиться на свободный конец бактериальной мРНК и начинать ее транслировать — даже до того, как ее транскрипция будет полностью завершена, — следуя «по пятам» за РНК-полимеразой, по мере перемещения последней по ДНК. В случае эукариотической мРНК ее 5'- и 3'-концы взаимодействуют друг с другом (см. рис. 6.40 и 6.76, *a*); поэтому, как только рибосома диссоциирует, две ее субчастицы находятся в оптимальном положении для того, чтобы реиницировать трансляцию на той же самой молекуле мРНК.

6.2.13. Есть некоторые отклонения от стандартного генетического кода

Как сообщалось в главе 1, генетический код (представленный на рис. 6.50) относится ко всем трем главным ветвям древа жизни, выступая важным свидетель-

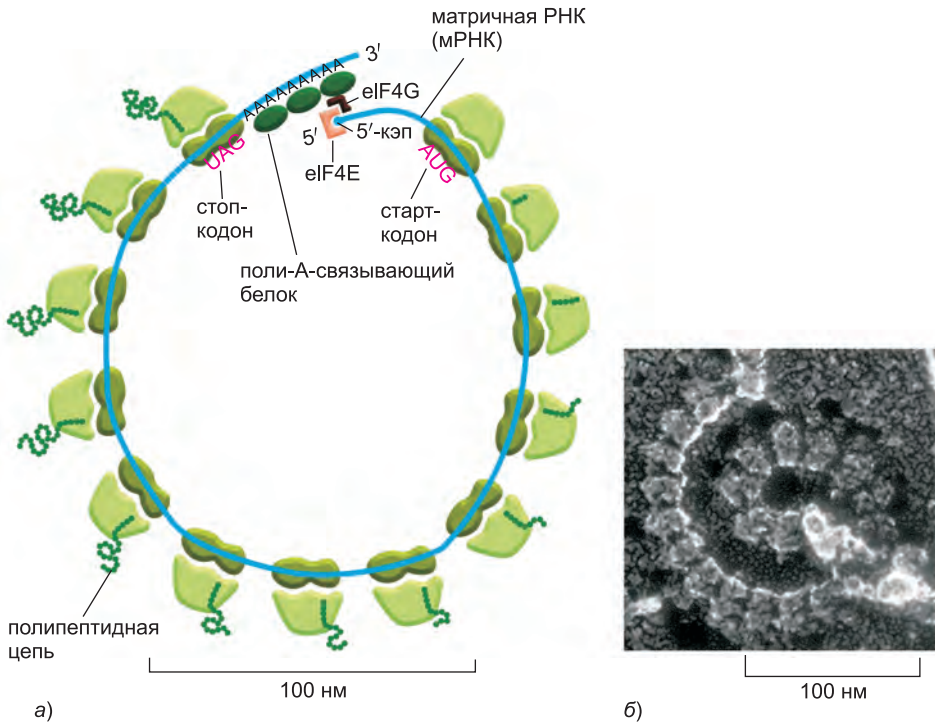


Рис. 6.76. Полирибосома. а) Схема, на которой показано, как ряд рибосом может одновременно транслировать одну молекулу эукариотической мРНК. б) Электронный микротооснимок полирибосомы в эукариотической клетке. (Изображение б любезно предоставил John Heuser.)

ством происхождения всей жизни на Земле от общего предка. Хотя и редко, но все же бывают и исключения из этого кода. Например, *Candida albicans* — самый распространенный грибковый патоген человека, транслирует кодон CUG как серин, тогда как почти все остальные организмы транслируют его в лейцин. Митохондрии (которые имеют свои собственные геномы и кодируют большую часть своего трансляционного аппарата) часто отклоняются от стандартного кода. Например, в митохондриях млекопитающих триплет AUA транслируется как метионин, тогда как в цитозоле клетки он транслируется как изолейцин (см. табл. 14.3, **стр. 862**). Такого типа отклонения в генетическом коде заложены в самом трансляционном «аппарате» организмов или органелл, в которых они имеют место.

Во многих клетках встречается изменчивость иного вида, иногда называемая *рекодированием трансляции*, или *трансляционным перекодированием* (*translation recoding*). В данном случае информация из другой нуклеотидной последовательности, находящейся в мРНК, может изменить смысловое содержание генетического кода в специфическом участке молекулы мРНК. Стандартный код позволяет клеткам производить белки, используя только 20 аминокислот. Однако бактерии, археи и эукариоты имеют в наличии двадцать первую аминокислоту, которая может быть включена непосредственно в растущую полипептидную цепь посредством рекодирования трансляции. Селеноцистеин, который абсолютно необходим для эффективной работы самых разных ферментов, содержит атом селена на месте

атома серы в цистеине. Селеноцистеин производится ферментативно из серина, присоединенного к молекуле специальной тРНК, которая спаривается основаниями с кодоном UGA — обычно сигнализирует остановку трансляции. Молекулы мРНК для белков, в которые на кодоне UGA должен быть вставлен селеноцистеин, несут дополнительную нуклеотидную последовательность поблизости от него, которая и вызывает такое событие перекодирования (рис. 6.77).

Другая форма перекодировки, *сдвиг рамки считывания при трансляции (translation frameshifting)*, позволяет синтезировать с одной мРНК более одного белка. Ретровирусы — члены большой группы патогенов, которые инфицируют эукариот, — обычно используют сдвиг рамки считывания при трансляции, чтобы производить белки капсида (*белки Gag*), а также вирусную обратную транскриптазу и интегразу (*белки Pol*) с одного РНК-транскрипта (см. рис. 5.73). Вирусу нужно намного больше копий белков Gag, чем таковых белка Pol. Такое количественное урегулирование достигается за счет кодирования генов *Pol* сразу после генов *Gag*, но в другой рамке считывания. Небольшие количества продуктов гена *Pol* производятся ввиду того, что эпизодически происходящий выше сдвиг рамки считывания при трансляции позволяет пропускать стоп-кодон белка Gag. Такой сдвиг рамки считывания происходит в определенном кодоне мРНК и требует специфического

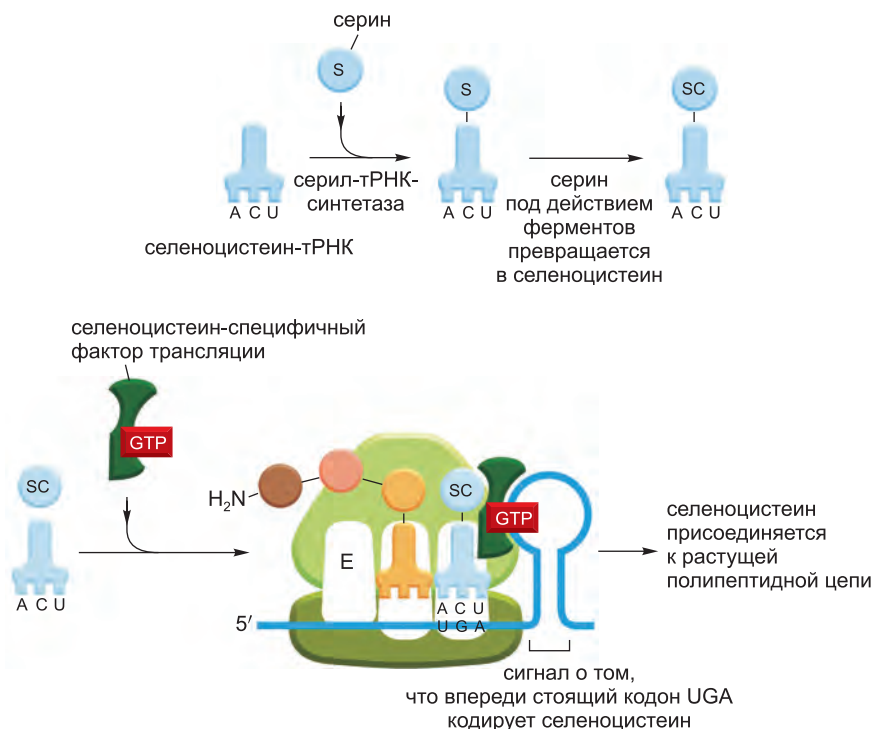


Рис. 6.77. Включение селеноцистеина в растущую полипептидную цепь. Специализированная тРНК загружается серином при содействии обычной серил-тРНК-синтетазы, и серин впоследствии ферментативно преобразуется в селеноцистеин. Определенная структура в мРНК (структура стебля и петли со специфической последовательностью нуклеотидов) сигнализирует, что селеноцистеин должен быть вставлен у соседнего UGA-кодона. Как показано на схеме, это событие требует участия селеноцистеин-специфического фактора трансляции.

сигнала рекодирования (*recording signal*), который, кажется, является структурной особенностью последовательности РНК, расположенной ниже участка этого кодона (рис. 6.78).

6.2.14. Ингибиторы синтеза белка прокариот как антибиотики

Многие из наиболее действенных антибиотиков, применяемых в современной медицине, представлены соединениями, выделяемыми грибами, которые замедляют синтез бактериальных белков. Грибы и бактерии конкурируют за многие из населяемых ими экологических ниш, и за миллионы лет совместной эволюции грибы научились вырабатывать сильнодействующие ингибиторы против бактерий. Некоторые из таких лекарств основаны на структурных и функциональных различиях между рибосомами бактерий и эукариот — с тем чтобы избирательно препятствовать работе бактериальных рибосом. Таким образом, люди могут принимать высокие дозы некоторых из таких соединений без риска неспецифической токсичности. Многие антибиотики занимают карманы в рибосомных РНК и попросту мешают слаженной работе рибосомы (рис. 6.79). В таблице 6.4 перечислены некоторые из наиболее известных антибиотиков этого типа наряду с некоторыми другими ингибиторами

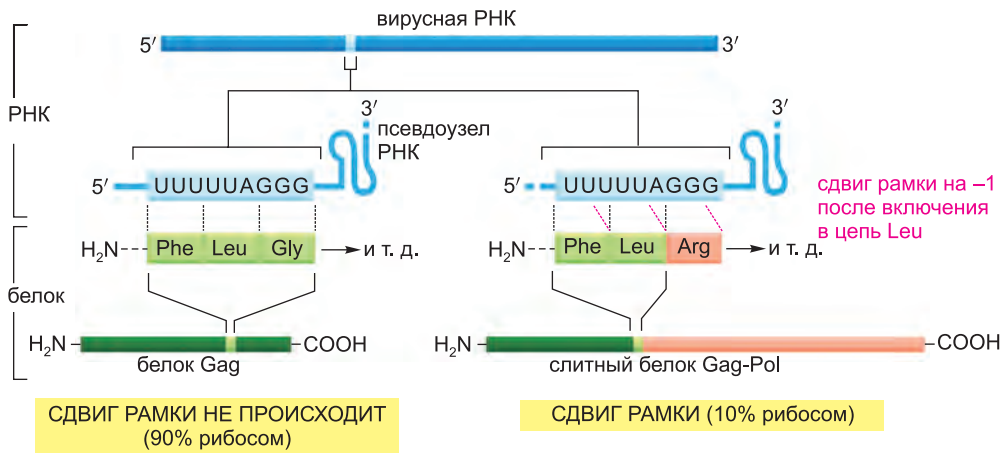


Рис. 6.78. Сдвиг рамки считывания, который обеспечивает синтез обратной транскриптазы и интегразы ретровируса. Присущие вирусу обратная транскриптаза и интеграза получаются в результате протеолитического процессинга крупного белка-предшественника (слитный белок Gag–Pol), состоящего из аминокислотных последовательностей белков Gag и Pol. Протеолитический процессинг экспрессируемого в огромных количествах белка Gag ведет белки вирусного капсида. И белок Gag, и слитный белок Gag–Pol начинаются с идентичной мРНК, но если белок Gag заканчивается на стоп-кодоне, расположенном ниже показанной последовательности, то трансляция слитного белка Gag–Pol обходит этот стоп-кодон, приводя к синтезу более длинного продукта. Пропуск стоп-кодона возможен благодаря контролируемому сдвигу рамки считывания при трансляции, как показано на схеме. Особенности, заложенные в локальной структуре РНК (включая показанную петлю РНК), приводят к тому, что тРНК^{Leu}, присоединенная к С-концу растущей полипептидной цепи, иногда соскальзывает на рибосоме назад на один нуклеотид таким образом, что оказывается спаренной с кодоном UUU вместо кодона UUA, который первоначально задал ее включение в полипептидную цепь; следующий кодон (AGG) в новой рамке считывания определяет аргинин, а не глицин. Такое контролируемое скольжение обусловлено отчасти псевдоузлом, который образуется на вирусной мРНК (см. рис. 6.102). На рисунке представлена последовательность вируса AIDS (СПИД) человека, HIV (Переработано из T. Jacks et al., *Nature* 331: 280–283, 1988. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

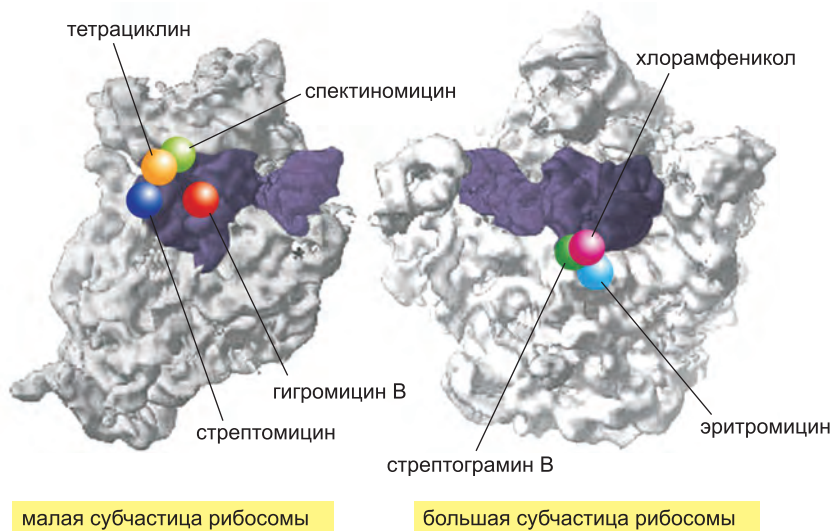


Рис. 6.79. Участки связывания антибиотиков на бактериальной рибосоме. Малая (слева) и большая (справа) субчастицы рибосомы расположены так, как если бы рибосома была открыта подобно книге; связанные молекулы тРНК представлены в фиолетовом цвете (см. рис. 6.64). Большинство из показанных антибиотиков связывается непосредственно с карманами, образованными молекулами рибосомной РНК. Гигромицин В вызывает ошибки в трансляции, спектиномицин блокирует перемещение пептидил-тРНК из А-участка в Р-участок, а стрептограмин В препятствует элонгации синтезируемых пептидов. В таблице 6.4 приведено описание механизмов ингибирования, присущих другим антибиотикам, показанными на рисунке. (Переработано из J. Pohlsgaard and S. Douthwaite, *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 870–881, 2005. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

синтеза белка — иные из их числа воздействуют на клетки эукариот и поэтому не могут применяться в качестве антибиотиков.

Поскольку многие соединения из приведенных в таблице 6.4 блокируют определенные операции в процессах, которые ведут от ДНК к белку, они полезны для исследований в области клеточной биологии. Среди наиболее широко применяемых в таких исследованиях препаратов мы упомянем *хлорамфеникол*, *циклогексимид* и *пурамицин* — все они специфически ингибируют синтез белка. В клетке эукариот, например, хлорамфеникол ингибирует синтез белка на рибосомах только в митохондриях (и в хлоропластах у растений), что, возможно, отражает происхождение этих органелл от прокариот (обсудим это в главе 14). Циклогексимид, напротив, затрагивает только рибосомы в цитозоле. Пурамицин особенно интересен, потому что это структурный аналог молекулы тРНК, связанной с аминокислотой, так что он дает нам еще один пример молекулярной мимикрии; рибосома ошибочно принимает его за подлинную аминокислоту и ковалентно связывает с С-концом растущей пептидной цепи, таким образом вызывая преждевременное завершение и высвобождение полипептида. Как и следовало ожидать, пурамицин ингибирует синтез белка как у прокариот, так и у эукариот.

Таблица 6.4. Ингибиторы синтеза белка или РНК

ИНГИБИТОР	СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ
<i>Эффективен только для бактерий</i>	
Тетрациклин	блокирует связывание аминоацил-тРНК с А-участком рибосомы
Стрептомицин	препятствует переходу от инициации трансляции к элонгации цепи, а также нарушает декодирование
Хлорамфеникол	блокирует пептидил-трансферазную реакцию на рибосомах (этап 2 на рис. 6.66)
Эритромицин	блокирует элонгацию пептидной цепи, связываясь в канале выхода рибосомы
Рифамицин	блокирует инициацию цепей РНК, присоединяясь к РНК-полимеразе (препятствует синтезу РНК)
<i>Эффективен и для бактерий, и для эукариот</i>	
Пурамицин	присоединяясь к концу растущей полипептидной цепи, вызывает ее преждевременное отделение от рибосомы
Актиномицин D	связывается с ДНК и блокирует перемещение РНК-полимеразы (препятствует синтезу РНК)
<i>Эффективен только для эукариот</i>	
Циклогексимид	блокирует реакцию транслокации на рибосомах (этап 3 на рис. 6.66)
Анизомидин	блокирует пептидил-трансферазную реакцию на рибосомах (этап 2 на рис. 6.66)
α -аманитин	блокирует синтез мРНК, связываясь преимущественно с РНК-полимеразой II

Примечание. Рибосомы в митохондриях (и хлоропластах) эукариот по своей чувствительности к ингибиторам часто близки к рибосомам прокариот. Следовательно, некоторые из этих антибиотиков могут оказывать вредное воздействие на митохондрии человека.

6.2.15. Точность трансляции требует затрат свободной энергии

Осуществляемая рибосомой трансляция есть компромисс между противоречивыми ограничениями точности и скорости. Мы уже видели, например, что точность трансляции (1 ошибка на 10^4 соединенных аминокислот) требует задержки во времени каждый раз, когда новая аминокислота добавляется к растущей полипептидной цепи, в силу чего общая скорость трансляции снижается и составляет у бактерий 20 включенных аминокислот в секунду. Мутантные бактерии с определенным видоизменением в малой субчастице рибосомы делают более продолжительные паузы и транслируют мРНК в белок с гораздо более высокой точностью, чем приведенная выше цифра; однако синтез белка у таких мутантов протекает столь медленно, что бактерии едва успевают выжить.

Мы узнали также и то, что достижение наблюдаемой точности синтеза белка требует затрат большого количества свободной энергии; это вполне оправданно, ибо, как мы рассуждали в главе 2, существует определенная цена, которую клетка должна платить за любое увеличение порядка в своих владениях. В большинстве клеток синтез белка потребляет больше энергии, чем любой другой процесс биосинтеза. Так, для образования каждой новой пептидной связи необходимо расщепить, по крайней мере, четыре высокоэнергетические фосфатные связи: две потребляются при загрузке молекулы тРНК аминокислотой (см. рис. 6.56) и еще две идут на осуществление операций реакционного цикла реакций, происходящих на рибосоме во время собственно синтеза (см. рис. 6.67). Вдобавок к этому дополнительная энергия

расходуется каждый раз, когда связь с неправильной аминокислотой гидролизуется тРНК-синтетазой (см. рис. 6.59), и каждый раз, когда неправильная тРНК входит в рибосому, запускает гидролиз ГТР и выбраковывается (см. рис. 6.67). Для обеспечения эффективности такие корректирующие механизмы должны допускать также и удаление заметной доли правильных взаимодействий; по этой причине коррекция оказывается еще более затратной по энергии, чем может казаться.

6.2.16. Механизмы контроля качества действуют таким образом, чтобы предотвратить трансляцию поврежденных молекул мРНК

У эукариот производство мРНК включает в себя как транскрипцию, так и ряд сложных операций процессинга РНК; последние протекают в ядре, отдельно от рибосом, и только по окончании «обработки» молекулы мРНК транспортируются в цитоплазму для последующей их трансляции (см. рис. 6.40). Однако эта схема не защищена от ошибок и некоторые неправильно процессируемые молекулы мРНК по недосмотру все-таки отправляются в цитоплазму. Кроме того, молекулы мРНК, которые были безупречны, когда покидали ядро, могут под действием каких-либо факторов разорваться или повредиться уже в цитозоле. Ясно, что опасность трансляции поврежденных или не полностью процессированных молекул мРНК (в результате чего получились бы усеченные или — в ином ключе аберрантные белки) столь велика, что клетка имеет несколько резервных мер, призванных предотвратить появление таких досадных случаев.

Дабы избежать трансляции разорванных молекул мРНК, машины инициации трансляции, прежде чем ее начать, опознают 5'-кэп и поли-А-хвост (см. рис. 6.72). Помогает подтвердить, что молекула мРНК должным образом сплайсирована, прежде чем допустить ее к трансляции, комплекс соединения экзонов (ЕКС), который, размещаясь на мРНК после ее сплайсирования, стимулирует последующую трансляцию мРНК (см. рис. 6.40).

Но самая мощная «система надзора» за мРНК, названная **нонсенс-опосредствованным распадом мРНК (nonsense-mediated mRNA decay)**, устраняет дефектные молекулы мРНК прежде, чем они могут быть транслированы в белок. Этот механизм вводится в игру, когда клетка решает, что молекула мРНК несет стоп-кодон (UAA, UAG или UGA) в «неподходящем» месте (такой кодон называют бессмысленным, или нонсенс-кодоном), — такая ситуация, вероятнее всего, возникает в молекуле мРНК, которая была неправильно сплайсирована. Аберрантный сплайсинг обычно приводит к случайному введению нонсенс-кодона в рамку считывания мРНК, особенно в организмах наподобие человека, чьи интроны отличаются большим средним размером (см. рис. 6.32, б).

Этот механизм надзора начинает действовать, когда молекула мРНК транспортируется из ядра в цитозоль. Как только 5'-конец мРНК показывается из ядерной поры, его встречает рибосома, которая и начинает транслировать эту мРНК. По мере протекания трансляции приграничные комплексы экзона (ЕКС), связанные с мРНК на каждом участке сплайсинга, очевидно, вытесняются движущейся рибосомой. Нормальный стоп-кодон будет находиться в пределах последнего экзона, так что ко времени, когда рибосома достигнет его и остановится, на мРНК больше не должно остаться ни одного ЕКС. Если дело обстоит именно так, то мРНК считается «прошедшей осмотр» и выпускается в цитозоль, где клетка может транслировать ее, уже не сомневаясь в ее правильности (рис. 6.80). Однако, если рибосома достигает

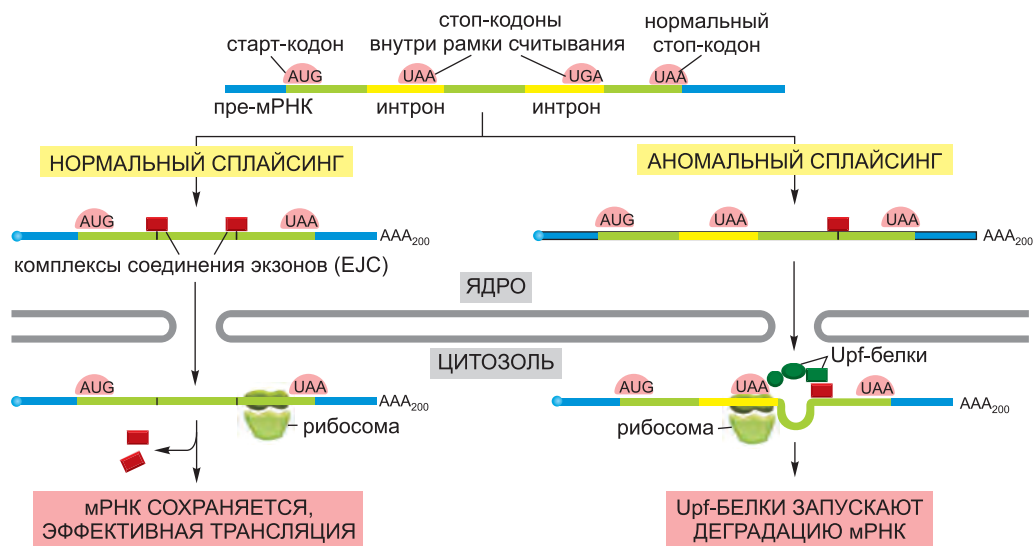


Рис. 6.80. Нонсенс-опосредствованный распад мРНК. Как показано справа, в случае неудачного сплайсинга пре-мРНК в рамку считывания для белка часто вводится преждевременный стоп-кодон. Особенно высока вероятность введения такого «внутрирамочного» стоп-кодона у млекопитающих, где интроны, как правило, очень длинные. При трансляции таких неправильных молекул мРНК получают аномальные, или aberrantные, белки, которые могут повредить клетке. Однако, как показано в правом нижнем углу рисунка, такие неправильные РНК разрушаются действием механизма нонсенс-опосредствованного распада. Согласно одной модели, молекулу мРНК, несущую комплексы соединения экзонов (EJC) — чтобы «отметить» успешно завершённые сращивания, — сначала встречает рибосома, которая проводит «пробный» раунд трансляции. По мере прохождения мРНК через узкий канал рибосомы EJC вытесняются и успешно прошедшие испытание молекулы мРНК высвобождаются, чтобы подвергнуться уже многократным раундам трансляции (слева). Однако если стоп-кодон встретится прежде, чем будет достигнут последний EJC (справа), то мРНК подвергнется нонсенс-опосредствованному распаду, запускаемому белками Uprf (зеленые), которые связываются с каждым EJC. Обратите внимание, что для запуска нонсенс-опосредствованного распада преждевременный стоп-кодон должен быть в той же рамке считывания, которая кодирует нормальный белок. (Переработано из J. Lykke-Andersen et al., *Cell* 103: 1121–1131, 2000. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

преждевременного стоп-кодона и застопоривается, то это значит, что на молекуле мРНК остались EJC, и эта РНК подвергается незамедлительной деградации. Таким образом, первый раунд трансляции позволяет клетке проверить пригодность каждой молекулы мРНК на выходе из ядра.

Нонсенс-опосредствованный распад, возможно, был особенно важен в эволюции, позволяя клеткам эукариот с большей легкостью осваивать новые гены, образовывавшиеся путем перестроек ДНК, мутаций или альтернативных схем сплайсинга, — за счет возможности выбора для трансляции только тех молекул мРНК, которые могут произвести полноразмерные белки. Нонсенс-опосредствованный распад важен также и в клетках развивающейся иммунной системы, где происходят интенсивные перестройки ДНК (см. рис. 25.36), что часто приводит к появлению преждевременных стоп-кодонов. Система надзора обеспечивает деградацию молекул мРНК, произведенных из таких перестроенных генов, позволяя, таким образом, избежать потенциального токсического воздействия усеченных белков.

Наконец, нонсенс-опосредствованный надзор играет важную роль в смягчении симптомов многих наследственных болезней человека. Как мы знаем, наследственные заболевания обычно вызваны мутациями, которые нарушают функции ключевого белка — такого, как например, гемоглобин или один из факторов свертывания крови. Приблизительно одна треть всех генетических нарушений у людей обусловлена нонсенс-мутацией или мутациями (такими как мутации со сдвигом рамки считывания или мутации в участках сплайсинга), которые помещают нонсенс-мутации в рамку считывания гена. У индивидов, которые несут один мутантный и один функционально активный гены, нонсенс-опосредствованный распад устраняет aberrантные мРНК и таким образом предотвращает синтез потенциально токсичного белка. Без такой системы безопасности у индивидов с одним функционально активным и одним мутантным «геном патологии», по всей вероятности, симптомы заболевания были бы выражены намного сильнее.

Ранее мы уже узнали из этой главы, что бактерии не проводят сложной «обработки» мРНК, т. е. процессинга, свойственного эукариотам, и что трансляция часто начинается до полного завершения синтеза молекулы РНК. И все же бактерии тоже имеют механизмы «проверки качества», призванные решать дальнейшую участь не полностью синтезированных и усеченных молекул мРНК. Когда бактериальная рибосома доходит до конца неполной РНК, она застопоривается и не высвобождает РНК. Освобождение приходит в форме специальной РНК (названной tmРНК), которая входит в А-участок рибосомы и самотранслируется, вызволяя рибосому. Специальный 11-аминокислотный ярлык (тэг — от англ. tag), навешиваемый таким путем на С-конец усеченного белка, сигнализирует протеазам, что весь белок должен быть деградирован (рис. 6.81).

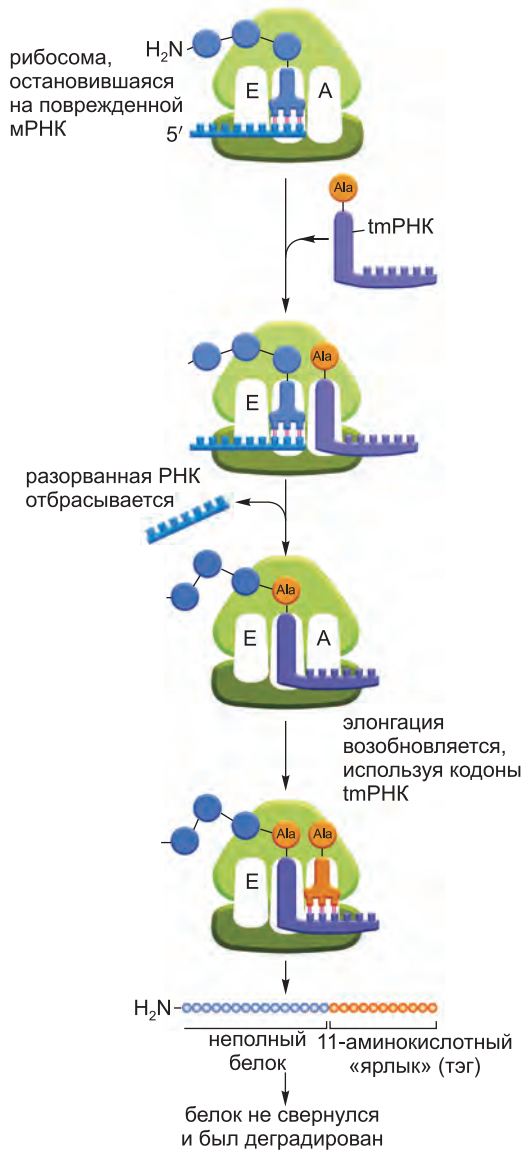
6.2.17. Некоторые белки начинают сворачиваться еще до завершения синтеза

Процесс экспрессии гена не заканчивается тем моментом, когда генетический код использован для создания последовательности аминокислот, входящих в состав белка. Чтобы быть полезной для клетки, новая полипептидная цепь должна свернуться в свою уникальную трехмерную конформацию, связаться с какими-либо малыми молекулами, выступающими в роли кофакторов и необходимыми для ее активности, быть надлежащим образом модифицирована протеинкиназами или какими-то другими модифицирующими белок ферментами и, наконец, быть правильно собрана с другими белковыми субъединицами, вкуче с которыми она работает (рис. 6.82).

Информация, необходимая для всех вышеупомянутых шагов, в конечном счете содержится в последовательности связанных друг за другом аминокислот, которую рибосома производит, когда транслирует молекулу мРНК в полипептидную цепь. Как обсуждалось в главе 3, при сворачивании полипептидной цепи в компактную структуру большинство гидрофобных остатков оказывается внутри. Кроме того, между разными частями молекулы образуется большое число нековалентных взаимодействий. Именно общая совокупность всех этих энергетически благоприятных взаиморасположений и определяет конечную модель свернутой полипептидной цепи — это конформация с наименьшей свободной энергией (см. стр. 130).

За многие миллионы лет эволюции аминокислотная последовательность каждого белка была отобрана не только по конформации, которую она принимает,

Рис. 6.81. Освобождение бактериальной рибосомы, застопоренной на неполной молекуле мРНК. Показанная tmРНК представляет собой 363-нуклеотидную РНК, обладающую функциями и тРНК, и мРНК, откуда и происходит ее название. Она несет аланин и может войти в свободный А-участок застопоренной рибосомы, чтобы добавить этот аланин к полипептидной цепи, подражая тРНК, хотя не существует никакого кодона для организации этого шага. Тогда рибосома транслирует еще 10 кодонов с tmРНК, завершая 11-аминокислотный «ярлык» на белке. Протеазы опознают этот «ярлык» и деградируют весь белок. Хотя представленный на рисунке пример взят из мира бактерий, эукариоты тоже могут прибегать к подобной стратегии.



но также и по способности делать это быстро. У некоторых белков такое сворачивание начинается незамедлительно, как только белок выходит из рибосомы, с его N-конца (этот процесс называется «котрансляционным сворачиванием». — *Прим. ред.*). В таких случаях, по мере того как каждый очередной белковый домен появляется из рибосомы, в течение нескольких секунд он образует компактную структуру, которая содержит большинство конечных элементов вторичной структуры (α -спиралей и β -листов), выстроенных в близкой к правильной конформации (рис. 6.83). Для многих белковых доменов такое необычайно динамичное и пластичное состояние, называемое *расплавленной глобулой* (*molten globule*), служит отправной точкой для относительно медленного процесса, в ходе которого происходит множество видоизменений боковых цепей, в результате которых в конечном счете формируется правильная третичная структура. На синтез белка среднего размера уходит несколько минут, и для некоторых белков большая часть процесса фолдинга завершается к тому времени, когда рибосома высвобождает C-конец белка (рис. 6.84).

6.2.18. Сворачивание многих белков направляют молекулярные шапероны

Вряд ли большинство белков начинает сворачиваться во время своего синтеза. Вместо этого, у выхода из рибосомы их встречают белки «специального

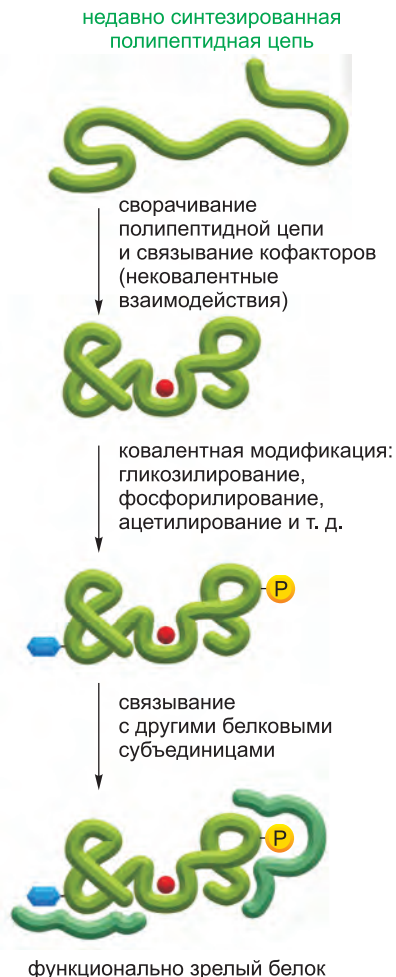


Рис. 6.82. Этапы создания функционально активного белка. Как показано на схеме, трансляция последовательности мРНК в последовательность аминокислот на рибосоме отнюдь не завершает процесс формирования белка. Чтобы выполнять свою функцию, законченная полипептидная цепь должна принять правильную трехмерную конформацию, связать все необходимые кофакторы и собраться в единое целое со своими белковыми партнерами (если таковые имеются). В основе этих изменений лежит образование нековалентных взаимодействий. Как видно на схеме, многим белкам требуются также ковалентные модификации отдельных аминокислот. Хотя наиболее распространенные модификации представлены гликозилированием и фосфорилированием белка, известно более 100 различных типов ковалентных модификаций (см., например, рис. 3.81).

назначения» — класс белков, называемых **молекулярными шаперонами (molecular chaperons)**. Молекулярные шапероны нужны клеткам, потому что существует множество различных путей, которые могут быть выбраны для преобразования развернутого или частично свернутого белка в его конечную компактную конформацию. У многих белков некоторые из промежуточных продуктов, образующихся по пути, агрегировали бы и были бы сочтены клеткой как «отходы производства», не вмешайся туда шаперон (**рис. 6.85**).

Многие молекулярные шапероны названы **белками теплового шока** (обозначаются *Hsp* ; *heat-shock protein*), потому что их синтез резко возрастает после того, как клетки подвергают кратковременному действию повышенной температуры (например, 42 °С для клеток, которые

обычно живут при 37 °С). Это отражает действие системы «обратной связи», которая реагирует на увеличение числа неправильно свернутых белков (типа тех, которые продуцируются при повышении температуры), наращивая синтез шаперонов, которые помогают этим белкам свернуться вновь и уже так, как надо.

Есть несколько главных семейств молекулярных шаперонов эукариот, в том числе белки *Hsp60* и *Hsp70*. Члены различных семейств действуют в разных органеллах. Так, как еще будет сказано в главе 12, митохондрии содержат свои собственные молекулы *Hsp60* и *Hsp70*, которые отличаются от тех, что работают в цитозоле; а специальный *Hsp70* (названный *BIP*) помогает сворачивать белки в эндоплазматической сети.

Все белки из семейств *Hsp60* и *Hsp70*, помогая другим белкам сворачиваться, работают со своими собственными маленькими наборами связанных белков. Все белки *Hsp* обладают сродством к выставленным на поверхности гидрофобным участкам не полностью свернутых белков и гидролизуют АТФ, часто связывая и высвобождая белок-субстрат с каждым циклом гидролиза АТФ. В других отношениях белки *Hsp*

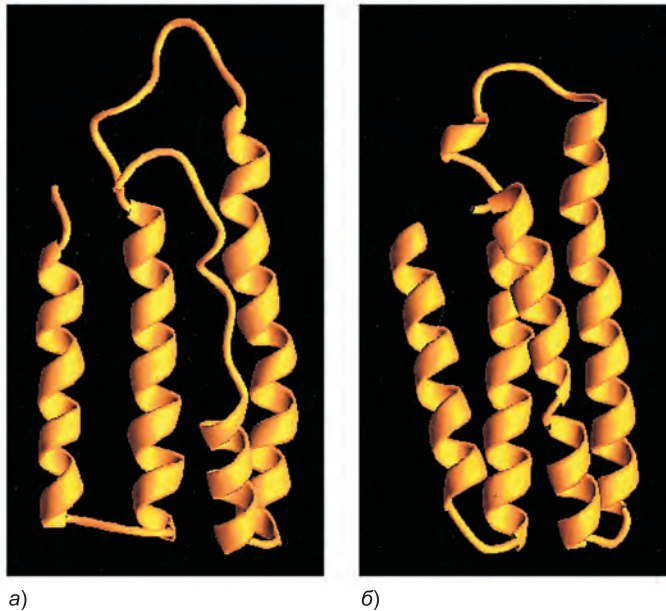


Рис. 6.83. Структура расплавленной глобулы. а) В форме расплавленной глобулы цитохром b_{562} более открыт и менее упорядочен, чем в окончательно свернутой форме, изображенной на виде б. Обратите внимание, что расплавленная глобула содержит большую часть вторичной структуры конечной формы, хотя концы α -спиралей еще не завиты, а одна из спиралей сформирована лишь частично. (Изображения любезно предоставлены Joshua Wand, опубликованы в Y. Feng et al., *Nat. Struct. Biol.* 1: 30–35, 1994. С великодушного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

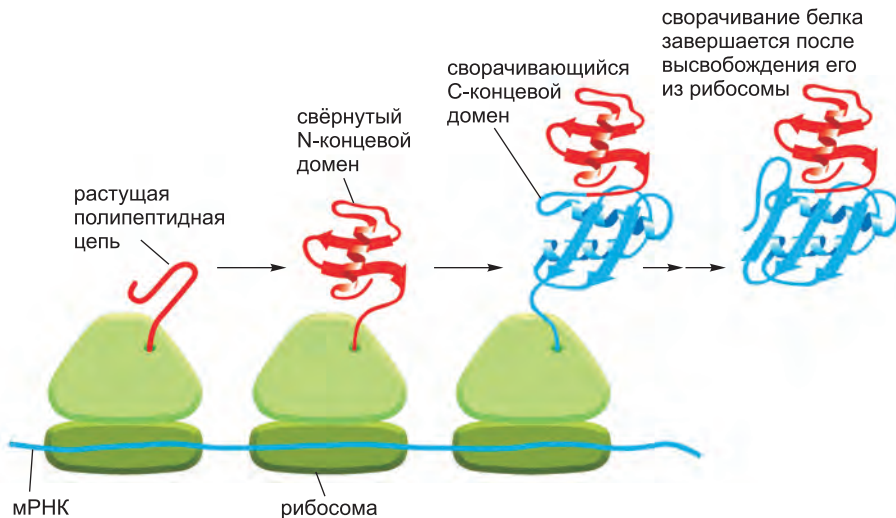


Рис. 6.84. Котрансляционное сворачивание белка. На рисунке показано, как растущая полипептидная цепь приобретает вторичную и третичную структуры по мере появления из рибосомы. Сначала сворачивается N-концевой домен, в то время как C-концевой домен еще синтезируется. До тех пор пока этот белок не высвободится из рибосомы, он не принимает конечную конформацию. (Взято с модификациями из A. N. Federov and T. O. Baldwin, *J. Biol. Chem.* 272: 32715–32718, 1997.)

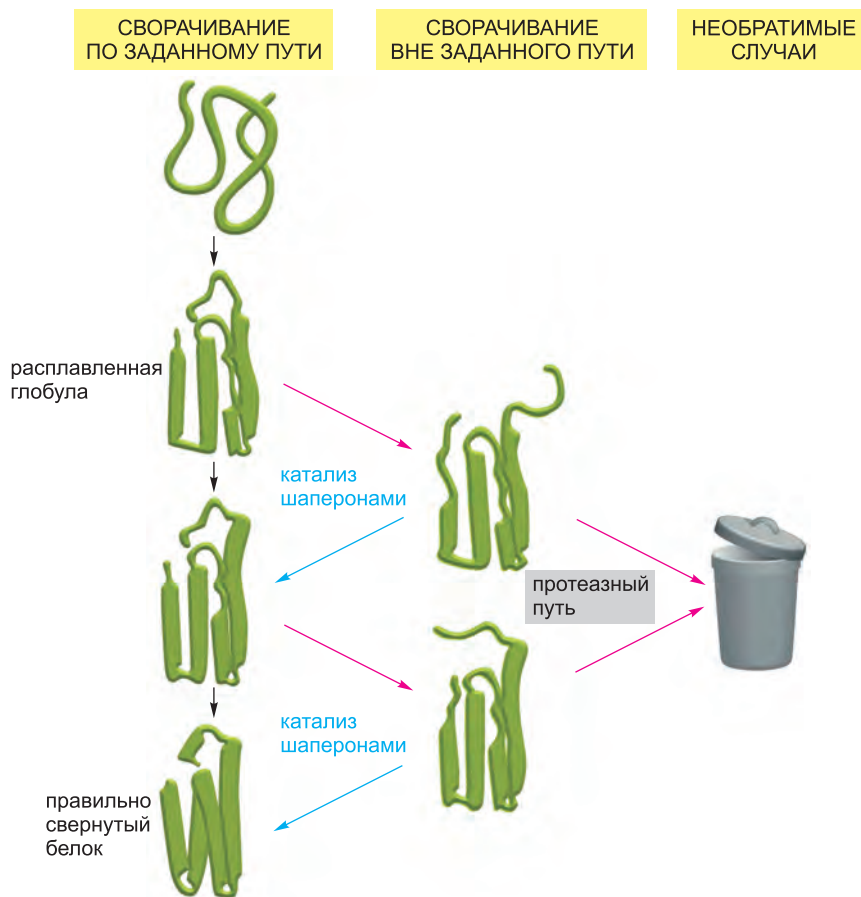


Рис. 6.85. Современный взгляд на фолдинг белка. Каждый домен недавно синтезированного белка быстро достигает состояния «расплавленной глобулы». Последующее сворачивание происходит медленнее и идет по множеству путей, часто с привлечением молекулярных шаперонов. Некоторым молекулам все равно не удастся свернуться правильно; как объяснено в тексте, определенные протеазы распознают такие молекулы и подвергают их деградации.

обоих типов работают по-разному. Машина из белков Hsp70 действует на ранних стадиях образования многих белков, связываясь с цепочкой приблизительно из семи гидрофобных аминокислот до того, как белок оставит рибосому (**рис. 6.86**). Напротив, Hsp60-подобные белки образуют большую бочкообразную структуру, которая действует после того, как белок полностью синтезирован. Шаперон такого типа, иногда называемый *шаперонином* (*chaperonin*), формирует «изоляционную камеру», в которую доставляются неправильно свернутые белки, агрегацию коих он предотвращает и предоставляет им благоприятную среду, в которой у них есть возможность исправиться и принять нужную форму (**рис. 6.87**).

Шаперонам, представленным на рис. 6.86 и 6.87, часто приходится осуществлять множество циклов гидролиза АТФ, чтобы добиться правильной укладки очередной полипептидной цепи. Хотя часть этой энергии идет на выполнение механической работы, вероятно, намного больше ее расходуется на то, чтобы га-

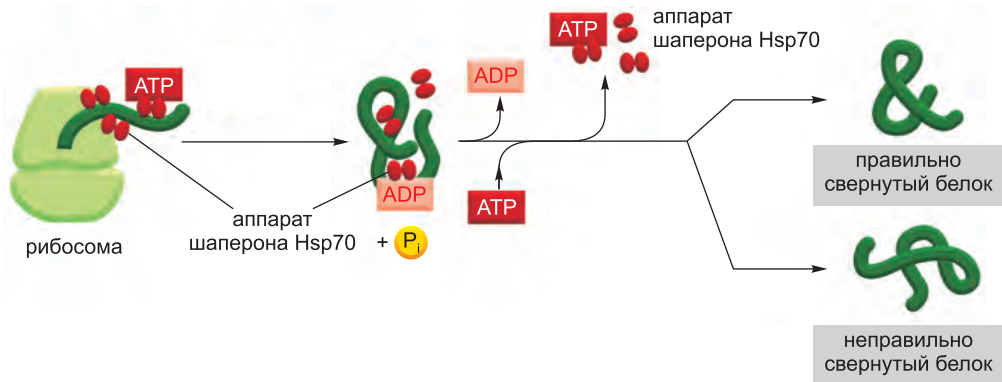


Рис. 6.86. Семейство Hsp70 молекулярных шаперонов. Эти белки действуют на раннем этапе, опознавая короткий отрезок гидрофобных аминокислот на поверхности белка. При содействии ряда более мелких белков Hsp40 (не показаны) связанные с ATP молекулы Hsp70 захватывают свой целевой белок и затем гидролизуют ATP до ADP, претерпевая конформационные изменения, которые вынуждают молекулы Hsp70 связываться с мишенью еще прочнее. После того как Hsp40 отделяется, быстрое повторное связывание ATP индуцирует диссоциацию белка Hsp70 после высвобождения ADP. В действительности повторные циклы связывания и высвобождения белка Hsp помогают целевому белку свернуться вновь (совершить рефолдинг), как схематично показано на рис. 6.85.

рантировать надлежащую укладку белка в конце процесса. Точно так же, как мы видели на примерах транскрипции, сплайсинга и трансляции, затраченная свободная энергия может быть употреблена клетками на повышение точности биологического процесса. В случае белкового фолдинга гидролиз ATP позволяет шаперонам распознать широкий круг ошибочно свернутых структур, остановить их дальнейшее сворачивание и возобновить фолдинг белка — уже по правильному пути.

Хотя наше обсуждение было сосредоточено на шаперонах только двух типов, клетка располагает и множеством других. Огромное разнообразие белков в клетках, как можно думать, требует наличия и широкого репертуара шаперонов с многоплановыми возможностями надзора и исправления.

6.2.19. Экспонируемые гидрофобные области служат аварийными сигналами для проверки качества белка

Если в клетки на короткое время ввести радиоактивные аминокислоты, то можно проследить, как недавно синтезированные белки созревают до своей конечной функционально активной формы. Такого рода эксперименты показывают, что белки Hsp70 начинают действие первыми: когда белок еще продолжает синтезироваться на рибосоме; а Hsp60-подобные белки включаются в работу лишь позже и помогают свернуться уже завершенным белкам. Но как клетка отличает неверно свернутые белки, которые требуют дополнительных циклов катализируемого ATP рефолдинга, от белков с правильными структурами?

Перед тем как ответить на данный вопрос, мы должны взять паузу, чтобы рассмотреть посттрансляционную судьбу белков в более широком ракурсе. Обычно, если на поверхности белка экспонирован порядочного размера участок гидрофобных аминокислот, то это ненормально: белок или не смог правильно свернуться после

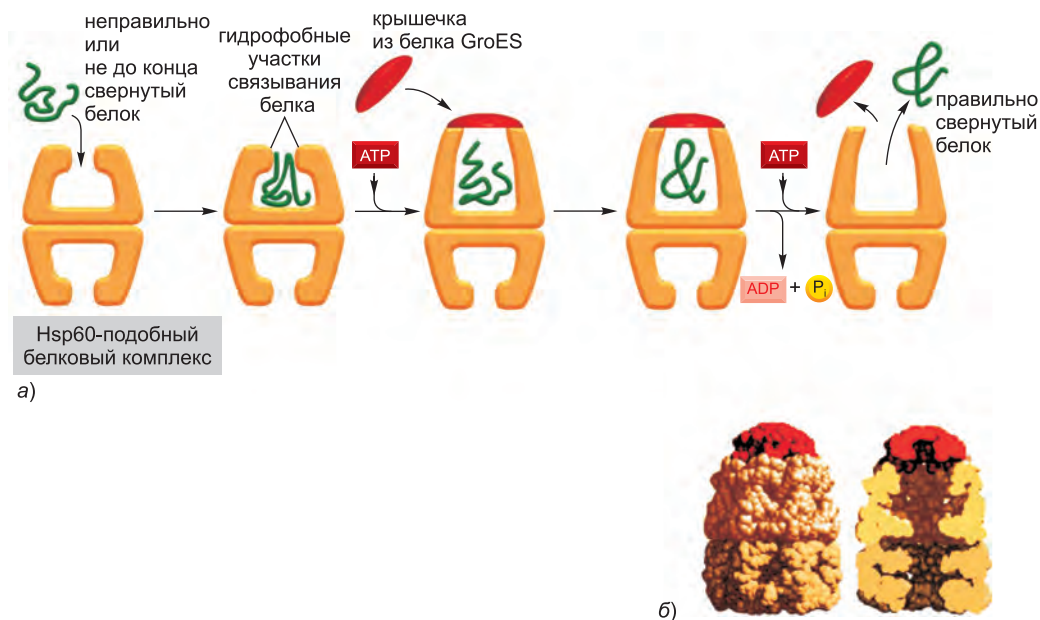


Рис. 6.87. Структура и функция семейства Hsp60 молекулярных шаперонов. а) Катализ рефолдинга белка. Ошибочно свернутый белок сначала улавливается гидрофобными взаимодействиями по одному ободу бочки. Последующее связывание ATP плюс белковая крышка увеличивают диаметр обода бочки, в результате чего «белок-клиент» может кратковременно распрямиться (частично развернуться). Кроме этого, белок теперь замкнут в ограниченном пространстве, где он имеет возможность заново свернуться. Примерно через 15 секунд происходит гидролиз ATP, ослабляющий комплекс. При последующем связывании следующей молекулы ATP белок, будь он свернут или нет, извлекается и цикл повторяется. Молекулярный шаперон такого типа известен также под именем шаперонин; он обозначается как Hsp60 в митохондриях, TCP1 — в цитозоле клеток позвоночных и GroEL — у бактерий. Как показано на рисунке, только половина симметричной бочки обслуживает белкового «клиента» в любой момент времени. б) Структура GroEL, связанного со своей крышкой GroES, — по данным рентгеновской кристаллографии. Слева показана внешняя сторона бочкообразной структуры, а справа — продольный срез через ее центр. (Изображение б переработано на основании В. Bukau and A. L. Horwich, *Cell* 92: 351–366, 1998. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

выхода из рибосомы, или перенес какое-либо бедствие, которое частично развернуло его позже, или же был не в состоянии найти своего партнера-субъединицу в более крупном белковом комплексе. Такой белок не просто бесполезен для клетки — он может быть опасен. Многие белки с чрезмерно экспонированной гидрофобной областью могут образовывать в клетке огромные агрегаты. Мы увидим, что, в редких случаях, такие конгломераты и в самом деле образуются и вызывают серьезные заболевания у человека. Однако мощные механизмы «проверки качества» белка обычно предотвращают подобные бедствия.

Учитывая такую обстановку, никого не удивляет, что клетки выработали в ходе эволюции сложнейшие механизмы, которые распознают гидрофобные области на белках и сводят к минимуму наносимый ими урон. Два таких механизма зависят от только что описанных молекулярных шаперонов: они связываются с гидрофобной областью и пытаются «отремонтировать» (репарировать) дефектный

белок, предоставляя ему очередной шанс свернуться. В то же время, покрывая гидрофобные области, эти шапероны кратковременно предотвращают образование агрегатов. Белки, которые сами очень быстро и правильно сворачиваются, не экспонируя гидрофобных областей, шапероны обходят стороной.

На **рис. 6.88** приведены все варианты проверки качества, которые клетка проводит в отношении трудносвертывающихся недавно синтезированных белков. Как показано, когда попытки рефолдинга терпят неудачу, в действие приводится третий механизм — полное уничтожение белка путем протеолиза. Протеолитический путь начинается с опознавания аномальной гидрофобной области на поверхности белка и заканчивается отправкой всего белка на машину разрушения — это сложная протеаза, известная под названием *протеасома*. Как будет описано далее, этот процесс зависит от сложноорганизованной системы «маркировки» белков, которая выполняет также и другие очень важные функции в клетке, уничтожая определенные нормальные белки.

6.2.20. Протеасома представляет собой компартиментализованную протеазу с изолированными активными участками

Протеолитические машины и шапероны соревнуются между собой за право реорганизации неправильно свернутого белка. Если недавно синтезированный белок сворачивается быстро, то лишь малая доля его подвергается деградаци. Напротив, медленно свертывающийся белок уязвим протеолитической машиной в течение более длительного времени и намного большее число его молекул разрушается прежде, чем остатки достигнут надлежаще свернутого состояния. В силу мутаций или же вследствие ошибок транскрипции, сплайсинга и трансляции РНК некоторые белки никогда не сворачиваются должным образом. И очень важно, чтобы клетка уничтожала такие потенциально опасные белки.

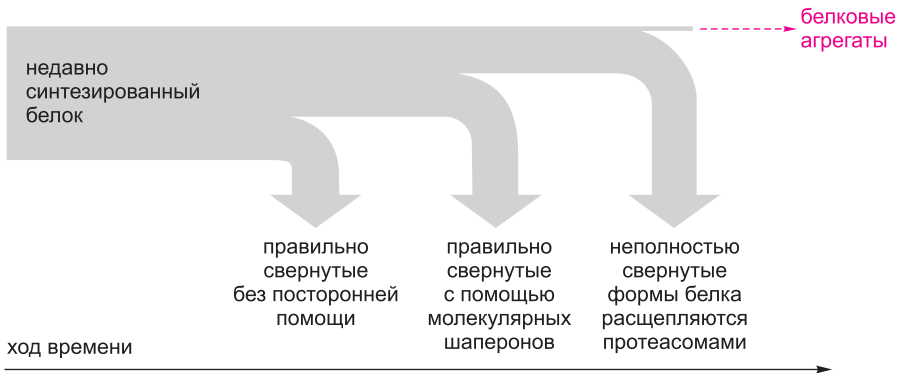
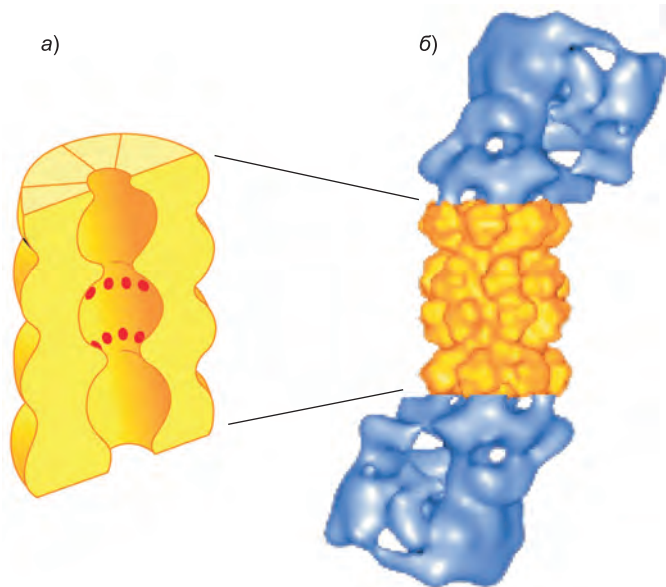


Рис. 6.88. Процессы отслеживания качества белка после его синтеза. Недавно синтезированный белок иногда сворачивается правильно и самостоятельно объединяется со своими белками-партнерами — в таком случае механизмы «проверки качества» оставляют его в покое. Неправильно свернутым белкам помогают повторно свернуться (совершить рефолдинг) молекулярные шапероны: сначала белки из семейства Hsp70, а затем, в некоторых случаях, — Hsp60-подобные белки. Шапероны обоих типов опознают своих «клиентов» по экспонированному участку гидрофобных аминокислот на поверхности. Эти процессы «спасения белка» конкурируют с другим механизмом, который после опознавания аномально выставленного гидрофобного участка помечает белок для разрушения протеасомой. Совокупное действие всех этих процессов необходимо для предотвращения в клетке массовой агрегации белков, что может произойти, если гидрофобные области множества белков неспецифично объединятся.

Аппарат, который сознательно уничтожает aberrантные белки, представлен **протеасомой (proteasome)** — присутствующая в клетке в большом количестве АТФ-зависимая протеаза, которая составляет почти 1% белка клетки. Присутствуя в многочисленных копиях, рассеянных всюду по цитозолю и ядру, протеасома уничтожает также и aberrантные белки эндоплазматического ретикулума (ER; endoplasmic reticulum). Ориентированная на ER система надзора обнаруживает белки, которые не в состоянии ни свернуться, ни быть собранными должным образом при поступлении в ER, и *ретротранслоцирует (retrotranslocates)* их обратно в цитозоль для деградации (обсудим это подробнее в главе 12).

Протеасома состоит из центрального полого цилиндра (20S-кор протеасомы), образованного из многочисленных белковых субъединиц, которые собираются в виде квазицилиндрической трубки из четырех гептамерных колец (**рис. 6.89**). Некоторые из этих субъединиц представляют собой различные протеазы, активные участки которых выходят во внутреннюю камеру цилиндра. Такое строение протеасомы удерживает эти очень эффективные протеазы от слишком рьяной деятельности в клетке. Каждый конец цилиндра обычно связан с крупным белковым комплексом (19S колпачок), представляющем собой белковое кольцо из шести субъединиц, через которое белки-мишени как бы продергиваются и попадают в ядро протеасомы, где подвергаются деградации (**рис. 6.90**). Реакция «вдевания нити», движимая гидролизом АТФ, разворачивает целевые белки по мере их продвижения сквозь колпачок, обнажая их перед протеазами, выстилающими ядро протеасомы (**рис. 6.91**). Белки, что составляют кольцевую структуру в колпачке протеасомы, принадлежат к большому классу белковых «анфолдаз» (unfoldases, что дословно значит «развертазы»), известных как *AAA-белки*. Многие из них функционируют как гексамеры, и вполне

Рис. 6.89. Протеасома. а) Изображенная в разрезе структура центрального 20S цилиндра, определенная рентгеноструктурным анализом, где активные участки протеаз обозначены красными точками. б) Полная протеасома, в которой центральный цилиндр (желтый) дополнен 19S колпачками (синие)



на каждом конце. Структура колпачка была определена путем компьютерной обработки полученных на электронном микроскопе изображений. Сложный колпачок (также называемый регуляторной частицей) избирательно связывает белки, которые помечены убиквитином — меткой для разрушения; после этого протеасома использует гидролиз АТФ для разворачивания полипептидной цепи этих белков и пропускает их через узкий канал (см. рис. 6.91) во внутреннюю камеру 20S цилиндра для переваривания до коротких пептидов. (Изображение б заимствовано из W. Vaumeister et al., *Cell* 92: 367–380, 1998. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

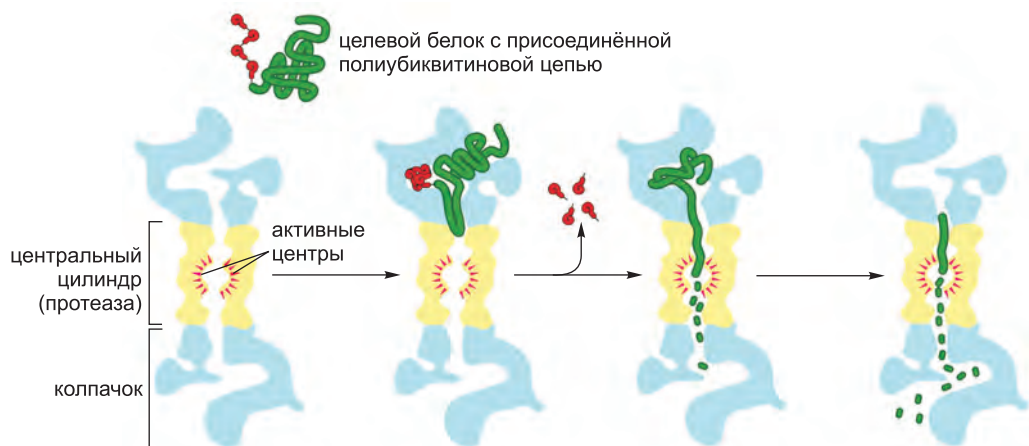


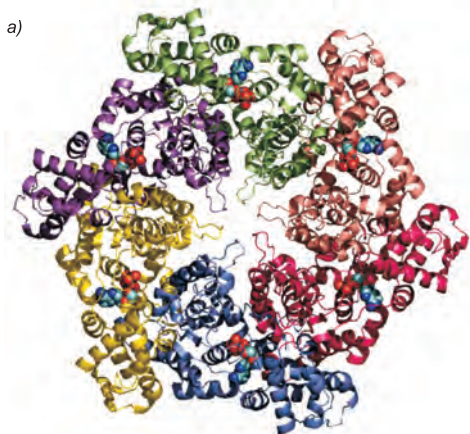
Рис. 6.90. Процессивное расщепление белка протеасомой. Колпачок протеасомы опознает белок-субстрат, в данном случае помеченный полиубиквитиновой цепью (см. рис. 6.92), и впоследствии перемещает его в ядро (кор) протеасомы, где он и расщепляется. На ранней стадии убиквитин отщепляется от белкового субстрата и рециклизуется. Транслокация в кор протеасомы опосредуется кольцом АТР-зависимых белков, которые разворачивают белковый субстрат по мере его «продергивания» через кольцо и далее — в ядро протеасомы (см. рис. 6.91). (Заимствовано из S. Prakash and A. Matouschek, *Trends Biochem. Sci.* 29: 593–600, 2004. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

возможно, что они имеют общие механистические особенности с АТР-зависимым раскручиванием ДНК ДНК-хеликазами (см. рис. 5.15).

Важнейшее свойство протеасомы (и одна из причин сложности ее строения) заключается в *процессивности* ее механизма: в отличие от «простой» протеазы, которая расщепляет полипептидную цепь субстрата только единожды перед тем как отсоединиться, протеасома удерживает весь субстрат связанным, пока весь он не будет разбит на короткие пептиды.

19S-колпачки действуют как регулируемые «створки» на входе во внутреннюю протеолитическую камеру и отвечают за связывание целевого белка-субстрата с протеасомой. За некоторыми исключениями, протеасомы воздействуют на белки, которые специфически помечены для разрушения: ковалентно присоединены «опознавательным ярлыком» (тэгом), образованного из маленького белка, называемого *убиквитином* (рис. 6.92, а). Убиквитин находится в клетках или в свободном виде, или ковалентно связан с каким-либо из множества разных внутриклеточных белков. Для многих белков мечение убиквитином заканчивается их разрушением в протеасоме. Однако в других случаях мечение убиквитином имеет совершенно иное значение. В конечном счете, именно число присоединенных убиквитиновых молекул и способ, которым они связаны друг с другом, и определяют, как клетка истолкует такое убиквитиновое послание (рис. 6.93). В последующих пунктах мы акцентируем внимание на роли убиквитинирования в деградации белков.

а)



б)

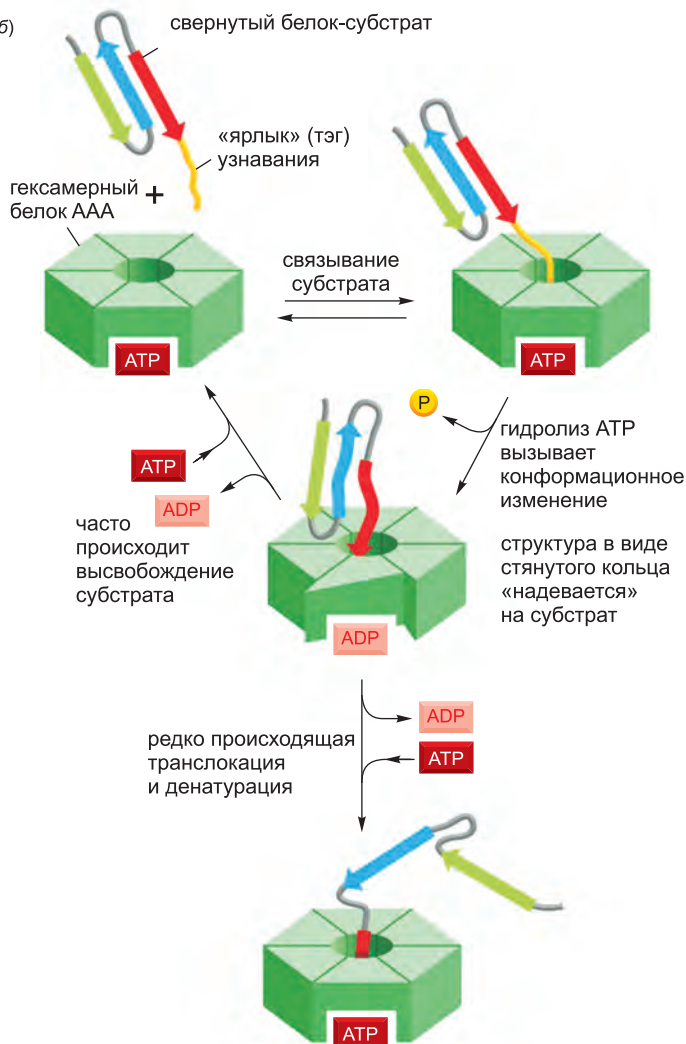


Рис. 6.91. Гексамерная белковая анфолдаза («развергаза»). а) Структура образована из шести субъединиц, каждая из которых принадлежит к семейству AAA-белков. б) Модель проявляемого AAA-белками действия АТР-зависимой анфолдазы. АТР-связанная форма гексамерного кольца AAA-белков связывает свернутый белок-субстрат, который «приговорен» к разворачиванию (и последующему разрушению), так как на нем опознавательная метка — такая как полиубиквитиновая цепь (см. ниже) или пептид, прикрепляемый для отметки не полностью синтезированных белков (см. рис. 6.81). Конформационное изменение, протекающее необратимо за счет гидролиза АТР, втягивает субстрат в центральное ядро (кор) и стягивает кольцевую структуру. В этот момент втягиваемый туда белок-субстрат может частично развернуться

и войти в глубь поры, а может сохранить свою структуру и отделиться. Для очень стабильных белковых субстратов могут потребоваться сотни циклов гидролиза АТР и диссоциации, прежде чем они будут успешно втянуты в ААА-кольцо. Будучи, наконец, развернут, белок-субстрат продвигается относительно быстро через пору за счет последовательных циклов гидролиза АТР. (Изображение а заимствовано из X. Zhang et al., *Mol. Cell* 6: 1473–1484, 2000, и А. N. Lupas and J. Martin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 746–753, 2002; схема б — из R. T. Sauer et al., *Cell* 119: 9–18, 2004. На все это было получено любезное разрешение издательства Elsevier.)

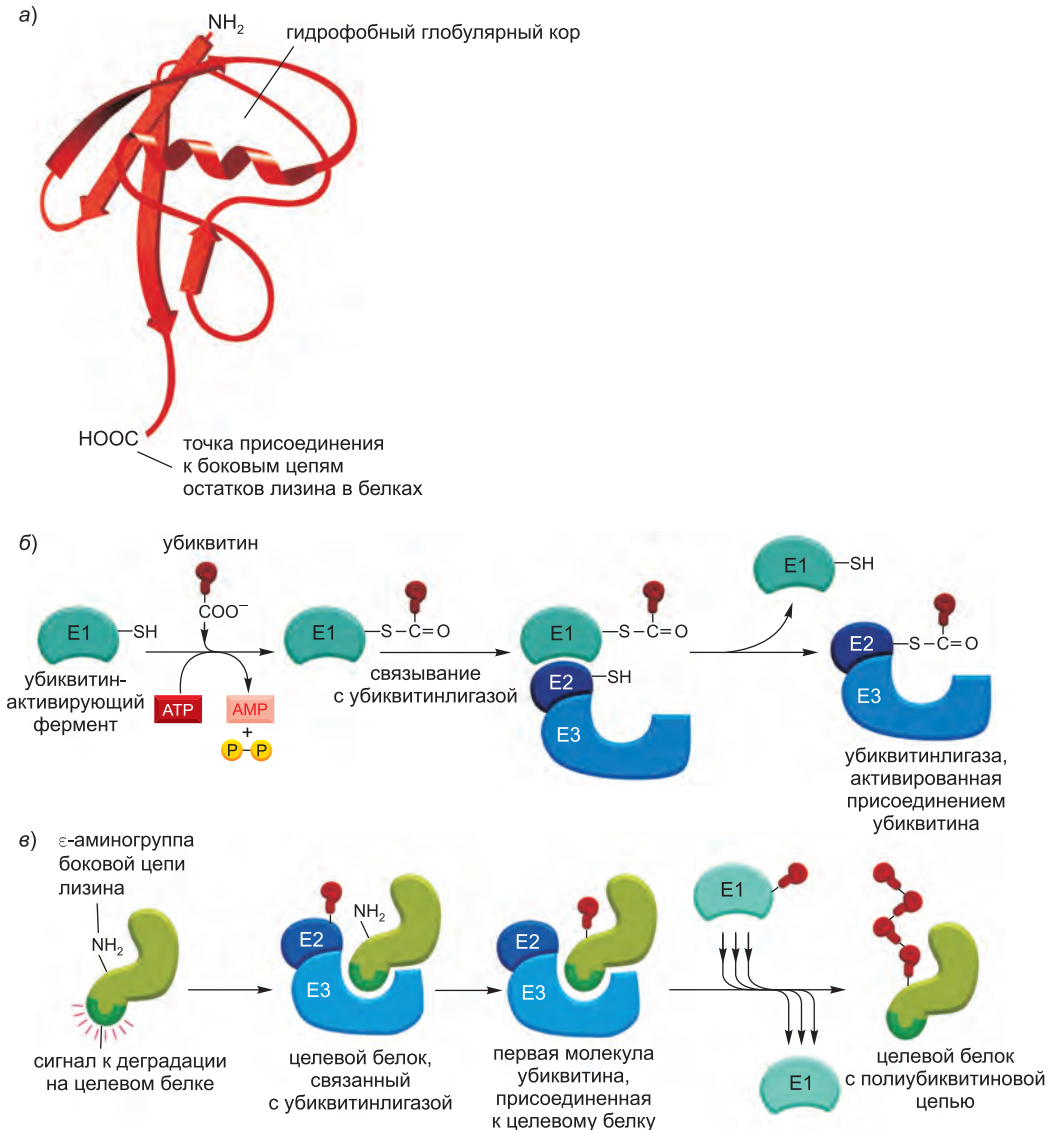


Рис. 6.92. Убиквитин и маркирование белков полиубиквитиновыми цепями. а) Трехмерная структура убиквитина; этот относительно малый белок содержит 76 аминокислот. б) С-конец убиквитина первоначально активируется присоединением к боковой цепи цистеина белка E1 посредством высокоэнергетической тиозфирной связи. Эта реакция требует ATP и протекает через ковалентный промежуточный продукт AMP–убиквитин. Затем активированный убиквитин, связанный с E1, также известным как убикуитин-активирующий фермент, переносится на цистеины ряда молекул E2. Эти молекулы E2 существуют в виде комплексов с еще более крупным семейством молекул E3. в) Присоединение полиубиквитиновой цепочки к целевому белку. В клетке млекопитающих находится несколько сотен различных комплексов E2–E3, многие из которых узнают специфический сигнал деградации на целевых белках посредством компонента E3. Молекулы E2 называют убикуитин-конъюгирующими ферментами. Ферменты E3 традиционно упоминались как убикуитинлигазы, но более корректно оставить это название за функционально активными комплексами E2–E3. Подробная структура такого комплекса представлена на рис. 3.79.

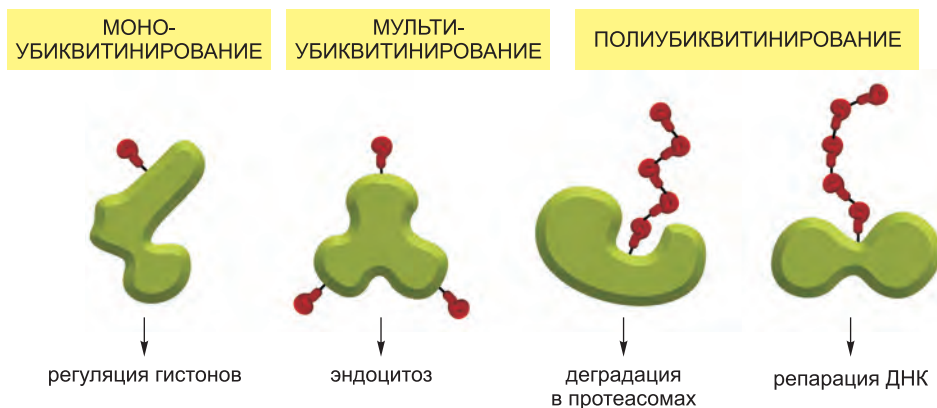


Рис. 6.93. Маркирование белков убиквитином. Каждая из представленных схем модификации может нести определенное значение для клетки. Оба типа полиубиквитинирования отличаются способом соединения молекул убиквитина между собой. Связь через Lys48 означает деградацию в протеасоме, тогда как при соединении через Lys63 имеет другие значения. Убиквитиновые метки «считываются» белками, которые специфично узнают модификацию каждого типа.

6.2.21. Сложноорганизованная убиквитин-конъюгирующая система помечает предназначенные для расщепления белки

Подготовку убиквитина для конъюгации с другими белками проводит АТФ-зависимый *убиквитин-активирующий фермент* (E1) — он создает активированный E1-связанный убиквитин, который впоследствии передается одному из набора *убиквитин-конъюгирующих* (E2) ферментов (рис. 6.92, б). Ферменты E2 действуют в одной связке с дополнительными белками (E3). В комплексе E2–E3, названном *убиквитинлигазой*, компонент E3 связывается со специфическими сигналами к деградации, названными дегронами, в белковых субстратах, помогая ферменту E2 сформировать *полиубиквитиновую* цепь, связанную с лизином белка-субстрата. В такой цепочке С-концевой остаток каждого убиквитина связан с определенным лизином предыдущей убиквитиновой молекулы (см. рис. 6.93), в результате чего получается линейный ряд убиквитин–убиквитиновых конъюгатов (рис. 6.92, в). Именно такая полиубиквитиновая цепь на целевом белке и опознается специфическим рецептором в протеасоме.

У млекопитающих существует примерно 30 структурно подобных, но разных ферментов E2 и сотни различных белков E3, которые образуют комплексы с определенными ферментами E2. Таким образом, система убиквитин–протеасома состоит из множества различных, но подобным образом организованных протеолитических путей, причем их общими составляющими являются как фермент E1 на «верхушке», так и протеасома в «основании»; а отличаются они составом входящих в них убиквитинлигаз E2–E3 и набором дополнительных факторов. Различные убиквитинлигазы опознают разные сигналы к деградации и поэтому нацелены на разрушение разных субпопуляций внутриклеточных белков.

Денатурированные или по какой-либо иной причине неправильно свернутые белки, равно как и белки, содержащие окисленные или иные аномальные аминокислоты, опознаются и разрушаются, потому что на поверхности aberrантных белков, как правило, экспонированы аминокислотные последовательности или

конформационные мотивы, которые распознаются «отрядом» молекул E3 в системе убиквитин—протеасома как сигналы к деградации; в нормальных аналогах этих белков такие последовательности должны, конечно, быть погружены вглубь и поэтому будут недоступны. Однако машины протеолиза, которые опознают и уничтожают аномальные белки, должны обладать способностью отличать *завершенные* белки, которые имеют «неправильные» конформации, от многочисленных растущих на рибосомах полипептидов (а также полипептидов, только что вышедших с рибосом), которые еще не успели принять надлежащую свернутую конформацию. Это не тривиальная задача; система убиквитин—протеасома, как думают, уничтожает многие из растущих и недавно образованных молекул белка не потому, что эти белки неправильны как таковые, а потому, что они в течение непродолжительного времени несут на себе сигналы к деградации, которые будут запрятаны внутрь в их зрелом (свернутом) состоянии.

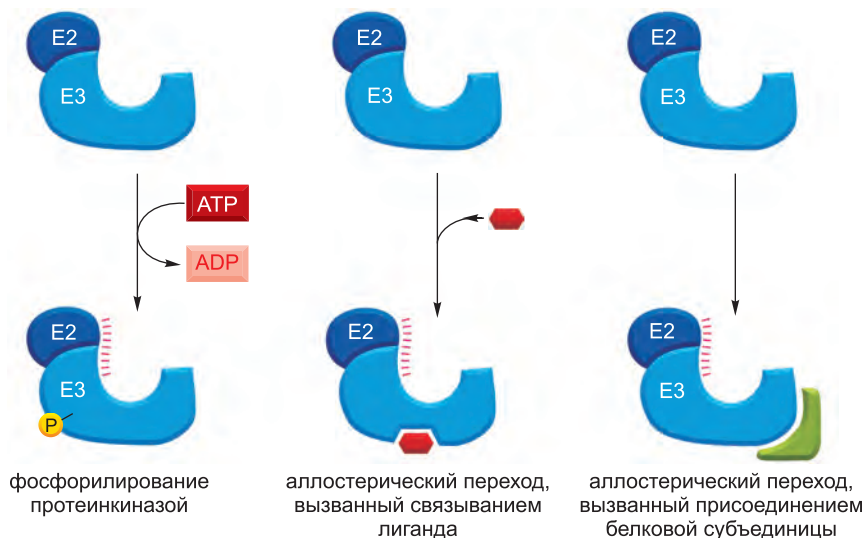
6.2.22. Многие белки находятся под контролем механизмов регулируемого разрушения

Как только что было описано, одна из функций внутриклеточных протеолитических механизмов состоит в опознавании и уничтожении неправильно свернутых или в каком-либо ином отношении аномальных белков. На протеолитические механизмы клетки возложена еще одна миссия — наделять короткими сроками жизни определенные нормальные белки, концентрации которых должны быстро изменяться в зависимости от изменений состояния клетки. Некоторые из таких короткоживущих белков всегда подвергаются быстрой деградации, тогда как многие другие *условно* долговечны, то есть при некоторых условиях они метаболически стабильны, но при изменении состояния клетки становятся нестабильными. Например, митотические циклины долговечны на всем протяжении клеточного цикла — до их внезапной деградации в конце митоза, что будет объяснено в главе 17.

Как же управляется такое регулируемое разрушение белков? Несколько механизмов проиллюстрированы с помощью характерных примеров, которые появятся в этой книге чуть позже. По одному из основных механизмов (рис. 6.94, а), активность убиквитинлигазы усиливается или фосфорилированием E3, или аллостерическим переходом в белке E3, вызываемым связыванием с ним определенной маленькой или большой молекулы. Например, стимулирующий переход к анафазе комплекс (APC; anaphase-promoting complex) представляет собой многосубъединичную убиквитинлигазу, которая активируется синхронизированным с клеточным циклом присоединением субъединиц во время митоза. После этого активированный APC вызывает деградацию митотических циклинов и некоторых других регуляторов перехода из метафазы в анафазу (см. рис. 17.44).

И наоборот, в ответ на внутриклеточные сигналы или на сигналы окружающей среды в некотором белке может сформироваться сигнал к деградации и обусловить его скоротечное убиквитинирование и разрушение протеасомой. Один общий способ создания такого сигнала — фосфорилирование определенного участка белка, в результате чего становится видимым обычно скрытый сигнал к деградации. Другой способ демаскировать такой сигнал — действовать путем регулируемой диссоциации белковых субъединиц. Наконец, мощные сигналы к деградации могут быть созданы путем расщепления одной пептидной связи, при условии, что такое расщепление создаст новый N-конец, который опознается специальным белком E3

а) АКТИВАЦИЯ УБИКВИТИНЛИГАЗЫ



б) АКТИВАЦИЯ СИГНАЛА К ДЕГРАДАЦИИ

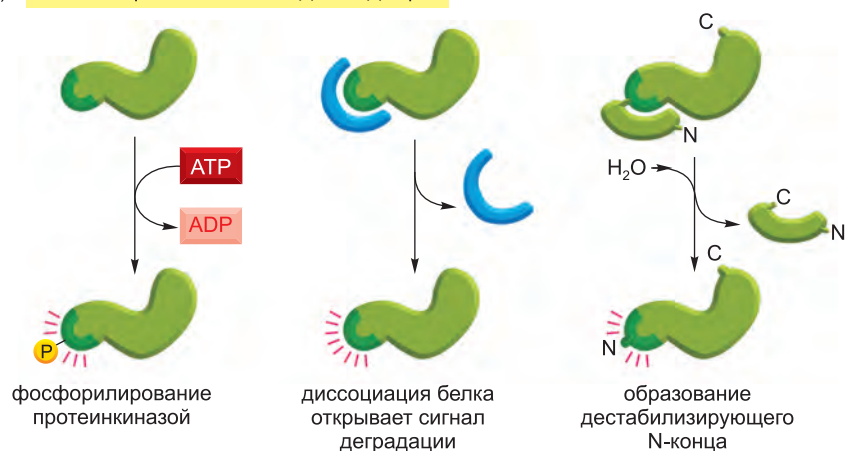


Рис. 6.94. Два основных способа индуцировать деградацию определенного белка. а) Активация специфической молекулы E3 создает новую убиквитинлигазу. б) Формирование экспонированного сигнала деградации в белке, который предназначен для деградации. С таким сигналом связывается убиквитинлигаза, что приводит к присоединению полиубиквитиновой цепочки к близлежащему лизину на целевом белке. Все шесть показанных путей, как известно, используются клетками, чтобы обеспечить попадание выбранных белков в протеасому.

как «дестабилизирующий» N-концевой остаток (рис. 6.94, б).

Сигнал к деградации N-концевого типа возникает в силу «правила N-конца», которое связывает время жизни белка *in vivo* с природой его N-концевого остатка. Согласно правилу N-конца, у дрожжей *S. cerevisiae* 12 дестабилизирующих остатков (Arg, Lys, His, Phe, Leu, Tyr, Trp, Ile, Asp, Glu, Asn и Gln) из 20 стандартных

аминокислот. Дестабилизирующие N-концевые остатки опознаются специальной убиквитинлигазой, которая остается консервативной в ряду от дрожжей до человека.

Как мы видели, все белки изначально синтезируются с метионином (или формилметионином у бактерий) в качестве N-концевого остатка, который, по правилу N-конца, является стабилизирующим остатком. Специальные протеазы, названные метионинаминопептидазами, часто удаляют первый метионин новоявленного белка, но они делают это только в том случае, если второй остаток тоже является стабилизирующим — согласно правилу N-конца. Поэтому первоначально было неясно, как подчиняющиеся правилу N-конца субстраты образуются *in vivo*. Однако теперь известно, что такие субстраты образуются сайт-специфическими протеазами. Например, субъединица когезина — белкового комплекса, что удерживает сестринские хроматиды вместе, — расщепляется высокоспецифичной протеазой во время перехода из метафазы в анафазу. Такое регулируемое клеточным циклом расщепление позволяет сестринским хроматидам разойтись и ведет к завершению митоза (см. рис. 17.44). С-концевой фрагмент расщепленной субъединицы несет N-концевой аргинин — дестабилизирующий остаток по правилу N-конца. Мутантные клетки, у которых не срабатывает путь по правилу N-конца, показывают значительное повышение частоты потери хромосом — предположительно, по причине невозможности деградировать этот фрагмент субъединицы когезина, что препятствует образованию новых связанных с хроматидами когезиновых комплексов в следующем клеточном цикле.

6.2.23. Неправильно свернутые белки могут агрегировать и вызывать у человека деструктивные процессы

Многие наследственные болезни человека — например, серповидноклеточная анемия (см. [стр. 1495](#)) и дефицит альфа-1-антитрипсина (состояние, которое часто ведет к заболеваниям печени и эмфиземе), — вызваны мутантными белками, которые избегают проводимых клеткой проверок качества, неправильно сворачиваются и образуют агрегаты. Абсорбируя важнейшие макромолекулы, такие агрегаты могут серьезно повредить клетке и даже вызвать ее смерть. Часто наследование одного мутантного аллеля гена может вызвать болезнь, так как нормальная копия этого гена не в силах защитить клетку от разрушительного действия белковых агрегатов.

У здоровых индивидов постепенный упадок имеющихся у клетки систем проверки качества белков также может вызвать заболевание, причиной которого будет образование агрегатов нормальными белками ([рис. 6.95](#)). В некоторых случаях белковые агрегаты выходят из мертвых клеток и накапливаются во внеклеточном матриксе, который окружает все клетки ткани, и в крайних случаях они могут даже повредить ткань. Поскольку мозг состоит из высокоорганизованной системы нервных клеток, он особенно уязвим. Поэтому не удивительно, что белковые агрегаты вызывают прежде всего нейродегенеративные заболевания. Наиболее яркими примерами этого служат хорea Гентингтона и болезнь Альцгеймера — последняя является причиной старческого слабоумия у более чем 20 миллионов человек в сегодняшнем мире.

Для того чтобы белковый агрегат того или иного типа мог жить, расти и повреждать организм, он должен быть очень устойчив к протеолизу как внутри клетки, так и вне ее. Многие из белковых скоплений, что создают неприятности, образуют

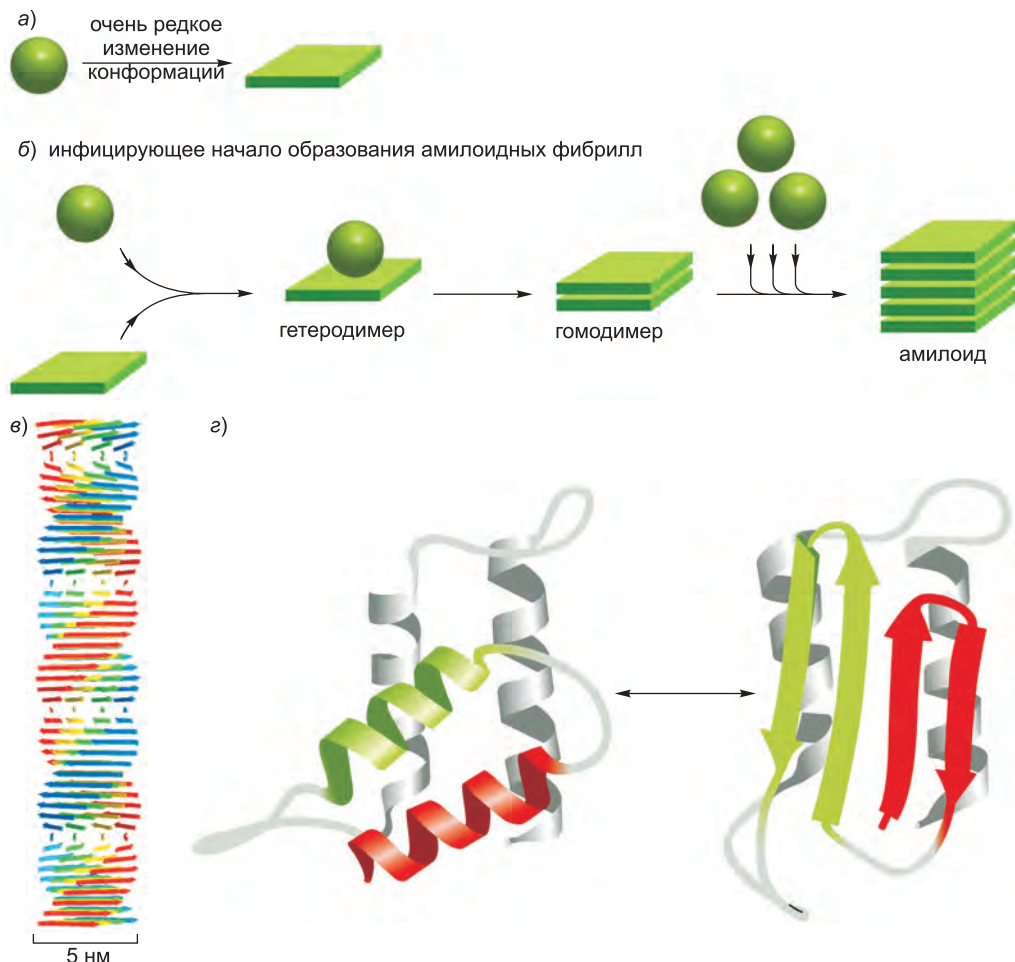


Рис. 6.95. Белковые агрегаты, которые вызывают заболевания человека. а) Схематическое изображение типа конформационного изменения в белке, которое создает материал для формирования «кросс-бета» структуры. б) Схема, иллюстрирующая самоинфицирующий характер «кросс-бета» структуры (cross-beta filament) при агрегации белков, что лежит в основе болезней, вызываемых прионами. PrP (прионный белок) весьма необычен, потому что неправильно свернутый вариант этого белка, названный PrP*, побуждает нормальный белок PrP, с которым он контактирует, изменить свою конформацию, как показано на схеме. Большинство заболеваний человека, вызываемых белковыми агрегатами, обусловлено суперпродукцией видоизмененного белка, который особенно склонен к агрегации, но белковый агрегат не может распространяться от одного животного к другому. в) Рисунок «кросс-бета» структуры — типичного устойчивого к действию протеаз белкового агрегата, встречающегося при многих неврологических заболеваниях человека. Поскольку в β -листе между атомами основной цепи полипептида образуются взаимодействия типа водородных связей (см. рис. 3.9), ряд различных неправильно свернутых белков может дать такую структуру. з) Одна из нескольких возможных моделей преобразования PrP в PrP*, показывающая вероятное изменение двух α -спиралей в четыре β -цепи. Хотя структура нормального белка была определена точно, структура инфекционной формы еще достоверно не известна, потому что агрегаты не позволяют применять стандартные методы определения структуры. (Изображение в было любезно предложено Louise Serpell и переработано на основе M. Sunde et al., *J. Mol. Biol.* 273: 729–739, 1997. С великодушного разрешения издательства Academic Press; схема з переработана из S. V. Prusiner, *Trends Biochem. Sci.* 21: 482–487, 1996. С благосклонного позволения издательства Elsevier.)

фибриллы, построенные из ряда полипептидных цепей, которые уложены слоями друг на друга в виде плитки из стопки β -листов. Эта так называемая «*кросс-бета*» структура (*cross-beta filament*) (рис. 6.95, в) — структура, особенно устойчивая к протеолизу, — встречается при многих неврологических расстройствах, вызываемых белковыми скоплениями, где она образует отчетливо различимые бляшки, известные как *амилоиды*.

Одна из специфических разновидностей таких патологий заслужила особенно дурную славу. Это болезни, вызываемые прионами — **прионные заболевания (prion diseases)**. В отличие от хореи Гентингтона или болезни Альцгеймера, прионные болезни могут распространяться от одного организма к другому, если этот второй организм ест ткань, содержащую белковый агрегат. Группа заболеваний, называемых у овец овечьей трясучкой, у человека — болезнью Крейтцфельда—Якоба (CJD; Creutzfeld—Jacob disease) и у крупного рогатого скота — коровьей губчатой энцефалопатией (BSE; bovine spongiform encephalopathy), вызывается неправильно свернутой, агрегированной формой белка под названием PrP (прионный белок). PrP обычно расположен на внешней поверхности плазматической мембраны — наиболее заметно в нейронах. Его нормальная функция не известна. Однако PrP имеет досадную склонность преобразовываться в крайне специфическую аномальную конформацию (см. рис. 6.95, а). Эта конформация не только формирует стойкие к протеазе «кросс-бета» структуры; она также и «инфекционна», потому что превращает нормально свернутые молекулы PrP в такую же патологическую форму. Данное свойство обуславливает формирование петли с положительной обратной связью, в которой распространяется аномальная форма PrP, названная PrP* (см. рис. 6.95, б), и, таким образом, позволяет патологической конформации быстро распространяться в мозге от клетки к клетке, в конечном счете вызывая смерть и животных, и людей. Может представлять опасность употребление в пищу тканей животных, которые содержат PrP*, о чем свидетельствуют зарегистрированные в Великобритании случаи распространения BSE (обычно упоминаемой как «болезнь коровьего бешенства») от крупного рогатого скота на людей. К счастью, в отсутствие PrP* необычайно трудно перевести PrP в аномальную форму.

Хотя очень немногие белки имеют потенциал аномально сворачиваться в «инфекционную» конформацию, но приведем пример мистического «исключительно белкового наследования», наблюдаемого в клетках дрожжей. Возможность изучать инфекционные белки в дрожжах прояснила другую примечательную особенность прионов. Эти белковые молекулы могут образовывать несколько отличающихся друг от друга типов агрегатов из одной и той же полипептидной цепи. Более того, агрегат каждого типа может быть инфекционным, вынуждая нормальные молекулы белка принимать аномальную структуру того же самого типа. Так, несколько разных «штаммов» инфекционных частиц может появиться из одной и той же полипептидной цепи (рис. 6.96). Каким образом одна полипептидная последовательность может принимать множественные формы агрегатов, до конца не ясно; вполне возможно, что все прионные агрегаты напоминают «кросс-бета» структуры (см. рис. 6.95, в), которые скреплены воедино преимущественно взаимодействиями основной пептидной цепи. При этом боковые цепи аминокислот могут свободно принимать различные конформации, и, если такие структуры самораспространяются, можно объяснить существование различных штаммов.

Наконец, хотя прионы открыты при изучении причин болезней, которые ими вызваны, они, кажется, играют также и некоторую положительную роль в клет-

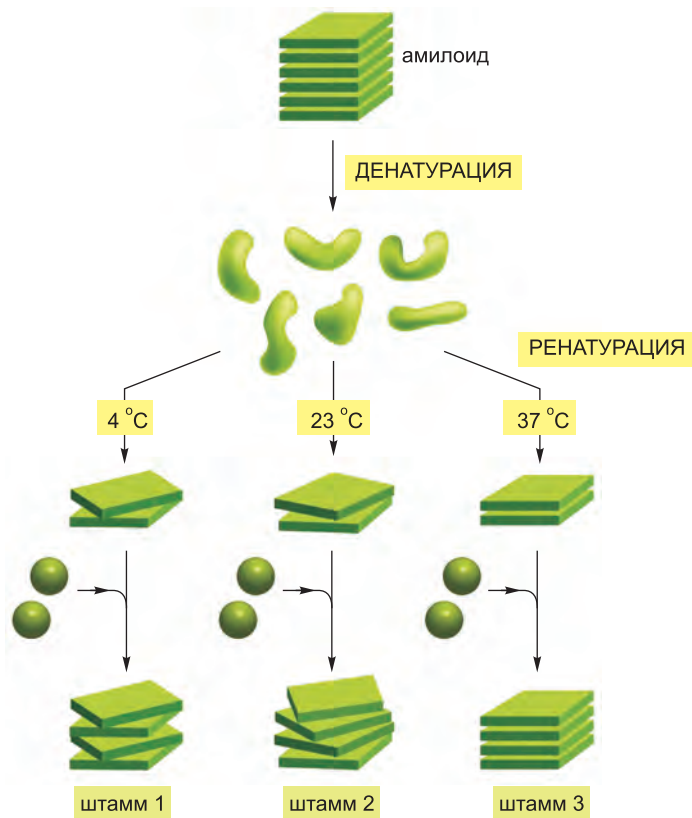


Рис. 6.96. Создание различных прионных штаммов *in vitro*. В данном эксперименте амилоидные фибриллы денатурировали и их компоненты ренатурировали при различных температурах. В результате такой обработки образовались амилоиды трех различных типов, каждый из которых способен самораспространяться при добавлении новых субъединиц.

ке. Например, некоторые виды грибов используют трансформации прионов для формирования различных типов клеток. Высказано также предположение, хотя и спорное, что прионы играют определенную роль в закреплении воспоминаний у сложных многоклеточных организмов наподобие нас с вами.

6.2.24. Путь от ДНК к белку включает много этапов

Итак, из этой главы мы узнали, что множество различных типов химических реакций должно совершиться в клетке, чтобы на основании содержащейся в гене информации получить должным образом свернутый белок (рис. 6.97). Так что окончательный уровень правильно свернутого белка в клетке зависит от эффективности выполнения каждого из многочисленных этапов. В следующей главе мы увидим, что клетки обладают способностью изменять уровни белков согласно своим потребностям. В принципе, любой (или все) из представленных на рис. 6.97 этапов могут регулироваться для каждого отдельного белка. Как мы увидим в главе 7, известны примеры регулирования на всех этапах — от гена до белка. Однако инициация транскрипции служит для клетки наиболее привычной точкой для регуляции экс-

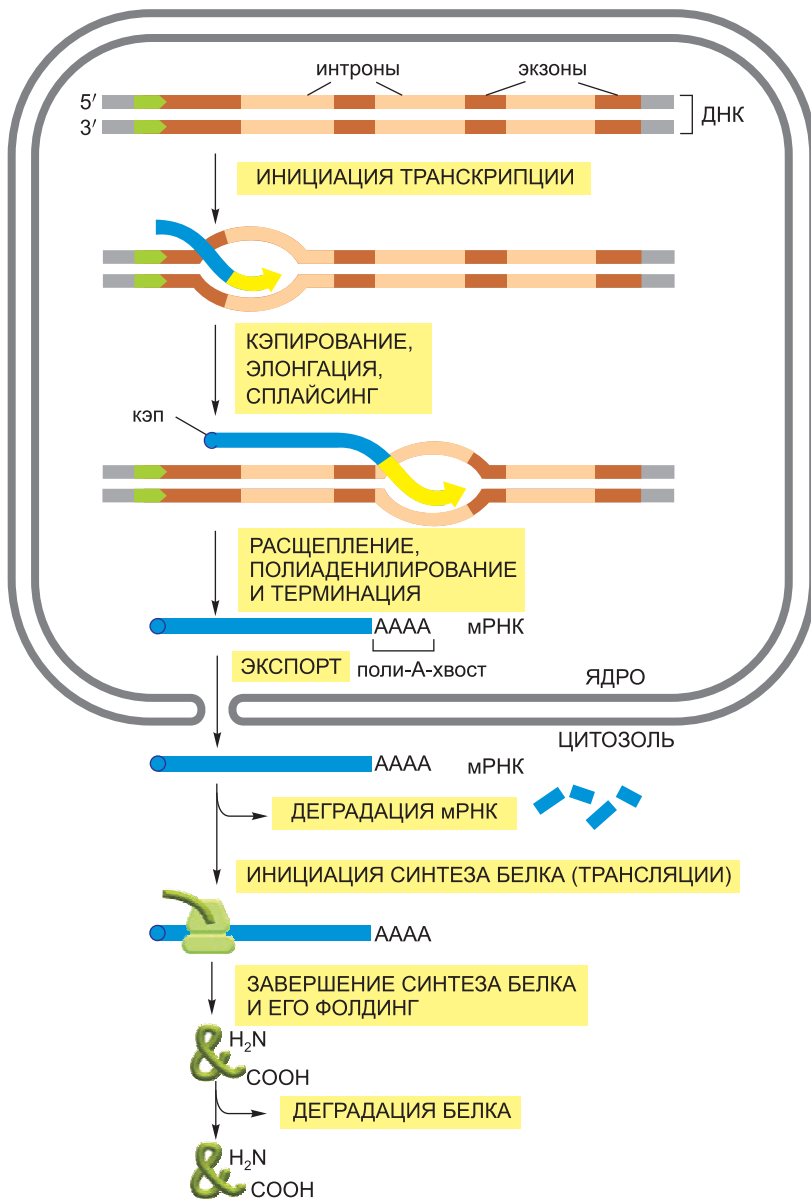


Рис. 6.97. Производство белка клеткой эукариот. Окончательный уровень каждого белка в клетке эукариот зависит от эффективности всех изображенных на схеме этапов.

прессии всех ее генов. Это вполне разумно, поскольку самый эффективный способ препятствовать экспрессии гена состоит в том, чтобы блокировать самый первый шаг — транскрипцию его последовательности ДНК в молекулу РНК.

Заключение

Трансляция нуклеотидной последовательности молекулы мРНК в белок происходит в цитоплазме на крупном рибонуклеопротеидном комплексе, называемом рибосомой. Аминокислоты, используемые для синтеза белка, сначала прикрепляются к семейству молекул тРНК, каждая из которых опознает через комплементарные взаимодействия между парами оснований специфические наборы из троек нуклеотидов, или триплеты, в мРНК (кодона). Затем последовательность нуклеотидов мРНК считывается с одного конца до другого триплетами — согласно правилам генетического кода.

Чтобы запустить трансляцию, малая субчастица рибосомы связывается с молекулой мРНК на стартовом кодоне (AUG), который распознается уникальной молекулой инициаторной тРНК. Большая субчастица рибосомы присоединяется к этому комплексу, тем самым завершая сборку рибосомы, которая и начинает синтез белка. Во время этой стадии, молекулы аминоацил-тРНК — каждая из которых несет определенную аминокислоту — связываются последовательно с соответствующими кодонами на мРНК, образуя комплементарные пары оснований между антикодоном на тРНК и кодоном на мРНК. Каждая аминокислота добавляется к С-концу растущего полипептида за четыре последовательных шага: связывание аминоацил-тРНК, следующее за ним образование пептидной связи, которое, в свою очередь, сопровождается двумя ступенями транслокации рибосомы. Используя гидролиз GTP, факторы элонгации продвигают эти реакции и повышают точность выбора аминокислот. Молекула мРНК, кодон за кодоном, продвигается через рибосому в направлении 5' → 3', пока не достигнет одного из трех стоп-кодонов. Тогда с рибосомой связывается фактор терминации, который останавливает трансляцию и высвобождает законченный полипептид.

Рибосомы эукариот и бактерий состоят в близких эволюционных отношениях, несмотря на различия в числе и размерах своих рРНК и белковых компонентов. Ведущая роль в процессе трансляции принадлежит рРНК, которая определяет общую структуру рибосомы, формирует участки связывания для молекул тРНК, сопоставляет молекулы тРНК с кодонами мРНК и образует активный участок фермента пептидилтрансферазы, что ковалентно соединяет аминокислоты друг с другом во время трансляции.

На заключительных этапах синтеза белка молекулярные шапероны двух разных типов направляют сворачивание (фолдинг) полипептидных цепей по верному пути. Эти шапероны, известные как Hsp60 и Hsp70, узнают на белках экспонированные гидрофобные области и предотвращают агрегацию белков, что иначе конкурировало бы с укладкой недавно синтезированных белков в правильные трехмерные структуры. Процесс фолдинга белка должен конкурировать также и со сложным механизмом «проверки качества», который уничтожает белки с аномально экспонированными гидрофобными областями. В таком случае убиквитинлигаза ковалентно присоединяет к неправильно свернутому белку убиквитин, и полученная полиубиквитиновая цепочка опознается «колпачком» протеасомы, которая перемещает весь белок в «чрево» протеасомы для его протеолитической деградации. Близко связанный с этим протеолитический механизм, основанный на специальных сигналах к деградации, опознаваемых убиквитинлигазами, используется для «назначения» сроков жизни многим нор-

мально свернутым белкам. Этим же методом некоторые нормальные белки устраняются клеткой в ответ на определенные сигналы.

6.3. Мир РНК и происхождение жизни

Итак, мы с вами увидели, что выражение наследственной информации требует необычайно сложных машин и проходит свой путь от ДНК к белку через перевалочный пункт — РНК. Такой механизм представляет главный парадокс: если нуклеиновые кислоты необходимы для синтеза белка, а белки нужны, в свою очередь, для синтеза нуклеиновых кислот, то как такая система взаимозависимых компонентов могла вообще возникнуть? Согласно одной гипотезе, на Земле до появления современных клеток существовал *мир РНК* (рис. 6.98). В те далекие времена РНК и хранила генетическую информацию, и катализировала химические реакции в примитивных клетках. Лишь на более поздних этапах эволюции ДНК стала генетическим материалом, а белки стали главными катализаторами и структурными компонентами клеток. Если данное представление верно, то переход из мира РНК не был завершен; как мы видели в этой главе, РНК все еще катализирует несколько фундаментальных реакций в современных клетках, что можно считать молекулярным атавизмом, напоминающим нам о мире, предшествовавшем нашему.

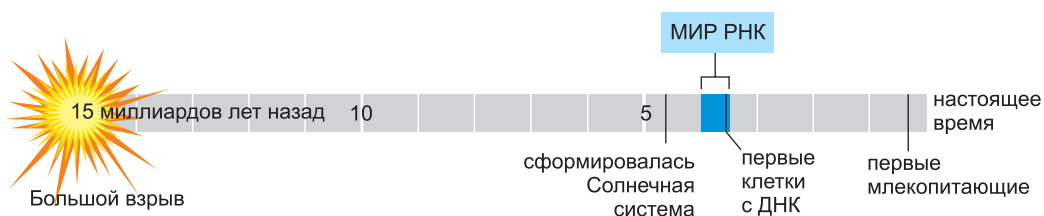


Рис. 6.98. Временная шкала существования Вселенной, предполагающая первоначальное развитие живых систем в мире РНК.

В этом параграфе мы знакомим читателя с некоторыми доводами в пользу гипотезы о «мире РНК». Мы увидим, что существование в современных клетках нескольких из наиболее удивительных «созданий», таких как рибосома и машина пре-мРНК сплайсинга, наиболее легко объяснить, если считать их потомками сложной сети опосредствуемых РНК взаимодействий, которые преобладали в метаболизме клетки из «мира РНК». Мы также обсудим вопрос о том, как ДНК могла занять место РНК в качестве генетического материала, как генетический код мог возникнуть и как белки могли заменить РНК в роли катализаторов и взять на себя основную долю биохимического катализа, приходящуюся на них в клетках современного нам мира.

6.3.1. Для жизни необходимо сохранение информации

Согласно предположениям некоторых ученых, первые «биологические» молекулы на Земле были образованы в ходе катализа на основе металлов, происходившего на кристаллических поверхностях минералов. В принципе, сложная система молекулярного синтеза и разложения (метаболизм) могла существовать на таких поверхностях задолго до появления первых клеток. Хотя это и спорно,

многие ученые полагают, что на добиологической Земле имела место интенсивная стадия «химической эволюции», во время которой малые молекулы, которые могли катализировать свой собственный синтез, конкурировали друг с другом за сырье.

Однако для существования жизни требуется гораздо больше этого. Как сказано в главе 1, возможно, главным свойством жизни является *наследственность*. Клетка должна не просто использовать сырье, чтобы создавать сеть катализируемых реакций, она должна делать это согласно сложному набору инструкций, закодированных в наследственной информации. Репликация этой информации гарантирует, что сложный метаболизм клеток может точно воспроизводиться. Другая отличительная особенность жизни — генетическая изменчивость, которая проистекает из изменений в наследственной информации. Эта изменчивость, на которую воздействует давление естественного отбора, лежит в основе невероятного многообразия форм жизни на нашей планете.

Таким образом, для появления жизни необходим какой-либо способ хранения информации, какой-нибудь способ ее дублирования, некоторый способ ее изменения и, наконец, хотя бы какой-то способ преобразования этой информации — посредством катализа — в благоприятные химические реакции. Но с чего такая система могла начать формироваться? В современных клетках наиболее многофункциональные катализаторы представлены полипептидами, состоящим из множества различных аминокислот с химически разнообразными боковыми цепями и, следовательно, **полипептиды** способными принимать разнообразные трехмерные структуры, покрытые химически активными боковыми группами аминокислот. Полипептиды также несут информацию, заложенную в порядке следования их аминокислотных субъединиц. Но не известно ни одного способа, которым полипептид может воспроизвести себя, непосредственно определяя образование другого с точно такой же последовательностью.

6.3.2. Полинуклеотиды могут выполнять две функции: хранить информацию и катализировать химические реакции

Полинуклеотиды обладают одним свойством, которое резко отличает их от полипептидов: они могут непосредственно направлять формирование копий своей собственной последовательности. Эта способность обусловлена комплементарным спариванием оснований нуклеотидных субъединиц, что позволяет одному полинуклеотиду служить матрицей для образования другого. Как мы узнали из этой и предыдущей глав книги, такие механизмы матричной комплементарности лежат в основе репликации и транскрипции ДНК в современных клетках.

Но для эффективного синтеза полинуклеотидов таким механизмам матричной комплементарности требуются катализаторы, которые должны активировать реакцию полимеризации: без катализаторов образование полимера протекает медленно, подвержено ошибкам и неэффективно. Сегодня направляемая матрицей полимеризация нуклеотидов активно катализируется ферментами белковой природы, такими как ДНК- и РНК-полимеразы. Как такая полимеризация могла катализироваться прежде — до существования белков с необходимой ферментативной специфичностью? Ответ на этот вопрос забрезжил с открытием в 1982 году того факта, что молекулы РНК сами могут выступать в роли катализаторов. Мы уже видели в этой главе, например, что молекула РНК катализирует одну из важнейших реакций в клетке — ковалентное соединение аминокислот при формировании белка. Уникаль-

ный потенциал молекул РНК служить и носителем информации, и катализатором подводит неизбежное основание под гипотезу о существовании мира РНК.

Таким образом, РНК обладает всеми свойствами, необходимыми молекуле, которая могла бы катализировать многообразие химических реакций, в том числе и те, что ведут к своему же собственному синтезу (рис. 6.99). Хотя самореплицирующиеся системы молекул РНК не обнаружены в природе, ученые уверены, что они могут быть сконструированы в лаборатории. Хотя демонстрация данного факта не стала бы прямым доказательством того, что самореплицирующиеся молекулы РНК играли определяющую роль в происхождении жизни на Земле, она, несомненно, показала бы, что такой сценарий вполне возможен.

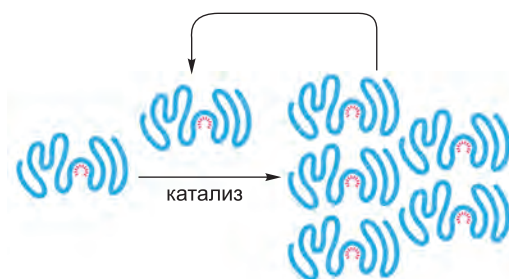


Рис. 6.99. Молекула РНК, способная катализировать свой собственный синтез. Этот гипотетический процесс требовал бы и катализа производства второй нити РНК с комплементарной последовательностью нуклеотидов, и использования этой второй молекулы РНК как матрицы для образования многочисленных молекул РНК с исходной последовательностью. Красными «кокошниками» показаны активные участки таких гипотетических РНК-ферментов.

6.3.3. Миру РНК, возможно, предшествовал мир пред-РНК

Хотя РНК и кажется весьма подходящей для формирования базового набора самореплицирующихся биохимических катализаторов, ясности, что именно РНК была первым видом молекул, которые сыграли эту роль, пока нет. Чисто с химической точки зрения трудно вообразить, сколь долго молекулы РНК могли образовываться в самом начале, когда в их распоряжении были лишь неферментативные пути достижения этой цели. Начнем с того, что предшественники РНК, рибонуклеотиды, трудно образовать неферментативным путем. Более того, для образования РНК необходимо, чтобы длинный ряд фосфодиэфирных связей 3'–5' был собран вопреки набору конкурирующих реакций, в том числе: гидролиз, образование связей 2'–5' и связей 5'–5'. Исходя из этих проблем, было высказано предположение о том, что первыми молекулами, которые обладали и каталитической активностью, и способностью хранить информацию, возможно, были полимеры, которые напоминают РНК, но устроены химически проще (рис. 6.100). Мы не встречаем никаких следов этих соединений в современных клетках, не оставили такие соединения и записей в палеонтологической летописи жизни. И тем не менее относительная простота этих «РНК-подобных полимеров» предполагает, что один из них, а не сама РНК, мог быть первым биополимером на Земле, способным и хранить информацию, и оказывать каталитическое действие.

Если гипотеза о мире пред-РНК верна, то должен был произойти переход к миру РНК, и, возможно, это произошло в ходе синтеза РНК с использованием

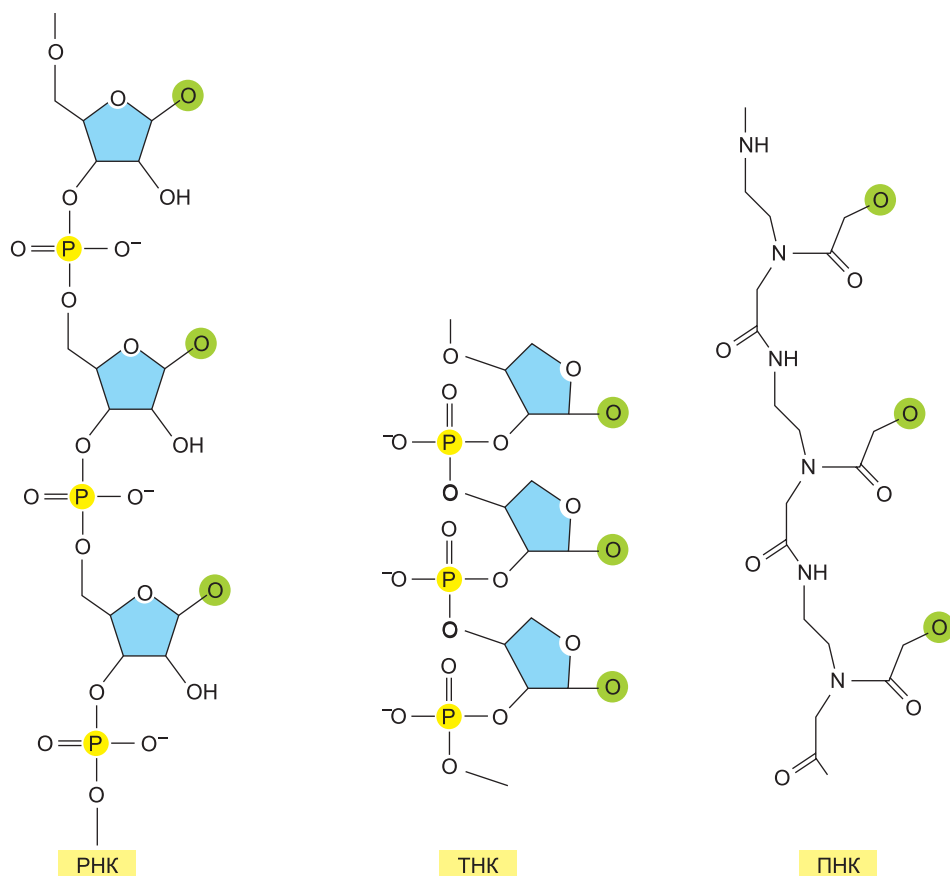


Рис. 6.100. Структуры РНК и двух схожих с ней полимеров — носителей информации. Во всех случаях буква О на зеленом фоне обозначает пуриновое или пиримидиновое основание. Полимер ТНК (треозонуклеиновая кислота; threose nucleic acid, TNA) содержит 4-углеродное углеводное звено в отличие от рибозы с 5-ю атомами углерода в РНК. В ПНК (пептидной нуклеиновой кислоте; peptide nucleic acid, PNA) рибозофосфатная основная цепь РНК заменена пептидной основной цепью, встречающейся в белках. Подобно РНК, ТНК и ПНК могут образовывать двойные спирали путем комплементарного спаривания оснований и поэтому каждый из этих полимеров мог бы, в принципе, послужить матрицей для своего собственного синтеза.

одного из таких более простых полимеров одновременно в качестве матрицы и катализатора. И хотя детали миров пред-РНК и РНК, вероятно, так и останутся неизвестными, мы знаем наверняка, что молекулы РНК могут катализировать широкий спектр химических реакций, и сейчас мы как раз обратимся к свойствам РНК, благодаря которым это возможно.

6.3.4. Одноцепочечные молекулы РНК способны сворачиваться в очень сложные структуры

Как мы могли убедиться, комплементарное спаривание оснований и водородные связи прочих типов могут возникать между нуклеотидами в одной и той

же цепи, заставляя молекулу РНК складываться уникальным образом, определяемым ее нуклеотидной последовательностью (см., например, рис. 6.6, 6.52 и 6.69). Сравнение множества структур РНК позволило обнаружить консервативные мотивы — короткие элементы структуры, которые используются много раз как составные части более крупных структур. На **рис. 6.101** показаны некоторые из таких мотивов вторичной структуры РНК, а на **рис. 6.102** приведено несколько часто встречающихся примеров более сложных взаимодействий и иногда более дальнего порядка, известных как третичные взаимодействия РНК.

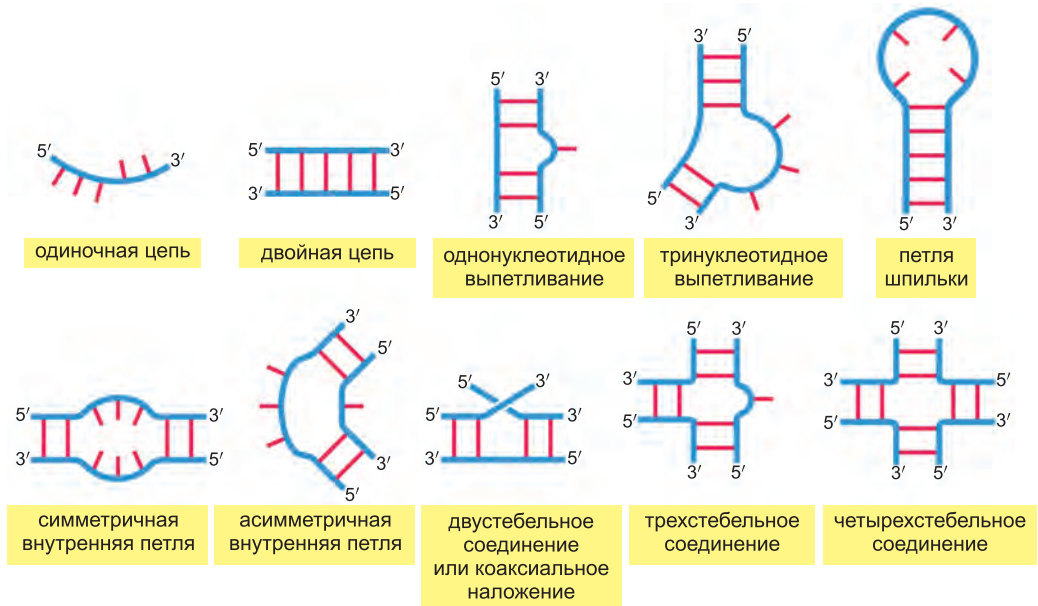


Рис. 6.101. Стандартные элементы вторичной структуры РНК. Обычные взаимодействия типа комплементарного спаривания оснований обозначены красными «перекладинами» в двуниевых частях РНК.

Белковым катализаторам нужна поверхность с уникальными контурами и химическими свойствами, на которой данный набор субстратов может вступать в реакцию (помнится, мы уже обсуждали это в главе 3). Точно так же молекула РНК, надлежащим образом свернутая в должную форму, может служить ферментом (**рис. 6.103**). Подобно некоторым белкам, многие из таких рибозимов работают за счет ионов металлов, заключенных в активных участках. Эта особенность открывает перед ними более широкий горизонт каталитических возможностей на фоне ограниченного репертуара химических групп полинуклеотидной цепи.

Однако в современных клетках, как известно, относительно немного каталитических РНК, и большая часть наших умозаключений о мире РНК опирается на данные лабораторных экспериментов, в которых создаются большие пулы молекул РНК со случайными последовательностями нуклеотидов. После этого из их числа отбирают и изучают те редкие молекулы РНК, что обладают свойством, заданным экспериментатором (**рис. 6.104**). В ходе таких экспериментов созданы молекулы

¹ Имеется в виду ион Mg^{2+} . — Прим. перев.

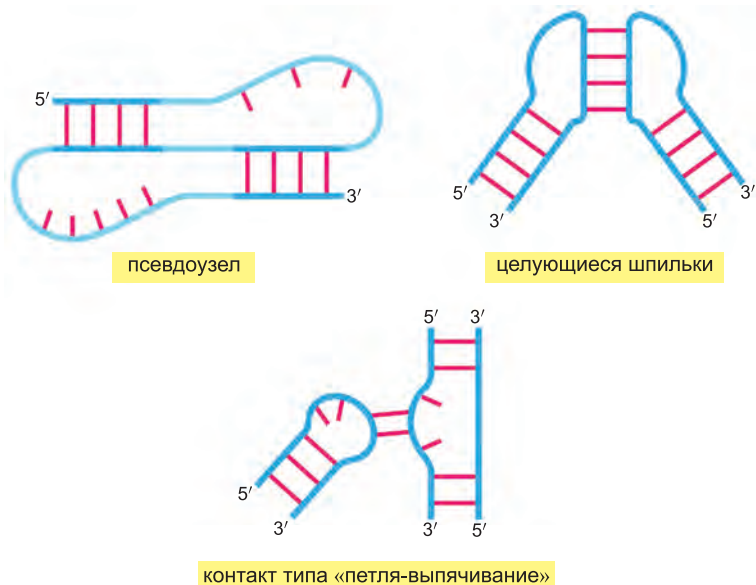


Рис. 6.102. Примеры третичных взаимодействий в РНК. Некоторые из таких взаимодействий могут состыковать отдаленные части одной и той же молекулы РНК или соединить две отдельные молекулы РНК друг с другом.

РНК, которые могут катализировать широкий диапазон биохимических реакций (табл. 6.5) со скоростями реакции, приближающимися к таковым у белков. На фоне таких результатов не ясно, почему белковые катализаторы значительно превосходят числом рибозимы в современных клетках. Эксперименты показали, что молекулы РНК могут испытывать больше трудностей, чем белки, при связывании гибких гидрофобных субстратов; более того, наличие 20 типов аминокислот против четырех типов оснований может наделять белки большим числом каталитических стратегий.

Подобно белкам, молекулы РНК могут претерпевать конформационные изменения — или в ответ на маленькие молекулы, или на другие РНК. Мы видели несколько примеров этого на рибосоме и сплайсосоме и мы увидим другие в главе 7, когда представим на суд читателя *рибонпереключатели* (*riboswitches*). Одно из наиболее значительных конформационных изменений РНК наблюдалось с искусственным рибозимом, который может существовать в двух совершенно разных конформациях, каждая из которых обладает своим каталитическим действием (рис. 6.105). После открытия катализа РНК стало ясно, что РНК является необычайно многофункциональной молекулой, и поэтому вполне разумно говорить о существовании в прошлом мира РНК с очень высоким уровнем биохимических процессов.

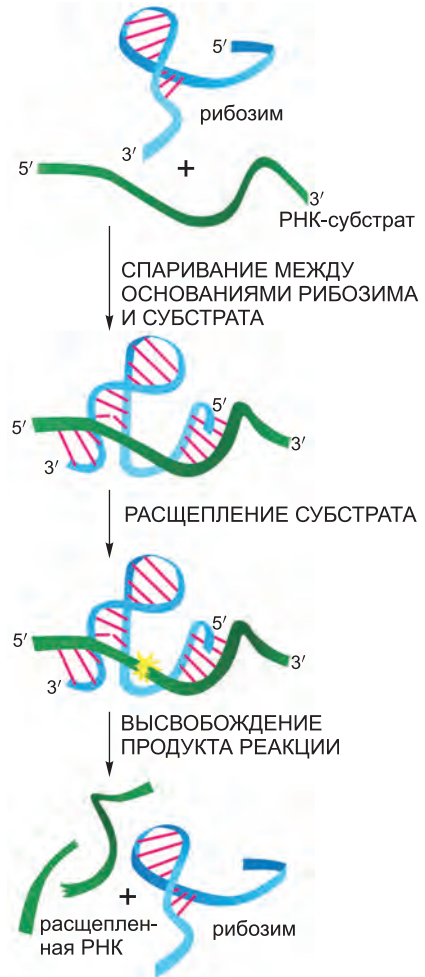
Рис. 6.103. Рибозим. Эта простая молекула РНК катализирует расщепление второй РНК в определенном участке. Такой рибозим встречается встроенным в более крупные РНК-геномы, — называемые виридами, — которые заражают растения. Расщепление, которое происходит в природе в отдаленном месте той же самой молекулы РНК, что содержит рибозим, является одним из этапов репликации виридного генома. Хотя это и не показано на рисунке, для протекания такой реакции необходима молекула¹ Mg в активном участке. (Переработано из T. R. Cech and O. C. Uhlenbeck, *Nature* 372: 39–40, 1994. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

6.3.5. Самореплицирующиеся молекулы подвергаются естественному отбору

Трехмерная свернутая структура полинуклеотида влияет на его устойчивость, на оказываемые им воздействия на другие молекулы и на его способность реплицироваться. Поэтому в любой самореплицирующейся смеси полинуклеотидов некоторые из них окажутся особенно результативными. Поскольку в любом процессе копирования неизбежно происходят ошибки, время от времени будут возникать новые разновидности последовательностей этих полинуклеотидов.

Некоторые каталитические эффекты могли играть чрезвычайно важную роль в ранней эволюции жизни. Рассмотрим, в частности, молекулу РНК, которая помогает катализировать процесс матричной полимеризации, используя любую молекулу РНК в качестве матрицы (**рис. 6.106**). Такая молекула, действуя на копии самой себя, может самореплицироваться. В то же время, она может способствовать репликации молекул РНК других типов, «из своего ближайшего окружения» (**рис. 6.107**). Если некоторые из таких находящихся по соседству РНК обладают каталитическими действиями, которые помогают выживанию РНК каким-либо иным образом (катализируя производство рибонуклеотидов, например), то набор из молекул РНК различных типов, каждая из которых специализирована на выполнении определенной задачи, мог доэволюционировать до кооперативной системы, которая реплицируется с необычайно высокой эффективностью.

Но для того чтобы какая-либо из таких кооперативных систем могла эволюционировать, молекулы РНК должны совместно присутствовать в какой-либо полости (компарменте). Например, набор взаимно выгодных РНК (таких как представленные на рис. 6.107) мог бы сам себя реплицировать, только если все эти РНК оставались бы по соседству с РНК, которая специализирована для матричной полимеризации. Более того, компарментализация стала бы барьером для вторжения



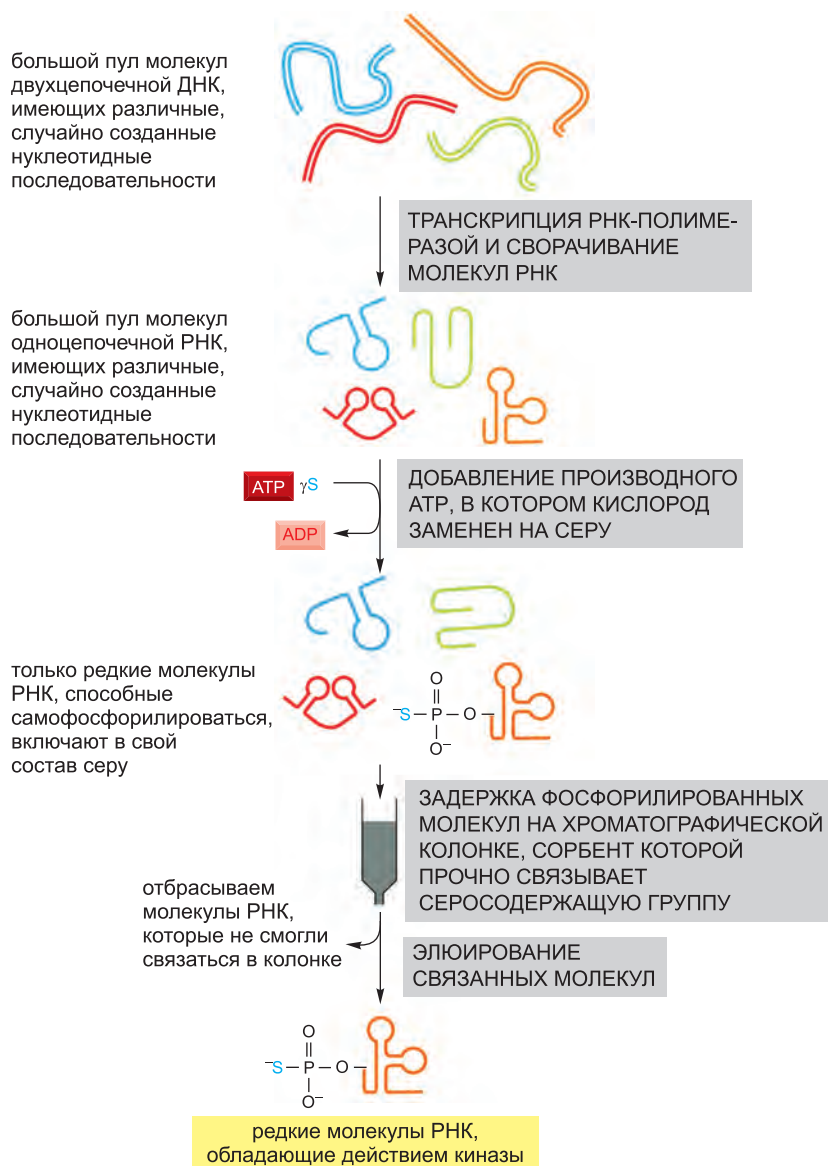


Рис. 6.104. Отбор синтетического рибозима *in vitro*. Начав с большого резерва молекул нуклеиновых кислот, синтезированных в лаборатории, можно выделить и исследовать те редкие молекулы РНК, которые обладают заданной каталитической активностью. Хотя здесь представлен характерный пример (автофосфорилирующего рибозима), разновидности этой процедуры использовались для получения многих рибозимов, перечисленных в таблице 6.5. Во время реакции автофосфорилирования РНК находится в достаточно разбавленной концентрации — с целью предотвратить «перекрестное» фосфорилирование между молекулами РНК. В действительности, необходимо несколько повторов этой процедуры для отбора очень редких молекул РНК с заданным каталитическим действием. Так, материал, вначале элюированный из колонки, конвертируют обратно в ДНК, многократно амплифицируют (используя обратную транскриптазу и ПЦР, как объяснено в главе 8), транскрибируют опять в РНК и подвергают повторным раундам селекции. (Переработано из J. R. Lorsch and J. W. Szostak, *Nature* 371: 31–36, 1994. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

Таблица 6.5. Некоторые биохимические реакции, которые, возможно, катализируют рибозимы

РЕАКЦИЯ	РИБОЗИМЫ
образование пептидной связи при синтезе белка	рибосомная РНК
расщепление РНК, лигирование РНК	самосплайсирующиеся РНК, РНазы Р, а также отобранная селекцией <i>in vitro</i> РНК
расщепление ДНК	самосплайсирующиеся РНК
сплайсинг РНК	самосплайсирующиеся РНК; возможно, РНК сплайсосом
полимеризация РНК	отобранная <i>in vitro</i> РНК
фосфорилирование РНК и ДНК	отобранная <i>in vitro</i> РНК
аминоацилирование РНК	отобранная <i>in vitro</i> РНК
алкилирование РНК	отобранная <i>in vitro</i> РНК
образование амидной связи	отобранная <i>in vitro</i> РНК
образование гликозидной связи	отобранная <i>in vitro</i> РНК
окислительно-восстановительные реакции	отобранная <i>in vitro</i> РНК
образование углерод-углеродной связи	отобранная <i>in vitro</i> РНК
образование фосфоамидной связи	отобранная <i>in vitro</i> РНК
обмен дисульфидными связями	отобранная <i>in vitro</i> РНК

в систему молекул РНК-паразита. Так что отбор набора молекул РНК согласно способности самореплицирующихся систем производить ту или иную продукцию не мог быть эффективным до тех пор, пока эволюцией не была рождена некоторая полость, заключившая их в свое лоно.

Ранняя, грубая форма компартиментализации могла представлять собой просто адсорбцию на поверхностях или частицах. Потребность в более замысловатых типах компартамента с легкостью удовлетворялась классом маленьких молекул, которые обладают нехитрым физико-химическим свойством *амфифильности*, то есть состоят из гидрофобной (водонерастворимой) части и гидрофильной (водорастворимой) части. Когда такие молекулы помещают в воду, они объединяются в агрегаты, как можно плотнее примыкая друг к другу своими гидрофобными частями, а гидрофильные выставляя в воду. Амфифильные молекулы соответствующей формы самопроизвольно объединяются в *двойные слои, или бислои*, создавая маленькие замкнутые пузырьки, водное содержимое которых отделено от внешней среды (**рис. 6.108**). Это явление можно продемонстрировать в пробирке, просто смешивая фосфолипиды и воду друг с другом — при соответствующих условиях образуются маленькие пузырьки. Все современные клетки окружены *плазматической мембраной*, состоящей из амфифильных молекул — преимущественно фосфолипидов — в такой конфигурации; в главе 10 мы рассмотрим эти молекулы во всех подробностях.

Самопроизвольная сборка набора амфифильных молекул, заключающая в себе самореплицирующуюся смесь РНК (или пред-РНК) и других молекул (**рис. 6.109**), возможно, сформировала первые охваченные мембраной клетки. Хотя еще не ясно, в какой момент эволюции биологических катализаторов это могло произойти, чтобы молекулы РНК, запечатанные в замкнутую мембрану, начали эволюционировать всерьез как носители генетических инструкций: новые варианты могли отбираться

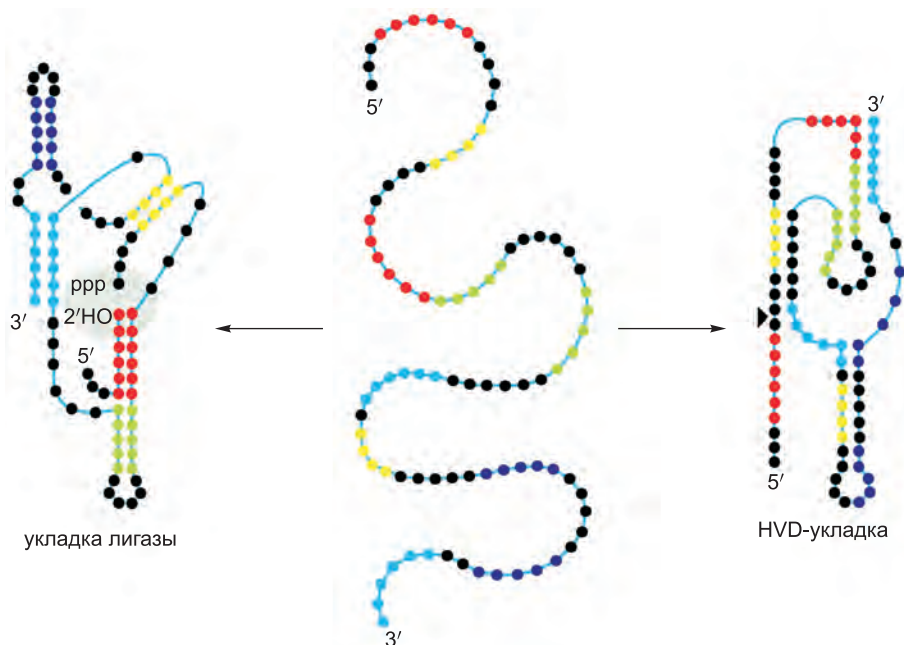


Рис. 6.105. Молекула РНК, которая сворачивается в два разных рибозима. Эта 88-нуклеотидная РНК, созданная в лаборатории, может свернуться в рибозим, который выполняет реакцию самолигирования (слева), или в рибозим, который осуществляет реакцию саморасщепления (справа). В ходе реакции лигирования образуется фосфодиэфирная связь 2'–5' и высвобождается пирофосфат. Эта реакция «сшивает» разрыв (серый фон), который был экспериментально введен в молекулу РНК. В реакции, выполняемой вирусом гепатита D (HVD), РНК расщепляется в этой же позиции, указанной стрелкой. Это расщепление напоминает то, что было использовано в цикле жизни HVD (сателлит вируса гепатита В) — отсюда и название укладки. Каждый нуклеотид представлен цветной точкой, причем цвета просто помогают отличать эти два разных образца укладки. Свернутые структуры иллюстрируют вторичные структуры этих двух рибозимов, где области спаривания оснований обозначены близко стоящими в паре цветными точками. Обратите внимание, что укладки этих двух рибозимов не имеют общих элементов вторичной структуры. (Переработано из Е. А. Schultes and D. P. Bartel, *Science* 289: 448–452, 2000. С любезного разрешения издательства AAAS.)

не только на основе их собственной структуры, но также и по их воздействию на другие молекулы в той же полости. Вот тогда нуклеотидные последовательности молекул РНК и могли начать экспрессироваться сообразно положению целостной живой клетки.

6.3.6. Как именно эволюционировал механизм синтеза белка?

Молекулярные процессы, лежащие в основе синтеза белка в современных клетках, кажутся нам непостижимо сложными. Хотя мы и понимаем большинство из них, они не дают нам концептуального осознания того пути, которым происходят транскрипция ДНК, репарация ДНК и репликация ДНК. Особенно трудно представить, как синтез белка появился в ходе эволюции, потому что сейчас, как мы видим, он осуществляется сложной взаимосвязанной системой молекул РНК и белков; очевидно, что белки не могли существовать до того, как ранняя версия

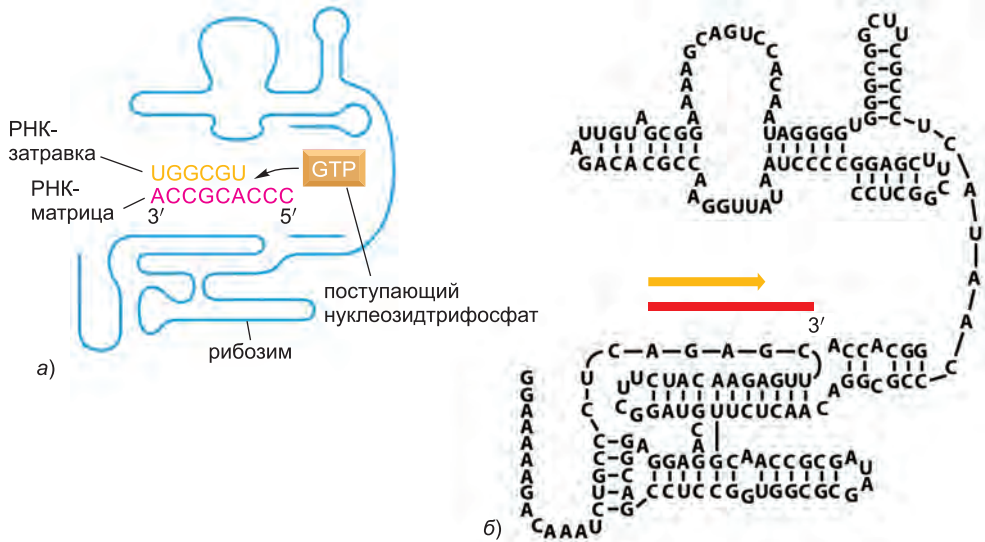


Рис. 6.106. Созданный в лаборатории рибозим, который может катализировать матричный синтез РНК из нуклеозидтрифосфатов. а) Схема рибозима и одного шага катализируемой им реакции матричной полимеризации. б) Нуклеотидная последовательность рибозима с обозначенными на ней парами оснований. Хотя этот рибозим не отличается особой эффективностью (он может синтезировать лишь короткие отрезки РНК), он добавляет правильное, предписанное матрицей основание более чем в 95 % случаев. (Займствовано из W. K. Johnston et al., *Science* 292: 1319–1325, 2001. С любезного разрешения издательства AAAS.)

трансляционного аппарата не вышла в свет. Гипотеза о мире РНК особенно привлекательна потому, что использование РНК и для хранения информации, и для катализа кажется и экономически выгодным, и несложным по замыслу. Будучи притягательной для умов, рисующих в своем воображении красочные картины о первых днях жизни на Земле, эта теория не объясняет, как возникла современная система синтеза белка. Хотя мы можем лишь размышлять о происхождении современного механизма синтеза белка

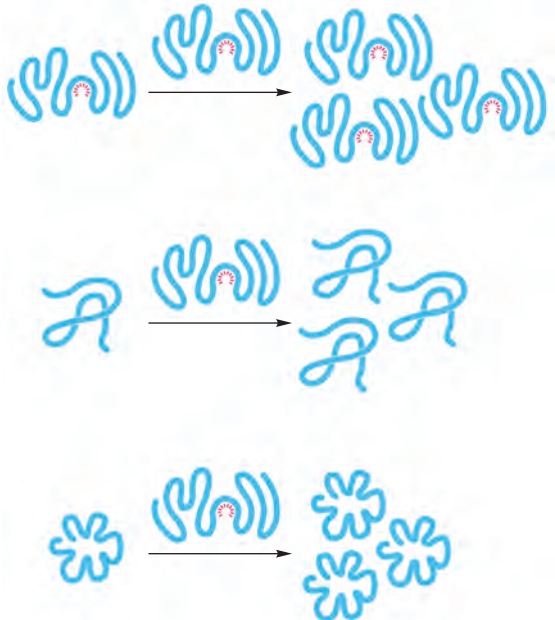


Рис. 6.107. Семейство взаимно поддерживающих свое существование молекул РНК. Одна молекула — рибозим, который реплицирует и сам себя, и другие молекулы РНК. Остальные молекулы катализируют второстепенные реакции, необходимые для выживания такой кооперативной системы, — например, синтез рибонуклеотидов для синтеза РНК или фосфолипидов для разделения пространства на полости.

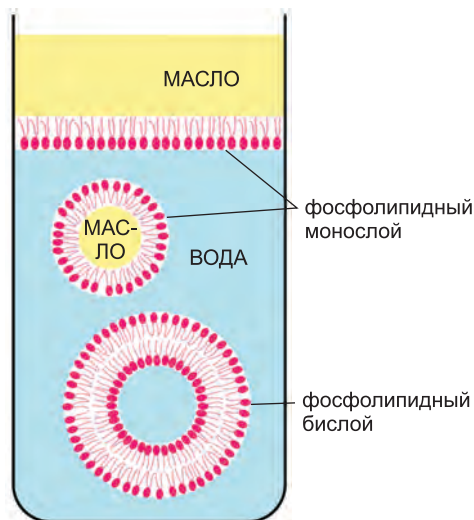


Рис. 6.108. Формирование мембраны фосфолипидами. Поскольку эти молекулы имеют гидрофильные головки и липофильные хвосты, постольку на границе раздела масла и воды они выстраиваются головками к воде, а хвостами к маслу. В воде они объединяются с образованием замкнутых двуслойных пузырьков, в которых липофильные хвосты находятся в контакте друг с другом, а гидрофильные головки выставлены в воду.

и генетического кода, несколько экспериментальных наблюдений подсказывают нам правдоподобные сценарии.

В современных клетках некоторые короткие пептиды (типа антибиотиков) синтезируются без рибосомы; ферменты пептидсинтетазы собирают такие пептиды из аминокислот, располагая их в надлежащей

последовательности, не прибегая к помощи молекул мРНК в управлении синтезом. Вполне возможно, что такая бескодовая, примитивная версия синтеза белка сначала развилась во время мира РНК, где она катализировалась молекулами РНК. Эта идея не представляет никаких концептуальных трудностей, потому что, как мы видели, в современных клетках образование пептидных связей катализируется рРНК. Мы знаем также и то, что рибозимы, созданные в лаборатории, могут выполнять специфические реакции аминокислотирования; то есть они способны подобрать конкретной аминокислоте соответствующую ей тРНК. Поэтому вполне

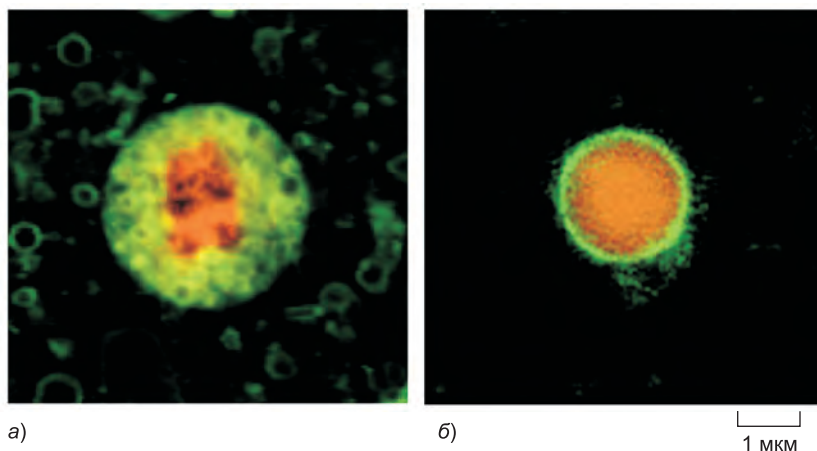


Рис. 6.109. Инкапсуляция РНК простыми амфифильными молекулами. В этих экспериментах глинистый минерал монтмориллонит был использован для того, чтобы свести вместе РНК и жирные кислоты. а) Монтмориллонитовая частица, покрытая РНК (красная), оказалась заключенной в везикулу из жирных кислот (зеленая). б) РНК (красная) в растворе была окружена жирными кислотами (зеленые). Эти эксперименты показывают, что монтмориллонит может сильно ускорять самопроизвольное образование везикул из амфифильных молекул и вовлекать внутрь их РНК. Выдвинута гипотеза, что, в принципе, подобные действия могли привести к появлению первых примитивных клеток на Земле. (Заимствовано из М. М. Hanczyc et al., *Science* 302: 618–622, 2003. С любезного разрешения издательства AAAS.)

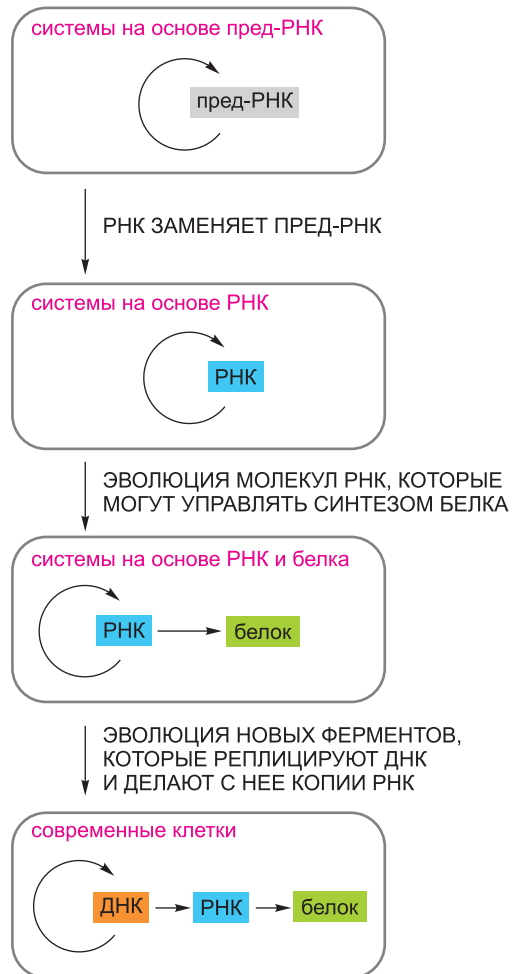
возможно, что тРНК-подобные адапторные молекулы, каждая из которых соответствует определенной аминокислоте, могли возникнуть в мире РНК, положив начало генетическому коду.

В принципе, другие молекулы РНК (предшественники молекул мРНК) могли служить грубыми матрицами для направления неслучайной полимеризации нескольких разных аминокислот. Любая РНК, которая помогала проводить синтез полезного полипептида, имела бы большое преимущество в эволюционной борьбе за выживание. Мы можем представить себе относительно неспецифичный рибозим пептидилтрансферазу, который в течение какого-то времени стал крупнее и приобрел способность размещать заряженные аминокислотами молекулы тРНК точно на матрицах РНК — и в конечном счете воплотился в современную рибосому. Как только в ходе эволюции появился синтез белка, стал возможным переход к миру, в котором правят белки, и в конечном счете они взяли на себя большинство каталитических и структурных задач — в силу большей многофункциональности, обусловленной наличием 20-ти, а не 4-х различных субъединиц в своем составе. Хотя только что обрисованные сценарии, являются лишь умозрительными, известные свойства молекул РНК вполне вписываются в эти гипотетические картины.

6.3.7. Все ныне живущие клетки в качестве своего наследственного материала используют ДНК

Если умозрительные рассуждения об эволюции, воплощенные в гипотезе о мире РНК, верны, то первые клетки должны были существенно отличаться от клеток, которые мы знаем сегодня, тем, что они хранили свою наследственную информацию в РНК, а не в ДНК (рис. 6.110). Свидетельства того, что в ходе эволюции сначала возникла РНК и только потом ДНК, можно обнаружить в химических различиях между ними. Рибоза, подобно глюкозе и другим простым углеводам, может быть образована из формальдегида (НСНО) — простого

Рис. 6.110. Гипотеза, согласно которой РНК предшествовала ДНК и белкам в ходе эволюции. В самых ранних клетках молекулы пред-РНК, должно быть, имели совместные генетические, структурные и каталитические функции, и РНК постепенно перенимала у них эти функции. В современных клетках ДНК служит хранилищем генетической информации и белки выполняют подавляющее большинство каталитических функций в клетках. Сегодня РНК выступает, прежде всего, в роли посредника в синтезе белка, хотя и оставила за собой катализ небольшого числа определяюще важных реакций.



химиката, который легко получается в лабораторных экспериментах, призванных воспроизвести условия на молодой Земле. Сахар дезоксирибоза получить сложнее, и в современных клетках он образуется из рибозы в ходе реакции, катализируемой белковым ферментом; а это предполагает, что рибоза предшествует дезоксирибозе в истории клетки. Предположительно, ДНК появилась на сцене позже и сразу же оказалась более подходящей, чем РНК, в роли постоянного хранилища генетической информации. В частности, дезоксирибоза в сахарнофосфатном остове придает молекуле ДНК большую химическую устойчивость по сравнению с цепью РНК — так что намного более длинные отрезки ДНК могли сохраняться неповрежденными.

Другие различия между РНК и ДНК: двухцепочечная структура ДНК и использование тимина вместо урацила — еще более упрочили позиции ДНК, ибо благодаря им многие неизбежные поломки, которые происходят в молекуле, устраняются намного легче, о чем мы уже вели подробную беседу в главе 5 (см. **стр. 296–297 и 300–301**).

Заключение

На основе наших знаний о современных организмах и о молекулах, их образующих, кажется весьма правдоподобным, что развитие полностью автокаталитических механизмов, фундаментальных для живых систем, началось с эволюции семейств молекул, которые могли катализировать свою собственную репликацию. Со временем семейство «сотрудничающих» РНК-катализаторов, вероятно, развило способность направлять синтез полипептидов. ДНК, по всей вероятности, была поздним дополнением: по мере того как накопление дополнительных белковых катализаторов позволяло клеткам развиваться в более эффективные и сложные системы, двойная спираль ДНК заменяла РНК, будучи более устойчивой молекулой для хранения возраставших количеств генетической информации, необходимой таким клеткам.

Задачи

Какие утверждения являются верными? Обоснуйте свой ответ

6.1. Последствия ошибок в транскрипции ДНК менее значимы, чем последствия ошибок в ее репликации.

6.2. Так как интроны в основном представляют собой генетическое «барахло», нет необходимости в ходе сращивания РНК удалять их из первичного транскрипта с особой точностью.

6.3. Нестрогое спаривание оснований происходит между первой позицией кодона и третьей позицией антикодона.

6.4. Белковые ферменты, как думают, значительно превосходят численностью рибозимы в современных клетках, потому что они катализируют намного больше разнообразных реакций, чем рибозимы, и делают это с намного более высокими скоростями.

Обсудите следующие проблемы

6.5. В каком направлении должна РНК-полимераза на **рис. Q6.1** двигаться по матрице, чтобы произвести изображенные на нем сверхспиральные структуры? Следовало ли ожидать появления сверхспиралей, если бы РНК-полимераза по мере своего продвижения по матрице могла свободно вращаться вокруг оси ДНК?

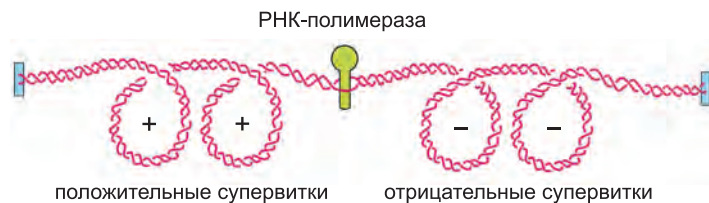


Рис. Q6.1. Сверхспирали вокруг движущейся РНК-полимеразы (к задаче 6.5).

6.6. Во время транскрипции к СТД (С-концевому домену) РНК-полимеразы II присоединяются фосфаты. В чем заключается роль, во всех ее аспектах, СТД-фосфорилирования РНК-полимеразы II?

6.7. Ген α -тропомииозина человека подвергается альтернативному сплайсингу, чтобы производить несколько форм мРНК α -тропомииозина в клетках разных типов (рис. Q6.2). У всех форм мРНК кодирующая белок последовательность одинакова в экзонах 1 и 10. Экзоны 2 и 3 — альтернативные экзоны, используемые в разных молекулах мРНК, равно как и экзоны 7 и 8. Какое из следующих утверждений об экзонах 2 и 3 является наиболее точным? Является ли это утверждение самым точным также и для экзонов 7 и 8? Обоснуйте свои ответы.

А. Экзоны 2 и 3 должны иметь одинаковое число нуклеотидов.

Б. Экзоны 2 и 3 должны оба содержать целое число кодонов (то есть число нуклеотидов, поделенное на 3, должно быть целым).

В. Экзоны 2 и 3 должны оба содержать число нуклеотидов, которое, будучи разделено на 3, оставляет один и тот же остаток (то есть 0, 1 или 2).

6.8. После обработки клеток химическим мутагеном вы выделили два мутанта. Один несет аланин, а другой несет метионин на участке белка, который обычно содержит валин (рис. Q6.3). После второй обработки этих двух мутантов мутагеном вы выделяете мутанты, каждый из которых теперь несет треонин в позиции, предназначенной для валина (рис. Q6.3). При допущении о том, что все мутации ограничены заменой одного нуклеотида, установите кодоны, которые используются для кодирования валина, метионина, треонина и аланина на затрагиваемом этими

а) ГЕН α -ТРОПОМИОЗИНА ЧЕЛОВЕКА



б) ЧЕТЫРЕ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТА СПЛАЙСИНГА

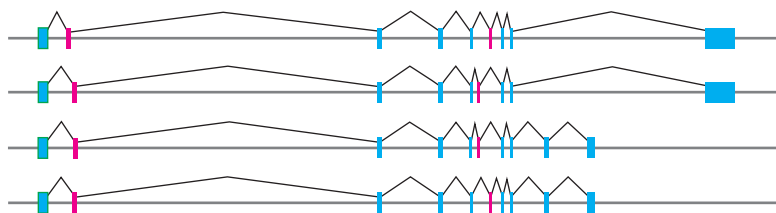


Рис. Q6.2. Альтернативно сплайсированные молекулы мРНК гена α -тропомииозина человека (к задаче 6.7).

а) Экзоны в гене α -тропомииозина человека. Местоположение и относительные размеры экзонов показаны синими и красными прямоугольниками. б) Схемы сплайсинга для четырех молекул мРНК α -тропомииозина. Сплайсинг обозначен линиями, соединяющими экзоны, которые включены в мРНК.

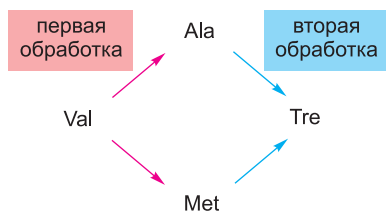


Рис. Q6.3. Два раунда мутагенеза, проходящего с заменой аминокислоты в единственной позиции белка (к задаче 6.8).

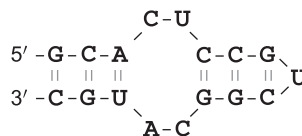


Рис. Q6.4. Шпилька РНК с симметричной внутренней петлей (к задаче 6.13).

мутациями участке. Удалось бы вам выделить мутанты с переходом валин → треонин за один шаг?

6.9. Фактор элонгации EF-Tu вводит две короткие паузы между спариванием оснований кодон—антикодон и образованием пептидной связи. Эти паузы повышают точность синтеза белка. Опишите эти паузы и объясните, каким образом они повышают точность трансляции.

6.10. И Hsp60-подобные молекулярные шапероны, и их аналоги Hsp70 проявляют сродство к экспонированным гидрофобным областям на белках, используя их как индикаторы неполного фолдинга. Почему, как вы думаете, гидрофобные области служат критическими сигналами о состоянии фолдинга белка?

6.11. Большинству белков для правильного фолдинга требуется помощь молекулярных шаперонов. Как, вы предполагаете, удастся правильный фолдинг самим шаперонам?

6.12. Что такого особенного в РНК, благодаря чему она выглядит столь привлекательной в роли эволюционного предшественника ДНК и белка? Что в таком случае позволило ДНК стать лучшим материалом, чем РНК, для хранения генетической информации?

6.13. Если бы молекула РНК могла формировать шпильку с симметричной внутренней петлей, как показано на рис. Q6.4, то мог бы комплемент этой РНК формировать подобную структуру? Если это так, то были бы какие-либо области в этих двух структурах идентичными? Если да, то какие?

Литература

Общая

Berg J. M., Tymoczko J. L. & Stryer L. (2006) *Biochemistry*, 6th ed. New York: WH Freeman.

Brown T. A. (2002) *Genomes 2*, 2nd ed. New York: Wiley-Liss.

Gesteland R. F., Cech T. R. & Atkins J. F. (eds.) (2006) *The RNA World*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hartwell L., Hood L., Goldberg M. L. et al. (2006) *Genetics: from Genes to Genomes*, 3rd ed. Boston: McGraw Hill.

Lodish H., Berk A., Kaiser C. et al. (2007) *Molecular Cell Biology*, 6th ed. New York: WH Freeman.

Stent G. S. (1971) *Molecular Genetics: An Introductory Narrative*. San Francisco: WH Freeman.

The Genetic Code (1966) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 31.

The Ribosome (2001) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 66.

Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P. et al (2003) *Molecular Biology of the Gene*, 5th ed. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings.

От ДНК к РНК

Bentley D.L. (2005) Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 251–256.

Berget S.M., Moore C. & Sharp P.A. (1977) Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3171–3175.

Black D.L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 291–336.

Brenner S., Jacob F. & Meselson M. (1961) An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190: 576–581.

Cate J.H., Gooding A.R., Podell E. et al. (1996) Crystal structure of a group I ribozyme domain: principles of RNA packing. *Science* 273: 1678–1685.

Chow L.T., Gelinis R.E., Broker T.R. et al. (1977) An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12: 1–8.

Cramer P. (2002) Multisubunit RNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 89–97.

Daneholt B. (1997) A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell* 88: 585–588.

Dreyfuss G., Kim V.N., & Kataoka N. (2002) Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 195–205.

Houseley J., LaCava J. & Tollervey D (2006) RNA-quality control by the exosome. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 529–539.

Izquierdo J.M. & Valcarcel J. (2006) A simple principle to explain the evolution of pre-mRNA splicing. *Genes. Dev.* 20: 1679–1684.

Kornberg R.D. (2005) Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem. Sci.* 30: 235–239.

Malik S. & Roeder R.G. (2005) Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem. Sci.* 30: 256–263.

Matsui T., Segall J., Weil P.A. & Roeder R.G. (1980) Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 255: 11992–11996.

Patel A.A. & Steitz J.A. (2003) Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 960–970.

Phatnani H.P. & Greenleaf A.L. (2006) Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes. Dev.* 20: 2922–2936.

Query C.C. & Konarska M.M. (2006) Splicing fidelity revisited. *Nature Struct. Mol. Biol.* 3: 472–474.

Ruskin B., Krainer A.R., Maniatis T. et al. (1984) Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing *in vitro*. *Cell* 38: 317–331.

Spector D.L. (2003) The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 573–608.

Staley J.P. & Guthrie C. (1998) Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92: 315–326.

Thomas M.C. & Chiang C.M. (2006) The general transcription machinery and general cofactors. *Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41: 105–178.

Wang D., Bushnell D.A., Westover K.D. et al. (2006) Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell* 127: 941–954.

От РНК к белку

Allen G.S. & Frank J. (2007) Structural insights on the translation initiation complex: ghosts of a universal initiation complex. *Mol. Microbiol.* 63: 941–950.

Anfinsen C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223–230.

Brunelle J.L., Youngman E.M., Sharma D. et al. (2006) The interaction between C75 of tRNA and the A loop of the ribosome stimulates peptidyl transferase activity. *RNA* 12: 33–39.

Chien P., Weissman J.S., & DePace A.H. (2004). Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 617–656.

Crick F.H.C. (1966) The genetic code: III. *Sci. Am.* 215: 55–62.

Hershko A., Ciechanover A. & Varshavsky A. (2000) The ubiquitin system. *Nature Med.* 6: 1073–1081.

Ibba M. & Soll D. (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 617–650.

Kozak M. (1992) Regulation of translation in eukaryotic systems. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 197–225.

Kuzmiak H.A., & Maquat L.E. (2006) Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol. Med.* 12: 306–316.

Moore P.B. & Steitz T.A. (2005) The ribosome revealed. *Trends Biochem. Sci.* 30: 281–283.

Noller H.F. (2005) RNA structure: reading the ribosome. *Science* 309: 1508–1514.

Ogle J.M., Carter A.P. & Ramakrishnan V. (2003) Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem. Sci.* 28: 259–266.

Prusiner S.B. (1998) Nobel lecture. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13363–13383.

Rehwinkel J., Raes J. & Izaurralde E. (2006) Nonsense-mediated mRNA decay: Target genes and functional diversification of effectors. *Trends Biochem. Sci.* 31: 639–646.

Sauer R.T., Bolon D.N., Burton B.M. et al. (2004) Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell* 119: 9–18.

Shorter J. & Lindquist S. (2005) Prions as adaptive conduits of memory and inheritance. *Nature Rev. Genet.* 6: 435–450.

Varshavsky A (2005) Regulated protein degradation. *Trends in Biochem. Sci.* 30: 283–286.

Voges D., Zwickl P. & Baumeister W. (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 1015–1068.

Weissmann C (2005) Birth of a prion: spontaneous generation revisited. *Cell* 122: 165–168.

Young J.C., Agashe V.R., Siegers K. et al. (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 781–791.

Мир РНК и происхождение жизни

Joyce G.F. (1992) Directed molecular evolution. *Sci. Am.* 267: 90–97.

Orgel L. (2000) Origin of life. A simpler nucleic acid. *Science* 290: 1306–1307.

Kruger K., Grabowski P., Zaug P. et al. (1982) Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31: 147–157.

Silverman S.K. (2003) Rube Goldberg goes (ribo)nuclear? Molecular switches and sensors made from RNA. *RNA* 9: 377–383.

Szostak J.W., Bartel D.P. & Luisi P.L. (2001) Synthesizing life. *Nature* 409: 387–390.

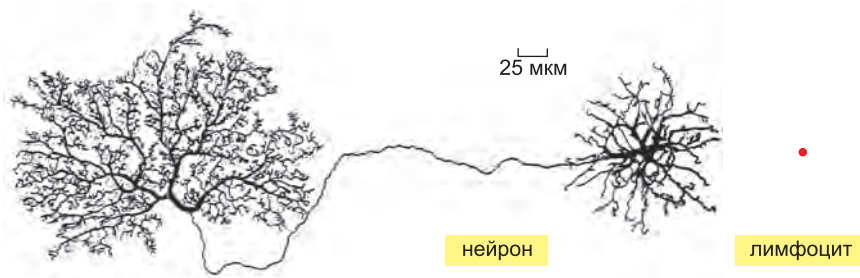


Рис. 7.1. Нейрон и лимфоцит млекопитающего. Длинные ветви нейрона, идущие от сетчатки, позволяют ему получать электрические сигналы от многих клеток и передавать их соседним клеткам. Лимфоцит — это белое кровяное тельце, свободно перемещающееся по организму и участвующее в ответе иммунной системы на заражение. Обе клетки содержат одинаковый геном, но экспрессируют различные РНК и белки. (Из В. В. Boycott, *Essays on the Nervous System* [R. Bellairs and E. G. Gray, eds.]. Oxford, UK: Clarendon Press, 1974.)

7

Контроль генной экспрессии

ДНК любого организма кодирует все молекулы РНК и белков, необходимые для построения его клеток. Однако само по себе полное описание последовательности ДНК организма, будь это несколько миллионов нуклеотидов, как у бактерии, или несколько миллиардов — у человека, не позволяет нам воссоздать организм, так же как список английских слов — восстановить пьесу Шекспира. В обоих случаях проблемой является то, как используются элементы последовательности ДНК или слова из списка. При каких условиях синтезируется каждый генный продукт и, когда он получен, каково его действие?

В данной главе обсуждается первая половина проблемы — правила и механизмы, согласно которым определенный набор генов избирательно экспрессируется в каждой клетке. Механизмы контроля генной экспрессии действуют на самых разных уровнях, и мы по очереди обсудим их. Начнем же с обзора нескольких основных принципов генетического контроля у многоклеточных организмов.

7.1. Общие представления о генетическом контроле

Морфология и функция различных типов клеток, входящих в состав высшего организма, часто довольно сильно отличаются. Например, если сравнить нейрон и лимфоцит млекопитающего, то разница между ними настолько велика, что трудно себе представить, что эти клетки содержат одинаковый геном (**рис. 7.1**). По этой причине и потому что дифференцировка клеток часто является необратимой, биологи сначала предполагали, что гены в ходе этого клеточного процесса могут избирательно

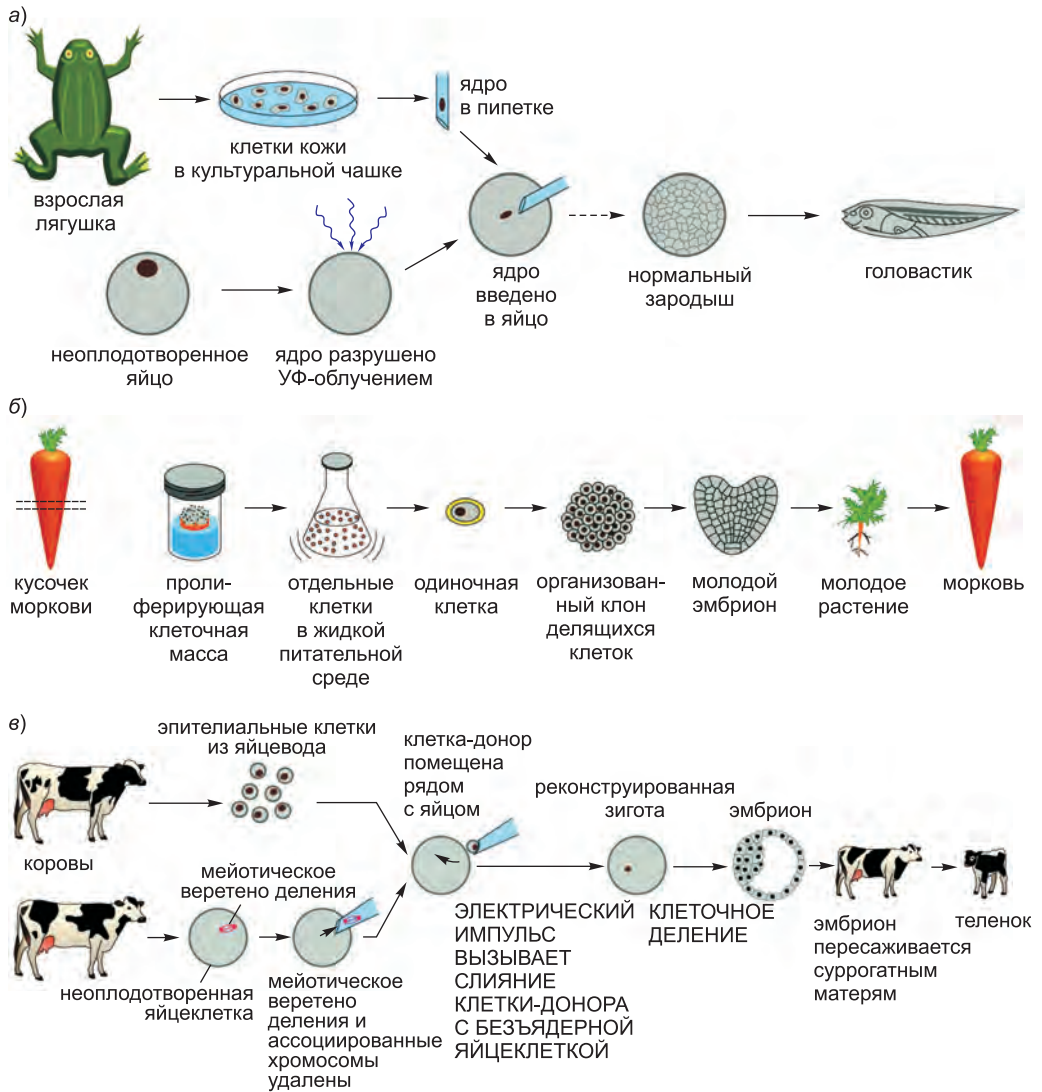


Рис. 7.2. Опыты, доказывающие, что дифференцированная клетка содержит всю необходимую для развития целого организма генетическую информацию. а) Ядро клетки кожи взрослой лягушки, трансплантированное в безъядерную яйцеклетку, может дать начало целому головастику. Прерывистая стрелка обозначает дополнительный этап трансплантации, необходимый для того, чтобы дать трансплантированному геному время адаптироваться к эмбриональному окружению. В ходе него из раннего развивающегося эмбриона отбирается одно из ядер и переносится обратно в дополнительную безъядерную яйцеклетку. б) У многих видов растений дифференцированные клетки сохраняют способность к «дедифференцировке», поэтому отдельная клетка может образовать клон клеток, который в дальнейшем даст начало целому растению. в) Ядро дифференцированной клетки от взрослой коровы, введенное в безъядерную яйцеклетку другой коровы, может дать начало теленку. Разные телята, полученные из одной дифференцированной донорной клетки, являются генетически идентичными и, следовательно, представляют собой клоны друг друга. (а, с изменениями из V. Gurdon, *Sci. Am.* 219: 24–35, 1968. С разрешения Scientific American.)

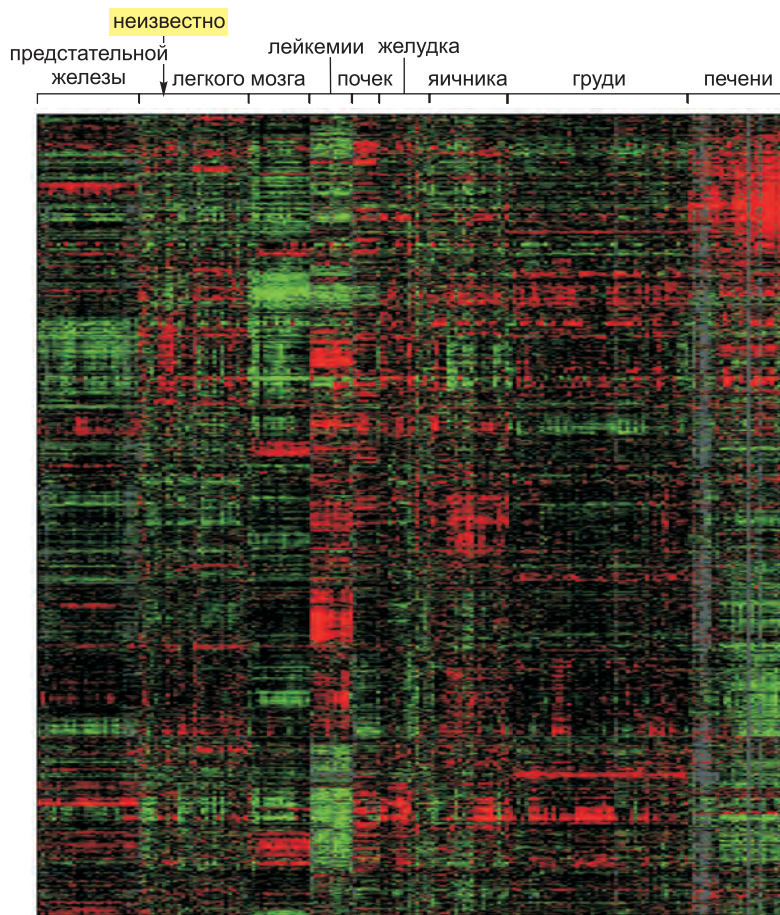


Рис. 7.3. Различия в картинах экспрессии мРНК среди разных типов раковых клеток человека. На рисунке обобщен очень большой набор измерений, в ходе которых определялись уровни мРНК 1800 выбранных генов (располагаются *сверху вниз*) у 142 различных линий раковых клеток человека (располагаются *слева направо*), каждая — от разного пациента. Каждая небольшая *красная* полоса обозначает, что данный ген у данной опухоли транскрибируется на уровне, значительно превышающем средний во всех клеточных линиях. Каждая небольшая *зеленая* полоса указывает на уровень экспрессии ниже среднего, а каждая *черная* полоса отмечает уровень экспрессии, близкий к среднему значению среди различных опухолей. Метод, использованный для получения этих данных (выделение мРНК с последующей гибридизацией с ДНК-чипами), описан в главе 8 (стр. 574–575). Обратите внимание, что относительные уровни экспрессии каждого из 1800 проанализированных генов отличаются у разных опухолей (это видно, если проследить по рисунку за определенным геном *слева направо*). Этот анализ также показал, что каждый тип опухоли обладает своей характерной картиной экспрессии генов. Подобная информация может быть использована для «типирования» раковых клеток неизвестного происхождения путем сравнения их профилей экспрессии генов с профилями экспрессии уже известных опухолей. Например, на рисунке неизвестный образец был идентифицирован как рак легких. (Любезно предоставлено Patrick O. Brown, David Botstein, and the Stanford Expression Collaboration.)

утрачиваться. Однако теперь известно, что дифференцировка клеток в основном определяется изменением экспрессии генов, а не изменениями последовательности нуклеотидов в геноме клетки.

7.1.1. В различных типах клеток многоклеточного организма содержится одинаковая ДНК

Разные типы клеток многоклеточного организма отличаются друг от друга потому, что синтезируют и накапливают различные наборы молекул РНК и белков. Доказательство же, что это происходит без изменения последовательности ДНК, получено в классической серии экспериментов на лягушке. Если ядро полностью дифференцированной клетки лягушки ввести в ооцит, ядро которого удалено, инъецированное «донорное» ядро детерминирует развитие из реципиентной яйцеклетки нормального головастика (рис. 7.2, а). Поскольку у головастика имеется целый ряд различных дифференцированных клеток, получивших свои последовательности ДНК из ядра исходной донорной клетки, можно сделать вывод, что дифференцированная донорная клетка не потеряла никаких важных последовательностей ДНК. Аналогичный вывод следует и из опытов, проведенных над различными растениями. В этом случае кусочки дифференцированной ткани растений культивировали на искусственной среде, после чего эту ткань разделяли на отдельные клетки. Во многих случаях одна из таких изолированных клеток способна регенерировать целое взрослое растение (рис. 7.2, б). Наконец, тот же принцип продемонстрирован и на млекопитающих, включая крупный рогатый скот, овцу, свинью, козу, собаку и мышь. В этих случаях ядра соматических клеток вводили в безъядерные



Рис. 7.4. Различия двух тканей человека по спектру экспрессируемых белков. На каждой из сторон рисунка белки представлены в виде результатов двумерного электрофореза в полиакриламидном геле (см. стр. 521–522). Белки разделены по молекулярной массе (*сверху вниз*) и по изоэлектрической точке — значению pH, при котором белок не заряжен (*справа налево*). Белковые пятна, искусственно окрашенные *красным*, встречаются у обоих образцов, *голубые* являются специфичными для одной из двух тканей. Различия между двумя образцами тканей значительно «перевешивают» их сходство: даже белки, общие для обеих тканей, как правило, различаются по относительному содержанию. Обратите внимание, что данный метод позволяет разделить белки по размеру и по заряду, следовательно, белок, который, например, имеет несколько различных фосфорилированных форм, будет представлен в виде серии *горизонтальных пятен* (см. *верхний правый* участок *правой* половины). Показана только малая часть полного спектра белков для каждого из образцов. Хотя двумерный электрофорез в полиакриламидном геле является простым способом наглядной демонстрации различий между двумя образцами белков, методы, основанные на масс-спектрологии (см. [стр. 519–521](#)), дают намного более детальную информацию и поэтому используются чаще. (С любезного разрешения Tim Myers and Leigh Anderson, Large Scale Biology Corporation.)

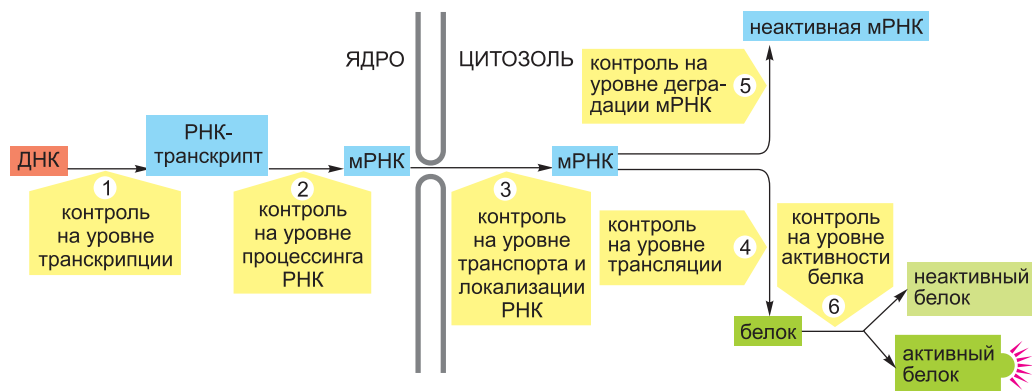


Рис. 7.5. Шесть уровней контроля экспрессии генов эукариот. Контроль, осуществляемый на уровнях 1–5, рассматривается в данной главе. Шестой уровень — регуляция активности белка — по большей части осуществляется путем ковалентной посттрансляционной модификации, включающей фосфорилирование, ацетилирование, а также убикитинирование (см. табл. 3.3, [стр. 186](#)), и обсуждается во многих главах этой книги.

яйцеклетки и, когда их пересаживали суррогатным матерям, некоторые из этих яйцеклеток, называемых реконструированными зиготами, развивались в здоровых животных (рис. 7.2, *в*).

Другим доказательством того, что в ходе развития позвоночных большие блоки ДНК не теряются и не перестраиваются, служит сравнение подробных карт поперечной исчерченности митотических хромосом (см. рис. 4.11). Если исходить из этого критерия, то следует признать, что наборы хромосом в дифференцированных клетках человеческого тела оказываются идентичными. Более того, сравнение геномов различных клеток методом рекомбинантных ДНК подтвердило, что изменения в экспрессии генов, лежащие в основе развития многоклеточного организма, заключаются, как правило, не в изменениях последовательностей соответствующих генов. Однако существует несколько случаев, когда при развитии организма происходят перестройки ДНК в геноме: наиболее ярко это проявляется при развитии иммунной системы млекопитающих, что будет описано в главе 25.

7.1.2. В различных типах клеток синтезируются разные наборы белков

В качестве первого шага к пониманию механизма клеточной дифференцировки, необходимо узнать, насколько отличаются друг от друга разные типы клеток. Полный ответ на этот фундаментальный вопрос еще не получен, но можно уже выделить определенные общие положения.

1. Существует множество процессов, общих для всех клеток, и, следовательно, любые две клетки одного организма имеют много одинаковых белков. Среди них структурные белки хромосом, РНК-полимеразы, ферменты репарации ДНК, рибосомные белки, ферменты, участвующие в основных реакциях метаболизма, а также множество белков, образующих цитоскелет.

2. Некоторые белки обнаруживаются в большом количестве лишь в специализированных клетках, где они функционируют, а в других типах клеток их нельзя

определить даже чувствительными методами анализа. Например, гемоглобин можно обнаружить только в эритроцитах.

3. Согласно исследованиям множества разных мРНК, в типичной клетке человека в любой момент времени экспрессируется 30–60% от примерно 25000 ее генов. При сравнении профилей экспрессии (паттернов) мРНК ряда различных клеточных линий человека обнаружено, что уровень экспрессии почти каждого активного гена меняется от одного типа клеток к другому. Некоторые из этих различий ярко выражены, как например, упомянутый ранее гемоглобин, но большинство из них едва заметны. Даже гены, активные во всех клетках, разнятся по уровню экспрессии в разных типах клеток. Паттерны, отражающие содержание мРНК (определенные при помощи ДНК-чипов, описываемых в главе 8), являются настолько специфическими для каждого типа клеток, что их можно использовать для определения типа раковых клеток, у которых не известна ткань-источник опухолевого роста (рис. 7.3).

4. Несмотря на существование значительных различий в экспрессии мРНК среди специализированных клеток, они не учитывают еще целый комплекс отличий в спектре синтезируемых белков. Как будет видно далее в этой главе, регуляция экспрессии генов возможна на множестве стадий, происходящих после транскрипции. Например, альтернативный сплайсинг может дать от одного гена целое семейство белков. Наконец, возможна ковалентная модификация белков после их синтеза. Следовательно, лучший способ оценки коренных различий в экспрессии генов между различными типами клеток — при помощи методов, напрямую показывающих уровни экспрессии белков и их посттрансляционные модификации (рис. 7.4).

7.1.3. Внешние сигналы могут вызывать изменение экспрессии генов в клетке

Большинство специализированных клеток многоклеточного организма способно изменять картину экспрессии своих генов в ответ на внеклеточные сигналы. Например, если клетка печени подвергается воздействию глюкокортикоидного гормона, то синтез нескольких специфических белков резко возрастает. Глюкокортикоиды выделяются в кровь во время периодов голодания или интенсивных физических нагрузок и служат для печени сигналом к увеличению образования глюкозы из аминокислот и других малых молекул. Набор белков, синтез которых индуцируется, включает в себя ферменты, например, тирозинаминотрансферазу, способствующую превращению тирозина в глюкозу. Если гормон больше не поступает, синтез этих белков снижается до нормального уровня.

Другие типы клеток реагируют на глюкокортикоиды иначе. Например, жировые клетки снижают производство тирозинаминотрансферазы, тогда как некоторые другие типы клеток могут совсем не реагировать на глюкокортикоидные гормоны. Эти примеры иллюстрируют главную особенность специализации клеток: различные типы клеток часто по-разному отвечают на один и тот же внеклеточный сигнал. В основе подобных корректировок, происходящих в ответ на внеклеточные сигналы, лежат характерные черты профиля экспрессии генов, которые не меняются и придают каждому типу клеток его неизменный отличительный характер.

7.1.4. Экспрессия гена может регулироваться на множестве этапов пути от ДНК к РНК и белку

Если различия между клетками разных типов обусловлены тем, какие гены экспрессируются в них, тогда на каком уровне осуществляется контроль экспрессии генов? Согласно предыдущей главе существует множество этапов на пути, ведущем от ДНК к белку. Мы теперь знаем, что, в принципе, каждый из них может регулироваться. Таким образом, клетка может контролировать синтез своих белков путем: 1) контроля времени и частоты транскрипции данного гена (**контроль на уровне транскрипции**); 2) контроля сплайсинга и процессинга РНК-транскриптов (**контроль на уровне процессинга РНК**); 3) отбора зрелых мРНК, предназначенных для экспорта из ядра в цитозоль, и выбора места их размещения в цитозоле (**контроль на уровне транспорта РНК и ее локализации**); 4) отбора мРНК в цитоплазме для трансляции на рибосомах (**контроль на уровне трансляции**); 5) избирательной дестабилизации определенных молекул мРНК в цитоплазме (**контроль на уровне деградации мРНК**) или 6) селективной активации, инактивации, деградации или локализации специфических молекул белка после их синтеза (**контроль на уровне активности белка**) (рис. 7.5).

Для большинства генов наиболее важен контроль на уровне транскрипции. Это вполне логично, так как из всех возможных контрольных точек, представленных на рис. 7.5, только контроль на уровне транскрипции гарантирует, что клетка не будет синтезировать лишних промежуточных продуктов. В последующих разделах рассматриваются компоненты ДНК и белков, которые выполняют эту функцию, регулируя инициацию транскрипции генов. В конце этой главы мы еще вернемся к множеству дополнительных способов регуляции генной экспрессии.

7.1.5. Заключение

ДНК генома клетки содержит в своей последовательности информацию, необходимую для создания тысяч различных молекул белков и РНК. В клетке обычно экспрессируется только часть генов, а возникновение в многоклеточном организме различных типов клеток обусловлено экспрессией разных наборов генов. Кроме того, клетки могут изменять картину экспрессируемых генов в ответ на изменения в окружающей среде, например, в ответ на сигналы от других клеток. В принципе, все этапы экспрессии гена могут регулироваться, но для большинства генов самая важная точка контроля — это инициация транскрипции РНК.

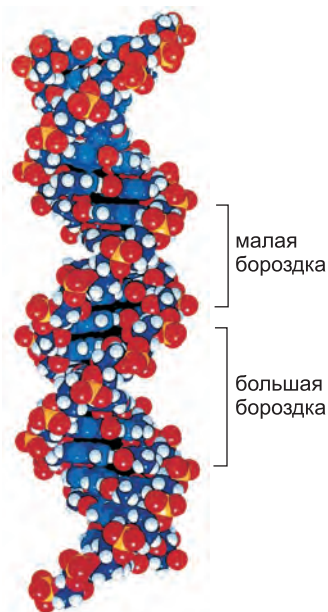


Рис. 7.6. Двойная спираль ДНК. Пространственная модель ДНК, на которой можно видеть большую и малую бороздки на внешней стороне двойной спирали. Цвета атомов следующие: углерод — синий, азот — голубой, водород — белый, кислород — красный, фосфор — желтый.

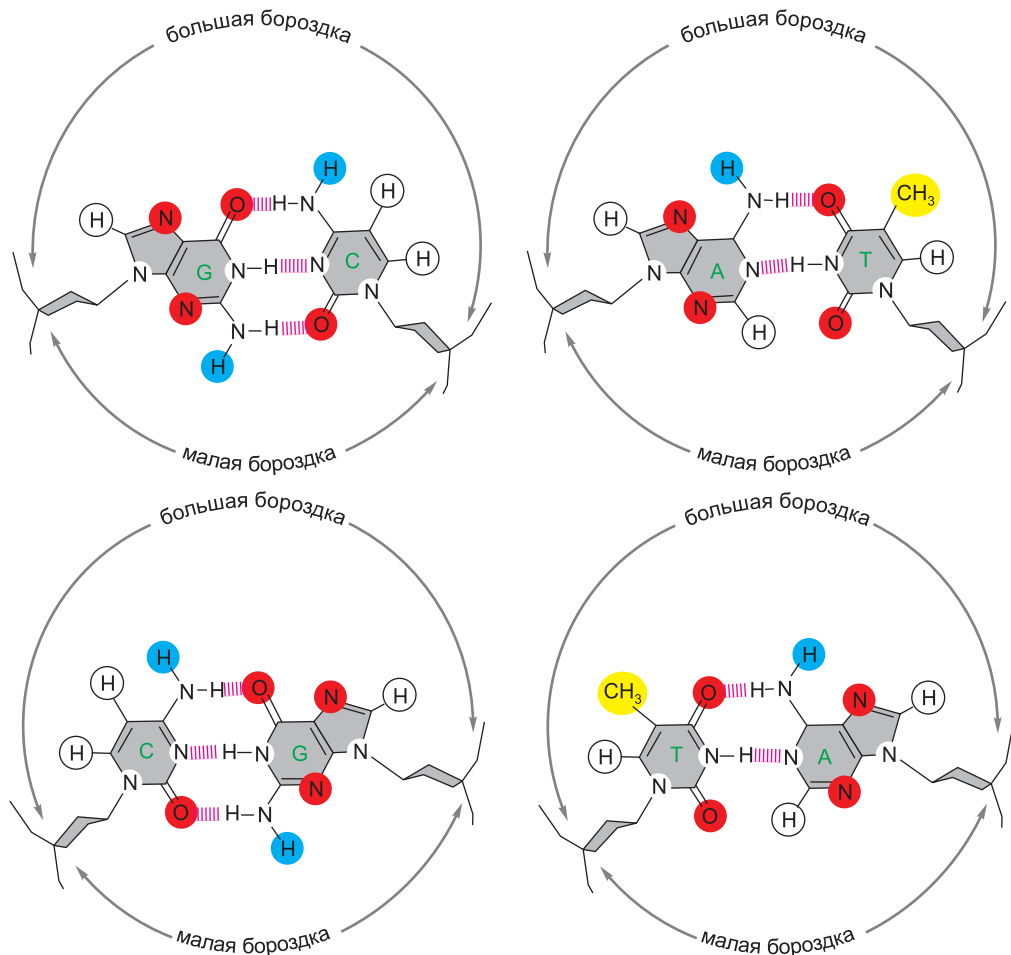


Рис. 7.7. Как различные пары оснований в ДНК могут быть распознаны по внешнему краю — без необходимости раскрытия двойной спирали. Представлены четыре возможные конфигурации пар оснований с потенциальными донорами водородной связи (обозначены голубым цветом), потенциальными акцепторами водородной связи (красные) и водородными связями собственно между парами оснований в виде серии коротких параллельных красных линий. Метильные группы, которые образуют гидрофобные выступы, отмечены желтым, а атомы водорода, присоединенные к углероду и, следовательно, недоступные для образования водородных связей, — белым. (Из С. Branden and J. Tooze, *Introduction to Protein Structure*, 2nd ed. New York: Garland Publishing, 1999.)

7.2. ДНК-связывающие мотивы в белках, регулирующих экспрессию генов

Как клетка определяет, какой из тысячи ее генов транскрибировать? Как описано в главе 6, транскрипция каждого гена контролируется регуляторной областью ДНК, расположенной относительно недалеко от места, где начинается транскрипция. Некоторые регуляторные области достаточно просты и действуют как переключатели, запускаемые одним сигналом. Множество других имеют сложную структуру и

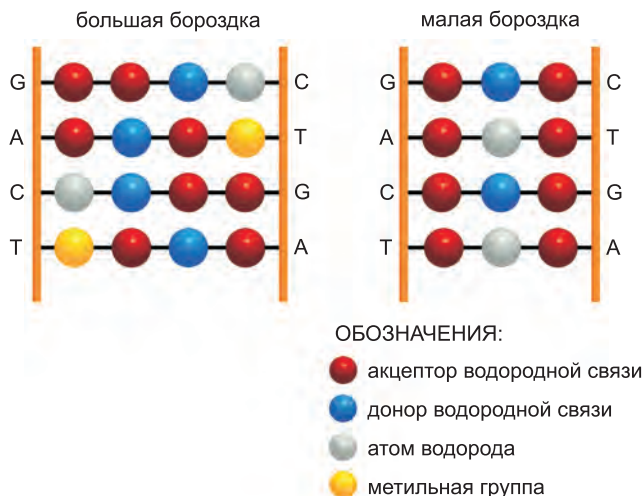


Рис. 7.8. Код распознавания ДНК. Внешний контур каждой представленной здесь пары оснований, если напрямую смотреть на большую или малую бороздку, содержит характерную комбинацию доноров и акцепторов водородной связи и метильных групп. В большой бороздке каждое из четырех сочетаний нуклеотидных пар создает свой уникальный рисунок специфических черт. Однако в малой бороздке для пар G–C и C–G рисунок одинаков, так же как для A–T и T–A. Цветовые обозначения те же, что и на рис. 7.7. (Из С. Branden and J. Tooze, *Introduction to Protein Structure*, 2nd ed. New York: Garland Publishing, 1999.)

похожи на крошечные микропроцессоры, отвечающие на разнообразные сигналы, которые они интерпретируют и обобщают для того, чтобы включить или выключить соседние гены. В независимости от того, сложная это или простая структура, эти переключающие устройства обнаружены во всех клетках и состоят из двух основных компонентов: 1) коротких участков ДНК определенной последовательности и 2) *регуляторных белков (регулирующих экспрессию генов)*, которые распознают и связываются с этой ДНК.

Начнем наше обсуждение белков, регулирующих экспрессию генов, с описания того, как они были открыты.

7.2.1. Регуляторные белки были открыты при изучении генетики бактерий

Генетические исследования бактерий, проведенные в 1950-х годах, впервые доказали существование **регуляторных белков (gene regulatory proteins; часто неточно называемых «факторами транскрипции»)**, которые включали или выключали специфические наборы генов. Один из этих регуляторов, *репрессор лямбда*, кодируется бактериальным вирусом — *бактериофагом лямбда*. Репрессор выключает вирусные гены, кодирующие белки, необходимые для новых вирусных частиц, и таким образом позволяет вирусному геному оставаться молчаливым пассажиром бактериальной хромосомы, размножающимся вместе с бактерией при благоприятных условиях для ее роста (см. рис. 5.78). Репрессор фага лямбда был одним из первых описанных регуляторных белков и, как отмечается далее, остается одним из наиболее изученных. Другие регуляторные белки бактерий реагируют на условия

питания, выключая гены, кодирующие специфический ряд ферментов метаболизма, когда они не нужны. Первым открытым бактериальным белком данного типа был *lac-репрессор*, который выключает синтез белков, ответственных за метаболизм лактозы, когда этого сахара нет в среде.

Первый шаг к пониманию регуляции генов состоял в выделении мутантных штаммов бактерий и бактериофага лямбда, не способных выключать специфические наборы генов. В то время предполагали, а позже доказали, что у большинства этих мутантов был дефицит белков, действующих как специфические репрессоры для этих наборов генов. Поскольку эти белки, как и большинство регуляторных белков, присутствуют в клетке в малых количествах, то их выделение было сложным и трудоемким делом. В конечном итоге эти белки были очищены путем фракционирования клеточных экстрактов. Было показано, что выделенные белки связываются со специфическими последовательностями ДНК, расположенными вблизи генов, которые они регулируют. Впоследствии при помощи сочетания классической генетики и методов изучения взаимодействий белок-ДНК, описываемых далее в этой главе, были определены точные последовательности ДНК, которые они распознают.

7.2.2. Белки могут считывать информацию с внешней стороны спирали ДНК

Как обсуждалось в главе 4, ДНК в хромосоме представляет собой очень длинную двойную спираль (рис. 7.6). Белки, регулирующие экспрессию генов, должны распознавать специфические нуклеотидные последовательности внутри этой структуры. Первоначально предполагалось, что этим белкам, возможно, потребуется прямой

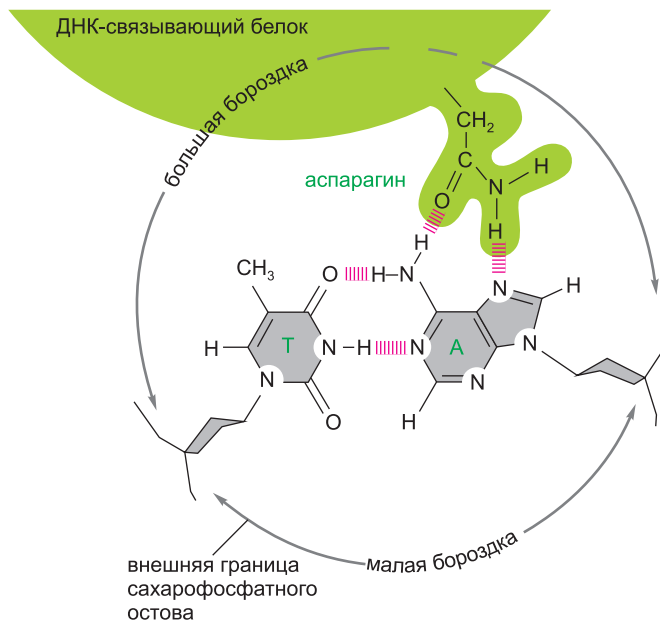


Рис. 7.9. Связывание регуляторного белка с большой бороздкой ДНК. Показан только один контакт. Обычно область взаимодействия поверхностей белка и ДНК содержит 10–20 подобных контактов, в которых участвуют разные аминокислоты, каждая из которых вносит вклад в усиление взаимодействия белок–ДНК.

Таблица 7.1. Некоторые регуляторные белки и последовательности ДНК, которые их распознают

	НАЗВАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК ¹
Бактерия	Lac repressor	5' AATTGTGAGCGGATAACAATT 3' TTAACACTCGCCTATGTTAA
	CAP	TGTGAGTTAGCTCACT ACACTCAATCGAGTGA
	Lambda repressor	TATCACCGCCAGAGGT ATAGTGGCGGTCTCCAT
Дрожжи	Gal4	CGGAGGACTGTCCCTCCG GCCTCCTGACAGGAGGC
	Mat α 2	GATGTAATT GTACATTA
	Gcn4	ATGACTCAT TACTGAGTA
Дрозофила	Kruppel	AACGGGTAA TTGCCAATT
	Bicoid	GGGATTAGA CCCTAATCT
Млекопитающие	Sp1	GGGCGG CCC GCC
	Oct1 Pou domain	ATGCAAAT TACGTTA
	GATA1	TGATAG ACTATC
	MyoD	CAAATG GTTTAC
	p53	GGGCAAGTCT CCCGTTCAGA

Примечание. Для удобства для каждого белка указана только одна последовательность распознавания, а не консенсусная последовательность (см. рис. 6.12).

доступ к водородным связям между парами оснований внутри двойной спирали, чтобы отличить одну последовательность ДНК от другой. Однако сейчас уже ясно, что внешняя сторона двойной спирали сполна содержит информацию о последовательностях ДНК, которую могут узнавать регуляторные белки без необходимости раскрытия двойной спирали. Внешняя часть каждой пары оснований выставлена на поверхность двойной спирали, демонстрируя характерный рисунок доноров и акцепторов водородной связи и гидрофобных участков, который распознают белки в большой и малой бороздках (рис. 7.7). Однако только в большой бороздке эти комбинации заметно отличаются для каждого из четырех сочетаний нуклеотидных пар (рис. 7.8). По этой причине регуляторные белки, как будет видно далее, в основном образуют специфические контакты с большой бороздкой.

7.2.3. Короткие последовательности ДНК являются основными компонентами генетических переключателей

Специфическая нуклеотидная последовательность может быть «прочитана» в форме рисунка молекулярных особенностей на поверхности двойной спирали ДНК. Особые нуклеотидные последовательности, каждая обычно длиной меньше 20 нуклеотидных пар, действуют в качестве основных компонент генетических переключателей, будучи участками распознавания для связывания специфических регуляторных белков генов. Идентифицированы тысячи таких последовательностей ДНК, каждая узнается своим регуляторным белком (или набором родственных регуляторных белков). Некоторые из регуляторных белков, рассматриваемые в ходе этой главы, перечислены в **табл. 7.1** вместе с последовательностями ДНК, которые они распознают.

Теперь обратимся к самим регуляторным белкам, вторым главным компонентам генетических переключателей. Начнем со структурных особенностей, благодаря которым эти белки узнают короткие специфические последовательности, содержащиеся в намного более длинной двойной спирали ДНК.

7.2.4. Регуляторные белки генов содержат структурные мотивы, которые могут считывать последовательность ДНК

В биологии опознавание на молекулярном уровне главным образом основывается на точном соответствии между поверхностями двух молекул, и самые яркие примеры этого принципа обнаружены при исследовании регуляторных белков. Регуляторный белок узнает специфическую последовательность ДНК, так как поверхность белка обладает значительной степенью комплементарности к специфическим чертам поверхности этой области двойной спирали. В большинстве случаев

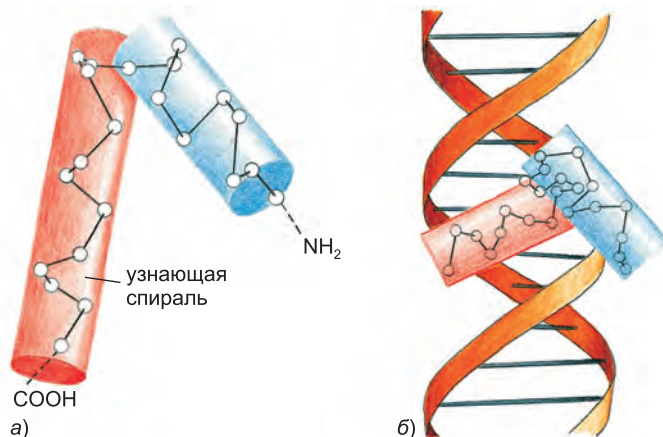


Рис. 7.10. Связывающийся с ДНК мотив спираль-виток-спираль. Мотив изображен на (а), где каждый белый кружок обозначает центральный углеродный атом в аминокислоте. С-концевая α -спираль (красная) называется узнающей спиралью, так как участвует в сайт-специфическом распознавании ДНК. Как показано на (б), спираль входит в большую бороздку ДНК, где она контактирует с внешней частью нуклеотидных пар оснований (см. также рис. 7.7). N-концевая α -спираль (синяя) в основном выполняет функцию структурного компонента, который помогает правильно расположить узнающую спираль.

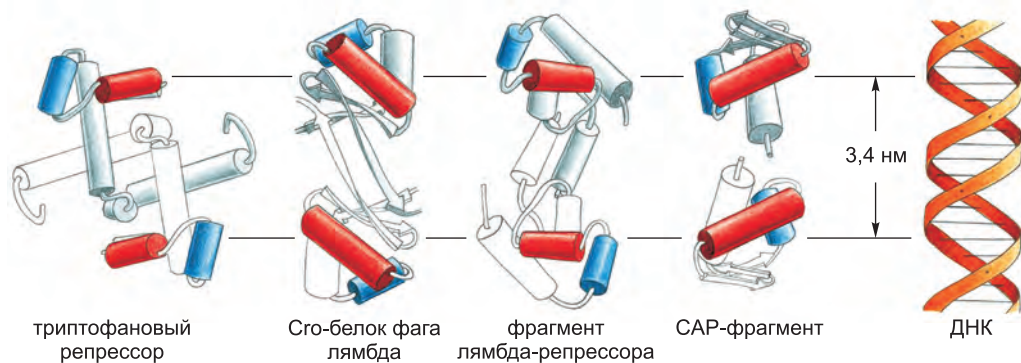


Рис. 7.11. Некоторые ДНК-связывающие белки, содержащие мотив спираль-виток-спираль. Все эти белки связываются с ДНК как димеры, в которых две копии узнающей спирали (красный цилиндр) отделены друг от друга ровно на один виток спирали ДНК (3,4 нм). Другая спираль мотива спираль-виток-спираль выделена синим, как на рис. 7.10. Лямбда-репрессор и белок Cro контролируют экспрессию генов фага лямбда, а триптофановый репрессор и белок-активатор катаболизма (CAP; catabolite activator protein) контролируют экспрессию ряда генов *E. coli*.

белок образует ряд контактов с ДНК, включая водородные и ионные связи, а также гидрофобные взаимодействия. Каждая отдельная связь сама по себе слаба, но вместе взятые примерно 20 связей, обычно образующихся в области контакта поверхностей белка и ДНК, обеспечивают высоко специфичное и весьма сильное взаимодействие (рис. 7.9). В действительности взаимодействия белок–ДНК включают в себя некоторые из самых прочных и наиболее специфических молекулярных взаимодействий, известных в биологии.

Каждый пример распознавания белком ДНК является уникальным по своим деталям, но рентгеноструктурный анализ и ЯМР-спектроскопия нескольких сотен регуляторных белков выявили, что многие из них содержат тот или иной мотив из небольшого набора структурных мотивов, связывающихся с ДНК. В таких мотивах в основном задействованы либо α -спирали, либо β -листы — для связывания с большой бороздкой ДНК, которая, как отмечалось выше, содержит достаточно информации, чтобы отличить одну последовательность ДНК от любой другой. Соответствие между ДНК и регуляторными белками настолько точное, что даже высказывалось предположение о том, что в ходе эволюции размеры основных структурных элементов нуклеиновых кислот и белков развивались вместе, чтобы эти молекулы могли взаимодействовать друг с другом по принципу «ключ-замок».

7.2.5. Мотив спираль-виток-спираль — один из самых простых и самых распространенных ДНК-связывающих мотивов

Первым признанным ДНК-связывающим белковым мотивом стал мотив **спираль-виток-спираль (helix-turn-helix)**. Первоначально идентифицированный в бактериальных белках, этот мотив позже был обнаружен у многих сотен связывающихся с ДНК эукариотических и прокариотических белков. Он формируется из двух α -спиралей, связанных короткой выступающей цепочкой аминокислот, которая образует «виток» (рис. 7.10). Две спирали находятся под фиксированным углом друг к другу, в основном благодаря взаимодействиям между ними. Спираль,



Рис. 7.12. Специфическая последовательность ДНК, узнаваемая белком Cro бактериофага лямбда. В этой последовательности выделенные зеленым нуклеотиды расположены симметрично, что позволяет каждому мономеру белка, также показанному зеленым цветом, распознавать каждую половину сайта ДНК одинаково. См. реальную структуру белка на рис. 7.11.

расположенная ближе к карбоксильному концу, называется *узнающей спиралью* (*recognition helix*), потому что она соответствует по размерам и взаимодействует с большой бороздкой ДНК. Боковые цепи ее аминокислот, отличающиеся от белка к белку, играют важную роль в узнавании специфических последовательностей ДНК, с которыми связывается белок.

Вне области спираль-виток-спираль структура разных белков, которые содержат этот мотив, может варьировать в широких пределах (рис. 7.11). Соответственно, каждый белок «представляет» мотив спираль-виток-спираль молекуле ДНК своим уникальным способом, что, полагают, повышает универсальность мотива спираль-виток-спираль благодаря возрастанию числа последовательностей ДНК, для распознавания которых можно использовать этот мотив. Кроме того, у большинства этих белков части полипептидной цепи, находящиеся вне домена спираль-виток-спираль, также образуют немаловажные связи с ДНК, помогающие произвести тонкую настройку взаимодействия.

Группа белков, содержащих мотив спираль-виток-спираль, представленная

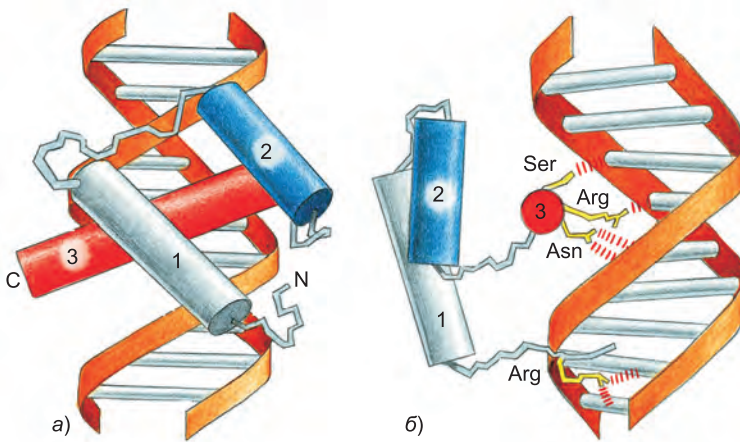


Рис. 7.13. Гомеодомен, связанный со специфической последовательностью ДНК. Показаны две разные проекции одной и той же структуры. а) Гомеодомен свернут в три α -спирали, которые плотно упакованы при помощи гидрофобных взаимодействий. Участок, включающий спирали 2 и 3, напоминает мотив спираль-виток-спираль. б) Узнающая спираль (спираль 3, красная) образует важные контакты с большой бороздкой ДНК. Например, как показано на рис. 7.9, аспарагин (Asn) спирали 3 контактирует с аденином. Подвижное плечо, связанное со спиралью 1, контактирует с нуклеотидными парами в малой бороздке. Представленный здесь гомеодомен является частью регуляторного белка дрожжей, но он очень близко напоминает гомеодомены многих эукариотических организмов. (Адаптировано из С. Wolberger et al., *Cell* 67: 517–528, 1991. С разрешения Elsevier.)

на рис. 7.11, демонстрирует характерную черту многих сайт-специфических белков, связывающихся с ДНК. Они связываются с последовательностями ДНК как симметричные димеры, а сами последовательности ДНК состоят из двух очень схожих «полусайтов», которые также расположены симметрично (рис. 7.12). Такое расположение позволяет каждому белковому мономеру образовать практически идентичные наборы контактов и невероятно повысить связывающую способность: в первом приближении удвоение числа контактов удваивает свободную энергию взаимодействия и при этом *возводит в квадрат* константу средства.

7.2.6. Гомеодоменные белки составляют особый класс белков, содержащих мотив спираль-виток-спираль

Вскоре после открытия первых регуляторных белков у бактерий генетические исследования плодовой мушки дрозофила привели к выделению и описанию важного класса генов, *гомеозисных*, или *гомеотических*, *селекторных генов* (*homeotic selector genes*), которые, как дирижер в оркестре, играют ключевую роль в регулировании всеми звеньями развития мухи. Как обсуждается в главе 22, позже доказано их фундаментальное значение и в развитии высших животных. Мутации в этих генах могут вызывать превращение одной части тела мухи в другую, указывая на то, что белки, которые они кодируют, контролируют ключевые стадии развития организма.

Когда в 1980-х годах определили нуклеотидные последовательности нескольких

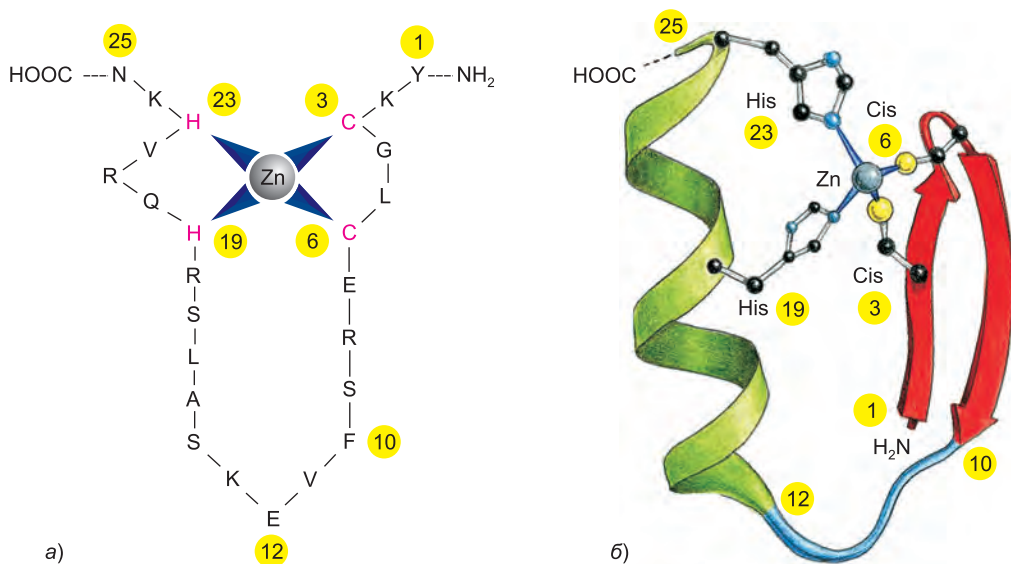


Рис. 7.14. Один из типов «цинковых пальцев». Этот белок относится к семейству Cys-Cys-His-His белков, содержащих «цинковый палец», названных так согласно аминокислотам, удерживающим цинк. а) Схематичное изображение аминокислотной последовательности «цинкового пальца» белка лягушки, принадлежащего к подобному классу. б) Трехмерная структура того же типа «цинкового пальца», состоящего из антипараллельного β-листа (аминокислоты 1–10), за которым следует α-спираль (аминокислоты 12–24). Четыре аминокислоты, которые связывают цинк (Cys 3, Cys 6, His 10 и His 23), прочно удерживают один конец α-спирали с одним из концов β-слоя. (Адаптировано из M. S. Lee et al. *Science* 245: 635–637, 1989. С разрешения AAAS.)

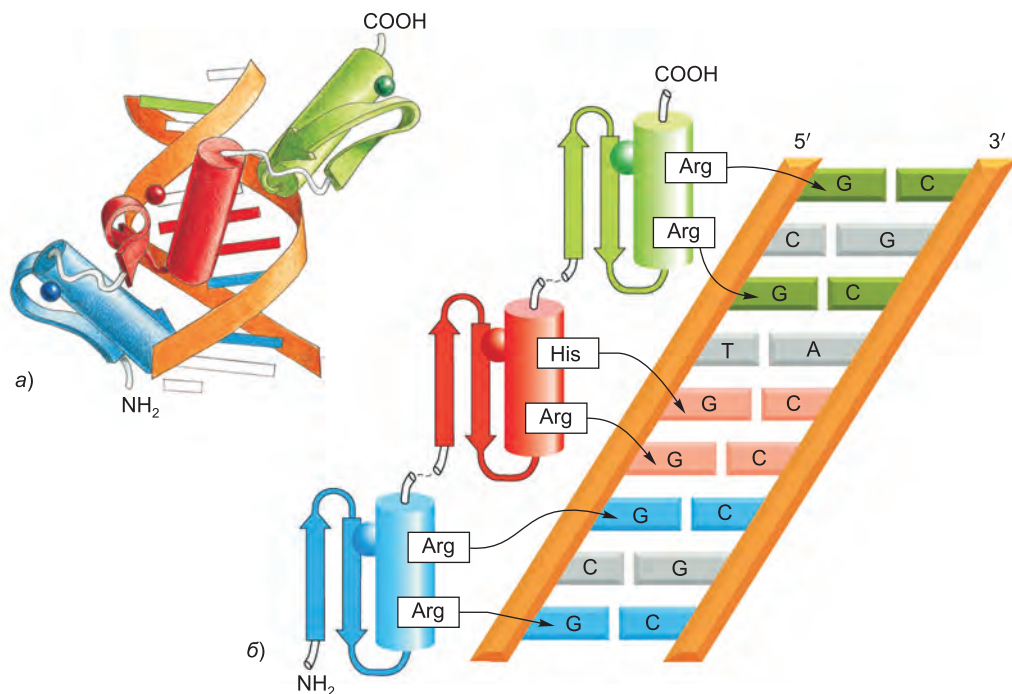


Рис. 7.15. Связывание белка, содержащего «цинковый палец», с ДНК. а) Структура фрагмента регуляторного белка мыши, связанного со специфическим участком ДНК. Этот белок распознает ДНК при помощи трех «цинковых пальцев» типа Cis-Cis-His-His (см. рис. 7.14), располагающихся как прямые повторы. б) Три пальца имеют схожие аминокислотные последовательности и контактируют с ДНК сходным образом. На а и б атом цинка у каждого «пальца» изображен в виде небольшого шарика. (Адаптировано из N. Pavletich and C. Pabo, *Science* 252: 810–817, 1991. С разрешения AAAS.)

гомеозисных селекторных генов, оказалось, что каждый из них кодирует практически идентичный участок из 60 аминокислот, который и характеризует этот класс белков и называется **гомеодоменом (homeodomain)**. После определения трехмерной структуры гомеодомена обнаружили, что он содержит мотив спираль-виток-спираль, родственный такому же мотиву у бактериальных регуляторных белков. Это явилось одним из первых признаков того, что принципы генной регуляции, установленные у бактерий, относятся также и к более высокоорганизованным организмам. Сейчас открыто свыше 60 гомеодоменных белков только у одной дрозофилы, и эти белки идентифицированы практически у всех изученных эукариотических организмов — от дрожжей до растений и человека.

Структура гомеодомена, связанного со специфической последовательностью ДНК, представлена на **рис. 7.13**. Мотив спираль-виток-спираль регуляторных белков бактерий часто встроен в различные структурные контексты, тогда как тот же мотив в гомеодоменах всегда окружен одной и той же структурой (образующей остальную часть гомеодомена), что означает, что этот мотив всегда презентруется ДНК одним и тем же способом. Действительно, структурные исследования показали, что гомеодоменный белок дрожжей и гомеодоменный белок дрозофилы обладают очень похожей конформацией и узнают ДНК практически одинаковым образом, хотя они идентичны только по 17 из 60 аминокислот (см. рис. 3.13).

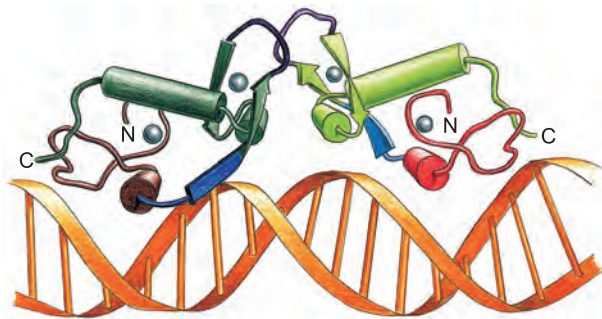


Рис. 7.16. Димер домена типа «цинковый палец», принадлежащий семейству внутриклеточных рецепторов, связанный со специфической последовательностью ДНК. Каждый домен «цинкового пальца» содержит два атома цинка (обозначены небольшими серыми шариками): один стабилизирует узнающую ДНК спираль (показана коричневым цветом в одной субъединице и красным — в другой), а другой стабилизирует петлю (показана фиолетовым цветом), участвующую в образовании димера. Каждый атом цинка скоординирован четырьмя остатками цистеина, расположенными соответствующим образом. Как и в белках с мотивом спираль-виток-спираль, представленных на рис. 7.11, две узнающие спирали димера разделены друг от друга расстоянием, соответствующим одному витку спирали ДНК. В качестве конкретного примера приведена часть глюкокортикоидного рецептора — белка, посредством которого клетки определяют наличие и реагируют (на уровне транскрипции) на действие глюкокортикоидных гормонов, синтезируемых надпочечниками при стрессе. (Адаптировано из В. F. Luisi et al., *Nature* 352: 497–505, 1991. С разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

7.2.7. Существует несколько видов связывающихся с ДНК мотивов типа «цинковый палец»

Мотив спираль-виток-спираль состоит исключительно из аминокислот, а вторая важная группа связывающихся с ДНК мотивов содержит в качестве структурных компонентов один или более атомов цинка. Все подобные цинк-координированные мотивы, связывающиеся с ДНК, называются «цинковыми пальцами» (**zink fingers**), но это описание относится только к их внешнему виду на схематических изображениях со времени их первого открытия (**рис. 7.14, а**). Последующие структурные исследования показали, что они делятся на несколько различающихся по структуре групп, две из которых мы здесь рассмотрим. Первый тип первоначально открыт у белков, активирующих транскрипцию гена рибосомной РНК эукариот. Он обладает простой структурой, в которой цинк удерживает вместе α -спираль и β -слой (**рис. 7.14, б**). Подобный тип «цинкового пальца» часто находят в tandemных кластерах, где α -спираль каждого из участников может контактировать с большой бороздкой ДНК, образуя практически непрерывный участок α -спиралей вдоль бороздки. Таким образом, сильное и специфическое взаимодействие ДНК–белок создается на основе повторяющихся основных структурных элементов (**рис. 7.15**).

Другой тип «цинкового пальца» обнаружен у большого семейства внутриклеточных рецепторных белков (подробно описано в главе 15). В этом случае образуется структура иного вида (схожая в некотором отношении с мотивом спираль-виток-спираль): здесь две α -спирали упакованы вместе с атомами цинка (**рис. 7.16**). Эти белки, так же как и белки с мотивом спираль-виток-спираль, обычно образуют димеры, которые позволяют одной из двух α -спиралей от каждой субъединицы

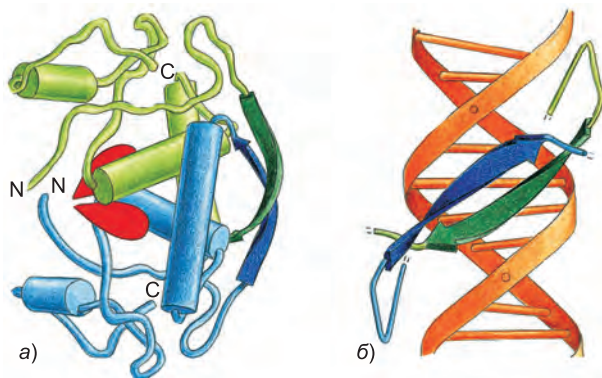


Рис. 7.17. Бактериальный метиониновый белок-репрессор. Метиониновый репрессор бактерий регулирует гены, которые кодируют ферменты, катализирующие синтез метионина. При избытке этой аминокислоты она связывается с репрессором, вызывая изменение его структуры, что позволяет этому белку прочно связываться с ДНК, выключая синтез ферментов. *а)* Для прочного связывания с ДНК метиониновый репрессор должен образовать комплекс с *S*-аденозилметионином, который выделен *красным*. Одна субъединица белкового димера показана *зеленым* цветом, другая – *голубым*. Связывающийся с ДНК двухцепочный β -слой содержит по одной цепи от каждой субъединицы; цепи обозначены *темно-зеленым* и *синим* цветами. *б)* Упрощенная схема связывания метионинового репрессора и ДНК, показывающая, как двухцепочный β -слой репрессора связывается с большой бороздкой ДНК. Для упрощения другие участки репрессора не показаны. (*а* — адаптировано из S. Phillips, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1: 89–98, 1991, с разрешения Elsevier; *б* — адаптировано из W. Somers and S. Phillips, *Nature* 359: 387–393, 1992, с разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

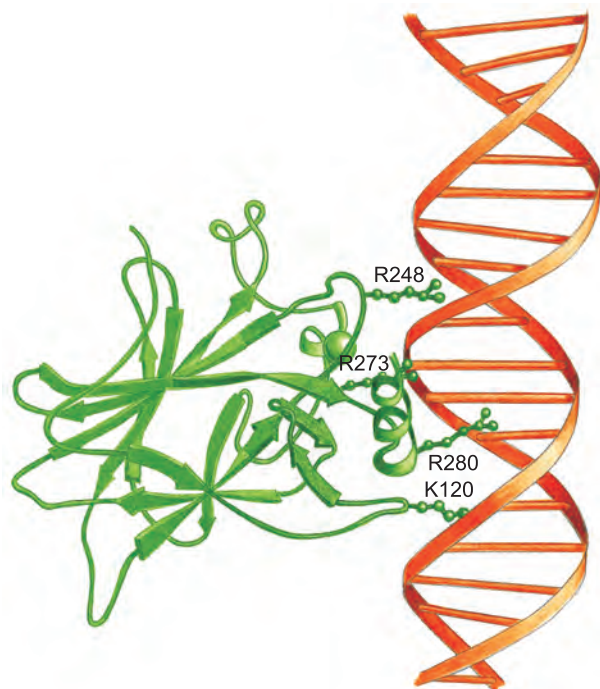


Рис. 7.18. Распознавание ДНК белком p53. Самые важные контакты с ДНК образуют аргинин 248 и лизин 120, которые отходят от выступающих петель, входящих внутрь малой и большой бороздок. Для сворачивания белка p53 требуется атом цинка (показан в виде сферы), но способ, которым цинк удерживается в этой структуре, совершенно отличается от способа, используемого содержащими «цинковый палец» белками, описанными ранее.

Рис. 7.19. Димер «лейциновой молнии», связанный с ДНК. Два α -спиральных связывающихся с ДНК домена (внизу) димеризуются в α -спиральной области «лейциновой молнии» (вверху) и образуют перевернутую Y-образную структуру. Каждое плечо Y-структуры образовано одной α -спиралью (по одной от каждого мономера), опосредующей связывание со специфической последовательностью ДНК в большой бороздке. Каждая α -спираль связывается с половиной симметричной структуры ДНК. Приведена структура белка Gsp4 дрожжей, регулирующего транскрипцию в зависимости от наличия аминокислот в окружающей среде. (Адаптировано из Т. Е. Ellenberger et al., *Cell* 71: 1223–1237, 1992. С разрешения Elsevier.)



взаимодействовать с большой бороздкой ДНК. Два описываемых в этой главе типа «цинковых пальцев» различаются по структуре, но обладают двумя важными одинаковыми чертами: оба используют цинк в качестве структурного компонента и оба используют α -спираль для узнавания большой бороздки ДНК.

7.2.8. β -слои также могут узнавать ДНК

У рассмотренных до этого ДНК-связывающих мотивов α -спирали являются основным механизмом, используемым для узнавания специфических последовательностей ДНК. Однако одна большая группа регуляторных белков использует совершенно иной способ распознавания. В данном случае информацию на поверхности большой бороздки «считывает» двухцепочечный β -слой с боковыми цепями аминокислот, протянувшимися от β -слоя к ДНК (рис. 7.17). Как и в случае с распознаванием при помощи α -спирали, этот мотив из β -слоев может быть использован для узнавания множества различных последовательностей ДНК. Вид конкретно узнаваемой последовательности ДНК зависит от последовательности аминокислот, которые составляют β -слой.

7.2.9. У некоторых белков для узнавания ДНК используются петли, которые входят в большую и малую бороздки ДНК

Несколько связывающихся с ДНК белков используют для считывания нуклеотидной последовательности не α -спирали и β -листы, а выступающие пептидные петли. Например, белок p53, важный *опухольный супрессор* (*tumor suppressor*) человека, при помощи таких петель узнает нуклеотидные пары в большой и малой бороздках (рис. 7.18). Нормальная функция p53 заключается в строгом регулировании роста и пролиферации клетки. Оценить важность данного белка позволяет следующий факт: почти половина всех раковых клеток человека приобретает сома-

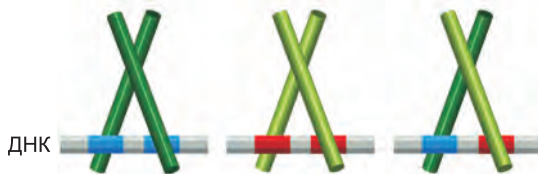


Рис. 7.20. Гетеродимеризация белков, содержащих «лейциновую молнию», может изменить специфичность связывания с ДНК. Гомодимеры «лейциновой молнии» связываются с симметричными последовательностями ДНК, как это изображено слева и по центру. Эти два белка узнают различные последовательности ДНК, обозначенные *красными* и *голубыми* участками на ДНК. Два разных мономера могут объединяться и образовывать гетеродимер, который узнает уже гибридную последовательность ДНК, состоящую из одного *красного* и одного *голубого* участка.

тические мутации в гене белка p53, и, как будет видно в главе 20, этот этап является ключевым в развитии множества опухолей. Многие из отмеченных в раковых клетках мутаций p53 разрушают или изменяют его связывание с ДНК; действительно, при раке человека наиболее часто в белке p53 мутирован аминокислотный остаток Arg 248, который контактирует с малой бороздкой ДНК (см. рис. 7.18).

7.2.10. Мотив «лейциновая молния» опосредует как связывание с ДНК, так и димеризацию белка

Многие регуляторные белки распознают ДНК как гомодимеры, вероятно, из-за того, что, как мы видели, это является самым простым способом достичь сильного специфического связывания (см. рис. 7.12). Обычно часть белка, отвечающая за димеризацию, отличается от части, ответственной за связывание с ДНК. Однако

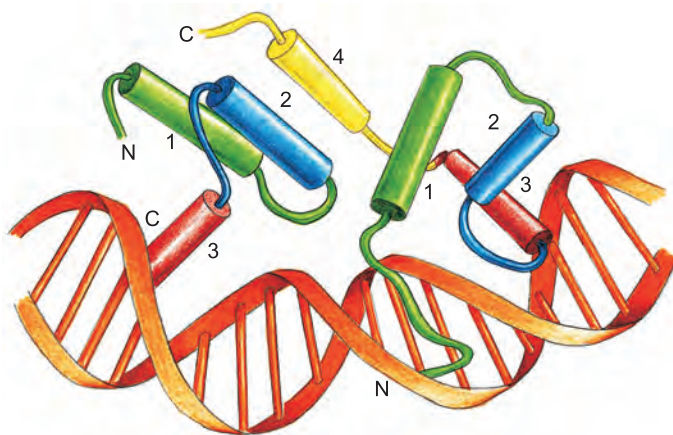


Рис. 7.21. Гетеродимер, состоящий из двух гомеодоменных белков, связанный со своим участком распознавания ДНК. Желтая спираль 4 правого белка (Mata2) неструктурирована в отсутствие левого белка (Mata1) и образует спираль только при гетеродимеризации. Последовательность ДНК распознается совместно обоими белками; некоторые из контактов белок–ДНК, образованных Mata2, показаны на рис. 7.13. Два этих белка являются белками почкующихся дрожжей, у которых гетеродимер определяет специфический тип клеток (см. рис. 7.65). Спирали пронумерованы в соответствии с рис. 7.13. (Адаптировано из T. Li et al., *Science* 270: 262–269, 1995. С разрешения AAAS.)

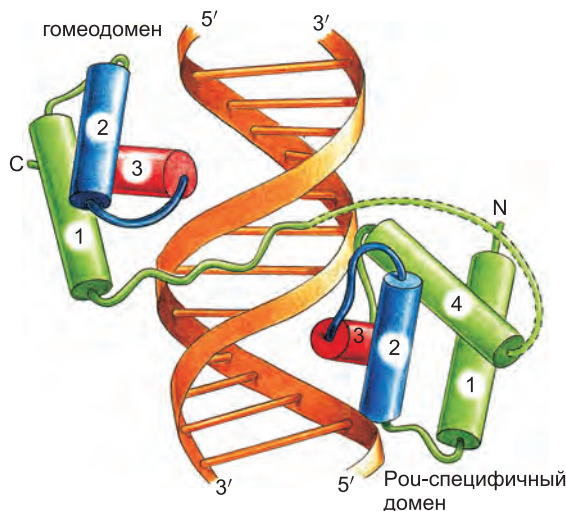


Рис. 7.22. Два ДНК-связывающих домена, ковалентно соединенные гибким полипептидом. Приведенная структура (называемая Pou-доменом) состоит из гомеодомена и структуры спираль-виток-спираль, соединенных гибким полипептидным «поводком», обозначенным пунктирными линиями. Единственный ген кодирует целиком весь белок, который синтезируется как непрерывная полипептидная цепь. Ковалентное соединение двух этих структур подобным образом приводит к значительному увеличению сродства белка к специфической последовательности ДНК по сравнению со сродством любой отдельной части. Группа регуляторных белков млекопитающих, примером которых является эта структура, регулирует образование факторов роста, иммуноглобулинов и других молекул, участвующих в развитии организма. Конкретный приведенный пример относится к белку Oct1. (Адаптировано из J. D. Klemm et al., *Cell* 77: 21–32, 1994. С разрешения Elsevier.)

один мотив просто и практически сочетает в себе обе эти функции. Он называется **мотив «лейциновая молния»**, получив свое имя из-за способа, каким две α -спирали, по одной от каждого мономера, соединяются вместе и образуют короткую биспираль (см. рис. 3.9). Спирали удерживаются вместе с помощью взаимодействий между гидрофобными боковыми цепями аминокислот (чаще всего лейцина), отходящими от одной стороны каждой цепи. Сразу же за областью димеризационного контакта две α -спирали расходятся и образуют Y-образную структуру, которая позволяет их боковым цепям контактировать с большой бороздкой ДНК. Таким образом, димер захватывает двойную спираль, как прищепка бельевую веревку (**рис. 7.19**).

7.2.11. Гетеродимеризация расширяет набор распознаваемых регуляторными белками последовательностей ДНК

Многие из до этого рассмотренных нами регуляторных белков связываются с ДНК как гомодимеры, то есть как димеры, состоящие из двух одинаковых субъединиц. Однако множество регуляторных белков может также соединяться с неидентичными партнерами, образуя гетеродимеры, состоящие из двух различных субъединиц. Поскольку гетеродимеры обычно образуются из двух белков, которые отличаются по специфичности связывания с ДНК, то смешение и сочетание регуляторных белков подобным образом значительно расширяет репертуар

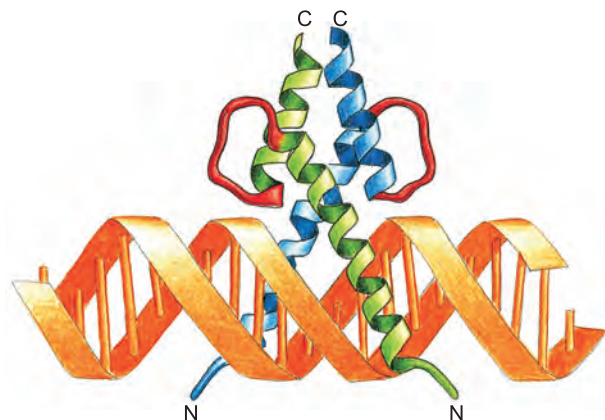


Рис. 7.23. Димер мотива спираль-петля-спираль (HLH), связанный с ДНК. Два мономера удерживаются вместе в узле из четырех спиралей: каждый мономер предоставляет по две α -спирали, связанные гибкой петлей белка (красная). Со специфической последовательностью ДНК связываются две α -спирали, выступающие из четырехспирального узла. (Адаптировано из A. R. Ferre-D'Amare et al., *Nature* 363: 38–45, 1993. С разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

ДНК-связывающих специфичностей, который могут показать эти белки. Как показано на [рис. 7.20](#), три разные специфичности связывания с ДНК, в принципе, могут быть сформированы из двух типов мономеров «лейциновой молнии», тогда как шесть — из трех типов мономеров и т. д.

Однако при таком беспорядочном сочетании белков действуют и ограничения. Например, если бы в обычной эукариотической клетке все типы белков с «лейциновой молнией» образовывали гетеродимеры, то количество «взаимных помех» между цепями, регулирующими экспрессию генов в клетке, было бы, вероятно, настолько огромным, что вызвало бы хаос. Возможность образования определенного гетеродимера зависит от того, как хорошо гидрофобные поверхности двух «лейциновых молний» сцепляются друг с другом, что, в свою очередь, зависит от

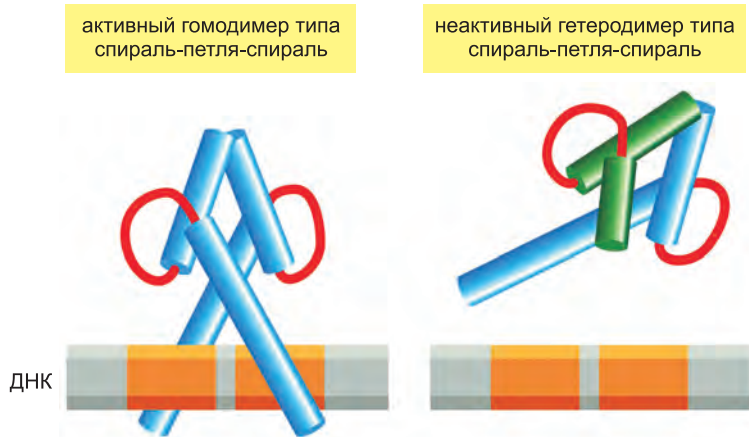


Рис. 7.24. Ингибиторная регуляция усеченными HLH-белками. Мотив спираль-петля-спираль (HLH) отвечает за димеризацию и за связывание с ДНК. Слева гомодимер HLH-белков узнает симметричную последовательность ДНК. Справа при связывании HLH-белка нормальной длины (голубой) с усеченным HLH-белком (зеленый), у которого нет LYR-связывающей α -спирали, образуется гетеродимер, который не способен прочно связываться с ДНК. Если в клетке присутствует избыток усеченного белка, то его молекулы блокируют гомодимеризацию белка нормальной длины и, следовательно, мешают ему связываться с ДНК.

конкретных аминокислотных последовательностей двух областей этих «застежек». Таким образом, в клетке каждый белок, содержащий «лейциновую молнию», может образовывать димеры только с небольшим набором других белков с аналогичным мотивом.

Гетеродимеризация является примером **комбинаторного контроля (combinatorial control)**, при котором клеточным процессом управляют не отдельные белки, а комбинации различных белков. Гетеродимеризация как механизм комбинаторного контроля экспрессии генов встречается у многих различных видов регуляторных белков (рис. 7.21). Комбинаторный контроль является ведущей темой, с которой мы будем неоднократно сталкиваться в этой главе, а образование гетеродимерных комплексов, регулирующих активность генов, является только одним из множества путей, при котором белки, чтобы контролировать экспрессию генов, действуют совместно.

Определенные комбинации регуляторных белков стали «намертво» связанными в клетке; например, два разных ДНК-связывающихся домена могут посредством перегруппировки генов, происходящей в ходе эволюции, оказаться соединенными в одну полипептидную цепочку, которая проявляет уже новую ДНК-связывающую специфичность (рис. 7.22).

7.2.12. Мотив спираль-петля-спираль тоже опосредует димеризацию и связывание с ДНК

Другим важным ДНК-связывающим мотивом, родственным «лейциновой молнии», является **мотив спираль-петля-спираль (HLH; helix-loop-helix)**, который отличается от рассмотренного ранее мотива спираль-виток-спираль и состоит из короткой α -спирали, соединенной при помощи петли со второй более длинной α -спиралью. Гибкость петли позволяет одной спирали загибаться назад и укладываться напротив другой. Как показано на рис. 7.23, подобная двуспиральная структура связывается и с ДНК, и с мотивом HLH второго белка. Второй белок может быть таким же (образуется гомодимер) или иным (образуется гетеродимер). В любом случае две α -спирали, которые отходят от области димеризационного контакта, образуют специфические контакты с ДНК.

У некоторых белков с мотивом HLH нет α -спирального удлинения, ответственного за связывания с ДНК. Эти укороченные белки могут образовывать гетеродимеры с белками нормальной длины, содержащими мотив HLH, но такие гетеродимеры не способны прочно связываться с ДНК, потому что об-

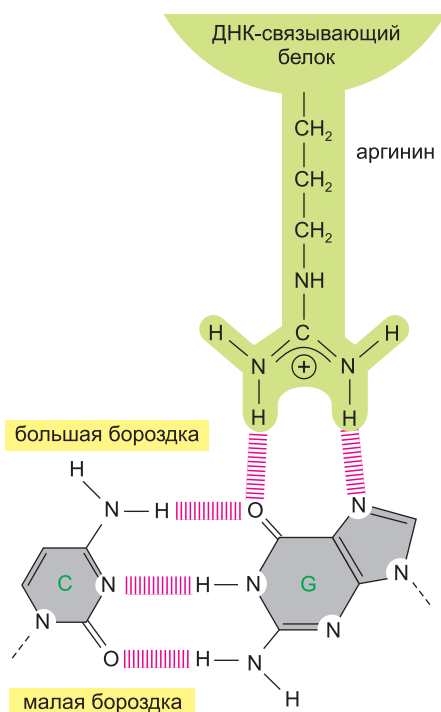


Рис. 7.25. Один из самых распространенных типов взаимодействий белок–ДНК. Благодаря специфической геометрии акцепторов водородной связи (см. рис. 7.7) боковая цепь аргинина однозначно распознает гуанин. На рис. 7.9 показан еще один часто встречающийся тип взаимодействий белок–ДНК.

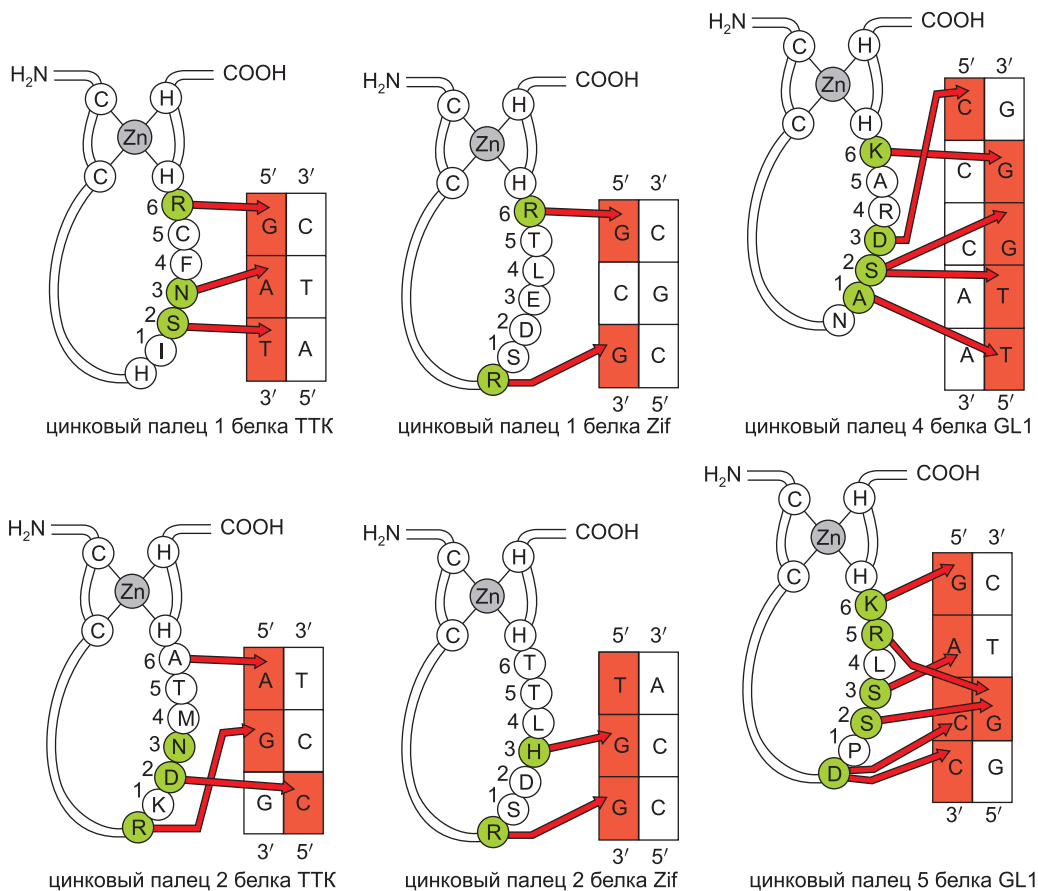


Рис. 7.26. Обобщенная схема сайт-специфических взаимодействий между шестью разными «цинковыми пальцами» и последовательностями ДНК, которые они распознают. Все шесть «цинковых пальцев» имеют одинаковую общую структуру (см. рис. 7.14), но каждый из них связывается с различной последовательностью ДНК. Пронумерованные аминокислоты образуют α -спираль, которая узнает ДНК (рис. 7.14 и 7.15), а те аминокислоты, которые образуют сайт-специфические контакты с ДНК, окрашены *зеленым* цветом. Нуклеотидные основания, с которыми контактирует белок, выделены *оранжевым*. Обычно образуются контакты аргинин–гуанин (см. рис. 7.25), но гуанин может также распознаваться серином, гистидином или лизином, как показано на рисунке. Кроме того, одна и та же аминокислота (в данном примере серин) может распознавать более одного основания. Два из изображенных «цинковых пальцев» входят в состав белка ТТК (белок дрозофилы, участвующий в развитии организма); два «пальца» принадлежат белку мыши (Zif268), представленному на рис. 7.15, и два — белку человека (GL1), aberrантные формы которого могут вызывать определенные типы рака. (Адаптировано из С. Branden and J. Tooze, Introduction to Protein Structure, 2nd ed. New York: Garland Publishing, 1999.)

разуют только половину необходимых контактов с ней. Таким образом, кроме создания активных димеров, гетеродимеризация является широко используемым клетками способом держать под контролем специфические регуляторные белки (рис. 7.24).

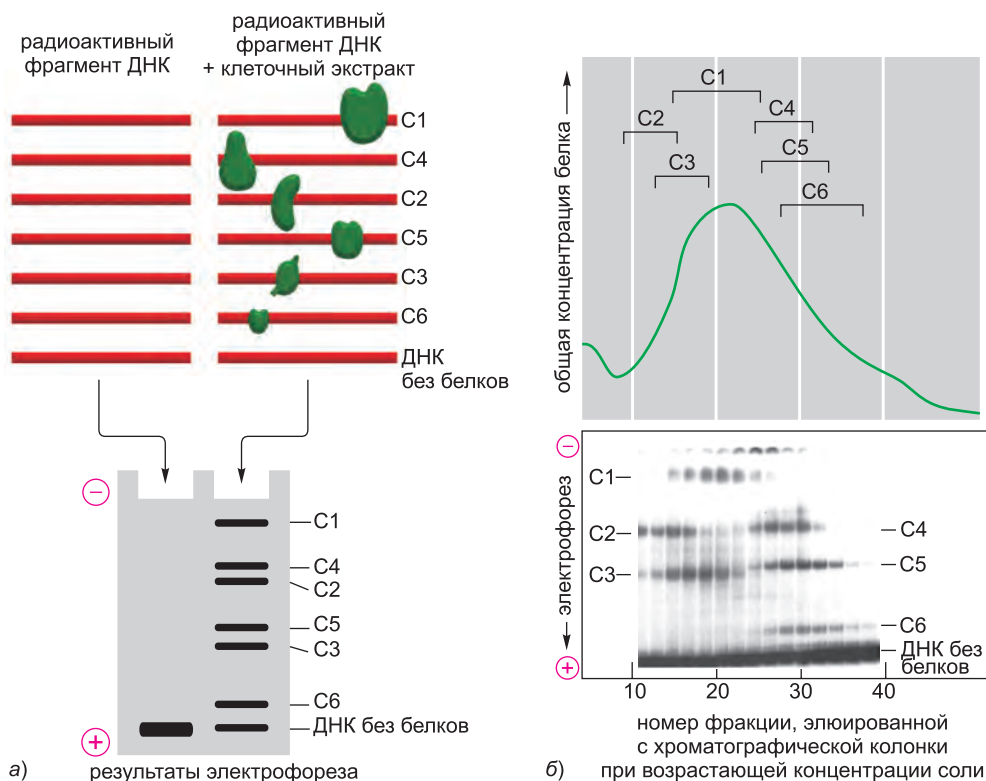


Рис. 7.27. Метод сдвига электрофоретической подвижности. Принцип метода изображен на схеме а. В этом примере экстракт, полученный из линии антител-продуцирующих клеток, смешивали с радиоактивно-меченым фрагментом ДНК, содержащим около 160 нуклеотидов регуляторной последовательности гена, кодирующего легкую цепь иммуноглобулина, продуцируемого этой клеточной линией. Воздействие белков, входящих в состав экстракта, на подвижность фрагмента ДНК определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующей радиоавтографией. Свободные фрагменты ДНК быстро мигрируют к концу геля, тогда как те же фрагменты, связанные с белками, задерживаются. Обнаружение шести отстающих полос ДНК указывает на присутствие в экстракте шести различных сайт-специфических ДНК-связывающих белков (обозначенных С1–С6), которые связываются с этим фрагментом ДНК. (Для простоты все фрагменты ДНК, с которыми связываются более одного белка, на рисунке не показаны). На схеме б экстракты фракционировали по стандартной методике хроматографического разделения белков (см. стр. 512–513) (вверху), каждую фракцию смешивали с радиоактивным фрагментом ДНК, наносили на одну дорожку полиакриламидного геля и анализировали далее, как указано на схеме а. (б — модификациями из С. Scheidreit, A. Heguy and R.G. Roeder, *Cell* 51: 783–793, 1987. С разрешения Elsevier.)

7.2.13. До сих пор невозможно предсказать последовательности ДНК, распознаваемые всеми регуляторными белками

Различные рассмотренные нами ДНК-связывающие мотивы белков представляют собой только структурные каркасы, от которых отходят специфические боковые цепи аминокислот и контактируют со специфическими парами оснований ДНК. Поэтому справедливо задать вопрос, существует ли простой код распознавания «аминокислота — пара оснований»; всегда ли, например, с парой оснований G-C

контактирует определенная боковая цепь аминокислоты? Ответ будет отрицательным, хотя определенные типы взаимодействий аминокислота–основание встречаются намного чаще, чем другие (рис. 7.25). Как мы видели в главе 3, белковые поверхности практически любой формы и состава могут быть созданы всего лишь из 20 аминокислот, и регуляторный белок использует разные их комбинации, чтобы создать поверхность, которая будет строго комплементарна специфической последовательности ДНК. Известно, что одна и та же пара оснований, таким образом, может распознаваться множеством способов в зависимости от ее контекста (рис. 7.26). Тем не менее постижение принципов узнавания белок–ДНК молекулярными биологами достигло такого уровня, что они могут конструировать новые белки, которые распознают заданную последовательность ДНК.

Обозначив основные черты регуляторных белков, давайте обратимся к некоторым методам, которые сейчас используются для их изучения.

7.2.14. По сдвигу электрофоретической подвижности ДНК можно выявить сайт-специфические ДНК-связывающие белки

Генетические исследования, которые проложили дорогу к регуляторным белкам бактерий, дрожжей и дрозофилы, намного сложнее у позвоночных. Поэтому для выделения регуляторных белков позвоночных потребовалось дождаться развития новых методов исследования. Многие из этих подходов основаны на определении в клеточном экстракте ДНК-связывающего белка, который специфически узнает известную последовательность ДНК, контролирующую экспрессию определенного гена. Один из самых обычных способов определения и изучения сайт-специфических связывающихся с ДНК белков основан на влиянии связавшегося белка на миграцию молекул ДНК в электрическом поле.

Молекула ДНК обладает высоким отрицательным зарядом и, следовательно, в электрическом поле быстро движется к положительному электроду. При электрофорезе в полиакриламидном геле (см. стр. 534) молекулы ДНК разделяются по размеру, так как меньшие молекулы легче проходят через мелкую сетчатую структуру геля, чем большие. Молекулы белка, связавшись с ДНК, снижают ее подвижности в геле. В общем, чем больше связавшийся белок, тем медленнее движется связанная с ним молекула ДНК. Это явление лежит в основе **метода сдвига электрофоретической подвижности в геле (gel-mobility shift assay)**. С помощью этого метода удастся обнаружить даже следовые количества сайт-специфического ДНК-связывающего белка. В короткие фрагменты ДНК, длина и последовательность которых известна (полученные либо при клонировании ДНК, либо путем химического синтеза, обсуждаемого в главе 8), вводят радиоактивную метку и смешивают с экстрактом клеток, полученную смесь наносят на полиакриламидный гель и проводят электрофорез. Если фрагмент ДНК соответствует области хромосомы, с которой, например, связываются несколько сайт-специфических белков, то при радиоавтографии (см. стр. 602–603) видна серия полос ДНК, каждая из них отстает от исходной на разную величину и представляет определенный комплекс ДНК–белок. Белки, связанные с ДНК в каждой из полос, можно выделить последовательным фракционированием клеточного экстракта (рис. 7.27). После очистки сайт-специфического ДНК-связывающего белка можно использовать метод сдвига электрофоретической подвижности для изучения силы и специфичности его взаимодействия с различными последовательностями ДНК, продолжительности

жизни комплексов ДНК–белок и других свойств, важных для функционирования белка в клетке.

7.2.15. ДНК-аффинная хроматография облегчает очистку сайт-специфических ДНК-связывающих белков

После определения распознаваемой регуляторным белком последовательности ДНК можно использовать чрезвычайно действенный метод очистки белка, называемый **ДНК-аффинной хроматографией (DNA-affinity chromatography)**. Химически синтезированный двухцепочечный олигонуклеотид соответствующей последовательности пришивают к нерастворимой пористой матрице, например агарозе, а затем

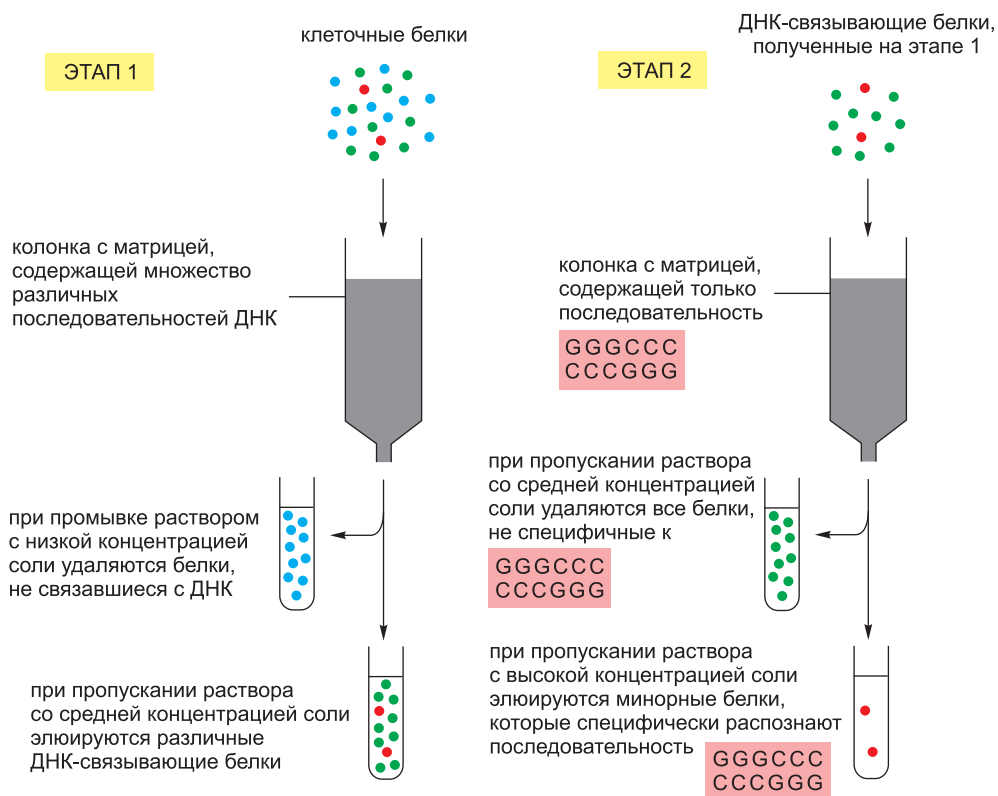


Рис. 7.28. ДНК-аффинная хроматография. На первом этапе все белки, способные связываться с ДНК, отделяют от остальных клеточных белков на колонке, содержащей большое количество различных последовательностей ДНК. Большинство сайт-специфических ДНК-связывающих белков обладают слабым (неспецифическим) сродством ко всей массе ДНК и поэтому задерживаются на колонке. Подобное сродство во многом зависит от ионного притяжения, и белки можно смыть с колонки раствором со средней концентрацией соли. На втором этапе смесь белков, связывающихся с ДНК, пропускают через колонку, которая содержит только ДНК определенной последовательности. Как правило, все белки «сядут» на колонку — большинство из-за неспецифических взаимодействий. И снова их смывают с колонки растворами со средней концентрацией соли, и на колонке остаются только те белки (обычно только один или несколько), которые связываются специфически, а следовательно, очень прочно именно с данной последовательностью ДНК. Эти оставшиеся на колонке белки элюируют растворами с очень высокой концентрацией соли.

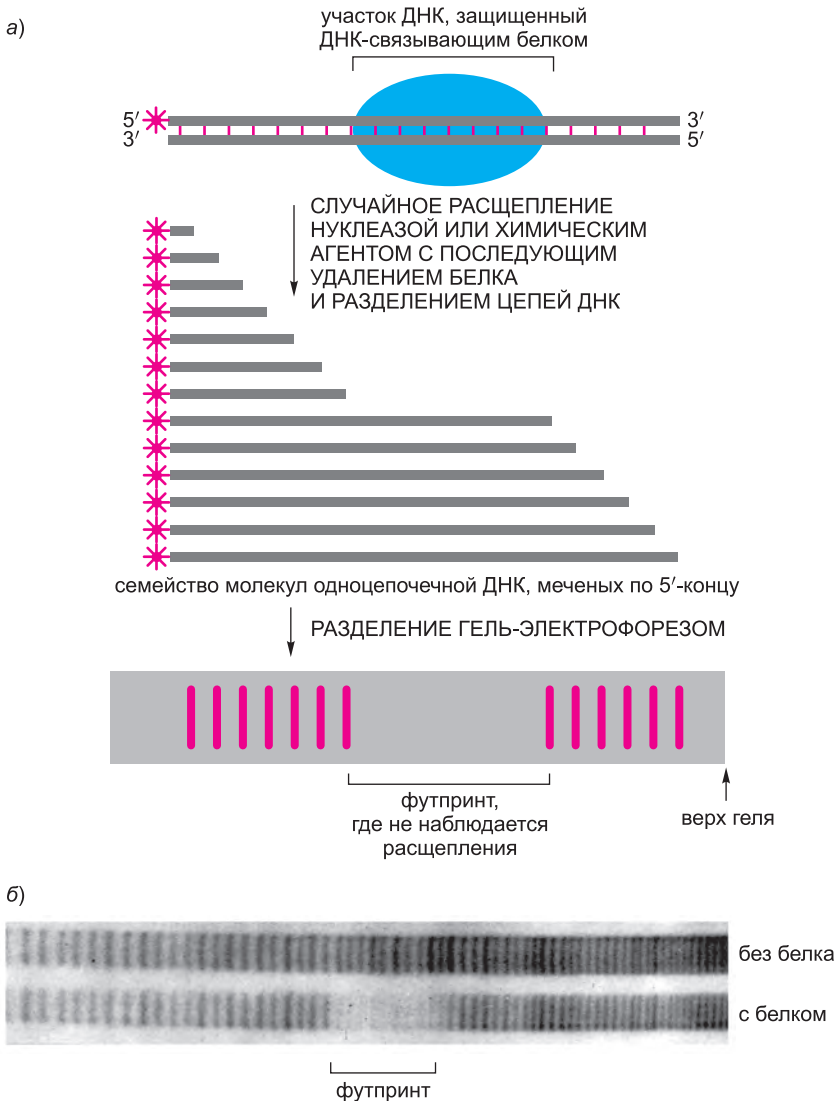


Рис. 7.29. Метод футпринтинга ДНК. а) Схема метода. В один из концов ДНК-фрагмента вводят радиоактивную метку ^{32}P (процедура описана на рис. 8.34) и затем меченый фрагмент расщепляют с помощью нуклеазы или химического соединения, вводя случайные одноцепочечные разрывы. После проведения денатурации ДНК и разделения ее на отдельные цепи фрагменты, которые образуются из меченой цепи, разделяют на геле и детектируют с помощью радиоавтографии (см. рис. 8.33). После этого сравнивают расположение полос ДНК, образуемых в присутствии и отсутствии ДНК-связывающих белков. При наличии такого белка он прикрывает нуклеотиды на участке связывания и защищает их фосфодиэфирные связи от расщепления. В результате меченые фрагменты, которые содержат участок связывания, отсутствуют, и на геле возникает пробел, именуемый футпринт. В приведенном примере ДНК-связывающий белок защищает семь фосфодиэфирных связей от действия расщепляющего агента. б) Реальный футпринт, использованный для определения участка связывания регуляторного белка человека. В качестве расщепляющего агента использовали низкомолекулярное железосодержащее органическое соединение, которое в норме расщепляет любую из фосфодиэфирных связей с практически равной частотой. (б – с любезного разрешения Michele Sawadogo и Robert Roeder.)

Рис. 7.30. Метод определения последовательности ДНК, распознаваемой регуляторным белком. Очищенный регуляторный белок смешивают с большим количеством коротких фрагментов ДНК с разными последовательностями нуклеотидов. Набор таких фрагментов ДНК можно получить путем программирования синтезатора ДНК — аппарата, который химически синтезирует ДНК любой желаемой последовательности (описан в главе 8). Например, существует 4^{11} , или приблизительно 4,2 миллиона, возможных нуклеотидных последовательностей для фрагмента ДНК из 11 нуклеотидов. Затем двухцепочечные фрагменты ДНК, которые прочно связываются с регуляторным белком, отделяют от не связавшихся с белком фрагментов ДНК. Один из методов, который может быть использован для такого разделения, — это метод сдвига электрофоретической подвижности, как показано на рис. 7.27. После отделения комплексов ДНК–белок от свободной ДНК связанные с белком фрагменты ДНК отделяют от белков и используют обычно еще в нескольких дополнительных циклах того же самого процесса отбора (не показано). Нуклеотидные последовательности тех фрагментов ДНК, которые остаются после многочисленных циклов связывания и разделения, можно определить и построить распознаваемую данным белком консенсусную последовательность ДНК.



этой модифицированной матрицей заполняют колонку, которая селективно связывает белки, узнающие определенные последовательности ДНК (рис. 7.28). Этот относительно нетрудоемкий метод позволяет добиться 10000-кратной очистки.

Большинство регуляторных белков присутствует в клетке в очень маленьких концентрациях, но используя аффинную хроматографию, обычно можно выделить такие количества чистого белка, которых будет достаточно для того, чтобы определить масс-спектроскопией или другими методами (описаны в главе 8) его частичную аминокислотную последовательность. Если известна полная последовательность генома организма, то частичная аминокислотная последовательность может быть использована для идентификации гена. А ген предоставляет не только информацию о полной аминокислотной последовательности белка, но также и возможность его синтеза в неограниченных количествах методами генной инженерии, которые рассмотрены в главе 8.

последовательности ДНК пяти близкородственных видов дрожжей

```

1 --- TGA TGACAGTCTTAATAATCATCTGCAAC --- TCTTGAAGATCTTGCTTTATAGATGCAAAAATTACGGTACGCTTTTCCASCTATAATAAATATGATGTTGTCSAAT
2 --- СААСGGTAGTTTCGAGGTGСАТАААТ --- ССGGTGGА - СТGGССТТАААGTTAGAACTCCCACTTCACTTCCT - TC - - АТTG - ТАГТСТGTCTTATC
3 TCTTTGAGGCAGTCTTGATACCGGTGТААААС --- ССАСGGGTCTAGCTCТАGACTCAAAAT - АСGTCCACTTTCCССТGHTATGATGTTGTTGTCGAT
4 --- САААСТGATCC AGAAGCACTCTGATTCACCTTTGATACCAATCGATCTCAATCAAAATGGCCCTGAACTTG - АТ - - - АТА - TGATGTTTGCСССТ
5 --- ТААТАСТGATCCСАТАGGTCTCTAA - САССGGCACT - CTGGCCTTATGATGTAAGAACTTAACTGAACTTTT - АТТGТАТА - ТААСССТАТGТATТ

[ сайт связывания регуляторного белка ]

1 GTGATGAGTGAATGCTCTCCCTGTACCCGGTТ - TTCAITGTTCAATTTGTTTTCAGGCTCTAA - ATGTTTGTGATGCAATATTTAAACAAGGAGAAACAGAAA - -
2 АААСТССТААТСААТCTTGAACCCGGCTGGCTGCTGAGATGTTGTTTCACTTTTAGTAAGATGCAAGTCAAAAGTCAAGCAGTACGGGACA
3 GTC - - - CGTAGAGCACTCTCTGTTACCCGGATATCTCTGTTATCTTCTGTTTAAAGCTTTAA - АААТАTGATGCAATATTTAAACAAGCAGTACAGGAA - -
4 АТСGТАСАГААТТАТGG - АТТАСССGGCCGACCCCTTTTTCGGTGTCTCAAGCTTCAA - ААААСТGATGCAATTTTAAACAAGTGGTATATA - - - -
5 GGCАААААТАТАТТТТСGTTACCCGAAACCAGCTTTTAAATGATCTGTTTCAAG - - - - - - - - - - TSAATGCAATCTTAAACAAGCAATACATAGA - -

1 --- TGTTTTGTGACAGCACCTGTCAATTTT - TAGGATAGTAGCAATCGCAAC - - - - GTTCTCAATAAATGTCТААГА - - - -
2 СТСТGCTCTATAGTAGCACCTTCTAACTTCAATGAGAAACAATAAAGACAGAA - - - - CТАCTTACAGCTCTAGCA - - - -
3 --- TGTTTTGTGATAGCACCTTCTCAGTTT - TGAATAACAGCAACCGCAGAC - - - - А - - - - САААСТCTTAAA - - - -
4 --- TGTCTACGATAGCACCTTGTGTTCTCGTGTGAATAACCCAAAGGAACAAGCTAGCCCCCCTCCCCACGACTCCAGC
5 --- TGTTTTGTGATAGCACCTTCAAGTTTTACTTGAATAAGGACAAAGAGAA - - - - CCGCCCGGACGCTCCCAAT - - - -

```

кодирующая
последовательность
гена

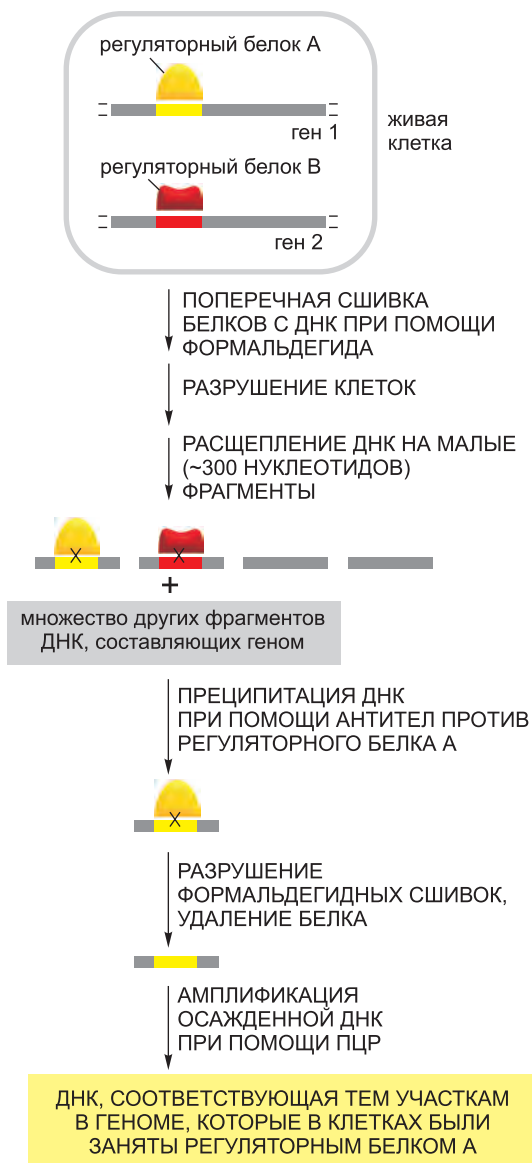
Рис. 7.31. Филогенетический футпринтинг. В этом примере сравниваются последовательности ДНК, расположенные слева от одного и того же гена, принадлежащие пяти близкородственным видам дрожжей; одинаковые нуклеотиды выделены *желтым* цветом. Филогенетический футпринтинг выявляет участки распознавания ДНК для регуляторных белков, так как эти участки являются более консервативными, чем окружающие их последовательности. В этом примере показана только область, расположенная левее отдельного гена, но этот подход обычно используют для анализа всего генома. Регуляторные белки, связывающиеся с участком, обведенным *красным*, показаны на рис. 7.21. В данном примере некоторые из более коротких филогенетических футпринтов представляют собой участки связывания дополнительных регуляторных белков, не все из которых идентифицированы. (Из M. Kellis et al., *Nature* 423: 241–254, 2003, с разрешения Macmillan Publishers Ltd., и D.J. Galgoczy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 18069–18074, 2004, с разрешения National Academy of Sciences.)

7.2.16. Распознаваемую регуляторным белком последовательность ДНК можно установить экспериментально

Обнаружить регуляторные белки можно и до того, как станет известна последовательность ДНК, которую они распознают. Например, множество гомеодоменных белков дрозофилы открыли при селекции мутаций, влияющих на развитие мухи, что позволило определить гены, кодирующие эти белки, а затем получить необходимые количества этих белков сверхэкспрессией в культуре клеток и легко их очистить. *Футпринтинг ДНК (DNA footprinting)* — это один из методов определения последовательностей ДНК, распознаваемых регуляторным белком, выделенным в чистом виде. В этом методе необходим также очищенный фрагмент двойной спирали ДНК, содержащий в себе участок, узнаваемый этим белком. Короткие последовательности, распознаваемые белком, могут случайно попадаться на любом длинном фрагменте ДНК, однако часто необходимо использовать ДНК, соответствующую регуляторной области гена, про который известно, что он находится под контролем интересующего белка. Футпринтинг ДНК основан на использовании нуклеаз или химических соединений, которые в случайном порядке разрезают ДНК по любой фосфодиэфирной связи. Связавшийся регуляторный белок препятствует действию нуклеаз на фосфодиэфирные связи, таким образом, точный участок узнавания белком выявляется в виде защищенной зоны, или футпринта — «отпечатка ноги» (рис. 7.29).

Для второго способа определения распознаваемой регуляторным белком последовательности ДНК не требуется предварительных данных о том, какие гены этот белок, быть может, регулирует. В данном случае очищенный белок используют для отбора из большого пула различных случайно созданных

Рис. 7.32. Иммунопреципитация хроматина. Этот метод позволяет определить в геноме все участки, занимаемые регуляторным белком *in vivo*. Амплификация ДНК методом цепной полимеразной реакции (ПЦР) представлена на рис. 8.45. Определить осажденные амплифицированные фрагменты ДНК можно путем гибридизации смеси фрагментов с ДНК-микрочипами, как описано в главе 8.



коротких фрагментов ДНК только тех, которые прочно с ним связываются. После нескольких циклов такого отбора определяют нуклеотидную последовательность прочно связавшихся с белком фрагментов ДНК, и тогда может быть сформулирована консенсусная последовательность ДНК, которую распознает данный регуляторный белок (рис. 7.30). Как только она становится известна, то при помощи автоматизированного поиска по геному можно определить вероятные гены, транскрипцию которых, возможно, контролирует интересующий регуляторный белок. Однако эту стратегию не стоит считать абсолютно надежной. Например, у многих организмов синтезируется ряд близкородственных регуляторных белков, которые распознают очень схожие последовательности ДНК, но данным методом их нельзя различить. В большинстве случаев полученные в ходе перебора геномных последовательностей

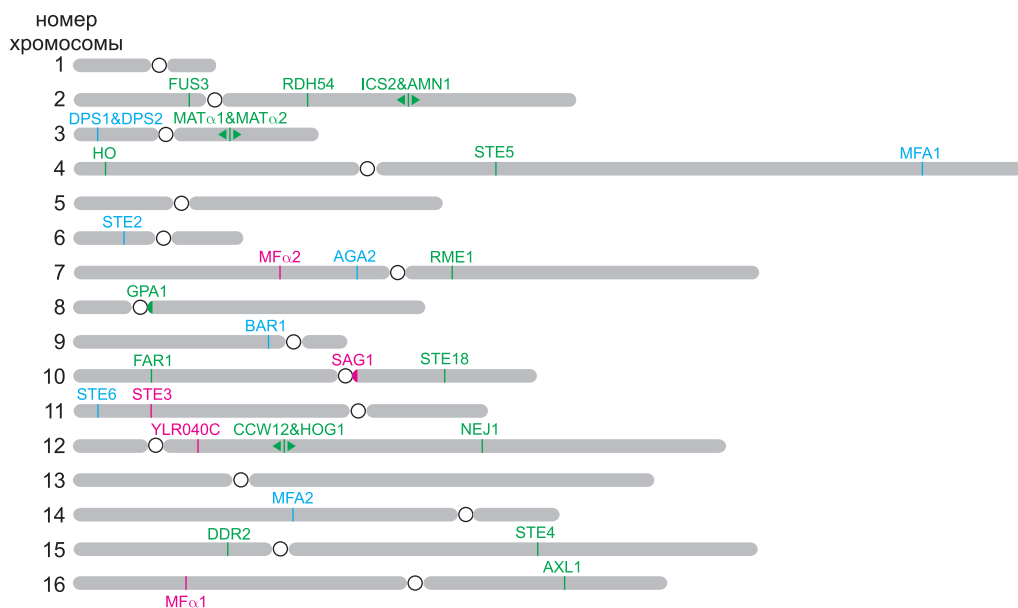


Рис. 7.33. Регуляторная сеть: полный набор генов, контролируемых тремя ключевыми регуляторными белками у почкующихся дрожжей, как было установлено по участкам ДНК, с которыми эти белки связывались. Регуляторные белки, именуемые Msc1, Msc2, Msc3, характеризуют два различных гаплоидных типа спаривания (аналогичных мужским и женским гаметам) этого одноклеточного организма. Показаны 16 хромосом генома дрожжей (серые) с цветными полосами, обозначающими участки, где связываются различные комбинации трех регуляторных белков. Над каждым участком связывания указано название белкового продукта регулируемого гена. Msc1, действующий в комплексе с другим белком, Msc2, активизирует экспрессию генов, отмеченных красным цветом; Msc2, действующий в комплексе с Msc1, подавляет гены, отмеченные голубым цветом; Msc1 в комплексе с Msc2 подавляет гены, отмеченные зеленым цветом (см. рис. 7.21 и 7.65). Двойные стрелки обозначают дивергентно транскрибируемые гены, которые контролируются указанными регуляторными белками. Эта полная карта связывания регуляторных белков была получена с помощью сочетания методов иммунопреципитации хроматина (см. рис. 7.32) и филогенетического футпринтинга (см. рис. 7.29), проведенных в пределах генома. Подобное определение полных регуляторных сетей показывает, что эти сети не обязательно являются крайне сложными, хотя первоначально могут казаться таковыми. Подобный тип исследований также помогает выявить общую логику транскрипционных сетей, используемую в современных клетках. (Из J. Galgoczy et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101: 18069–18074, 2004. С разрешения National Academy of Sciences.)

предполагаемые участки действия регуляторных белков должны в конечном итоге проходить экспериментальную проверку.

7.2.17. Регуляторные последовательности ДНК определяют, используя сравнительную геномику, методом филогенетического футпринтинга

Широкая доступность полных последовательностей генома предоставляет удивительно простой метод определения важных регуляторных участков ДНК, даже если регуляторный белок, который с ними связывается, неизвестен. Этот метод заключается в сравнении геномов нескольких близкородственных видов. Если виды правильно подобраны, то кодирующие белки части генома будут очень схожими, но области между последовательностями, кодирующими белки или молекулы РНК, будут значительно различаться, так как большинство этих последовательностей не являются функционально важными и поэтому изменяются в ходе эволюции. Среди исключений находятся регуляторные последовательности, которые контролируют транскрипцию генов. Они выступают как консервативные островки в океане неконсервативных нуклеотидов (рис. 7.31). Хотя идентификацию регуляторных белков, распознающих консервативные последовательности ДНК, следует проводить другими способами, тем не менее филогенетический футпринтинг является мощным методом определения многих последовательностей ДНК, контролирующей экспрессию генов.

7.2.18. Методом иммунопреципитации хроматина определяют многие участки ДНК, занимаемые регуляторными белками в живых клетках

В определенный момент времени регуляторный белок не будет занимать в геноме все возможные для него участки связывания на ДНК. При некоторых обстоятельствах белок может быть не синтезирован и поэтому его не будет в клетке; он может быть в клетке, но у него не будет партнера для образования гетеродимера; или он не сможет попасть в ядро, пока не поступит соответствующий сигнал из окружающей среды клетки. Даже если регуляторный белок присутствует в ядре и способен связываться с ДНК, компоненты хроматина или другие регуляторные белки, которые могут связываться с теми же последовательностями ДНК или последовательностями, перекрывающими их, могут закрывать многие из его возможных участков связывания на ДНК.

Имунопреципитация хроматина (chromatin immunoprecipitation, ChIP) служит эмпирическим способом определения участков ДНК, которые при определенном наборе условий занимает заданный регуляторный белок (рис. 7.32). Метод заключается в следующем: в живых клетках белки ковалентно сшиваются с ДНК, клетки разрушают, а ДНК механически дробят на мелкие фрагменты и затем используют антитела против заданного регуляторного белка — чтобы очистить ДНК, с которой ковалентно сшился этот белок в клетке. Если провести гибридизацию этой ДНК с микрочипами, содержащими весь геном, в виде серии отдельных фрагментов ДНК (см. рис. 8.73), то можно точно идентифицировать местоположение каждого «осажденного» фрагмента ДНК в составе генома (этот метод называется ChIP-chip — *прим.ред.*). Таким образом все участки, занятые регуляторным белком в исходных клетках, могут быть отмечены на генетической карте генома клетки

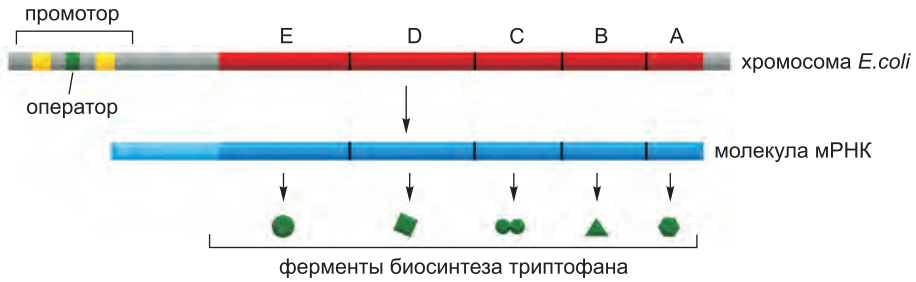


Рис. 7.34. Кластер генов *E. coli*, который кодирует ферменты для синтеза аминокислоты триптофана. Эти пять генов триптофанового оперона (*Trp*-оперон), обозначенные как *TrpA*, *B*, *C*, *D* и *E*, транскрибируются как одна молекула мРНК, что позволяет контролировать их экспрессию совместно. Кластеры генов, транскрибируемых как одна молекула мРНК, типичны для бактерий. Каждый такой кластер называется опероном.

(рис. 7.33). (Развитие в последние годы высокопроизводительного секвенирования следующего поколения — next generation sequencing — позволяет проводить прямое секвенирование фрагментов ДНК, связанных с исследуемым белком. Этот метод называется ChIP-seq — прим.ред.)

Имунопреципитацию хроматина также часто применяют для локализации в геноме тех участков, укладка которых производилась различными типами модифицированных гистонов (описано в главе 4). В данном случае применяются антитела,

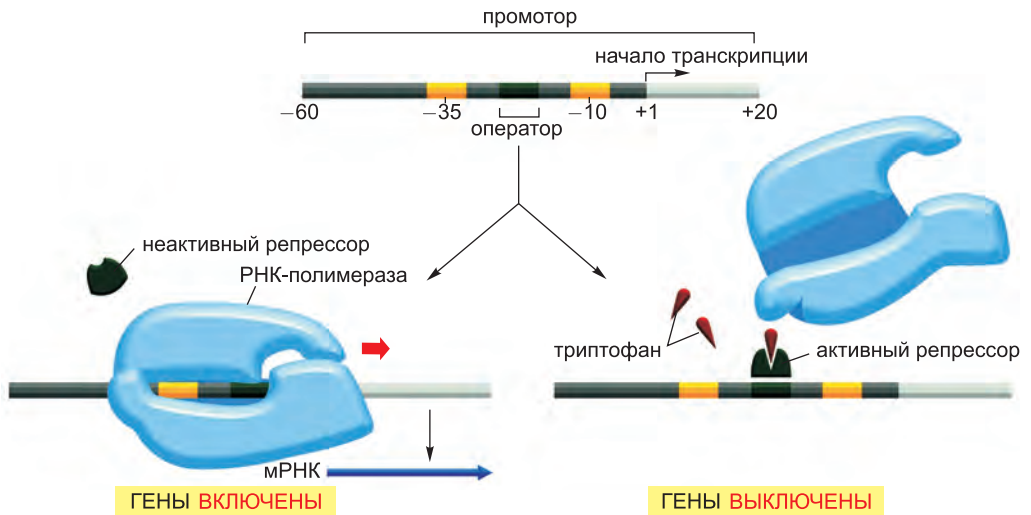


Рис. 7.35. Включение и выключение триптофановых генов. Если внутриклеточная концентрация триптофана низкая, то РНК-полимераза связывается с промотором и транскрибирует пять генов триптофанового оперона (*Trp*-оперона). Однако если концентрация триптофана высокая, то активируется триптофановый репрессор, который связывается с оператором и тем самым блокирует присоединение РНК-полимеразы к промотору. Когда концентрация внутриклеточного триптофана снижается, репрессор освобождается от триптофана и становится неактивным, что позволяет полимеразе начать транскрибировать эти гены. Промотор содержит два ключевых блока информации о последовательности ДНК: области последовательностей -35 и -10, выделенные желтым (см. рис. 6.12).

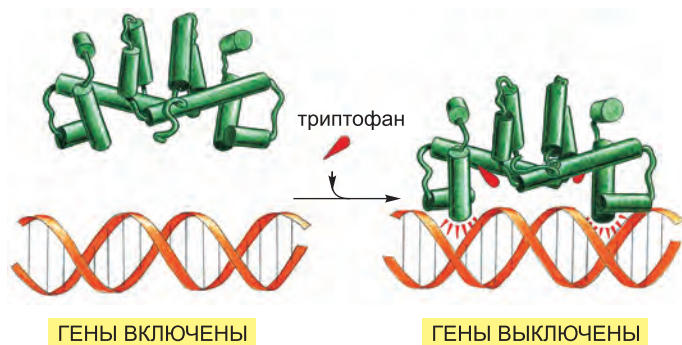


Рис. 7.36. Соединение триптофана с белком-репрессором триптофанового оперона изменяет конформацию репрессора. Конформационное изменение дает возможность этому регуляторному белку тесно связываться со специфической последовательностью ДНК (оператором) и, таким образом, блокировать транскрипцию генов, которые кодируют белки, необходимые для синтеза триптофана (*Trp*-оперон). Трехмерная структура этого бактериального белка, содержащего мотив спираль-виток-спираль, определена с помощью метода дифракции рентгеновских лучей и показана как в случае связывания триптофана, так и без него. Связывание триптофана приводит к увеличению расстояния между двумя узнающими спиральями в гомодимере, что позволяет репрессору плотно садиться на оператор. (Адаптировано из R. Zhang et al., *Nature* 327: 591–597, 1987. С разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

специфичные к определенной, интересующей модификации гистонов.

Заключение

Белки, регулирующие транскрипцию генов, распознают короткие отрезки двойной спирали ДНК, имеющие специфическую последовательность, и при этом определяют, какой из тысячи генов в клетке будет транскрибирован. Для широкого круга организмов определены тысячи регуляторных белков. Каждый из этих белков обладает своими уникальными чертами, но большинство связываются с ДНК в виде гомодимеров или гетеродимеров и распознают ДНК с помощью одного из небольшого числа структурных мотивов. Обычно встречаются мотивы спираль-виток-спираль, гомеодомен, «лейциновая молния», спираль-петля-спираль и нескольких видов «цинковых пальцев». Точная аминокислотная последовательность, составляющая мотив, определяет распознаваемую регуляторным белком специфическую последовательность ДНК. Гетеродимеризация увеличивает диапазон распознаваемых последовательностей ДНК. В настоящее время доступны мощные методы для идентификации и выделения этих белков, генов, которые их кодируют, и распознаваемых ими последовательностей ДНК, а также для картирования всех генов, которые эти белки регулируют в геноме.

7.3. Как работают генетические переключатели

В предыдущей части описаны основные компоненты генетических переключателей: регуляторные белки генов и специфические последовательности ДНК, которые эти белки распознают. Сейчас мы рассмотрим, как работают эти компоненты, включая и выключая гены в ответ на разнообразные сигналы.

В середине XX века идея о том, что гены можно включать и выключать, была революционной. Это представление стало главным прорывом в нашем понимании механизмов регуляции генов, а первоначально возникло при изучении адаптации бактерий *E. coli* к изменениям состава питательной среды. Параллельные исследования бактериофага лямбда привели ко множеству аналогичных выводов и помогли установить лежащий в основе этого механизм. Многие из этих же принципов применимы и к эукариотическим клеткам. Однако невероятная сложность регуляции генов у высших организмов, наряду с упаковкой их ДНК в хроматин создает определенные проблемы и предоставляет некоторые совершенно новые возможности для регуляции, как мы увидим далее. Начнем с простейшего примера: включение и выключение генов у бактерий в ответ на единственный сигнал.

7.3.1. Триптофановый репрессор является простым генетическим переключателем, включающим и выключающим гены бактерий

Хромосома бактерии *E. coli* — одноклеточного организма, состоит из единственной кольцевой молекулы ДНК, насчитывающей $4,6 \times 10^6$ нуклеотидных пар. Эта ДНК кодирует примерно 4300 белков, однако в конкретный момент времени в клетке синтезируется лишь часть этих белков. Экспрессия многих генов регулируется в соответствии с доступностью питательных веществ в среде, что показано

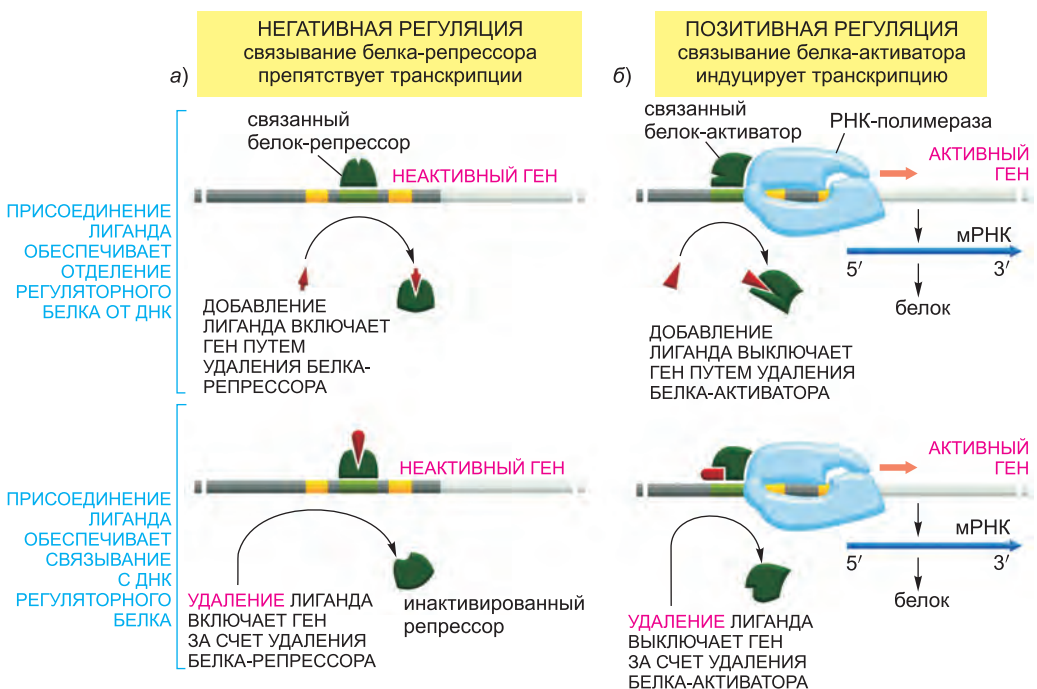


Рис. 7.37. Обобщенная схема различных механизмов, с помощью которых специфические регуляторные белки контролируют транскрипцию генов прокариотов. а) Негативная регуляция; б) позитивная регуляция. Обратите внимание, что «индуцирующий» лиганд может включить ген, либо обеспечивая удаление белка-репрессора (слева сверху), либо способствуя связыванию белка-активатора с ДНК (справа внизу). Аналогичным образом «ингибирующий» лиганд может выключить ген как путем удаления белка-активатора (справа сверху), так и путем связывания белка-репрессора с ДНК (слева снизу).

на примере пяти генов *E. coli*, кодирующих ферменты, необходимые для синтеза аминокислоты триптофана. Эти гены организованы в один **оперон (operon)**, то есть расположены рядом друг с другом и транскрибируются с одного *промотора (promoter)* как одна длинная молекула РНК (рис. 7.34). Однако если в питательной среде присутствует триптофан и он поступает в клетку (например, если бактерия находится в кишечнике млекопитающего, которое только что съело белковую пищу), то клетке больше не требуются эти ферменты — и их синтез выключается.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе такого переключения, достаточно хорошо изучены. Как описано в главе 6, промотор является специфической последовательностью ДНК, которая направляет действия РНК-полимеразы на связывание с ДНК, разворачивание двойной спирали и начало синтеза молекулы РНК. Промотор, который направляет транскрипцию генов биосинтеза триптофана, содержит регуляторный элемент, называемый **оператором (operator)**; см. рис. 7.34). Он представляет собой просто короткий участок регуляторной ДНК заданной нуклеотидной последовательности, которая распознается белком-репрессором, в данном случае **триптофановым репрессором (tryptophan repressor)** — членом семейства белков, содержащих мотив спираль-виток-спираль (см. рис. 7.11). Промотор и оператор расположены таким образом, что когда триптофановый репрессор занимает оператор, то он блокирует РНК-полимеразе доступ к промотору и тем самым препятствует экспрессии ферментов, синтезирующих триптофан (рис. 7.35).

Регуляция блокировки экспрессии генов осуществляется оригинальным способом: чтобы белок-репрессор мог присоединиться к ДНК, с ним должны быть связаны две молекулы триптофана. Как показано на рис. 7.36, связывание с триптофаном изменяет наклон мотива спираль-виток-спираль в репрессоре, вследствие чего он надлежащим образом входит в большую бороздку ДНК; без триптофана мотив разворачивается внутрь и белок не может связаться с оператором. Таким образом, триптофановый репрессор и оператор представляют собой простой механизм, включающий и выключающий производство ферментов биосинтеза триптофана в зависимости от наличия свободного триптофана.

Поскольку активная, связывающаяся с ДНК форма белка служит для выключения генов, этот способ регуляции генов называется **негативной регуляцией (negative**

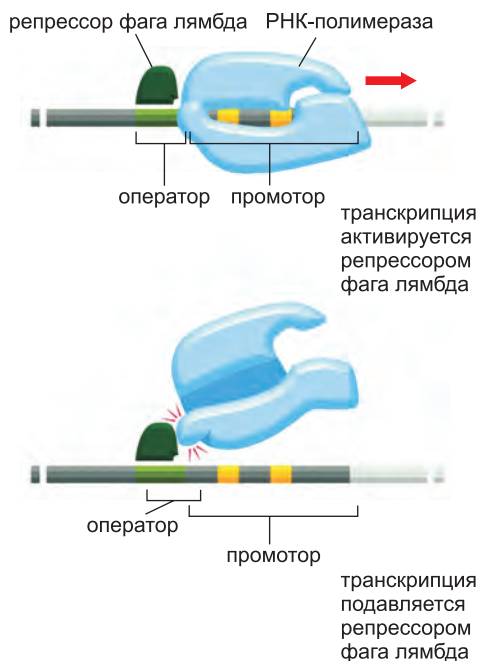


Рис. 7.38. Некоторые регуляторные белки бактерий могут выступать в роли как активаторов, так и репрессоров транскрипции в зависимости от точного расположения их участков связывания с ДНК. В качестве примера рассмотрим репрессор бактериофага лямбда. Для некоторых генов белок действует как активатор транскрипции, обеспечивая благоприятный контакт для РНК-полимеразы (вверху). У других генов (внизу) оператор расположен на одну пару оснований ближе к промотору, и, вместо того чтобы помогать полимеразе, этот же белок — репрессор в данном случае — конкурирует с ней за связывание с ДНК. Репрессор фага лямбда распознает свой оператор с помощью мотива спираль-виток-спираль, как показано на рис. 7.11.

control), и регуляторные белки, которые в нем участвуют, называются *репрессорами транскрипции* (*transcriptional repressors*) или *белками-репрессорами* (*gene repressor proteins*).

7.3.2. Активаторы транскрипции включают гены

В главе 6 описано, что очищенная РНК-полимераза *E. coli* (включая ее σ -субъединицу) может связываться с промотором и инициировать транскрип-

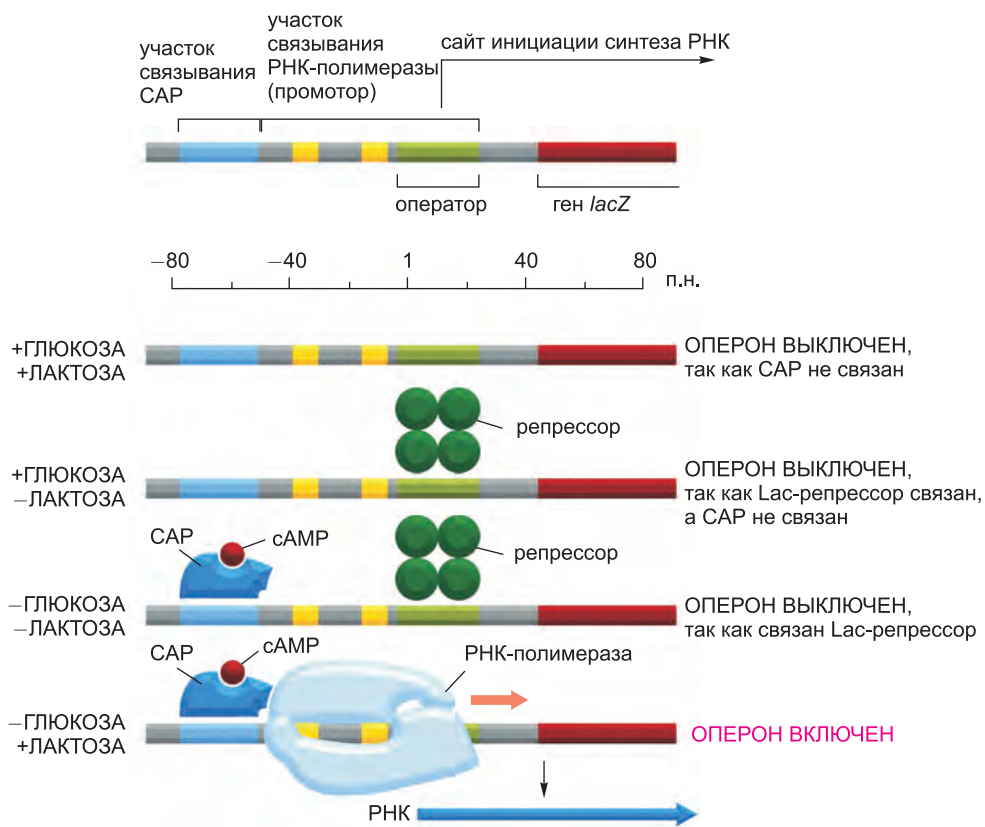


Рис. 7.39. Двойной контроль лактозного оперона. Концентрации глюкозы и лактозы контролируют инициацию транскрипции *Lac*-оперона, воздействуя соответственно на CAP и Лас-репрессор. Первый ген *Lac*-оперона, *LacZ*, кодирует фермент β -галактозидазу, которая расщепляет лактозу на галактозу и глюкозу. При добавлении лактозы происходит увеличение концентрации аллолактозы, изомера лактозы, которая связывается с Лас-репрессором и вызывает его отсоединение от ДНК. Добавление глюкозы приводит к уменьшению концентрации цикло-АМР (сАМР), и, поскольку сАМР больше не связан с CAP, этот белок-активатор отделяется от ДНК, выключая оперон.

На рисунке обобщены основные черты *Lac*-оперона, но в действительности ситуация намного сложнее. Существует несколько участков связывания Лас-репрессора, расположенных в различных местах ДНК. Приведенный участок связывания оказывает наибольшее воздействие, но для полного подавления экспрессии необходимы и другие сайты (см. рис. 7.40). Кроме того, экспрессия *Lac*-оперона никогда полностью не выключается. Требуется очень небольшое количество фермента β -галактозидазы для превращения лактозы в аллолактозу, что позволяет тем самым инактивировать Лас-репрессор при добавлении лактозы в питательную среду.

цию ДНК. Однако многие бактериальные промоторы только в незначительной степени функциональны сами по себе, поскольку либо они плохо распознаются РНК-полимеразой, либо полимеразе сложно развернуть спираль ДНК и начать транскрипцию. В любом случае этим плохо функционирующим промоторам могут помочь регуляторные белки, которые связываются с соседним участком ДНК и контактируют с РНК-полимеразой таким образом, что значительно увеличивают вероятность инициации транскрипции. Поскольку активная, связывающаяся с ДНК форма таких белков включает гены, этот метод регуляции генов называется **позитивной регуляцией (positive control)**, и регуляторные белки, которые действуют подобным образом, известны как *активаторы транскрипции (transcriptional activators)*, или *белки-активаторы генов (gene activator proteins)*. В некоторых случаях бактериальные белки-активаторы помогают РНК-полимеразе связаться с промотором путем предоставления дополнительной поверхности для контакта. В других случаях они контактируют с РНК-полимеразой и способствуют ее переходу из первоначальной ДНК-связывающей конформации в активную транскрибирующую форму посредством стабилизации переходного состояния фермента. Как и репрессоры, белки-активаторы генов должны быть связаны с ДНК, чтобы реализовывать присущую им активность. Таким образом, каждый регуляторный белок действует избирательно, контролируя только те гены, которые содержат распознаваемую им последовательность ДНК.

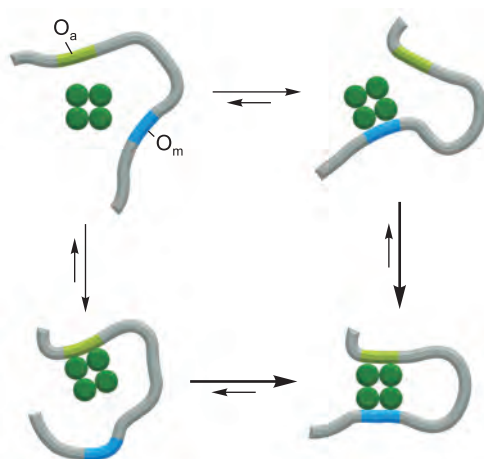


Рис. 7.40. Петлеобразование ДНК может стабилизировать взаимодействия белок—ДНК. Репрессор *Lac*-оперона представляет собой тетрамер, который может одновременно связываться с двумя операторами. Лактозный оперон имеет в общей сложности три оператора, но для простоты здесь показаны только два: основной оператор (O_m) и дополнительный оператор (O_a). На рисунке изображены все возможные состояния *Lac*-репрессора, связанного с этими двумя операторами. При заданных концентрациях репрессора в клетке и при отсутствии лактозы самым стабильным будет состояние, изображенное снизу справа; и чтобы полностью отсоединиться от ДНК, *Lac*-репрессор должен сначала пройти через переходное состояние, где он связан только с одним оператором. В этих состояниях локальная концентрация *Lac*-репрессора очень высока по отношению к свободному оператору, и реакция смещается в сторону образования двусвязной формы белка, а не его диссоциации. Таким образом, даже участки с низким сродством (O_a) могут увеличивать заполняемость высокоаффинных участков (O_m) и усиливать репрессию генов в клетке. (Адаптировано из J. M. G. Vilar and S. Leibler, *J. Mol. Biol.* 331: 981–989, 2003. С разрешения Academic Press.)

Связанные с ДНК белки-активаторы могут увеличивать интенсивность инициации транскрипции в 1000 раз — величина, отвечающая относительно слабым и неспецифическими взаимодействиям между активатором и РНК-полимеразой. Например, изменение сродства РНК-полимеразы к ее промотору в 1000 раз соответствует изменению ΔG на 4 ккал/моль, что отвечает появлению только нескольких слабых, нековалентных связей. Таким образом, белки-активаторы генов могут просто обеспечивать несколько благоприятных взаимодействий, которые помогают привлечь РНК-полимеразу к промотору.

Как и при негативном контроле, осуществляемом репрессорами, активаторы транскрипции могут действовать и как часть простого генетического переключателя. Например, бактериальный белок *CAP* (*catabolite activator protein*; *белок-активатор катаболизма*) активирует гены, которые дают возможность *E. coli* использовать альтернативные источники углерода, когда предпочитаемый ею источник углерода — глюкоза, не доступен. Падение уровня глюкозы вызывает возрастание концентрации циклического АМР — внутриклеточной сигнальной молекулы, которая связывается с *CAP*, что позволяет ему присоединиться к специфической последовательности ДНК вблизи целевых промоторов и, следовательно, включить соответствующие гены. Таким образом, включение и выключение экспрессии целевого гена зависит от концентрации в клетке циклического АМР: включается при высокой, выключается при низкой. На **рис. 7.37** обобщены различные способы использования позитивной и негативной регуляции экспрессии генов.

Активаторы и репрессоры транскрипции имеют сходную структуру. Например, триптофановый репрессор и активатор транскрипции *CAP* содержат мотив спираль-виток-спираль (см. рис. 7.11) и для их связывания с ДНК необходим низкомолекулярный кофактор. Фактически некоторые бактериальные белки, включая *CAP* и репрессор бактериофага лямбда, могут действовать и как активаторы, и как репрессоры в зависимости от конкретного местоположения распознаваемой ими последовательности ДНК относительно промотора: если участок связывания белка перекрывает промотор, то полимеразы не может связаться, и белок действует как репрессор (**рис. 7.38**).

7.3.3. Лактозный оперон контролируется активаторами и репрессорами транскрипции

Более сложные типы генетических переключателей сочетают позитивный и негативный виды контроля. Например, лактозный оперон (*Lac-оперон*; *Lac operon*) *E. coli*, в отличие от *Trp*-оперона, находится под обоими: отрицательным и положительным, механизмами регуляции транскрипции, которые реализуются соответственно белком-репрессором *Lac*-оперона и *CAP*. В *Lac*-опероне закодированы белки, необходимые для транспорта дисахарида лактозы внутрь клетки и его расщепления. Как мы уже знаем, *CAP* позволяет бактериям при отсутствии глюкозы использовать альтернативные источники углерода, как например, лактозу. Однако было бы нерационально для *CAP* индуцировать экспрессию *Lac*-оперона, если лактозы нет в наличии, — и *Lac*-репрессор гарантирует, что при отсутствии лактозы *Lac*-оперон выключен. Подобный механизм дает возможность регуляторной области *Lac*-оперона объединять и реагировать на два разных сигнала, так что эффективная экспрессия оперона происходит только при выполнении двух условий: наличие лактозы и отсутствие глюкозы. При любых других из трех возможных сигнальных

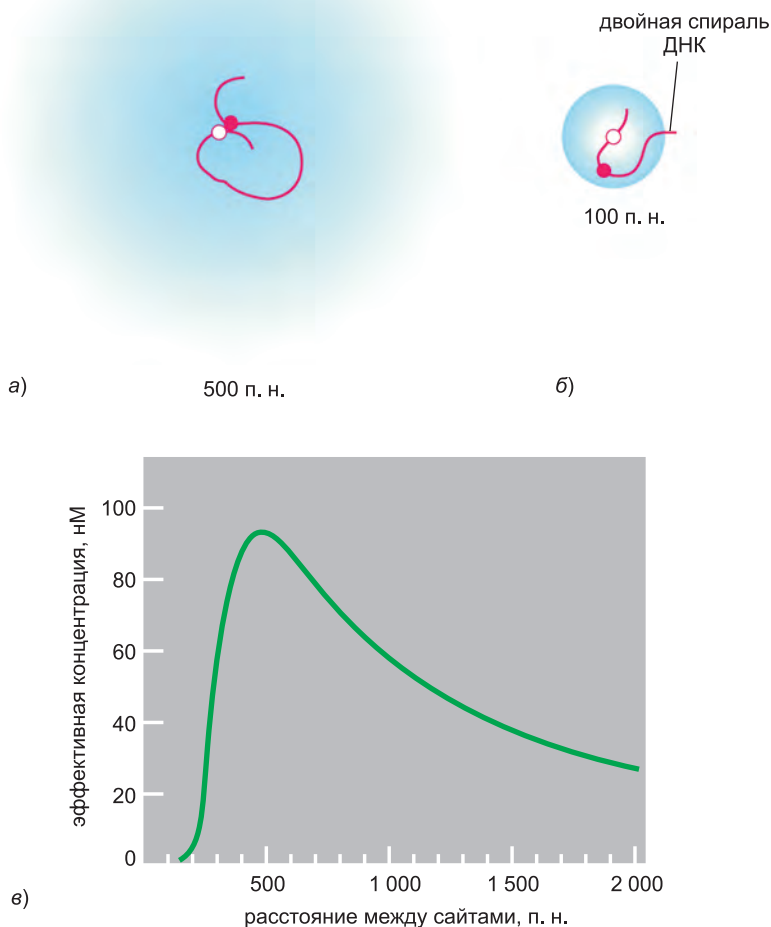


Рис. 7.41. Присоединение двух белков к отдельным участкам двойной спирали ДНК может в значительной мере повысить вероятность их взаимодействия. а) Разделение двух белков петлей ДНК размером 500 нуклеотидных пар повышает частоту столкновений этих белков. Интенсивность голубого окрашивания в каждой из точек пространства отражает вероятность того, что красный белок будет располагаться на данном расстоянии от белого белка. б) Гибкость ДНК такова, что типичная последовательность может образовать плавный изгиб под углом 90° (изогнутый виток) на участке длиной примерно 200 нуклеотидных пар. Следовательно, если два белка разделены всего лишь 100 нуклеотидными парами, вероятность образования контакта между ними невелика. В таких случаях взаимодействие белков облегчается, если их участки связывания находятся друг от друга на расстоянии, кратном 10 нуклеотидным парам, — тогда оба белка располагаются на одной и той же стороне спирали ДНК (содержащей около 10 нуклеотидов на виток) и, таким образом, внутри петли ДНК, где они могут лучше всего достать друг до друга. в) Теоретическая эффективная концентрация красного белка на участке связывания белого белка как функция разделяющего их расстояния. Согласно опытам, на малых расстояниях реальная эффективная концентрация превышает вычисленную здесь. (в — с любезного разрешения Gregory Bellomy, с изменениями из M. C. Mossing and M. T. Record, *Science* 233: 889–892, 1986. С разрешения AAAS.)

комбинаций кластер генов остается в выключенном состоянии (рис. 7.39).

Простой принцип действия этого генетического переключателя впервые привлек внимание биологов 50 лет назад. Как объяснялось выше, молекулярная основа механизма действия переключателя была выяснена при помощи комбинации методов генетики и биохимии, что дало первые представления о том, как регулируется экспрессия генов.

7.3.4. При регуляции экспрессии бактериальных генов происходит петлеобразование ДНК

Контроль *Lac*-оперона, показанный на рис. 7.39, кажется простым и экономичным, но продолжающееся изучение этого и других примеров генной регуляции у бактерий выявило новую особенность регуляции генов, известную как *петлеобразование ДНК (DNA looping)*. Первоначально считалось, что *Lac*-оперон содержит только один оператор, но в последующих работах был обнаружен дополнительный, второй оператор, расположенный вблизи. Одна тетрамерная молекула *Lac*-репрессора может связывать одновременно сразу два оператора, при этом ДНК между ними образует петлю. Способность одновременно связывать два оператора усиливает общее взаимодействие репрессора с ДНК и, таким образом, приводит к возрастанию уровня репрессии в клетке (рис. 7.40).

Петлеобразование ДНК позволяет также быстро установить контакт между двумя разными белками, связавшимися вдоль двойной спирали ДНК. ДНК можно представить в виде «привязи», помогающей одному связавшемуся с ДНК белку взаимодействовать с другим, несмотря на тысячи нуклеотидных пар, которые могут

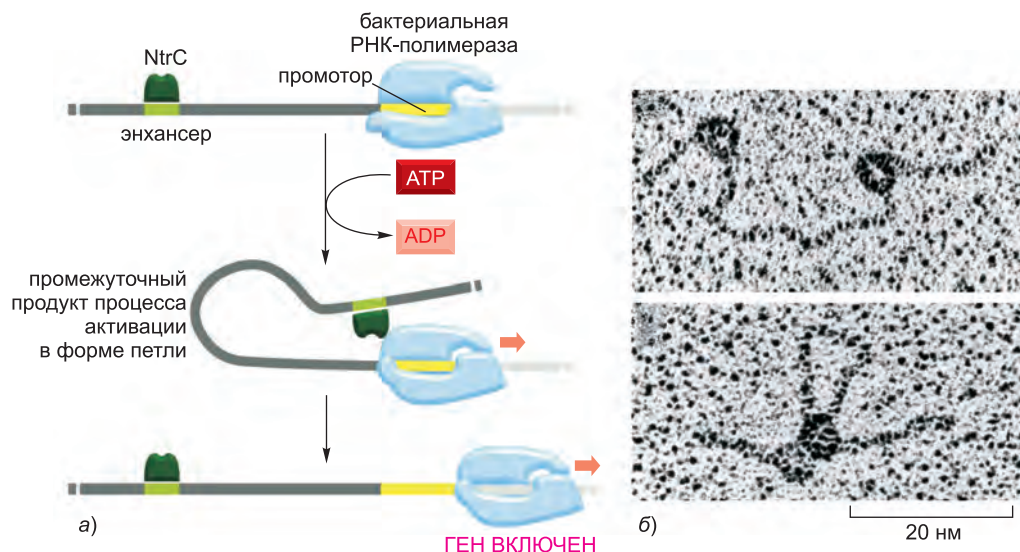


Рис. 7.42. Активация генов на расстоянии. а) Белок NtrC является бактериальным регуляторным белком, который активирует транскрипцию, напрямую контактируя с РНК-полимеразой и вызывая ее переход из исходной связанной с ДНК формы в форму, способную к проведению транскрипции (описано в главе 6). Как здесь показано, для стимулируемого NtrC перехода необходима энергия гидролиза АТФ, хотя это не типично для инициации транскрипции у бактерий. б) Взаимодействие NtrC и РНК-полимеразы, а также петлю ДНК, выступающую между ними, можно рассмотреть в электронный микроскоп. (б — с любезного разрешения Harrison Echols and Sydney Kustu.)

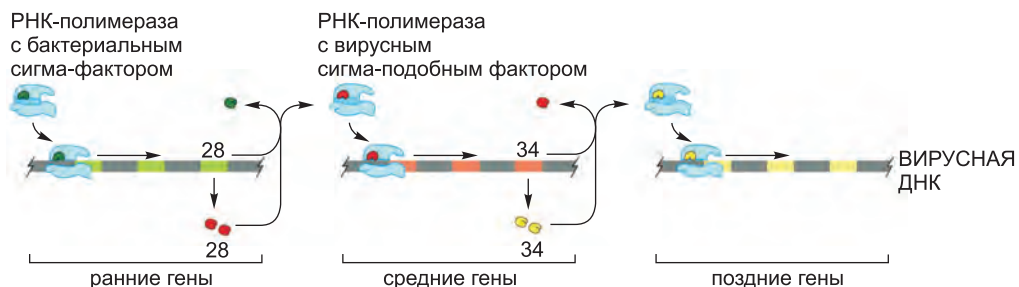


Рис. 7.43. Взаимозаменяемые субъединицы РНК-полимеразы как стратегия контроля экспрессии генов у бактериофага. Бактериальный вирус SPO1, который заражает бактерию *B. subtilis*, использует полимеразу бактерий для транскрипции своих ранних генов сразу после того, как вирусная ДНК попадает в клетку. Один из ранних генов, именуемый 28, кодирует сигма-подобный фактор, который связывается с РНК-полимеразой и вытесняет бактериальный сигма-фактор. Новая форма полимеразы специфически инициирует транскрипцию «средних» генов вируса SPO1. Один из средних генов кодирует второй сигма-подобный фактор, 34, который замещает продукт гена 28 и ориентирует РНК-полимеразу на транскрипцию «поздних» генов. На основе этого последнего набора генов синтезируются белки, которые укладывают хромосому вируса в вирусную оболочку и лизируют клетку. При данной стратегии наборы вирусных генов экспрессируются в порядке своей необходимости, что гарантирует быструю и эффективную репликацию вируса.

разделять участки их связывания (рис. 7.41). Далее будет видно, что петлеобразование ДНК особенно важно при регуляции генов эукариот, хотя и играет ключевую роль во многих других случаях регуляции бактериальных генов — не только в *Lac*-опероне. Например, петлеобразование ДНК позволяет белку-активатору NtrC без труда напрямую контактировать с РНК-полимеразой, несмотря на то что два этих белка связываются с ДНК на расстоянии в несколько сотен пар нуклеотидов друг от друга (рис. 7.42).

7.3.5. Бактерии используют взаимозаменяемые субъединицы РНК-полимеразы для облегчения регуляции транскрипции генов

Мы уже отмечали значимость регуляторных белков, связывающихся с ДНК и подающих сигналы РНК-полимеразе о том, начинать ли синтез цепи РНК или нет. Это один из главных способов, с помощью которого эукариоты и прокариоты контролируют инициацию транскрипции; однако некоторые бактерии и их вирусы применяют еще одну стратегию, основанную на использовании взаимозаменяемых субъединиц РНК-полимеразы. Как описано в главе 6, сигма-субъединица (σ -субъединица) необходима бактериальной РНК-полимеразе для распознавания промотора. Большинство бактерий синтезируют целый ряд сигма-субъединиц, каждая из которых может взаимодействовать с основной частью РНК-полимеразы (кор-ферментом) и направлять ее к различным группам промоторов (таблица 7.2). Эта схема позволяет выключать один большой набор генов и включать новый набор генов путем простой замены одной сигма-субъединицы на другую. Эта стратегия эффективна, поскольку исключает необходимость заниматься каждым геном поочередно. Действительно, некоторые бактерии кодируют до сотни различных сигма-субъединиц и, следовательно, во многом зависят от такой формы регуляции

генов. Вирусы бактерий часто пользуются этим, чтобы завладеть полимеразой клетки-хозяина и быстро и последовательно активировать несколько наборов вирусных генов (рис. 7.43).

7.3.6. Сложные генные переключатели эволюционировали, чтобы контролировать транскрипцию генов эукариот

Принципы регуляции генов бактерий и эукариот во многом одинаковы, включая ключевую роль регуляторных белков, прочно связывающихся с короткими участками ДНК, важность слабых белок-белковых взаимодействий в активации генов, а также гибкость, возможную благодаря петлеобразованию ДНК. Однако по сравнению с прокариотами в регуляции генов эукариот участвуют намного больше белков и более

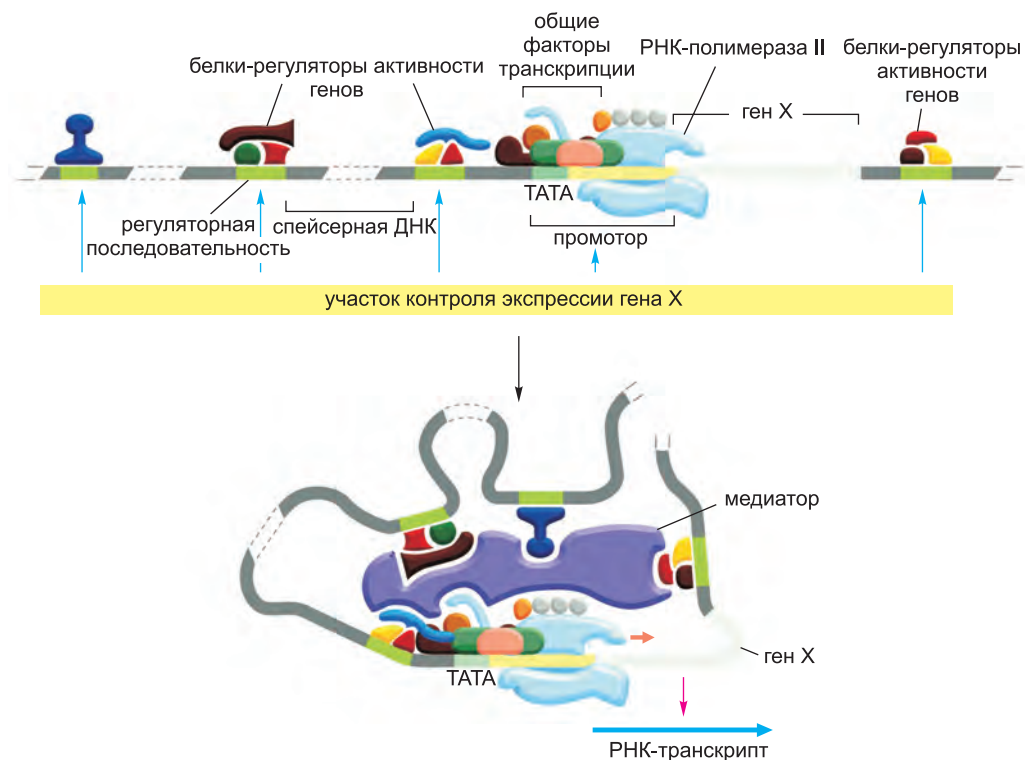


Рис. 7.44. Контролирующая область типичного эукариотического гена. Промотор представляет собой последовательность ДНК, где происходит сборка общих факторов транскрипции и полимеразы (см. рис. 6.16). Регуляторные последовательности служат участками связывания для регуляторных белков, присутствие которых на ДНК влияет на интенсивность инициации транскрипции. Эти последовательности можно обнаружить вблизи промотора, намного раньше него или даже в интронах либо после гена. Как показано в нижней части рисунка, петлеобразование ДНК позволяет регуляторным белкам, связавшимся на любом из этих мест, взаимодействовать с белками, которые собираются на промоторе. Многие регуляторные белки генов действуют через медиатор, тогда как другие напрямую влияют на общие факторы транскрипции и РНК-полимеразу. Здесь не показано, но многие регуляторные белки также влияют на структуру хроматина в контролирующей области ДНК, таким образом, воздействуя на инициацию транскрипции косвенным путем (см. рис. 4.45). Как отмечалось в тексте, для простоты «ген X» относится здесь к кодирующей последовательности в гене.

длинные отрезки ДНК, а сама регуляция часто кажется невообразимо сложной. Эта повышенная сложность служит важным преимуществом эукариотической клетки. Генетические переключатели у бактерий, как было отмечено, обычно реагируют на один или несколько сигналов. Но для эукариот вполне обычным является поступление десятка сигналов на один промотор и аппарат транскрипции, суммирующий все эти различные сигналы, чтобы образовать соответствующее количество мРНК. Начнем наше описание регуляции генов у эукариот с выделения основных особенностей, которые отличают ее от регуляции у бактерий.

В главе 6 шла речь о том, что для эукариотической РНК-полимеразы II, которая транскрибирует все кодирующие белок гены, необходимо пять основных факторов транскрипции (в целом 27 субъединиц, см. табл. 6.3, **стр. 341**), а для бактериальной РНК-полимеразы требуется только один фактор транскрипции — σ -субъединица. Как мы видели, пошаговая сборка основных факторов транскрипции на эукариотическом промоторе предоставляет, в принципе, множество этапов, на которых клетка может увеличить или уменьшить частоту инициации транскрипции в ответ на действие регуляторных белков.

У эукариотических клеток нет оперонов — наборов связанных генов, транскрибируемых как одно целое, следовательно, каждый ген регулируется отдельно.

Каждый бактериальный ген обычно контролируется одним или несколькими регуляторными белками, но для эукариот является типичным контроль гена множеством (иногда сотнями) различных регуляторных белков. Такая сложность организации становится возможной, поскольку, как мы увидим далее, многие эукариотические регуляторные белки могут действовать через очень большие расстояния (десятки тысяч нуклеотидных пар), что позволяет практически бесконечному числу белков влиять на единственный ген.

Основным компонентом системы регуляции генов у эукариот является *медиатор (mediator)* — комплекс из 24 субъединиц, служащий посредником между регуляторными белками и РНК-полимеразой (см. рис. 6.19). Медиатор обеспечивает более широкую площадь контакта для регуляторных белков по сравнению с той, которую предоставляет в одиночку одна лишь РНК-полимераза у бактерий.

Упаковка эукариотической ДНК в хроматин дает множество возможностей для регуляции транскрипции, что не доступно для бактерий.

Основные факторы транскрипции РНК-полимеразы II были рассмотрены в главе 6 (см. **стр. 340–343**), а здесь мы сконцентрируем свое внимание на последних четырех описанных особенностях и на том, как они используются для контроля экспрессии генов у эукариот.

7.3.7. Контролирующая область гена эукариот состоит из промотора и регуляторных последовательностей ДНК

Поскольку типичный эукариотический регуляторный белок контролирует транскрипцию, связываясь с ДНК вдали от промотора, последовательности ДНК, которые контролируют экспрессию гена, часто распределены вдоль длинных отрезков ДНК. Мы используем термин **контролирующая область гена (gene control region)** для описания всего отрезка ДНК, участвующего в регулировании и инициации транскрипции гена, включая **промотор (promoter)**, где происходит сборка основных факторов транскрипции и полимеразы, а также все **регуляторные последовательности (regulatory sequences)**, с которыми связываются регуляторные белки для

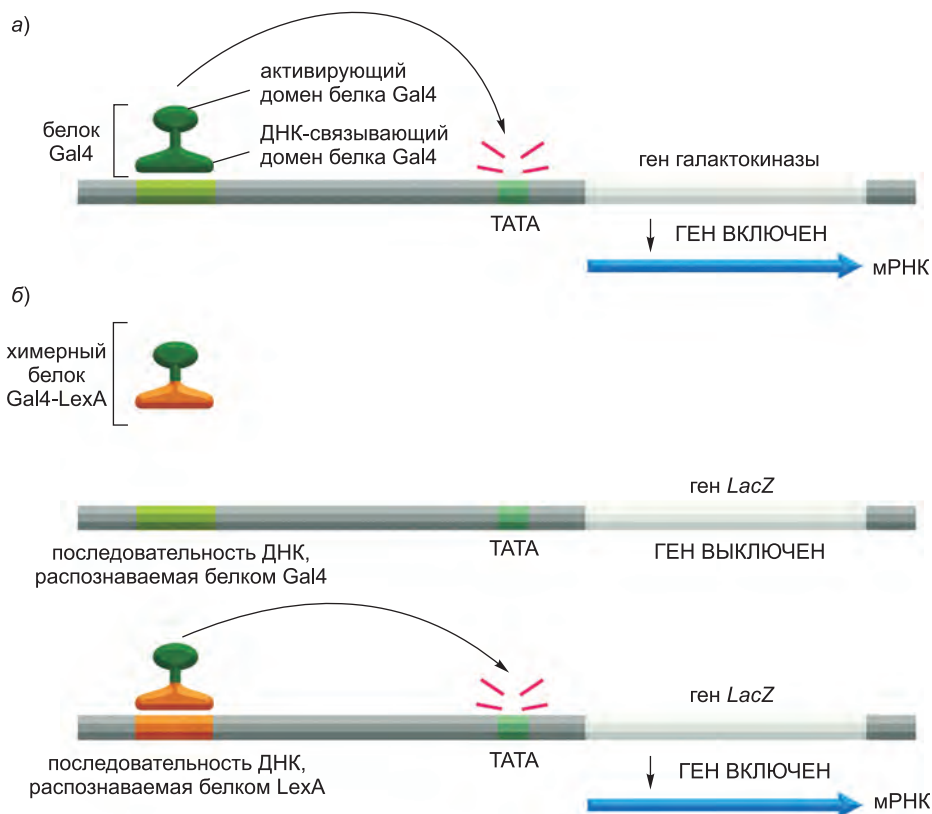


Рис. 7.45. Модульная структура белка-активатора. Схема опыта, позволяющего выявить в составе белка-активатора Gal4 у дрожжей независимые ДНК-связывающие и активирующие транскрипцию домены. Функциональный активатор может быть получен при соединении С-концевой части белка Gal4 дрожжей и ДНК-связывающего домена бактериального регуляторного белка (белок LexA) методами генной инженерии. Когда этот бактериально-дрожжевой гибридный белок будет синтезироваться в клетках дрожжей, он будет активировать транскрипцию дрожжевых генов, если перед этими генами встроить специфический участок, обеспечивающий его связывание с ДНК. а) В норме белок Gal4 отвечает за активацию транскрипции генов дрожжей, кодирующих ферменты, которые превращают галактозу в глюкозу. б) Чтобы химерный регуляторный белок, созданный методами генной инженерии, активировал транскрипцию, в контролирующей области должна присутствовать распознаваемая LexA последовательность. В описанном опыте контролирующая область одного из генов, регулируемых белком LexA, слита с геном *LacZ E. coli*, который кодирует фермент β-галактозидазу (см. рис. 7.39). β-галактозидазу очень просто определить биохимическими методами, что очень удобно для мониторинга уровня экспрессии, который задается контролирующей областью гена. Здесь *LacZ* используется в качестве репортерного гена, так как он «докладывает» об активности контролирующей области гена.

контроля скорости процессов сборки на промоторе (рис. 7.44). Вполне обычным является обнаружение у животных и растений регуляторных последовательностей гена, рассеянных на таких больших расстояниях, как 50 000 нуклеотидных пар. Большинство подобной ДНК служит в качестве «спейсерных» последовательностей, которые регуляторные белки напрямую не распознают, но она придает гибкость, необходимую для эффективного петлеобразования ДНК. В данном случае важно

крибируемых РНК-полимеразой II, существуют тысячи различных регуляторных белков. Например, ориентировочно из 25000 человеческих генов установлено 8% (около 2000 генов), кодирующих регуляторные белки. Большинство из них узнают последовательности ДНК, используя один из описанных ранее связывающихся с ДНК мотивов. Неудивительно, что в эукариотической клетке каждый из ее генов регулируется особым способом. При заданном общем количестве генов у эукариот и сложности их регуляции трудно было сформулировать простые правила регуляции генов, применимые во всех случаях. Однако мы смогли сделать несколько обобщений о том, как регуляторные белки, связавшись с контролирующей областью гена на ДНК, запускают последовательность событий, которая приводит к активации или репрессии гена.

Медиатор и основные, или общие, факторы транскрипции одинаковы для всех генов, которые транскрибирует полимеразы II, но регуляторные белки и расположение участков связывания относительно промотора у каждого гена свои.

7.3.8. Эукариотические белки-активаторы индуцируют сборку РНК-полимеразы и общих факторов транскрипции на сайте инициации транскрипции

Участки ДНК, с которыми связываются эукариотические белки-активаторы, сначала назывались *энхансерами*, поскольку их присутствие увеличивало интенсивность инициации транскрипции (от англ. enhance — увеличивать, усиливать). Когда же впервые выяснили, что эти белки-активаторы могут связываться за десять тысяч нуклеотидных пар от промотора, это стало полной неожиданностью, но, как мы видели, петлеобразование ДНК дает по крайней мере одно из объяснений этому первоначально загадочному наблюдению.

Самые простые белки-активаторы построены из модулей, состоящих из двух отдельных доменов. Один домен обычно содержит один из рассмотренных ранее структурных мотивов, узнающих специфическую последовательность ДНК. Второй домен, иногда называемый *активирующим транскрипцию доменом* (*activation domain*), ускоряет интенсивность инициации транскрипции. Такой тип модульной структуры впервые выявлен в экспериментах, где были использованы методы генной инженерии для создания химерного белка, содержащего активирующий транскрипцию домен одного белка и соединенный с ним ДНК-связывающий домен другого белка (рис. 7.45).

Как эукариотический белок-активатор после связывания с ДНК увеличивает интенсивность инициации транскрипции? Как будет скоро видно, существует несколько механизмов, посредством которых это может произойти, и во многих случаях эти различные механизмы согласованно работают на одном промоторе. Но вне зависимости от точного биохимического пути основная функция активаторов состоит в привлечении, позиционировании и модификации общих факторов транскрипции, медиатора и РНК-полимеразы II на промоторе так, чтобы могла начаться транскрипция. Они делают это напрямую, непосредственно действуя на эти компоненты, или косвенно, изменяя структуру хроматина вокруг промотора.

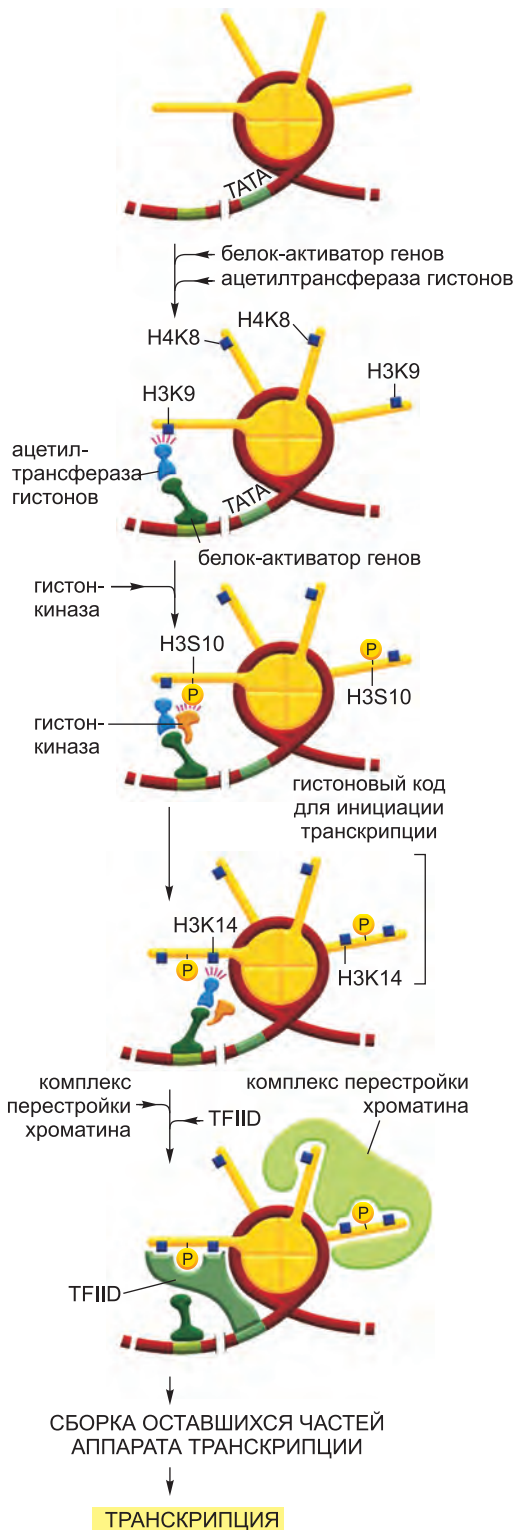
Некоторые белки-активаторы непосредственно связываются с одним или более из общих факторов транскрипции, ускоряя их сборку на промоторе, который связан через ДНК с этим активатором. Другие взаимодействуют с медиатором и привлекают его к ДНК, где он затем может облегчить сборку РНК-полимеразы и общих

Рис. 7.47. Написание и чтение гистонового кода в ходе инициации транскрипции. В этом примере, представляющем промотор гена интерферона человека, белок-активатор связывается с упакованной в хроматин ДНК и сначала привлекает гистоновую ацетиルトрансферазу, чтобы ацетилировать лизин 9 гистона H3 и лизин 8 гистона H4. Далее, гистонкиназа, привлеченная белком-активатором, фосфорилирует серин 10 гистона H3, но это возможно только после ацетилирования лизина 9. Затем модификация серина подает сигнал гистоновой ацетиルトрансферазе ацетилировать лизин 14 (K14) на гистоне H3. На этом запись гистонового кода инициации транскрипции завершается. Обратите внимание, что написание кода является последовательным процессом, где каждая модификация гистона зависит от предыдущей. Окончательное чтение кода происходит, когда связываются общий фактор транскрипции TFIID и комплекс перестройки хроматина SWI/SNF — оба в значительной степени стимулируют последующие этапы инициации транскрипции. TFIID и SWI/SNF распознают ацетилированные хвосты гистонов с помощью *бромодомена (bromodomain)* — белкового домена, специализирующегося на считывании этой конкретной модификации гистонов. Бромодомен расположен на субъединице каждого белкового комплекса. (Адаптировано из T. Agalioti, G. Chen and D. Thanos, *Cell* 111: 381–392, 2002. С разрешения Elsevier.)

факторов транскрипции на промоторе (см. рис. 7.44). В этом смысле эукариотические активаторы напоминают активаторы бактерий касательно привлечения РНК-полимеразы к специфическим участкам ДНК, чтобы РНК-полимераза могла начать транскрипцию.

7.3.9. Эукариотические белки-активаторы модифицируют также и локальную структуру хроматина

Общие факторы транскрипции, медиатор и РНК-полимераза, оказываются, не способны сами собираться на промоторе, упакованном в стандартные нуклеосомы. Более того, можно предположить,



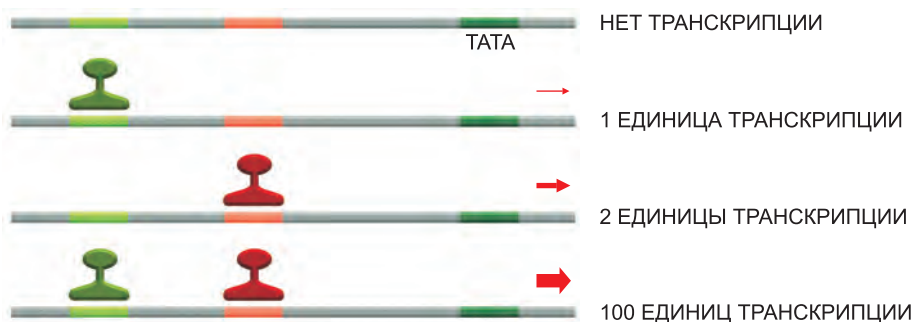


Рис. 7.48. Транскрипционный синергизм. В данном опыте сравнивается интенсивность транскрипции, создаваемая в эукариотической клетке тремя регуляторными белками, сконструированными экспериментально, а также показан транскрипционный синергизм, превышающий суммарный эффект от действия множества активаторов. Транскрипционный синергизм обычно наблюдается между различными белками-активаторами одного и того же организма и даже между белками-активаторами разных видов эукариот, если их экспериментально ввести в одну и ту же клетку. Последнее наблюдение отражает высокую степень консерватизма сложного аппарата, ответственного за инициацию транскрипции у эукариот.

что такая упаковка, возможно, развилась в ходе эволюции, чтобы предотвратить «утечку» транскрипции. Кроме своих прямых действий, направленных на сборку транскрипционного аппарата на промоторе, белки-активаторы также способствуют инициации транскрипции с помощью изменения структуры хроматина в области регуляторных последовательностей и промоторов генов.

Согласно главе 4, четыре из наиболее важных способов локального изменения структуры хроматина состоят в ковалентной модификации гистонов, перестройке нуклеосом, удалении нуклеосом и их замене. Белки-активаторы используют все четыре механизма, привлекая ферменты, модифицирующие гистоны, АТР-зависимые комплексы перестройки хроматина и гистоновые шапероны, чтобы изменить структуру хроматина в области промоторов, которые они контролируют (рис. 7.46). Полагают, что в общих чертах эти локальные изменения в структуре хроматина делают подвергающуюся воздействию ДНК более доступной, таким образом облегчая сборку общих факторов транскрипции, медиатора и РНК-полимеразы на промоторе. Локальная модификация хроматина также дает возможность присоединиться к контролирующей области гена дополнительным регуляторным белкам. Однако самая важная роль ковалентной модификации гистонов при транскрипции, вероятно, заключатся не в прямом изменении структуры хроматина: скорее всего, как обсуждается в главе 4, эти модификации обеспечивают благоприятные взаимодействия для связывания широкого набора белков, которые считывают «гистоновый код». Что касается инициации транскрипции, то этот набор белков включает другие гистон-модифицирующие ферменты (комплексы «читатель-писатель»), комплексы перестройки хроматина и по крайней мере один из общих факторов транскрипции (рис. 7.47).

Изменения структуры хроматина, происходящие в ходе инициации транскрипции, могут сохраняться в течение различных периодов времени. В некоторых случаях, как только регуляторный белок отсоединяется от ДНК, происходит быстрое обращение процесса модификации хроматина, возвращающее ген в его состояние до активации. Быстрое восстановление прежней структуры особенно важно для генов,

которые должны быстро включаться и выключаться в клетке в ответ на внешние сигналы — как например, глюкокортикоидные гормоны, рассмотренные ранее в этой главе. Однако в других случаях измененная структура хроматина сохраняется даже после того, как регуляторный белок, который управлял ее созданием, отсоединился от ДНК. В принципе, эта память может распространяться и на следующее поколение клеток, поскольку, как обсуждалось в главе 4, структура хроматина может самовоспроизводиться (см. рис. 4.52). Интересно рассмотреть возможность того, что различные модификации гистонов являются устойчивыми в течение различного времени, обеспечивая клетку механизмом долгосрочной, среднесрочной и краткосрочной памяти относительно профилей экспрессии генов.

В ходе транскрипции гена РНК-полимеразой II происходит специальный вид модификации хроматина. В большинстве случаев нуклеосомы — непосредственно впереди полимеразы — ацетируются комплексами белков-«писателей», которые несет полимеразы, удаляются гистоновыми шаперонами и располагаются за движущейся полимеразой. Затем они быстро деацетируются и метилируются также комплексами «писатель-читатель», располагающимися на полимеразе, которая оставляет позади себя нуклеосомы, особо резистентные к транскрипции. Несмотря на то что этот удивительный процесс может показаться нелогичным, он, вероятно, развивался как средство предотвращения ложной реинициации транскрипции позади двигающейся полимеразы, которая, по существу, расчищает себе путь сквозь хроматин. Далее в этой главе, когда будет обсуждаться *РНК-интерференция*, потенциальная опасность, которую несет клетке подобная «неуместная транскрипция», станет особенно очевидной.

Мы только что убедились в том, что белки-активаторы могут серьезно влиять на структуру хроматина. Однако даже до того, как начинают действовать белки-активаторы, многие гены находятся «на позиции», готовые к быстрой активации. Например, регуляторные области многих генов имеют «метку» в виде короткой области без нуклеосом, по краям которой

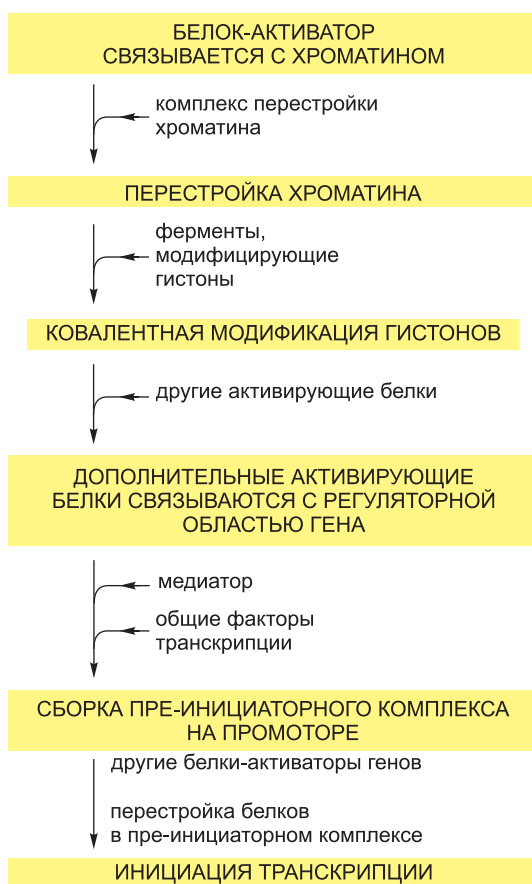


Рис. 7.49. Последовательность событий, ведущая к инициации транскрипции специфического гена. В этом хорошо изученном примере, взятом из биологии почкующихся дрожжей *S. cerevisiae*, этапы, ведущие к инициации транскрипции, идут в особом порядке, однако этот порядок меняется от гена к гену. Например, у другого гена сначала происходит модификация гистонов с последующим привлечением РНК-полимеразы, а затем и комплексов перестройки хроматина. На рис. 7.47 показана еще одна возможная последовательность событий.

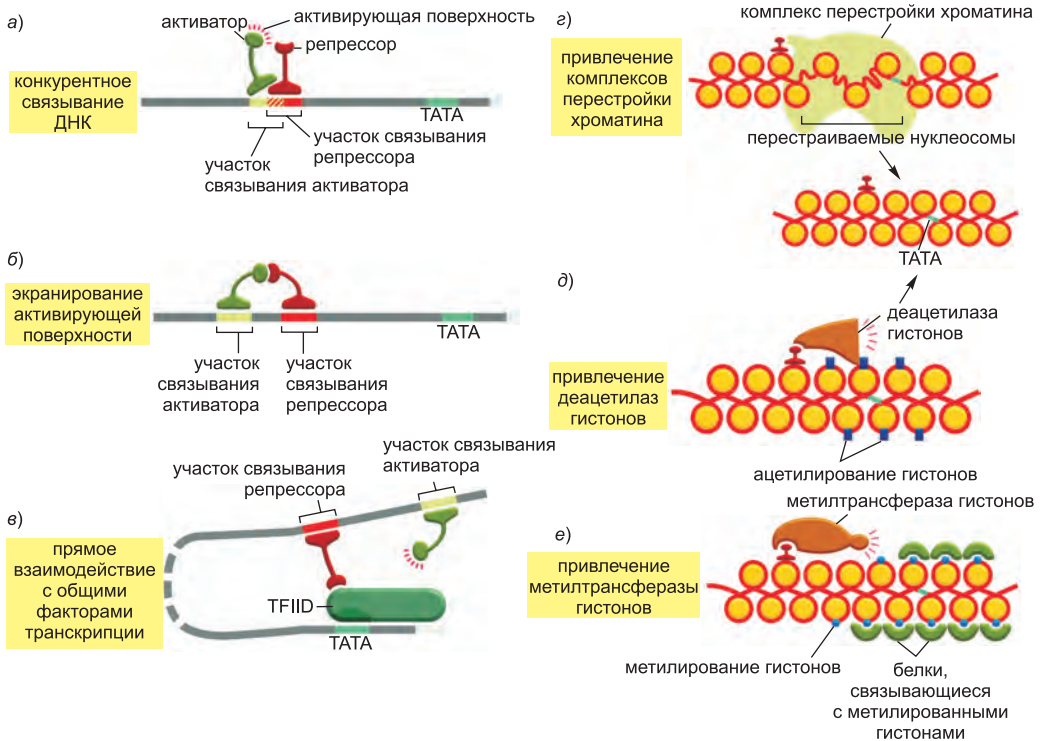


Рис. 7.50. Шесть возможных способов действия эукариотического белка-репрессора. а) Белки-активаторы и белки-репрессоры конкурируют за связывание с одной и той же регуляторной последовательностью ДНК. б) Оба белка могут связываться с ДНК, но репрессор связывается с активирующим доменом белка-активатора, таким образом препятствуя выполнению им его функций активации транскрипции. Как вариант этой стратегии, репрессор прочно связывается с активатором, не связываясь непосредственно с ДНК. в) Репрессор блокирует сборку общих факторов транскрипции. Некоторые репрессоры также действуют на последних стадиях инициации транскрипции, например, препятствуя освобождению РНК-полимеразы от общих факторов транскрипции. г) Репрессор привлекает комплекс перестройки хроматина, который возвращает состояние промоторной области в нуклеосомную форму до транскрипции. д) Репрессор привлекает к промотору гистоновую деацетилазу. Как было выяснено, ацетилирование гистонов может стимулировать инициацию транскрипции (рис. 7.47), и репрессор просто отменяет эту модификацию. е) Репрессор привлекает гистоновую метилтрансферазу. Она модифицирует определенные позиции на гистонах, с которыми, в свою очередь, связываются белки, поддерживающие хроматин в транскрипционно неактивной форме. Например, у дрозофилы гистоновая метилтрансфераза Suv39 метилирует лизин 9 (K9) гистона H3, с этой модификацией связывается белок HP1. В другом примере E(z) метилирует лизин 27 (K27) гистона H3, а с этой модификацией связывается белок Polycomb. Белки HP1 и Polycomb распознают метилированные лизины при помощи *хромодомена*. Они могут действовать локально, выключая специфические гены, как показано здесь, или занимать целые области хромосомы, чтобы репрессировать кластер генов. Седьмой механизм негативного контроля — инактивация активатора транскрипции при помощи гетеродимеризации, показана на рис. 7.24. Для упрощения на а–в не показаны нуклеосомы, а масштаб г–е уменьшен относительно а–в.

расположены нуклеосомы, содержащие гистоновый вариант H2AZ. Такая структура, определяемая последовательностью ДНК, обеспечивает свободный доступ регуляторным белкам к области без нуклеосом. Кроме того, предполагается, что

нуклеосомы, содержащие H2AZ, легко диссоциируют, таким образом еще больше облегчая инициацию транскрипции.

7.3.10. Белки-активаторы взаимно усиливают действие друг друга

Мы уже выяснили, что эукариотические белки-активаторы генов могут влиять на различные этапы инициации транскрипции. В общем случае там, где для повышения скорости реакции совместно действует несколько факторов, их совместный эффект является не простой суммой положительных эффектов, даваемых каждым фактором, а произведением. Например, если фактор А понижает барьер свободной энергии для реакции на определенную величину и таким образом ускоряет реакцию в 100 раз, а фактор В, воздействуя на другую составляющую реакции, делает то же самое, тогда совместное действие А и В снизит барьер вдвое и ускорит реакцию в 10 000 раз. Даже если А и В будут действовать только как агенты, привлекающие один и тот же белок, сродство этого белка к активному центру умножается в разы. Таким образом, белки-активаторы генов часто проявляют *транскрипционный синергизм (transcriptional synergy)* — когда несколько белков-активаторов, действуя совместно, увеличивают эффективность инициации транскрипции на величину, значительно превышающую ту, которая была бы получена при простом суммировании их вклада по отдельности (рис. 7.48). Легко заметить, как множество регуляторных белков, каждый из которых связывается с различными регуляторными областями ДНК, работают вместе, чтобы контролировать конечную интенсивность транскрипции эукариотического гена.

Поскольку белки-активаторы могут влиять на множество различных этапов пути, ведущего к активации транскрипции, то стоит рассмотреть, всегда ли эти этапы происходят в установленном порядке. Например, всегда ли модификация гистонов предшествует перестройке хроматина, как в примере на рис. 7.47? Медиатор вступает до или после РНК-полимеразы? Ответы на эти вопросы оказываются различными для разных генов и отличаются даже для одного и того же гена, находящегося под действием разных регуляторных белков (рис. 7.49).

Какими бы ни были точные механизмы и порядок их выполнения, регуляторный белок должен напрямую или косвенно связываться с ДНК, чтобы воздействовать на транскрипцию своего целевого гена, а интенсивность транскрипции гена в конечном счете зависит от спектра регуляторных белков, связывающихся левее или правее его сайта инициации транскрипции.

7.3.11. Белок-репрессор генов эукариот может ингибировать транскрипцию различными способами

У эукариот, как и у бактерий, для регуляции транскрипции генов используются, помимо белков-активаторов, **белки-репрессоры (gene repressor proteins)**. Однако из-за разницы в способах инициации транскрипции, которые используют эукариоты и бактерии, эукариотические репрессоры обладают значительно более широким набором возможных механизмов действия. Из главы 4 известно, что большие области генома можно выключать путем упаковки ДНК в гетерохроматин. Однако эукариотические гены редко когда располагаются в геноме в соответствии со своей функцией, поэтому эта стратегия является в целом непригодной для большинства примеров регуляции генов. Вместо этого, большинство эукариотических репрессоров должно работать по схеме «ген за геном». В отличие от бактериаль-

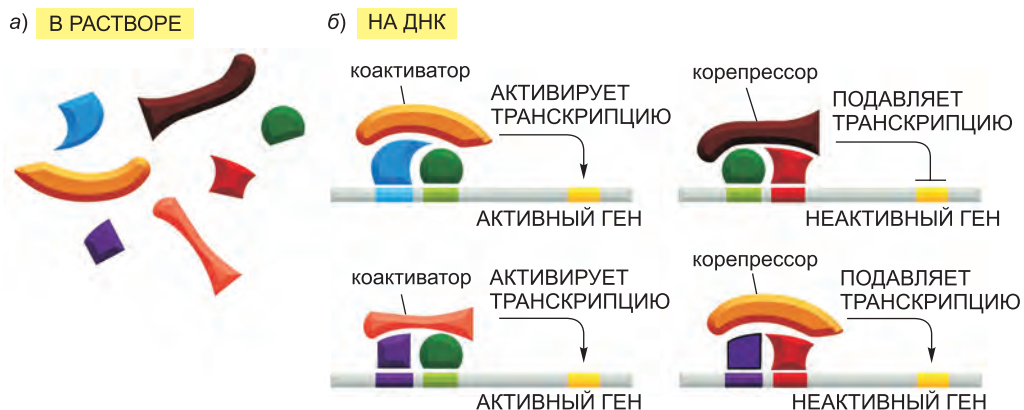


Рис. 7.51. Регуляторные белки эукариот часто собираются в комплексы на ДНК. На *а* показаны семь регуляторных белков. Природа и функция комплекса, которые они образуют, зависит от специфической последовательности ДНК, которая служит затравкой для их сборки. На *б* некоторые образовавшиеся комплексы активируют транскрипцию гена, а другие ее подавляют. Обратите внимание, что *красные* и *зеленые* белки есть и в активирующих, и в репрессирующих комплексах. Белки, которые не связываются самостоятельно с ДНК, но собираются на других связывающихся с ДНК регуляторных белках, часто называются коактиваторами или корепрессорами. Однако эти термины немного вводят в заблуждение, потому что они охватывают огромное разнообразие белков, включая гистоновые белки-«читатели» и белки-«писатели», комплексы перестройки хроматина и многие другие классы белков. Некоторые белки не обладают собственной активностью, а просто служат в качестве «основы» для привлечения тех белков, которые ею обладают.

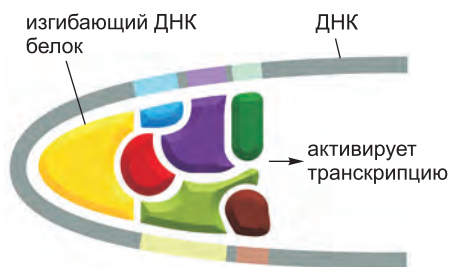
ных репрессоров, большинство эукариотических репрессоров не конкурирует непосредственно с РНК-полимеразой за доступ к ДНК, скорее они используют ряд других механизмов, некоторые из которых приведены на [рис. 7.50](#). Как и белки-активаторы, многие белки-репрессоры эукариот воздействуют на заданный ген при помощи более чем одного механизма и, следовательно, обеспечивают надежную и эффективную репрессию.

Репрессия генов особенно важна для животных и растений, чей рост зависит от действия сложно организованных программ развития. Неверная экспрессия единственного гена в критический момент времени может иметь катастрофические последствия для индивидуума. По этой причине многие из генов, кодирующие наиболее важные при развитии организма регуляторные белки, находятся под надежной репрессией, если в них нет необходимости.

7.3.12. Регуляторные белки эукариот часто кооперативно связываются с ДНК

До настоящего момента мы выяснили, что при связывании эукариотического активатора и репрессора со специфической последовательностью ДНК запускается сложная серия событий, заканчивающихся инициацией транскрипции или, наоборот, ее репрессией. Однако эти белки редко распознают ДНК как индивидуальные полипептиды. В действительности для эффективного связывания с ДНК в эукариотической клетке необходимо несколько сайт-специфических белков ДНК, действующих совместно. Например, два регуляторных белка со слабым сродством

Рис. 7.52. Схематическое изображение «комитета» регуляторных белков, связанных с энхансером. Белок, показанный *желтым*, называется «архитектурным» белком, потому что его основная роль заключается в сгибании ДНК — чтобы на ней смогла произойти кооперативная сборка остальных компонентов. Приведенная здесь структура основана на той, что была найдена в контролирующей области гена, кодирующего субъединицу Т-клеточного репрессора (описан в главе 25), и она активирует транскрипцию соседнего промотора. Только определенные клетки развивающейся иммунной системы, которые в итоге дадут начало зрелым Т-клеткам, обладают полным набором белков, необходимых для образования этой структуры.



друг к другу могут объединиться, чтобы связаться с последовательностью ДНК, если ни один из них не обладает достаточным средством, чтобы связаться с участком ДНК самостоятельно. В одном хорошо изученном случае связавшийся с ДНК белковый димер образует особую поверхность, которая узнается третьим белком, несущим активирующий домен, стимулирующий начало транскрипции. Этот пример иллюстрирует основную важную идею: белок-белковые взаимодействия, которые слишком слабы, чтобы образовывать комплексы в растворе, могут это сделать на ДНК, где последовательность ДНК выступает в качестве очага «кристаллизации», или затравки, для сборки белкового комплекса.

Как показано на [рис. 7.51](#), отдельный регуляторный белок может участвовать в нескольких типах регуляторных комплексов. Например, в одном случае белок может функционировать как часть комплекса, который активирует транскрипцию, а в другом — как часть комплекса, который ее репрессирует. Таким образом, индивидуальные эукариотические регуляторные белки не обязательно являются «чистыми» активаторами или «чистыми» репрессорами, вместо этого, они действуют как регуляторные элементы, используемые для построения комплексов, функция которых зависит от окончательной сборки всех его отдельных компонентов. Окончательная сборка, в свою очередь, зависит как от расположения последовательностей ДНК контролирующей области, так и от определенных регуляторных белков, находящихся в клетке в активной форме. Следовательно, каждый эукариотический ген регулируется «комитетом» белков, и все из них должны присутствовать в клетке, чтобы экспрессия гена была на должном уровне.

В некоторых случаях точная последовательность ДНК, с которой связывается регуляторный белок, может напрямую повлиять на конформацию этого белка и, следовательно, на его последующую транскрипционную активность. Например, связываясь с одним типом последовательности ДНК, белок-рецептор стероидных гормонов взаимодействует с корепрессором и в итоге выключает транскрипцию. При связывании с немного отличающейся последовательностью ДНК он принимает другую конформацию и взаимодействует с коактиватором, таким образом стимулируя транскрипцию.

Обычно несколько относительно коротких участков нуклеотидной последовательности направляют сборку группы регуляторных белков на ДНК (см. [рис. 7.51](#)). Однако в некоторых крайних случаях, когда регуляция производится «комитетом» белков, образуется более изощренная структура белок–ДНК ([рис. 7.52](#)). Поскольку для окончательной сборки требуется наличие множества регуляторных белков,

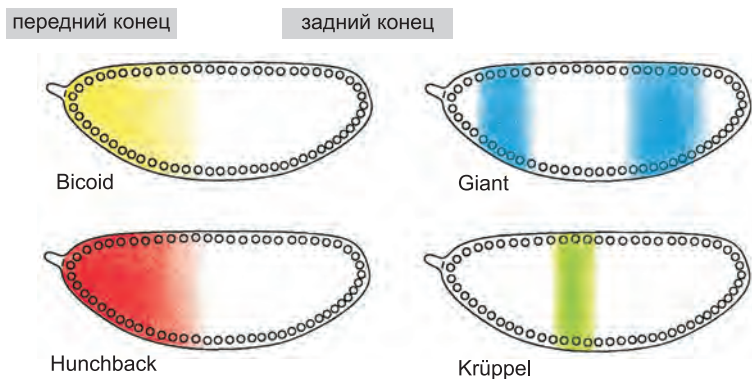


Рис. 7.53. Неоднородное распределение четырех регуляторных белков в раннем зародыше дрозофилы. На этой стадии зародыш представляет собой синцитий со множеством ядер, расположенных в общей цитоплазме. На данных рисунках не показаны детали, но все эти белки сконцентрированы в ядрах.

которые связываются с ДНК, то это является простым способом, гарантирующим, что ген экспрессируется только тогда, когда клетка содержит правильную комбинацию этих белков. Ранее мы наблюдали, как образование гетеродимеров в растворе обеспечивает механизм для комбинаторного контроля экспрессии генов. Сборка комплексов регуляторных белков на ДНК является вторым важным механизмом комбинаторного контроля, механизмом, открывающим гораздо большие возможности.

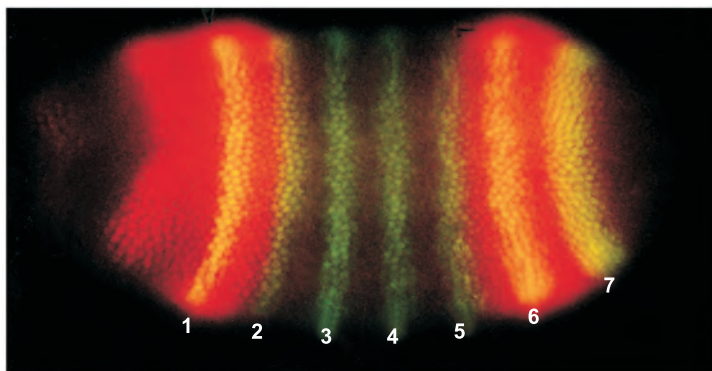


Рис. 7.54. Семь регулярных полос белка, кодируемого геном *Even-skipped (Eve)*, в развивающемся эмбрионе дрозофилы. Спустя два с половиной часа после оплодотворения яйцеклетку зафиксировали и окрасили антителами, которые распознают белок Eve (зеленый), и антителами, которые распознают белок Giant (красный). Окраска имеет желтый цвет в тех местах, где содержатся оба белка. На этой стадии эмбрионального развития яйцеклетка содержит примерно 4000 ядер. Оба белка Eve и Giant находятся в ядрах, и ширина полос белка Eve составляет примерно четыре ядра. На рис. 7.52/7.53 также показан профиль окрашивания белка Giant. (С любезного разрешения Michael Levine.)

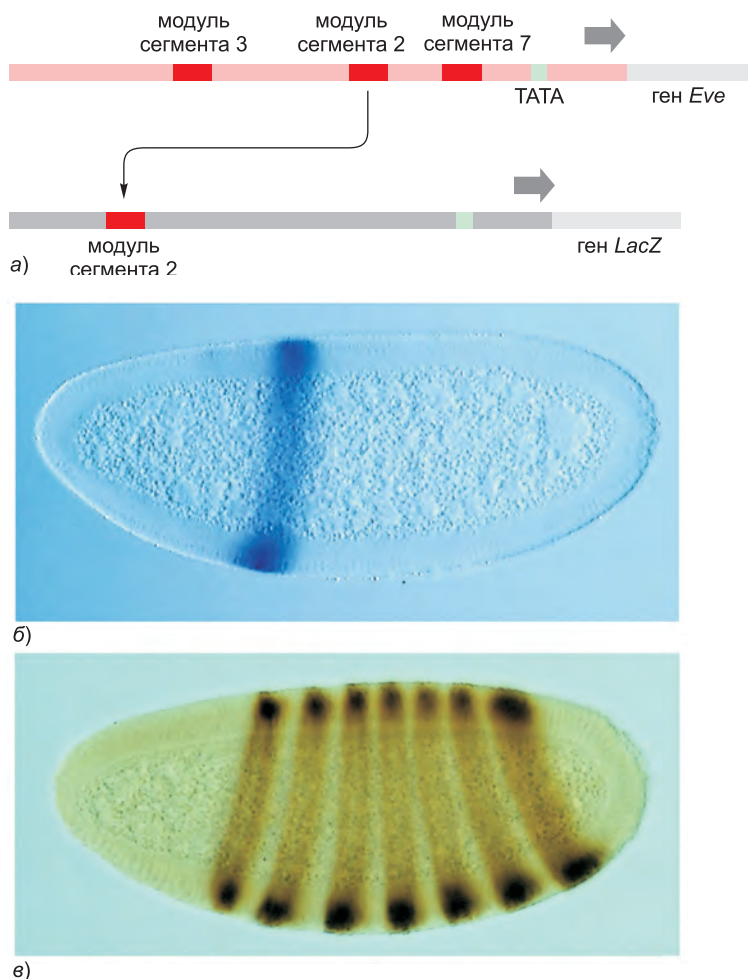


Рис. 7.55. Опыты, показывающие модульную организацию регуляторной области гена *Eve*. а) Фрагмент регуляторной области гена *Eve* размером 480 нуклеотидных пар удалили и вставили слева от контрольного промотора, который управляет синтезом фермента β-галактозидазы (продукт гена *LacZ E.coli*). б) Когда искусственную конструкцию вновь ввели в геном эмбрионов дрозофилы, эмбрионы экспрессировали β-галактозидазу (определяют гистохимическим окрашиванием) точно на месте второй из семи регулярных полос гена *Eve* (в). (б и в — с любезного разрешения Stephen Small и Michael Levine.)

7.3.13. Сложные генетические переключатели, регулирующие развитие дрозофилы, построены из более мелких модулей

В условиях, когда регуляторные белки могут располагаться на множестве участков вдоль длинных отрезков ДНК и на каждом из них собираться в комплексы, когда эти комплексы оказывают влияние на структуру хроматина, так же как и на привлечение и сборку основного аппарата транскрипции на промоторе, казалось бы, должны существовать практически бесконечные возможности для развития контролирующих устройств, которые бы регулировали транскрипцию эукариотических генов.

Чрезвычайно поразительным примером сложного многокомпонентного генетического переключателя является механизм, контролирующий транскрипцию гена *Even-skipped* (*Eve*) дрозофилы, экспрессия которого играет важную роль в развитии зародыша дрозофилы. Если этот ген инактивируется мутацией, то многие части зародыша не формируются и зародыш рано погибает. В главе 22 описывается, что на той стадии эмбрионального развития, когда начинается экспрессия гена *Eve*, зародыш представляет собой единственную гигантскую клетку, содержащую множество ядер в общей цитоплазме. Эта цитоплазма, однако, не однообразна — она содержит смесь регуляторных белков, которые неравномерно распределены вдоль зародыша, отражая таким образом позиционную информацию, которая отличает одну часть эмбриона от другой (рис. 7.53). (Способ, который используют поначалу для установления этих различий, описан в главе 22.) Сначала ядра идентичны, но под действием различных регуляторных белков они начинают быстро экспрессировать разные гены. Например, ядра на переднем конце развивающегося эмбриона подвергаются действию набора регуляторных белков, отличающегося от того, который влияет на ядра в заднем конце эмбриона.

Регуляторные последовательности ДНК, контролирующие ген *Eve*, приспособлены к считыванию информации о концентрации регуляторных белков в каждой точке вдоль оси эмбриона и интерпретируют эту информацию таким образом, что ген *Eve* экспрессируется в виде семи регулярных полос. Ширина каждой полосы первоначально составляет от пяти до шести ядер, и расположены полосы точно



Рис. 7.56. Детальная структура регуляторного модуля, ответственного за экспрессию гена *Eve* в полосе 2. Сегмент контролирующей области гена *Eve*, идентифицированный, как показано на предыдущем рисунке, содержит регуляторные последовательности, каждая из которых связывает тот или иной из четырех регуляторных белков. Из генетических экспериментов стало известно, что эти четыре регуляторных белка отвечают за правильную экспрессию гена *Eve* в полосе 2. Например, дрозофилы, дефицитные по двум активаторам, Bicoid и Hunchback, не могут эффективно экспрессировать *Eve* в полосе 2. У мух с дефицитом по любому из двух репрессоров гена, Giant и Krüppel, полоса 2 расширяется и занимает аномально широкую область эмбриона. Участки связывания с ДНК для этих регуляторных белков идентифицированы следующим образом: клонировали гены, кодирующие эти белки, и проводили футпринтинг ДНК (см. рис. 7.29). На верхней диаграмме показано, что в некоторых случаях участки связывания регуляторных белков перекрываются и белки могут конкурировать за связывание с ДНК. Например, считается, что связывание Krüppel и связывание Bicoid с крайним правым участком — взаимоисключающие процессы.

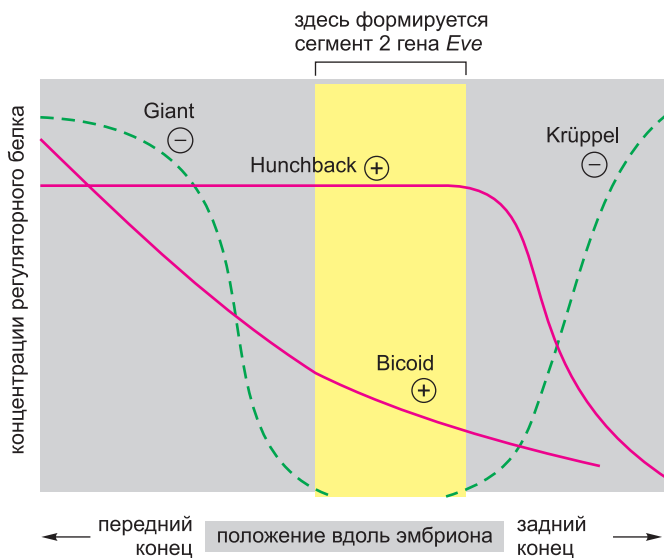


Рис. 7.57. Распределение регуляторных белков, отвечающих за обеспечение экспрессии гена *Eve* в полосе 2. Распределение этих белков наглядно продемонстрировано при использовании методологии окрашивания развивающегося эмбриона дрозофилы антителами, направленными против каждого из четырех белков (см. рис. 7.53 и 7.54). Экспрессия гена *Eve* в полосе 2 происходит только в той позиции, где присутствуют два активатора (*Bicoid* и *Hunchback*) и нет двух репрессоров (*Krüppel* и *Giant*). Например, у мух, дефицитных по *Krüppel*, полоса 2 расширяется назад. Подобным же образом она расширяется назад, если участки ДНК, с которыми связывается белок *Krüppel* в модуле полосы 2 (см. рис. 7.56), инактивированы мутацией.

Сам ген *Eve* кодирует регуляторный белок, который, после того как профиль экспрессии из семи регулярных полос установится, регулирует экспрессию других генов дрозофилы. По мере развития эмбрион, соответственно, подразделяется на все более и более тонкие сегменты, которые в итоге дадут начало различным частям взрослой особи, как описано в главе 22.

Этот пример с эмбрионами дрозофилы является необычным в том плане, что ядра непосредственно подвергаются воздействию позиционных сигналов в виде концентраций регуляторных белков. В эмбрионах большинства других организмов отдельные ядра находятся в разделенных клетках и внеклеточная позиционная информация, чтобы повлиять на геном, должна поступать или через плазматическую мембрану, или, чаще всего, создавать сигналы в цитозоле.

вдоль переднезадней оси эмбриона (рис. 7.54). Как осуществляется этот выдающийся подвиг обработки информации? Еще не все молекулярные детали этого процесса поняты, но, исходя из исследований гена *Eve* и других генов дрозофилы, регулируемых сходным образом, уже сформулировано несколько основных принципов.

Регуляторная область гена *Eve* очень большая (примерно 20 000 нуклеотидных пар) и образована из серии относительно простых регуляторных модулей, каждый из которых содержит множество регуляторных последовательностей и определяет местоположение конкретной полосы экспрессии гена *Eve* на оси эмбриона. Эту модульную организацию контролирующей области гена *Eve* выявляют в опытах, в ходе которых определенный регуляторный модуль (скажем, определяющий полосу 2) удаляют со своего нормального места слева от гена *Eve* и помещают перед репортерным геном (см. рис. 7.45), а затем вновь вводят в геном дрозофилы. При исследовании развивающихся эмбрионов, полученных от мух, несущих эту гене-

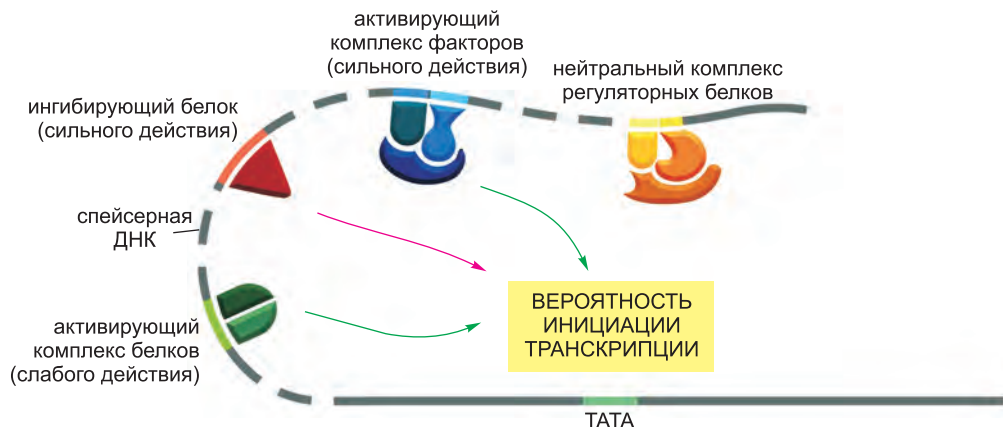


Рис. 7.58. Объединение множества входящих сигналов на промоторе. Чтобы воздействовать на инициацию транскрипции на промоторе, многочисленные наборы регуляторных белков могут работать сообща, как они это делают в модуле полосы 2 гена *Eve*, приведенном на рис. 7.56. Пока остается неясным то, как в клетке достигается интеграция множества входящих сигналов, но, скорее всего, конечная транскрипционная активность гена является результатом конкуренции между активаторами и репрессорами, которые действуют согласно механизмам, обобщенным на рис. 7.46 и 7.50.

тическую конструкцию, показано, что репортерный ген экспрессируется точно на месте полосы 2 (рис. 7.55). В ходе подобных экспериментов выявляют существование других регуляторных модулей, каждый из которых определяет или любую из шести других полос, или некоторую другую часть картины экспрессии гена *Eve*, в норме проявляющуюся на поздних стадиях развития (см. рис. 22.39).

7.3.14. Ген *Eve* дрозофилы регулируется механизмами комбинаторного контроля

Подробное изучение регуляторного модуля полосы 2 дало некоторое понимание того, как происходит считывание и интерпретация позиционной информации. Он содержит последовательности, распознаваемые двумя регуляторными белками (*Vicoid* и *Hunchback*), которые активируют транскрипцию *Eve*, и двумя белками (*Krüppel* и *Giant*), которые ее подавляют (рис. 7.56). (Регуляторные белки дрозофилы часто имеют колоритные имена, отражающие фенотип, получающийся в результате инактивации гена, кодирующего белок, из-за мутации.) Относительные концентрации этих четырех белков определяют, будут ли белковые комплексы, образующиеся в полосе 2, активировать транскрипцию гена *Eve*. На рис. 7.57 показано распределение четырех регуляторных белков вдоль области зародыша дрозофилы, где образуется полоса 2. Считается, что любой из двух репрессорных белков, если он связан с ДНК, будет выключать модуль полосы 2, тогда как для его максимальной активации должны связаться оба белка: *Vicoid* и *Hunchback*. Таким образом, эта простая регуляторная единица сочетает четыре позиционных сигнала так, что включает модуль полосы 2, а следовательно, и экспрессию гена *Eve*, только в тех ядрах, которые расположены в местах, где наблюдаются высокие уровни белков *Vicoid* и *Hunchback*, а *Krüppel* и *Giant* отсутствуют. Такое сочетание активаторов и репрессоров встречается только в одной области раннего эмбриона, во всех других местах, следовательно, модуль полосы 2 неактивен.

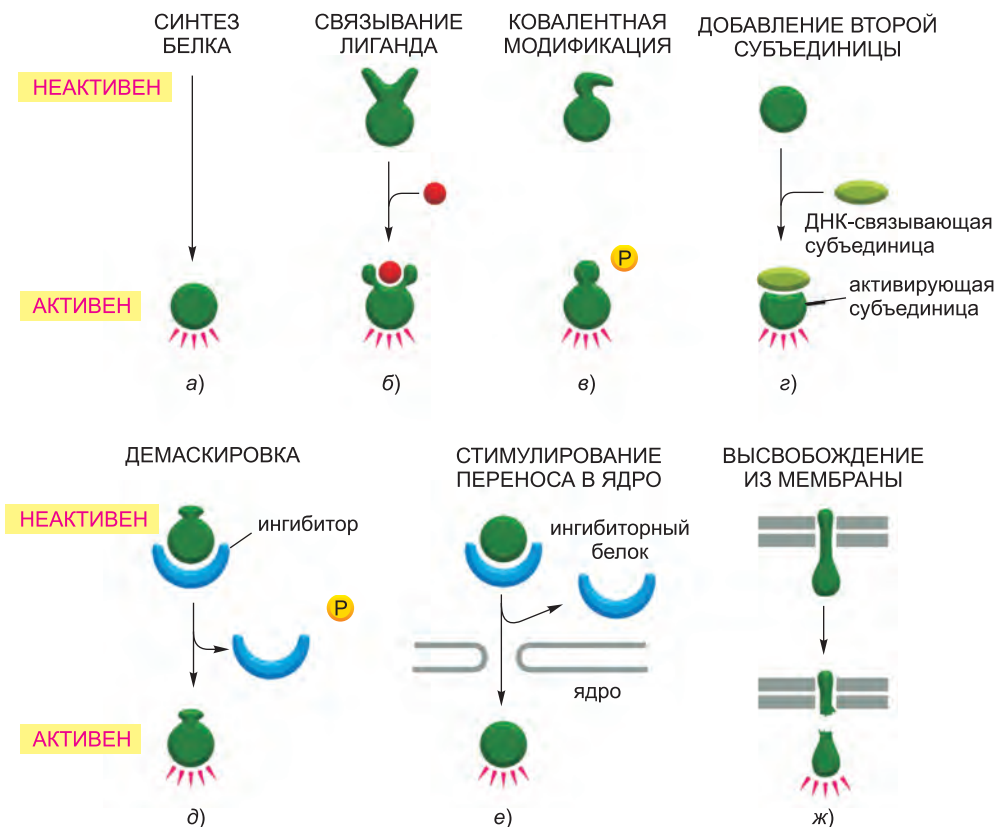


Рис. 7.59. Некоторые способы регуляции активности регуляторных белков в эукариотических клетках.

а) Белок синтезируется лишь в случае необходимости и быстро распадается при протеолизе — так что его накопления не происходит. б) Активация при связывании с лигандом. в) Активация посредством ковалентной модификации. Здесь показано фосфорилирование, но возможно множество других модификаций (см. табл. 3.3, стр. 186). г) Образование комплекса между ДНК-связывающим белком и другим белком, несущим домен, активирующий транскрипцию. д) Демаскировка активирующего домена при фосфорилировании ингибирующего белка. е) Стимулирование транспорта в ядро при удалении ингибирующего белка, который, в противном случае, не дает регуляторному белку попасть в ядро. ж) Высвобождение регуляторного белка из мембранного бислоя при помощи регулируемого протеолиза.

Мы уже обсудили два механизма комбинаторного контроля экспрессии генов: гетеродимеризацию регуляторных белков в растворе (см. рис. 7.20) и сборку комбинаций регуляторных белков в небольшие комплексы на ДНК (см. рис. 7.51). Вероятно, что оба механизма принимают участие в сложной регуляции экспрессии гена *Eve*. Кроме того, только что описанная регуляция полосы 2 является примером третьего типа комбинаторного контроля. Поскольку отдельные регуляторные последовательности в модуле полосы 2 гена *Eve* растянуты вдоль ДНК, многие наборы регуляторных белков могут одновременно связываться на разных участках и воздействовать на промотор гена. Промотор объединяет транскрипционные сигналы, посылаемые всеми связанными белками (рис. 7.58).

Регуляция экспрессии гена *Eve* является ярким примером комбинаторного

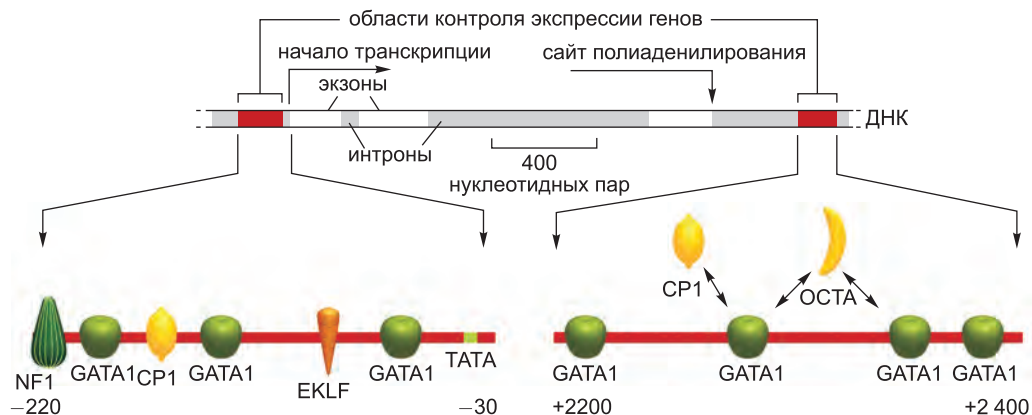


Рис. 7.60. Модель контроля гена β -глобина человека. На диаграмме показаны некоторые из регуляторных белков, контролирующих экспрессию гена в ходе развития эритроцитов (см. рис. 7.61). Некоторые из показанных регуляторных белков, как CP1, обнаружены во многих видах клеток, тогда как другие, например, GATA1, присутствуют только в нескольких типах клеток, включая эритроциты, поэтому считается, что они вносят вклад в специфичную к типу клеток экспрессию гена β -глобина. Двойные стрелки обозначают, что несколько участков связывания GATA1 перекрывают участки связывания других регуляторных белков, и предполагается, что присоединение к этим участкам GATA1 исключает возможность связывания с ними других белков. После связывания с ДНК регуляторные белки привлекают к промотору комплексы перестройки хроматина, ферменты, модифицирующие гистоны, основные факторы транскрипции, медиатор и РНК-полимеразу. (Адаптировано из В.Emerson, in *Gene Expression: General and Cell-Type Specific* [M. Karin, ed.], pp. 116–161. Boston: Birkhauser, 1993.)

контроля. Семь комбинаций регуляторных белков (одна комбинация для каждой полосы) активируют экспрессию гена *Eve*, а множество других комбинаций (все они были обнаружены в областях между полосами) не дают проявляться элементам полос. Предполагается, что другие регуляторные модули полос построены схожим образом с описанными для полосы 2 и приспособлены для считывания позиционной информации, поступающей от других комбинаций регуляторных белков. Вся контролирующая область гена *Eve*, протянувшаяся на 20 000 нуклеотидных пар ДНК, связывает свыше 20 различных регуляторных белков. Большая и сложная контролирующая область, таким образом, построена из серии небольших модулей, каждый из которых состоит из уникальной композиции коротких последовательностей ДНК, распознаваемых специфическими регуляторными белками.

7.3.15. У млекопитающих сложные контролирующие области генов тоже построены из простых регуляторных модулей

Вероятно, 8% кодирующей способности генома млекопитающих отдано синтезу белков, которые служат регуляторами транскрипции генов. Такое большое число генов отражает крайне сложную сеть контролирующих устройств, управляющих экспрессией генов млекопитающих. Каждый ген регулируется набором регуляторных белков, каждый из этих белков является продуктом гена, который, в свою очередь, регулируется целым набором других белков и т.д. Кроме того, молекулы регуляторных белков сами подвергаются воздействию сигналов, поступающих извне, которые могут активировать или инактивировать их множеством различных способов (рис. 7.59). Таким образом, профиль экспрессии генов в клетке можно

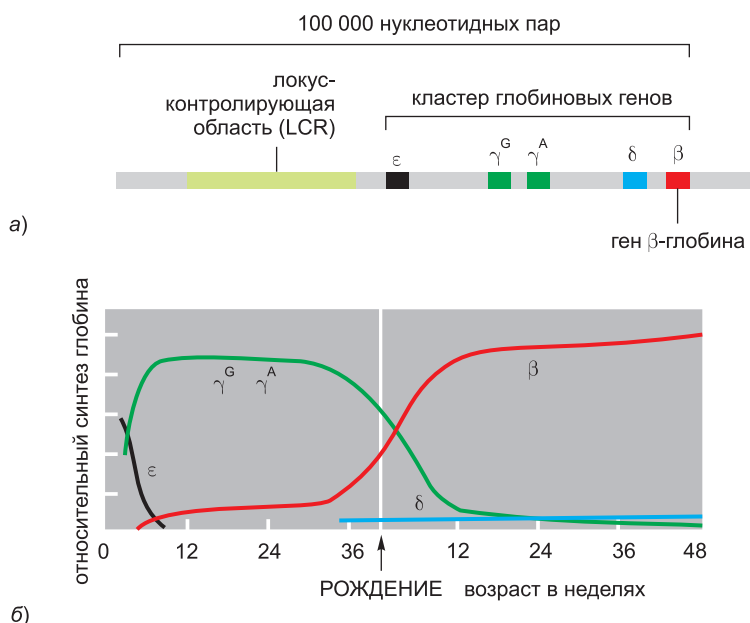


Рис. 7.61. Кластер β -подобных глобиновых генов человека. *а)* Представлен большой участок хромосомы, охватывающий 100 000 нуклеотидных пар. Он содержит пять глобиновых генов и локус-контролирующую область (LCR). *б)* Изменение экспрессии β -подобных глобиновых генов на разных стадиях развития человека. Каждая из глобиновых цепей, кодируемых этими генами, для образования гемоглобина в эритроцитах соединяется с α -глобиновой цепью. (*а* — по F. Grosveld, G. B. van Assendelft, D. R. Greaves and G. Kollias, *Cell* 51: 975–985, 1987. С разрешения Elsevier.)

рассматривать как результат сложных молекулярных вычислений, которые внутриклеточная сеть контроля генов производит в ответ на информацию, поступающую из окружения клетки. Мы обсудим эти проблемы позднее в главах 15 и 22, которые посвящены клеточной сигнализации и развитию организма, но сложность проблемы уже заметна даже на уровне отдельного генетического переключателя, регулирующего активность одного гена. Например, вполне обычным считается обнаружение гена млекопитающего с контролирующей областью длиной в 100 000 нуклеотидных пар, в которой множество модулей (каждый модуль содержит ряд регуляторных последовательностей, связывающихся с регуляторными белками) перемежается длинными отрезками иной некодирующей ДНК.

Один из самых хорошо изученных примеров сложной регуляторной области млекопитающих обнаружен у человека в гене β -глобина, который экспрессируется исключительно в эритроцитах. Экспрессию этого гена контролирует сложный набор регуляторных белков, одни из которых действуют как активаторы, другие как репрессоры (рис. 7.60). Концентрации (или активности) множества этих регуляторных белков изменяются в ходе развития организма, и только особая комбинация всех белков запускает транскрипцию гена. Ген β -глобина человека является частью кластера глобиновых генов (рис. 7.61, *а*), которые транскрибируются исключительно в клетках эритроидного ряда, то есть в клетках линии дифференцировки эритроцитов, но на различных стадиях развития млекопитающего (см. рис. 7.61, *б*). Ген ϵ -глобина

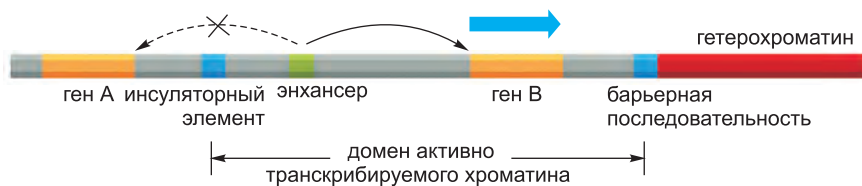


Рис. 7.62. Схематическая диаграмма, суммирующая свойства инсуляторов и барьерных последовательностей. Инсуляторы направленно блокируют действие энхансеров (слева), барьерные последовательности препятствуют распространению гетерохроматина (справа). Таким образом, регуляция гена В происходит должным образом, причем инсулятор гена В не допускает транскрипции гена А под влиянием энхансера гена В. Вероятный механизм функционирования барьерной последовательности представлен на рис. 4.47. До сих пор остается неизвестным, как инсуляторы реализуют свое воздействие. Один из возможных вариантов — служить «приманками», которые связывают аппарат транскрипции и не позволяют ему взаимодействовать с аутентичным энхансером. Другое предположение состоит в том, что инсуляторы «закоривают» ДНК в ядерной оболочке, таким образом мешая образованию петель ДНК между энхансером и «не его» промотором.

экспрессируется на ранних стадиях эмбрионального развития, γ -глобин — в поздний эмбриональный период и у плода, а δ и β — преимущественно во взрослом организме. Продукты генов немного различаются по кислородсвязывающим свойствам, соответствующим разным условиям оксигенации в эмбрионе, плоде и взрослом организме. Каждый из глобиновых генов обладает своим набором регуляторных белков, необходимых для включения этого гена в нужное время.

Глобиновые гены считаются необычными по той причине, что в соответствующее время и соответствующем месте они транскрибируются с чрезвычайно высокой интенсивностью. В самом деле, эритроциты представляют собой нечто большее, чем просто мешки гемоглобина, синтезированные клетками-предшественниками. Для достижения такого невероятно высокого уровня транскрипции глобиновые гены, кроме того что имеют свои индивидуальные регуляторные последовательности, разделяют еще контролирующую область, называемую *локус-контролирующей областью* (LCR; locus control region), которая расположена намного левее кластера генов и необходима для правильной экспрессии каждого из них (см. рис. 7.61, а). Значимость LCR можно оценить на примере пациентов с определенной формой талассемии — тяжелой наследственной формы анемии. У этих пациентов происходит делеция в β -глобиновом локусе, в ходе которой удаляются вся или часть LCR. Сам ген β -глобина и его соседняя регуляторная область остаются неповрежденными, но ген транскрипционно неактивен, даже в эритроидных клетках.

Подробности способа функционирования LCR не выяснены, но известно, что регуляторные белки, которые связываются с LCR, взаимодействуют посредством петлеобразования ДНК с белками, связанными с контролируемыми областями регулируемых ими глобиновых генов. Подобным образом белки, связанные на LCR, помогают привлекать комплексы перестройки хроматина, ферменты, модифицирующие гистоны, и компоненты аппарата транскрипции, которые действуют совместно со специфическими регуляторными областями каждого отдельного глобинового гена. Кроме того, LCR включает в себя *барьерную последовательность* (*barrier sequence*) (см. рис. 4.47), которая препятствует распространению соседнего

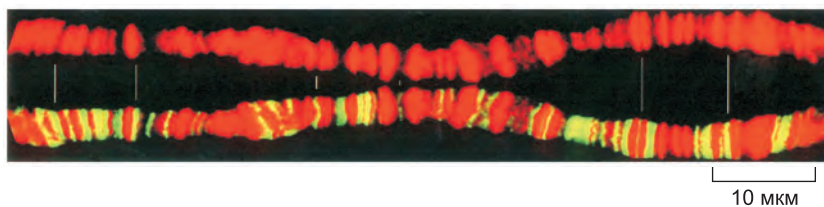


Рис. 7.63. Локализация инсультор-связывающего белка дрозофилы на политенных хромосомах. Для демонстрации картины распределения дисков политенную хромосому (описана в главе 4) окрашивали пропидий йодидом (красный). Диски имеют ярко-красный цвет, междисковые участки видны как темные промежутки (вверху). Места на этой политенной хромосоме, с которыми связывается специфический инсульторный белок, называемый BEAF, окрашены ярко-зеленым при помощи антител, направленных против этого белка (внизу). Белок BEAF преимущественно находится в междисковых областях, что отражает его роль в организации хромосом в структурные, так же как и в функциональные домены. Для удобства эти две микрофотографии одной и той же политенной хромосомы показаны как зеркальные отображения. (С любезного разрешения Uli Laemmli, из K. Zhao et al., *Cell* 81: 879–889, 1995. С разрешения Elsevier.)

гетерохроматина на β -глобиновый локус, как описано в главе 4. Эта двойная черта отличает глобиновый LCR от множества других регуляторных последовательностей в геноме человека; но глобиновые гены не единственные LCR-содержащие гены, так как локус-контролирующие области также есть у других интенсивно транскрибируемых клеточно-специфичных генов. Скорее, LCR следует рассматривать не как уникальные элементы ДНК со специализированными свойствами, а как чрезвычайно мощные комбинации более фундаментальных видов регуляторных последовательностей.

7.3.16. Инсульторы — это последовательности ДНК, препятствующие влиянию эукариотических регуляторных белков на отдаленные гены

У всех генов есть контролирующие области, которые диктуют, в какое время, при каких условиях и в какой ткани будет экспрессироваться ген. Также мы уже выяснили, что регуляторные белки могут действовать через очень протяженные отрезки ДНК. Тогда возникает вопрос: как контролирующие области различных генов не мешают друг другу? Другими словами, что не позволяет регуляторному белку, связанному на контролирующей области одного гена, внести неурядицу в транскрипцию соседних генов?

Для того чтобы избежать такого взаимовлияния, функционируют несколько типов элементов ДНК, разграничивающих геном на отдельные регуляторные домены. В главе 4 были описаны барьерные последовательности, которые препятствуют распространению гетерохроматина на гены, которые нужно экспрессировать. Вторым типом элементов ДНК, называемых «инсульторами», не дает энхансерам выйти из-под контроля и активировать неверные гены (рис. 7.62). Инсультор, очевидно, может блокировать связь между энхансером и промотором, но для этого он должен находиться между ними. Идентифицированы белки, которые связываются с инсульторами, но то, как они направленно нейтрализуют действие энхансеров, до сих пор остается тайной.

Несмотря на отсутствие подробной информации о механизмах их действия, считается, что места расположения инсуляторов и барьерных последовательностей в геноме расчленяют его на независимые домены, регулирующие гены и обладающие определенной структурой хроматина (рис. 7.63). Характерные черты этой организации могут быть наглядно показаны при помощи окрашивания целых хромосом специализированными белками, связывающими эти элементы ДНК.

Хотя хромосомы организованы в упорядоченные домены, которые препятствуют неразборчивому действию энхансеров, обнаружено, что существуют особые условия, при которых энхансер, расположенный на одной хромосоме, активирует ген, расположенный на второй хромосоме. Поразительный пример — регуляция обонятельных рецепторов млекопитающих. Обонятельные рецепторы представляют собой белки, экспрессируемые чувствительными нейронами, которые позволяют млекопитающим точно различать тысячи различных запахов (см. стр. 917). Например, человек обладает 350 генами обонятельных рецепторов, и они строго регулируются, так что только один из них экспрессируется в каждом чувствительном нейроне. Гены обонятельных рецепторов распределены среди множества разных хромосом, но энхансер у них — один на всех. Как только энхансер активирует ген рецептора, связавшись с его регуляторной областью, он остается прочно связанным, таким образом предотвращая активацию любых других рецепторных генов. Хотя многое нам остается неизвестным в этом механизме, он, без сомнения, указывает на крайнюю многогранность присущих эукариотической клетке стратегий регуляции транскрипции.

7.3.17. Генетические переключатели быстро эволюционируют

Мы выяснили, что контролирующие области эукариотических генов часто распределены вдоль длинных отрезков ДНК, тогда как контролирующие области прокариотических генов обычно собраны в кластеры вокруг точки начала транскрипции. Вполне вероятно, что плотная форма упаковки бактериальных генетических переключателей развилась из более протяженных форм в ответ на давление эволюционного отбора на бактерии, направленного на поддержание малого размера генома. Однако эта компрессия достается дорогой ценой, так как ограничивает сложность и приспособляемость контролирующего устройства. В отличие от этого, протяженная форма эукариотических контролирующих областей с отдельными регуляторными модулями, разделенными длинными отрезками спейсерной ДНК, упрощает перестановку регуляторных модулей в ходе эволюции как для создания новых регуляторных цепей, так и для изменения старых. Согласно главам 1 и 4 и тому, что будет еще отмечено в главе 22, как раз изменения в регуляции генов, а не приобретение новых генов в большинстве случаев служат основой разнообразия жизни на Земле. Выяснение истории того, как происходила эволюция современных контролирующих областей генов, представляет собой интереснейшую проблему для биологов с множеством подсказок, содержащихся в современных геномах.

Заключение

Регуляторные белки включают и выключают транскрипцию отдельных генов в клетках. У прокариот эти белки обычно связываются со специфическими последовательностями ДНК, расположенными вблизи точки начала транскрипции РНК-полимеразой, и в зависимости от природы регуляторного

белка и точного расположения его участка связывания относительно сайта инициации активируют или подавляют транскрипцию гена. Однако гибкость спирали ДНК также позволяет белкам, связанным на удаленных участках, влиять на РНК-полимеразу на промоторе посредством петлеобразования разделяющей их ДНК. Регулирование генов высших эукариот намного сложнее, что соответствует более крупному размеру генома и большому разнообразию образующихся типов клеток.

Один эукариотический ген обычно контролируется множеством регуляторных белков, связанных с последовательностями, которые могут находиться на расстоянии в тысячи нуклеотидных пар от промотора, направляющего транскрипцию гена. Эукариотические активаторы и репрессоры реализуют свое действие с помощью широкого набора разнообразных механизмов, которые в основном изменяют структуру хроматина и контролируют сборку общих факторов транскрипции, медиатора и РНК-полимеразы на промоторе. Время и место транскрипции каждого гена, так же как и интенсивность его транскрипции при различных условиях, определяется набором регуляторных белков, которые связываются с регуляторной областью этого гена.

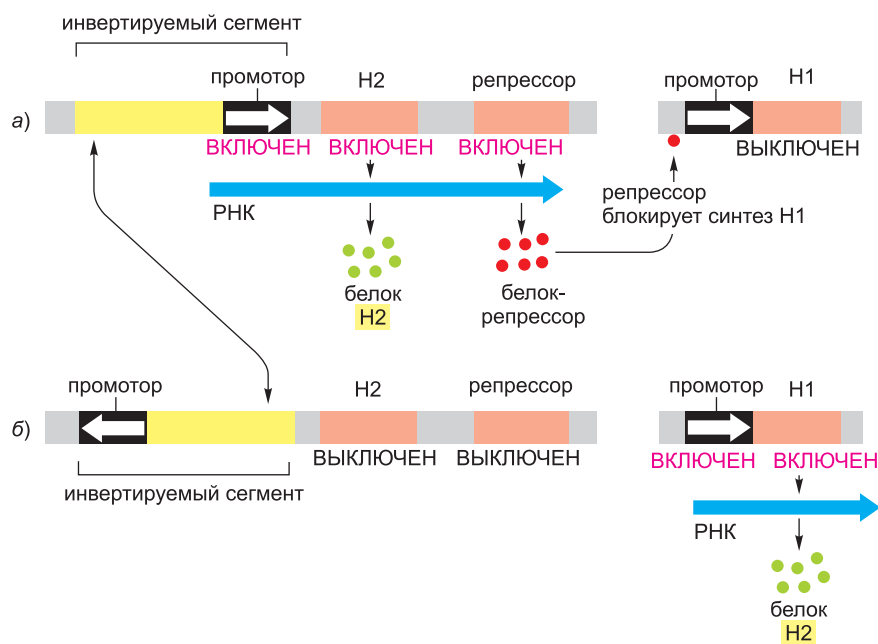


Рис. 7.64. Переключение экспрессии генов у бактерий путем инверсии ДНК. Альтернативная транскрипция двух генов флагеллина у бактерии *Salmonella* в результате простой сайт-специфической рекомбинации, приводящей к инверсии небольшого сегмента ДНК, содержащего промотор. а) Приняв одну ориентацию, промотор активирует транскрипцию гена флагеллина H2, так же как и белка-репрессора, блокирующего экспрессию гена флагеллина H1. б) Если промотор инвертирован, то он больше не включает экспрессию гена H2 или репрессора, а, вместо этого, экспрессируется ген H1, который, таким образом, больше не подавляется. Механизм рекомбинации активируется лишь изредка (примерно один раз на 10^5 клеточных делений). Следовательно, образование одного или другого типа флагеллина обычно строго наследуется в каждом клоне клеток.

7.4. Молекулярно-генетические механизмы, участвующие в образовании специализированных типов клеток

Все клетки должны обладать способностью включать и выключать гены в ответ на изменения окружающей среды, но клетки многоклеточного организма развили эту способность до крайней степени и с использованием высоко специализированных механизмов — чтобы образовывать организованный строй дифференцированных типов клеток. В частности, в многоклеточном организме, после того как клетка становится коммитированной к дифференцировке в специфический тип клеток, то этот выбор поддерживается во множестве последующих поколений, что означает, что клетка запоминает изменения в экспрессии генов, связанные с этим выбором. Явление *клеточной памяти (cell memory)* — это необходимое условие для формирования органических тканей и поддержания стабильности дифференцированных типов клеток. В отличие от этого, другие изменения экспрессии генов, встречающиеся у эукариот, так же как и у большинства бактерий, — лишь временные (транзистентные). Например, триптофановый репрессор выключает гены биосинтеза триптофана у бактерий только при наличии триптофана. Как только из среды удаляется триптофан, гены вновь включаются и у потомков клетки не сохраняется памяти о том, что их предшественники «сталкивались» с триптофаном. Даже у бактерий, однако, несколько типов изменений экспрессии генов могут стабильно наследоваться.

В этом разделе мы рассмотрим не только механизмы клеточной памяти, но также то, как устройства, регулирующие экспрессию генов, могут быть объединены для образования «логических цепей», посредством которых клетки интегрируют сигналы, отсчитывают время, запоминают события своего прошлого и регулируют уровни экспрессии целых хромосом. Начнем с рассмотрения некоторых из самых хорошо изученных генетических механизмов дифференцировки, действующих в клетках бактерий и дрожжей.

7.4.1. Перестройки последовательностей ДНК опосредуют смену фаз у бактерий

Как отмечалось выше, дифференцировка клеток высших эукариот обычно происходит без заметных изменений в последовательности ДНК. В отличие от этого, у некоторых прокариот стабильно наследуемый профиль (паттерн) регуляции генов достигается путем перестроек ДНК, активирующих или инактивирующих специфические гены. В связи с тем что изменение в последовательности ДНК будет точно скопировано в ходе последующих циклов репликации, измененное состояние активности гена унаследует всеми потомками клетки, в которой произошла перестройка. Однако некоторые из этих перестроек ДНК обратимы, так что случайные индивидуумы могут переключиться обратно на исходную конфигурацию ДНК. Результатом станет изменяющийся паттерн активности генов, что можно зафиксировать, наблюдая в течение длительных промежутков времени множество клеточных поколений.

Хорошо изученный пример этого механизма дифференцировки встречается у бактерий *Salmonella* и известен как **фазовая вариация (phase variation)**. Этот способ дифференцировки не имеет эквивалентов у высших эукариот, но может оказывать значительное воздействие на животных, так как болезнетворная бактерия

использует его для того, чтобы избежать обнаружения иммунной системой хозяина. Переключение экспрессии генов у *Salmonella* происходит путем случайной инверсии специфического участка ДНК размером 1000 нуклеотидных пар, что изменяет экспрессию белка клеточной поверхности флагеллина, для которого у бактерии есть 2 различных гена (рис. 7.64). Фермент сайт-специфической рекомбинации катализирует инверсию и таким образом изменяет ориентацию промотора, расположенного внутри инвертированного сегмента ДНК. Если промотор находится в одной ориентации, бактерия синтезирует один тип флагеллина, а если в другой ориентации — синтезируется другой тип. Поскольку инверсии происходят очень редко, то все клоны бактерий несут тот или иной тип флагеллина.

Весьма вероятно, развитие фазовой вариации в ходе эволюции произошло по причине того, что она защищает популяцию бактерий от иммунного ответа организма хозяина-позвоночного. Если у хозяина вырабатываются антитела к одному типу флагеллина, то несколько бактерий, флагеллин которых оказался измененным вследствие инверсии гена, смогут выжить и размножиться.

У бактерий из природных популяций очень часто наблюдается фазовая вариация по одному или нескольким фенотипическим признакам. Подобные «нестабильности» исчезают с течением времени у стандартных лабораторных штаммов, и поэтому лежащие в их основе механизмы изучены только в нескольких случаях. Не все из них связаны с инверсией ДНК. Например, бактерия, вызывающая у человека гонорейю (*Neisseria gonorrhoeae*), избегает действия иммунной системы благодаря наследуемому изменению свойств клеточной поверхности, возникающему вследствие генной конверсии (описана в главе 5), а не инверсии. Этот механизм основан на переносе последовательностей ДНК из библиотеки молчащих «кассет генов» на участок генома, где происходит экспрессия генов. Его преимущество заключается в создании множества вариантов основного белка поверхности бактериальной клетки.

7.4.2. Набор регуляторных белков определяет тип клеток у почкующихся дрожжей

По причине легкости выращивания и проведения различных генетических экспериментов над дрожжами, они послужили модельными организмами для изучения механизмов контроля генов в эукариотических клетках. Обычные пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* привлекли к себе особый интерес из-за их способности дифференцироваться в три различных типа клеток. Дрожжи — это одноклеточные эукариоты, которые могут существовать как в гаплоидном, так и в диплоидном состоянии. Диплоидные клетки образуются в ходе процесса, известного как **спаривание (mating)**, при котором две гаплоидные клетки сливаются. Чтобы это произошло, клетки должны различаться по *типу спаривания* (полу). У дрожжей существуют два типа спаривания: **α** и ****a****. Клетки двух типов приспособлены для спаривания друг с другом: каждая из них образует специфическую диффундирующую сигнальную молекулу (фактор спаривания) и специфический белок-рецептор клеточной поверхности; благодаря им клетки противоположного типа спаривания способны узнавать друг друга и сливаться. Образовавшиеся в результате диплоидные клетки, обозначаемые **a/α** , отличаются от каждого из родительских типов: они не способны спариваться, но при недостатке питательных веществ могут формировать споры (спорулировать), которые при мейозе дают на-

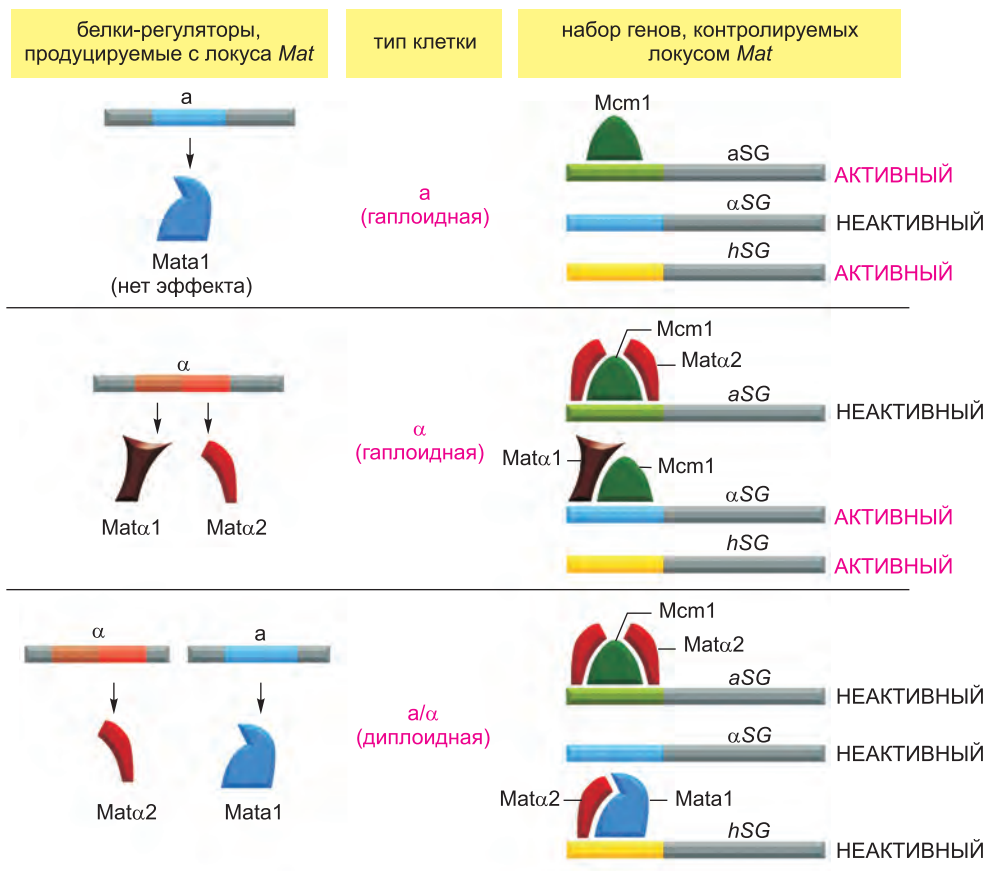


Рис. 7.65. Контроль типа клеток у дрожжей. Три регуляторных белка Mata α 1, Mata α 2 и Mata1, которые синтезируются на локусе *Mat*, определяют тип клеток у дрожжей. В гаплоидных клетках типа а, в гаплоидных клетках типа α и в диплоидных клетках (типа а/ α) транскрибируются различные наборы генов. Гаплоидные клетки экспрессируют либо набор α -специфических генов (α SG), либо набор а-специфических генов (aSG), плюс набор гаплоид-специфических генов (hSG). В диплоидных клетках ни один из этих генов не экспрессируется. Регуляторные белки *Mat* контролируют многие заданные гены в каждом типе клеток, связываясь в различных комбинациях со специфическими регуляторными последовательностями, расположенными перед этими генами. Следует отметить, что белок Mata α 1 является белком-активатором, тогда как Mata α 2 – это белок-репрессор. Оба работают в сочетании с регуляторным белком Mcm1, который есть у всех трех типов клеток. В диплоидной клетке Mata α 2 и Mata1 образуют гетеродимер (изображен в деталях на рис. 7.21), который выключает набор генов (в том числе ген, кодирующий белок-активатор Mata α 1), отличающийся от того, который выключают белки Mata α 2 и Mcm1. Эта относительно простая система регуляторных белков — пример комбинаторного контроля экспрессии генов.

чало гаплоидным клеткам (описано в главе 21).

Механизмы, обуславливающие образование и поддержание трех этих клеточных типов, иллюстрируют несколько из ранее рассмотренных стратегий, приводящих к изменению профиля экспрессии генов. Тип спаривания гаплоидной клетки определяется единственным локусом, **локусом типа спаривания (mating-type locus, *Mat*)**, который в клетке а-типа кодирует один регуляторный белок, Mata1,

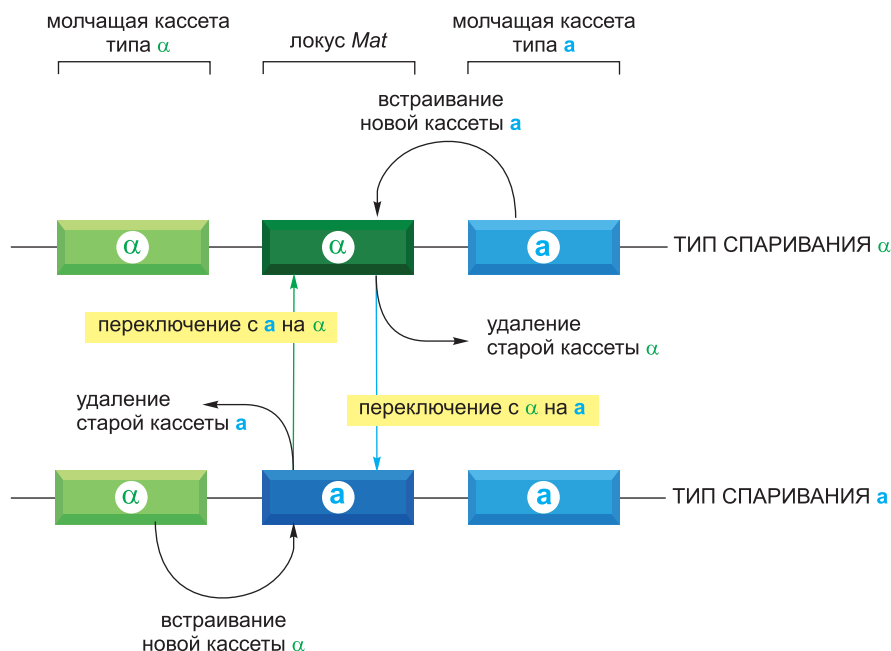


Рис. 7.66. Кассетная модель переключения типа спаривания у дрожжей. Кассетное переключение происходит в ходе процесса конверсии гена с участием специализированного фермента (НО-эндонуклеазы), которая вводит двухцепочечный разрез в специфическую последовательность ДНК локуса *Mat*. ДНК вблизи разреза затем удаляется и заменяется копией молчащей кассеты, определяющей противоположный тип спаривания. Механизм этой специализированной формы генной конверсии схож с репарацией двухцепочечных разрывов, описанной в главе 5 (стр. 308–309).

а в α -клетках — два регуляторных белка, *Mata1* и *Mata2*. Белок *Mata1* никак не проявляет себя в гаплоидных клетках **a**-типа, которые его синтезируют, но становится важным в дальнейшем — в диплоидной клетке, образующейся в результате спаривания. В отличие от *Mata1*, белок *Mata2* действует в α -клетках как репрессор транскрипции, который выключает **a**-специфические гены, тогда как белок *Mata1* выступает в роли активатора транскрипции, включая α -специфические гены. После слияния клеток двух типов спаривания комбинация регуляторных белков *Mata1* и *Mata2* обуславливает совершенно новый паттерн экспрессии генов, отличный от родительских. На рис. 7.65 проиллюстрирован механизм, с помощью которого специфические гены, ответственные за тип спаривания, по-разному экспрессируются в трех типах клеток. Это один из первых идентифицированных примеров комбинаторного контроля генов, который остается одним из самых изученных на молекулярном уровне.

У большинства лабораторных штаммов *S. cerevisiae* **a**- и α -типы клеток стабильно поддерживаются на протяжении множества клеточных делений, но некоторые штаммы, выделенные из природных популяций, могут многократно переключаться между этими типами клеток при помощи механизма перестройки генов, по результатам напоминающим перестройку ДНК у *N. gonorrhoeas*; однако точный механизм характерен, по-видимому, только для дрожжей. В хромосоме дрожжей по обоим

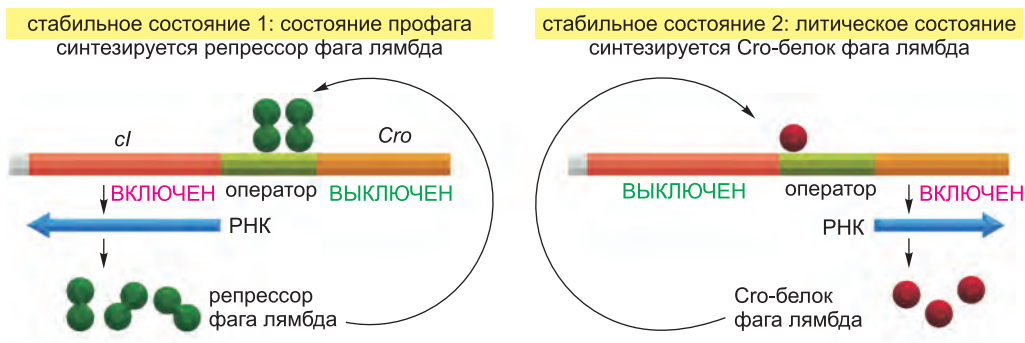


Рис. 7.67. Упрощенный вариант регуляторной системы, определяющей способ роста бактериофага лямбда в хозяйских клетках *E. coli*. В стабильном состоянии 1 (состояние профага) синтезируется белок-репрессор, который активирует свой собственный синтез и выключает синтез ряда других белков бактериофага, включая белок Cro. В состоянии 2 (литическое состояние) синтезируется белок Cro, который выключает синтез белка-репрессора. В результате образуется много фаговых белков, вирусная ДНК свободно реплицируется в клетке *E. coli*, формируется много новых частиц бактериофага, что в итоге приводит к гибели клетки. Этот пример показывает, как два регуляторных белка могут быть объединены цепочкой событий, приводящих к двум статусам наследования. Репрессор фага лямбда и белок Cro узнают оператор через мотив спираль-виток-спираль (см. рис. 7.11).

сторонам локуса *Mat* располагается по молчащему локусу, кодирующему регуляторные белки, определяющие тип спаривания: молчащий локус с одной стороны кодирует *Mata1* и *Mata2*, молчащий локус с другой стороны — *Mata1*. Почти через каждое клеточное деление активный ген в локусе *Mat* вырезается и заменяется вновь синтезированной копией молчащего локуса, определяющего противоположный тип спаривания. Поскольку при изменении из активной «ячейки» удаляется один ген, а на его место встает другой, этот механизм называют *кассетным механизмом*. Изменение обратимо, так как при удалении первоначального гена из локуса *Mat* в геноме остается его молчащая копия. Новые копии ДНК, синтезированные с молчащих генов, действуют как одноразовые кассеты, которые по очереди вставляются в локус *Mat*, служащий в качестве «проигрывателя» (рис. 7.66).

Молчащие кассеты упакованы в специализированную форму хроматина и поддерживаются в транскрипционно неактивной форме. Исследование этих кассет, которое продолжается уже почти 40 лет, дало многие из ключевых представлений о роли структуры хроматина в регуляции генов.

7.4.3. Два белка, подавляющие синтез друг друга, определяют наследственный статус бактериофага лямбда

Как мы выяснили в начале данной главы, ядро одной дифференцированной клетки содержит всю необходимую генетическую информацию для построения всего организма позвоночного или растения. Это исключает возможность того, что основным механизмом клеточной дифференцировки у этих высших эукариот будет необратимое изменение в последовательности ДНК, хотя подобные изменения встречаются при дифференцировке лимфоцитов (описано в главе 25). *Обратимые* изменения последовательности ДНК, которые напоминают недавно описанные для *Salmonella* и дрожжей, в принципе, все еще могут быть ответственны за некоторые

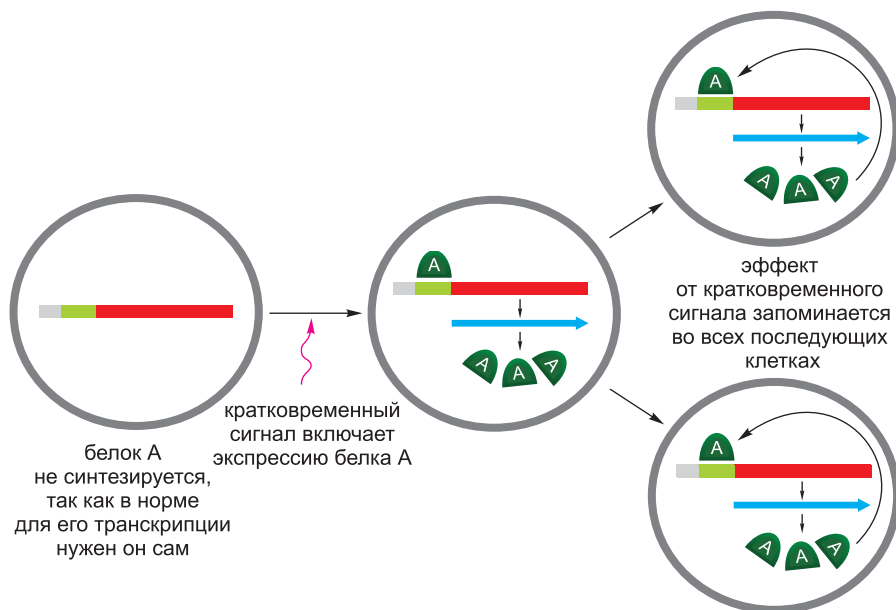


Рис. 7.68. Схематическое изображение, показывающее, как петля положительной обратной связи может создавать клеточную память. Белок А — регуляторный белок, активирующий собственную транскрипцию. Все потомки этой клетки будут, следовательно, «помнить», что клетка-предшественник испытала действие кратковременного (транзиентного) сигнала, инициировавшего синтез белка.

из наследуемых изменений экспрессии генов, наблюдаемых у высших организмов, но в настоящее время нет доказательств того, что подобные механизмы широко используются.

Другие механизмы, уже затронутые в этой главе, однако, также способны участвовать в создании паттернов регуляции генов, которые могут передаваться по наследству последующим клеточным поколениям. Один из самых простых примеров — переключатель, присущий бактериальному вирусу (бактериофагу) лямбда: вирус как бы находится в позиции «туда-сюда» (flip-flop) между двумя стабильными самоподдерживающимися состояниями. Этот тип переключателя можно рассматривать как прототип похожих, но более сложных переключателей, которые действуют в ходе развития высших эукариот.

Ранее упоминалось, что при благоприятных условиях бактериофаг лямбда может встраиваться в ДНК клетки *E. coli* и автоматически реплицироваться каждый раз, когда делится бактерия (состояние профага, или лизогенный путь — *прим. ред.*). В другом варианте вирус может размножаться в цитоплазме, приводя к гибели своего хозяина (литический путь — *прим. ред.*) (см. рис. 5.78). Белки, кодируемые геномом бактериофага, принимают участие в переключении между двумя этими состояниями. Геном бактериофага содержит всего около 50 генов, которые совершенно по-разному транскрибируются в двух состояниях. Например, вирус, который собирается интегрироваться в геном, должен синтезировать белок *интегразу*, необходимый для встраивания ДНК бактериофага в хромосому бактерии, но должен подавить образование вирусных белков, ответственных за размножение вируса. После того как установился тот или другой тип транскрипции, он уже

стабильно поддерживается.

Центром этого сложного механизма переключения регуляции генов являются два регуляторных белка, синтезируемых вирусом: **белок-репрессор фага лямбда** (белок cI; **lambda repressor protein**), с которым мы уже сталкивались, и **белок Cro (Cro protein)**. Эти белки подавляют синтез друг друга — условие, приводящее к существованию только двух стабильных состояний (**рис. 7.67**). В состоянии 1 (*состояние профага*) репрессор фага лямбда занимает оператор, блокируя синтез белка Cro и при этом активируя свой собственный синтез. В состоянии 2 (*литическое состояние*) белок Cro занимает другой участок на операторе, блокируя синтез репрессора, но делая возможным свой собственный синтез. В состоянии профага большая часть ДНК стабильно включенного в геном клетки-хозяина бактериофага не транскрибируется. В литическом состоянии ДНК интенсивно транскрибируется, реплицируется, упаковывается в новые вирусные частицы, которые высвобождаются при лизисе клетки хозяина.

Если клетки хозяйского штамма растут хорошо, то бактериофаг, скорее всего, примет состояние 1, что позволит его ДНК размножаться вместе с хромосомой хозяина. Если клетка, несущая профаг, оказывается ослабленной, то встроенный вирус переходит из состояния 1 в состояние 2, чтобы размножиться в цитоплазме клетки и быстро выйти из нее. Этот переход запускается ответом клетки-хозяина на повреждение ДНК, которое инактивирует белок-репрессор. Однако при отсутствии таких сигналов репрессор фага лямбда выключает образование белка Cro и включает свой собственный синтез, и эта *петля положительной обратной связи (positive feedback loop)* помогает поддерживать стадию профага.

7.4.4. Простые генетические регуляторные цепи могут использоваться для создания запоминающих устройств

Петли положительной обратной связи служат основой для простой общей стратегии клеточной памяти, то есть для создания и поддержания наследуемых

паттернов экспрессии генов. На **рис. 7.68** показан основной принцип, разложенный на самые необходимые компоненты. Эукариотические клетки используют множество вариантов этой простой стратегии. Например, несколько регуляторных белков, участвующих в образовании плана строения тела дрозофилы (описано в главе 22), стимулируют свою собственную транскрипцию, тем самым создавая петлю положительной обратной связи, способствующую их непрерывному синтезу; в то же время многие из этих белков подавляют транскрипцию генов, кодирующих дру-

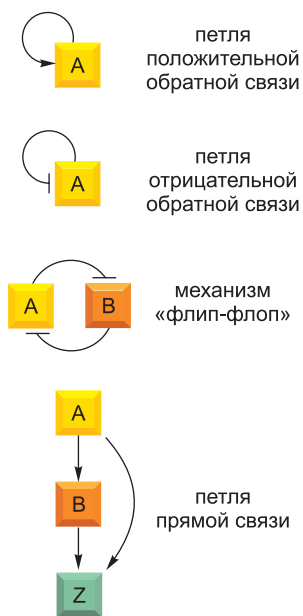


Рис. 7.69. Распространенные типы сетевых мотивов в транскрипционных цепях. А и В представляют регуляторные белки, стрелки обозначают позитивный транскрипционный контроль, а линии с чертой изображают негативный транскрипционный контроль. Более подробные описания петель положительной обратной связи и механизмов «флип-флоп» («туда-сюда») даны соответственно на рис. 7.70 и 7.71. В петлях прямой связи А и В представляют регуляторные белки, и они оба активируют транскрипцию целевого гена Z.

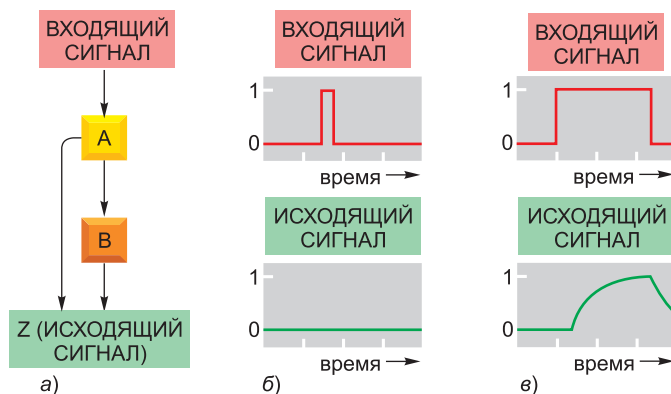


Рис. 7.70. Как петля прямой связи может измерять длительность сигнала. а) В этом теоретическом примере оба белка-активатора А и В необходимы для транскрипции гена Z, и белок А становится активным, только если есть входной сигнал. б) Если входной сигнал, направленный на белок А, короткий, то А активен недостаточно долго для того, чтобы накопился белок В, — и ген Z не транскрибируется. в) Если поданный на А-сигнал устойчив, то белок В накапливается, белок А остается активным и Z транскрибируется. Подобная система позволяет клетке игнорировать быстрые колебания входного сигнала и отвечать только на его устойчивые уровни. Эта стратегия может быть использована, например, чтобы различать случайный шум и истинный сигнал.

Показанное здесь поведение рассчитано для одного определенного набора значений параметров, описывающих количественные свойства А, В, Z и их синтез. С другими значениями этих параметров петли прямой связи могут, в принципе, выполняться другие типы «расчетов». В клетках было обнаружено множество петель прямой связи, и их теоретический анализ помогает исследователям оценить и впоследствии проверить различные пути их возможного функционирования. (Адаптировано из S. S. Shen-Orr, R. Milo, S. Mangan and U. Alon, *Nat. Genet.* 31: 64–68, 2002. С разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

гие важные регуляторные белки. Таким образом, несколько регуляторных белков, взаимно влияющих на синтез и деятельность друг друга, могут определять сложный паттерн наследственности.

7.4.5. Транскрипционные цепи позволяют клетке выполнять логические операции

Простые генетические переключатели могут быть объединены для создания всевозможных видов контролирующих устройств, так же как в компьютере простые электронные переключательные элементы могут быть соединены друг с другом, чтобы выполнять множество типов операций. Изучение регуляторных цепей выявило, что определенные простые типы структур раз за разом обнаруживаются в клетках очень разных видов. Например, *петли* положительной и *отрицательной обратной связи* (*negative feedback loop*) в особенности распространены во всех клетках (**рис. 7.69**). Как отмечалось выше, первый тип петель представляет собой простое запоминающее устройство, второй же часто используется для поддержания экспрессии гена в пределах стандартного уровня независимо от колебаний биохимических условий внутри клетки. Например, допустим, белок-репрессор связывается с регуляторной областью своего гена и приводит в действие сильную отрицательную обратную связь. Она такова, что если концентрация белка-репрессора выше некоторого критического значения (определяемого его средством к своему ДНК-связывающему участку), то

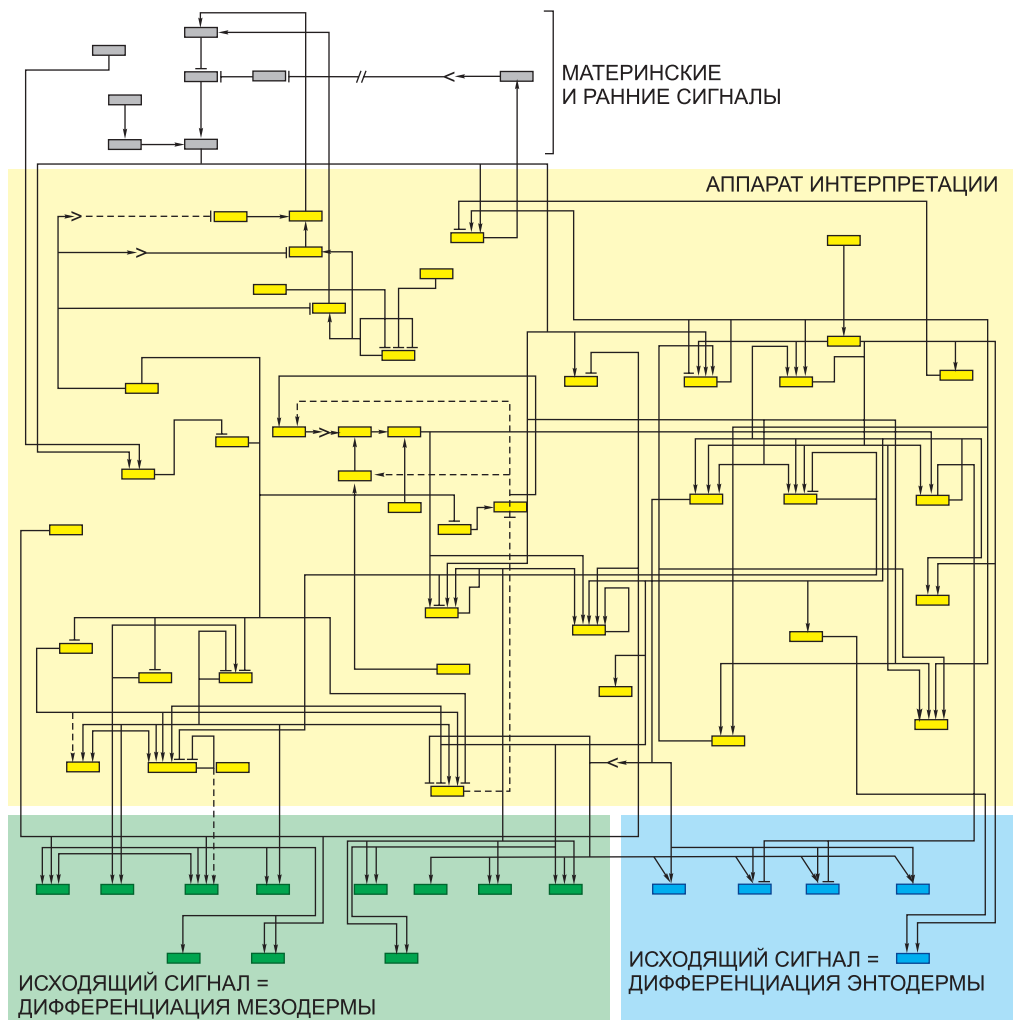


Рис. 7.71. Чрезвычайно сложная генетическая цепь, определяющая формирование части развивающегося эмбриона морского ежа. Каждый небольшой цветной прямоугольник представляет собой индивидуальный ген. Желтые гены кодируют регуляторные белки, зеленые и синие кодируют белки, придающие соответственно клеткам мезодермы и энтодермы их специализированные свойства. Гены, изображенные серым цветом, очень активны у матери и посылают яйцу сигналы, необходимые для его правильного развития. Стрелками изображены примеры активации регуляторным белком транскрипции другого гена. Линии, заканчивающиеся чертой, указывают на случаи репрессии гена.

транскрипция происходит с очень низкой интенсивностью, а если ниже этого значения — с очень высокой. Тогда концентрация белка будет поддерживаться близкой к критическому значению, так как любое обстоятельство, вызывающее падение ниже этого значения, приведет к крутому взлету скорости синтеза, а любое повышение сверх этого значения вызовет выключение синтеза. Однако подобные корректировки займут некоторое время, так что внезапное изменение условий вызовет значительное нарушение в экспрессии гена, хотя оно будет кратковременным. Как описано

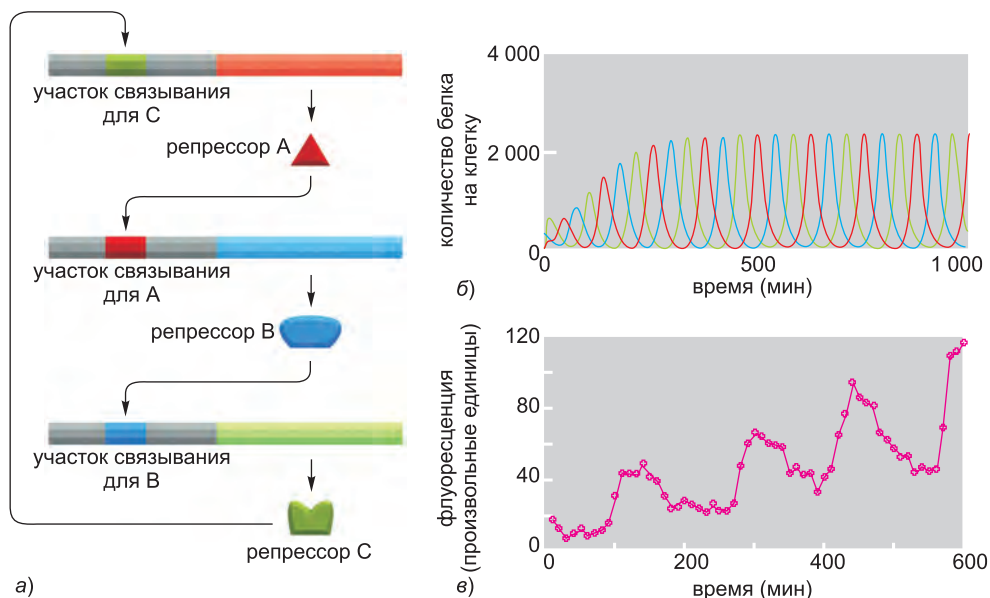


Рис. 7.72. Простой генный осциллятор, или «часы», разработанные в лаборатории. а) Используя технологию рекомбинантных ДНК, создали три искусственных гена. Они кодируют разные бактериальные белки-репрессоры, и каждый ген контролируется продуктом другого гена из этого набора, так что образуется регуляторная цепь, как показано на рисунке. В качестве репрессоров (обозначены как А, В и С на схеме) взяты репрессор лактозного оперона (см. рис. 7.39), репрессор тетрациклинового оперона, регулирующего гены в ответ на действие тетрациклина, и репрессор фага лямбда (см. рис. 7.67). При введении в бактериальную клетку три гена образуют запаздывающую цепь отрицательной обратной связи. Например, продукт гена А, действуя через гены В и С, косвенно ингибирует свою собственную экспрессию. Запаздывающая отрицательная обратная связь порождает колебания. б) Компьютерная модель колебаний. Клетка раз за разом проходит цикл ряда состояний: экспрессируется белок А, затем В, затем С, а затем снова А и т.д. При этом поочередно каждый генный продукт избегает репрессии, налагаемой предыдущим продуктом, и подавляет экспрессию следующего. в) Реальные колебания, наблюдаемые в клетке, содержащей три искусственных гена из а, как показано с помощью флуоресцентного репортера экспрессии одного из этих генов. Возрастающая амплитуда флуоресцентного сигнала отражает рост бактериальной клетки. (Адаптировано из М. В. Elowitz and S. Leibler, *Nature* 403: 335–338, 2000. С разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

в главе 15, система отрицательной обратной связи может, таким образом, работать как индикатор внезапных изменений. Как вариант, если в петле обратной связи происходит запаздывание сигнала, то результатом этого могут быть спонтанные колебания в экспрессии гена (см. рис. 15.28). Количественные характеристики петли отрицательной обратной связи определяют, какому из этих возможных вариантов будет соответствовать ее поведение.

Начиная с двух и более генов, сложность возможного диапазона контролируемых цепей и их особенностей быстро возрастает. Мы выяснили, что бактериофаг лямбда является примером обычного типа цепи из двух генов, который может переключаться между экспрессией одного и экспрессией другого генов. Другой распространенный принцип построения цепи называется *петлей прямой связи* (*feed-forward loop*) (см. рис. 7.69). В частности, она может служить фильтром,

реагирующим на продолжительные входные сигналы, но игнорирующим короткие (рис. 7.70). Клетка может использовать эти различные сетевые мотивы как миниатюрные логические устройства для обработки информации удивительно сложным путем.

Простые типы только что приведенных устройств в типичной эукариотической клетке объединяются, образуя чрезвычайно сложные цепи (рис. 7.71). Каждая клетка в развивающемся многоклеточном организме обладает этим аппаратом контроля транскрипции и должна, по существу, использовать запутанную систему взаимосвязанных транскрипционных переключателей для вычисления своего поведения в любой момент времени в ответ на множество различных входящих сигналов, полученных в прошлом и настоящем. Мы только начинаем понимать, как изучать такие сложноорганизованные внутриклеточные системы контроля. На самом деле, без количественной информации намного более точной и полной по сравнению с той, которой мы пока обладаем, невозможно предсказать поведение системы, — такой, как например, представленная на рис. 7.71, — тут одной принципиальной схемой не обойтись.

7.4.6. Синтетическая биология создает новые устройства из существующих биологических частей

Наше обсуждение было сосредоточено на транскрипционных цепях, встречающихся в природе, но информацию можно получить также при разработке и конструировании искусственных цепей в лабораторных условиях с последующим введением их в клетки с целью изучения их поведения. Например, на рис. 7.72 показано, как созданная генно-инженерным путем бактериальная клетка может переключаться в установленном порядке между тремя состояниями, работая, таким образом, как осциллятор или простой часовой механизм. Конструирование подобных новых устройств из существующих биологических частей часто называют *синтетической биологией* (*synthetic biology*). Ученые используют данный подход, чтобы проверить, правильно ли они поняли свойства компонентов, составляющих систему. Если это так, то они будут способны соединить эти части по-новому и точно предсказать характеристики нового устройства. Тот факт, что эти предсказания обычно не оправдываются, свидетельствует о том, как далеко мы находимся от истинного понимания детальной работы клетки. В наших знаниях много крупных пробелов, для заполнения которых потребуются умелое применение количественных подходов физических наук к изучению сложных биологических систем.

7.4.7. В основе циркадных часов лежат петли обратной связи, регулирующие экспрессию генов

Жизнь на Земле эволюционировала в условиях существования суточного цикла дня и ночи, и многие современные организмы, начиная от архей и заканчивая растениями и человеком, приобрели внутренний ритм, диктующий различное поведение в разное время суток. Формы этого поведения варьируют от циклического изменения активности метаболических ферментов у грибов до сложноорганизованных циклов сна и бодрствования у человека. Внутренние осцилляторы, контролирующие подобные суточные ритмы, называются циркадными часами (или циркадными ритмами).

Организм, располагая своими собственными циркадными часами, может пред-

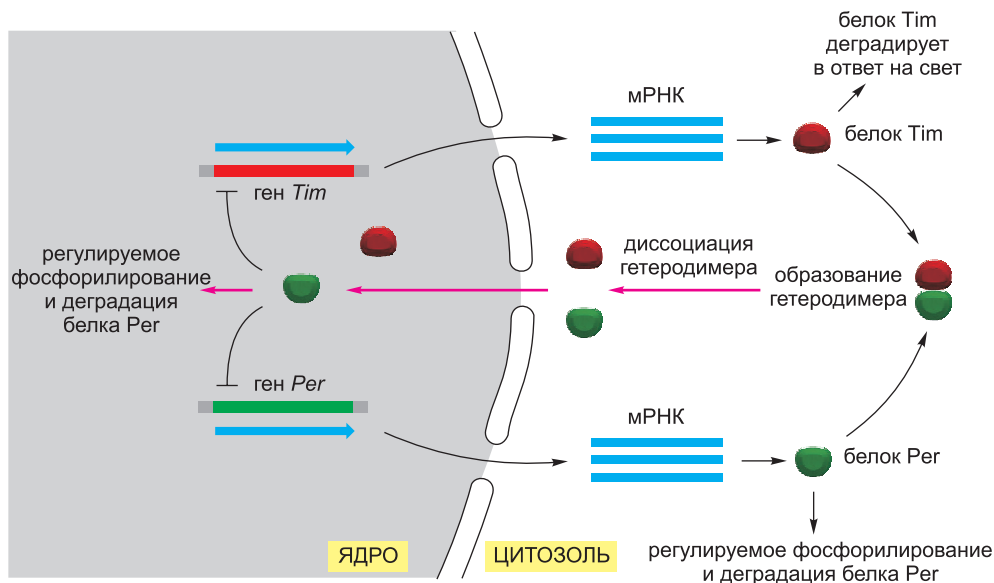


Рис. 7.73. Упрощенная схема механизма работы циркадных часов в клетках дрозофилы. Основной особенностью часов является периодическое накопление и распад двух регуляторных белков – Tim (сокращенно от *timeless*, название дано на основе фенотипа генной мутации) и Per (сокращенно от *period*). Трансляция мРНК, кодирующих эти белки, происходит в цитозоле, и, когда достигается критическая концентрация каждого белка, образуется гетеродимер. После некоторой задержки по времени гетеродимер диссоциирует, и белки Tim и Per экспортируются в ядро, где они регулируют ряд генных продуктов, опосредующих действие часов. Попав в ядро, Per также подавляет экспрессию генов *Tim* и *Per*, что приводит к созданию системы обратной связи, вызывающей снижение концентраций белков Tim и Per. Кроме этой транскрипционной обратной связи, часы также зависят от ряда других белков. Например, контролируемая деградация белка Per, отмеченная на схеме, задерживает периодическое накопление белков Tim и Per — ключевых в работе часов. Этапы, на которые накладываются специфические задержки по времени, показаны красным.

Подведение (или сброс) часов происходит в ответ на новые циклы дня и ночи. Большинство клеток дрозофилы не обладают настоящими фоторецепторами, однако свет распознается внутриклеточными флавопротеинами, также называемыми криптохромами. В присутствии света эти белки связываются с белком Tim и вызывают его расщепление, таким образом, сбрасывая ход часов. (Адаптировано из J. C. Dunlap, *Science* 311: 184–186, 2006. С разрешения AAAS.)

видеть регулярные суточные изменения окружающей его среды и заранее предпринимать соответствующие действия. Конечно, внутренние часы не могут быть идеально точными, и поэтому они должны обладать способностью «сбрасываться» под действием внешних сигналов, например дневного света. Таким образом, циркадные часы будут идти даже при отсутствии сигналов окружающей среды (смена дня и ночи), но период свободно текущего ритма в основном составляет немного меньше или немного больше 24 часов. Внешние сигналы о времени суток вызывают небольшие корректировки в настройках хода часов, чтобы организм находился в синхронности с окружающей средой. После более сильных сдвигов циркадные циклы постепенно сбрасываются (подводятся) под действием нового цикла смены дня и ночи, что может подтвердить любой, кто испытывал на себе перелет через несколько часовых поясов.

Вполне можно ожидать, что циркадные часы у такого создания, как человек, будут сами по себе сложным многоклеточным устройством, в котором задействованы разные группы клеток, ответственные за различные части осцилляторного механизма. Поразительно, но оказывается, что почти у всех организмов, включая человека, хронометрами служат отдельные клетки. Таким образом, часы, действующие внутри каждого участника специализированной группы клеток мозга (клетки в супрахиазматическом ядре гипоталамуса), контролируют наши суточные циклы сна и бодрствования, температуру тела и высвобождение гормонов. Даже если выделить эти клетки из мозга и рассеять на поверхности культуральной чашки, они будут продолжать осциллировать по отдельности, демонстрируя циклическую картину экспрессии генов с периодом примерно в 24 часа. В организме эти клетки получают нервные сигналы от сетчатки, подгоняющие их колебания к суточному циклу дня и ночи, и пересылают информацию о времени суток в другую область мозга — эпифиз, который передает сигналы времени остальному телу путем высвобождения гормона мелатонина в соответствии с ходом часов.

Клетки супрахиазматического ядра играют центральную роль как хронометры у млекопитающих, но в теле млекопитающих это далеко не единственные клетки, которые обладают внутренним циркадным ритмом или способностью «сбрасываться» в ответ на дневной свет. Подобным же образом у дрозофилы много различных типов клеток, включая клетки груди, брюшка, антенны, ноги, крыла и семенника, продолжают отсчитывать циркадный цикл после отделения от тела мухи. Часы в этих изолированных тканях, как и в клетках супрахиазматического ядра, могут сбрасываться под действием налагаемых внешних циклов дня и ночи.

Таким образом, работа циркадных часов представляет собой фундаментальную проблему клеточной биологии. Пока не известны все детали, но в ходе изучения большого разнообразия организмов уже выявлены многие из основных принципов и молекулярных компонентов биологических часов. Что касается животных, большая часть известной информации была получена при исследовании мутаций дрозофилы: эти мутации приводили к тому, что ее циркадные часы шли быстрее или медленнее или совсем не работали. В результате проведенных исследований пришли к открытию, что в циркадных часах различных млекопитающих задействовано множество одних и тех же компонентов.

Механизм циркадных часов дрозофилы вкратце изображен на **рис. 7.73**. «Сердце» этого механизма — транскрипционная петля обратной связи, в которую встроен механизм задержки по времени: накопление определенных ключевых генных продуктов выключает транскрипцию их генов, но с задержкой — так что, грубо говоря, клетка колеблется между состоянием, когда присутствуют продукты генов, а транскрипция выключена, и состоянием, когда продуктов нет и транскрипция включена.

Несмотря на сравнительную простоту основного принципа работы циркадных часов, его реализация — сложный процесс. Одна из причин его сложности состоит в том, что часы должны быть «забуферены», то есть устойчивы к изменениям температуры, что обычно ускоряет или замедляет ассоциацию макромолекул. Кроме того, часы должны идти точно и при этом допускать возможность сброса. И хотя до сих пор не ясно, как, несмотря на изменения температуры, биологические часы идут с постоянной скоростью, мы знаем, что механизм сбрасывания часов у дрозофилы основан на светозависимом разрушении одного из ключевых регуляторных белков (см. рис. 7.73).

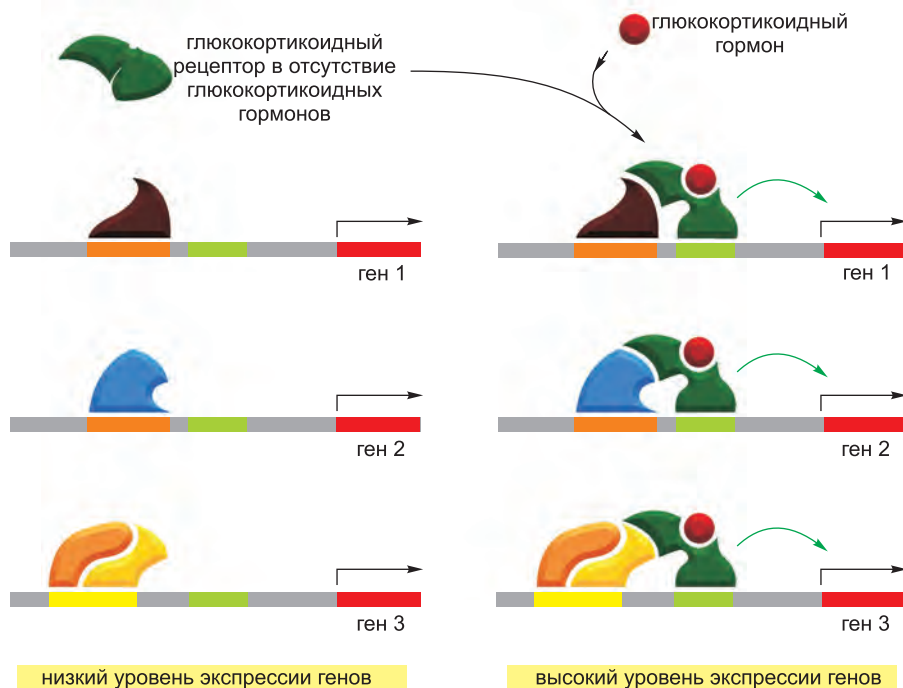


Рис. 7.74. Один регуляторный белок может координировать экспрессию нескольких разных генов. Действие глюкокортикоидного рецептора представлено в виде схемы. Слева находится серия генов с разными белками-активаторами, связанными с их регуляторными областями. Однако сами по себе эти связанные белки не являются достаточными для полной активации транскрипции. Справа показан эффект добавления дополнительного регуляторного белка, глюкокортикоидного рецептора в комплексе с глюкокортикоидным гормоном, который может связываться с регуляторной областью каждого гена. Глюкокортикоидный рецептор завершает комбинацию регуляторных белков, необходимых для максимальной инициации транскрипции, и гены теперь активируются как набор. Если гормона нет, глюкокортикоидный рецептор не может связаться с ДНК.

Кроме активации экспрессии генов, связанная с гормоном форма глюкокортикоидного рецептора подавляет транскрипцию определенных генов в зависимости от регуляторных белков, уже находящихся на их контролируемых областях. Действие глюкокортикоидного рецептора на любой заданный ген, следовательно, зависит от типа клетки, содержащихся в ней регуляторных белков и регуляторной области гена. Структура ДНК-связывающей части глюкокортикоидного рецептора показана на рис. 7.16.

7.4.8. Один регуляторный белок может координировать экспрессию целого набора генов

Клеткам необходимо уметь включать и выключать гены по отдельности, но им также необходимо согласовывать экспрессию больших групп разных генов. Например, когда покоящаяся эукариотическая клетка получает сигнал о начале деления, множество до сих пор неэкспрессируемых генов одновременно включаются, чтобы запустить события, приводящие в конечном итоге к делению клетки (описано в главе 17). Один из способов координации экспрессии группы генов, применяемый бактериями, состоит в объединении их в *оперон*, находящийся под контролем одно-

го промотора (см. рис. 7.34). Однако у эукариот каждый ген транскрибируется с отдельного промотора.

В таком случае как эукариоты координируют экспрессию генов? Это является особенно важным вопросом в связи с тем, что, как отмечалось выше, большинство эукариотических регуляторных белков действует как часть «комитета» регуляторных белков, и для экспрессии гена на должном уровне в правильной клетке, в правильное время в ответ на соответствующий сигнал необходимы все его члены. Тогда как эукариотическая клетка может быстро и решительно включать и выключать целые группы генов?

Ответ на этот вопрос следующий: несмотря на то, что контроль экспрессии генов представляет собой комбинаторный процесс, действие единственного регуляторного белка все же может быть решающим для выключения или включения определенного гена — просто потому, что этот белок завершает комбинацию белков,

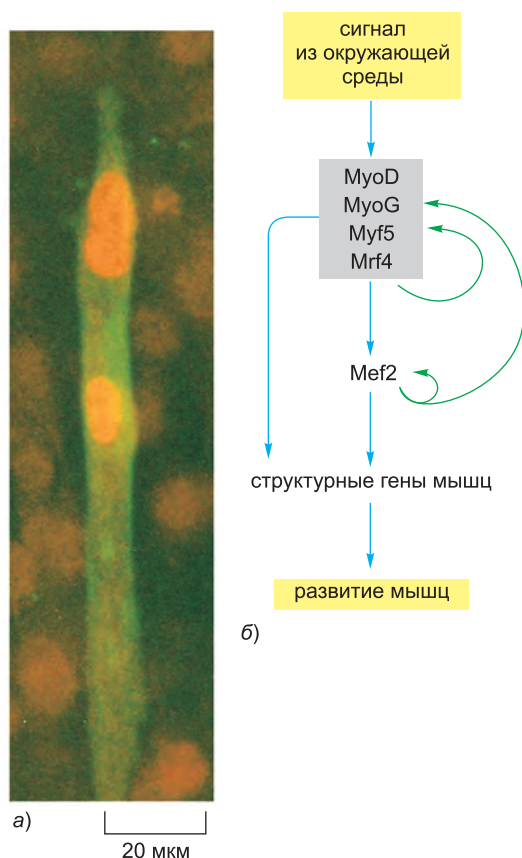


Рис. 7.75. Роль миогенных регуляторных белков в развитии мышц.

а) Эффект экспрессии белка *MyoD* в фибробластах. Как показано на этой микрофотографии, полученной методом иммунной флуоресцентной микроскопии, фибробласты кожи куриного эмбриона превратились в клетки мышц при экспериментально индуцированной экспрессии в них гена *MyoD*. Фибробласты, у которых индуцировали экспрессию гена *MyoD*, сливались с образующимися продолговатыми многоядерными мышечноподобными клетками, окрашенные *зеленым* при помощи антител, выявляющих специфичный для мышц белок. Фибробласты, которые не экспрессируют ген *MyoD*, едва видны на заднем фоне. **б)** Упрощенная схема, показывающая некоторые из регуляторных белков, участвующих в развитии скелетных мышц. Внешние сигналы приводят к синтезу четырех близкородственных миогенных регуляторных белков: *MyoD*, *Myf5*, *MyoG* и *Mrf4*. Эти регуляторные белки активируют свой собственный синтез, а также синтез друг друга, в серии сложных петель обратной связи, только некоторые из которых показаны на рисунке. В свою очередь, эти белки непосредственно активируют транскрипцию структурных генов мышц и гена *Mef2*, кодирующего дополнительный регуляторный белок. Белок *Mef2* действует совместно с миогенными белками в петле прямой связи для дальнейшей активации транскрипции структурных генов мышц, а также образует дополнительную петлю положительной обратной связи, которая помогает поддерживать уровень транскрипции миогенных генов. (*а* — с любезного разрешения Stephen Tapscott and Harold Weintraub; *б* — адаптировано из J. D. Molkentin and E. N. Olson, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93: 9366–9373, 1996. С разрешения National Academy of Sciences.)

необходимую для максимальной активации или подавления этого гена. Эта ситуация аналогична набору последней цифры кодового замка: замок откроется только лишь после того, как добавлена последняя цифра, при условии, что до этого были введены все остальные. Кроме того, та же цифра может завершать комбинации множества разных замков. Аналогично, добавление определенного белка может включать много различных генов.

В случае человека примером может быть контроль экспрессии генов *белком-рецептором глюкокортикоидов (glucocorticoid receptor protein)*. Чтобы связаться с регуляторными участками ДНК, этот регуляторный белок должен сначала образовать комплекс с молекулой глюкокортикоидного гормона, например кортизола (см. рис. 15.13). Этот гормон секретируется в организме во время периодов голодания и интенсивных физических нагрузок, и среди всех его остальных эффектов он стимулирует увеличение синтеза глюкозы из аминокислот и других низкомолекулярных соединений в клетках печени, из-за чего в них возрастает экспрессия множества разных генов, кодирующих ферменты метаболизма и другие продукты. Все эти гены имеют различные и сложноорганизованные контролирующие области, но их максимальная экспрессия зависит от связывания комплекса гормон–глюкокортикоидный рецептор с регуляторным участком каждого гена на ДНК. Когда организм восстанавливается и гормон исчезает, то экспрессия каждого из этих генов в печени падает до своего нормального уровня. Подобным образом один регуляторный белок может контролировать экспрессию множества разных генов (рис. 7.74).

Действие глюкокортикоидного рецептора не ограничивается только воздействием на клетки печени. В других типах клеток активация гормоном этого регуляторного белка также вызывает изменения в уровнях экспрессии многих генов, но затронутые гены часто отличаются от тех, на которые он действует в клетках печени. Как отмечалось выше, каждый тип клеток обладает индивидуальным набором регуляторных белков и из-за существования комбинаторного контроля это серьезно влияет на действие глюкокортикоидного рецептора. Поскольку рецептор способен соединяться со многими разными наборами клеточно-специфичных регуляторных белков, активация его гормоном приводит к различному спектру эффектов в каждом типе клеток.

7.4.9. Экспрессия ключевого регуляторного белка может запустить экспрессию целой батареи генов, регулирующих последующие звенья сигнальных каскадов

Способность координированно включать и выключать множество генов является важной не только в повседневной регуляции функции клетки. Это также способ, при помощи которого эукариотические клетки дифференцируются в специализированные типы клеток в ходе эмбрионального развития. Развитие мышечных клеток является тому прекрасным примером.

Как описано в главе 16, клетка скелетной мышцы млекопитающих является высокодифференцированной гигантской клеткой, образованной в результате слияния множества клеток-предшественников, называемых *миобластами (myoblasts)*, и поэтому содержит много ядер. В зрелой мышечной клетке синтезируется большое число присущих только ей белков, включая специфические типы актина, миозина, тропомиозина и тропонина (все входят в состав сократительного аппарата), креатинфосфокиназу (обеспечивает специализированный метаболизм мышечных клеток) и

ацетилхолиновые рецепторы (делают мембрану чувствительной к нейростимуляции). В пролиферирующих миообластах такие специфичные для мышц белки и соответствующие им мРНК отсутствуют либо присутствуют в очень небольших количествах. По мере слияния миообластов соответствующие гены согласованно включаются как часть общего процесса трансформации паттерна экспрессии генов.

Вся эта программа дифференциации мышечных клеток может быть запущена в культуре фибробластов кожи и других определенных типах клеток, если ввести любой белок из так называемых миогенных белков (MyoD, Myf5, MyoG и Mrf4), принадлежащих к семейству белков с мотивом спираль-петля-спираль, которые в норме экспрессируются только в мышечных клетках (рис. 7.75, а). Участки связывания этих регуляторных белков находятся на регуляторных последовательностях ДНК, расположенных по соседству со многими специфичными для мышц генами; и миогенные белки, таким образом, напрямую активируют транскрипцию этих генов. Кроме того, миогенные белки стимулируют свою собственную транскрипцию, так же как транскрипцию множества других регуляторных белков, связанных с процессом развития мышц. Это приводит к созданию сложноорганизованной серии петель положительной обратной связи и петель прямой связи, которые усиливают сигнал и поддерживают программу развития мышечной ткани, даже после исчезновения иницирующего сигнала (рис. 7.75, б; см. также главу 22).

Возможно, что в этих типах клеток, становящихся мышечными клетками после добавления миогенных белков, уже накопилось некоторое количество регуляторных белков, которые могут объединяться с миогенными белками и включать специфичные для мышц гены. Другие типы клеток не могут превращаться в мышцы под действием миогенина или ему подобных — вероятно, в этих клетках не накопились другие необходимые регуляторные белки.

Превращение одного типа клеток (фибробласты) в другой (скелетные мышцы) под действием единичного регуляторного белка снова подчеркивает один из наиболее важных принципов, рассмотренных в этой главе: различия в экспрессии генов могут породить существенные различия между типами клеток — в их размерах, форме, химическом составе и функциях.

7.4.10. Комбинаторный контроль генов обеспечивает возникновение различных типов клеток эукариот

Уже обсуждалось, как многочисленные регуляторные белки могут совместно действовать, чтобы регулировать экспрессию отдельного гена. Но, как показал пример миогенных белков, комбинаторный контроль генов подразумевает нечто большее, чем это: не только каждый ген реагирует на множество регуляторных белков, которые его контролируют, но каждый регуляторный белок участвует в контроле многих генов. Вместе с тем, хотя некоторые регуляторные белки являются специфическими для одного типа клеток, большинство регуляторных белков активируется в разнообразных типах клеток, на нескольких участках в организме и по несколько раз в ходе его развития. Этот пункт схематично проиллюстрирован на рис. 7.76, где показано, как комбинаторный контроль генов позволяет создавать системы с высокой степенью биологической сложности при наличии сравнительно небольшого числа регуляторных белков.

При комбинаторном контроле данный регуляторный белок не обязательно обладает одной, легко определяемой функцией, которая заключается в управлении

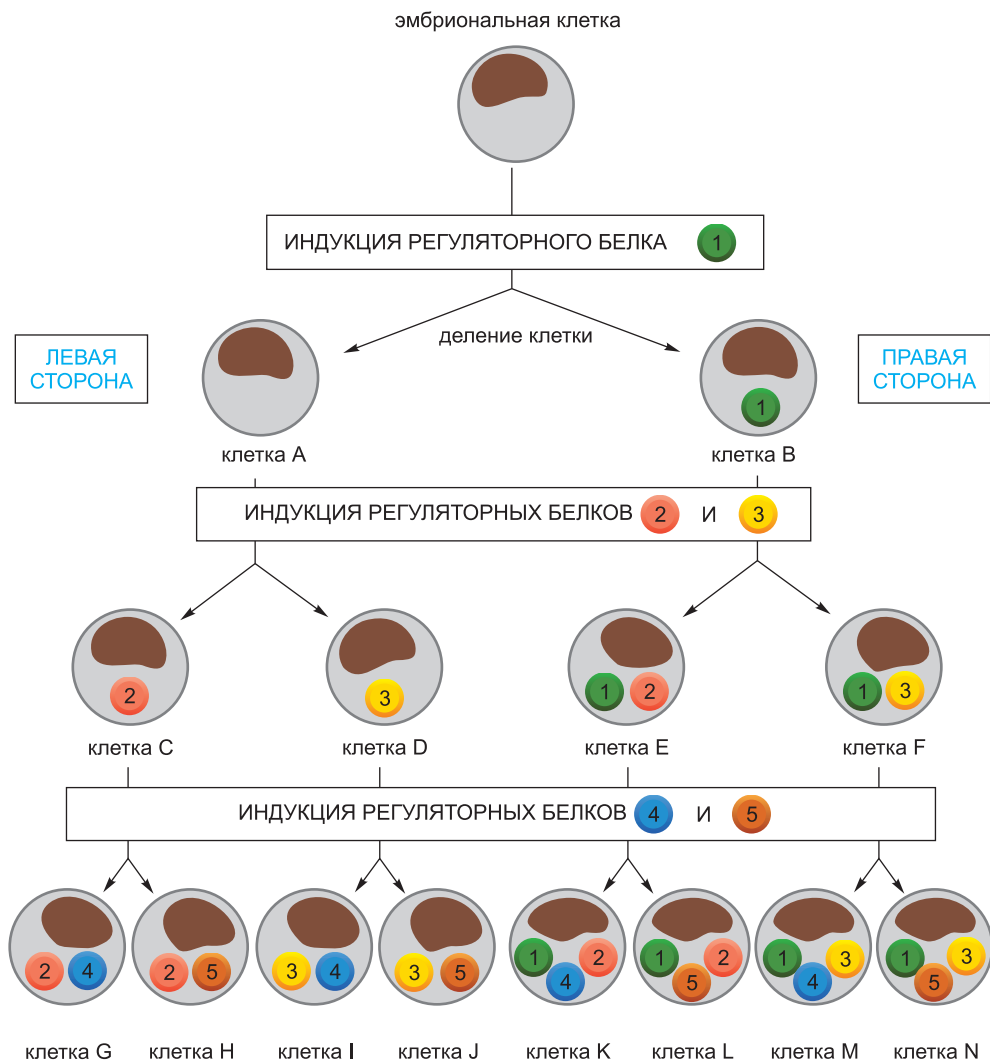


Рис. 7.76. Важность комбинаторной регуляции генов для развития организма. Комбинации из нескольких регуляторных белков могут обеспечить возникновение многих типов клеток в ходе развития организма. В этой простой, идеальной схеме «решение» о синтезе какого-либо одного из двух разных регуляторных белков (обозначенных пронумерованными кружками) принимается после каждого клеточного деления. Согласно своему относительному положению в эмбрионе дочерняя клетка, расположенная ближе к *левой стороне* эмбриона, всегда индуцирует синтез белков с четными номерами, тогда как дочерняя клетка, находящаяся ближе к *правой стороне* эмбриона, — синтез белков с нечетными номерами. Считается, что синтез каждого регуляторного белка является самоподдерживающимся процессом (см. рис. 7.68). Таким образом, посредством клеточной памяти шаг за шагом выстраиваются конечные условия для комбинаторного контроля. В этом чисто гипотетическом примере пять различных регуляторных белков в итоге дали начало восьми типам клеток (G–N).

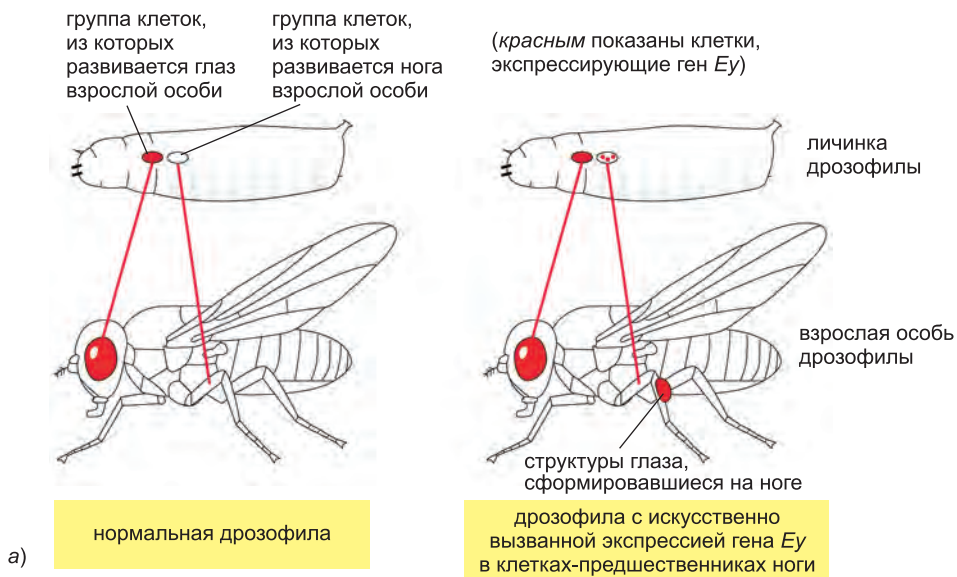
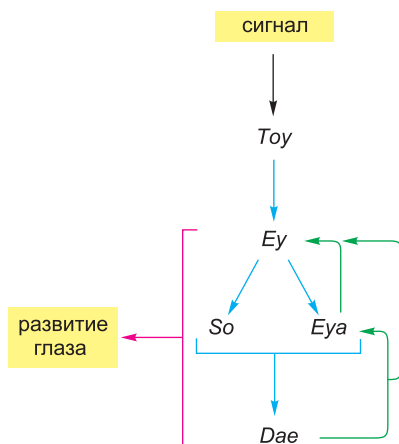


Рис. 7.77. Экспрессия гена *Ey* дрозофилы в клетках-предшественниках ноги инициирует развитие глаза на ноге. а) Упрощенные схемы, показывающие результаты нормальной экспрессии гена *Ey* в личинке плодовой мушки (слева) и экспрессии гена *Ey*, вызванной искусственным способом, в клетках, из которых в норме развивается ткань ноги (справа). б) Фотография аномальной ноги с глазом (см. также рис. 22.2). (б — с любезного разрешения Walter Gehring.)

особой батареей генов или спецификации отдельного клеточного типа. Скорее, регуляторные белки можно сравнить со словами в языке: они используются в различных значениях во множестве контекстов и редко когда по отдельности: это хорошо подобранная комбинация, передающая информацию, которая определяет событие регуляции генов.

Одно из требований комбинаторного контроля состоит в том, что многие регуляторные белки должны обладать способностью к совместным действиям, чтобы оказывать воздействие на итоговую интенсивность транскрипции. Опыты показали,

Рис. 7.78. Регуляторные белки, определяющие развитие глаза у дрозофилы. Гены *Toy* (*Twin of eyeless*) и *Ey* (*Eyeless*) кодируют схожие регуляторные белки, Тоу и Еу, каждый из которых при их эктопической экспрессии может запускать развитие глаза. При нормальном развитии для экспрессии *Ey* необходим ген *Toy*. После активации транскрипции белком Тоу белок Еу активирует транскрипцию генов *So* (*Sine oculis*) и *Eya* (*Eyes absent*), действующих совместно, чтобы включить ген *Dac* (*Dachshund*). Зелеными стрелками отмечено, что некоторые из регуляторных белков образуют серию взаимосвязанных петель положительной обратной связи, усиливающих первоначальное коммитирование клеток на развитие глаза. Известно, что для того, чтобы развился глаз, белок Еу напрямую связывается с многочисленными целевыми генами, включая те, что кодируют кристаллины хрусталика, родопсины и другие фоторецепторные белки. (Адаптировано из T. Czerny et al., *Mol. Cell* 3: 297–307, 1999. С разрешения Elsevier.)



что даже неродственные регуляторные белки, взятые от совершенно разных эукариотических видов, при введении в одну клетку могут скооперироваться для «общего дела», что отражает высокую степень консерватизма аппарата транскрипции.

По-видимому, многофункциональный, комбинаторный способ действия регуляторных белков во многом ограничил их эволюцию: они должны быть способны соединяться с другими регуляторными белками, основными факторами транскрипции, медиатором, РНК-полимеразой и ферментами, модифицирующими хроматин.

Важное следствие комбинаторного контроля генов состоит в том, что эффект от введения нового регуляторного белка в клетку будет зависеть от истории клетки, так как именно «прошлое» клетки определяет, какие регуляторные белки уже в ней есть. Таким образом, в ходе развития клетка может накапливать набор регуляторных белков, которые не обязательно сразу же меняют экспрессию генов. Добавление последних членов цепочки из входящих в состав необходимой комбинации регуляторных белков завершает регуляторное «послание» и может приводить к значительным изменениям в экспрессии генов. Подобная схема, как мы видели, помогает объяснить, как добавление одного регуляторного белка в клетку фибробласта может вызвать ее внезапное превращение в мышечную клетку. Возможно, что именно эта схема обуславливает описанные в главе 22 важные различия между процессом *детерминации клетки*, где клетка становится коммитированной к определенному пути развития, и процессом *дифференцировки клетки*, где коммитированная клетка проявляет свой специализированный характер.

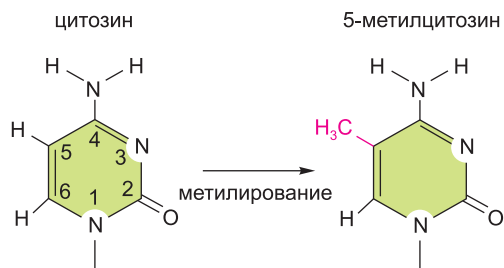


Рис. 7.79. Образование 5-метилцитозина происходит при метилировании цитозина в двойной спирали ДНК. У позвоночных этот процесс ограничен цитозиновыми остатками (С), находящимися в последовательности CG.

7.4.11. Один регуляторный белок может запустить образование целого органа

Мы выяснили, что, хотя комбинаторный контроль является нормой для эукариотических генов, один регуляторный белок, если он завершает соответствующую комбинацию белков, может быть решающим при включении или выключении целого набора генов, и мы видели, как это может привести к превращению одного типа клеток в другой. Впечатляющее распространение этого принципа было обнаружено при исследованиях развития глаза дрозофилы, мыши и человека. В данном случае ключевым является регуляторный белок, называемый *Eu* (сокращенно от *Eyeless*) у мух и *Rax6* у позвоночных. При экспрессии в соответствующем окружении *Eu* может запускать образование не просто одного типа клеток, а целого органа (глаза), состоящего из разных типов клеток, и все они определенным образом организованы в пространстве.

Самое поразительное доказательство ведущей роли белка *Eu* продемонстрировано в опытах над плодовыми мушками, когда на начальных стадиях развития экспрессию гена *Eu* вызывали искусственным способом в группах клеток, которые в норме формируют части ног. Эта аномальная экспрессия генов приводила к развитию глаз на ногах (рис. 7.77).

Глаз дрозофилы состоит из тысяч клеток, и вопрос о том, как регуляторный белок координирует формирование целого органа, является центральной темой *биологии развития*. Как описывается в главе 22, в этом задействованы как межклеточные взаимодействия, так и внутриклеточные регуляторные белки. Обратите внимание в данном случае на то, что белок *Eu* напрямую контролирует экспрессию многих других генов посредством связывания с их регуляторными областями. Некоторые из генов, находящихся под контролем *Eu*, сами кодируют регуляторные белки, которые, в свою очередь, контролируют экспрессию других генов. Кроме того, некоторые из этих регуляторных продуктов генов, в свою очередь, тоже действуют на сам ген *Eu*, создавая петлю положительной обратной связи, которая

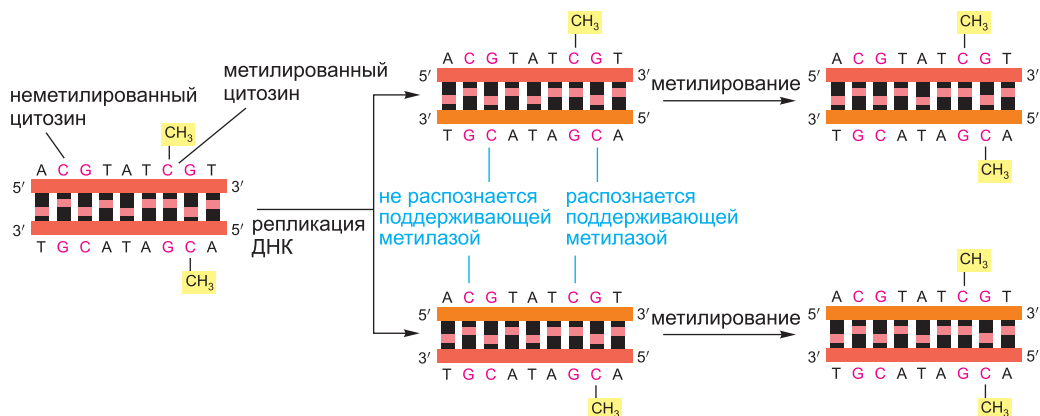


Рис. 7.80. Как происходит точное наследование профиля метилирования ДНК. В ДНК позвоночных метилирована значительная часть остатков цитозина, входящих в состав последовательности CG (см. рис. 7.79). Благодаря действию метил-зависимого метилирующего фермента (поддерживающей метилтрансферазы) однажды проведенная разметка ДНК-метильными группами наследуется дочерними молекулами ДНК, как показано на рисунке.

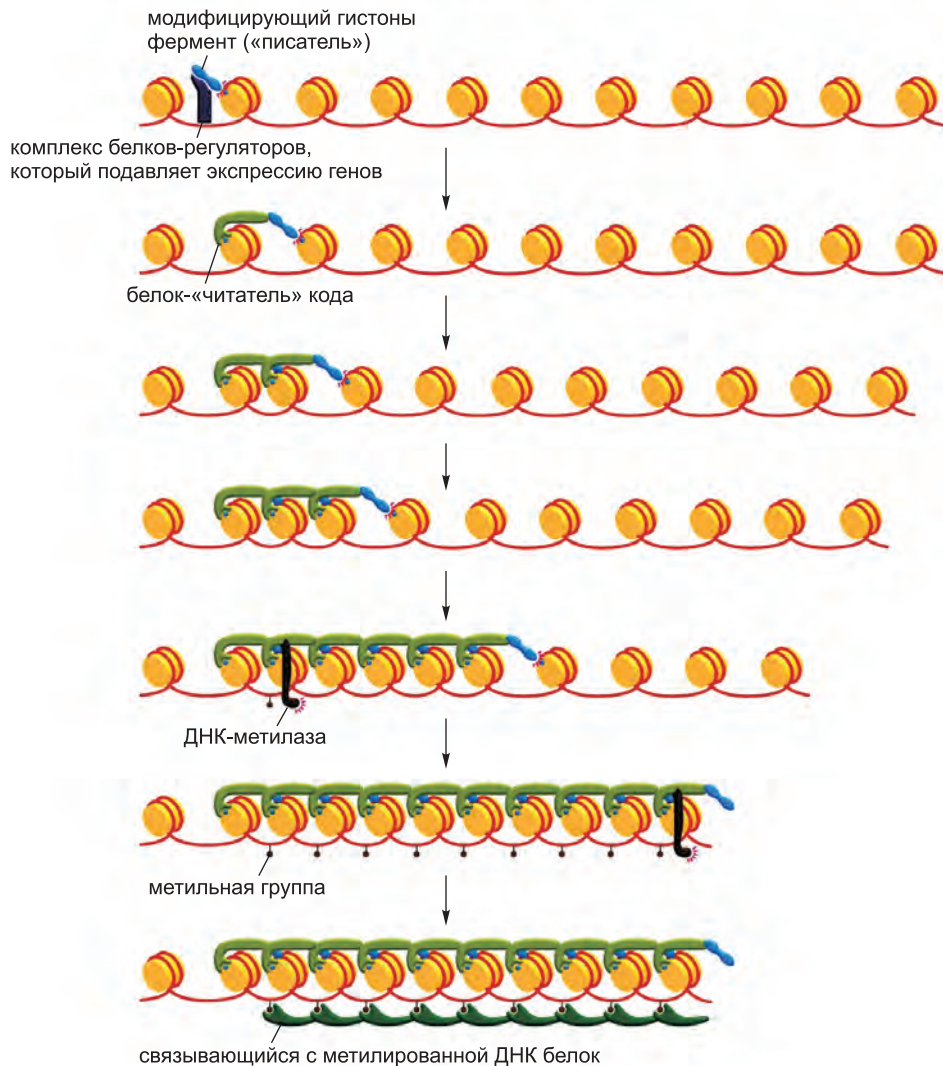


Рис. 7.81. Многочисленные механизмы задействованы стабильной репрессией генов. В этом схематичном примере гистоновые белок-«читатель» и белок-«писатель» под управлением регуляторных белков формируют репрессивную форму хроматина. Заново синтезированная ДНК-метилаза привлекается гистоновым белком-«читателем» и метилирует соседние остатки цитозина на ДНК, к которым, в свою очередь, присоединяются связывающиеся с метилированной ДНК белки. В ходе репликации ДНК некоторые из модифицированных (синяя точка) гистонов будут наследоваться одной дочерней хромосомой, некоторые – другой, и в каждой дочерней клетке они могут индуцировать реконструкцию того же самого профиля модификации хроматина (см. рис. 5.39). В то же время механизм, приведенный на рис. 7.80, будет приводить к наследованию обеими дочерними хромосомами одинакового профиля метилирования. Два механизма наследования будут взаимно усиливать действия друг друга, если метилирование ДНК будет стимулировать активность гистонового белка-«писателя». Эта схема может объяснить наследование дочерними клетками модификаций как гистонов, так и ДНК. Она также может пояснить склонность некоторых модификаций хроматина распространяться по хромосоме (см. рис. 4.45).

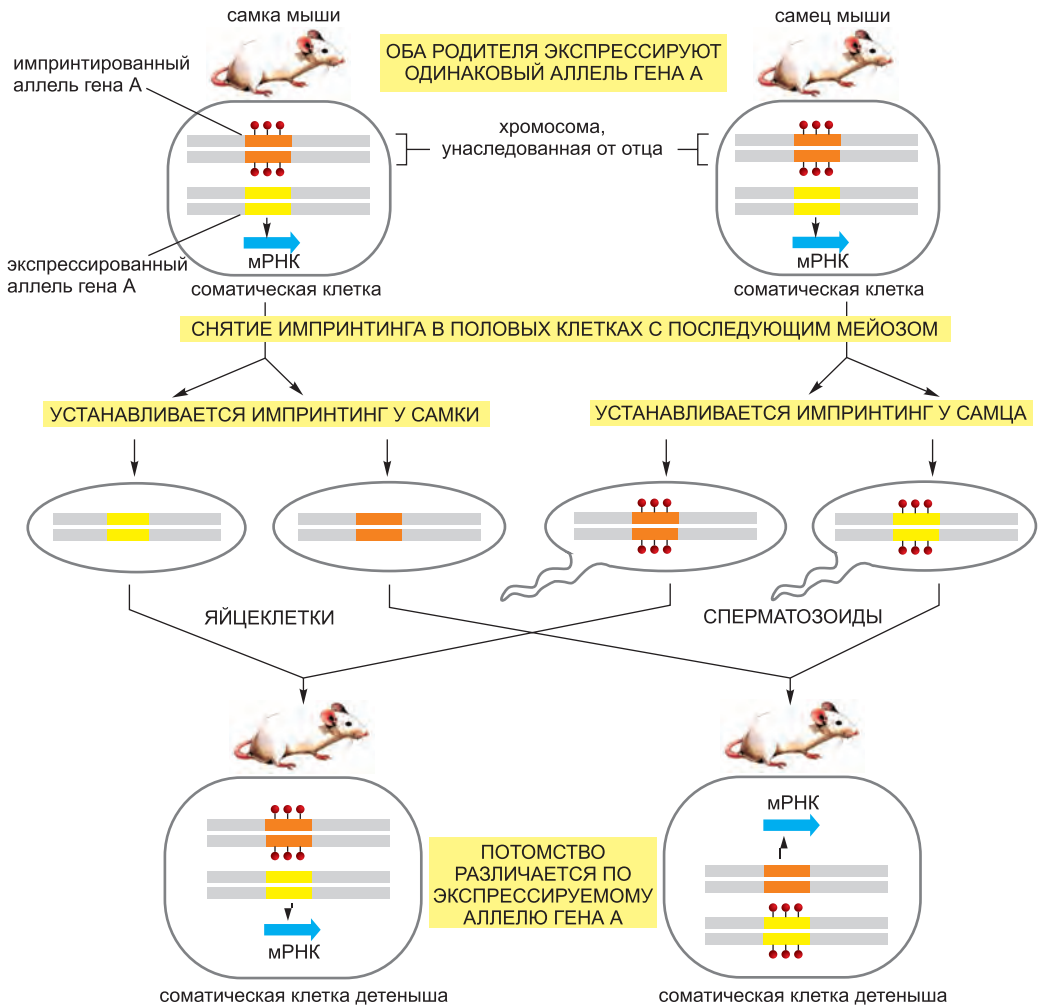


Рис. 7.82. Импринтинг у мыши. В верхней части рисунка показана пара гомологичных хромосом в соматических клетках двух взрослых мышей: самца и самки. В этом примере обе мыши унаследовали верхнюю гомологичную хромосому от отца, а нижнюю — от матери, и отцовская копия гена, подвергающаяся импринтингу (показано *оранжевым* цветом), метилирована, что препятствует ее экспрессии. Копия того же гена, полученная от матери (*желтая*), экспрессируется. На оставшейся части рисунка показан результат скрещивания этих двух мышей. В ходе образования половых клеток, но до мейоза, импринтинг снимается. Затем, на значительно более поздних стадиях процесса созревания половых клеток, налагается уже специфичный для каждого пола импринтинг (*средняя* часть рисунка). В яйцеклетках самки ни один из аллелей гена А не метилируется, в сперматозоидах самца метилируются оба аллеля. Внизу рисунка показаны два возможных варианта импринтинга, которые наследуются потомством. Мышь *слева* обладает тем же типом импринтинга, что и родители, тогда как мышь *справа* — противоположным типом. Если два аллеля гена А отличаются, то эти разные варианты импринтинга могут привести к фенотипическим различиям в потомстве, несмотря на то что несут точно такие же последовательности ДНК двух аллелей гена А. Импринтинг служит важным исключением из классического генетического поведения, и считается, что ему подвержены несколько сотен мышиных генов. Однако большинство генов мыши не подвергаются импринтингу, и, следовательно, к большей части генома мыши применимы законы наследования Менделя.

обеспечивает непрерывный синтез белка Еу, пока клетки делятся и дифференцируют дальше (рис. 7.78). Таким образом, воздействие только одного регуляторного белка может надолго запустить каскад регуляторных белков и механизмов межклеточного взаимодействия, чьи действия приведут к формированию организованной группы из множества разных типов клеток. Можно представить, как при неоднократном применении этого принципа постепенно выстраивается сложный организм.

7.4.12. При делении клеток позвоночных характер метилирования ДНК может передаваться по наследству

До сих пор подчеркивалась регуляция транскрипции генов белками, которые связываются с ДНК, но и сама ДНК может быть ковалентно модифицирована; и в последующих разделах мы увидим, что это тоже предоставляет возможности для регуляции экспрессии генов. В клетках позвоночных метилирование цитозина представляет мощный механизм, посредством которого происходит передача профилей экспрессии генов дочерним клеткам. Метилированная форма цитозина, 5-метилцитозин (5-метил-С), имеет то же отношение к цитозину, что и тимин к урацилу, и модификация также не оказывает влияния на спаривание оснований (рис. 7.79). Метилирование ДНК (DNA methylation) у позвоночных ограничивается нуклеотидами цитозина (С) в последовательности CG, которая спарена с точно такой же последовательностью (но в обратной ориентации) на другой цепи ДНК. Следовательно, прямое наследование дочерними цепями ДНК существующего типа метилирования обеспечивается простым механизмом. Фермент, называемый *поддерживающей метилтрансферазой* (*maintenance methyltransferase*), главным образом действует на те последовательности CG, которые спарены с уже метилированной последовательностью CG. В результате профиль (паттерн) метилирования родительской цепи ДНК служит матрицей для метилирования дочерней цепи, что приводит к тому, что он наследуется непосредственно после репликации ДНК (рис. 7.80).

Стабильное наследование паттернов метилирования ДНК может быть объяснено действием поддерживающей ДНК-метилтрансферазы. Однако профиль метилирования ДНК динамически изменяется в ходе развития позвоночных. Вскоре после оплодотворения по геному прокатывается волна деметилирования — и большинство метильных групп ДНК утрачивается. Такое деметилирование может происходить либо путем подавления активности поддерживающей ДНК-метилтрансферазы, в результате чего происходит пассивная потеря метильных групп в ходе каждого цикла репликации ДНК, либо вследствие действия специфического деметилирующего фермента. На более поздних стадиях развития новые типы метилирования образуются при помощи нескольких *de novo* синтезируемых ДНК-метилтрансфераз, направляемых к ДНК сайт-специфическими ДНК-связывающими белками, где они модифицируют соседние неметилированные нуклеотиды CG (в настоящее время показано, что, зачастую «целеуказателем» для метилирования ДНК, равно как и для модификации гистонов, может служить некодирующая РНК — прим.ред.). Как только новые паттерны метилирования установятся, они могут быть распространены в ходе раундов репликации ДНК благодаря действию поддерживающих метилтрансфераз.

Метилирование ДНК может по-разному использоваться в клетках позвоночных. Возможно, его самая важная роль состоит в совместной работе с другими механизма-

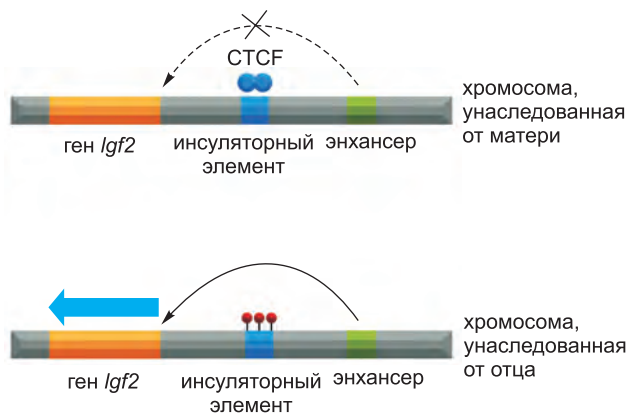


Рис. 7.83. Механизм импринтинга гена *Igf2* мыши. На хромосомах, унаследованных от матери, белок, именуемый CTCF, связывается с инсулятором (см. рис. 7.62), блокируя коммуникацию между энхансером (зеленый) и геном *Igf2* (оранжевый). Следовательно, белок *Igf2* не экспрессируется с хромосомы, унаследованной от матери. Вследствие импринтинга инсулятор на хромосоме, полученной от отца, метилируется, что приводит к его инактивации из-за блокирования связывания с ним белка CTCF, и позволяет энхансеру активировать транскрипцию гена *Igf2*. В других примерах импринтинга метилирование препятствует экспрессии генов, мешая связываться белкам, необходимым для транскрипции гена.

ми контроля экспрессии генов с целью создания особо эффективной формы репрессии генов, которая может без ошибок передаваться дочерним клеткам (рис. 7.81). Такая комбинация механизмов гарантирует, что ненужные эукариотические гены можно подавить с высокой эффективностью. Например, интенсивность, с которой транскрибируется ген позвоночных в одной ткани, может отличаться от интенсивности в другой ткани в 10^6 раз. Неэкспрессируемые гены позвоночных являются намного менее «текучими» в отношении транскрипции, чем гены бактерий, у которых наибольшие известные различия в интенсивности транскрипции экспрессируемых и неэкспрессируемых генов не превышают 1000-кратный уровень.

Как метилирование ДНК помогает подавлять экспрессию генов, пока не полностью понятно, но выяснены два основных механизма. Метилирование ДНК в области промотора гена или его регуляторных последовательностей может непосредственно помешать связыванию белков, необходимых для инициации транскрипции. Кроме того, в клетке есть набор белков, которые специфически связываются с метилированной ДНК (см. рис. 7.81), таким образом блокируя доступ другим белкам. Одним из отражений важной роли метилирования ДНК для человека является широко распространенная причастность ошибок в этом механизме к развитию рака (см. главу 20).

Позже мы вернемся в этой главе к теме сайленсинга генов посредством метилирования ДНК, когда будем обсуждать инактивацию X-хромосомы и другие примеры крупномасштабного подавления генов. Однако сначала опишем несколько других способов, при помощи которых метилирование ДНК влияет на наш геном.

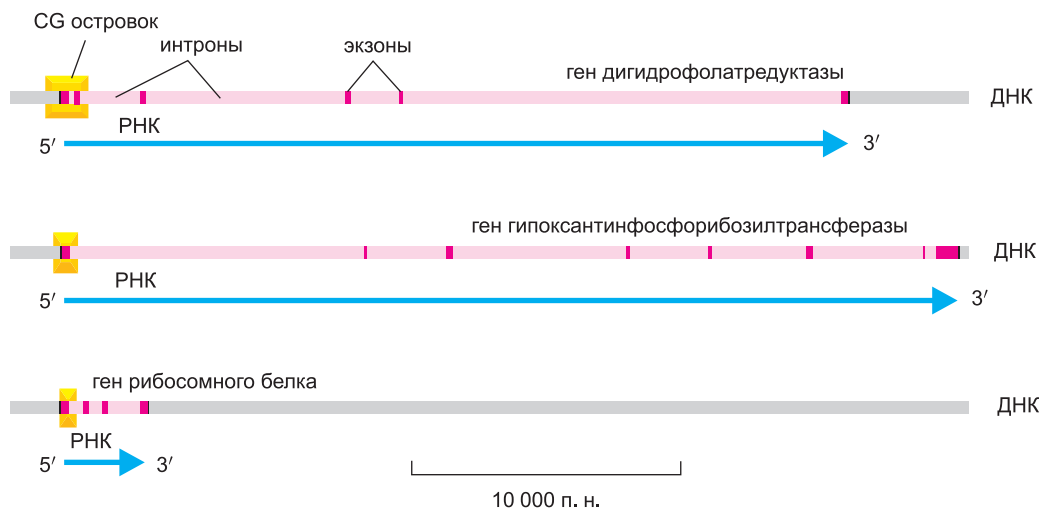


Рис. 7.84. CG-островки, окружающие промотор в трех генах «домашнего хозяйства» млекопитающих. Желтыми прямоугольниками отмечен размер каждого островка. У большинства генов млекопитающих (см. рис. 6.25) экзоны (темно-красные) короче, нежели интроны (розовые). (Адаптировано А. Р. Bird, *Trends Genet.* 3: 342–347, 1987. С разрешения Elsevier.)

7.4.13. Геномный импринтинг основан на метилировании ДНК

Клетки млекопитающих являются диплоидными и содержат один набор генов, унаследованный от отца, и один набор генов, унаследованный от матери. Экспрессия небольшой части генов зависит от того, были ли они унаследованы от матери или от отца: пока активна отцовская копия гена, материнская копия гена молчит, и наоборот. Это явление называется **геномным импринтингом (genomic imprinting)**. Ген *Igf2* *инсулин-подобного фактора роста 2 (insulin-like growth factor-2)* считается хорошо изученным примером импринтированного гена. Ген *Igf2* необходим для внутриутробного роста; и мыши, у которых он совершенно не экспрессируется, рождаются в два раза меньше обычного размера. Однако транскрипция идет только с отцовской копии гена *Igf2*, и только эта копия имеет значение для фенотипа. В результате мышь с мутантным, полученным от отца геном *Igf2* рождается малорослой, тогда как мышь с мутантным геном *Igf2*, полученным от матери, соответствует норме.

На ранних эмбриональных стадиях развития гены, подвергающиеся импринтингу, метилируются в соответствии с тем, были ли они получены от сперматозоида или от яйцеклетки. Таким образом, метилирование ДНК используется в качестве метки, помогающей различать две копии гена, которые в другом случае были бы идентичными (рис. 7.82). Поскольку импринтированные гены некоторым образом защищены от волны деметилирования, которая происходит вскоре после оплодотворения (см. стр. 467), такая метка дает возможность соматическим клеткам «запомнить», от какого из родителей получена каждая из двух копий гена, и в соответствии с этим регулировать их экспрессию. В большинстве случаев метилированный участок импринтинга подавляет близлежащую экспрессию, но в некоторых случаях он может активировать экспрессию гена. Например, что касается гена *Igf2*, метилирование инсуляторного элемента (см. рис. 7.62) на хромосоме, полученной

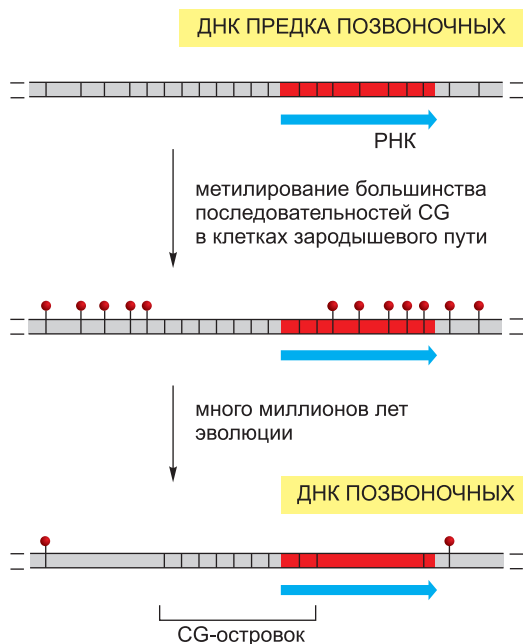


Рис. 7.85. Механизм, объясняющий заметную общую нехватку последовательностей CG и их группирование в островки CG в геномах позвоночных. Черной линией отмечено расположение динуклеотидов CG в последовательности ДНК, тогда как красной головкой обозначена метильная группа на динуклеотиде CG. Последовательности CG, расположенные в регуляторных последовательностях генов, которые транскрибируются в половых клетках, не метилированы и, следовательно, имеют тенденцию к сохранению в ходе эволюции. С другой стороны, метилированные последовательности CG склонны утрачиваться при дезаминировании 5-метилцитозина в тимин, только если последовательность CG не является значимой для выживания

от отца, блокирует его функцию и позволяет отдаленному энхансеру активировать транскрипцию гена *Igf2*. На материнской хромосоме инсуляторный элемент не метилирован, и поэтому ген

Igf2 не транскрибируется (рис. 7.83).

Почему вообще должен существовать импринтинг, остается загадкой. У позвоночных он ограничен плацентарными млекопитающими и многие из импринтированных генов участвуют в развитии плода. Одна из идей заключается в том, что импринтинг отражает компромисс в эволюционной борьбе между самцами, стремящимися произвести как можно больше потомства, и самками, ограничивающими его размер. Вне зависимости от смысловой нагрузки импринтинг служит поразительным доказательством того, что, помимо нуклеотидной последовательности, могут наследоваться и другие черты ДНК.

7.4.14. CG-богатые островки есть во многих генах млекопитающих

В ходе эволюции метилированные остатки цитозина в геноме имеют тенденцию к исчезновению, что объясняют способом работы ферментов репарации ДНК. Случайное дезаминирование неметилированного цитозина приводит к возникновению урацила (см. рис. 5.45), который в норме не входит в состав ДНК и потому легко распознается ферментом репарации урацил-ДНК-гликозилазой, вырезается и затем заменяется на цитозин (как описано в главе 5). Но последствия случайного дезаминирования 5-метил-С не могут быть устранены подобным способом, так как при дезаминировании образуется тимин, который не отличим от других, немутантных остатков тимина, входящих в состав ДНК. Существует специальная система репарации, чтобы удалять такие мутантные нуклеотиды тимина, но многие из дезаминированных нуклеотидов остаются незамеченными, так что в ходе эволюции эти метилированные остатки цитозина в геноме имеют тенденцию превращаться в тимин.

В ходе эволюции подобным образом было утеряно более трех из каждых четырех CG, что привело к значительному уменьшению содержания этого динуклеотида

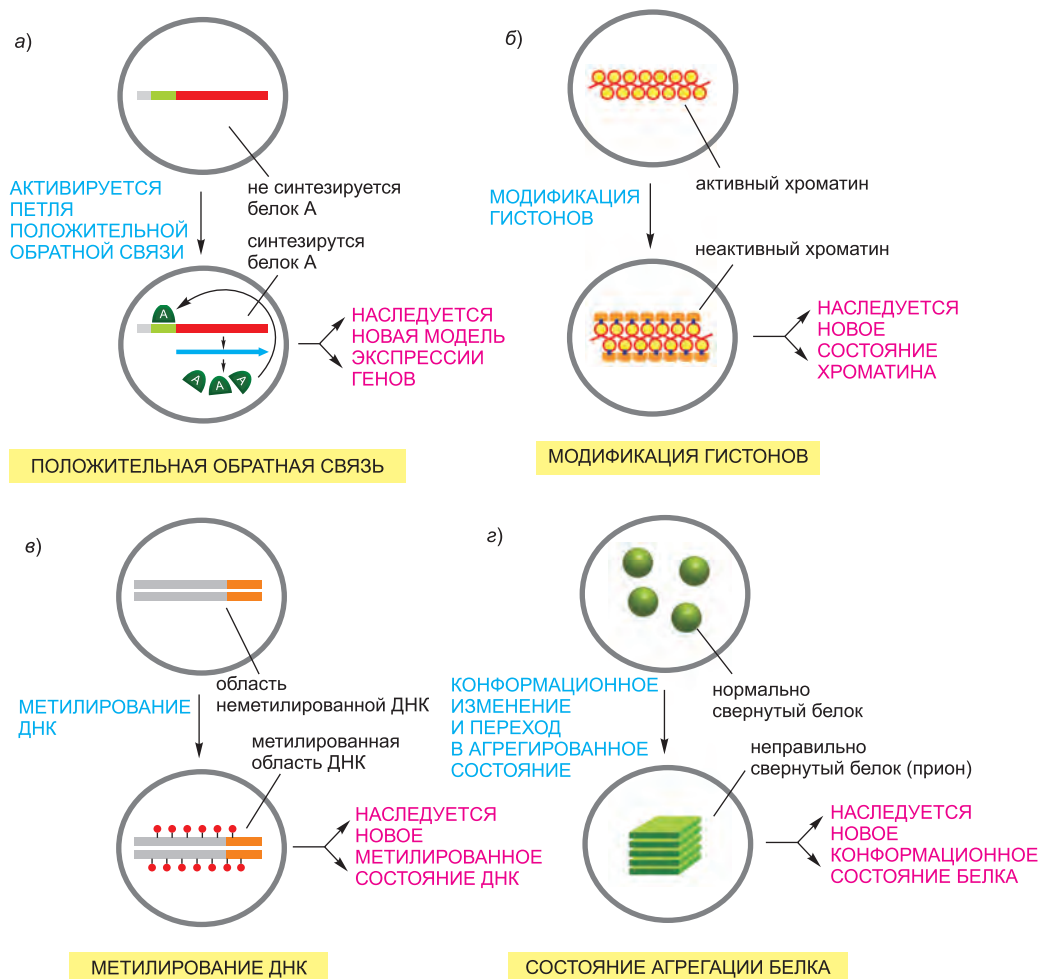


Рис. 7.86. Четыре различных механизма, которые могут вызывать эпигенетическую форму наследования в организме. (См. наследование модификации гистонов на рис. 4.52; см. наследование конформаций белка на рис. 6.95.)

в геноме позвоночных. Оставшиеся последовательности CG очень неравномерно распределены по геному: существуют отдельные области длиной 1000–2000 нуклеотидов, называемые **CG-островками (CG islands)**, в которых содержание CG в 10–20 раз выше, чем в среднем по геному. Подобные островки, за некоторыми важными исключениями, по-видимому, остаются неметилированными во всех типах клеток. Они часто окружают промоторы так называемых *генов «домашнего хозяйства» (housekeeping genes)*, то есть тех генов, которые кодируют много белков, необходимых для жизнедеятельности клетки и, следовательно, экспрессируемых в большинстве клеток (рис. 7.84).

Распределение CG-островков (также называемых островками CpG, чтобы отличать динуклеотиды CG от пары оснований CG) можно легко объяснить, если



Рис. 7.87. Однояйцевые близнецы, выросшие порознь. (С любезного разрешения Nancy L. Segal)

предположить, что метилирование CG было первоначально перенято позвоночными как способ поддержания ДНК в транскрипционно неактивном состоянии (см. рис. 7.81). У позвоночных новые мутации метилцитозина в тимин могут передаваться следующему поколению, только если они произошли в зародышевой линии клеток — клеточной линии, которая дает начало сперматозоидам и яйцеклеткам. Большая часть ДНК в половых клетках позвоночных не активна и сильно метилирована.

За долгую эволюцию метилированные последовательности CG в этих неактивных областях, по-видимому, были утрачены в ходе спонтанного дезаминирования, результаты которого не были исправлены. Однако промоторы генов, остающихся активными в половых клетках (включая большинство генов «домашнего хозяйства») остаются неметилированными, и поэтому при спонтанном дезаминировании остатков цитозина, происходящем в них, могут быть безошибочно репарированы. У современных клеток позвоночных подобные области сохранились в виде CG-островков (рис. 7.85). Кроме того, любая мутация последовательности CG в геноме, которая нарушала бы функцию или процесс регуляции гена во взрослом организме, подвергалась бы отрицательному отбору, и некоторые CG-островки, по-видимому, являются результатом превышающей норму плотности критических последовательностей CG для этих генов.

Геном млекопитающих содержит приблизительно 20 000 CG-островков. Большинство островков отмечают 5'-концы транскрипционных единиц и таким образом, вероятно, и 5'-концы генов. Так что их наличие предоставляет нам удобный способ идентификации генов в последовательностях ДНК позвоночных.

7.4.15. Эпигенетические механизмы гарантируют передачу дочерним клеткам стабильных профилей экспрессии генов

Как упоминалось выше, в организме, после дифференцировки клетки в определенный клеточный тип, она, как правило, сохраняет свою специализацию, и при делении дочерние клетки наследуют тот же специализированный характер. Например, клетки печени, пигментные клетки и эндотелиальные клетки (описаны в главе 23) делятся множество раз в течение жизни индивидуума, и каждая из них безошибочно образует дочерние клетки того же типа. Подобные дифференцированные клетки должны запоминать свою специфическую картину экспрессии генов и

передавать ее своим потомкам в ходе всех последующих клеточных делений.

Мы уже привели несколько способов, позволяющих дочерним клеткам «запоминать», каким типом клеток они обязаны стать. Один из простейших способов — через петлю положительной обратной связи, в которой ключевой регуляторный белок активирует напрямую или косвенно транскрипцию своего собственного гена (см. рис. 7.68 и 7.69). Взаимосвязанные петли положительной обратной связи обеспечивают еще большую стабильность путем буферизации системы цепи против колебаний уровня любого регуляторного белка (рис. 7.75, б и 7.78). Также ранее отмечалось, что метилирование ДНК может служить способом передачи паттернов экспрессии генов потомкам (см. рис. 7.80).

Петли положительной обратной связи и метилирование ДНК распространены как среди бактерий, так и среди эукариот, но эукариотам доступны также и другие способы поддержания дифференцированного состояния клетки в течение множества клеточных делений. Согласно главе 4, структура хроматина может сама по себе безошибочно передаваться от родительской к дочерней клетке. Для этого существует несколько механизмов, но самый простой основан на ковалентной модификации гистонов. Как мы уже выясняли, такие модификации образуют «гистоновый код», содержащий различные типы модификации, которые служат участками связывания различных белков-«читателей». Если эти белки, в свою очередь, действуют как (или привлекают) ферменты-«писатели», которые в точности воспроизводят типы модификации, привлекая их изначально, тогда распространение активных и молчащих областей хроматина может быть точно передано по наследству (см. рис. 5.39). В известном смысле самоподдерживающаяся модификация гистонов является формой петли положительной обратной связи, которая связана с ДНК, но не требует участия самой подвергающейся изменению последовательности ДНК.

Способность дочерней клетки сохранять память о пофиллах экспрессии генов, которые существовали в родительской клетке, является примером **эпигенетического наследования (epigenetic inheritance)**. Значения этого термина немного отличаются друг от друга в различных областях биологии, но мы будем его использовать в самом широком смысле, чтобы охватить любое наследуемое различие в фенотипе клетки или организма, которое не является результатом изменений нуклеотидной последовательности ДНК (см. рис. 4.35). Сейчас мы рассмотрели три из наиболее важных механизмов, которые лежат в основе эпигенетических изменений, но существуют и другие (рис. 7.86). В клетках эти механизмы часто объединяются, чтобы обеспечить точное и надежное поддержание и наследование картин экспрессии генов — в нашем случае в течение периода времени до 100 лет и более.

Более полувека биологи были поглощены идеей о ДНК как носителе наследственной информации, и это совершенно верно. Однако стало ясно, что хромосомы человека тоже несут большое количество информации, которая является эпигенетической и не содержится в самой последовательности ДНК. Импринтинг является одним из примеров. Другой наблюдается при явлении *моноаллельной экспрессии (mono-allelic expression)*, когда экспрессируется только одна из двух копий определенных генов человека. Для множества таких генов решение о том, какой аллель экспрессировать, а экспрессию какого аллеля подавить, является случайным, но, после того как оно принято, оно передается дочерним клеткам. Далее мы увидим крайний случай проявления этого феномена при инактивации X-хромосомы.

У человека совокупный эффект от действия случайных и запускаемых под действием окружающей среды эпигенетических изменений можно увидеть, сравнивая

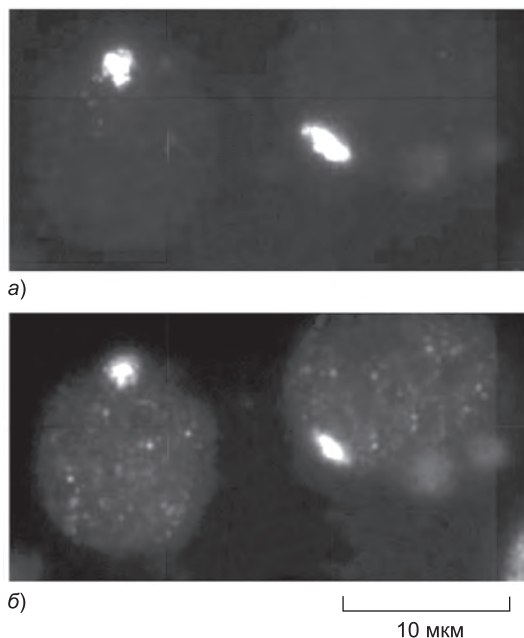


Рис. 7.88. Инактивация X-хромосомы в женских клетках. а) Только инактивированная X-хромосома покрыта XIST-РНК, визуализированной здесь при помощи гибридизации *in situ* с флуоресцентно мечеными РНК, имеющими комплементарную нуклеотидную последовательность. На рисунке показаны ядра двух соседних клеток. б) Тот же образец, окрашенный антителами против компонента комплекса белков группы Polycomb, который покрывает X-хромосому и помогает подавить экспрессию ее генов. (Из В. Panning, *Methods Enzymol.* 376: 419–428, 2004. С разрешения Academic Press.)

однойяйцевых близнецов. Их геномы имеют одинаковую последовательность нуклеотидов, но при сопоставлении их профилей модификации гистонов и метилирования ДНК наблюдаются многочисленные различия. Поскольку эти различия приблизительно соотно-

сятся не только с возрастом, но также и со временем, которое близнецы провели порознь, полагают, что некоторые из этих изменений являются результатом действия факторов внешней среды (рис. 7.87). Исследования *эпигенома* находятся на ранних стадиях, но идея о том, что события окружающей среды могут навсегда запечатлеваться нашими клетками, завораживает и представляет для следующего поколения ученых-биологов важную проблему, ждущую решения.

7.4.16. Изменения структуры хроматина целой хромосомы могут передаваться по наследству

Уже отмечалось, что состояния хроматина и метилирование ДНК могут передаваться по наследству, помогая образовывать и сохранять профили экспрессии генов на протяжении многих клеточных поколений. Возможно, наиболее яркий пример этого эффекта встречается у млекопитающих, у которых изменение в структуре хроматина целой хромосомы может модулировать уровни экспрессии всех генов на этой хромосоме.

Мужские и женские особи различаются по своим *половым хромосомам* (*sex chromosomes*). Самки имеют две X-хромосомы, тогда как у самцов есть одна X- и одна Y-хромосома. В результате женские клетки содержат в два раза больше копий генов X-хромосомы, чем мужские клетки. У млекопитающих половые хромосомы X и Y коренным образом различаются по составу генов. X-хромосома отличается крупным размером и содержит более 1000 генов, тогда как Y-хромосома — небольшая и содержит менее 100 генов. У млекопитающих развился механизм *компенсации доз генов* (*dosage compensation*), чтобы уравновесить дозу генных продуктов X-хромосомы между мужскими и женскими особями. Мутации, которые препятствуют осуществлению компенсации доз, летальны — правильное соотношение генных продуктов X-хромосом к генным продуктам *аутосом* (неполовых

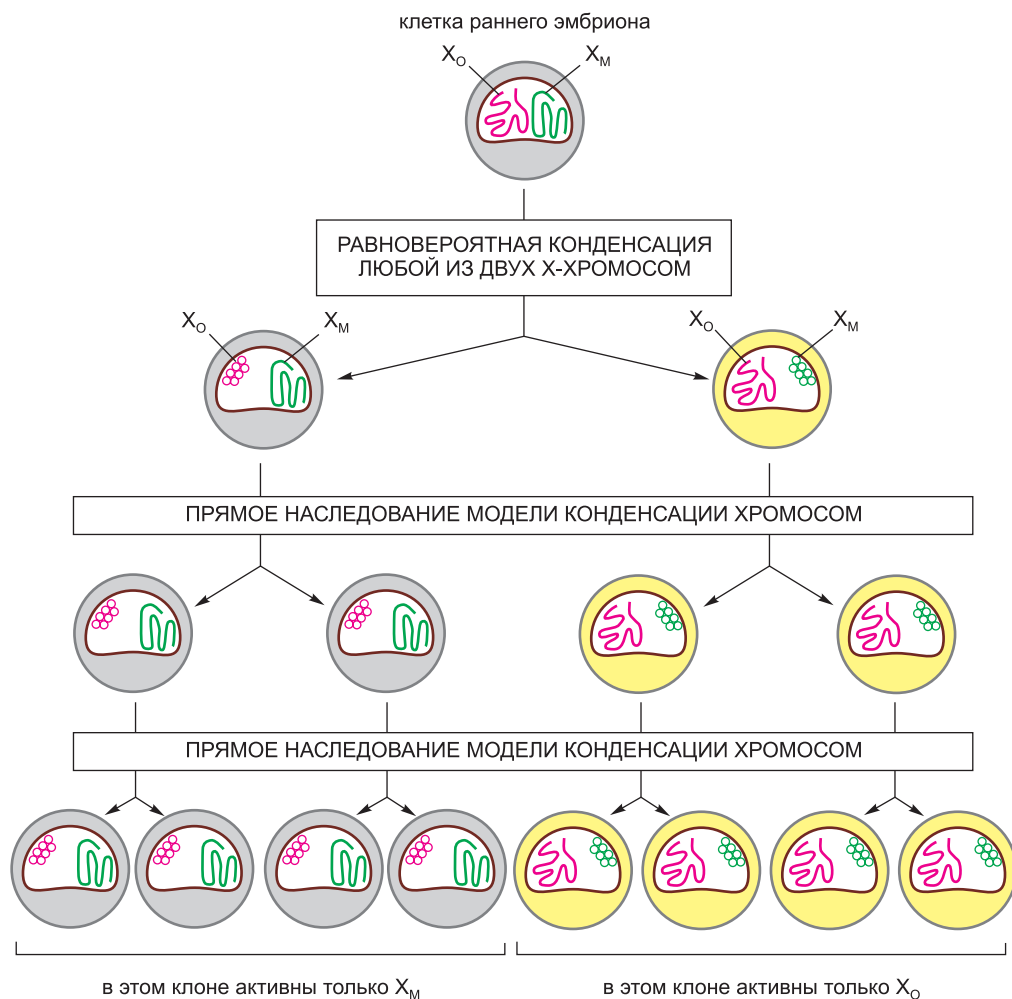


Рис. 7.89. Инактивация X-хромосомы. Клональное наследование конденсированной неактивной X-хромосомы, что имеет место у самок млекопитающих.

хромосом) является критическим параметром выживания.

У млекопитающих компенсация доз генов достигается путем инактивации транскрипции одной из двух X-хромосом в женских соматических клетках — процесс, известный как **инактивация X-хромосомы (X-inactivation)**. На ранней стадии развития женского эмбриона, когда он состоит из нескольких тысяч клеток, одна из двух X-хромосом в каждой клетке сильно конденсируется в тип гетерохроматина. Конденсированную X-хромосому можно легко увидеть в световой микроскоп в интерфазных клетках: она располагается в окрестностях ядерной мембраны (**рис. 7.88**), и ее первоначальным названием было *тельце Барра (Barr body)*. В результате инактивации две X-хромосомы могут сосуществовать в одном ядре, подвергаясь действию одних и тех же диффундирующих регуляторных белков, но

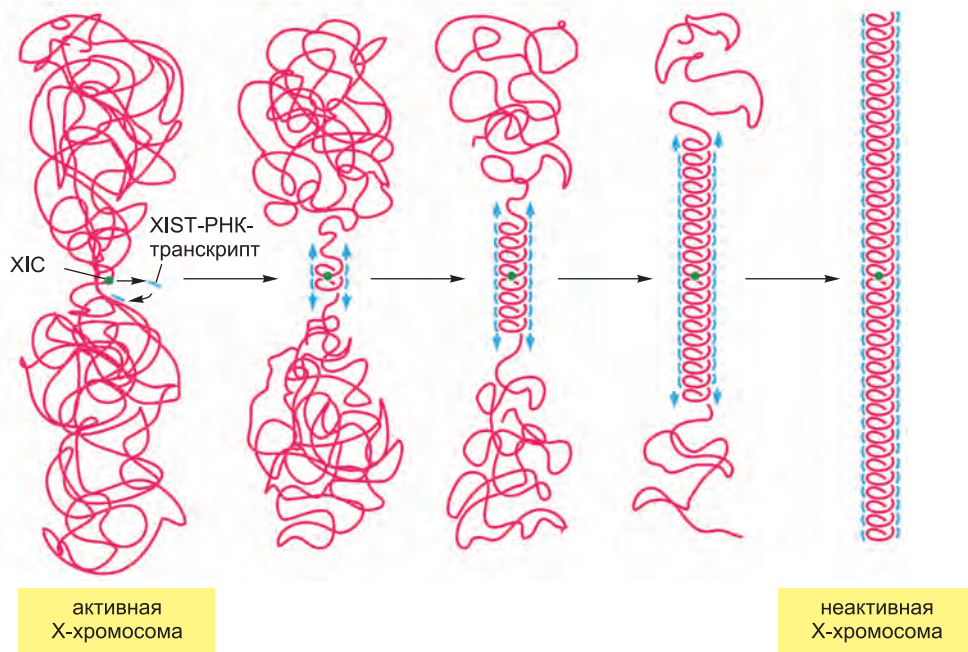


Рис. 7.90. Инактивация X-хромосомы у млекопитающих. Инактивация X-хромосомы начинается с синтеза XIST-PHK (специфический к инактивации X-хромосомы транскрипт; X-inactivation specific transcript) с локуса XIC (центр инактивации X-хромосомы; X-inactivation center). Ассоциация XIST-PHK с одной из двух женских X-хромосом коррелирует с конденсацией этой хромосомы. На ранних стадиях эмбриогенеза оба процесса, присоединение XIST-PHK и конденсация хромосомы, постепенно движутся от локуса XIC по направлению к концам хромосомы. Детали того, как это происходит, остаются еще нерасшифрованными.

полностью различаясь по экспрессии своих генов.

Первоначальный выбор, какую из X-хромосом инактивировать, унаследованную от матери (X_M) или унаследованную от отца (X_O), случаен. После своей инактивации X_O или X_M остается неактивной при всех последующих делениях этой клетки и ее потомков, указывая на то, что неактивное состояние исправно поддерживается в течение множества циклов репликации ДНК и митоза. Поскольку инактивация X-хромосомы — событие случайное и происходит после того, как в эмбрионе уже сформировалось несколько тысяч клеток, каждый женский организм представляет собой мозаику из клональных групп клеток, в которых инактивирована X_O - или X_M -хромосома (рис. 7.89). Эти клональные группы расположены во взрослом организме небольшими кластерами, поскольку сестринские клетки стремятся оставаться в тесном контакте друг с другом в ходе последних стадий развития. Например, инактивация X-хромосомы вызывает рыже-черную черепаховую окраску шерсти некоторых кошек. У этих кошек одна X-хромосома несет ген, который дает рыжую окраску шерсти, а другая X-хромосома несет аллель того же гена, в результате действия которого образуется черный окрас. Это случайная инактивация X-хромосомы, что порождает участки клеток разного цвета. В отличие от кошек, коты этой генетической линии либо абсолютно рыжие, либо абсолютно черные в

зависимости от того, какую X-хромосому они унаследовали от своих матерей.

Инактивация X-хромосомы поддерживается в течение тысячи клеточных делений, но она не всегда постоянна. В частности, она обратима в ходе образования половых клеток, так что все гаплоидные ооциты содержат активную X-хромосому и могут экспрессировать продукты ее генов.

Как происходит инактивация транскрипции целой хромосомы? Инактивация X-хромосомы начинается и распространяется от единственного участка в середине X-хромосомы, **центра инактивации X-хромосомы (X-inactivation center, XIC)**. В XIC закодирована необычная молекула РНК, *XIST-РНК*, которая экспрессируется исключительно с неактивной X-хромосомы и чья экспрессия необходима для ее инактивации. С *XIST-РНК* не синтезируется белок, и она остается в ядре, где в итоге покрывает всю неактивную X-хромосому. Распространение *XIST-РНК*, начиная от XIC и по всей хромосоме, совпадает с распространением сайленсинга генов, указывая на то, что *XIST-РНК* направляет образование и расширение области гетерохроматина (рис. 7.90). Любопытно, что около 10% генов на X-хромосоме избегают этого подавления транскрипции и остаются активными.

Помимо содержания *XIST-РНК*, гетерохроматин X-хромосомы характеризуется также наличием специфического варианта гистона 2A, гипоацетилированием гистонов H3 и H4, убиквитилированием гистона 2A, метилированием специфических позиций на гистоне H3 и специфическими вариантами метилирования ДНК (относительно предположения о том, как все эти признаки могут быть причинно связаны, см. рис. 7.81). Комбинация подобных модификаций, по-видимому, делает большую часть инактивированной X-хромосомы необычайно невосприимчивой к транскрипции. Поскольку, в принципе, эти модификации по крайней мере являются самораспространяющимися, то легко увидеть, как после инактивации X-хромосомы, это состояние может стабильно поддерживаться в течение многих клеточных делений.

Многие свойства инактивации X-хромосомы у млекопитающих остаются еще не открытыми. Как принимается первоначальное решение: какую из X-хромосом инактивировать? Какой механизм препятствует инактивации также и другой X-хромосомы? Как *XIST-РНК* координирует образование гетерохроматина? Как некоторые гены X-хромосомы избегают инактивации? Мы только начинаем понимать этот механизм регуляции генов, который является ключевым для выживания нашего собственного вида.

Инактивация X-хромосомы у самок — это только один из способов, с помощью которых в организмах, размножающихся половым путем, достигается компенсация доз генов. У дрозофилы большинство генов на единственной X-хромосоме, которая есть в мужских клетках, транскрибируются примерно в два раза интенсивнее, чем их копии в женских клетках. Эта специфическая для самцов «повышающая регуляция» (up-regulation) транскрипции является результатом изменения структуры хроматина на всей X-хромосоме самца. Комплекс компенсации доз генов содержит несколько модифицирующих гистоны ферментов, так же как и две некодирующие РНК, транскрибированные с X-хромосомы. Он собирается на сотнях участков вдоль X-хромосомы и создает картины модификации гистонов, которые, предполагается, повышают интенсивность транскрипции, благодаря воздействиям на ее инициацию или элонгацию, большинства генов X-хромосомы самца.

У нематод используется третий тип стратегии компенсации доз генов. В данном случае два пола представлены самцами (с одной X-хромосомой) и гермафро-

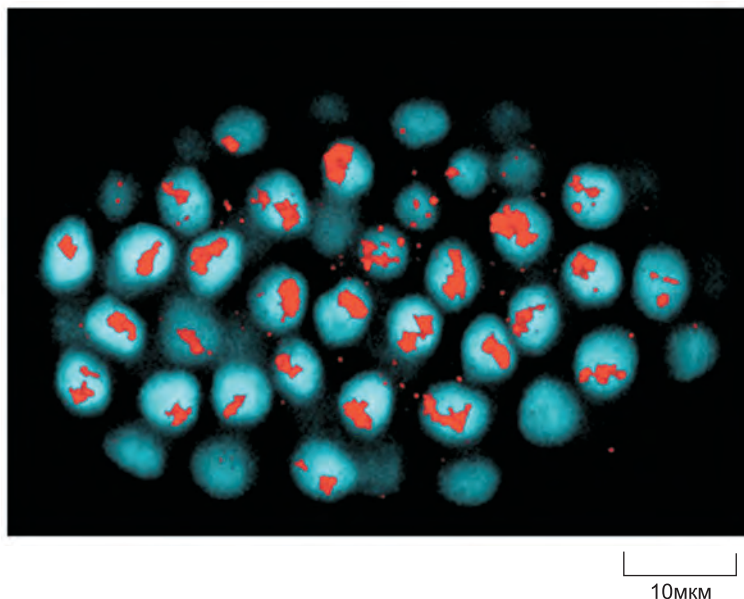


Рис. 7.91. Расположение белков, отвечающих за компенсацию доз генов, относительно X-хромосом в ядрах гермафродита (XX) *C. elegans*. На этом рисунке показаны многочисленные ядра, взятые из развивающегося эмбриона. Вся ДНК окрашена голубым при помощи интеркалирующего в ДНК красителя DAPI, а белок Sdc2 окрашен красным благодаря использованию анти-Sdc2-антител, конъюгированных с флуоресцентным красителем. Опыт показал, что белок Sdc2 ассоциирует только с ограниченным набором хромосом, идентифицированных в ходе других опытов как две X-хромосомы. Белок Sdc2 связывается по всей длине X-хромосомы и привлекает комплекс компенсации доз генов. (Из Н.Е. Dawes et al., *Science* 284: 1800–1804, 1999. С разрешения AAAS.)

дитами (с двумя X-хромосомами) и компенсация доз происходит путем примерно двукратной «понижающей регуляции» (down-regulation) транскрипции каждой из двух X-хромосом в клетках гермафродита. Это осуществляется посредством структурных, охватывающих всю хромосому изменений в X-хромосомах гермафродитов (рис. 7.91). Комплекс компенсации доз генов, который полностью отличается от комплекса дрозофилы и напоминает, вместо этого, комплекс *конденсина* (*condensin*), обеспечивающий компактизацию хромосом в ходе митоза и мейоза (см. рис. 17.27), собирается вдоль каждой X-хромосомы гермафродита и при помощи неизвестного механизма налагает глобальную двукратную репрессию на нормальный уровень экспрессии каждого гена.

Стратегия и средства, используемые для того, чтобы вызвать компенсацию доз генов, отличаются у млекопитающих, мух и червей, но все они включают в себя структурные изменения, затрагивающие целиком всю X-хромосому. Вероятно, что в ходе эволюции происходила независимая адаптация и приспособление характерных черт структуры хромосом, являющихся достаточно общими для всех, с целью преодолеть проблему высокой специфичности при регуляции генов, с чем сталкиваются животные, размножающиеся половым путем.

7.4.17. В системе, контролирующей экспрессию генов, есть удивительные шумы

До настоящего момента в этой главе экспрессия генов рассматривалась нами так, как если бы она была строго детерминированным процессом, так что если бы была известна концентрация всех соответствующих регуляторных белков и других контролирующих молекул, то можно было бы точно предсказать уровень экспрессии генов. На самом же деле поведению клетки присуще большое число случайных отклонений. Частично это происходит из-за случайных флуктуаций, происходящих в окружающей среде, и это нарушает концентрации регуляторных молекул внутри клетки непредсказуемым образом. Другой возможной причиной в некоторых случаях может быть хаотическое поведение внутриклеточной системы контроля. Математический анализ показывает, что даже достаточно простые контролирующие системы могут быть чрезвычайно чувствительными к контролирующим параметрам таким образом, что, например, крошечная разница в начальных условиях может привести к совершенно другому долгосрочному результату. Но, кроме этих причин непредсказуемости, существует дополнительная, более фундаментальная причина того, почему все поведение клетки в некоторой степени «неизбежно случайно».

Клетки представляют собой химические системы, состоящие из относительно малого количества молекул, и химические реакции на уровне отдельных молекул происходят, по существу, случайным, или *стохастическим (stochastic)*, образом. Заданная молекула за единицу времени с определенной вероятностью подвергается химической реакции, но произойдет ли это на самом деле в любой данный момент времени, предсказать невозможно — это зависит от случайных тепловых столкновений и вероятностных правил квантовой механики. Чем меньше число молекул, управляющих процессом внутри клетки, тем сильнее на него будет влиять случайность химических актов на одномолекулярном уровне. Таким образом, существует некоторая степень случайности в каждом аспекте поведения клетки, но определенные процессы склонны к этому в высокой степени.

В частности, контроль транскрипции, зависит от точного химического состояния гена. Рассмотрим простой идеальный случай, в котором ген транскрибируется до тех пор, пока белок-активатор транскрипции связан с его регуляторной областью, и становится транскрипционно неактивным, если этот белок не связан. Реакция ассоциации/диссоциации между регуляторной областью ДНК и белком является стохастической: если время полужизни t_x связанного состояния составляет час, то ген может оставаться активным иногда в течение 30 минут или меньше, а иногда в течение нескольких часов кряду перед тем, как белок-активатор диссоциирует. Таким образом, транскрипция будет колебаться между активным и неактивным состояниями, по существу, случайным образом. Средняя скорость колебания и отношение среднего времени, проведенного в активном состоянии, ко времени, проведенному в неактивном состоянии, будет определяться величинами $k_{\text{неакт}}$ и $k_{\text{акт}}$ для реакции связывания и концентрацией белка-активатора в клетке. Количество транскриптов гена, накапливаемых в клетке, будет колебаться соответственно; если время жизни транскриптов больше t_x , колебания будут сглаженными, если меньше — резкими.

Один из способов демонстрации подобных случайных колебаний в экспрессии отдельных копий генов состоит в конструировании при помощи методов генной инженерии клеток, в которых одна копия контролирующей области гена соединена с

последовательностью, кодирующей зеленый флуоресцентный репортерный белок, а другая копия подобным же образом соединена с последовательностью, кодирующей красный флуоресцентный репортерный белок. Оба этих генетических конструкта находятся в одной клетке и подвергаются одинаковому воздействию окружающей среды, но флуктуации в уровне их экспрессии проходят независимо. В результате в популяции клеток, несущих одну и ту же пару конструктов, некоторые клетки оказываются зелеными, другие красными, а третьи являются смесью двух цветов и, таким образом, представлены различными оттенками желтого (см. рис. 8.75). В более общем случае решение о судьбе клетки часто «принимается» стохастически, по-видимому, по причине подобных случайных флуктуаций; в главе 23, где обсуждается происхождение различных типов лейкоцитов, мы еще столкнемся с подобными явлениями.

В некоторых типах клеток и для некоторых аспектов поведения клетки только что описанная случайность в контроле транскрипции генов, вероятно, становится основным источником случайной изменчивости, в других типах клеток преобладают иные источники случайных отклонений. Если шум в контролирующей системе был бы опасен, то развились бы специальные регулирующие механизмы для сведения его эффектов к минимуму; петля прямой связи, описанная ранее, является примером такого устройства, помогающего отфильтровывать воздействие быстрых колебаний в контролирующем сигнале. Но во всех клетках некоторая степень случайности неизбежна. Это фундаментальная черта поведения клетки.

Заключение

Многие типы клеток животных и растений образуются большей частью с использованием механизмов, вызывающих транскрипцию разных наборов генов в различных клетках. Поскольку специализированные животные клетки могут сохранять свой уникальный характер в течение множества циклов клеточных делений и даже при росте в культуре, то механизмы регуляции генов, которые участвуют в их создании, однажды установившись, должны быть стабильными и передаваться по наследству при делении клетки. Эти качества отражают память клетки об истории своего развития. Бактерии и дрожжи также демонстрируют наличие у них клеточной памяти и представляют собой необычайно доступные модельные системы для изучения механизмов регуляции генов.

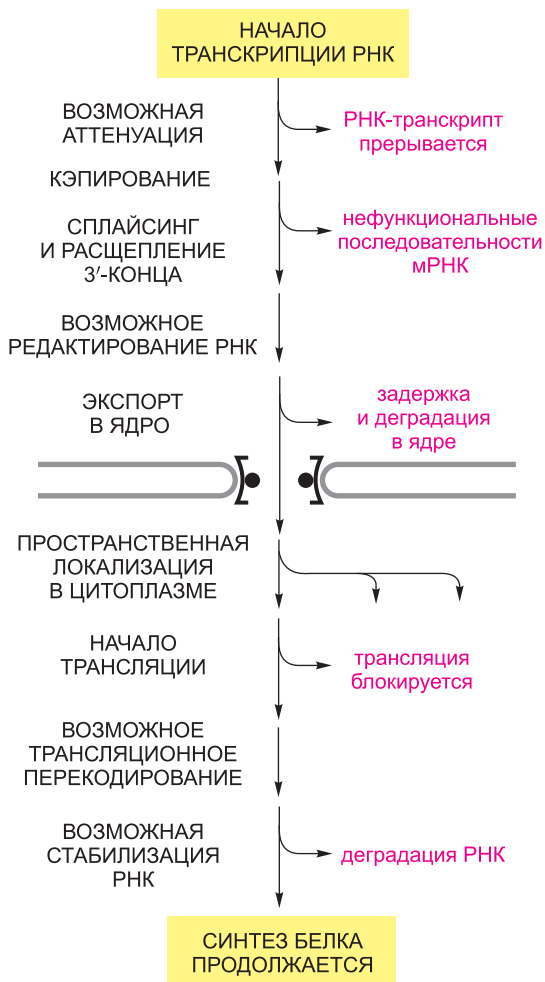
Прямые или косвенные петли положительной обратной связи, которые дают возможность регуляторным белкам сохранять и поддерживать свой собственный синтез, обеспечивают простейший механизм клеточной памяти. Транскрипционные цепи также служат в клетке средствами для выполнения логических операций и измерения времени. Простые транскрипционные цепи, объединенные в крупные регуляторные сети, выполняют сложные программы эмбрионального развития.

У эукариот транскрипция любого специфического гена главным образом контролируется комбинацией регуляторных белков. Полагают, что каждый тип клеток в высшем эукариотическом организме содержит специфический набор регуляторных белков, которые обеспечивают экспрессию только тех генов, которые соответствуют этому типу клетки. Любой конкретный регуляторный белок может быть активным в широком спектре разнообразных обстоятельств и обычно участвует в регуляции множества различных генов.

В отличие от бактерий, эукариотические клетки используют передаваемые

Рис. 7.92. Посттранскрипционные средства контроля экспрессии генов. Конечная скорость синтеза белка может, в принципе, регулироваться на любом из указанных этапов. Сплайсинг, редактирование РНК и перекодирование трансляции (описано в главе 6) также могут изменять последовательность аминокислот в белке, что дает клетке возможность образовывать более одного варианта белка с одного и того же гена. Вероятно, лишь несколько из приведенных здесь этапов критичны при регуляции какого-либо конкретного белка.

по наследству состояния конденсации хроматина как дополнительный механизм регуляции экспрессии генов и создания клеточной памяти. Особенно яркий пример — инактивация целой X-хромосомы у самок млекопитающих. Метилирование ДНК также может осуществлять сайленсинг генов, который будет передаваться по наследству. Кроме того, этот механизм лежит в основе феномена геномного импринтинга у млекопитающих, при котором экспрессия гена зависит от того, был ли он унаследован от матери или от отца.



7.5. Посттранскрипционные средства контроля

В принципе, каждый этап, необходимый для экспрессии генов, может контролироваться. Действительно, можно найти примеры каждого вида регуляции, и многие гены регулируются посредством множества механизмов. Как отмечалось выше, контроль инициации транскрипции генов является крайне важной формой регуляции для всех генов. Но на более поздних этапах пути от ДНК к белку могут функционировать и другие средства контроля, регулируя количество произведенного генного продукта и в некоторых случаях определяя точную аминокислотную последовательность белкового продукта. Эти **посттранскрипционные средства контроля (post-transcriptional controls)**, которые действуют после того, как РНК-полимераза связалась с промотором гена и начала синтез РНК, являются ключевыми для регуляции множества генов.

В последующих разделах мы рассмотрим варианты посттранскрипционной регуляции по их порядку во времени, согласно последовательности событий, которым может подвергнуться молекула РНК после начала ее транскрипции (**рис. 7.92**).

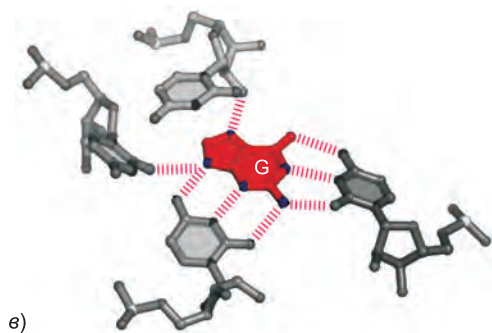
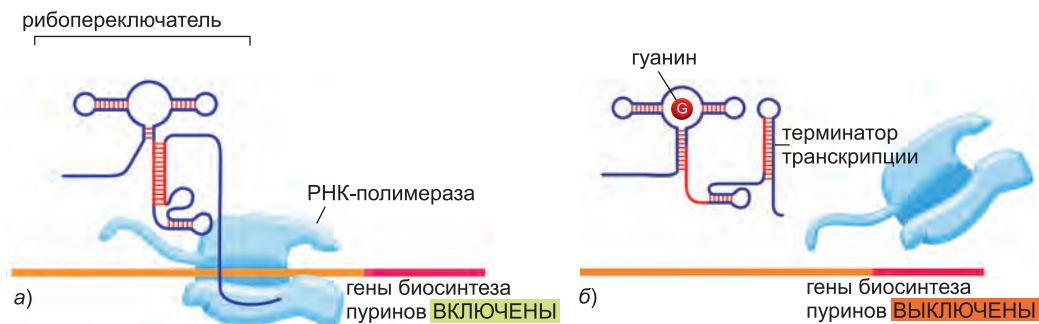


Рис. 7.93. Рибопереключатель, реагирующий на гуанин. а) В этом примере, взятом из бактериальной клетки, рибопереключатель контролирует экспрессию генов биосинтеза пуринов. При низкой концентрации гуанина в клетках элонгирующая РНК-полимераза транскрибирует гены биосинтеза пуринов, следовательно, происходит экспрессия ферментов, необходимых для синтеза гуанина. б) При избыточной концентрации гуанина он связывается с рибопереключателем, вызывая его конформационное изменение, что заставляет РНК-полимеразу терминировать транскрипцию (см. рис. 6.11). в) Гуанин (красный), связанный с рибопереключателем.

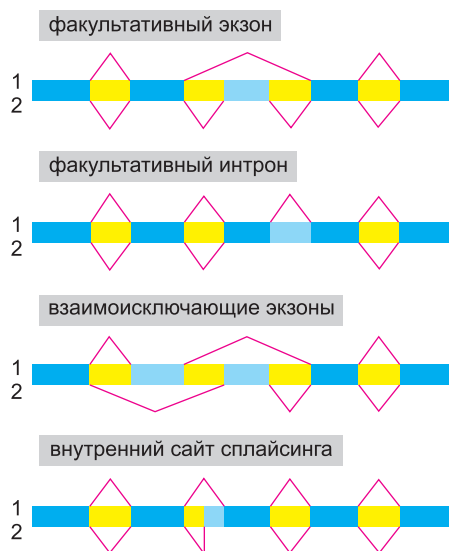
Показаны только те нуклеотиды, которые образуют гуанин-связывающий карман. Существует много других рибопереключателей, включая те, которые распознают S-аденозилметионин, коэнзим B_{12} , флавиномононуклеотид, аденин, лизин и глицин. (Адаптировано из M. Mandal and R. R. Breaker, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 451–63, 2004, с разрешения Macmillan Publishers Ltd., и C. K. Vanderpool and S. Gottesman, *Mol. Microbiol.* 54: 1076–1089, 2004, с разрешения Blackwell Publishing.)

7.5.1. Аттенуация транскрипции приводит к преждевременной терминации синтеза некоторых молекул РНК

Давно известно, что экспрессия определенных генов у бактерий ингибируется путем преждевременной терминации транскрипции, — феномен, именуемый **аттенуацией транскрипции (transcription attenuation)**. Иногда в таких случаях растущая цепь РНК принимает конформацию, которая приводит к ее взаимодействию с РНК-полимеразой, причем таким образом, что транскрипция останавливается. При необходимости синтеза генного продукта регуляторные белки связываются с растущей цепью РНК и препятствуют аттенуации, позволяя довести транскрипцию до получения полной молекулы РНК.

Аттенуация транскрипции также действует и у эукариот. Хорошо изученный пример встречается в ходе жизненного цикла HIV — вируса иммунодефицита человека, вызывающего синдром приобретенного иммунодефицита, или AIDS. После встраивания в геном хозяина вирусная ДНК транскрибируется РНК-полимеразой II клетки (см. рис. 5.71). Однако полимеразы обычно прекращают транскрипцию после синтеза транскриптов длиной несколько сотен нуклеотидов, и, следовательно, неэффективно транскрибируют весь вирусный геном. При оптимальных условиях для роста вируса кодируемый вирусом белок под названием Tat, который свя-

Рис. 7.94. Четыре варианта альтернативного сплайсинга РНК. В каждом случае один тип РНК-транскрипта сплайсируется двумя альтернативными способами с образованием двух разных мРНК (1 и 2). Синими прямоугольниками отмечены последовательности экзонов, которые сохраняются в обоих мРНК. Голубые прямоугольники соответствуют возможным последовательностям экзонов, имеющимся лишь в мРНК одного типа. Прямоугольники, соединенные красными линиями, отмечают места удаления последовательностей интронов (желтые). (Адаптировано с разрешения из A. Andreadis, M. E. Gallego and B. Nadal-Ginard, *Annu. Rev. Cell Biol.* 3: 207–242, 1987. С разрешения Annual Reviews.)



зывается со специфической структурой типа «стебель-петля» на растущей цепи РНК, содержащей «выпяченное основание» (bulged base), отменяет такую преждевременную терминацию. После связывания с этой специфической структурой РНК (именуемой Tar) Tat собирает несколько клеточных белков, позволяющих РНК-полимеразе продолжать транскрипцию. Роль по крайней мере нескольких из этих белков в норме заключается в предотвращении остановки и преждевременной терминации синтеза РНК-полимеразой при транскрипции ею нормальных генов клетки. Эукариотические гены часто содержат длинные интроны, и, чтобы происходила эффективная транскрипция гена, РНК-полимераза II не может себе позволить задерживаться на нуклеотидных последовательностях, которые, случается, приводят к ее остановке. Таким образом, нормальный клеточный механизм, очевидно, был адаптирован вирусом иммунодефицита человека, чтобы эффективно транскрибировать свой геном под контролем одного-единственного вирусного белка.

7.5.2. Рибопереключателю могут быть представителями древней формы генетического контроля

В главе 6 обсуждалась идея о том, что, до возникновения современных клеток на Земле, РНК и хранила наследственную информацию, и катализировала химические реакции. Недавнее открытие *рибопереключателю (riboswitches)* показало, что РНК также может образовывать контролирующие устройства, регулирующие экспрессию генов. Рибопереключателю представляют собой короткие последовательности РНК, меняющие свою конформацию при связывании с небольшими молекулами, например молекулами метаболитов. Каждый рибопереключателю узнает специфическое низкомолекулярное соединение, и происходящее в результате конформационное изменение используется для регуляции экспрессии генов. Рибопереключателю часто располагаются около 5'-конца молекул мРНК и сворачиваются в то время, пока синтезируется мРНК, и в зависимости от того, связана регуляторная малая молекула или нет, блокируют движение РНК-полимеразы или позволяют ей двигаться вперед (рис. 7.93).

Рибопереключателю особенно часто встречаются у бактерий, где они чув-

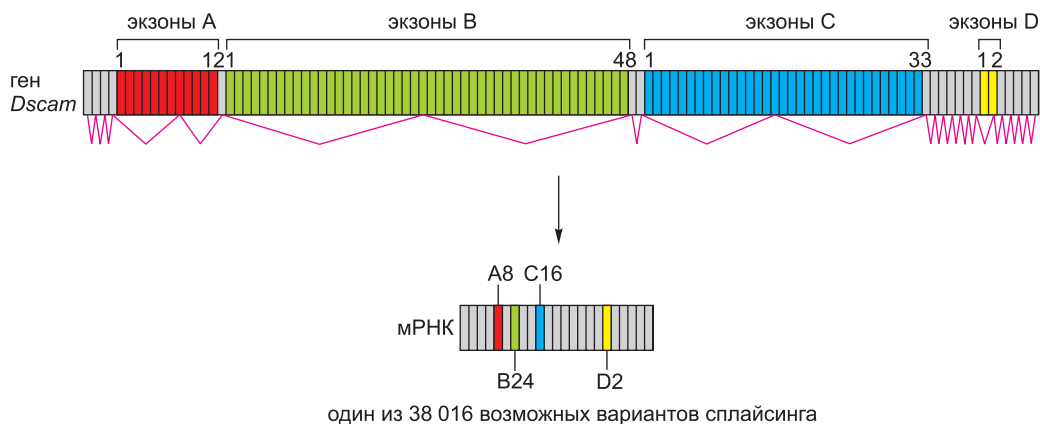


Рис. 7.95. Альтернативный сплайсинг РНК-транскриптов гена *Dscam* дрозофилы. Белки DSCAM являются направляющими рецепторами аксонов, которые помогают направлять конусы роста к соответствующим мишеням в развивающейся нервной системе. Конечная мРНК содержит 24 экзона, четыре из которых (обозначены А, В, С и D) представлены в гене *Dscam* как ряды альтернативных экзонов. Каждая РНК содержит от 1 до 12 альтернативных вариантов для экзона А (красные), от 1 до 48 – для экзона В (зеленые), от 1 до 33 – для экзона С (синие) и от 1 до 2 альтернативных вариантов для экзона D (желтые). Если использовать все возможные комбинации сплайсинга, то, в принципе, с гена *Dscam* можно синтезировать 38016 различных белков. На этом рисунке приведен только один из возможных вариантов сплайсинга (отмечен красной линией и показан в виде зрелой мРНК внизу). Каждый вариант белка *Dscam* будет сворачиваться приблизительно в одну и ту же структуру (преимущественно серию внеклеточных иммуноглобулин-подобных доменов, соединенных с трансмембранной областью (см. рис. 25.74)), но аминокислотная последовательность доменов будет варьироваться в соответствии с вариантом сплайсинга. Подозревают, что это разнообразие форм рецептора вносит свой вклад в образование сложных нервных цепей, но точные свойства и функции множества вариантов белка *Dscam* пока не выяснены. (Адаптировано из D. L. Black, *Cell* 103: 367–370, 2000. С разрешения Elsevier.)

ствительны к наличию в клетке важных низкомолекулярных метаболитов и в соответствии с этим регулируют экспрессию генов. Возможно, к их наиболее примечательным свойствам относится высокая специфичность и сродство, с которыми каждый рибопереклюатель узнает только соответствующую ему малую молекулу; во многих случаях все химические характеристики малой молекулы считаются РНК (рис. 7.93, в). Кроме того, наблюдаемые значения аффинности связывания достигают тех же значений, которые характеризуют сильное связывание между низкомолекулярными соединениями и белками.

Рибопереклюатели, возможно, дают нам пример самых экономичных контролируемых генов устройств, поскольку совершенно пренебрегают необходимостью использовать регуляторные белки. В примере, показанном на рис. 7.93, рибопереклюатель контролирует элонгацию транскрипции, но рибопереклюатели регулируют и другие этапы экспрессии генов, что будет видно дальше по ходу этой главы. Очевидно, что крайне сложные устройства контроля генов могут быть построены из коротких последовательностей РНК.

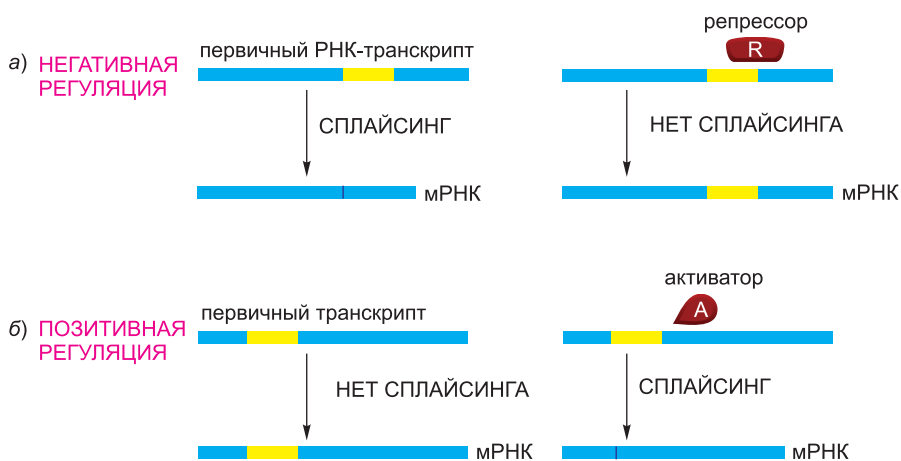


Рис. 7.96. Негативная и позитивная регуляция альтернативного сплайсинга РНК. а) При негативной регуляции белок-репрессор связывается с транскриптом пре-мРНК и блокирует доступ аппарата сплайсинга к границе сплайсинга. Это часто приводит к использованию скрытых сайтов сплайсинга и, таким образом, к изменению варианта сплайсинга (не показан). б) При позитивной регуляции аппарат сплайсинга не способен эффективно удалять определенную интронную последовательность без помощи белка-активатора. Поскольку нуклеотидные последовательности, с которыми связываются эти активаторы, могут располагаться на много нуклеотидных пар дальше контролируемых ими границ сплайсинга, они часто называются *энхансерами сплайсинга*.

7.5.3. Альтернативный сплайсинг РНК позволяет получать различные формы белка от одного гена

Как обсуждалось в главе 6, сплайсинг РНК укорачивает транскрипты многих эукариотических генов, удаляя последовательности интронов из пре-мРНК. Мы также видели, что в клетке сплайсинг РНК-транскрипта может происходить поразному, и, таким образом, с одного гена получают различные полипептидные цепи — процесс, называемый **альтернативным сплайсингом РНК (alternative RNA splicing)**; см. рис. 6.27 и рис. 7.94). Существенная часть генов животных (примерно 40% у мухи и 75% у человека) образует многочисленные белки подобным образом.

Если существует несколько возможных точек сплайсинга в транскрипте, то из одного гена можно получить десятки различных белков. В одном предельном случае ген дрозофилы с помощью альтернативного сплайсинга может образовать до 38000 различных белков с одного гена (рис. 7.95), но в экспериментах пока обнаружена только часть этих форм. Учитывая, что геном дрозофилы состоит приблизительно из 14 000 идентифицированных генов, ясно, что сложность белкового состава организма может значительно превышать число его генов. Этот пример также иллюстрирует опасность постановки знака равенства между числом генов и сложностью организации организма. Например, альтернативный сплайсинг является сравнительно редким явлением у одноклеточных почкующихся дрожжей, но весьма распространен у дрозофилы. У почкующихся дрожжей примерно 6200 генов, только 300 из которых подвергаются сплайсингу, и практически все из них имеют лишь один интрон. Говорить, что у мухи только в 2–3 раза больше генов,

чем у дрожжей, значит значительно преуменьшать разницу в сложности этих двух геномов.

В некоторых случаях альтернативный сплайсинг РНК имеет место вследствие *неоднозначности интрона (intron sequence ambiguity)*: стандартный механизм сплайсосомы, удаляющий интронные последовательности (описан в главе 6), не может четко различать две или более альтернативные пары 5'- и 3'-сайтов сплайсинга, так что в разных ситуациях случайно реализуются разные варианты. При подобном конститутивном альтернативном сплайсинге во всех клетках, где ген экспрессируется, образуются кодируемые им разные версии одного и того же белка.

Однако во многих случаях регулируется именно альтернативный сплайсинг РНК, а не конститутивный. В простейших примерах регулируемый сплайсинг используется для переключения между синтезом нефункционального и функционального белка. Например, функциональная форма транспозазы, катализирующей транспозицию Р-элемента дрозофилы, синтезируется в половых клетках, а нефункциональная форма — в соматических клетках, что позволяет Р-элементу распространяться по геному мухи, не причиняя вреда соматическим клеткам (см. рис. 5.69). Показано, что различие в активности транспозазы обусловлено наличием интрона в РНК транспозазы, который вырезается только в половых клетках.

Кроме переключения с синтеза функционально активной формы белка на синтез нефункциональной, регуляция сплайсинга РНК может приводить к созданию в разных типах клеток различных вариантов белка в соответствии с потребностями клетки. Например, в разных тканях тропомиозин синтезируется в различных специализированных формах (см. рис. 6.27). Формы многих других клеточно-специфичных белков образуются таким же способом.

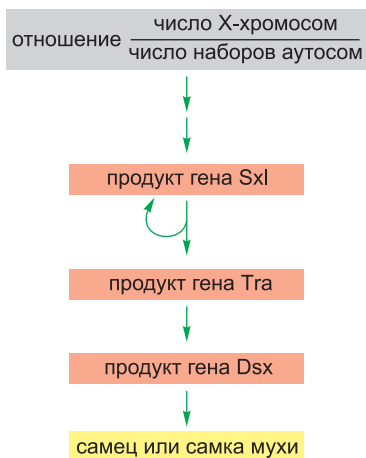
Сплайсинг РНК может регулироваться как негативно — когда регуляторная молекула перекрывает доступ аппарата, осуществляющего сплайсинг, к определенному сайту расщепления на РНК; так и позитивно — когда регуляторная молекула помогает направить аппарат сплайсинга к сайту, пропускаемому в других случаях (рис. 7.96).

Вследствие гибкости процесса сплайсинга РНК блокирование «сильного» сайта сплайсинга часто будет приводить к проявлению «слабого» сайта и в результате — к различным вариантам сплайсинга. Подобно этому при подавлении конкурирующего сайта активация субоптимального сайта сплайсинга может заканчиваться альтернативным сплайсингом. Таким образом, сплайсинг молекулы пре-мРНК можно рассматривать как хрупкий баланс между конкурирующими сайтами сплайсинга — баланс, который может легко смещаться в одну или другую сторону под действием регуляторных белков.

7.5.4. Открытие альтернативного сплайсинга требует пересмотра понятия «ген»

С тех пор, как стало известно, что эукариотические гены обычно содержат интроны, а их кодирующие последовательности можно состыковать по-разному, вновь встал вопрос о том, что следует понимать под словом «ген». Первое определение гена на молекулярном уровне было предложено в начале 1940-х гг. на основании изучения биохимической генетики гриба нейроспора. До этого времени геном считали область генома, которая в ходе мейоза обособляется как отдельная единица и ответственна за проявление определенного фенотипического признака,

Рис. 7.97. Определение пола у дрозофилы. Приведенные генные продукты участвуют в последовательном каскаде реакций, отвечающих за определение пола мухи согласно соотношению числа X-хромосом к набору аутосом (X/A). Гены *Sex-lethal (Sxl)*, *Transformer (Tra)* и *Doublesex (Dsx)* получили свои имена в соответствии с фенотипами, получающимися при их инактивации мутацией. Функция продуктов этих генов состоит в передаче информации о соотношении X/A множеству других генов, определяющих фенотип, характерный для того или иного пола. Эти другие гены функционируют как два альтернативных набора: одни определяют свойства, характерные для самки, другие – для самца (см. рис. 7.98).



например, белых или красных глаз у дрозофилы либо гладких или морщинистых семян у гороха. Работа на нейреспоре показала, что большинство генов соответствуют областям генома, направляющим синтез единственного фермента (для каждого гена — своего). На основании этого возникло предположение, что один ген кодирует одну полипептидную цепь. Эта гипотеза оказалась весьма плодотворной для последующих исследований. Когда в 1960-х гг. стало больше известно о механизмах экспрессии генов, ген стали определять как фрагмент ДНК, который транскрибируется с образованием РНК, кодирующей одну полипептидную цепь (или одну структурную РНК, как например, молекулы тРНК или рРНК). Открытие в конце 1970-х гг. прерывистых генов и интронов легко укладывалось в первоначальное определение гена при условии, что одна полипептидная цепь определяется РНК, транскрибируемой с любой одной последовательности ДНК. Однако теперь нам стало ясно, что в клетках высших эукариот благодаря альтернативному сплайсингу РНК многие последовательности ДНК могут кодировать набор различных, но родственных белков. Что же тогда следует считать геном?

В тех относительно редких случаях, когда два сильно различающихся эукариотических белка образуются из одной транскрипционной единицы, говорят, что эти белки кодируются различными генами, которые на хромосоме перекрываются. Однако определение большинства вариантов белка, образующихся в результате альтернативного сплайсинга РНК, как продуктов перекрывающихся генов, может показаться излишне сложным. Проще изменить исходную формулировку и считать геном любую последовательность ДНК, которая транскрибируется как отдельная единица и кодирует один набор близкородственных полипептидных цепей (изоформ белка). В такое определение гена также входят те последовательности ДНК, которые кодируют варианты белка, получаемые в ходе иных, чем сплайсинг РНК, посттранскрипционных процессов, как например, сдвиг рамки считывания при трансляции (см. рис. 6.78), регулируемое полиаденилирование и редактирование РНК (рассматривается ниже).

7.5.5. Определение пола дрозофилы зависит от регулируемой последовательности реакций сплайсинга РНК

Обратимся сейчас к одному из самых хорошо изученных примеров регулируемого сплайсинга РНК. У дрозофилы первичным сигналом, определяющим,

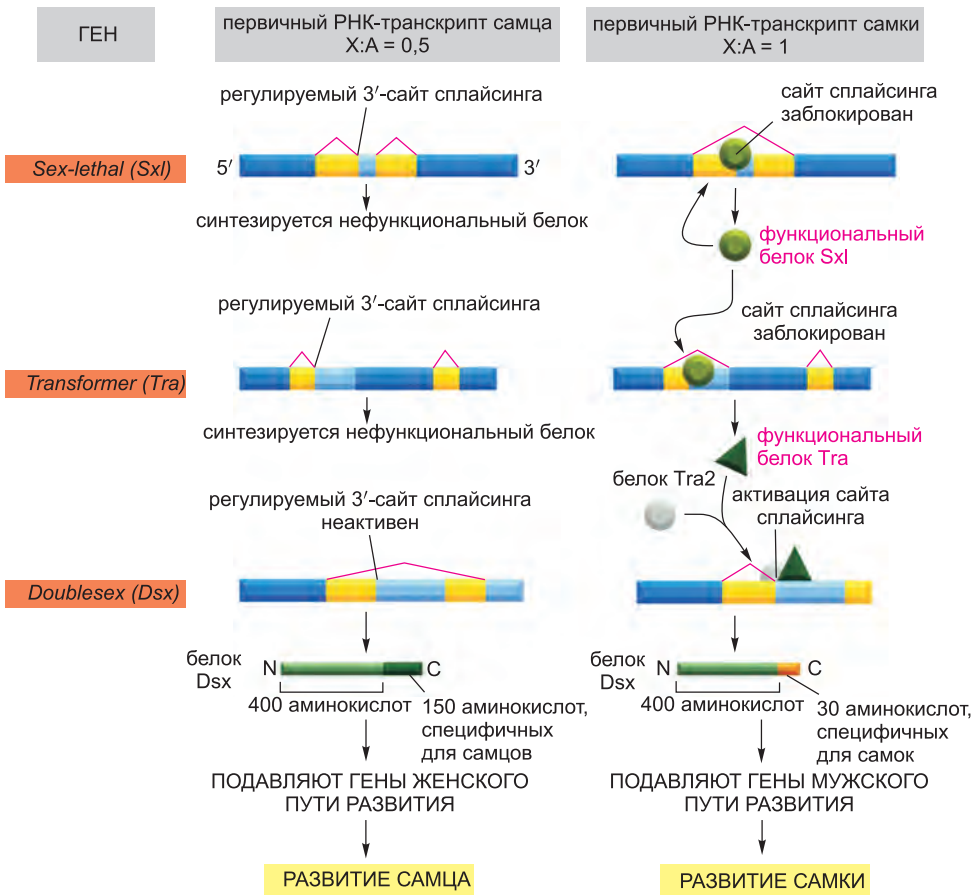


Рис. 7.98. Каскад изменений в экспрессии генов, который определяет пол у дрозофилы посредством альтернативного сплайсинга РНК. Отношение количества X-хромосом к числу наборов аутосом, равное 0,5, приводит к развитию самца. Развитие самца является путем «по умолчанию», в ходе которого транскрибируются оба гена *Sxl* и *Tra*, но их РНК подвергаются конститутивному сплайсингу с образованием нефункциональных молекул РНК, а транскрипт гена *Dsx* сплайсируется с образованием белка, который выключает гены, определяющие развитие женских признаков. Отношение X/A, равное 1, запускает в эмбрионе развитие по пути самки посредством кратковременной активации промотора внутри гена *Sxl*. Это вызывает синтез специального класса транскриптов гена *Sxl*, которые конститутивно сплайсируются с образованием функциональной формы белка *Sxl*. Белок *Sxl* — регуляторный белок сплайсинга, воздействующий на два участка: 1) он связывается с конститутивно образуемым РНК-транскриптом гена *Sxl*, вызывая его специфичный для самок сплайсинг, что приводит к продолжению образования функциональной формы белка *Sxl*, и 2) он связывается с конститутивно образуемой РНК гена *Tra* и вызывает альтернативный сплайсинг этого транскрипта, с которого теперь синтезируется активный регуляторный белок *Tra*. Белок *Tra* с конститутивно образуемым белком *Tra2* действуют совместно для образования специфичной для самок сплайсированной формы транскрипта гена *Dsx*, который кодирует женскую форму белка *Dsx*, выключающего гены, определяющие мужские признаки.

Все компоненты этого пути первоначально идентифицированы в ходе исследований мутантов дрозофилы, имеющих отклонения при половом развитии. Например, ген *Dsx* (*Doublesex* — двуполость) получил свое название благодаря тому, что у мухи, у которой отсутствовал продукт этого гена, экспрессировались обе группы признаков: специфичные для самок и самцов. Обратите внимание, что этот путь включает и негативную, и позитивную регуляцию сплайсинга (см. рис. 7.96). Белок *Sxl* связывается с участком, богатым пиримидиновыми нуклеотидными остатками, который является частью стандартной консенсусной последовательности сплайсинга, и блокирует доступ нормальному фактору сплайсинга U2AF (см. рис. 6.29). Белок *Tra* связывается со специфическими последовательностями РНК на экзоне и вместе с белком *Tra2* активирует в норме субоптимальный сигнал сплайсинга посредством связывания с U2AF.

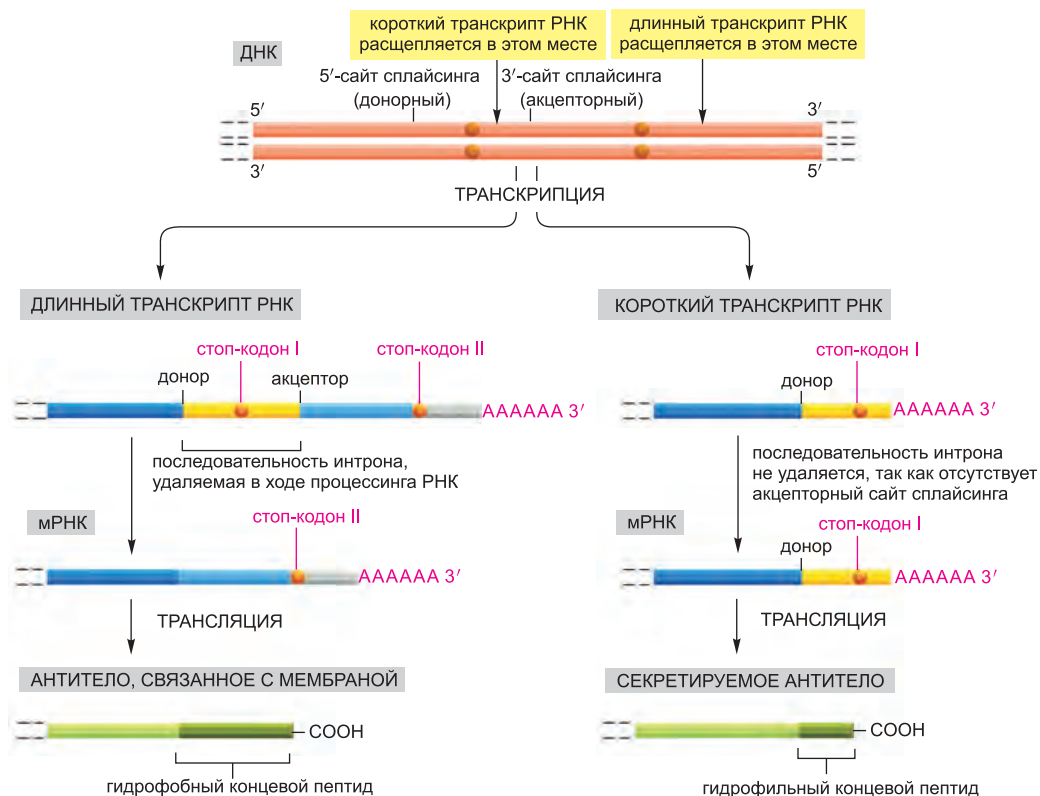


Рис. 7.99. Регулирование сайта расщепления и полиаденилирования РНК определяет, будет ли молекула антитела секретирована или останется связанной с мембраной. В нестимулированных В-лимфоцитах (слева) образуются длинные транскрипты РНК, и при сплайсинге РНК удаляется последовательность интрона вблизи 3'-конца этой молекулы. В результате образуется мРНК, которая кодирует молекулу антитела, связывающуюся с мембраной. Напротив, после стимуляции антигеном (справа) первичный транскрипт РНК расщепляется раньше сайта сплайсинга, находящегося перед последним экзоном. В результате часть последовательности интрона, удалявшейся из длинного транскрипта, остается в качестве кодирующей последовательности в коротком транскрипте. Это те нуклеотидные последовательности, которые кодируют гидрофильную часть на карбоксильном конце секретируемой молекулы антитела.

будет ли муха развиваться как самка или как самец, служит соотношение числа X-хромосом (X) к числу наборов аутосом (A). Если отношение X/A равно 1 (в норме это две X-хромосомы и два набора аутосом), особи развиваются в самок, тогда как особи с отношением X/A , равным 0,5 (в норме одна X-хромосома и два набора аутосом), развиваются как самцы. Это соотношение определяется уже на ранних стадиях развития организма и впоследствии запоминается каждой клеткой. Три ключевых генных продукта передают информацию об этом соотношении множеству других генов, которые определяют характерные для самки и для самца свойства (рис. 7.97). Как объясняется на рис. 7.98, определение пола у дрозофилы зависит от каскада реакций регулируемого сплайсинга РНК, включающих в себя три этих генных продукта.

Определение пола у дрозофилы представляет один из самых хорошо изучен-

ных примеров регуляторного каскада реакций, основанного на сплайсинге РНК, но остается неясным, почему именно эта стратегия используется у мух. Другие организмы, например нематоды, используют совершенно иную схему для определения пола — основанную на механизмах контроля транскрипции и трансляции. Кроме того, для развития самца требуется непрерывный синтез ряда нефункциональных молекул РНК, что кажется излишне расточительным. Одно из предположений состоит в том, что этот каскад реакций сплайсинга РНК, как и рассмотренные выше рибопереключатели, представляет собой древнюю стратегию контроля, оставшуюся с ранних этапов эволюции, когда РНК была преобладающей биологической молекулой и механизмы контроля экспрессии генов почти полностью основывались на взаимодействиях РНК–РНК.

7.5.6. Изменение сайта, в котором происходит расщепление транскрипта РНК и его полиаденилирование, может менять карбоксильный конец белка

В главе 6 говорилось, что у эукариот 3'-конец молекулы мРНК формируется не терминацией синтеза РНК РНК-полимеразой, а в ходе реакции расщепления РНК, которая катализируется дополнительными факторами при элонгации транскрипта (см. рис. 6.37). Клетка может контролировать место такого расщепления с

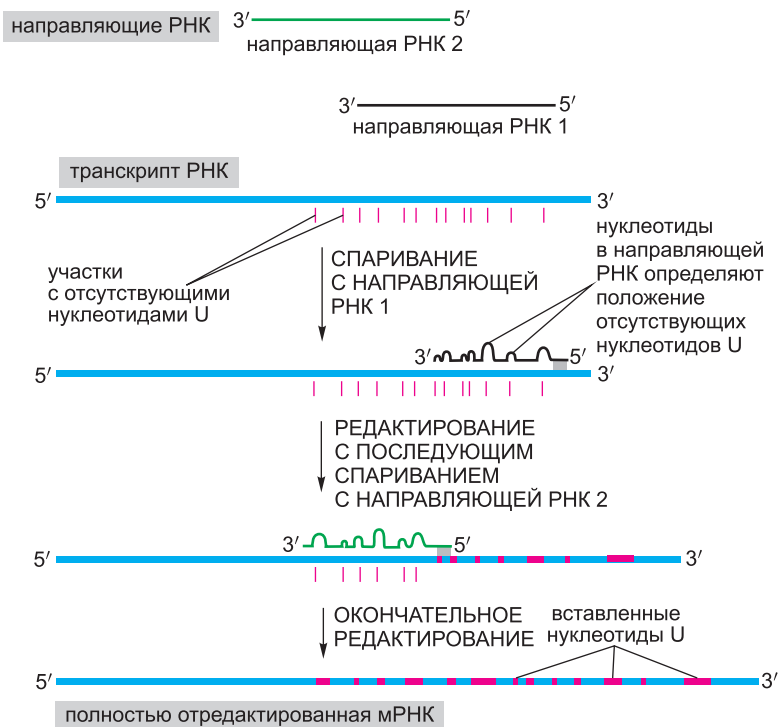


Рис. 7.100. Редактирование РНК в митохондриях трипаносом. В основном редактирование начинается вблизи 3'-конца и идет, как показано, в направлении 5'-конца транскрипта РНК, так как «якорная последовательность» на 5'-конце большинства направляющих РНК может спариваться только с редактируемыми последовательностями. Урациловые нуклеотиды добавляются специализированным ферментом, называемым уридилтрансферазой.

тем, чтобы изменить карбоксильный конец получающейся молекулы белка.

Хорошо изученным примером является переключение синтеза антител при созревании В-лимфоцитов с мембраносвязанных на секретируемые формы (см. рис. 25.17). В незрелых В-лимфоцитах образующиеся антитела связаны с плазматической мембраной, где они служат рецепторами антигенов. Стимуляция антигенами запускает деление этих клеток и начало секреции ими антител. Секретируемая форма антител отличается от мембраносвязанной формы только в терминальной части карбоксильного конца: мембраносвязанная форма содержит здесь длинную цепь из гидрофобных аминокислот, пересекающую липидный бислой мембраны, а секретируемая форма несет гораздо более короткий фрагмент гидрофильных аминокислот. Таким образом, для переключения с синтеза мембраносвязанных на секретируемые антитела необходима различная нуклеотидная последовательность на 3'-конце мРНК. Это достигается путем изменения длины первичного РНК-транскрипта в результате смены сайта расщепления РНК, как показано на **рис. 7.99**. Изменение участка расщепления происходит из-за увеличения концентрации субъединиц белка CstF, который связывается с G/U-богатыми последовательностями сайтов расщепления и полиаденилирования РНК и стимулирует расщепление РНК (см. рис. 6.37 и 6.38). Первый сайт расщепления и полиаденилирования, который встречается РНК-полимеразе, транскрибирующей ген антитела, считается субоптимальным и в нестимулированных В-лимфоцитах обычно пропускается, что приводит к синтезу более длинного РНК-транскрипта. В активированных В-лимфоцитах, синтезирующих антитела, повышается концентрация белка CstF — в результате расщепление происходит на субоптимальном участке и образуется более короткий транскрипт. Таким образом, изменение в концентрации основного фактора процессинга РНК может в значительной степени повлиять на экспрессию отдельного гена.

7.5.7. Редактирование РНК может изменять смысл информации, закодированной в молекуле РНК

Используемые клетками молекулярные механизмы являются постоянным источником сюрпризов. Примером может послужить процесс **редактирования РНК (RNA editing)**, который изменяет нуклеотидную последовательность транскриптов РНК после их синтеза и таким образом меняет закодированную в них информацию. Наиболее значительное редактирование РНК обнаружено в транскриптах, кодирующих белки в митохондриях трипаносом. В данном случае в определенные области транскрипта добавляется (или, реже, удаляется) один или более урациловых нуклеотидов, что изменяет как исходную рамку считывания, так и саму последовательность, и, таким образом, меняет смысл закодированной информации. Редактирование некоторых генов настолько существенно, что больше половины нуклеотидов в зрелой мРНК оказываются урациловыми, добавленными в ходе процесса редактирования. Набор из молекул РНК длиной от 40 до 80 нуклеотидов, транскрибирующихся отдельно, содержит информацию, точно определяющую, как должен быть изменен исходный РНК-транскрипт. У этих так называемых *направляющих РНК (guide RNAs)* за 5'-концом, комплементарным в последовательности одному концу редактируемой области транскрипта, идет последовательность, определяющая набор нуклеотидов, добавляемых в транскрипт (**рис. 7.100**). Механизм редактирования исключительно сложен: в каждой точке, где происходит редактирование, РНК разрезается, к образовавшемуся 3'-концу

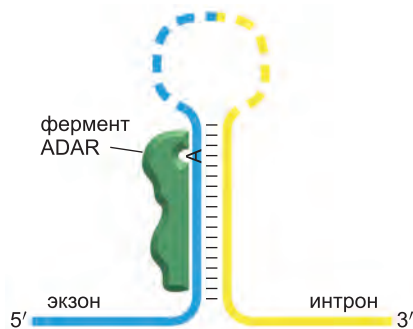


Рис. 7.101. Механизм $A \rightarrow I$ -редактирования у млекопитающих. Последовательности РНК, находящиеся на одной и той же молекуле РНК, обозначают место редактирования. Обычно последовательность, комплементарная месту редактирования, располагается на интроне, и образующая в результате двухцепочечная структура РНК привлекает фермент ADAR, выполняющий $A \rightarrow I$ -редактирование. Этот вид редактирования происходит в ядре до того, как пре-мРНК будет полностью процессирована. У мыши и человека есть три фермента ADAR: ADAR1 необходим в печени для нормального развития эритроцитов, ADAR2 требуется для нормального развития мозга (как описано в тексте), а роль ADAR3 не определена.

добавляются урациловые нуклеотиды и РНК лигируется обратно.

Более совершенный вид редактирования РНК встречается у млекопитающих. В данном случае существуют два основных типа редактирования: дезаминирование аденина с образованием инозина ($A \rightarrow I$ -редактирование) и дезаминирование цитозина с образованием урацила ($C \rightarrow U$ -редактирование, см. рис. 5.50). Поскольку такие химические модификации меняют свойства спаривания оснований (инозин спаривается с цитозином, а урацил — с аденином), то они могут значительно повлиять на смысл РНК. Если редактирование происходит в кодирующей области, оно может изменить аминокислотную последовательность белка или привести к образованию усеченного белка. Редактирование, происходящее за пределами кодирующих последовательностей, может повлиять на сплайсинг пре-мРНК, транспорт мРНК из ядра в цитозоль или на эффективность трансляции РНК.

Процесс $A \rightarrow I$ -редактирования особенно преобладает у человека, где по расчетам затрагивает свыше 1000 генов. Этот вид редактирования выполняют ферменты, называемые ADAR (аденозиндезаминазы, действующие на РНК). Они узнают двухцепочечную структуру РНК, образованную в результате спаривания участка, подвергающегося редактированию, с комплементарной последовательностью, расположенной где-то на той же самой молекуле мРНК, обычно в интроне на 3'-конце (рис. 7.101). Такие комплементарные последовательности определяют, будет ли редактироваться мРНК или нет и, если ответ положительный, точное место, где это будет происходить. Особенно важный пример $A \rightarrow I$ -редактирования встречается в случае мРНК, кодирующей медиатор-зависимый ионный канал в мозге. Редактирование заключается только в замене глутамина на аргинин; затронутая аминокислота располагается на внутренней стенке канала и произошедшая при редактировании замена меняет проницаемость канала для Ca^{2+} . Важность такого редактирования была показана на примере мышей, у которых удалили соответствующий ген ADAR. Мутантные мыши были подвержены эпилептическим припадкам и умирали в ходе или вскоре после отнятия от груди. Если вызвать мутацию гена ионного канала, чтобы напрямую образовывалась отредактированная форма белка, мыши, у которых отсутствовал фермент ADAR, развивались нормально, тем самым показывая, что редактирование РНК ионного канала в норме — критичное событие для развития мозга.

$C \rightarrow U$ -редактирование, осуществляемое другим набором ферментов, также критично для млекопитающих. Например, в определенных клетках кишечника

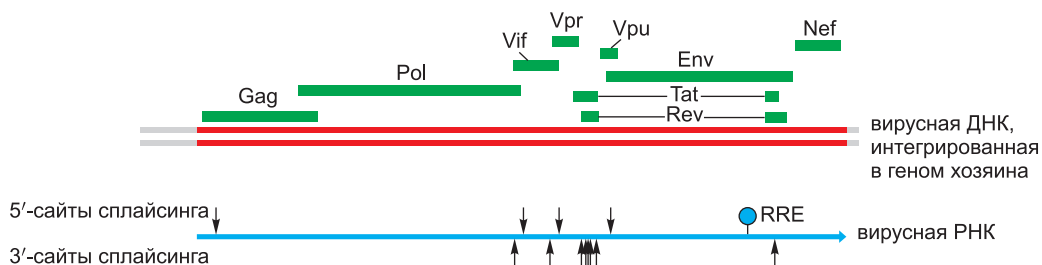


Рис. 7.102. Компактный геном вируса иммунодефицита человека (HIV). Места расположения девяти генов HIV показаны зеленым цветом. Красной двойной линией обозначена копия ДНК вирусного генома, которая встроилась в ДНК хозяина (серая). Обратите внимание, что кодирующие области многих генов перекрываются, а кодирующие области генов *Tat* и *Rev* разделены интронами. Голубая линия внизу рисунка изображает транскрипт пре-мРНК вирусной ДНК и расположение всех возможных сайтов сплайсинга (стрелки). Существует много альтернативных вариантов сплайсинга вирусного транскрипта. Например, в мРНК гена *Env* сохраняется интрон, который вырезается из мРНК генов *Tat* и *Rev*. *Rev*-чувствительный элемент (RRE) изображен в виде голубого шарика на палочке. Он представляет собой участок РНК размером 234 нуклеотида, сворачивающийся в определенную структуру; белок *Rev* распознает специфическую шпильку внутри этой более крупной структуры.

Ген *Gag* кодирует белок, который разрезается на несколько более мелких белков, образующих вирусный капсид. Ген *Pol* кодирует белок, который расщепляется с образованием обратной транскриптазы (транскрибирует РНК в ДНК), а также интегразы, участвующей во встраивании вирусного генома (в виде двухцепочечной ДНК) в геном хозяина. Белок *Pol* образуется при сдвиге рамки считывания рибосомы в ходе трансляции, начинающейся с гена *Gag* (см. рис. 6.78). Ген *Env* кодирует белки оболочки (см. рис. 5.71). Белки *Tat*, *Rev*, *Vif*, *Vpr*, *Vpu* и *Nef* являются небольшими белками, обладающими множеством функций. Например, *Rev* регулирует ядерный экспорт (см. рис. 7.103), а *Tat* регулирует элонгацию транскрипции по всему встроенному вирусному геному (см. стр. 478).

мРНК аполипопротеина В подвергается С → U-редактированию, в результате чего образуется преждевременный стоп-кодон и, следовательно, синтезируется укороченная форма белка. В клетках печени редактирующий фермент не экспрессируется и синтезируется полная форма аполипопротеина В. Две изоформы белка обладают различными свойствами, и каждая играет специализированную роль в метаболизме липидов, специфичном для органа, в котором она образуется.

Почему вообще существует редактирование РНК, остается загадкой. Одна из идей состоит в том, что оно возникло в ходе эволюции для исправления «ошибок» в геноме. Другое предположение, что оно появилось как своего рода небрежный способ образования клеткой слегка различающихся белков от одного гена. Третья возможность — что редактирование РНК первоначально развивалось как защитный механизм против ретровирусов и ретротранспозонов, а позже было адаптировано клеткой, чтобы изменять смысл определенных мРНК. Действительно, редактирование РНК до сих пор играет важную роль в защите клетки. Некоторые ретровирусы, включая HIV (см. рис. 5.71), подвергаются существенному редактированию после того, как заражат клетки. Это гиперредактирование порождает множество вредных мутаций в вирусном РНК-геноме, а также приводит к тому, что вирусные мРНК задерживаются в ядре, где в итоге деградируют. Несмотря на то что некоторые современные ретровирусы защищают себя от действия этого механизма, он, по видимому, помогает держать многие вирусы под контролем.

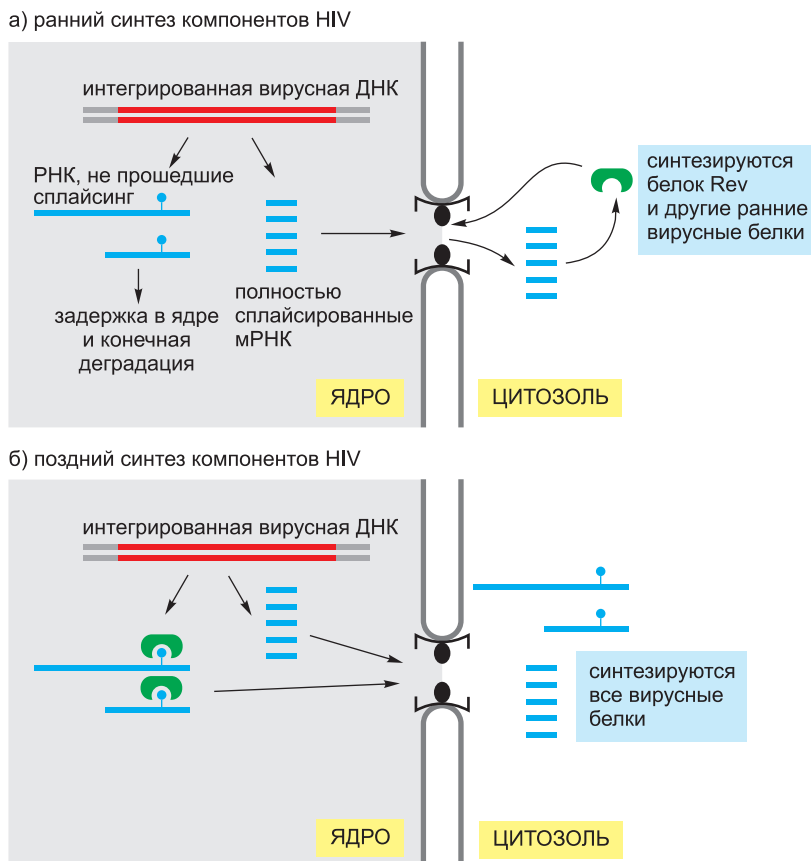


Рис. 7.103. Регуляция ядерного экспорта белком Rev вируса иммунодефицита человека (HIV). На ранней стадии заражения HIV (а) только полностью сплайсированные РНК, содержащие кодирующие последовательности для белков Rev, Tat и Nef, экспортируются из ядра и транслируются в цитоплазме. После накопления достаточного количества белка Rev и его транспорта в ядро (б) несплайсированная вирусная РНК может экспортироваться из ядра. Многие из этих РНК транслируются с образованием белка, а полноразмерные транскрипты упаковываются в новые вирусные частицы.

У приматов частота $A \rightarrow I$ -редактирования значительно выше, чем у других млекопитающих, и в большинстве случаев оно происходит на РНК, транскрибируемых с представленных в большом избытке Alu -элементов. Было выдвинуто предположение, что $A \rightarrow I$ -редактирование остановило эти мобильные элементы от полного «захвата» нашего генома благодаря инактивации необходимых для их пролиферации транскриптов РНК (см. рис. 5.74). Если эта идея верна, то редактирование РНК, возможно, глубоко повлияло на формирование современного генома человека.

7.5.8. Экспорт РНК из ядра может регулироваться

По подсчетам, пределы клеточного ядра у млекопитающих покидает только около одной двадцатой части от всей массы синтезируемых РНК. Согласно главе 6, большинство молекул РНК млекопитающих подвергается обширному процессингу,

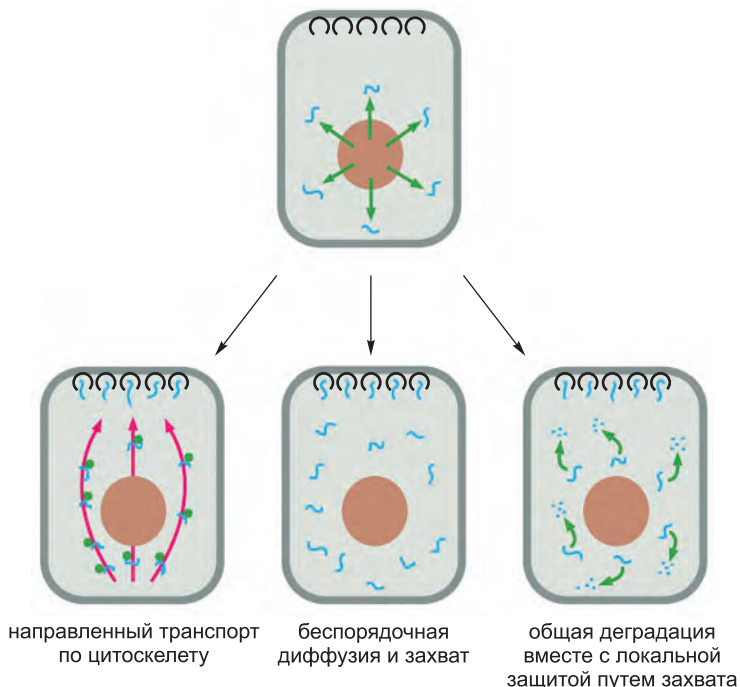


Рис. 7.104. Три механизма локализации мРНК. Готовые к распределению мРНК покидают ядро через ядерные поры (*вверху*). Некоторые локализуемые мРНК (*слева*) путешествуют к месту своего назначения посредством ассоциации с цитоскелетными моторами. Как описано в главе 16, эти моторы используют энергию гидролиза АТФ для однонаправленного движения вдоль филаментов в цитоскелете (*красные*). В конечном пункте назначения якорные белки (*черные*) удерживают мРНК на месте. Другие мРНК беспорядочно диффундируют в цитозоле и просто захватываются и, следовательно, концентрируются в местах своей локализации (*по центру*). Некоторые из этих мРНК (*справа*) в цитозоле разрушаются, если только они не связались посредством случайной диффузии с локализованным белковым комплексом, который удерживает и защищает мРНК от деградации (*черные*). Для каждого из этих механизмов требуется наличие специфических сигналов на мРНК, которые обычно располагаются в 3'-UTR (см. рис. 7.105). Во многих случаях локализации мРНК дополнительные механизмы блокируют трансляцию мРНК до тех пор, пока она не будет соответствующим образом локализована в клетке. (Адаптировано из Н. D. Lipshitz and С. A. Smibert, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 476-488, 2000. С разрешения Elsevier.)

и «оставшиеся» фрагменты РНК (вырезанные интроны и последовательности РНК с 3'-конца до сайта расщепления/полиаденилирования) деградируют в ядре. Не до конца процессированные или поврежденные иным путем РНК также в итоге разрушаются как часть системы контроля качества образования РНК.

Как описано в главе 6, экспорт молекул РНК из ядра откладывается до момента окончания процессинга. Однако для регуляции экспрессии генов могут использоваться механизмы, которые преднамеренно игнорируют эту контрольную точку. Эта стратегия закладывает основу для одного из наиболее хорошо изученных примеров **регулируемого ядерного транспорта (regulated nuclear transport)** мРНК, который встречается у вируса AIDS человека, HIV.

В главе 5 отмечалось, что HIV, попав в клетку, управляет образованием двух-

цепочечной ДНК-копии своего генома, которая затем встраивается в геном хозяина (см. рис. 5.71). Встроившись, вирусная ДНК транскрибируется РНК-полимеразой-II клетки-хозяина как одна длинная молекула РНК. Далее этот транскрипт сплайсируется множеством различных способов с образованием свыше 30 различных видов мРНК, с которых, в свою очередь, транслируются разнообразные белки (рис. 7.102). Для образования вирусного потомства целые, несплайсированные вирусные транскрипты должны экспортироваться из ядра в цитозоль, где происходит их упаковка в вирусные капсиды в качестве вирусного генома (см. рис. 5.71). Такой большой транскрипт, так же как и прошедшие альтернативный сплайсинг мРНК HIV, которые вирусу необходимо переместить в цитоплазму для начала синтеза белка, до этих пор несут целые интроны. Следовательно, существующий в норме в клетке хозяина запрет на ядерный экспорт несплайсированных молекул РНК является особой проблемой для HIV.

Вирус преодолевает этот запрет очень изобретательным способом. Он кодирует белок Rev, который связывается со специфической последовательностью РНК, именуемой Rev-чувствительным элементом (Rev responsive element, RRE), рас-

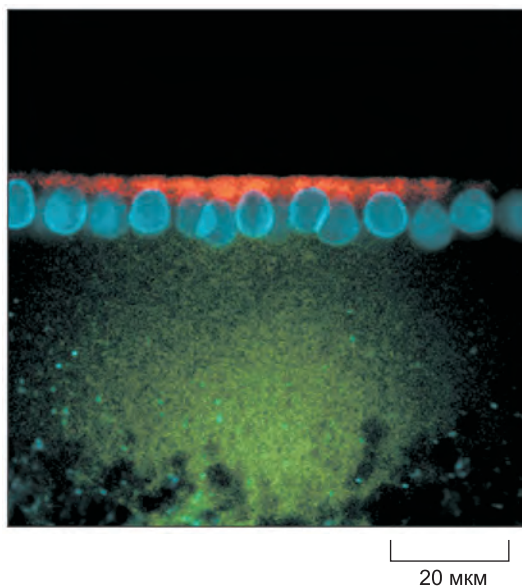


Рис. 7.105. Опыт, показывающий значение 3'-UTR для локализации мРНК в определенных областях цитоплазмы. Для этого опыта были подготовлены две разные флуоресцентно меченые молекулы РНК путем проведения транскрипции ДНК *in vitro* в присутствии флуоресцентно меченых производных UTR. Одна РНК (меченная красным флуорохромом) содержит кодирующую область белка Hairy (волосатости) дрозофилы вместе со смежной 3'-UTR (см. рис. 6.22). Другая РНК (меченная зеленым флуорохромом) содержит кодирующую область белка Hairy без 3'-UTR. Две РНК смешали и ввели в эмбрион дрозофилы на стадии развития, при которой множество ядер находится в общей цитоплазме (см. рис. 7.53). Когда спустя 10 минут визуализировали флуоресцентные РНК, полная РНК белка Hairy (красная) располагалась на передней стороне ядер (голубые), а локализации транскрипта без 3'-UTR (зеленый), не произошло. Белок Hairy является одним из многих регуляторных белков, определяющих позиционную информацию в развивающемся эмбрионе дрозофилы (описано в главе 22). Считается, что локализация его мРНК (в этом опыте показано, что она зависит от 3'-UTR) критична для нормального развития мухи. (С любезного разрешения Simon Bullock и David Ish-Horowicz.)

положенной внутри вирусного интрона. Белок Rev взаимодействует с рецептором ядерного экспорта (экспортин 1), который направляет движение вирусных РНК через ядерные поры в цитозоль, несмотря на наличие интронных последовательностей. В главе 12 подробно обсуждается способ функционирования рецепторов экспорта.

Регуляция ядерного экспорта белком Rev имеет несколько важных последствий для роста HIV и его патогенеза. Кроме обеспечения ядерного экспорта специфических несплайсированных РНК, она делит вирусную инфекцию на две фазы: раннюю и позднюю. В раннюю фазу Rev транслируется с полностью сплайсированной РНК, а все вирусные РНК, содержащие интроны, задерживаются в ядре и деградируют. В позднюю фазу в результате действия белка Rev несплайсированные РНК экспортируются из ядра. Такое распределение по времени помогает вирусу реплицироваться, благодаря поступлению генных продуктов приблизительно в том порядке, в котором они необходимы (рис. 7.103). Регуляция белком Rev, возможно, также помогает достичь вирусу состояния латентности, когда геном HIV встроен в геном клетки хозяина, но синтез вирусных белков временно приостановлен. Если после первоначального проникновения вируса в клетку хозяина условия становятся неблагоприятными для его транскрипции и репликации, то Rev синтезируется в концентрациях, слишком малых для того, чтобы стимулировать экспорт несплайсированной РНК. В такой ситуации цикл роста вируса останавливается, пока не произойдет улучшения условий, не повысятся уровни белка Rev и вирус не вступит в цикл репликации.

7.5.9. Некоторые мРНК расположены в определенных областях цитоплазмы

После того как недавно образованная молекула эукариотической мРНК проходит через ядерную пору и попадает в цитозоль, она обычно встречается с рибосомами, которые транслируют с нее полипептидную цепь (см. рис. 6.40). Как только первый цикл трансляции «проходит» тест на нонсенс-опосредованное разрушение (см. рис. 6.80), обычно начинается настоящая трансляция мРНК. Если мРНК кодирует белок, который предназначен для секреции или экспрессирования на клеточной поверхности, то сигнальная последовательность на аминоконце белка направит его к эндоплазматическому ретикулуму (ER; endoplasmic reticulum). Компоненты сортирующего белки аппарата клетки распознают сигнальную последовательность сразу же, как она появляется из рибосомы, и направляют весь комплекс, состоящий из рибосомы, мРНК и растущего белка, к мембране ER, где синтезируется оставшаяся часть полипептидной цепи, как описано в главе 12. В других случаях свободные рибосомы полностью синтезируют белок в цитозоле, а сигналы, содержащиеся в законченной полипептидной цепи, затем могут направлять белок к другим участкам в клетке.

Некоторые мРНК сами направляются к специфическим местам внутри клетки перед началом своей эффективной трансляции, что позволяет клетке расположить молекулы мРНК близко к местам, где существует потребность в кодируемом ими белке. Такая стратегия предоставляет клетке множество преимуществ. Например, позволяет создавать асимметрию в цитозоле клетки, а это ключевой этап на многих стадиях развития. Локализованная мРНК в сочетании с контролем трансляции также позволяет клетке осуществлять независимую регуляцию экспрессии генов

в различных частях клетки. Это свойство является особенно важным в больших, сильно поляризованных клетках, например нейронах, где конусы роста должны реагировать на сигналы, не ожидая ответа от отдаленного ядра. Локализация РНК встречается у многих организмов, включая одноклеточные грибы, растения и животных, и, вероятно, является обычным механизмом, используемым клетками, чтобы сконцентрировать интенсивный синтез белков в определенных местах.

Открыто несколько различных механизмов локализации мРНК (рис. 7.104), но для них всех необходимо наличие специальных сигналов в самой мРНК. Эти сигналы обычно сосредоточены в 3'-нетранслируемой области (UTR; *untranslated region*) — области РНК, которая тянется от стоп-кодона, терминирующего синтез белка, до начала поли-А хвоста (рис. 7.105). Такая локализация мРНК обычно сопряжена с механизмами контроля трансляции, чтобы гарантировать, что мРНК останется неактивной, пока не попадет на свое место.

Яйцо дрозофилы представляет особенно яркий пример локализации РНК. Локализация мРНК, кодирующей регуляторный белок bicoid, происходит путем прикрепления ее к цитоскелету на переднем конце развивающегося яйца. Когда оплодотворение запускает трансляцию этой мРНК, то создается градиент концентрации белка bicoid, играющего ключевую роль в направлении развития передней части эмбриона (показано на рис. 7.53 и более подробно обсуждается в главе 22). Многие мРНК в соматических клетках локализуются похожим способом. Например, в фибробластах млекопитающих мРНК, кодирующая актин, посредством сигнала в 3'-UTR располагается в богатом актиновыми филаментами кортексе клетки.

В главе 6 упоминалось, что молекулы мРНК, выходя из ядра, несут многочисленные метки в виде модификаций РНК (5'-кэп и 3'-поли-А хвост) и связанных белков (например, комплексов соединения экзонов), отмечающих успешное завершение различных этапов процессинга пре-мРНК. Только что было описано, что 3'-UTR мРНК можно рассматривать как «почтовый индекс», направляющий мРНК в различные места в клетке. Ниже мы также увидим, что мРНК несут информацию, устанавливающую их среднюю продолжительность жизни в цитозоле и эффективность, с которой с них транслируется белок. В широком смысле нетранслируемые области эукариотических мРНК напоминают контролируемые области генов при транскрипции: их нуклеотидная последовательность содержит информацию, определяющую «способ применения» РНК, и белки интерпретируют эту информацию, связываясь специфически с этими последовательностями. Таким образом, помимо сведений об аминокислотной последовательности белков, молекулы РНК насыщены многими дополнительными видами информации.

7.5.10. 5'- и 3'-нетранслируемые области контролируют трансляцию мРНК

После того как мРНК синтезировалась, одним из самых распространенных способов регуляции уровня образования ее белкового продукта является контроль этапа, инициирующего трансляцию. Детали инициации трансляции у эукариот и у бактерий различаются (как видно из главы 6), но они используют несколько одинаковых основных механизмов регуляции.

В мРНК бактерий консервативный участок из шести нуклеотидов, *последовательность Шайна—Дальгарно*, всегда находится на несколько нуклеотидов впереди иницирующего кодона AUG. Эта последовательность спаривается с 16S

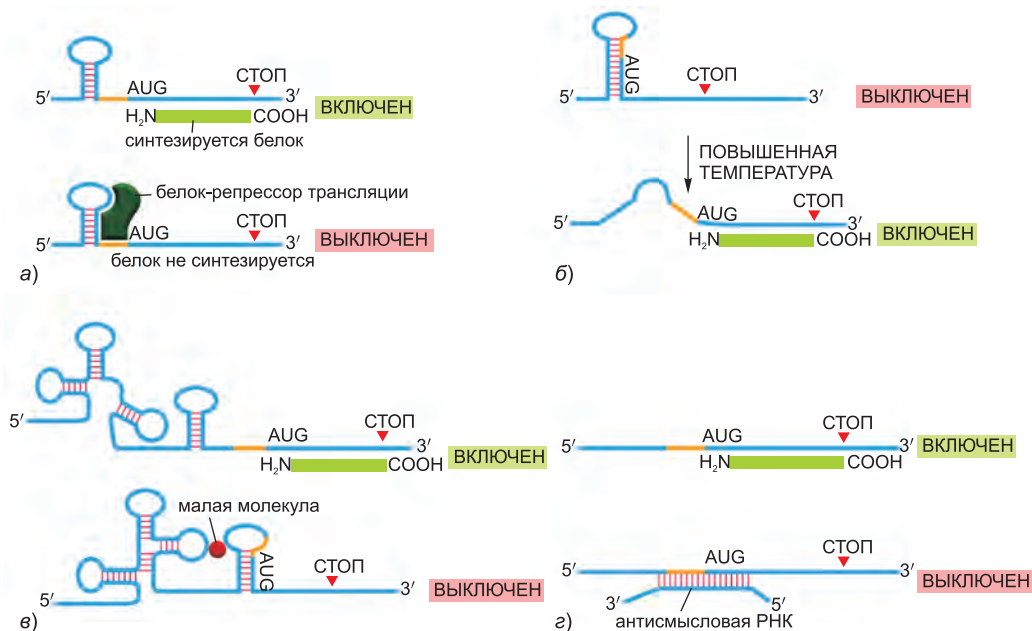


Рис. 7.106. Механизмы контроля трансляции. Хотя приведенные примеры относятся к клеткам бактерий, но многие из этих принципов действуют и у эукариот. *а)* Сайт-специфические РНК-связывающие белки подавляют трансляцию специфических мРНК, блокируя доступ рибосомы к последовательности Шайна–Дальгарно (*оранжевая*). Например, некоторые рибосомные белки подавляют трансляцию своей собственной РНК. Такой механизм начинает действовать только тогда, когда рибосомные белки образуются в избытке, превышающем количество рибосомной РНК, и, следовательно, не включаются в состав рибосом. Также этот механизм позволяет поддерживать в клетке правильно сбалансированные количества различных компонентов, необходимых для образования рибосом. В таких случаях регуляторная последовательность РНК на мРНК часто совпадает с последовательностью РНК, узнаваемой белком в процессе сборки рибосом. *б)* «Термодатчик» РНК позволяет провести эффективную инициацию трансляции только при повышенных температурах — когда плавится структура «стебель-петля». Подобный пример встречается у человеческого патогена *Listeria monocytogenes*, трансляция вирулентных генов которого усиливается при 37 °С — температуре организма-хозяина. *в)* Связывание низкомолекулярного соединения с рибопереключателем вызывает структурную перестройку РНК, что приводит к изоляции последовательности Шайна–Дальгарно (*оранжевая*) и блокированию инициации трансляции. У многих бактерий S-аденозилметионин действует таким же образом — чтобы предотвратить образование синтезирующих его ферментов. *г)* «Антисмысловая» РНК, синтезированная в каком-то другом месте генома, спаривается со специфической мРНК и блокирует ее трансляцию. Многие бактерии таким способом регулируют экспрессию железозапасующих белков. При избытке железа осуществляется понижающая регуляция (*down-regulation*) антисмыслового транскрипта, таким образом, становится возможной эффективная трансляция генов, кодирующих железозапасующие белки. Антисмысловые РНК широко используются в эукариотических клетках для регуляции экспрессии генов. Механизм в некоторой степени отличается от приведенного здесь и подробно обсуждается далее в этой главе.

РНК малой субчастицы рибосомы, правильно располагая иницирующий кодон AUG в рибосоме. Поскольку такое взаимодействие вносит значительный вклад в эффективность инициации, то оно предоставляет бактериальной клетке простой способ регулирования синтеза белка при помощи механизмов **контроля трансляции (translational control)**. Такие механизмы, осуществляемые белками или молекулами

РНК, в основном, включают в себя или раскрытие, или блокирование последовательности Шайна—Дальгарно (рис. 7.106).

Эукариотические мРНК не содержат последовательности Шайна—Дальгарно. Вместо этого, как описано в главе 6, выбор кодона AUG как сайта начала транскрипции во многом определяется его близостью к кэп-структуре на 5'-конце молекулы мРНК — участке, где малая рибосомная субчастица связывается с мРНК и начинает поиск иницирующего кодона AUG. Несмотря на существенные различия в инициации трансляции, эукариоты используют сходные стратегии для регуляции трансляции. Например, репрессоры трансляции связываются с 5'-концом мРНК и тем самым ингибируют инициацию трансляции. Другие репрессоры распознают нуклеотидные последовательности в 3'-UTR специфических молекул мРНК и снижают интенсивность инициации трансляции, препятствуя коммуникации между 5'-кэпом и 3'-поли-А хвостом (этап, необходимый для эффективной трансляции) (см. рис. 6.72). Чрезвычайно важный тип контроля трансляции у эукариот зависит от малых РНК (называемых *микроРНК*, или *miРНК*), которые связываются с мРНК и снижают выход белка. Синтез и процессинг *miРНК* осуществляется специализированным способом, и мы вернемся к ним позже в этой главе.

7.5.11. Фосфорилирование фактора инициации трансляции позволяет глобально регулировать синтез белка

Эукариотические клетки понижают общую скорость синтеза белка в ответ на различные стрессовые ситуации, включая недостаток факторов роста и питательных

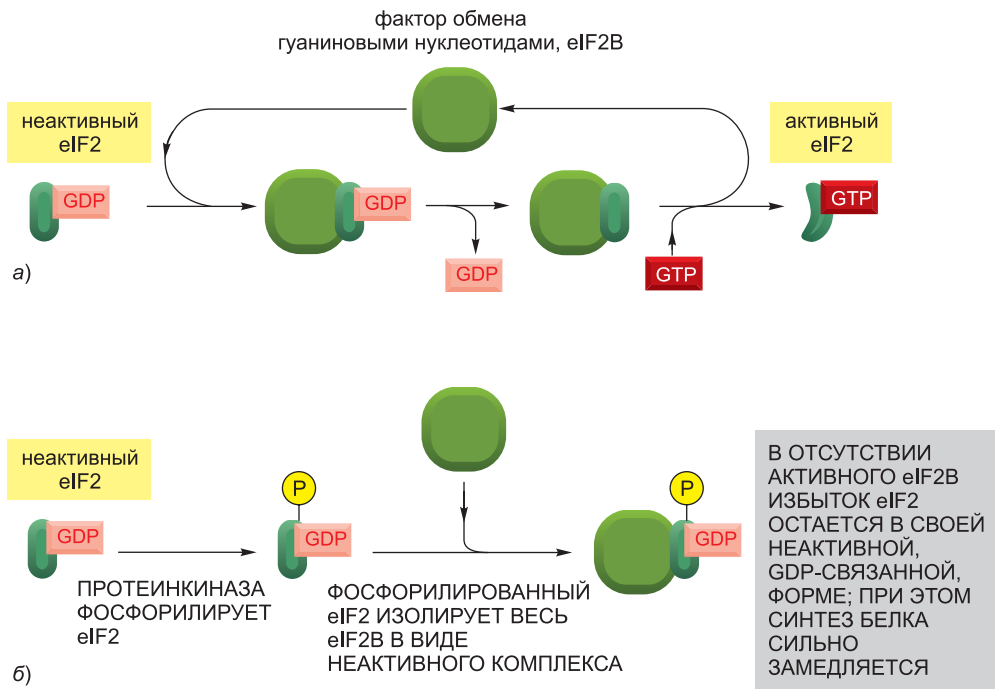


Рис. 7.107. Цикл eIF2. а) Возвращение в цикл использованного eIF2 фактором обмена гуаниновыми нуклеотидами (eIF2B). б) Фосфорилирование eIF2 контролирует скорости синтеза белков путем связывания eIF2B.

веществ, заражение вирусами и внезапное повышение температуры. Во многом это снижение вызвано фосфорилированием специфическими протеинкиназами, реагирующими на изменение условий, фактора инициации трансляции eIF2.

Нормальная функция eIF2 была описана в общих чертах в главе 6. Он образует комплекс с GTP и опосредует связывание инициаторной метионил-тРНК с малой субчастицей рибосомы, которая затем связывается с 5'-концом мРНК и начинает поиск старт-кодона по всей мРНК. После распознавания кодона AUG белок eIF2 гидролизует связанный GTP до GDP, что приводит к конформационному изменению белка и его освобождению от малой субчастицы рибосомы. Далее большая субчастица рибосомы присоединяется к малой субчастице, и образуется полная рибосома, которая начинает синтез белка (см. рис. 6.71).

Поскольку eIF2 очень прочно связывается с GDP, то необходим фактор обмена гуаниновыми нуклеотидами (см. рис. 3.73), обозначаемый eIF2B, для высвобождения GDP — чтобы новая молекула GTP могла связаться и реализовалась возможность повторного использования eIF2 (рис. 7.107, а). Если eIF2 фосфорилирован, то его повторное использование невозможно: фосфорилированный eIF2 необычайно прочно связывается с eIF2B, тем самым инактивируя его. В клетке содержится больше eIF2, чем eIF2B, и всего лишь часть фосфорилированного eIF2 может связать почти весь eIF2B. Это препятствует повторному использованию нефосфорилированного eIF2 и значительно замедляет процесс синтеза белка (рис. 7.107, б)

Регулирование концентрации активного eIF2 особенно важно в клетках млекопитающих, где eIF2 является частью механизма, позволяющего клеткам вступать в непролиферирующую стадию покоя (называется G_0), в которой скорость общего синтеза белка снижена до примерно одной пятой от скорости в пролиферирующих клетках (описано в главе 17).

7.5.12. Инициация, происходящая на кодонах AUG, расположенных перед сайтом начала трансляции, может регулировать инициацию трансляции у эукариот

В главе 6 говорилось, что трансляция у эукариот обычно начинается с первого кодона AUG с 5'-конца мРНК — с первого кодона AUG, который встречает малая субчастица рибосомы при поиске старт-кодона на мРНК. Однако нуклеотиды, непосредственно окружающие AUG, также влияют на эффективность инициации трансляции. Если участок распознавания достаточно слабый, сканирующие рибосомные субчастицы будут иногда пропускать первый кодон AUG на мРНК и, вместо этого, перепрыгивать на второй или третий кодон AUG. Это явление, известное как «ослабленное сканирование» (leaky scanning), — стратегия, часто используемая для образования с одной мРНК двух или более близкородственных белков, которые различаются только по своим аминоконцам. Очень важно, что это позволяет некоторым генам образовывать один и тот же белок с сигнальной последовательностью и без нее на аминоконце, так что белок направляется в два разных места в клетке (например, как в митохондриях, так и в цитозоль). В некоторых случаях клетка может регулировать относительное содержание изоформ белка, получаемых с помощью ослабленного сканирования, например, клеточно-специфичное увеличение содержания фактора инициации eIF4F способствует использованию кодона AUG, ближе всего расположенного к 5'-концу мРНК.

При другом виде контроля трансляции, обнаруженном у эукариот, используется

одна или больше коротких открытых рамок считывания (нуклеотидные последовательности, не содержащие стоп-кодонов), которые располагаются между 5'-концом мРНК и началом гена. Открытые рамки считывания (ORF; open reading frames) будут более основательно рассматриваться в главе 8, а пока мы будем считать ORF-отрезком ДНК, который начинается со старт-кодона (ATG), заканчивается стоп-кодоном и не содержит стоп-кодонов между ними — так что, в принципе, может кодировать полипептид. Часто аминокислотные последовательности, кодируемые этими расположенными левее отрывками рамками считывания (uORF; upstream ORFs), не очень-то и важны, скорее, uORF выполняют чисто регуляторную функцию. Присутствующая на молекуле мРНК uORF будет, как правило, понижать трансляцию расположенного после нее гена посредством захвата иницирующего комплекса сканирующей рибосомы, заставляя рибосому транслировать uORF и диссоциировать до того, как она достигнет последовательности, кодирующей белок.

Можно предположить, что при уменьшении активности основного фактора транскрипции (например, eIF2, рассмотренного выше) трансляция всех мРНК снизится в равной степени. Однако, вопреки ожиданиям, фосфорилирование eIF2 может оказывать избирательное воздействие и даже усиливать трансляцию специфических мРНК, содержащих uORF. Например, это может давать возможность клеткам дрожжей адаптироваться к острой нехватке отдельных питательных веществ путем выключения синтеза всех белков, кроме тех, которые необходимы

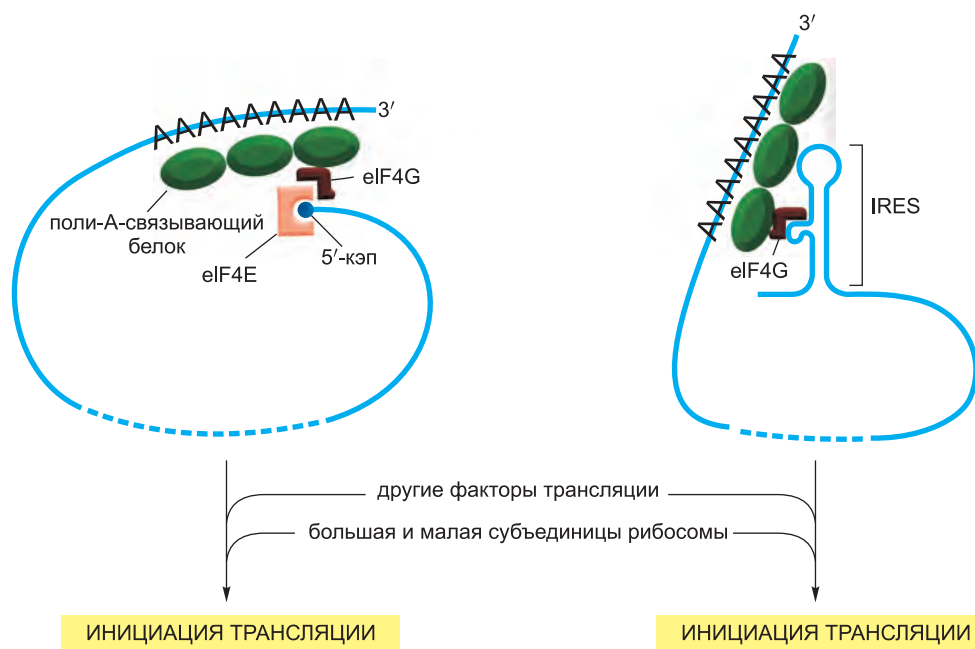


Рис. 7.108. Два механизма инициации трансляции. а) Для нормального кэп-зависимого механизма инициации трансляции требуется набор факторов инициации, сборка которых на мРНК стимулируется наличием структуры 5'-кэпа и поли-А хвоста (см. также рис. 6.72). б) Для IRES-зависимого механизма, преимущественно наблюдаемого у вирусов, требуется только подгруппа факторов нормальной инициации трансляции, которые напрямую собираются на свернувшейся в определенную структуру последовательности IRES. (Адаптировано из A. Sachs, *Cell* 101: 243–245, 2000. С разрешения Elsevier.)

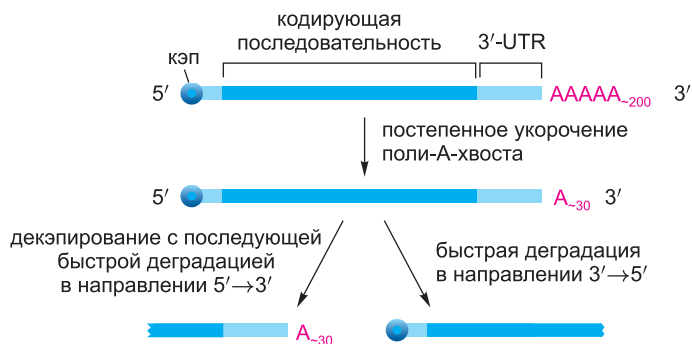


Рис. 7.109. Два механизма деградации эукариотической мРНК. При достижении критического порога длины поли-А хвоста индуцируется деградация мРНК в направлении $3' \rightarrow 5'$, которая может запускаться потерей белков, связывающихся с поли-А хвостом (см. рис. 6.40). Как показано на рис. 7.110, деаденилаза ассоциирует с 3'-поли-А хвостом и 5'-кэпом, и такая организация может давать сигнал о декэпировании после укорочения поли-А хвоста. Здесь показана деградация в направлениях $5' \rightarrow 3'$ и $3' \rightarrow 5'$ на разных молекулах РНК, но два этих процесса могут происходить одновременно на одной и той же молекуле РНК. (Адаптировано из С. А. Beelman and R. Parker, *Cell* 81: 179–183, 1995. С разрешения Elsevier

для синтеза недостающих веществ. Детали этого механизма хорошо проработаны для специфической мРНК дрожжей, которая кодирует белок, называемый *Gcn4*. Этот белок является регуляторным белком, необходимым для активации множества генов, кодирующих важные для синтеза аминокислот белки.

Матричная РНК гена *Gcn4* содержит четыре коротких uORF, которые ответственны за избирательное повышение трансляции *Gcn4* в ответ на вызванное аминокислотным голоданием фосфорилирование eIF2. Механизм повышения трансляции *Gcn4* сложен. В общих чертах: малая субчастица рибосомы движется вдоль мРНК, встречая каждый из uORF, но направляя трансляцию только подгруппы из них; если происходит трансляция последнего uORF, как и в случае нормальных, не голодающих клеток, то рибосомы диссоциируют на конце uORF и трансляция *Gcn4* оказывается неэффективной. Глобальное понижение активности eIF2, вызванное недостатком питательных веществ (см. рис. 7.108), повышает вероятность того, что сканирующая малая субчастица рибосомы пройдет четвертую uORF до того, как встретится с молекулой eIF2 (см. рис. 6.72). Такая субчастица рибосомы может свободно инициировать трансляцию на фактических последовательностях *Gcn4*, и происходящее в результате увеличение количества этого регуляторного белка приводит к образованию набора белков, усиливающих синтез аминокислот внутри клетки.

7.5.13. Участок внутренней посадки рибосомы предоставляет возможность регулировать трансляцию

Трансляция примерно 90% эукариотических мРНК начинается с первого после 5' кэпа кодона AUG, но определенные AUG-кодоны, как отмечалось в предыдущем разделе, могут пропускаться во время процесса сканирования. В этом разделе обсуждается еще один способ, с помощью которого клетки могут инициировать трансляцию на участках, удаленных от 5'-конца мРНК, используя специализированный тип последовательности РНК, называемый **участком внутренней посадки**

рибосомы (internal ribosome entry site, IRES). Последовательность IRES может встречаться на множестве различных мест мРНК. В некоторых редких случаях мРНК содержит две находящиеся вместе разные кодирующие белок последовательности, и трансляция первой последовательности происходит благодаря обычному механизму сканирования, а трансляция второй — посредством IRES. Последовательности IRES обычно имеют длину в несколько сотен нуклеотидов и сворачиваются в специфические структуры, которые связывают многие, но не все, из тех же самых белков, которые используются для инициации нормальной кэп-зависимой трансляции (рис. 7.108). В действительности для различных IRES требуются различные подгруппы факторов инициации. Однако все они обходятся без 5'-кэпа и фактора инициации трансляции eIF4E, который его распознает.

Некоторые вирусы используют IRES как часть своей стратегии, чтобы осуществлять трансляцию своих молекул мРНК, при этом блокируя нормальную кэп-зависимую трансляцию мРНК хозяина. При заражении эти вирусы образуют протеазу (закодированную в вирусном геноме), которая расщепляет фактор трансляции eIF4G клетки хозяина, делая его не способным связываться с eIF4E, кэп-связывающим комплексом. Это приводит к прекращению большей части трансляции в хозяйской клетке и эффективно привлекает аппарат трансляции на последовательности IRES, которые содержатся во многих вирусных мРНК. Укороченный eIF4G еще способен инициировать трансляцию на этих внутренних участках и даже может стимулировать трансляцию определенных вирусных мРНК, содержащих IRES. Избирательная активация IRES-зависимой трансляции также может происходить и на мРНК клетки хозяина. Например, когда клетки млекопитающих вступают на путь запрограммированной клеточной смерти (описано в главе 18), фактор eIF4G расщепляется и происходит общее снижение скорости трансляции.

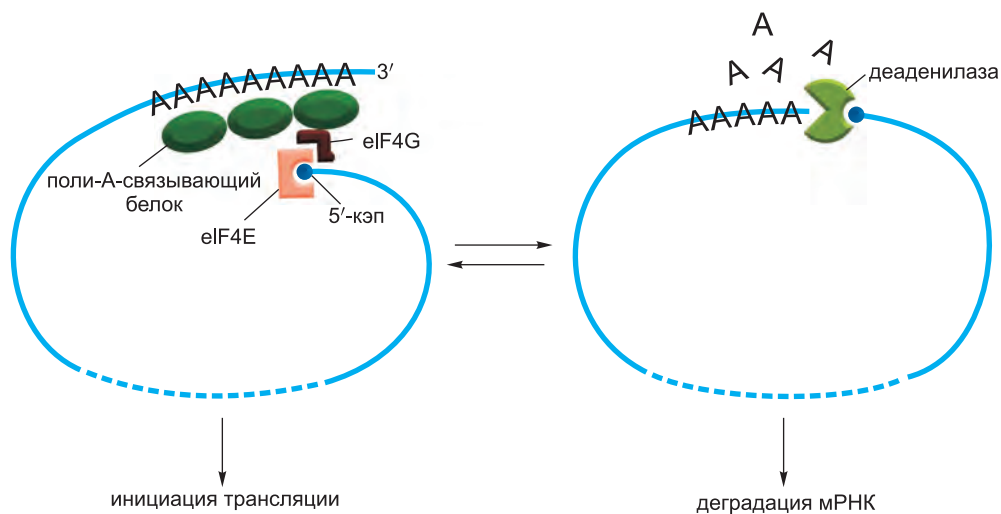


Рис. 7.110. Конкуренция между трансляцией и разрушением мРНК. Те же самые две особенности молекулы мРНК: ее 5'-кэп и 3'-поли-А хвост — используются как при инициации трансляции, так и при связанном с деаденированием разрушении мРНК (см. рис. 7.109). Деаденилаза, которая укорачивает поли-А хвост в направлении 3'→5', ассоциирует с 5'-кэпом. Как описано в главе 6 (см. рис. 6.72), аппарат инициации трансляции также связывается с 5'-кэпом и поли-А хвостом. (Адаптировано из M. Gao et al., *Mol. Cell* 5: 479–488, 2000. С разрешения «Elsevier».)

Однако некоторые белки, крайне важные для контроля процесса клеточной смерти, оказывается, транслируются с мРНК, содержащих последовательности IRES, что позволяет осуществлять их непрерывный синтез. Таким образом, механизм IRES позволяет транслировать избранные мРНК с высокой скоростью, несмотря на общее снижение способности клетки инициировать синтез белка.

7.5.14. Экспрессия генов может регулироваться изменением стабильности мРНК

Большая часть мРНК в клетках бактерий весьма нестабильна и имеет время полужизни меньше пары минут. За быстрое разрушение таких мРНК обычно ответственны экзонуклеазы, расщепляющие их в направлении $3' \rightarrow 5'$. Поскольку как синтез, так и разрушение бактериальных мРНК происходит стремительно, бактерия

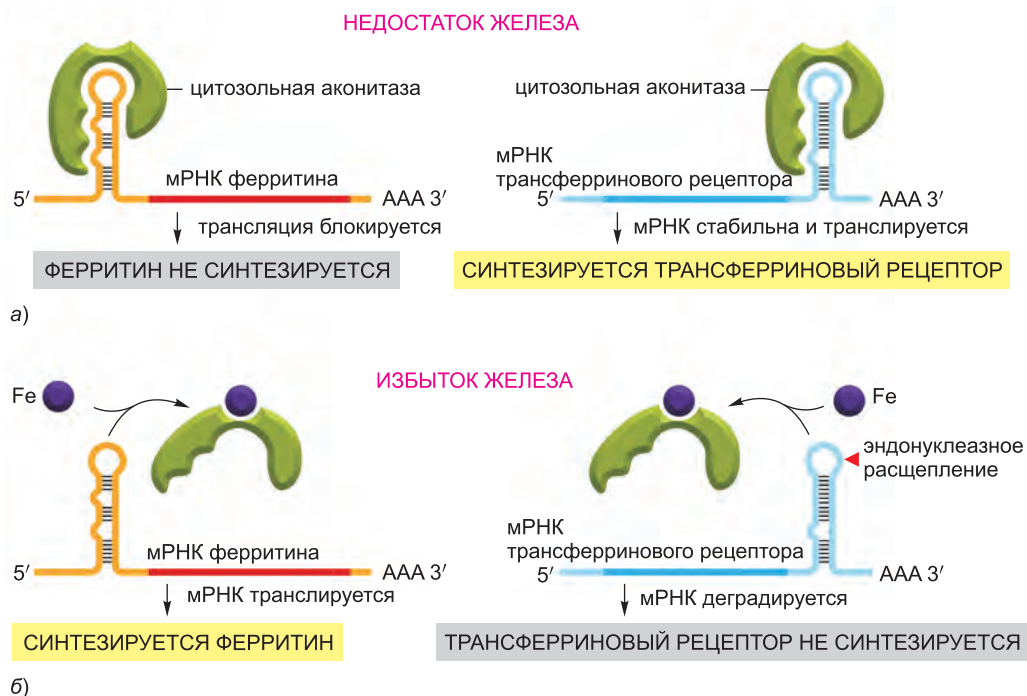


Рис. 7.111. Два механизма посттрансляционной регуляции, опосредуемой концентрацией железа. а) При недостатке железа связывание аконитазы с 5'-UTR мРНК ферритина препятствует инициации трансляции, а связывание аконитазы с 3'-UTR мРНК рецептора трансферрина блокирует сайты расщепления эндонуклеазой и, следовательно, стабилизирует мРНК. б) В ответ на увеличение концентрации железа в цитозоле клетка повышает уровень синтеза ферритина, чтобы связать избыток железа, и снижает уровень синтеза рецепторов трансферрина, чтобы импорт железа через плазматическую мембрану был меньше. Оба ответа обусловлены одним и тем же чувствительным к железу регуляторным белком аконитазой, который узнает общие черты в структуре «стебель-петля» в мРНК, кодирующие ферритин и рецептор трансферрина. Аконитаза отделяется от мРНК, когда связывается с железом. Но поскольку рецептор трансферрина и ферритин регулируются при помощи разных типов механизмов, их уровни реагируют на изменение концентрации железа противоположным образом, несмотря на то что в регуляции принимает участие один и тот же чувствительный к железу регуляторный белок. (Адаптировано из M. W. Hentze et al., *Science* 238: 1570–1573, 1987, и J. L. Casey et al., *Science* 240: 924–928, 1988. С разрешения AAAS.)

может быстро адаптироваться к изменениям окружающей среды.

Как правило, в эукариотических клетках мРНК более стабильна. Некоторые мРНК, например, как мРНК, кодирующая β -глобин, имеют время полужизни более 10 часов, но у большинства оно значительно короче и обычно составляет меньше 30 минут. Особенно коротким временем полужизни обладают мРНК, кодирующие, например, факторы роста или регуляторные белки, скорость синтеза которых в клетках должна меняться быстро.

Существует два основных механизма разрушения эукариотических мРНК. Оба начинаются с постепенного укорочения экзонуклеазой поли-А хвоста — этот процесс начинается сразу же, как мРНК достигает цитоплазмы. В широком смысле, такое укорочение поли-А работает в качестве таймера, отсчитывающего время жизни каждой мРНК. После уменьшения длины поли-А хвоста до критической величины (около 25 нуклеотидов у человека) два пути расходятся. По одному из них 5'-кэп удаляется (процесс называется декэпированием), и «неприкрытая» мРНК быстро деградирует, начиная со своего 5'-конца. По другому пути разрушение мРНК продолжается с 3'-конца через поли-А хвост внутрь кодирующей последовательности (рис. 7.109). Большинство эукариотических мРНК деградируют при помощи обоих механизмов.

Почти все мРНК подвержены этим двум типам разрушения, и специфические последовательности каждой мРНК определяют, как быстро будет наступать каждый этап и, следовательно, как долго каждая мРНК просуществует в клетке и с нее может образовываться белок. Последовательности 3'-UTR особенно важны для контроля времени жизни мРНК, и они часто содержат участки связывания для специфических белков, повышающих или понижающих скорость уменьшения длины поли-А хвоста, декэпирования или деградации в направлении 3' → 5'. На время полужизни мРНК также влияет эффективность ее трансляции. Процессы укорачивания поли-А и декэпирования непосредственно конкурируют с аппаратом трансляции мРНК, следовательно, любые факторы, затрагивающие эффективность трансляции мРНК, будут склонны оказывать противоположный эффект на деградацию (рис. 7.110).

Время полужизни большей части мРНК эукариот контролируется уменьшением длины поли-А хвоста, но некоторые мРНК могут разрушаться посредством специализированного механизма, который совершенно пропускает этот этап. В таких случаях специфические нуклеазы разрезают мРНК изнутри, эффективно декэпируя один конец и удаляя полиадениловый хвост у другого, так что обе половинки быстро деградируют. Разрушаемые подобным способом мРНК несут специфические нуклеотидные последовательности, часто находящиеся в 3'-UTR, которые служат узнаваемыми последовательностями для этих эндонуклеаз. Такая стратегия весьма упрощает плотную регуляцию стабильности таких мРНК путем блокировки сайта эндонуклеазы в ответ на внеклеточные сигналы. Например, добавление к клеткам железа уменьшает стабильность мРНК, которая кодирует рецепторный белок, связывающий железотранспортирующий белок трансферрин, что приводит к образованию меньшего количества рецептора. Этот эффект опосредуется чувствительным к железу РНК-связывающим белком аконитазой, который также контролирует трансляцию мРНК ферритина. Аконитаза может связываться с 3'-UTR мРНК трансферринового рецептора и, препятствуя расщеплению мРНК эндонуклеазами, увеличивать образование рецептора. При добавлении железа аконитаза отделяется от мРНК, раскрывая ее сайты расщепления и тем самым

понижая стабильность мРНК (рис. 7.111).

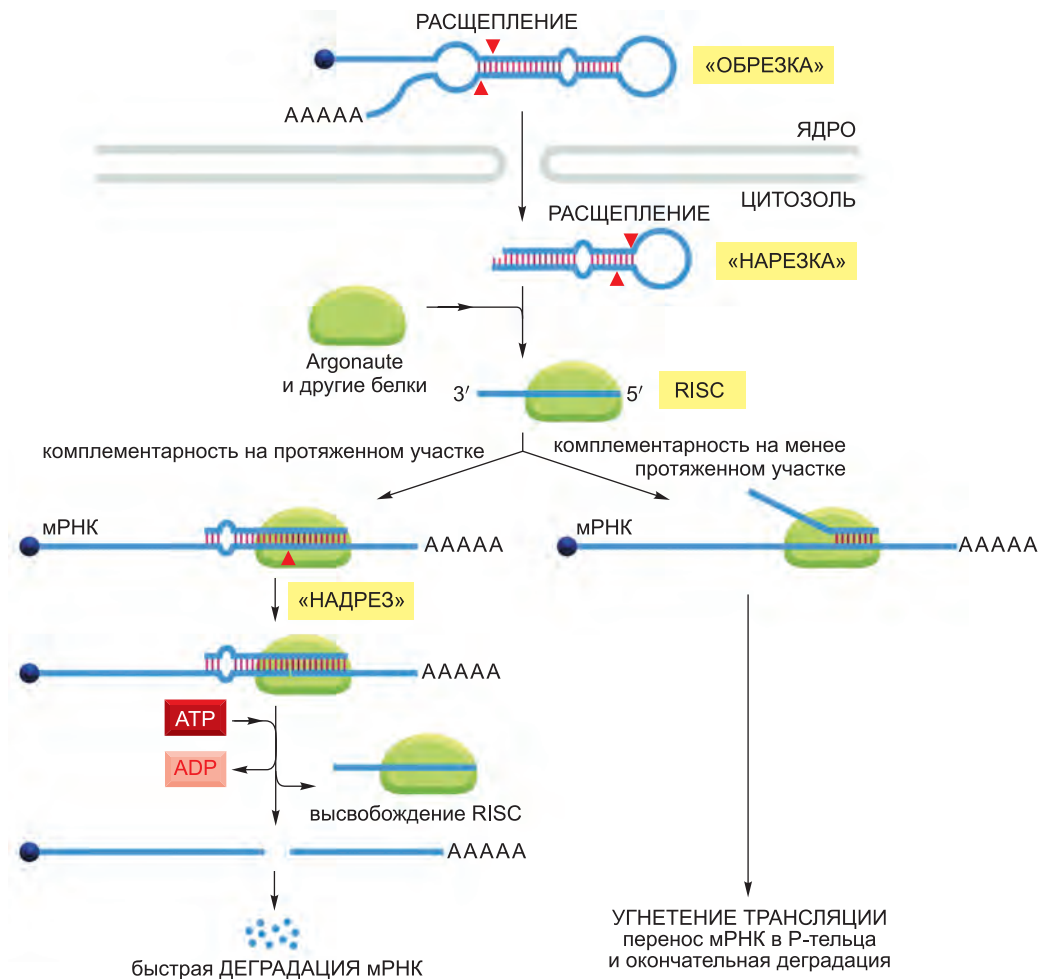


Рис. 7.112. Процессинг и механизм действия miRNA. Предшественник miRNA, благодаря комплементарности одной части своей последовательности другой, образует двухцепочечную структуру. Она обрезается еще в ядре, а затем экспортируется в цитозоль, где происходит ее дальнейшее расщепление ферментом Dicer с образованием соответствующей miRNA. Белок Argonaute в сочетании с другими компонентами RISC первоначально соединяется с обеими цепями miRNA, расщепляет и отбрасывает одну из них. Другая цепь, используя механизм комплементарного спаривания оснований, направляет RISC к специфическим мРНК. Если совпадение между двумя РНК значительное, как это часто наблюдается у растений, Argonaute разрезает целевую мРНК, что приводит к ее быстрой деградации. У животных совпадение между miRNA и мРНК часто не превышает короткой области «затравки» размером 7 нуклеотидов вблизи 5'-конца miRNA. Такой небольшой уровень комплементарности между двумя последовательностями РНК приводит к ингибированию трансляции, дестабилизации мРНК и ее переносу к Р-тельцам, где она в итоге деградирует.

7.5.15. Полиаденилирование в цитоплазме может регулировать трансляцию

Первоначальное полиаденилирование молекулы РНК (описано в главе 6) происходит в ядре, очевидно, автоматически для практически всех предшественников эукариотических мРНК. Как только что было рассмотрено, поли-А хвосты у большинства мРНК в цитозоле постепенно укорачиваются, и в конце концов РНК деградируют. Однако в некоторых случаях поли-А хвосты специфических мРНК в цитозоле удлиняются, и этот механизм служит еще одной формой регуляции трансляции.

Созревающие ооциты и яйцеклетки представляют собой наиболее яркий пример. Многие из нормальных путей деградации мРНК, кажется, отключены в этих гигантских клетках, так что клетки могут создавать большие запасы мРНК при подготовке к оплодотворению. Многие мРНК запасаются в цитоплазме, имея только 10–30 адениновых остатков на 3'-конце, и в этой форме они не транслируются. В особые моменты времени в ходе созревания ооцита и сразу после оплодотворения — когда клетке требуются белки, кодируемые этими мРНК, — цитозольная поли-А-полимераза к отдельным мРНК присоединяет поли-А последовательность, что значительно стимулирует трансляцию этих мРНК.

7.5.16. Малые некодирующие РНК-транскрипты регулируют многие гены животных и растений

В предыдущей главе была представлена центральная догма биологии, согласно которой поток генетической информации идет от ДНК через РНК к белку (рис. 6.2). Но мы видели, что молекулы РНК выполняют много важных заданий в клетке, помимо того что служат промежуточными переносчиками генетической информации. Серия недавно сделанных поразительных открытий показала, что некодирующих РНК намного больше, чем считали раньше, и играют они прежде неподвиженные, но хорошо известные роли в регулировании экспрессии генов.

Особое значение у животных и растений имеет тип короткой некодирующей РНК, именуемый **микроРНК (microRNA; miРНК)**. Например, у человека экспрессируется более 400 разных miРНК, и, по-видимому, они регулируют по крайней мере одну треть всех генов человека, кодирующих белки. После образования miРНК спариваются со специфическими мРНК и регулируют их стабильность и процесс их трансляции. Предшественники miРНК синтезируются РНК-полимеразой II и

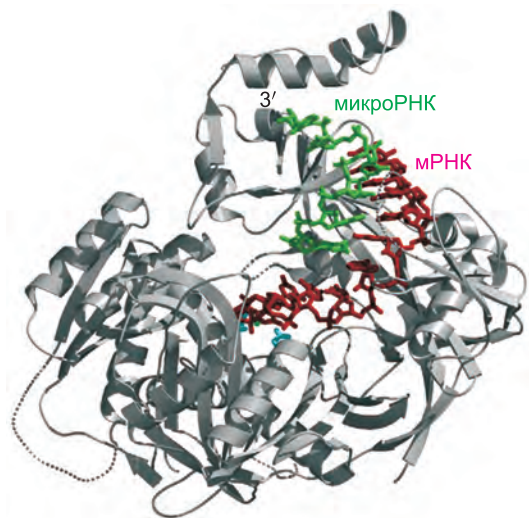


Рис. 7.113. Структура белка Argonaute, связанного с идеально спаренными miРНК и мРНК. (Адаптировано из N. H. Tolia and L. Joshua-Tor, *Nat. Chem. Biol.* 3: 36–43, 2007. С разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

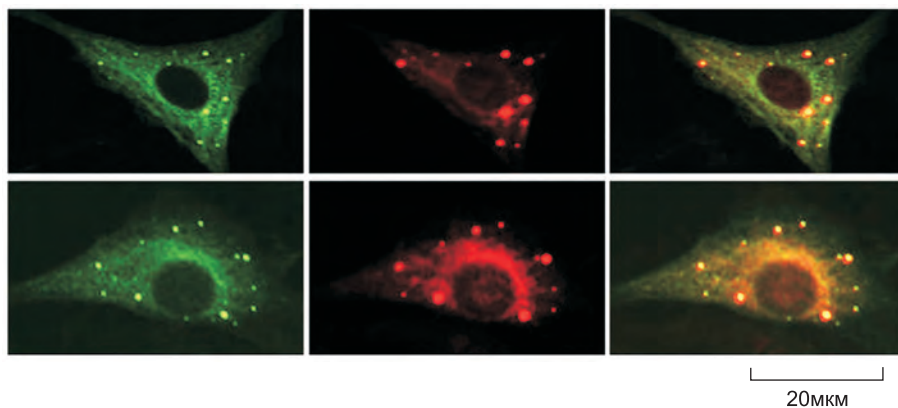


Рис. 7.114. Визуализация Р-телец. Клетки человека окрасили антителами к компоненту фермента декэпирования мРНК Dcp1a (изображения слева) и к белку Argonaute (изображения посередине). При наложении двух изображений (изображения справа) видно, что два белка сококализованы (или, говоря, колокализуются) вблизи центров, называемых Р-тельцами. (Адаптировано из J. Liu et al., *Nat. Cell Biol.* 7: 643–644, 2005. С разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

также проходят через экпирование и полиаденилирование. Затем они подвергаются специальному типу процессинга, после которого происходит сборка miРНК с группой белков и образуется *РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга*, или RISC (RNA-induced silencing complex). После своего образования RISC ищет свои целевые мРНК, проводя поиск комплементарных нуклеотидных последовательностей (рис. 7.112). Этот поиск в значительной степени облегчается белком Argonaute, компонентом RISC, который выставляет 5'-область miРНК так, чтобы она была оптимально расположена для спаривания с другой молекулой РНК (рис. 7.113). У животных область спаривания типично составляет семь нуклеотидных пар и обычно расположена в 3'-UTR целевой мРНК.

После того как miРНК связала мРНК, возможно несколько исходов. Если комплементарно спаренные основания занимают участок значительной протяженности, мРНК расщепляется белком Argonaute, эффективно удаляющим ее поли-А хвост, и облегчая ее доступность для действия экзонуклеаз (см. рис. 7.109). Вслед за расщеплением мРНК RISC (со связанной miРНК) высвобождается и может начинать поиск других мРНК. Соответственно, одна miРНК может действовать каталитически, разрушая множество комплементарных ей мРНК. Можно рассматривать miРНК как направляющие последовательности, которые сводят вместе разрушающие нуклеазы и специфические мРНК.

Если комплементарность между miРНК и мРНК не столь значительна, Argonaute не разрезает мРНК, скорее, подавляется трансляция мРНК и происходит ее дестабилизация. Этот эффект связан с уменьшением длины поли-А хвоста и перемещением мРНК к цитозольным структурам, называемым *процессирующими тельцами (processing bodies; Р-тельца)*, где мРНК изолируются от рибосом и в итоге декэпируются и деградируют. Р-тельца представляют собой динамичные структуры, состоящие из больших комплексов мРНК и РНК-деградирующих ферментов. Полагают, что это те места в клетке, где происходит последняя стадия разрушения большинства мРНК — даже тех, что не находятся под контролем

miРНК (рис. 7.114).

Несколько свойств делают miРНК особенно ценными регуляторами экспрессии генов. Во-первых, одна miРНК может регулировать целый ряд различных мРНК при условии, что мРНК содержат общую последовательность в их нетранслируемых областях. Такая ситуация вполне типична в случае человека, где некоторые miРНК контролируют сотни разных мРНК. Во-вторых, регуляция при помощи miРНК может быть комбинаторной. Когда спариванию между miРНК и мРНК не удастся запустить расщепление, дополнительные miРНК, связывающиеся с той же мРНК, приводят к дальнейшему падению скорости ее трансляции. Как обсуждалось ранее в этой главе относительно регуляторных белков, комбинаторный контроль генов значительно расширяет доступные клетке возможности, увязывая экспрессию генов не с одним регулятором, а с комбинацией различных регуляторов. В-третьих, miРНК занимают сравнительно мало места в геноме по сравнению с белком. Действительно, их малый размер является одной из причин, почему miРНК были открыты только недавно. Мы только начинаем осознавать влияние miРНК, но уже ясно, что они представляют собой очень важную часть аппарата клетки для регуляции экспрессии ее генов.

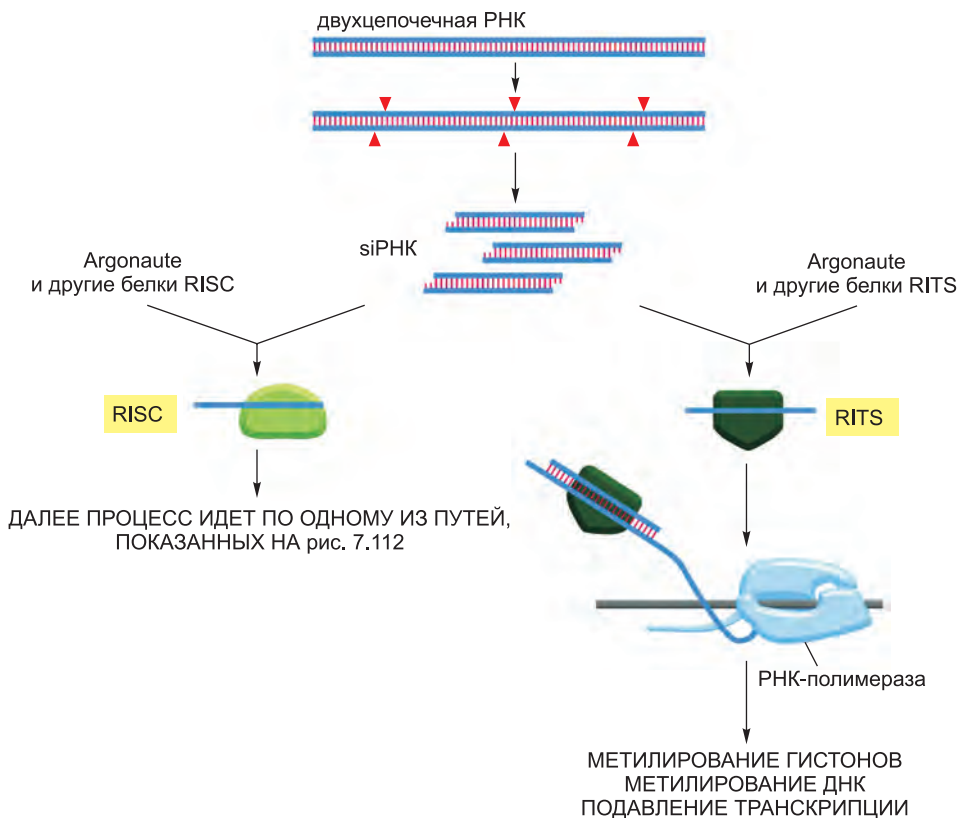


Рис. 7.115. siРНК-зависимое образование гетерохроматина. У многих организмов двухцепочечная РНК может запускать как разрушение комплементарных мРНК (слева), так и сайленсинг транскрипции (справа). Изменения в структуре хроматина, вызываемые связыванием комплекса RITS (РНК-индуцируемого сайленсинга транскрипции), напоминают те, которые приведены на рис. 7.81.

7.5.17. РНК-интерференция служит защитным механизмом клетки

Многие из белков, принимающих участие в только что описанных регуляторных механизмах, связанных с miРНК, также выполняют вторую функцию, действуя как защитный механизм: они организуют деградацию чужеродных молекул РНК, особенно тех, которые встречаются в двухцепочечной форме. Этот механизм, именуемый **РНК-интерференцией (RNA interference; RNAi)**, обнаружен у самых разнообразных организмов, включая одноклеточные грибы, растения и червей, что предполагает его эволюционную античность. Многие мобильные элементы и вирусы в ходе своих жизненных циклов образуют двухцепочечную РНК, хотя бы на короткое время, и РНК-интерференция помогает держать этих потенциально опасных «захватчиков» под контролем. Как будет видно, РНК-интерференция также снабдила ученых мощной экспериментальной технологией, позволяющей выключать экспрессию индивидуальных генов.

Наличие двухцепочечной РНК в клетке запускает РНК-интерференцию путем привлечения белкового комплекса, содержащего *Dicer* — ту же самую нуклеазу, которая осуществляет процессинг miРНК (см. рис. 7.112). Этот белковый комплекс расщепляет двухцепочечную РНК на короткие (примерно 23 нуклеотидные пары) фрагменты, называемые **малыми интерферирующими РНК (small interfering RNAs; siРНК)**. Белок Argonaute и другие компоненты RISC связывают затем в такие двухцепочечные siРНК, как и в случае с miРНК, и одна цепь дуплекса РНК разрезается белком Argonaute и отбрасывается. Оставшаяся одноцепочечная молекула siРНК направляет RISC обратно к комплементарным молекулам РНК, образуемым вирусом или мобильным элементом, и, так как нуклеотидные последовательности siРНК и РНК-мишени полностью комплементарны, Argonaute разрезает эти молекулы, приводя к их быстрой деградации (рис. 7.115).

Каждый раз, когда RISC расщепляет новую молекулу РНК, он высвобождается — таким образом, как мы видели в случае с miРНК, единичная молекула РНК может действовать каталитически, разрушая много комплементарных РНК. Некоторые организмы используют дополнительный механизм, который многократно усиливает сигнал РНК-интерференции. В таких организмах РНК-зависимые РНК-полимеразы могут превращать продукты siРНК-зависимого расщепления в еще большее количество двухцепочечных РНК. Такая амплификация гарантирует, что, начавшись, РНК-интерференция может продолжаться даже после того, как вся инициировавшая ее двухцепочечная РНК деградирована или рассеялась. Например, это позволяет делящимся клеткам продолжать осуществлять РНК-интерференцию, запущенную еще в родительских клетках.

У некоторых организмов активность РНК-интерференции может распространяться путем переноса фрагментов РНК от клетки к клетке. Это особенно важно для растений (чьи клетки связаны тонкими соединительными каналами, как описано в главе 19), поскольку это позволяет целому растению приобрести устойчивость к действию РНК-вируса после заражения только нескольких его клеток. В широком смысле ответ системы РНК-интерференции напоминает определенные механизмы иммунной системы животных: в обоих случаях вторгающийся организм вызывает специализированный ответ и — через амплификацию «атакующих» молекул — организм хозяина становится системно защищенным.

7.5.18. РНК-интерференция может управлять процессом образования гетерохроматина

Только что описанный механизм РНК-интерференции не обязательно останавливается на разрушении молекул РНК-мишеней. В некоторых случаях аппарат РНК-интерференции может избирательно выключать синтез целевых РНК. Чтобы этот поразительный механизм заработал, короткие siРНК, получающиеся в результате действия белка Dicer, собираются с группой белков (включая белок Argonaute) с образованием комплекса RITS (RNA-induced transcriptional silencing, РНК-индуцируемого сайленсинга транскрипции). Используя одноцепочечную siРНК в качестве направляющей последовательности, этот комплекс связывает комплементарные РНК-транскрипты по мере их появления из транскрибирующей РНК-полимеразы II (см. рис. 7.115). Расположившись на геноме подобным образом, комплекс RITS привлекает белки, которые ковалентно модифицируют соседние гистоны, и в конечном счете направляет образование и распространение гетерохроматина, предотвращая дальнейшую инициацию транскрипции. В некоторых случаях комплекс RITS также индуцирует метилирование ДНК, которое, как отмечалось, может подавлять экспрессию генов в еще большей степени. Поскольку гетерохроматин и метилирование ДНК могут распространяться самостоятельно, первоначальный сигнал, поданный с помощью РНК-интерференции, может продолжать подавлять экспрессию генов еще долго после того, как рассеялись все молекулы siРНК.

Образование гетерохроматина, направляемое РНК-интерференцией, является важным защитным механизмом клетки, который ограничивает накопление мобильных элементов в геноме благодаря поддержанию их в транскрипционно неактивной форме. Однако тот же самый механизм используется и во множестве нормальных процессов, происходящих в клетке. Например, у многих организмов аппарат РНК-интерференции поддерживает образование гетерохроматина около центромер. Центромерные последовательности ДНК транскрибируются в обоих направлениях, образуя комплементарные РНК-транскрипты, которые могут спариваться с образованием двухцепочечной РНК. Такая двухцепочечная РНК запускает РНК-интерференцию и стимулирует образование гетерохроматина у центромер. В свою очередь, такой гетерохроматин необходим центромерам для точного разделения хромосом в ходе митоза (см. рис. 4.50).

7.5.19. РНК-интерференция стала мощным инструментом экспериментаторов

Вероятно, изначально РНК-интерференция возникла как защитный механизм, но затем она стала совершенно неотъемлемой частью многих биологических процессов, происходящих в нормальной клетке: от контроля экспрессии генов и до структуры хромосом. Ученые также довели эту технологию до совершенства, превратив в мощный экспериментальный инструмент, который позволяет инактивировать практически любой ген, вызывая на него ответ системы РНК-интерференции. Такая техника, применяемая в культурах клеток и в некоторых случаях в организмах целых животных и растений, произвела революцию в генетических подходах клеточной и молекулярной биологии. Более подробно это будет обсуждаться в последующих главах (см. **стр. 571–572**). Потенциал РНК-интерференции для лечения болезней человека огромен. Поскольку у человека многие нарушения воз-

никают в результате неправильной экспрессии генов, возможность выключать эти гены, вводя экспериментально полученные комплементарные молекулы siРНК, представляется высокоперспективным направлением медицины. Замечательно, что механизм РНК-интерференции открыт совсем недавно и мы все еще заворожены деталями его механики и спектром его биологической значимости.

Заключение

В клетках многие этапы пути, ведущего от РНК к белку, регулируются, чтобы держать под контролем экспрессию генов. Наряду с регуляцией, на стадии инициации транскрипции большая часть генов контролируется на множестве уровней. Регуляторные механизмы включают: 1) аттенуацию РНК-транскрипта путем преждевременной терминации трансляции; 2) выбор альтернативного сайта сплайсинга РНК; 3) контроль формирования 3'-конца РНК посредством его расщепления и полиаденилирования; 4) редактирование РНК; 5) контроль экспорта из ядра в цитозоль; 6) локализацию мРНК в определенных местах клетки; 7) контроль инициации трансляции; 8) регулирующую деградацию мРНК. Большинство этих процессов основано на узнавании специфических последовательностей или структур на молекуле РНК, что подлежит регулированию, и это делают либо регуляторные белки, либо регуляторные молекулы РНК. Особенно широко в посттранскрипционном контроле клетка использует РНК-интерференцию — когда направляющие РНК спариваются с мРНК. РНК-интерференция может приводить либо к разрушению мРНК, либо к подавлению ее трансляции. Упаковка определенных генов в гетерохроматин — этот процесс тоже может вызвать РНК-интерференция.

ЗАДАЧИ

Какие из утверждений являются верными? Объясните почему

7.1. С точки зрения биологической функции мотив спираль-петля-спираль более близок к мотиву «лейциновая молния», чем к мотиву спираль-виток-спираль.

7.2. Обратимые генетические перестройки — это распространенный способ регуляции экспрессии генов в клетках прокариот и млекопитающих.

7.3. Считается, что CG-островки возникли в ходе эволюции, поскольку они связаны с частями генома, которые в половых клетках оставались активными, следовательно, неметилировались.

Обсудите следующие проблемы

7.4. На рис. Q7.1 показана небольшая часть изображения двумерного разделения белков человеческого мозга. Эти белки в одном направлении были разделены по размеру, в другом — по электрическому заряду (изоэлек-

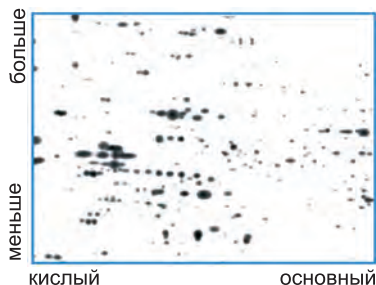


Рис. Q7.1. Двумерное разделение белков мозга человека (задача 7.4) с помощью двумерного гель-электрофореза. На рисунке приведена только малая часть белкового спектра. (С любезного разрешения Tim Myers и Leigh Anderson, Large Scale Biology Corporation.)

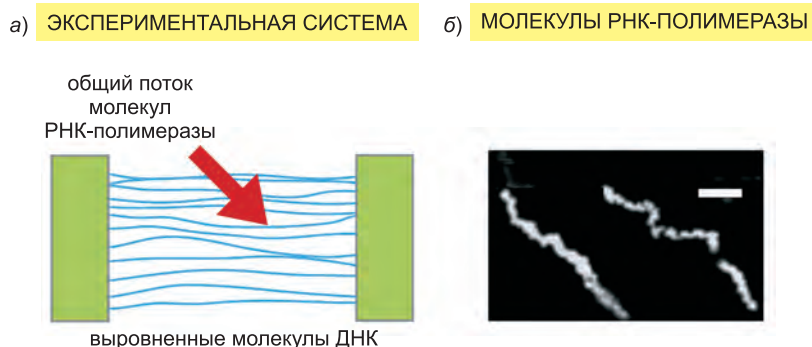


Рис. Q7.2. Взаимодействие индивидуальных молекул РНК-полимеразы с ДНК (задача 7.7). а) Начало опыта. Молекулы ДНК выровнены и закреплены на предметном стекле, сквозь них пропускают интенсивно флуоресцирующие молекулы РНК-полимеразы. б) Траектории двух индивидуальных молекул РНК-полимеразы. Одна молекула (слева) перемещалась вместе с общим потоком, а другая (справа) отклонилась от него. Масштабная полоска имеет размер 10 мкм. (б — перепечатано из Н. Kabata et al., *Science* 262: 1561–1563, 1993. С разрешения AAAS.)

трической точке). На подобных изображениях не все белковые пятна являются продуктами разных генов — некоторые представляют собой модифицированные формы белка, которые мигрируют по-разному. Выберите несколько групп пятен, которые могут представлять белки, различающиеся по числу содержащихся в них фосфатных групп. Обоснуйте свой ответ.

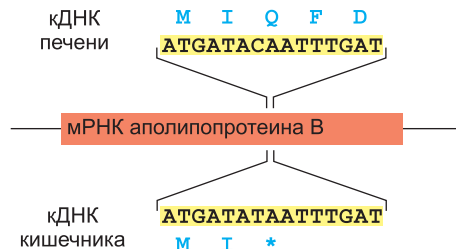
7.5. Анализ с помощью ДНК-чипов паттернов, отражающих содержание мРНК, показал, что уровень экспрессии практически любого активного гена отличается для различных типов клеток человека. Такие паттерны настолько специфичны для клеточного типа, что могут быть использованы для определения ткани, давшей начало раковым клеткам, даже если эти клетки метастазировали в другие части тела. Но, по определению, раковые клетки отличаются от своих нераковых клеток-предшественников. Тогда, как вы полагаете, могут ли быть использованы картины экспрессии мРНК для определения ткани-источника рака человека?

7.6. Ядро эукариотической клетки намного больше бактерии и содержит большее количество ДНК. Вследствие этого ДНК-связывающий белок в эукариотической клетке должен уметь выбирать специфический участок связывания среди намного большего числа посторонних последовательностей, чем это делает такой же белок в клетке бактерии. Составляет ли это особую проблему для регуляции генов у эукариот?

Рассмотрите следующий случай. Предположим, что в эукариотическом ядре и бактериальной клетке содержится одна копия одного и того же ДНК-сайта связывания. Кроме того, предположим, что ядро по объему в 500 раз больше клетки бактерии и содержит в 500 раз больше ДНК. Если концентрация регуляторного белка, связывающегося с этим участком, одинакова и в ядре, и в клетке бактерии, то будет ли регуляторный белок находить свой участок связывания в эукариотическом ядре так же хорошо, как и в клетке бактерии? Обоснуйте свой ответ.

7.7. ДНК-связывающие белки часто находят специфические участки связывания намного быстрее, чем можно было бы ожидать в случае простой диффузии в пространстве. Например, репрессор *Lac*-оперона связывается с оператором, сайтом

Рис. Q7.3. Расположение различий в последовательностях клонов кДНК, полученных из РНК аполипопротеина В (АроВ) печени и кишечника (задача 7.9). Закодированные аминокислотные последовательности в виде однобуквенного кода выровнены по последовательностям кДНК.



своего связывания с ДНК, в 100 раз быстрее, чем можно было бы ожидать для этой модели. Ясно, что репрессор должен находить оператор при помощи механизмов, снижающих размерность или объем поиска, чтобы ускорить обнаружение цели.

Таблица Q7.1. Гибридизация специфических олигонуклеотидов с амплифицированными участками РНК и ДНК печени и кишечника (задача 7.9)

	РНК		ДНК	
	ПЕЧЕНЬ	КИШЕЧНИК	ПЕЧЕНЬ	КИШЕЧНИК
Олиго-Q	+	-	+	+
Олиго-СТОП	-	+	-	-

Гибридизация отмечена +, ее отсутствие —.

При исследовании этой проблемы было применено несколько методов. В одном из наиболее изящных использовали интенсивно флуоресцирующие молекулы РНК-полимеразы, что позволяло проследить судьбу каждой индивидуальной молекулы. Набор молекул ДНК выравнивали параллельно друг другу и закрепляли на предметном стекле. Затем сквозь них под косым углом пропускали флуоресцентно-меченные молекулы РНК-полимеразы (рис. Q7.2, а). Траектории движения индивидуальных РНК-полимераз показали, что около половины молекул прошло в направлении общего потока, а около половины характерным образом отклонилось от него (рис. Q7.2, б). Если предварительно молекулы РНК-полимеразы инкубировали с короткими фрагментами ДНК, содержащими сильный промотор, то все траектории совпадали с общим потоком.

А. Дайте свое объяснение, почему некоторые молекулы РНК-полимеразы отклонились от общего потока, как показано на рис. Q7.2, б. Почему инкубация с короткими фрагментами ДНК, содержащими сильный промотор, приводит к исчезновению, отклоняющихся от общего потока траекторий?

Б. Дают ли эти результаты объяснение тому, как сайт-специфическим ДНК-связывающим молекулам удается находить свои участки связывания быстрее, чем это можно ожидать при простой диффузии?

В. Основываясь на своем объяснении, полагаете ли вы, что сайт-специфическая ДНК-связывающая молекула найдет свою цель быстрее в популяции коротких молекул ДНК или в популяции длинных? Предположим, что концентрация участков-мишеней одинакова и на одну молекулу ДНК приходится один такой участок.

7.8. У большинства абсолютно слепых людей циркадные ритмы «свободно

текущие», то есть их ритмы не синхронизированы с временными сигналами окружающей среды и суточный цикл колебаний составляет у них около 24,5 часов. Как вы полагаете, почему циркадные ритмы слепых людей не настроены на тот же 24-часовой ритм, как и у большинства населения? Можете ли вы догадаться, какие симптомы могут быть связаны со свободно текущими циркадными часами? Полагаете ли вы, что у слепых людей есть проблемы со сном?

7.9. У человека в крови обнаружены две близкородственные формы аполипопротеина В (АpoВ) — компонентов липопротеинов плазмы. АpoВ-48 (мол. масса 48 кДа) синтезируется кишечником и является ключевым компонентом хиломикроннов — крупных липопротеиновых частиц, отвечающих за доставку пищевых триглицеридов к жировой ткани для запасаения. АpoВ-100 (мол. масса 100 000 кДа) синтезируется в печени для образования намного более мелких частиц — липопротеинов очень низкой плотности, которые используются для распределения триглицеридов в организме, удовлетворяя потребности в энергии. Классический набор опытов охарактеризовал удивительные взаимоотношения между двумя этими белками.

В последовательностях клонированных копий кДНК, образованных от мРНК из этих двух тканей, обнаружено единственное отличие: в кДНК из клеток кишечника тимин является частью стоп-кодона в том месте, где в кДНК из клеток печени стоит цитозин как часть глутаминового кодона (**рис. Q7.3**). Чтобы подтвердить различия в мРНК и найти соответствующие различия в геноме, из клеток кишечника и печени были выделены РНК и ДНК, которые затем амплифицировали при помощи ПЦР, используя олигонуклеотиды, фланкирующие интересующую область. Амплифицированные фрагменты ДНК из четырех образцов протестировали на наличие остатков тимина или цитозина посредством гибридизации с олигонуклеотидами, содержащими последовательность кДНК либо печени (олиго-Q), либо кишечника (олиго-СТОП). Результаты представлены в **табл. Q7.1**.

Образуются ли две формы АpoВ посредством контроля транскрипции от двух разных генов путем контроля процессинга РНК-транскрипта от одного гена или путем различного расщепления белкового продукта от одного гена? Обоснуйте свой ответ.

Литература

Общая

- Brown T. A. (2002) *Genomes 2*, 2nd ed. New York: Wiley-Liss.
- Epigenetics (2004) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 69.
- Hartwell L., Hood L., Goldberg M.L. et al. (2006) *Genetics: from Genes to Genomes*, 3rd ed. Boston: McGraw Hill.
- Lodish H., Berk A., Kaiser C.L. et al. (2007) *Molecular Cell Biology*, 6th ed. New York: WH Freeman.
- McKnight S.L. & Yamamoto K.R. (eds.) (1993) *Transcriptional Regulation*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mechanisms of Transcription (1998) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 63.
- Ptashne M. & Gann A. (2002) *Genes and Signals*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Regulatory RNAs (2006) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71.

Watson J. D., Baker T. A., Bell S. P. et al. (2003) *Molecular Biology of the Gene*, 5th ed. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings.

О регуляции генов

Campbell K. H., McWhir J., Ritchie W. A. & Wilmut I. (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380: 64–66.

Davidson E. H. (2006) *The Regulatory Genome: Gene Regulatory Networks in Development and Evolution*. Burlington, MA: Elsevier.

Gurdon J. B. (1992) The generation of diversity and pattern in animal development. *Cell* 68: 185–199.

Levine M. & Tjian R. (2003) Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424: 147–151.

Ross D. T., Scherf U., Eisen M. B. et al. (2000) Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nature Genet.* 24: 227–235.

ДНК-связывающие мотивы в белках-регуляторах генов

Gehring W. J., Affolter M. & Burglin T. (1994) Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 487–526.

Harbison C. T., Gordon D. B., Lee T. I. et al. (2004) Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* 431: 99–104.

Luscombe N. M., Austin S. E., Berman H. M. et al. (2000) An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Gen. Biol.* 1: reviews 001.1–001.37.

McKnight S. L. (1991) Molecular zippers in gene regulation. *Sci. Am.* 264: 54–64.

Pabo C. O. & Sauer R. T. (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 1053–1095.

Rhodes D. & Klug A. (1993) Zinc fingers. *Sci. Am.* 268: 56–65.

Seeman N. C., Rosenberg J. M. & Rich A. (1976) Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 804–808.

Как работают переключатели генов

Becker P. B. & Hörz W. (2002) ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 247–273.

Beckwith J. (1987) The operon: an historical account. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology* (Neidhart F. C., Ingraham J. L., Low K. B. et al. eds.), vol. 2, pp. 1439–1443. Washington, DC: ASM Press.

Gaszner M. & Felsenfeld G. (2006) Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nature Rev. Genet.* 7: 703–713.

Gilbert W. and Muller-Hill B. (1967) The lac operator is DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58: 2415.

Green M. R. (2005) Eukaryotic transcription activation: right on target. *Mol. Cell* 18: 399–402.

Jacob F. & Monod J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3: 318–356.

Lawson C. L., Swigon D., Murakami K. S. et al. (2004) Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14:

10–20.

Millar C. B., & Grunstein M. (2006) Genome-wide patterns of histone modifications in yeast. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 657–666.

Narlikar G. J., Fan H. Y. & Kingston R. E. (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108: 475–487.

Oehler S., Eismann E. R., Krämer H. et al. (1990) The three operators of the lac operon cooperate in repression. *EMBO J.* 9: 973–979.

Ptashne M. (2004) *A Genetic Switch: Phage and Lambda Revisited*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Ptashne M. (1967) Specific binding of the lambda phage repressor to lambda DNA. *Nature* 214: 232–234.

St. Johnston D. & Nusslein-Volhard C. (1992) The origin of pattern and polarity in the Drosophila embryo. *Cell* 68: 201–219.

Strahl B. D. & Allis C. D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41–45.

Молекулярно-генетические механизмы, участвующие в образовании специализированных типов клеток

Alon U. (2006) *An Introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits* (Chapman & Hall/Crc Mathematical and Computational Biology Series) TF Chapman.

Bell-Pedersen D., Cassone V. M., Earnest D. J. et al. (2005) Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nature Rev. Genet.* 6: 544–556.

Bernstein B. E., Meissner A. & Lander E. S. (2007) The mammalian epigenome. *Cell* 128: 669–681.

Herskowitz I. (1989) A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature* 342: 749–757.

Klose R. J. & Bird A. P. (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 31: 89–97.

Meyer B. J. (2000) Sex in the worm: counting and compensating X-chromosome dose. *Trends Genet.* 16: 247–253.

Surani M. A. (2001) Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414: 122–128.

Tapscott S. J. (2005) The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Development* 132: 2685–2695.

Посттранскрипционная регуляция

Bass B. L. (2002) RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 817–846.

Blencowe B. J. (2006) Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* 126: 37–47.

Brennecke J., Stark A., Russell R. B. et al. (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biology* 3.

Fire A., Xu S., Montgomery M. K. et al. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811.

Frankel A. D. & Young J. A. T. (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu.*