

Э. Рис, М. Стернберг

ВВЕДЕНИЕ
В МОЛЕКУЛЯРНУЮ
БИОЛОГИЮ

ОТ КЛЕТОК К АТОМАМ

Перевод с английского
под редакцией д-ра физ.-мат. наук Ю. С.
ЛАЗУРКИНА
и д-ра биол. наук В. А.
ТКАЧУКА



Москва «Мир» 2002

FROM CELLS TO ATOMS

AN ILLUSTRATED INTRODUCTION TO MOLECULAR BIOLOGY

ANTHONY R. REES

MA, DPhil

Lecturer in Molecular Biophysics and
4itor in Biochemistry, Christ Church,
University of Oxford

MICHAEL J. E. STERNBERG

MA, MSc, DPhil ►yal

Society University Research Fellow
Department of Crystallography,
irkbeck College, University of London

Foreword by

SIR DAVID PHILLIPS

FRS

Professor of Molecular Biophysics
University of Oxford

Blackwell Scientific Publications

Oxford London Edinburgh Boston

Palo Alto Melbourn

УДК 577.2
ББК 28.070
P54

Рис Э., Стернберг М.
P54 Введение в молекулярную биологию: От клеток к атомам:
Пер. с англ. — М.: Мир, 2002. — 142 с, ил.
ISBN 5-03-003521-4

В книге английских авторов изложены основы молекулярной биологии. Материал разделен на 44 темы, каждая из которых представлена в виде схем и рисунков, сопровождаемых энциклопедическим по стилю текстом.

Предназначена для студентов биологических и медицинских вузов, учащихся старших классов, а также биологов, медиков, физиков и химиков, интересующихся проблемами молекулярной биологии.

УДК 577.2
ББК 28.070

Редакция литературы по биологии

Учебное издание Энтони

Рис, Майкл Стернберг

ВВЕДЕНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНУЮ БИОЛОГИЮ

От клеток к атомам

Зав. редакцией канд. биол. наук М. Р. Погосбекова.

Ведущий редактор канд. физ.-мат. наук Н. Н. Шафрановская.

Редактор Р. Ф. Куликова. Художник А. М. Павлов.

Художественный редактор В. П. Григорьев.

Технический редактор Е. В. Денюкова. Корректор Р. Ф. Куликова.

Оригинал-макет подготовлен Л. К. Васильевой, В. В. Левтоновым.

Лицензия ЛР № 010174 от 20.05.97 г.

Подписано к печати 26.12.01 г. Формат 84 x 108/б. Бумага офсетная.

Печать офсетная. Гарнитура NewtonС. Объем 4,5 бум. л. Усл. печ. л. 15,12.

Уч.-изд. л. 16,44. Изд. № 4/9797. Тираж 5000 экз. Зак. 5914.

Издательство «Мир»

Министерства РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций. 107996, ГСП-6, Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Диапозитивы изготовлены в издательстве «Мир»

Отпечатано в полном соответствии
с качеством предоставленных диапозитивов
в ОАО «Можайский полиграфический комбинат».
143200, г. Можайск, ул. Мира, 93.

ISBN 5-03-003521-4 (рус.) © 1984 by Blackwell Scientific Publications ISBN
0-632-00888-1 (англ.) © перевод на русский язык, «Мир», 1988, 2002

От редакторов перевода

Известно, что наибольших успехов молекулярная биология достигла в области понимания молекулярных механизмов генетических процессов, изучения синтеза, структуры и функций белков и нуклеиновых кислот — этих главных молекул всего живого. Большая часть предлагаемой читателю книги американских ученых Э. Риса и М. Стернберга посвящена именно этим вопросам. Достаточно полно рассматриваются структура клеток и их компонентов, строение вирусов, механизм действия ферментов и регуляция их активности, эволюция белков и т. д. Наряду с этим в ней освещены многие другие важные вопросы молекулярной и клеточной биологии и ряда смежных областей. Таким образом, эта книга перекрывает огромный диапазон объектов — от атомов и молекул до живых клеток.

Что же представляет собой сравнительно малое по объему издание, которое охватывает столь широкий и разнообразный материал? По лаконичности изложения его можно было бы рассматривать как энциклопедический словарь-справочник по молекулярной биологии. Представляется, однако, что для этого книга все же недостаточно полна. Ее главное достоинство состоит в том,

что все основные факты и достижения этих дисциплин изложены систематически. Никто не станет читать энциклопедический словарь подряд, страницу за страницей. Книгой же Риса и Стернберга читатель будет пользоваться в основном именно таким образом, хотя она несомненно может служить и справочником. Несмотря на краткость, книга очень содержательна: в ней в концентрированном виде изложены основные положения молекулярной биологии. Этому способствуют прекрасные иллюстрации, играющие не меньшую роль, чем сам текст.

Мы думаем, что книга Риса и Стернберга будет встречена с большим интересом. Особенно полезна она будет школьникам старших классов, а также студентам — физикам, химикам, биологам — и как введение в проблемы этой бурно развивающейся отрасли знаний, и как справочное пособие. Отдельные ее главы с удовольствием прочтут и специалисты.

Изданий такого рода у нас нет, и настоящая книга прекрасно заполнит этот пробел.

*Ю. С. Лазуркин В.
А. Ткачук*

Предисловие

Нередко суть предмета можно выразить с помощью одного удачно выбранного слова. Так, чаргаффовское определение молекулярной биологии как «нелегальной» биохимии указывает сразу и на характер ее взаимоотношений с биохимией, и на ту роль, которую сыграли в ее развитии ученые других специальностей, и на те конфликты (как творческого, так и иного характера), которые возникали, а порой и продолжают возникать. Кажется, само название «молекулярная биология» впервые употребил Уоррен Уивер — знаменитый руководитель отдела естественных наук Рокфеллеровского фонда, оказавший поддержку многим из числа первых исследователей, работавших в этой области. В своем отчете за 1938 г. он отметил, что «в тех пограничных областях, где физика и химия пересекаются с биологией, постепенно возникает новый раздел науки — молекулярная биология, начинающая приоткрывать завесы над многими тайнами живой клетки».

Этот новый раздел обязан своим развитием в значительной степени физикам и химикам, которые подошли к решению биохимических проблем с двух разных сторон. Одна из школ стремилась применить физические методы, в особенности рентгеноструктурный анализ, для определения трехмерной структуры наиболее важных в биологическом отношении макромолекул. В 1984 г. исполнилось 50 лет со времени открытия Берналом и Крауфтом того факта, что дифракция рентгеновских лучей на монокристаллах белков позволяет проводить исследование их структуры с разрешением, близким к атомному. Это стало одним из первых крупных достижений новой науки. Другая школа сосредоточила свои усилия на выяснении молекулярных механизмов генетических процессов, опираясь в основном на изучение вирусов бактерий. Эта так называемая «фаговая школа» связана с именами Дельбрюка и Луриа. Здесь важнейшим достижением (хотя, строго говоря, и не принадлежащим фаговой школе), сорокалетие которого тоже отмечалось в 1984 г., было установление Эвери, Мак-Леодом

и Мак-Карти того факта, что вовсе не белок, а ДНК является носителем генетической информации.

Объединение этих двух различных подходов к решению биологических проблем привело к открытию двойной спирали ДНК, сделанному в 1953 г. Криком и Уотсоном — физиком и биологом. Это замечательное открытие стало основой большинства молекулярно-биологических исследований, результаты которых описаны в данной книге.

Отличительной чертой молекулярной биологии было и остается то, что в ней делается упор на исследование структуры макромолекул и ее связи с функцией. Наиболее наглядно это было продемонстрировано на ДНК. Астбюри, один из пионеров этой науки, писал в 1950 г., накануне важнейших открытий: «...она занимается главным образом формой биологических молекул, а также тем, как эти формы эволюционируют, используются и разветвляются в своем восхождении к все более высоким уровням организации. Молекулярная биология — в основном наука о трехмерных структурах, но это вовсе не означает, что она является просто разделом морфологии. Она должна, кроме того, выяснить генезис различных структур и их функции».

Эта книга представляет собой сжатое изложение сведений, полученных в результате молекулярно-биологических исследований. В то же время в ней обращается внимание читателя и на многие нерешенные проблемы. Будет ли она использоваться в первую очередь как краткое введение в предмет, или как путеводитель для последующего основательного изучения, или же как некий итог, подлежащий пересмотру и исправлению, — все это покажет будущее. Однако в любом случае в ней несомненно нашли отражение те поразительные успехи в понимании природы биологических явлений, которые были достигнуты за последние примерно 40 лет.

Д. Филлипс

Предисловие авторов

Цель этой книги состоит в том, чтобы познакомить студентов — биологов и медиков, учеников старших классов и всех заинтересованных неспециалистов с основами молекулярной и клеточной биологии. Исследования, проведенные в этой области за последние десятилетия, позволили перейти при изучении структуры и функции клеток от описания их на уровне органелл к установлению молекулярных механизмов протекающих в них процессов. Например, любое обсуждение роли ядра в хранении, репликации и экспрессии генетического материала сводится к рассмотрению структуры и свойств ДНК, РНК и соответствующих белков. Поэтому всем, кто приступает к изучению данной области науки, необходимо не только усвоить основные положения клеточной и молекулярной биологии, но и понять их взаимосвязь. В надежде помочь в решении этой задачи и была написана эта книга. Как нам кажется, благодаря выбранной форме изложения и обилию иллюстраций книга будет полезна не только как введение в молекулярную биологию для начинающих, но и как сжатое изложение основных ее принципов для более квалифицированного читателя. В книге рассмотрен широкий круг вопросов — начиная от описания строения клеток и их органелл и кончая структу-

рой биологических макромолекул. Хотя некоторые разделы, строго говоря, не относятся непосредственно к области молекулярной биологии, мы включили их либо потому, что они необходимы для понимания других разделов (структура липидов и углеводов), либо потому, что они представляют общий интерес, хотя и мало связаны между собой (молекулярная эволюция и механизм проводимости нервного импульса). Мы рассмотрели также два таких современных вопроса, как генная инженерия и строение антител, поскольку считаем, что чем раньше начинающие молекулярные биологи познакомятся с этими важными темами, тем лучше.

В подобной книге невозможно отразить с достаточной полнотой все аспекты рассматриваемого предмета. Мы к этому и не стремились. Надеемся, что круг вопросов, на котором мы решили остановиться, и те необходимые обобщения, которые нами сделаны, удовлетворят читателей и воодушевят их на более глубокое изучение предмета. Если эта надежда осуществится, пусть даже частично, мы будем полностью удовлетворены.

*Энтони Р. Рис Майкл Дж. И.
Стернберг*

Благодарности

Мы хотели бы выразить нашу признательность за внимательное прочтение рукописи этой книги и ряд полезных замечаний и предложений м-ру Кирену Чада, д-ру Кейту Дэлзилу, д-ру Питеру Гудфорду, д-ру Луизе Джонсон, д-ру Патрику Махони, д-ру Джону Мак-Лэхлэну, проф. Эндрю Миллеру, проф. сэру Дэвиду Филлипсу, д-ру Брайану Саттону, м-ру Гарвею Шульману и д-ру Майклу Юдкину.

Мы благодарны также жене одного из нас (Э.Р.Р.) за ее выдержку и нашему художнику Дэвиду Гарднеру, неизменно сохранявшему хорошее настроение, несмотря на бесконечные переделки рисунков. И наконец, но отнюдь не в меньшей степени, мы благодарны нашему редактору Бобу Кэмпбеллу, вдохновлявшему нас на этот труд, и Джону Робсону за его долготерпение.

Материалы, заимствованные из других работ

Рисунки

Part of Fig. 4.1 from Branton D., Klug A. (1975). *J. Mol. Biol.*, **92**,

559-564, various plates and figures. Part of Fig. 4.1 from Marvin D. et al. (1975), *Nature (Lond.)*, **243**,

19-23, fig. 5. Part of Fig. 5.1 from KJug A. (1960). *Advances in Virus Research*,

vol. 7, p. 274.

Part of Fig. 5.1 from Wilson I. et al. (1981). *Nature*, **289**, 336. Fig. 6.1, 8.1 and 11.1 © I. Geis from Dickerson R.E., Geis I.

(1969). *The Structure and Action of Proteins*,

Benjamin/Cummings, Menlo Park, California. Fig. 9.1

© I. Geis from Cantor C.R., Schimmel P.R. (1980) *Biophysical Chemistry*, Part 1, fig. 2.23a, b, W.H. Freeman,

San Francisco. Fig. 10.1 © J.S. Richardson in Anfinsen C.B. et al. (eds.) (1981).

Advances in Protein Chemistry, vol. 34, figs. 73, 74, 77,

Academic Press, New York. Fig. 10.2 courtesy A.C.T. North from Imoto T. et al. (1972), fig. 2;

in Boyer P.D. (ed.). *The Enzymes*, vol. 7, 3rd edn., Academic

Press, New York.

Fig. 14.2 adapted from Johnson L.N. et al. (1968). *Structure Function and Evolution of Proteins*. Brookhaven Symposia in Biology, No. 2, Fig. 2.

Fig. 15.1. after Perutz M.F. (1978). Hemoglobin structure and respiration transport, *Scientific American*, **239**, No. 6, 80; and Baldwin J., Chothia C (1979). *J. of Molecular Biology*, **129**, 175-220, figs. 1.2.

Fig. 18.1 from Metzler D.E. (1977). *Biochemistry - the Chemical Reactions of Living Cells*, fig. 2.23a, Academic Press, New York.

Fig. 19.1 from Holbrook S.R. et al. (1978). *J. of Molecular Biology*, **123**, 631-660, fig. 4.

Part of Fig. 26.1 from Worcel A., Burgi E. (1972). *J. of Molecular Biology*, **71**, 127-147, fig. 12.

Part of Fig. 26.1 and 26.2 from Kornberg A. (1980). *DNA. Replication*, figs. 9.5 and 9.11, W.H. Freeman, San Francisco.

Part of Fig. 34. 1 from Henderson R. et al (1975). *Nature (Lond.)*, 257,28-31.

Fig. 37.1 after Stryer L. (1981). *Biochemistry*, 2nd edn., fig. 34.8, W.H. Freeman, San Francisco; and Cohen C (1975). The protein switch of muscle contraction, *Scientific American*, 233, No. 5, 39.

Fig. 39.1 part from Taylor D.L. et al. (1982). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, **299**, 185-197, fig. 4; and part from DePamphilis M.L., Adler J. (1971). *J. of Bacteriology*, **105**, 395, fig. 25.

Fig. 40.1 from Amzel L.M. et al. (1974). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **71**, 1427-1430, fig. 4.

Part of Fig. 41.1 from Schrader W.T. et al. (1981). In: Grcop Roy (ed.). *Recent Progression in Hormone Research*, vol. 37, p. 620, fig. 27, Academic Press, New York.

Fig. 43.1 from Quigley G.J. et al. (1980). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **77**, 7204-7208, figs 4, 6.

Другие материалы

Parts of table 44.1 and worked example from Price N.C., Dwek R.A. (1979). *Principles and Problems in Physical Biochemistry for Biochemists*, 2nd edn., Oxford University Press, Oxford.

Как пользоваться этой книгой

Каждая глава состоит из основного рисунка и объяснительного текста; иногда в тексте приводятся дополнительные рисунки меньшего размера. Вначале следует ознакомиться с основным рисунком, затем прочитать текст, а после этого вернуться к рисунку для более детального его рассмотрения. Коричневой краской выделены заголовки параграфов. Прописной шрифт, отмеченный коричневой краской, используется в тех случаях, когда впервые упоминается какой-

либо важный вопрос, который рассматривается в последующих параграфах. Для того чтобы подчеркнуть ключевые слова, которым иногда посвящены последующие параграфы, используется курсив. Если вам встретится непонятный термин, следует обратиться к предметному указателю. Наконец, для тех, кому захочется более детально ознакомиться с какой-либо темой, в конце книги приведен краткий список литературы.

1. Масштабы объектов молекулярной биологии

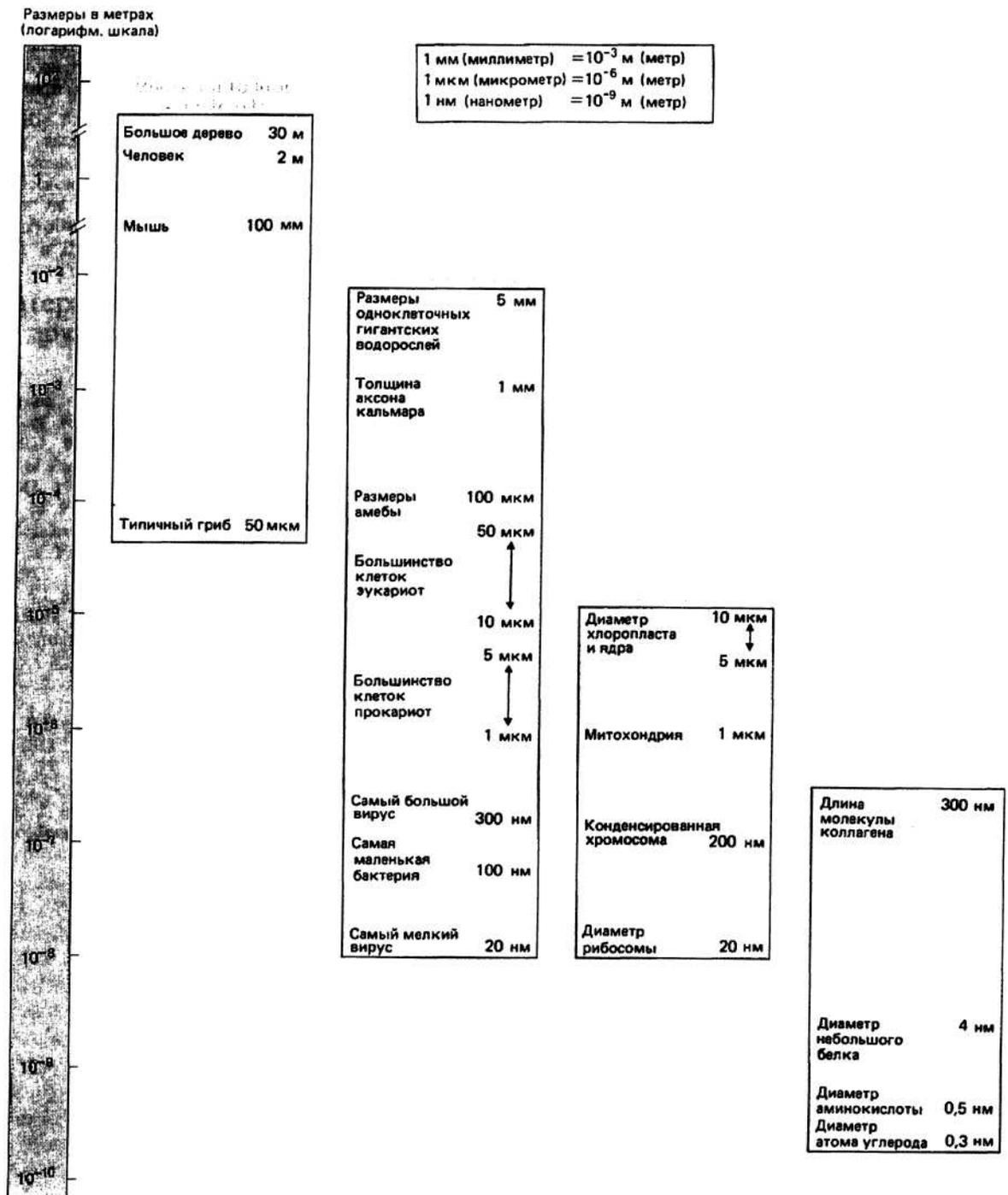


Рис. 1.1.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ согласно одному из возможных определений, — это раздел науки, изучающий функционирование живых организмов сквозь призму химической структуры входящих в их состав молекул и атомов. Самый крупный живой организм (например, дерево) достигает 30 м в своем наибольшем измерении, в то время как диаметр атома углерода составляет примерно 0,3 нм (т. е. $0,3 \cdot 10^{-9}$ м). Таким образом, отношение размеров живых организмов к размерам атомов может быть порядка 10^8 . Чтобы перекрыть весь этот диапазон, потребовались различные уровни организации: организм в целом, ткани, отдельные клетки, внутриклеточные (субклеточные) органеллы, макромолекулы, малые молекулы и, наконец, составляющие их атомы.

Живые организмы по типу составляющих их клеток можно разделить на *эукариот* (гл. 3) и *прокариот* (гл. 2). У эукариот геномная ДНК окружена ядерной оболочкой, т. е. эукариотические клетки имеют ядро, в то время как у прокариот отчетливо выраженное ядро отсутствует (в переводе с греческого *эу* примерно соответствует предлогу «с», *про* — предлогам «до, перед», а *кориос* означает ядро).

Многоклеточные организмы представляют собой организованную совокупность клеток. Основные группы таких организмов — это растения, животные, грибы и некоторые колониальные виды бактерий и синезеленых водорослей. В многоклеточных колониях прокариот все клетки одинаковы, тогда как в эукариотических организмах клетки различаются по форме и функциям, т. е. *дифференцированы*. И хотя размеры самого организма могут варьировать от 50 мкм (типичный представитель царства грибов) до 30 и более метров (высокое дерево), размеры составляющих их клеток на удивление близки друг к другу: их средний диаметр заключен в пределах от 10 до 50 мкм. Отмечены, впрочем, редкие исключения из этого правила для некоторых высокоспециализированных клеток: гигантский аксон кальмара (гл. 36) имеет толщину около 1 мм.

Одноклеточные организмы могут быть как эукариотами, так и прокариотами. Принадлежащая к эукариотам одноклеточная амеба (диаметр 100 мкм) в несколько раз крупнее большинства эукариотических клеток (10—15 мкм) многоклеточных растений и животных. По-видимому, одноклеточные прокариоты в основном меньше клеток эукариот: диаметр большинства из них составляет 1—5 мкм. Однако известны как чрезвычайно большие, так и очень маленькие клетки прокариот. [У одноклеточных *гигантских водорослей*, например, размеры клеток могут достигать 5 мм, а бактерия *пневмококк* имеет всего лишь около 100 нм (= 0,1 мкм) в диаметре.]

Клетка может быть определена как минимальная единица жизни, способная к самовоспроизведению. Все клетки содержат множества структурных единиц меньшего размера, называемых *органеллами*, которые выполняют специфические функции, например выра-

батывают энергию или приводят клетку в движение. Эти органеллы окружены со всех сторон жидкой цитоплазмой, а сама клетка отграничена от окружающей среды липидно-белковой оболочкой, которая называется клеточной мембраной.

Органеллы — это находящиеся в клетке субструктуры, которые выполняют те или иные специфические функции. Они служат для разделения клетки на области (или выделения внутри нее областей) с разными условиями и содержат разные наборы биологических молекул. Размеры органелл варьируют от 20 нм до 10 мкм. Наиболее крупные органеллы, такие как *ядра*, *митохондрии* и *хлоропласты*, обнаружены пока только в клетках эукариот; их диаметр примерно такой же, как у типичной прокариотической клетки (т. е. 1 — 10 мкм). Диаметр более мелких органелл, таких как *рибосомы* (которые обнаружены в клетках как эукариот, так и прокариот), составляет примерно 20 нм.

Гены заключают в себе информацию, однозначно определяющую структуру и функцию клетки. Все гены состоят из ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты), и каждая отдельная клетка может содержать многие тысячи таких генов. Последние, однако, присутствуют там не в виде отдельных фрагментов молекулы ДНК, а входят в состав более крупных структурных единиц, называемых *хромосомами*. Эти хромосомы копируются (или, как принято говорить, реплицируются; гл. 20, 21) в процессе деления клетки (гл. 29), и новые, дочерние, клетки получают точную копию набора родительских генов. Таким способом все особенности клетки передаются, или наследуются, от поколения к поколению.

Вирусы (гл. 4, 5) можно считать просто некоей совокупностью (ансамблем) макромолекул. Диаметр вирусной частицы составляет от 20 до 300 нм. Таким образом, вирусы значительно меньше самых мелких клеток и не способны к самовоспроизведению без действия синтезирующего аппарата клетки-хозяина. Вирусы можно также условно отнести к одному из двух типов на основе принадлежности клетки-хозяина к прокариотам или эукариотам. Размеры самых крупных вирусов, поражающих эукариот (например, вируса оспы), того же порядка (300 нм в диаметре), что и самых больших вирусов прокариот (например, бактериофагов типа T4). Это обусловлено тем, что далеко не все большие ансамбли макромолекул стабильны; это и налагает ограничения на максимальные размеры вирусных частиц.

Макромолекулы — белки (гл. 6—16), нуклеиновые кислоты (гл. 17—19) и полисахариды (гл. 31) — представляют собой гигантские молекулы, размеры которых варьируют от 3 до 300 нм. Одна из самых больших макромолекул — белок *коллаген* (гл. 11), компонент соединительной ткани: ее длина около 300 нм¹, длина же

¹Длина молекул ДНК в клетках эукариот может достигать несколько сантиметров. — *Прим. ред.*

большинства макромолекул лежит в диапазоне 4—20 нм. Однако агрегаты макромолекул (например, ДНК-белковые комплексы, из которых построена хромосома млекопитающих; гл. 26) могут представлять собой структуры гораздо более крупные, достигающие размеров вирусных частиц.

Малые молекулы как правило, имеют диаметр от 0,5 до 1 нм. Особенно важную роль в биологии играют три класса малых молекул — *аминокислоты* (гл. 6), *нуклеотиды* (гл. 17) и *моносахариды* (гл. 31). Они служат «кирпичиками», из которых строятся полимерные биологические макромолекулы (*белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды* соответственно). Поскольку диаметр молекулы типичного глобулярного белка, состоящего из 150 аминокислот, составляет всего лишь около 4 нм, совершенно очевидно, что аминокислотные остатки должны быть упакованы очень компактно, т. е. полимерная молекула должна быть свернута. Похожая, но менее плотная упаковка свойственна ДНК-белковым комплексам; напротив, в полисахаридах (гл. 31) расположение мономеров таково, что они образуют гораздо более вытянутые структуры.

Атомы углерода, кислорода, азота и водорода, из которых в основном и состоят биологические молекулы, имеют диаметр менее 0,4 нм. В каждом атоме есть ядро, состоящее из протонов (единственное исключение здесь — водород) и нейтронов; вокруг ядра, на разных расстояниях от него, вращаются электроны, причем расстояние до ядра однозначно задается энергией электрона. Поведение малых молекул определяется свойствами тех атомов, из которых они состоят. Поэтому разумно предположить, что исходя из атомных характеристик можно объяснить также поведение больших макромолекул. А поскольку органеллы, целые клетки и живые организмы представляют собой в сущности просто совокупности макромолекул, возможно, когда-нибудь в далеком будущем нам удастся построить атомную теорию жизни.

Структурные методы, применяемые в биологических исследованиях, включают микроскопию в видимом свете, электронную микроскопию и дифракцию рентгеновских лучей (на волокнах и кристаллах). *Световой микроскоп* позволяет различать линии или объекты, отстоящие друг от друга на расстояние 0,3 мкм и более (иначе говоря, имеет разрешение, или разрешающую способность, 0,3 мкм); таким образом, с его помощью можно получать сведения на уровне от больших органов до клеток. В *электронной микроскопии* вместо квантов света используются электроны, что позволяет различать объекты или линии, отстоящие друг от друга на расстояние 1 нм; этот метод используют для более детального изучения клеток и клеточных органелл. *Дифракция рентгеновских лучей на волокнах* позволяет идентифицировать периодические структурные особенности в волокнах биологических материалов, и обычно с ее помощью можно получать информацию о периодическом строении волокон вплоть до межатомных расстояний 0,3 нм (примером может служить структура двойной спирали ДНК; гл. 18). *Рентгеновская кристаллография* использует явление дифракции рентгеновских лучей на системах регулярно расположенных атомов в кристалле, в результате чего получается упорядоченная дифракционная картина; с ее помощью можно получать сведения о взаимном расположении атомов в молекуле с разрешением, достигающим 0,1 нм. Полезную информацию о форме и массе макромолекул и органелл (например, рибосом) часто можно получить с помощью ультрацентрифугирования, результаты которого выражают в виде коэффициента седиментации (в единицах Сведберга, S). Последний вычисляют согласно методике, изложенной в гл. 44. Таким образом, имеющиеся в распоряжении молекулярного биолога методы позволяют получать подробную структурную информацию по всему спектру биологических объектов, от клеток до атомов.

2. Прокариотическая клетка

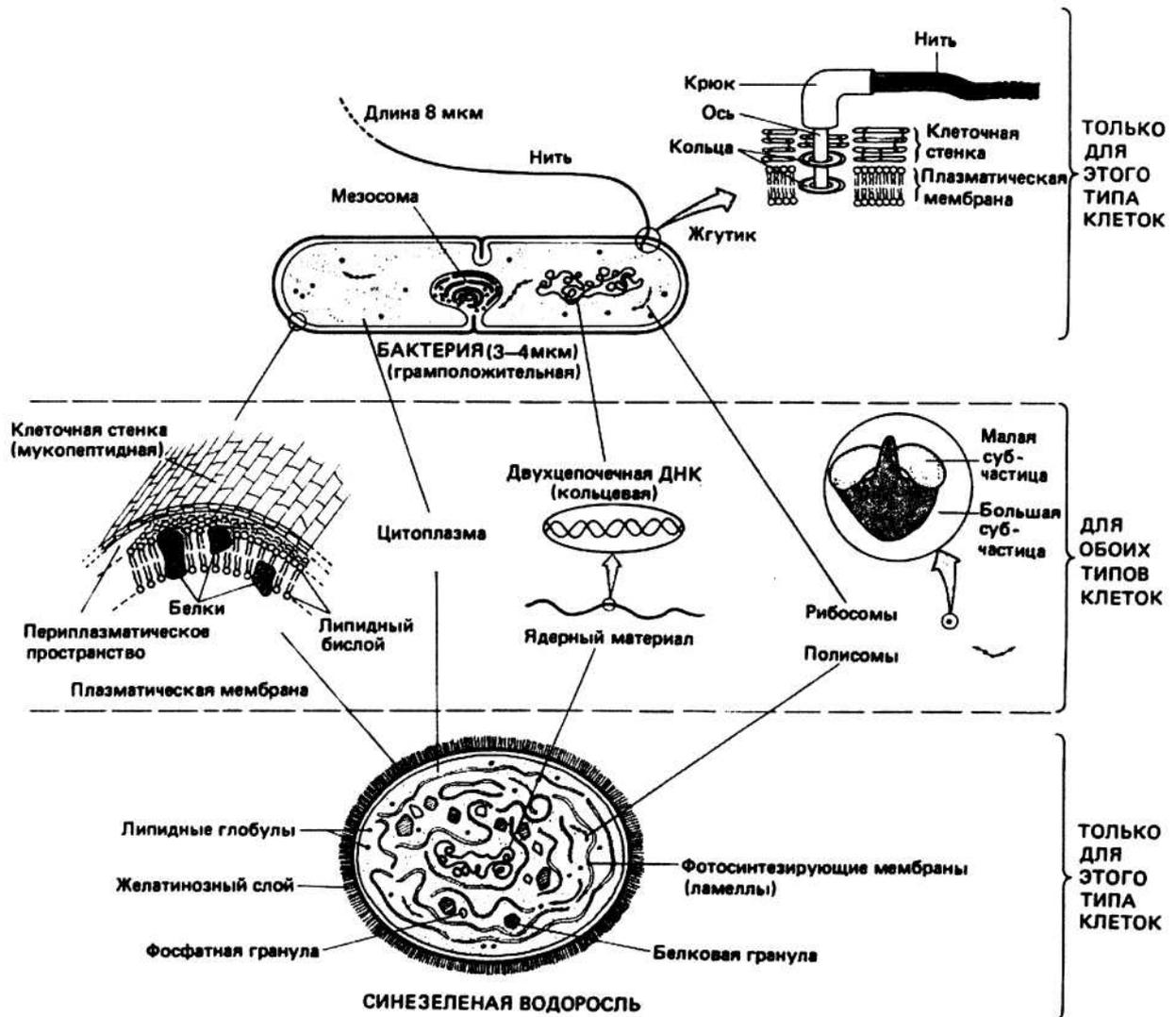


Рис. 2.1.

Прокариотическая клетка — простейший тип живой клетки (рис. 2.1). К прокариотам относятся такие одноклеточные организмы, как бактерии и синезеленые водоросли. Определяющей особенностью прокариотической клетки является наличие прямого контакта между ее хромосомой и цитоплазмой. Хромосомы эукариотической клетки, напротив, заключены в мембранную структуру — ядро. От эукариотических клеток (гл. 3) прокариоты отличаются, кроме того, отсутствием митохондрий и хлоропластов, меньшими размерами рибосом (их коэффициент седиментации 70S), а также весьма ограниченной — из-за наличия клеточной

стенки - способностью выделять и поглощать крупные молекулы.

Хромосома в прокариотической клетке всего одна. Она представляет собой непрерывный кольцевой тяж двухцепочечной ДНК. Молекула ДНК может достигать длины около 1 мм (например, у бактерии *E. coli*); в клетке она обычно туго скручена в компактную спиральную структуру (гл. 26). Существуют также внехромосомные ДНК-содержащие элементы — *плазмиды*. Это маленькие кольцевые структуры, несущие лишь по нескольку генов; некоторые из них могут кодировать такие ферменты, благодаря кото-

рым клетка становится устойчивой к различным антибиотикам.

Плазматическая мембрана клетки состоит из липидов и белков (гл. 34). Она служит полупроницаемым барьером, контролирующим перенос малых молекул и ионов в клетку и из клетки.

Мезосома представляет собой впячивание плазматической мембраны в цитоплазму. Она содержит многослойную мембранную систему, которая своей цитоплазматической стороной часто связана с ДНК. Считается, что мезосомы участвуют в клетке в двух разных процессах: они могут служить местом прикрепления ДНК (особенно во время репликации) и играть определенную роль в секреции.

Клеточная стенка расположена снаружи от плазматической мембраны и покрывает всю клетку. Она сообщает клетке жесткость, придает ей определенную форму, а также защищает ее от повреждения при осмотических и механических воздействиях. У бактерий клеточная стенка представляет собой жесткую сеть из липидов, полисахаридов и белков. В структурном отношении бактериальная клеточная стенка бывает в основном двух типов; в соответствии с этим бактерии разделяют на грамположительные и грамотрицательные (гл. 35). У синезеленых водорослей клеточная стенка построена из простых полисахаридов, таких как целлюлоза (гл. 31).

Желатиновый слой (гликокаликс) — самый наружный слой прокариотической клетки; чаще всего он встречается у синезеленых водорослей.

Жгутик — белковая органелла, отходящая от поверхности клетки в виде вытянутого отростка длиной от 1 до 20 мкм. С помощью жгутиков клетка перемещается в жидкой среде.

Рибосома (гл. 24) — сложная органелла, в которой осуществляется синтез белка. В связи с тем что бактерии размножаются с высокой скоростью, рибосомы могут составлять до 40% массы клетки. Рибосома — это комплекс молекул белков и рНК (рРНК), образующих почти сферическую частицу диаметром 20 нм. В рибосоме можно выделить две части — большую и малую субчастицы. Большая субчастица состоит из 34 разных белков, связанных с большой (23S) и малой (5S) молекулами рРНК. Малая субчастица содержит 21 белок и молекулу рРНК среднего размера (16S).

Энергия для процессов биосинтеза в прокариотической клетке поступает из двух основных источников. Первый — это нуклеозидтрифосфат, АТФ, который образуется в результате катализируемого группой ферментов гликолиза за счет энергии, содержащейся в молекулах такого рода питательных веществ, как глюкозы (например, глюкозы; гл. 17). Энергия, запасенная в АТФ, может затем использоваться множеством разных ферментов в анаболических (биосинтетических) процессах. Второй, самый важный источник энергии — это АТФ, синтезируемый с помощью группы белков, расположенных рядом друг с другом в

плазматической мембране и образующих так называемую цепь переноса электронов. Эта цепь, в конце которой происходит восстановление кислорода до воды, получает электроны от атомов водорода, продуцируемых в цикле Кребса при окислении кислотных субстратов. Образующиеся ионы H^+ «откачиваются» через бактериальную мембрану транспортными белками, в результате чего между вне- и внутриклеточным пространством возникает разность рН и электрического потенциала. Запасенная в таком электрохимическом градиенте свободная энергия используется для синтеза молекул АТФ в расположенных в мембране так называемых F1-частицах.

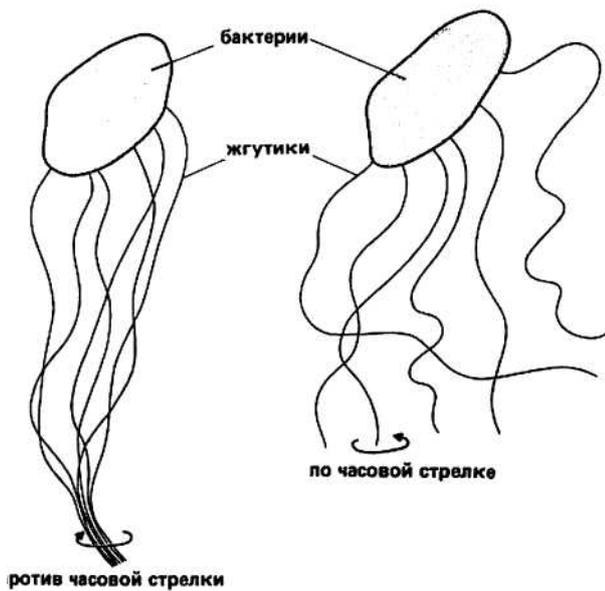
Фотосинтезирующие клетки, такие как синезеленые водоросли и фотосинтезирующие бактерии, производят энергию для метаболических процессов, поглощая энергию видимого света. У синезеленых водорослей фотосинтетические мембраны — ламеллы — содержат специальные пигменты, функция которых состоит в поглощении световой энергии и превращении ее в химическую для синтеза АТФ. Поскольку прокариотические водоросли способны использовать диоксид углерода в качестве единственного источника углерода, т.е. могут «фиксировать» углерод, включая его в сложные молекулы, их называют автотрофами.

Фотосинтезирующие бактерии содержат специальные белки, например бактериородопсин (гл. 34), расположенные в плазматической мембране и реагирующие на свет созданием протонного градиента путем перекачивания ионов H^+ через мембрану в одном направлении. Энергия возникающего таким образом электрохимического градиента используется затем для обеспечения синтеза АТФ. Эти бактерии отличаются, однако, от синезеленых водорослей тем, что они неспособны фиксировать CO_2 . Для осуществления биосинтеза они вынуждены извлекать углерод из уже существующих органических молекул, и по этой причине их называют гетеротрофами.

Транспорт малых молекул и ионов через плазматическую мембрану осуществляется особыми механизмами (гл. 38).

Эндоцитоз или поглощение белков и других макромолекул, находящихся в контакте с клеточной поверхностью, у прокариот происходит редко, однако у них возможен экзоцитоз.

Движение прокариот осуществляется с помощью жгутиков (гл. 39). Эти нитевидные отростки могут вращаться как по, так и против часовой стрелки. Вращением управляет сложное белковое образование, расположенное у основания жгутика. Отходящая от основания нить является полимером белка флагеллина. Клетка либо движется поступательно, либо как бы кувыркается на месте. У *E. coli* имеется небольшое число жгутиков, расположенных на одном конце клетки; тип движения клетки определяется направлением вращения ее жгутиков.



Размножение прокариот происходит неполовым путем. Каждая прокариотическая клетка делится на две в результате процесса, называемого митозом (гл. 29); с дочерними клетками происходит то же самое, и т. д.

Рис. 2.2. Когда жгутики вращаются в направлении против часовой стрелки (если смотреть с их конца в сторону тела клетки), они остаются «в фазе» друг с другом, и клетка движется по прямой. Если же жгутики вращаются по часовой стрелке, координация между ними быстро теряется, и движение клетки становится кувыркательным.

3. Эукариотическая клетка

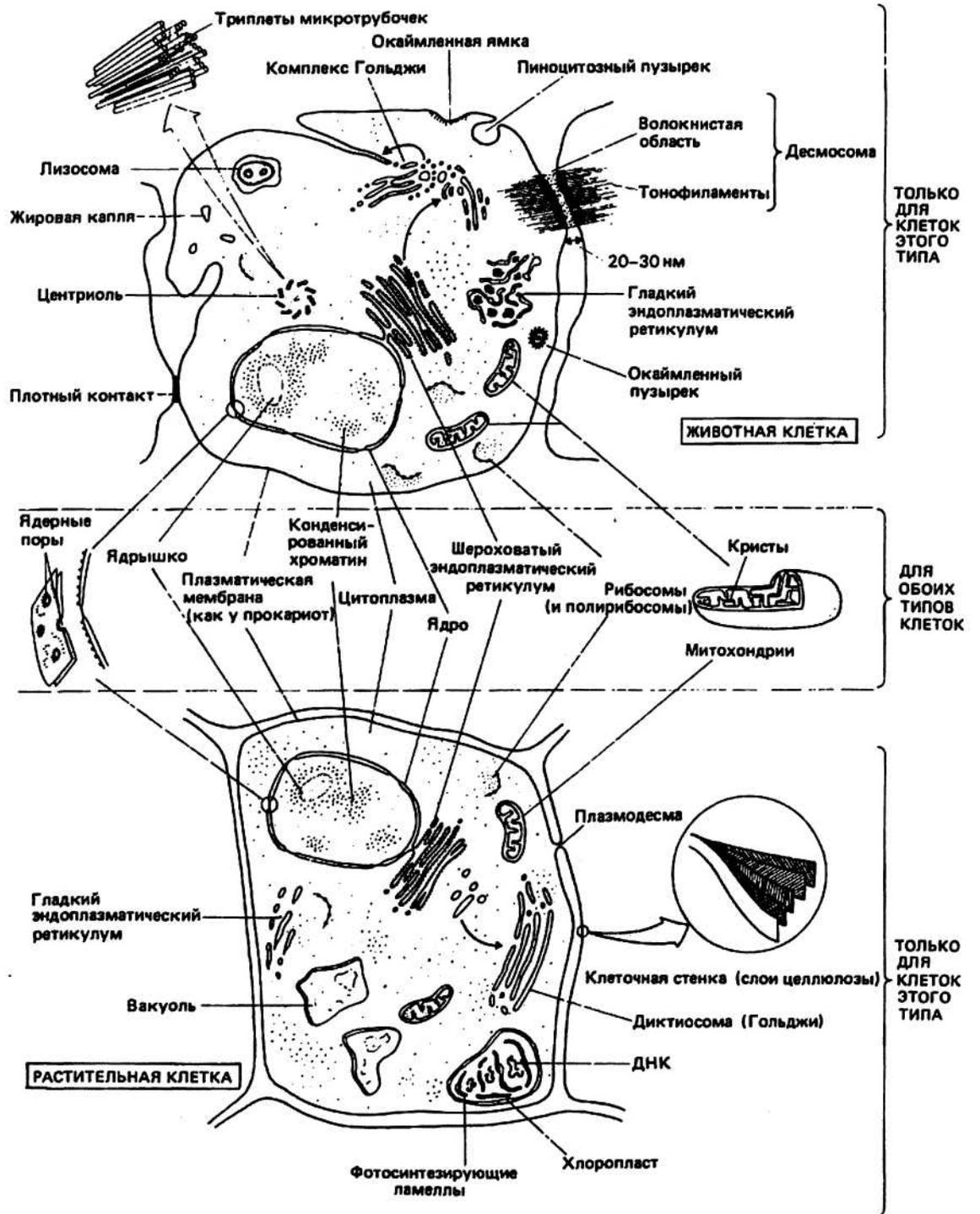


Рис. 3.1.

Эукариотическая клетка (рис. 3.1) обладает целым рядом структурных особенностей, которые отсутствуют в более простой, прокариотической клетке. Из эукариотических клеток состоят многие самые разнообразные организмы: высшие растения, многоклеточные животные, грибы и одноклеточные амёбы. Отдельные клетки из различных частей какого-либо высшего организма могут существенно отличаться друг от друга по морфологии и функции. По этой причине на представленной схеме отражены лишь главные черты большинства эукариотических клеток.

Ядро содержит нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), белки, а также небольшие молекулы и ионы, окруженные ядерной мембраной, состоящей из липидов и белков. Эукариотическая ДНК упакована в отдельные хромосомы, число которых варьирует в зависимости от вида (так, у человека в каждой диплоидной клетке 46 хромосом, а у огурца — 14).

Диплоидная клетка — это клетка, содержащая по две копии каждой хромосомы. Таким образом, в каждой клетке человека находится 23 пары хромосом, и диплоидное число их равно 46.

Гаплоидная клетка содержит только по одной копии каждой хромосомы, и, следовательно, гаплоидное число хромосом у человека равно 23.

Эукариотические хромосомы. ДНК в ядре обычно находится в комплексе с белками. Такие ДНК-белковые комплексы называются хроматином (гл. 26). Непрерывные нити хроматина, уложенные определенным образом, составляют хромосому. Приблизительно в центре каждой хромосомы имеется плотный, суженный участок, известный под названием центромеры. В этом месте хромосома прикрепляется к митотическому веретену во время деления (гл. 29).

Ядрышко представляет собой область внутри ядра, где локализованы гены, кодирующие три (28S, 16S и 5.8S) из четырех молекул рибосомных РНК. Плотная, волокнистая центральная зона ядрышка содержит ДНК-белковые комплексы; здесь происходит транскрипция генов рибосомных РНК.

Центриоли (обычно их две) лежат вблизи ядра. Каждая центриоль построена из цилиндрических элементов (микротрубочек), образованных в результате полимеризации белка *тубулина*. Девять триплетов микротрубочек расположены по окружности, как показано на рисунке. Центриоли принимают участие в формировании цитоплазматических микротрубочек (гл. 39) во время деления клетки и в регуляции образования митотического веретена. В клетках растений центриолей нет, и митотическое веретено образуется там иным способом.

Ядерная мембрана состоит из двух слоев, разделенных перинуклеарным пространством. По всей поверхности ядерной мембраны равномерно распределены ядерные поры. Так называемый поровый комплекс ядра имеет гранулярную структуру — белковые гранулы располагаются по границе округлого центрального

отверстия таким образом, что каждая гранула находится в вершине правильного восьмиугольника. Перенос веществ осуществляется главным образом через центральные области пор и происходит, по-видимому, как из ядра в цитоплазму, так и в обратном направлении.

Плазматическая мембрана эукариот, как и у прокариот, состоит из белков, углеводов и липидов. Она ограничивает полость, внутри которой помещаются клеточные компоненты. Некоторые органеллы, такие как *комплекс Гольджи*, напрямую связаны с поверхностью мембраны; другие же, как, например, *эндоплазматический ретикулум* (шероховатый и гладкий), непосредственно с плазматической мембраной не контактируют.

Клеточная стенка, имеющаяся только у растений, лежит снаружи от плазматической мембраны. Она состоит из большого числа слоев; каждый слой образован длинными цепями целлюлозных волокон. Такая структура придает клетке жесткость (гл. 31).

В **цитоплазме** эукариотических клеток можно выделить восемь структурных компонентов, объединенных под общим термином *органеллы*.

Эукариотическая рибосома, имеющая коэффициент седиментации 80S, крупнее своего прокариотического аналога, равно как и обе ее субчастицы: большая (60S) малая (40S) (гл. 24).

Гладкий эндоплазматический ретикулум (ГЭР) представляет собой систему гладких внутриклеточных мембран. В этой органелле локализованы многие ферменты (в частности, оксидазы), катализирующие реакции обезвреживания ядовитых веществ. Помимо этого, на мембранах ГЭР протекают синтез липидов, а также гидролитическое расщепление гликогена (гликогенолиз).

Шероховатый эндоплазматический ретикулум (ШЭР) — это тоже система внутриклеточных мембран, которые выглядят шероховатыми из-за прикрепленных к ним многочисленных рибосомных частиц. Часть ШЭР находится в прямом контакте с ядерной мембраной. На мембранах ШЭР синтезируются белки, предназначенные либо для секреции во внеклеточную среду, либо для включения в плазматическую мембрану.

Комплекс Гольджи представлен собранными в стопки дисковидными мембранами и связанными с ними многочисленными пузырьками. Эта органелла располагается обычно между ШЭР и плазматической мембраной. Здесь происходит модификация белков (например, гликозилирование), предназначенных для секреции во внеклеточную среду или для включения в плазматическую мембрану. На рисунке стрелками показан путь белков из ШЭР к комплексу Гольджи и в конечном итоге к плазматической мембране.

Диктиосома, обнаруженная у растений, выполняет ту же самую функцию, что и комплекс Гольджи у животных. По-видимому, она принимает участие также в синтезе и секреции компонентов клеточной стенки.

Митохондрия — это палочкообразная органелла диаметром около 1 мкм и длиной до 7 мкм. Она имеет двойную мембрану, разделяющую ее на два компартмента. Область, ограниченная складчатой внутренней мембраной (складки называются кристами) и известная под названием митохондриального матрикса, содержит рибосомы и митохондриальную ДНК — кольцевую двухцепочечную молекулу, кодирующую некоторые митохондриальные белки. Во внутренней мембране локализован фермент, ответственный за синтез АТР, — так называемый F1-комплекс. В компартменте, заключенном между наружной и внутренней мембранами, находятся субстраты, ферменты и некоторые метаболиты. Число митохондрий в одной-единственной клетке может достигать нескольких тысяч.

Хлоропласт — это органелла, по размерам (5—10 мкм в диаметре) примерно такая же, как эритроцит, а по форме напоминающая двояковыпуклую линзу. Он представляет собой комплекс мембран: двойной наружной и складчатых внутренних, организованных в виде стопок дисков. Эти диски, называемые тилакоидами, содержат компоненты фотосинтезирующего аппарата.

Цитоскелет — обязательный компонент всех эукариотических клеток (гл. 39) — представляет собой сложную сеть филаментов, пересекающих клетку в различных направлениях (на рисунке не изображен).

Секреции белков предшествует последовательность событий, начинающихся с переноса белковой цепи, синтезированной на рибосомах, во внутреннюю полость ШЭР, которая называется цистерной. После этого белок в составе специфических везикул транспортируется в комплекс Гольджи, откуда выделяется во внеклеточную жидкость. Мембранные белки, предназначенные для включения в плазматическую мембрану, лишь частично входят в цистерну ШЭР. Основная часть белковой цепи остается каким-то образом связанной с мембраной ШЭР. Фрагмент белка, обращенный в сторону цистерны ШЭР, может быть частично гликозилирован, т. е. с помощью специальных ферментов к нему могут быть присоединены молекулы Сахаров. Как и в случае секретируемых полипептидов, белок переносится затем в комплекс Гольджи, где

завершается гликозилирование и происходят другие модификации. Процесс заканчивается транспортом белка к плазматической мембране.

Энергия в эукариотических клетках вырабатывается в цитоплазме и митохондриях (у животных и растений) или в хлоропластах (только у растений) и запасается в молекулах нуклеозидтрифосфата, АТР. Эта молекула является наиболее универсальным источником энергии, хотя в некоторых реакциях могут использоваться и другие нуклеозидтрифосфаты, например GTP. АТР образуется в цитоплазме в результате разнообразных катаболических процессов, таких как гликолиз, а энергия, запасенная в трифосфатной группе, расходуется в ходе биосинтетических (анаболических) реакций. Основное место синтеза АТР у животных — это митохондрия, а у растений — хлоропласт.

Межклеточные контакты. Соединения между эукариотическими клетками образуются за счет специальных участков плазматической мембраны или клеточной стенки, называемых межклеточными контактами. В качестве примеров межклеточных контактов можно назвать десмосому, плотный контакт и плазмодесмы.

Транспорт веществ через плазматическую мембрану эукариотических клеток осуществляется с помощью различных механизмов (гл. 38).

Термин **половое размножение** применительно к высшим растениям и животным означает, что новый организм развивается из одной-единственной клетки (зиготы), образовавшейся при слиянии двух гамет, каждая из которых представляет собой гаплоидную клетку. Так, у человека зигота — это продукт слияния мужской половой клетки, сперматозоида, и женской половой клетки, яйцеклетки.

Митозом называется такой процесс деления диплоидной клетки (гл. 29), когда в результате появляются две идентичные и тоже диплоидные клетки. Это нормальный способ воспроизведения эукариотических клеток.

Мейоз — это особый тип деления, приводящий к образованию двух гаплоидных клеток из одной диплоидной и сопровождающийся, следовательно, уменьшением числа хромосом. Этому делению подвергаются те клетки, из которых формируется следующая генерация гамет, или половых клеток.

4. ДНК-содержащие вирусы

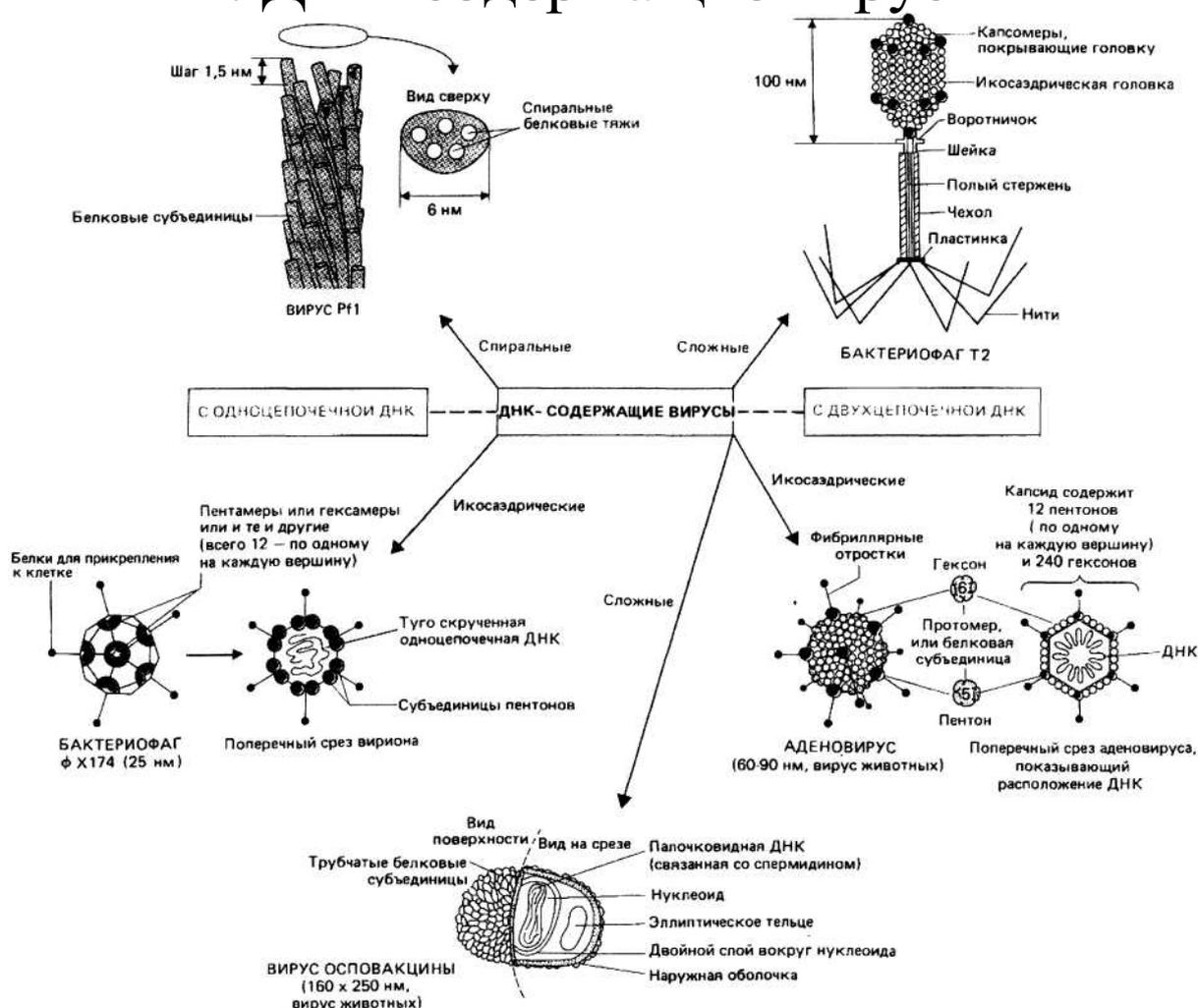


Рис. 4.1.

ВИРУСЫ — частицы, содержащие нуклеиновые кислоты, белки, а иногда и липиды и способные размножаться лишь в клетке-хозяине. Вне клетки вирусы не могут реплицироваться, поскольку у большинства из них нет ферментов, необходимых для полного воспроизведения зрелой вирусной частицы. Диаметр вирусных частиц (их называют также вирионами) равен 20—300 нм. Таким образом, они намного меньше, чем даже мельчайшие из прокариотических клеток. Так как размеры белков и некоторых нуклеиновых кислот находятся в диапазоне 2—50 нм, вирусную частицу можно было бы считать просто комплексом макромолекул. Вследствие их малых размеров и неспособности к самовоспро-

изведению вирусы часто относят к разряду «неживого».

ДНК-СОДЕРЖАЩИЕ ВИРУСЫ несут в качестве генетического материала либо одно-, либо двухцепочечную ДНК, которая может быть как линейной, так и кольцевой. В ДНК закодирована информация обо всех белках вируса. Вирусы классифицируют в зависимости от того, одно- или двухцепочечная у них ДНК и про- или эукариотической является клетка-хозяин. Вирусы, заражающие бактерии, называются бактериофагами.

Структура вируса в принципе такова: это молекула ДНК в белковой «обертке», называемой капсидом. Существует, однако, множество разных вариантов

строения вирусов — от просто покрытой белком ДНК (например, бактериофаг РП) до сложных макромолекулярных комплексов, окруженных мембранными структурами (например, вирус оспы). Если у вируса есть мембрана, говорят, что он в оболочке, а если мембраны нет, вирус называют «раздетым». Различают четыре основных класса капсидов ДНК-содержащих вирусов: спиральные, икосаэдрические, сложные без оболочки, сложные с оболочкой.

Спиральные капсиды обычно встречаются у нитевидных вирусов. Они образуются путем самосборки асимметричных белковых субъединиц (капсомеров), объединяющихся в трубчатую структуру со спиральной симметрией (например, у РП). Субъединицы в большинстве случаев гомогенны, так что поверхность вириона состоит из множества копий одного и того же белка, хотя под наружным капсидом могут находиться и другие белки. ДНК в таких вирусах либо вытянута, либо может быть туго скручена в комплексе со специальными связывающими белками (гл. 26).

Икосаэдрические капсиды свойственны большинству сферических ДНК-содержащих вирусов. Икосаэдр — это многогранник с двадцатью треугольными гранями, имеющий кубическую симметрию и приблизительно сферическую форму. Вершины треугольников, соединяясь, образуют соответственно двенадцать вершин икосаэдра; в местах соединения располагаются обычно пентамерные белковые структуры — пентоны; там же могут находиться участки, на которых формируются белковые нити, нередко ассоциированные с вершинами (например, у ф X174 — см. рис. 4.1). Грани икосаэдра заполнены другими белковыми субъединицами, сгруппированными обычно в гексамерные структуры — гексоны (например, у аденовируса — см. рис. 4.1). Количество субъединиц, необходимое для заполнения граней, определяется размерами вириона в целом, и разные икосаэдрические вирусы содержат

поэтому разное число гексонов — обычно при неизменном числе пентонов. ДНК обычно плотно свернута внутри капсида; иногда она связана с белками или полипептидами, способными стабилизировать ее структуру.

Сложные капсиды без оболочки типичны для бактериофагов: они состоят из частей с разными типами симметрии. У бактериофага Т2, например, ДНК находится в икосаэдрической головке, а для «узнавания» бактерии и введения в нее ДНК служат трубчатые и фибриллярные структуры (в узнавании участвует также лизоцим, расположенный на дистальном конце хвостового отростка).

Сложные капсиды с оболочкой есть только у вирусов эукариотических клеток. Они свойственны многим вирусам с нуклеоидом, состоящим из ДНК-белковых комплексов. Эти комплексы окружены одним или несколькими белковыми слоями, имеющими либо икосаэдрическую, либо нерегулярную симметрию, и наружной мембраной, почти все белковые компоненты которой являются по своему происхождению вирусными, а липидные структуры — клеточными.

Инфицирование — процесс, посредством которого вирус внедряется в клетку-хозяина и «настраивает» ее метаболический аппарат на воспроизведение вирионов. Зараженные вирусом клетки либо остаются живыми (в этом случае говорят, что вирус неvirulent), либо подвергаются лизису, приводящему к высвобождению вирусных частиц. Неземным игом заражения клеток ДНК-содержащими бактериофагами является лизис. ДНК-содержащие вирусы животных вызывают лизис редко; клетки, однако, могут погибнуть из-за возникших при заражении хромосомных повреждений, вследствие иммунологической реакции организма или просто в результате нарушения вирусом нормальных клеточных функций.



Рис. 4.2. Обобщенная схема размножения ДНК-содержащих вирусов.

Размножение вируса — четко очерченный цикл, приводящий в конечном счете, после синтеза новых молекул вирусных белков и большого числа копий вирусной ДНК, к формированию зрелых вирусных частиц. Хотя детали этого процесса могут различаться у разных ДНК-содержащих вирусов, по существу он универсален. У вирусов бактерий весь цикл может завершаться менее чем за час, тогда как у многих вирусов животных он занимает не один день.

Адсорбция вируса на клетке-хозяине — первый этап инфицирования. Она происходит на специфических рецепторных участках (белковых или липидных) клеточной поверхности, которые узнаются особыми выступающими частями вириона и к которым он прочно прикрепляется. У вирусов без оболочки такими частями могут быть белковые отростки (например, у аденовируса и бактериофага Т2), а у вирусов с оболочкой это, как правило, белки, погруженные в вирусную мембрану. В процессе адсорбции осуществляются, в частности, такие белок-белковые взаимодействия, результатом которых является инициация стадии *проникновения* ДНК в клетку.

Проникновение вирусной ДНК в клетку-хозяина происходит у разных вирусов по-разному. ДНК многих бактериофагов (например, бактериофага Т2) попадает в клетку, как предполагается, следующим образом: белковый стержень сплющивается, подобно телескопической конструкции, и ДНК «вспрыскивается» в бактерию. Из вирусов животных ДНК обычно переходит в клетку в результате как бы слияния наружного слоя вириона с клеточной мембраной. Это легко себе представить для вирусов с оболочкой: должно произойти просто слияние мембран; в случае же вирусов без оболочки все не столь ясно. В отличие от ДНК большинство бактериофагов ДНК вирусов животных всегда входят в клетку вместе с непосредственно прилегающими к ней белками; последующее освобождение ДНК от этих белков осуществляется с помощью ферментов.

Для понимания процессов, описываемых ниже, читателю, возможно, понадобится изучить сначала часть III этой книги.

Транскрипция и репликация генетического материала вируса осуществляются обычно с участием фер-

ментов клетки-хозяина. Сначала вирусная ДНК копируется РНК-полимеразами клетки-хозяина, в результате чего образуется мРНК, которая затем транслируется (гл. 25). На некоторых молекулах вирусной ДНК синтезируются также ее ДНК-копии — с помощью либо клеточной, либо кодируемой вирусом ДНК-полимеразы (гл. 20). Эти ДНК-копии используются впоследствии при сборке вирусных частиц. В некоторых случаях, например у бактериофага Т4, первые же новосинтезированные молекулы вирусной мРНК транслируются с образованием специальных белков, модифицирующих полимеразы клетки-хозяина таким образом, что те прекращают транскрипцию клеточных генов, не теряя при этом способности транскрибировать вирусные. В какой части клетки протекают процессы транскрипции и репликации вирусной ДНК: в ядре или в цитоплазме? Для бактериофагов такой дилеммы не существует; что же касается ДНК-содержащих вирусов животных, то, по-видимому, ни та, ни другая локализация не является для этой группы вирусов единственно возможной: у одних транскрипция и репликация происходят в ядре клетки-хозяина (например, у вируса герпеса), а у других — в цитоплазме (например, у поксвирусов).

Трансляция вирусной мРНК на рибосомах клетки-хозяина приводит к образованию вирусных белков. Некоторые из этих белков используются затем для построения капсидов, другие связываются с вирусной ДНК, вероятно, стабилизируя ее (у многих вирусов животных), а третьи, хотя и не войдут никогда в состав зрелых вирионов, участвуют в процессе их сборки в качестве ферментов (например, у бактериофага Т2).

Сборка вируса из его компонентов в клетке-хозяине может происходить спонтанно (и тогда она называется самосборкой), но может и зависеть от участия вспомогательных белков. Вирусная ДНК обычно покрывается слоем белка — капсидом. Капсид в свою очередь может заключаться в мембранную структуру, получаемую вирионом обычно от клетки-хозяина: покидая клетку путем отпочковывания от нее, вирусная частица оказывается окруженной плазматической мембраной.

5. РНК-содержащие вирусы

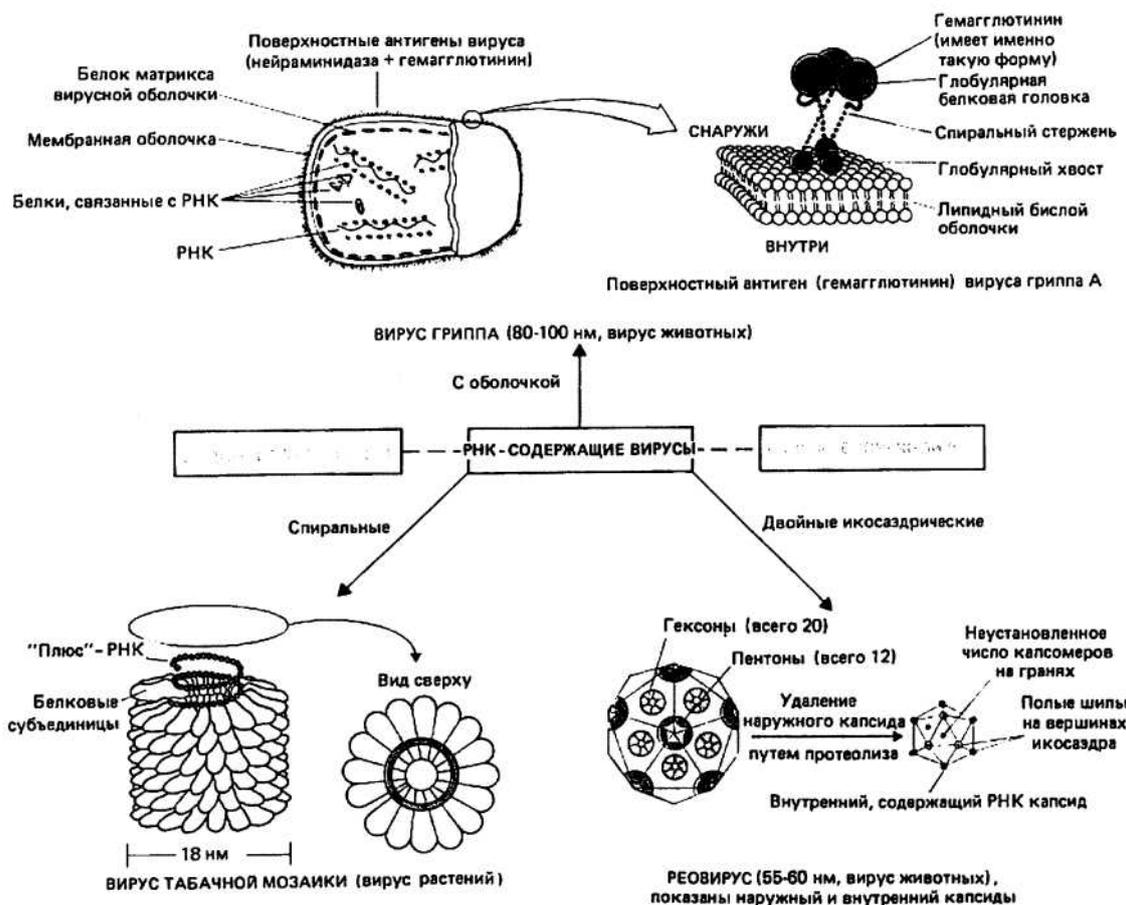


Рис. 5.1.

РНК-СОДЕРЖАЩИЕ ВИРУСЫ не имеют ДНК; генетическая информация этих вирусов закодирована в РНК. РНК может быть одно- или двухцепочечной, а клетка-хозяин — про- или эукариотической. Только вирусы с одноцепочечной РНК заражают бактерии, тогда как вирусы растений и животных могут быть как одно-, так и двухцепочечными.

Вирусы с двухцепочечной РНК заражают как растения, так и животных. Например, вирус колорадской клещевой лихорадки и вирус карликовости риса заражают соответственно насекомых и растения. Эти вирусы содержат РНК в сегментированной форме: в виде некоторого числа двухцепочечных фрагментов.

Вирусы с одноцепочечной РНК можно разделить на два типа: с «плюс»-цепью и «минус»-цепью. У вирусов первого типа цепь РНК может функционировать в клетке-хозяине непосредственно как мРНК, тогда как у вирусов второго типа на «минус»-цепи долж-

на сначала с помощью клеточных РНК-полимераз образоваться «плюс»-цепь. Вирусы животных бывают как первого, так и второго типов, а большинство вирусов растений относится к «плюс»-типу. Особый класс «плюс»-одноцепочечных вирусов образуют ретровирусы, которые способны заражать только клетки животных. Они отличаются от других РНК-содержащих вирусов тем, что имеют диплоидный геном, состоящий из двух идентичных «плюс»-цепей РНК. В качестве примеров одноцепочечных РНК-содержащих вирусов ниже будут рассмотрены *вирус гриппа*, *вирус табачной мозаики* и *ретровирусы*.

РЕОВИРУСЫ — это икосаэдрические вирусы без оболочки, белковый капсид которых состоит из двух слоев — наружного и внутреннего. Внутри капсида находятся 10 или 11 сегментов двухцепочечной РНК.

Инфекционный процесс начинается с проникновения в клетку РНК и затем протекает в соответствии со схемой 1 (см. рис. 5.2). После частичного разруше-



Рис. 5.2. Обобщенная схема размножения РНК-содержащих вирусов.

ния наружного капсида ферментами лизосом РНК в образовавшейся таким образом субвирусной частице транскрибируется, ее копии покидают частицу и соединяются с рибосомами. Затем в клетке-хозяине продуцируются белки, необходимые для формирования новых вирусных частиц.

Репликация РНК вирусов происходит по консервативному механизму - в отличие от репликации у ДНК-содержащих организмов, которая полуконсервативна (гл. 20). Одна из цепей каждого сегмента РНК служит матрицей для синтеза большого числа новых «плюс»-цепей. На этих «плюс»-цепях образуются затем как на матрице «минус»-цепи; «плюс»- и «минус»-цепи при этом не расходятся, а остаются вместе в виде двухцепочечных молекул. Сборка новых вирусных частиц из новообразованных «плюс»- и «минус»-сегментов и капсидных белков связана каким-то образом с митотическим веретеном клетки-хозяина, однако точно механизм сборки не известен.

ВИРУС ГРИППА является примером вируса с «минус»-одноцепочечной РНК. У него есть оболочка и спиральная сердцевина. Последняя состоит из восьми сегментов «минус»-РНК, которые в комплексе с белками образуют спиралевидные структуры. Каждый сегмент кодирует один из белков вируса. В наибольшем количестве вирус содержит белок матрикса, располагающийся на внутренней стороне оболочки и придающий ей стабильность. Все белки оболочки кодируются вирусной РНК, тогда как липиды являются по своему происхождению клеточными (см. «ДНК-содержащие вирусы», раздел «Сборка»). Основные белки оболочки — гемагглютинин и нейраминидаза.

Инфекционный процесс, протекающий по схеме 1 (см. рис. 5.2), начинается с прикрепления вируса к поверхности клетки-хозяина через гемагглютинин. Затем происходит слияние оболочки с клеточной мембраной, нуклеопротеиновая сердцевина (нуклеокап-сид) входит в клетку, и кодируемая вирусом РНК-зависимая РНК-полимераза синтезирует «плюс»-цепи мРНК на вирусных «минус»-цепях, после чего на рибосомах клетки-хозяина продуцируются вирусные белки. Некоторые из этих белков играют важную роль в репликации вирусного генома.

Репликация происходит в ядре, где с помощью той же, но, вероятно, модифицированной РНК-полимераза образуются «минус»-цепи РНК. После того как в ядро поступают нуклеокапсидные белки, происходит сборка нуклеокапсида. Затем нуклеокапсид проходит через цитоплазму, присоединяя по пути белки оболочки, и покидает клетку, отпочковываясь от ее плазматической мембраны. Считается, что в процессе отпочковывания принимает участие нейраминидаза.

ВИРУС ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ - пример «плюс»-одноцепочечного вируса растений. Этот не имеющий оболочки спиральный вирус содержит 2130 идентичных молекул белка капсида и одну цепь РНК. РНК располагается в спиральном желобке, образованном белковыми субъединицами, и удерживается многочисленными слабыми связями.

Инфекционный процесс, протекающий по схеме 1 (см. рис. 5.2), состоит в проникновении вируса в растительную клетку с последующей быстрой утратой им капсида. Затем в результате трансляции непосредственно «плюс»-цепочечной вирусной РНК рибосома-

ми клетки-хозяина образуются несколько белков, часть которых необходима для репликации вирусного генома.

Репликация осуществляется РНК-репликазой, продуцирующей копии РНК для новых вирионов. Синтез белка капсида происходит только после того, как инфицировавшая клетку РНК подвергается некоторой модификации, делающей возможным присоединение рибосом клетки к тому участку РНК, которым кодируется этот белок. Сборка вириона начинается с образования дисков из белка капсида. Два таких белковых диска, располагаясь концентрически, образуют похожую на бисквит структуру, которая после связывания с ней РНК приобретает форму спирали. Последующее присоединение молекул белка продолжается до тех пор, пока РНК не будет покрыта полностью. В своей окончательной форме вирион представляет собой цилиндр длиной 300 нм.

РЕТРОВИРУСЫ относятся к «плюс»-одноцепочечным РНК-содержащим вирусам животных; почти все они являются онкогенными. У ретровирусов есть оболочка и икосаэдрическая сердцевина, содержащая две идентичные молекулы «плюс»-цепочечной РНК.

Инфекционным процесс начинается с проникновения вируса в клетку, происходящего в соответствии со схемой 1 (см. рис. 5.2), но в дальнейшем протекает по схеме 2. После высвобождения РНК в цитоплазме

клетки-хозяина РНК-зависимая ДНК-полимераза, кодируемая вирусным геномом, синтезирует на «плюс»-цепях РНК «минус»-цепи ДНК. Затем рибонуклеиновая цепь в РНК/ДНК-гибриде разрушается, и на «минус»-цепи ДНК как на матрице образуется «плюс»-цепь ДНК. Получившаяся в результате двухцепочечная ДНК перемещается в ядро клетки-хозяина и встраивается там в клеточную ДНК.

Репликация ретровирусов происходит в процессе обычной, осуществляемой клеткой транскрипции клеточной ДНК, в которую теперь встроен вирусный геном. Параллельно идет синтез вирусных белков, которые вместе с копиями РНК, синтезированными транскрибирующими ферментами клетки-хозяина, формируют новые вирионы, отпочковывающиеся затем через плазматическую мембрану. Нередко в результате заражения ретровирусом изменяется характер роста клеток, и по своему поведению они начинают походить больше на опухолевые, чем на нормальные клетки: их рост становится быстрым и намного менее зависимым от поступающих извне стимуляторов, таких как гормоны или факторы роста. В настоящее время уже известно, что определенные гены ретровирусов кодируют белки, способные поддерживать клетки в таком состоянии, когда они более или менее непрерывно делятся (гл. 29). Выделение и идентификация этих белков будут способствовать пониманию механизма опухолевого роста.

6. Первичная структура белков

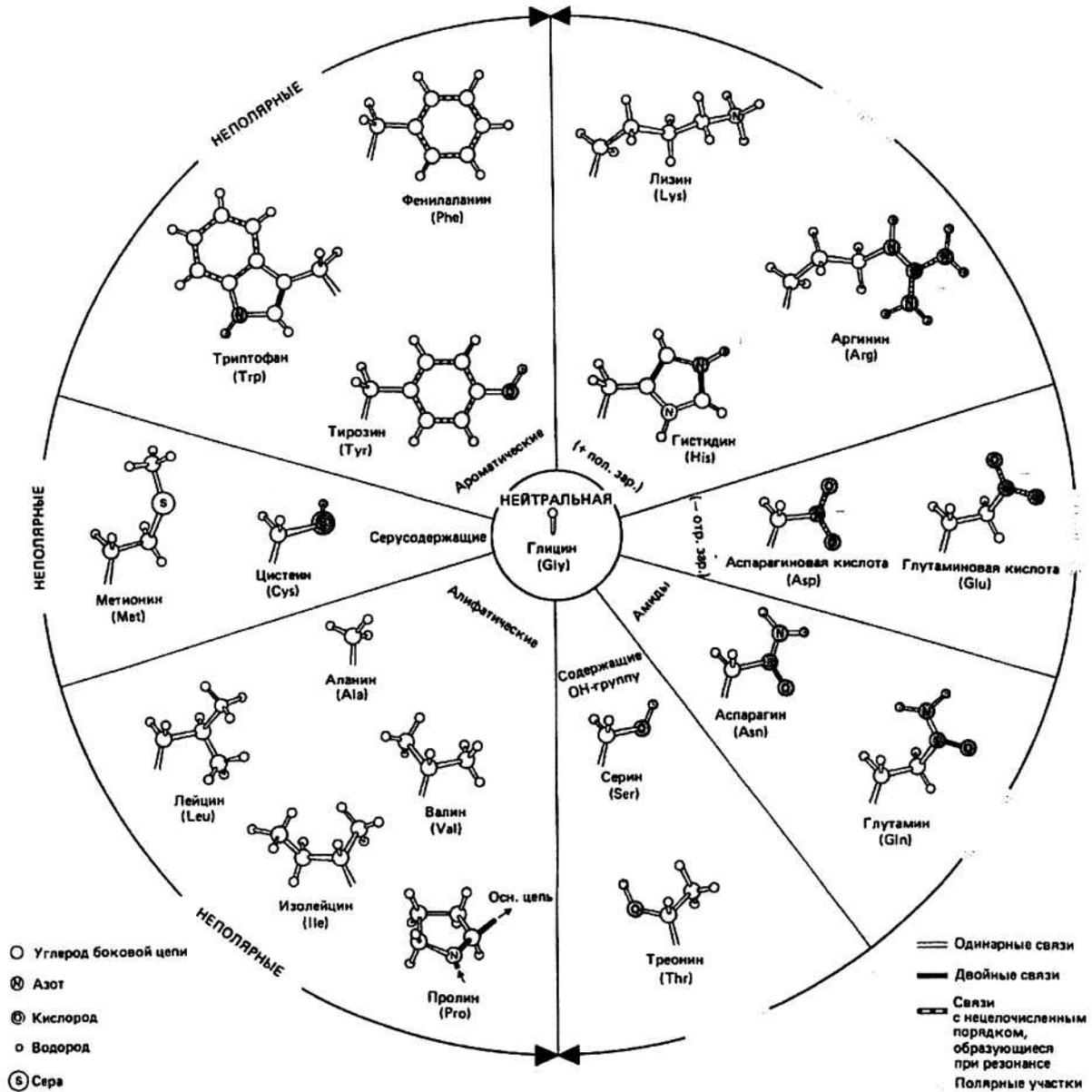


Рис. 6.1. Двадцать наиболее часто встречающихся боковых цепей.

Белки — один из основных классов биологических макромолекул. Широкий диапазон выполняемых ими функций находит отражение в огромном разнообразии их химических структур и пространственных форм. *Глобулярные белки*, которые в грубом приближении могут быть представлены в виде сфер, принимают участие в специфических процессах, таких как катализ (гл. 12, 13, 14), транспорт (гл. 15) или регуляция (гл. 28). *Фибриллярные белки* (гл. 11), например коллаген,

кератин и фиброин шелка, сильно вытянуты и из-за присущей им эластичности или жесткости часто играют структурную роль.

Четыре уровня структурной организации белков

При описании того или иного белка обычно пользуются терминами *первичная*, *вторичная*, *третичная* и *четвертичная структура*. Под первичной структурой понимают химическую формулу белка, изображаемую в виде линейной последовательности аминокислот-

ных остатков. Терминами вторичная, третичная и четвертичная структура обозначают различные уровни организации этой линейной последовательности в пространстве (гл. 9, 10).

Аминокислотные остатки, последовательно соединенные друг с другом, являются главными компонентами белков. Каждый остаток имеет константную (т. е. одинаковую для всех остатков) часть и, за исключением двух концевых остатков, связан с двумя другими таким образом, что формируется непрерывная, неразветвленная цепь, которая называется основной цепью белковой молекулы. К каждому ос-угле-родному атому (с-углероду, или С^α) основной цепи присоединены переменные части аминокислотных остатков (боковые, или R-группы). В белках, как правило, встречается 20 разных R-групп.

Свободная аминокислота отличается от аминокислотного остатка наличием дополнительного атома водорода на одном конце (а следовательно, присутствием аминогруппы —NH₂) и дополнительной гидроксильной группы (—OH) на другом конце (а следовательно, наличием —COOH, или карбоксильной группы) (рис. 6.2).

Пептидная связь образуется в результате реакции конденсации между аминогруппой одной свободной аминокислоты и карбоксильной группой другой (или между аминогруппой свободной аминокислоты и карбоксильным концом полипептида). При этом выделяется вода. Таким образом, свободные аминокислоты представляют собой мономеры, из которых путем поликонденсации строится полимер — молекула белка.

Полипептидная связь синтезируется в результате повторяющихся актов образования пептидной связи.

На одном конце цепи находится свободная —NH₂-группа (это N-конец), а на другом — свободная —COOH-группа (это С-конец).

Аминокислотной последовательностью называется порядок расположения остатков вдоль полипептидной цепи. Обычно в белковых молекулах насчитывается 40 или более остатков, хотя встречаются полипептиды, состоящие из 1000 и более аминокислотных остатков. Значительная вариабельность последовательностей обеспечивает большое разнообразие структур и функций белков. Поскольку полипептиды построены в основном из 20 разных аминокислот, для белка, содержащего 100 остатков, возможно 20¹⁰⁰ (т. е. примерно 10¹³⁰) различных вариантов последовательности.

Классификация боковых групп основана на различии их свойств в обычных физиологических условиях, т. е. при pH около 7. *Полярные отрицательно заряженные* — Asp⁻ и Glu⁻ — имеют отрицательно заряженную COO-группу. Будучи в COOH- (т. е. в протонированной) форме, они могут вести себя как кислоты. *Полярные положительно заряженные* — Arg⁺, His⁺ и Lys⁺ — несут положительный заряд вследствие протонирования атома азота. В депротонированной форме они могут проявлять свойства оснований. У *полярных незаряженных* — Asn, Gin, Ser и Thr — имеются поляризованные ковалентные связи и, следовательно, электроотрицательные и электроположительные участки. *Неполярные, или гидрофобные*, — Ala, Cys, He, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Tug и Val — содержат объемные алифатические или ароматические углеводородные цепи. Гидрофобные свойства Cys, Trp и Tug слегка ослабляются из-за наличия полярных групп (—SH, >NH и —OH

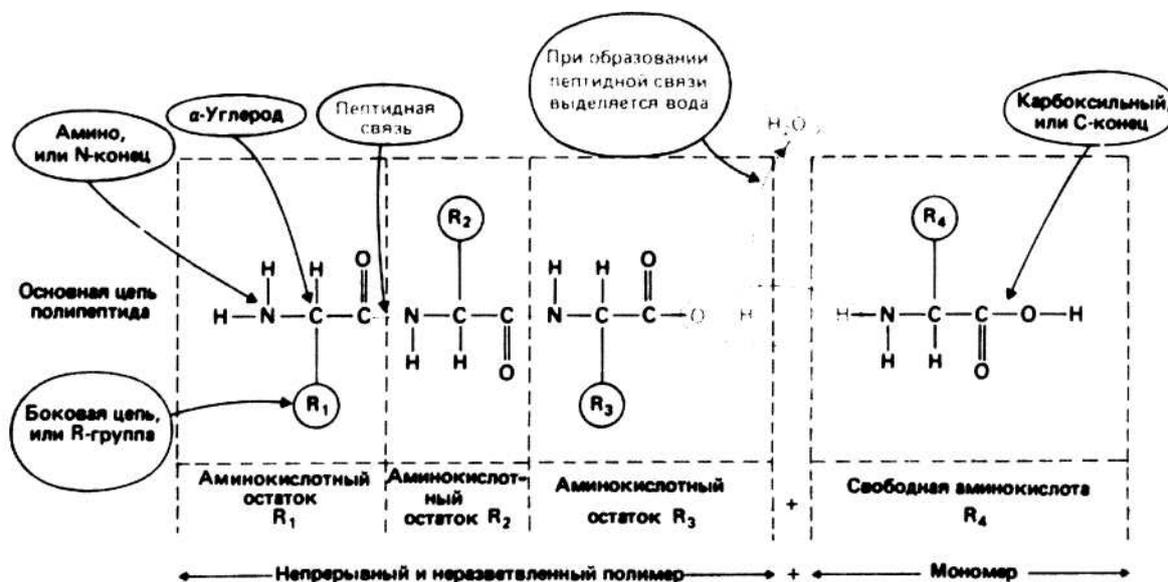


Рис. 6.2.

соответственно). *Нейтральные остатки* представлены одним Gly, боковая группа которого — атом водорода.

Дисульфидным мостиком называется ковалентная связь, соединяющая либо две части одной и той же полипептидной цепи, либо два разных полипептида. Дисульфидный мостик образуется при окислении двух остатков цистеина (т. е. при отщеплении водорода от двух реакционноспособных сульфгидрильных групп —SH). Новый остаток носит название *цистин*.

Пролин — необычный остаток, поскольку один конец его боковой группы ковалентно связан с C^α-атомом, а другой — с N-атомом основной цепи того же остатка, в результате чего образуется кольцо.

Стереои́змерия характерна для всех аминокислот, за исключением Gly. Асимметричным является С-атом, так как с ним связаны четыре разные химиче-

ские группы. В этом случае для каждой аминокислоты существуют две возможные конфигурации, известные под названием D- и L-форм (их называют также энантиомерами или стереоизомерами). Раствор одного из стереоизомеров поворачивает плоскость поляризации света в одном направлении, а раствор другого — в противоположном. Этот эффект носит название оптической активности. В белках встречаются только L-изомеры. Чтобы различить D- и L-конфигурации, нужно посмотреть в направлении от атома водорода к С-атому и «прочитать» по часовой стрелке три оставшиеся при С^α-атоме группы — тогда в случае L-формы группы CO, R и N составят слово CORN. Боковые группы Thr и Ile имеют дополнительный оптический центр — Р-углеродный атом, связанный с ос-углеродом основной цепи.



Рис. 6.3.

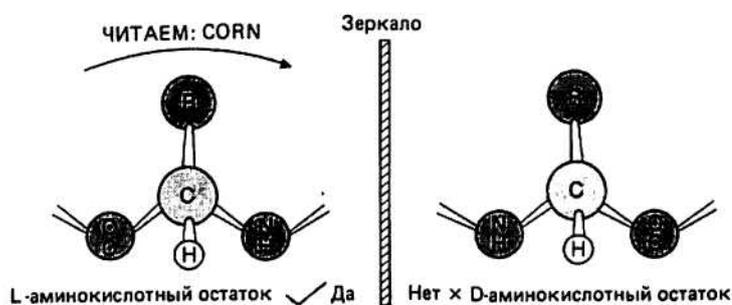
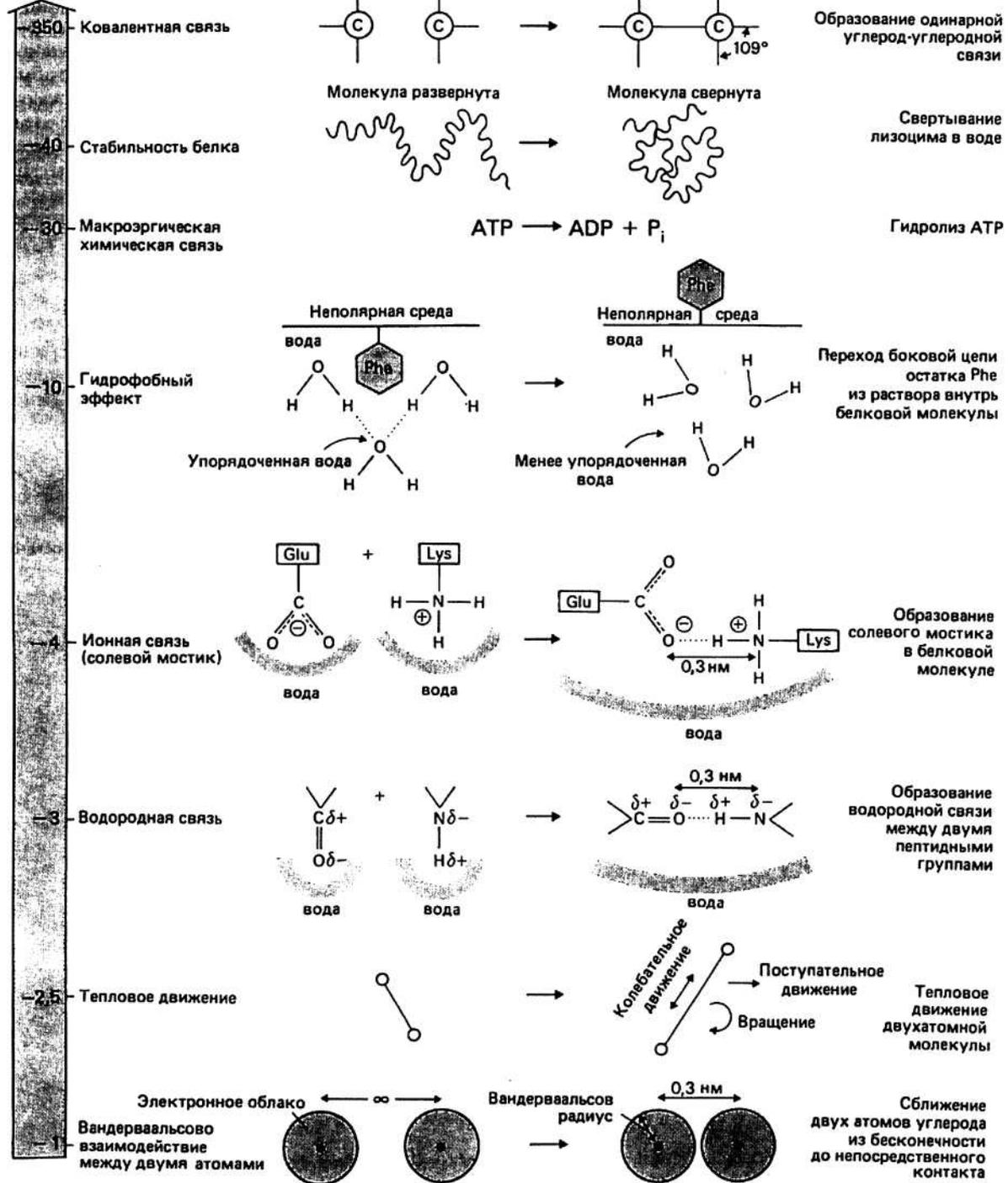


Рис. 6.4.

7. Энергия и силы

ИЗМЕНЕНИЕ СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ
кДж/моль (без соблюдения масштаба)



Свободная энергия — это величина, которую можно определить как ту часть внутренней энергии химической системы, за счет которой может совершаться работа над окружающей средой. Чтобы выяснить, будет ли данный процесс идти самопроизвольно, находят изменение свободной энергии (общепринятое ее обозначение ΔG) между конечным и начальным состояниями рассматриваемой системы ($\Delta G = G_{\text{конечн}} - G_{\text{начальн}}$). Если ΔG - отрицательная величина, система будет совершать работу самопроизвольно (подобно грузу, поднятому на некоторую высоту и готовому упасть); если же $\Delta G > 0$, система не будет совершать работу без дополнительного притока энергии извне. Когда $\Delta G = 0$, система находится в состоянии термодинамического равновесия. ΔG измеряется в джоулях (или килоджоулях) на моль вещества (Дж/моль или кДж/моль).

$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ — соотношение, указывающее на наличие двух составляющих ΔG при постоянной температуре T (по шкале абсолютных температур Кельвина). Одна из них — это *изменение энтальпии* (ΔH), которое можно приравнять изменению потенциальной энергии рассматриваемой системы: этот параметр связан с энергетическим состоянием молекул в данной химической системе. Другой параметр — *изменение энтропии* (ΔS) - с точностью до множителя T является мерой энергии, которую нельзя использовать для совершения полезной работы. Сама энтропия (S) возрастает с увеличением беспорядка в системе и является мерой ее неупорядоченности. Таким образом, ΔS - величина положительная, если система становится менее упорядоченной (гл. 44).

ΔG° химической реакции называется стандартным изменением свободной энергии и представляет собой такое значение ΔG , когда концентрация каждого из исходных реагирующих веществ до начала реакции составляет 1 моль \cdot л⁻¹; при этом все реагенты, включая продукты реакции, находятся в стандартных условиях. Для реакции, протекающей в стандартных условиях, ΔG° связано с константой равновесия K' соотношением $\Delta G^\circ = -RT \ln K'$ где R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура. Биохимики часто пользуются несколько модифицированной формой ΔG° , которая обозначается символом ΔG° (гл. 44).

Ковалентная связь — это химическая связь между атомами в молекуле. Связывание осуществляется путем обобществления электронов, принадлежавших одному или нескольким атомам. Ковалентные связи относятся к прочным связям: ΔG их образования составляет примерно -300 ÷ -400 кДж/моль. Чтобы столь большая энергия не растрачивалась впустую, любой биохимический процесс организован так, что разрыв какой-либо ковалентной связи неизменно энергетически сопряжен с образованием другой ковалентной связи.

Аденозинтрифосфат (АТФ) служит источником энергии для очень многих биохимических реакций.

Его строение описано в гл. 17. В связях —P—O—P— запасена значительная энергия. Отщепление концевой (в данном случае у-) фосфатной группы посредством гидролиза с образованием аденозиндифосфата (ADP) и неорганического фосфата (P_i) характеризуется $\Delta G^\circ = -30$ кДж/моль:



Примерно такое же количество энергии высвобождается и при отщеплении второго (т. е. (3-) фосфата. Вся эта энергия может пойти на обеспечение какой-нибудь биохимической реакции, в том числе такой, которая не протекает самопроизвольно в обычных условиях. Рассмотрим реакцию типа $X \rightleftharpoons Y$, для которой ΔG° составляет, скажем, +20 кДж/моль. Если превращение X в Y сопряжено с гидролизом АТФ, то суммарная реакция будет иметь вид



и для нее $\Delta G^\circ \approx (-30 + 20)$ кДж/моль = -10 кДж/моль, т. е. в стандартных условиях реакция будет идти самопроизвольно.

Нековалентный тип связи относится к взаимодействию между атомами, не связанными ковалентно друг с другом. Эти взаимодействия будут рассмотрены нами в дальнейшем на примере структуры белка, однако они встречаются и в других биологических молекулах. Поскольку нековалентные взаимодействия происходят не в вакууме, а в растворе, при их оценке необходимо учитывать влияние растворителя.

Стабильность свернутой молекулы белка в растворе относительно такого состояния белка, когда его цепь развернута, составляет обычно около -40 кДж/моль (например, для молекулы лизоцима). Это означает, что при переходе каждого моля лизоцима из развернутого состояния в свернутое высвобождается 40 кДж энергии.

Электростатические эффекты составляют значительную часть энтальпийного вклада нековалентных взаимодействий в ΔG (7. Разноименные заряды притягиваются друг к другу; для них, таким образом, энергетически выгодно сближение. Согласно закону Кулона, энергия взаимодействия между двумя зарядами q_1 и q_2 , удаленными друг от друга на расстояние r , прямо пропорциональна отношению

$$q_1 q_2 / \epsilon r,$$

где ϵ — диэлектрическая проницаемость соответствующей среды (ϵ служит мерой способности данной среды экранировать заряженные атомы). В вакууме $\epsilon = 1$, внутри молекулы белка она равна примерно 4, а в воде $\epsilon = 80$. Пользуясь законом Кулона, можно показать, что сближение положительного и отрицательного эле-

ментарных зарядов из бесконечности до расстояния 0,3 нм сопровождается термодинамически выгодным изменением свободной энергии, равным примерно —500 кДж/моль в вакууме, —125 кДж/моль внутри белковой молекулы и —6 кДж/моль в воде.

Ионная связь, (соленый мостик) образуется при сильном сближении (0,3 нм) двух атомов с разноименными зарядами. В самой белковой молекуле группа —COO⁻ боковой цепи остатка глутаминовой кислоты и группа —NH⁺₃ боковой цепи остатка лизина могут взаимодействовать между собой подобно низкомолекулярным ионам соли, образуя солевой мостик. Если, однако, такого мостика не образуется, боковые цепи могут взаимодействовать с растворителем; при этом свободная энергия системы также убывает. Поэтому образование солевого мостика, хотя и выгодно термодинамически, характеризуется ΔG, составляющим всего лишь около —4 кДж/моль, что гораздо меньше величины, следующей из закона Кулона.

Водородные связи. Когда атом водорода связывается с электроотрицательным атомом типа кислорода или азота, происходит смещение электронов, приводящее к появлению дробного положительного заряда (обозначаемого δ⁺) на атоме водорода и дробного отрицательного заряда (обозначаемого δ⁻) на его партнере. При этом образуется электрический диполь, который может взаимодействовать с другими диполями. Связь такого типа называется водородной. В молекулах белка группы >N—H и >C=O основной цепи часто участвуют в образовании водородных связей. ΔG образования водородной связи в вакууме составляет примерно —20 кДж/моль. Но те же группы >N—H и >C=O белковой молекулы могли бы взаимодействовать с окружающими их молекулами воды, что также термодинамически выгодно, поэтому величина ΔG образования водородной связи в молекуле белка составляет около —3 кДж/моль.

Вандерваальсовы силы заставляют атомы притягиваться друг к другу. Такие силы притяжения между атомами возникают, в частности, из-за наличия взаимодействий между флуктуирующими электрическими диполями, образуемыми электронным облаком и положительным ядром каждого атома. Однако два атома могут сближаться лишь до тех пор, пока их электронные облака не начнут перекрываться; дальнейшее сближение приводит к возникновению сильного от-

талкивания. Энергия такого взаимодействия описывается выражением

$$A/r^{12} - B/r^6,$$

где A и B — постоянные, зависящие от рода атомов. Таким образом, ввиду конкуренции двух взаимно противоположных эффектов — эффекта притяжения ($-B/r^6$) и эффекта отталкивания (A/r^{12}) — естественно предположить, что существует какое-то оптимальное (равновесное) расстояние между двумя атомами. Это приводит к понятию эффективного радиуса атома, называемого обычно вандерваальсовым.

Структура воды вокруг молекулы заметно сказывается на энтропии системы. Обычно молекулы воды движутся в растворе и вступают во взаимодействие друг с другом путем образования и разрыва водородных связей. Когда же молекулам воды приходится принимать достаточно жесткую конфигурацию, подобную структуре льда, упорядоченность возрастает, что термодинамически невыгодно из-за убывания энтропии.

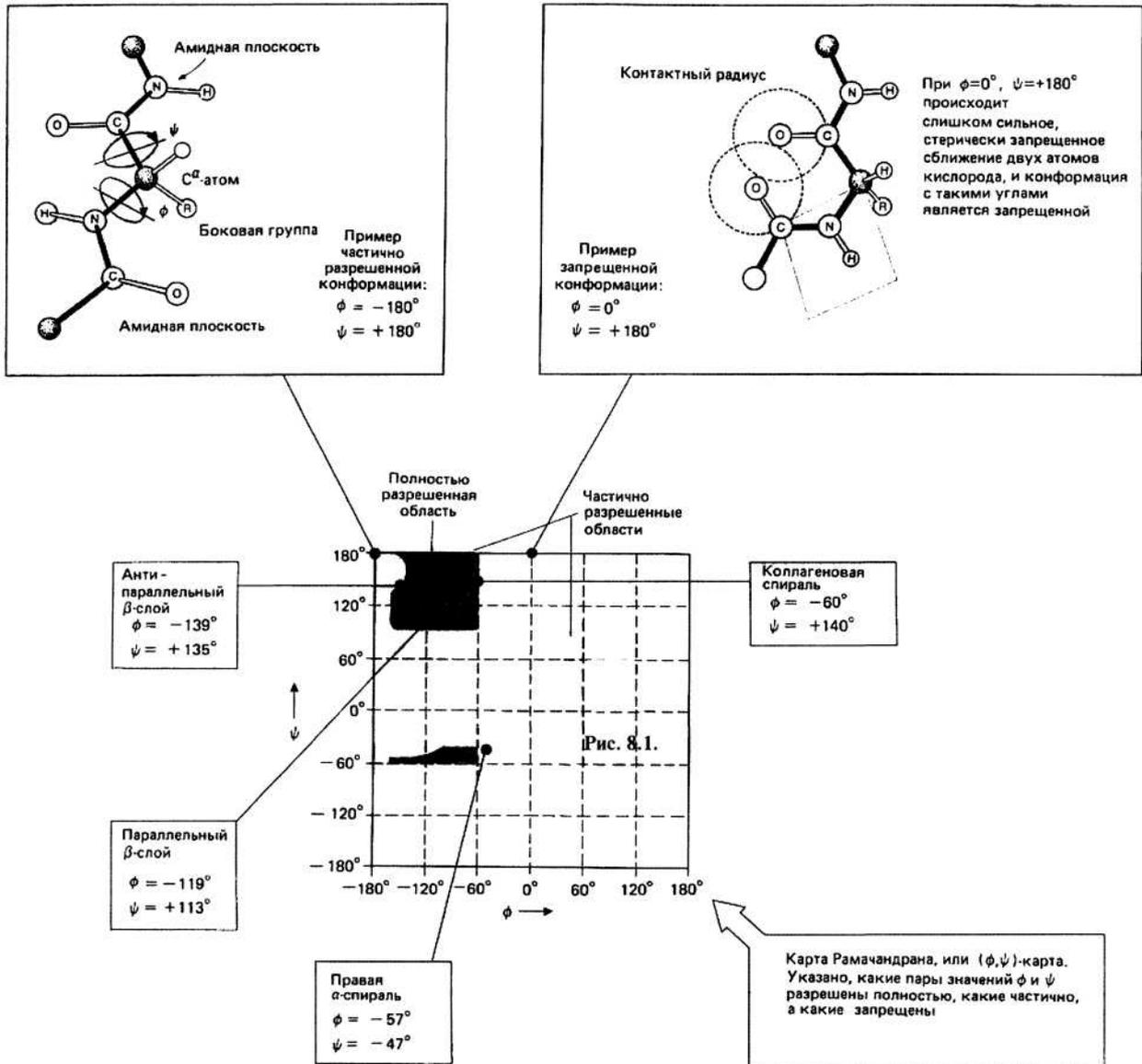
Гидрофобный эффект — это тенденция неполярных групп ассоциировать друг с другом, чтобы избежать контакта с водой. В результате такой ассоциации происходит нарушение структуры воды, вследствие чего энтропия системы возрастает. Выражение неполярный характер имеют алифатические и ароматические боковые цепи аминокислотных остатков белков (гл. 6) и основания нуклеиновых кислот (гл. 17).

Тепловое движение — это хаотическое движение атомов и молекул, определяющее температуру системы. Доля (f) молекул, у которых тепловая энергия больше некоторого произвольно взятого значения E , дается уравнением Больцмана:

$$f = \exp(-E/RT),$$

где R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура. Таким образом, доля молекул с энергией, большей RT ($= 2,5$ кДж/моль при комнатной температуре), равна $\exp(-1)$, или 0,37. Поэтому энергия связей должна превышать 2,5 кДж/моль, иначе они будут легко рваться и вновь образовываться в результате теплового движения. Таким образом, связи, обусловленные вандерваальсовыми силами, а иногда и водородные связи и солевые мостики, непрерывно рвутся и снова восстанавливаются.

8. Конформация пептидов



Конформациями молекулы называются такие варианты расположения в пространстве составляющих молекулу атомов, которые могут быть получены один из другого вращением вокруг одинарных ковалентных связей. В противоположность этому конфигурации — это такие варианты взаимного расположения атомов молекулы, переходы между которыми требуют разрыва и образования ковалентных связей. Так, D- и L-изомеры аминокислотных остатков (гл. 6) представля-

ют собой различные *конфигурации*, а α -спираль и коллагеновая спираль (см. ниже) — различные *конформации* полипептидной цепи.

Пептидной связью называется связь между $>C=O$ -группой одного остатка и $>N-H$ -группой следующего. Эта $C-N$ -связь вопреки ожиданиям не является одинарной, а в силу резонанса оказывается частично двойной ($C=N$). При этом соответственно уменьшается порядок двойной связи $C=O$. Такое изменение

порядка связей вызвано тем, что одна пара электронов связи C=O распределяется между атомами O, C и N. Вследствие этого перераспределения атомы O, C, N, H (пептидная группа) и связанные с ними ковалентно два C^a-атома оказываются лежащими в одной плоскости, называемой *амидной*, а вращение вокруг связи O*N становится запрещенным. Предположение о планарности пептидной группы было высказано Полингом и Кори. Они заметили, что длина пептидной связи (0,132 нм) имеет промежуточное значение между длиной одинарной C—N-связи (0,149 нм) и двойной C=O-связи (0,127 нм).



Рис. 8.2.

Транс-конформации пептидной группы. C^a-атомы, примыкающие с двух сторон к одной пептидной группе, обычно находятся в *транс-конформации* по отношению друг к другу. Альтернативная *цис-конформация* невыгодна из-за слишком сильного сближения объемных групп, присоединенных к C^a-атомам.



Рис. 8.3.

C^a-атом связан одинарными связями с α-атомом одной пептидной группы и с C-атомом следующей. Вокруг этих одинарных связей возможно относительно свободное вращение.

Углы φ и Ψ. Для описания вращения вокруг связей N—C^a и C^a—C используются соответственно углы φ (фи) и Ψ (пси). Угол φ задает положение всех атомов, которые лежат в амидной плоскости, *предшествующей* C^a-атому, а угол Ψ определяет положение всех атомов амидной плоскости, *следующей* за C^a-атомом.

Некоторые пары значений φ и Ψ запрещены, поскольку при этом имеют место стерические ограничения из-за сближения двух атомов на расстояние, меньшее чем сумма их контактных (т. е. вандерваальсовых) радиусов. Например, при φ = 0°, Ψ = 180° возникают стерические контакты между двумя атомами кислорода.

Конформационная карта Рамачандрана, или (φ, Ψ)-карта, показывает, какие пары значений φ и Ψ разрешены. Эта карта названа именем индийского ученого, рассчитавшего допустимые значения углов φ и Ψ. Каждая точка на карте соответствует определенной паре значений φ и Ψ и показывает, является ли данное взаимное расположение атомов двух амидных плоскостей и боковой группы, присоединенных к C^a-атому, энергетически выгодным. Приведенная на рис. 8.1 (φ, Ψ)-карта характерна для большинства боковых цепей, за исключением глицина и пролина. В случае полностью разрешенных конформаций нежелательные контакты между атомами отсутствуют. Запрещенные углы (например, φ = 0°, Ψ = 180°) соответствуют конформациям, в которых отдельные атомы находятся друг от друга на расстоянии, меньшем суммы их контактных радиусов. Необходимо отметить, что, поскольку атомы не являются жесткими сферами, возможно сближение их на расстояние, несколько меньшее суммы контактных радиусов. Хотя подобное сближение нежелательно, оно тем не менее может иметь место, а соответствующие конформации называются частично разрешенными (например, φ = —180°, Ψ = 180°). Если каждую полностью разрешенную пару значений φ и Ψ представить на карте темно-коричневой точкой, то получающиеся в результате темно-коричневые участки будут отвечать полностью разрешенным областям значений углов φ и Ψ. Частично разрешенные области значений углов φ и Ψ отмечены на карте светло-коричневым цветом. Следует подчеркнуть, что (φ, Ψ)-карты указывают разрешенные пары значений φ и Ψ для данного конкретного остатка. Боковая цепь глицина, состоящая лишь из одного атома водорода, по размеру меньше, чем у любого другого остатка. Поэтому на (φ, Ψ)-карте для глицина больше разрешенных областей, чем на картах других остатков. Напротив, в случае пролина ограничения, налагаемые ковалентной связью между атомом углерода боковой цепи и атомом азота основной цепи, приводят к значительному уменьшению размеров разрешенных областей.

Регулярные или спиральные структуры нескольких соседних вдоль цепи остатков значения φ и Ψ окажутся одинаковыми, то в пределах этого участка у каждого C^a-атома основная цепь будет поворачиваться на один и тот же угол. В результате получится регулярная вторичная структура. Подобные структуры часто обнаруживаются в глобулярных и фибриллярных белках. Особенно важное значение имеют параллельная и антипараллельная (β-структуры (гл. 9), α-спираль (гл. 9) и коллагеновая спираль (гл. 11). Значения углов φ и Ψ, соответствующие этим типам вторичной структуры, приведены на рис. 8.1.

9. Вторичная структура белков

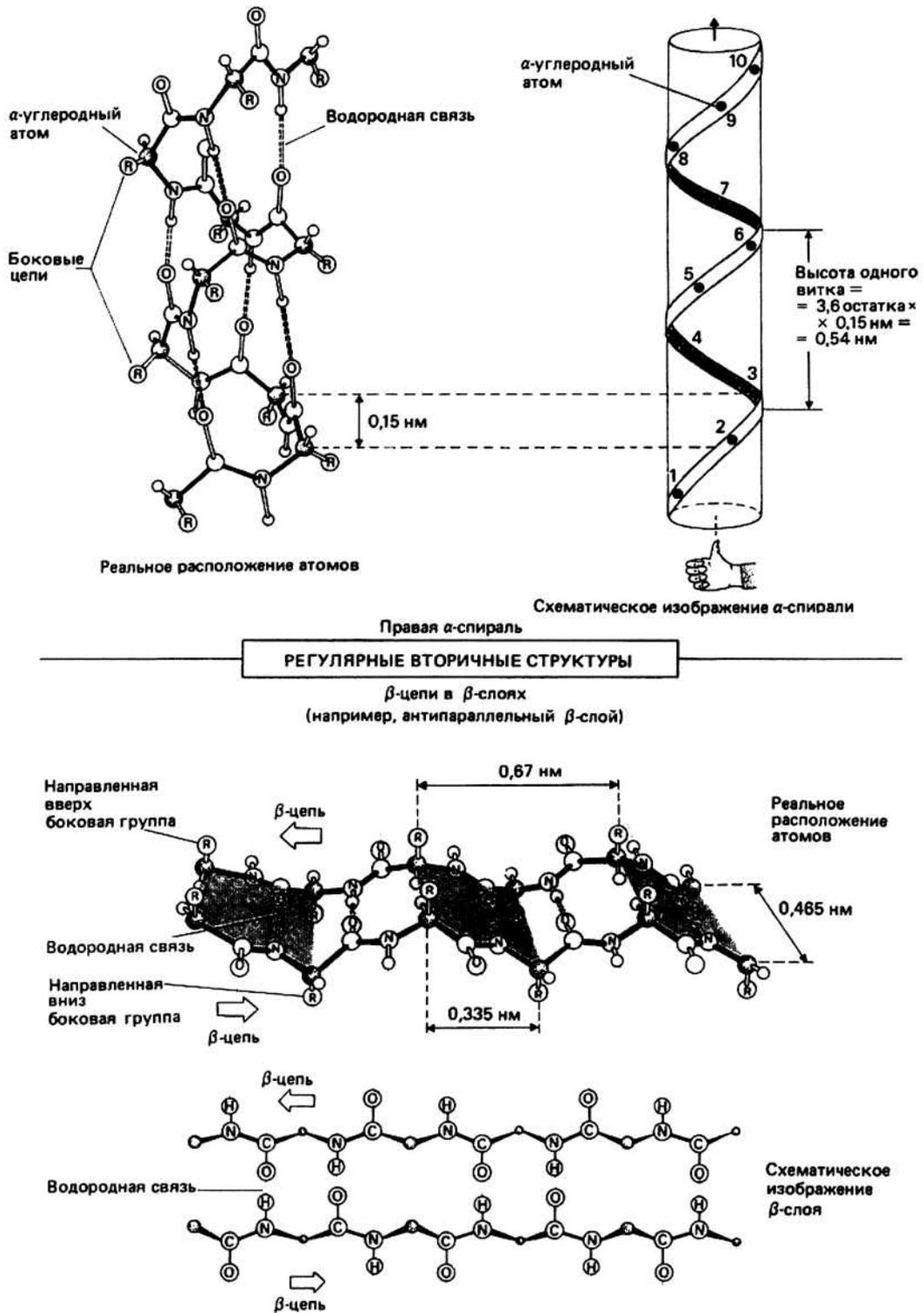


Рис. 9.1.

Под **вторичной структурой** участка полипептидной цепи понимают конформацию основной цепи этого фрагмента без учета конформации боковых групп. Согласно более раннему определению, употребляемому иногда и сейчас, вторичная структура — это те сегменты полипептидной цепи, которые участвуют в формировании регулярной сетки водородных связей. При некоторых конформациях образуются регулярные повторяющиеся структуры, стабилизированные водородными связями между $>N-H$ - и $>C=O$ -группами основной цепи (например, α -спираль, β -слой, коллагеновая спираль).

Регулярная или спиральная, вторичная структура образуется тогда, когда у всех остатков значения углов ϕ и Ψ одинаковы. При этом основная цепь у каждого C^{α} -атома поворачивается на один и тот же угол. Любую спираль можно рассматривать как результат наматывания цепи на боковую поверхность воображаемого цилиндра. Спираль характеризуется числом повторяющихся единиц (остатков), приходящихся на один виток (обозначается n), и расстоянием между соседними остатками вдоль оси спирали (d). Высота одного витка (p) равна произведению n на d . Спирали могут быть правыми и левыми. Утверждение, что какая-то спираль является правой, означает, что если вытянутый вперед большой палец правой руки направить вдоль оси спирали, то расположенные перпендикулярно ему зажатые в кулак остальные пальцы будут указывать направление хода цепи.

Цопни и Корм в 1951 г. предположили, что в белках должны встречаться два типа регулярной структуры — α -спираль ($n = 3,6$) и β -структура ($n = 2$). Эта догадка основывалась, во-первых, на известных данных о размерах пептидной группы и ее плоском строении, а во-вторых, на том, что оптимальные условия для образования водородной связи $N-H \dots O$ реализуются в том случае, когда все три атома, N, H и O, лежат на одной прямой. Именно способностью полипептидной цепи принимать форму α -спирали и β -структуры удалось объяснить результаты экспериментов по изучению дифракции рентгеновских лучей на волокнах фибриллярного белка кератина (гл. 11), находящегося соответственно в α - и β -формах (отсюда и название — α - и β -структуры). α -Спираль и β -структура являются энергетически наиболее выгодными конформациями, поскольку обе они стабилизированы водородными связями (гл. 7) между $>N-H$ - и $>C=O$ -группами основной цепи. Кроме того, и α -спираль, и β -структура дополнительно стабилизируются благодаря плотной упаковке атомов основной цепи, которые подогнаны друг к другу, как кусочки одной картинке-головоломки.

В правой α -спирали $\phi = -57^\circ$, $\Psi = -47^\circ$. Число остатков на виток (n) равно 3,6, расстояние между соседними остатками вдоль оси спирали (d) — 0,15 нм, а высота одного витка (p) составляет 0,54 нм ($= 3,6 \times 0,15$ нм). Каждая $>C=O$ -группа образует водородную связь с

четвертой по ходу цепи $>N-H$ -группой. Регулярность структуры означает, что все $>N-H$ - и $>C=O$ -группы, за исключением находящихся на концах спирали, могут образовывать водородные связи. α -Спираль по форме напоминает прутик, в котором стебель — это основная цепь, а торчащие в разные стороны ветки — боковые цепи (R-группы).

β -Слой формируется из двух или более β -структурных участков полипептидной цепи, называемых β -участками. В каждом β -участке полипептидная цепь почти полностью вытянута; при этом $>N-H$ - и $>C=O$ -группы ориентированы примерно перпендикулярно направлению β -участка и могут образовывать водородные связи с соседними участками. В результате из нескольких β -участков образуется структура, которая в грубом приближении оказывается плоской, напоминающей лист. Однако из-за того что плоскости пептидных групп в каждом β -участке наклонены поочередно в разные стороны относительно направления β -участка, плоский β -слой приобретает складчатую форму. Если двигаться вдоль одного из β -участков, составляющих β -слой, то боковые группы будут выступать по очереди то с одной, то с другой стороны β -слоя.

Параллельная и антипараллельная β -структуры. Существуют два разных варианта образования водородных связей между тяжами в составе β -слоя. Каждому варианту соответствует свои значения углов ϕ и Ψ . В параллельном β -слое ($\phi = -119^\circ$, $\Psi = 113^\circ$) соседние β -участки направлены в одну сторону (рис. 9.2), а в антипараллельном ($\phi = -139^\circ$, $\Psi = 135^\circ$) — в противоположные (рис. 9.1).

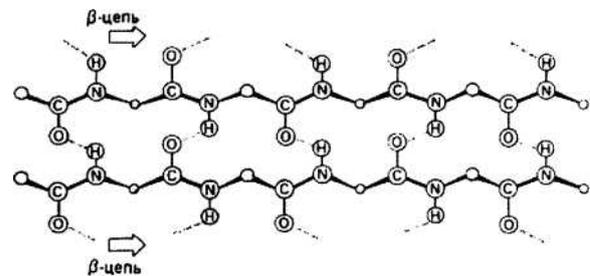


Рис. 9.2. Параллельный β -слой.

Коллагеновая спираль представляет собой третий тип регулярной вторичной структуры со значениями углов $\phi = -60^\circ$, $\Psi = 140^\circ$. В такой конформации находится основная часть полипептидной цепи фибриллярного белка коллагена (гл. 11).

Большинство глобулярных белков имеет α -спиральные и/или β -структурные участки. α -Спирали обычно состоят из 6—24 остатков, соответственно длина их варьирует от 0,9 до 2,4 нм. Значения углов ϕ и Ψ в спирали всегда немного отличаются от стандартных. Иногда несколько остатков принимают конфор-

мацию спирали 3_{10} , отличную от конформации ос-спирали. На один виток спирали 3_{10} приходится 3 остатка, а водородные связи в ней образуются между n и $n - 3$ по ходу цепи остатками. Участки β -слоя, как правило, состоят из 3—10 остатков и имеют длину от 1,0 до 3,3 нм. Типичный (3-слой содержит от 2 до 10 р-участков. В одних β -слоях все участки уложены параллельно друг другу, в других все соседние β -тяги антипараллельны. Кроме того, иногда в одном и том же слое присутствуют оба типа укладки. Так же как и в случае α -спирали, реальная конформация β -слоя может несколько отличаться от стандартной.

β -Изгиб- это еще один тип вторичной структуры, встречающийся во многих глобулярных белках в тех местах, где направление полипептидной цепи меняется на противоположное. Данная структура часто рассматривается как связующее звено между двумя уложенными антипараллельно β -участками в составе β -слоя. На рис. 9.3 приведен пример β -изгиба из четырех остатков с одной водородной связью между $>C=O$ -группой остатка 1 и $>N-H$ -группой остатка 4. В белках обнаруживаются и другие типы β -изгибов. В отличие от α -спирали, коллагеновой спирали и β -слоя в β -изгибе значения углов ϕ и ψ у разных остатков неодинаковы. β -Изгибы обычно находятся у поверхности белковой глобулы.

Предсказать, какие участки молекулы глобулярного белка будут иметь регулярную вторичную структуру, основываясь на данных об их аминокислотной последовательности, можно с точностью около 70%. Одни остатки (например, Glu, Met, Ala и Leu) часто встреча-

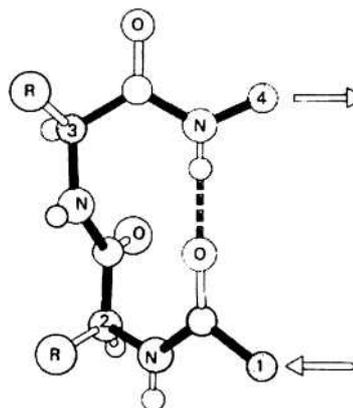


Рис. 9.3. β -Изгиб.

ются в α -спиралях, в то время как другие (Gly и Pro) — значительно реже. Что касается пролина (Pro), то этот остаток может находиться в α -спирали лишь в одном из первых трех положений, поскольку в остальных позициях наличие ковалентной связи между боковой цепью пролинового остатка и атомом азота основной цепи не позволяет $>N-H$ -группе образовать водородную связь. Некоторые остатки предпочитают находиться в β -участках (например, Val, Ile, Thr и Phe), тогда как остатки Asp и Glu принимают эту конформацию довольно редко. Такие данные о встречаемости различных остатков в разных типах вторичной структуры используются при предсказании локализации в белке α - и β -участков.

10. Структура глобулярных белков

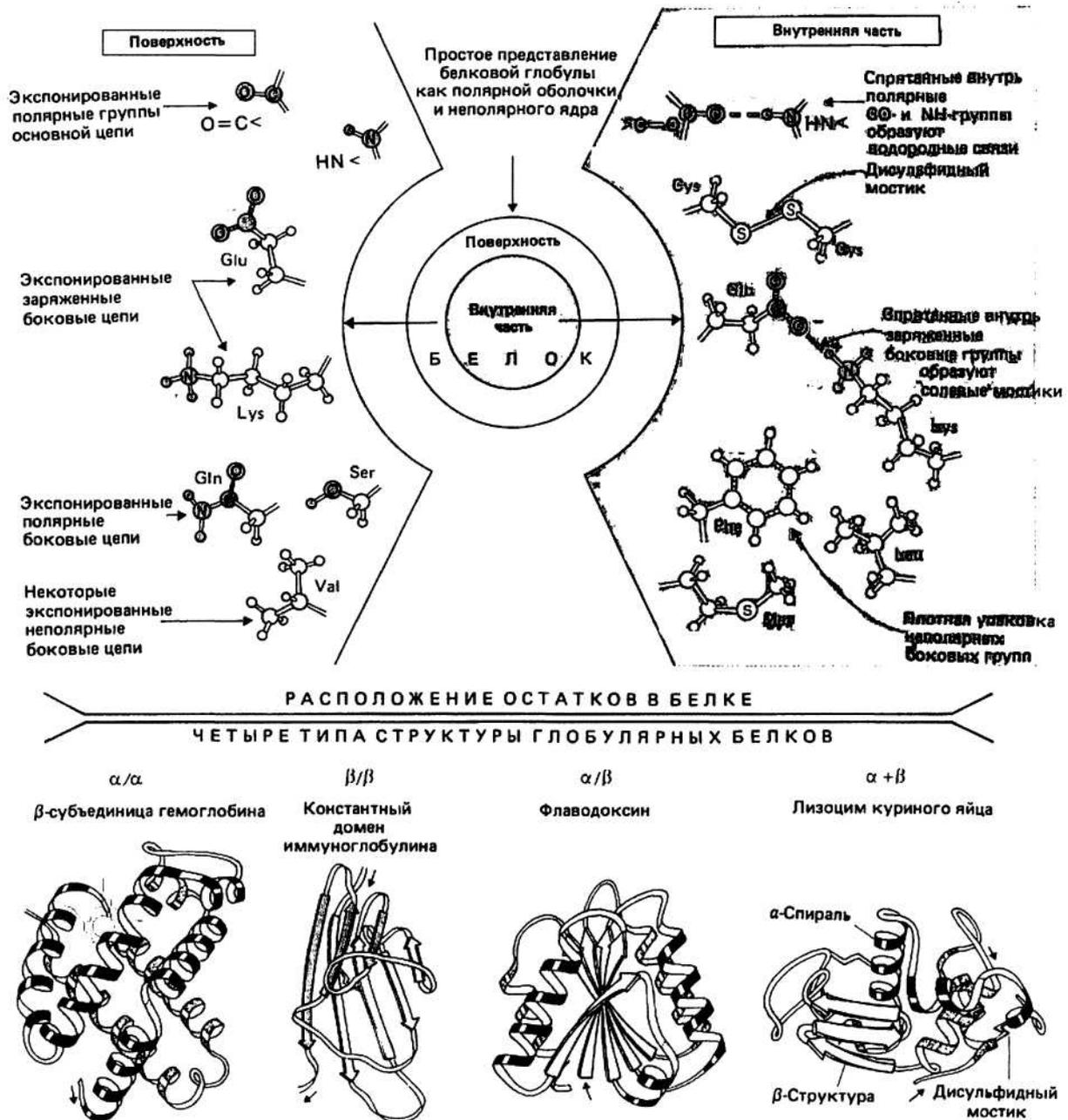


Рис. 10.1.

Под третичной структурой белка понимают расположение в пространстве всех атомов одиночной полипептидной цепи. Некоторые белки состоят из нескольких полипептидных цепей. Каждая цепь — это одна субъединица, или мономер. Димеры содержат две полипептидные цепи, тримеры — три, а тетрамеры — четыре. Молекулы гемоглобина представляет

собой типичный тетрамер, в котором имеются две идентичные α -цепи и две идентичные β -цепи.

Термин **четвертичная структура** белка означает взаимное расположение в пространстве мономеров, формирующих молекулу белка, который состоит из нескольких субъединиц.

С помощью рентгеноструктурного анализа белковых

кристаллов расшифрована трехмерная структура более ста различных белков. Положение большинства атомов, за исключением атомов водорода, может быть определено с точностью 0,1 нм. До сих пор кристаллографическими методами изучались в основном водорастворимые глобулярные белки, поэтому все, что будет сказано далее, касается именно этого класса белков.

На поверхности белковой глобулы сосредоточены в основном полярные группы и заряженные атомы, предпочитающие взаимодействовать с водным окружением. Сюда относятся полярные группы $>N-H$ и $>C=O$ основной цепи, заряженные атомы боковых цепей остатков Gli^- , $Aspa$, Lys^+ и Arg^+ и полярные боковые цепи таких остатков, как Ser , Thr , Asn , Gin и др. Между противоположно заряженными группами (например, между Gli^- и Lys^+) на поверхности белковой глобулы иногда образуются ионные связи, которые называются солевыми мостиками (гл. 7). Кроме того, на поверхности имеется некоторое количество неполярных атомов.

Внутренняя часть белковой глобулы представляет собой неполярную среду, защищенную от контактов с окружающим растворителем благодаря плотной упаковке атомов. Гидрофобное ядро образовано неполярными группами, входящими главным образом в состав алифатических и ароматических боковых цепей Ala , Val , He , Leu , Met , Phe и Tgr . Полярной или заряженной группе энергетически невыгодно находиться в таком гидрофобном окружении, если она при этом не взаимодействует с другой полярной группой или с атомом, имеющим противоположный заряд. Поэтому оказавшиеся внутри глобулы $>N-H$ и $>C=O$ -группы основной цепи образуют между собой водородные связи, формируя в результате α -спирали и β -слои. Точно так же находящиеся внутри глобулы противоположно заряженные группы (например, Gli^- и Lys^+) образуют ионные связи, известные под названием солевых мостиков.

Дисульфидный мостик — это ковалентная связь между двумя цистеиновыми остатками. Такие мостики встречаются в некоторых секреторных белках (гл. 6). Мостик может быть расположен как внутри глобулы, так и на ее поверхности. Во многих белках нет дисульфидных мостиков, хотя имеются цистеины в восстановленной форме.

Эксперименты по ренатурации показывают, что биологически активный белок после денатурации может самопроизвольно свернуться в исходную конформацию с восстановлением своей активности. Следовательно, при физиологических условиях состояние белка, имеющего нативную трехмерную структуру, термодинамически стабильно, т. е. соответствует минимуму свободной энергии. Более того, эти эксперименты говорят о том, что информация, необходимая для сворачивания белка в нативную конформацию, заложена в его аминокислотной последовательности.

Поэтому в принципе можно теоретически предсказать трехмерную структуру любого белка, исходя из его аминокислотной последовательности. Это было бы полезно в тех случаях, когда нельзя определить конформацию молекулы кристаллографическим методом. Хотя точность предсказания вторичной структуры белка (гл. 9) теперь довольно высока, предсказание третичной структуры остается нерешенной проблемой молекулярной биологии.

Сворачивание молекулы белка из развернутого состояния должно осуществляться либо одним, либо очень немногими путями. Пусть белковая молекула состоит из 50 остатков, каждый из которых может принимать 10 разных конформаций. Тогда общее число возможных конформаций составит 10^{50} , и если характерное время молекулярных перестроек составляет 10^{-13} с, то для того чтобы перепробовать все конформаций хотя бы по одному разу, потребуется примерно 10^{37} с ($\sim 10^{30}$ лет). Следовательно, должен существовать направленный путь сворачивания белка, ограничивающий этот перебор. Одно из предположений заключается в том, что отдельные участки белковой молекулы, например α -спирали, формируются в первую очередь и служат как бы центрами конденсации для остальных частей молекулы.

Стабильность свернутой молекулы белка в водном окружении крайне низка: для лизоцима из белка куриного яйца она составляет 40 кДж/моль. Основной движущей силой процесса сворачивания является энтропийный, гидрофобный эффект (гл. 7), вследствие которого неполярные группы стремятся выйти из водного окружения и оказаться внутри глобулы. К дальнейшей стабилизации структуры, по-видимому, приводит образование внутренних водородных связей, а также дисульфидных и солевых мостиков. Существует и энтропийный эффект, препятствующий сворачиванию. Этот эффект обусловлен тем, что для свернутой молекулы белка число разрешенных конформаций основной и боковых цепей меньше, чем у развернутой, а уменьшение числа конформаций энтропийно невыгодно (т. е. приводит к уменьшению энтропии).

Одни **участки полипептидной цепи**, находящиеся внутри свернутой белковой глобулы, являются α -спиралями или же (β -структурами, другие принимают нерегулярные, но вполне определенные конформаций (coil-участки). Полипептидная цепь, образующая белковую глобулу, свернута довольно сложным образом. Это иллюстрирует рис. 10.2, где при помощи отрезков, соединяющих последовательные C^α -атомы, изображена молекула лизоцима. (Сравните такое представление структуры белка с более упрощенным, приведенным на рис. 10.1).

Домены в крупных белках при сворачивании полипептидной цепи часто образуются две или более пространственно разделенные области, называемые доменами. По своей структуре каждый домен напоминает отдельный небольшой белок. Обычно в одном

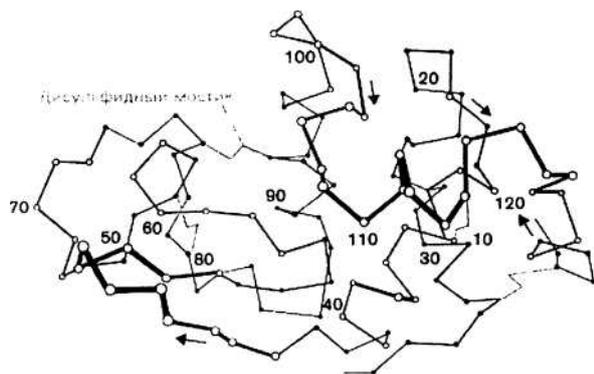


Рис. 10.2.

домене содержится от 40 до 300 остатков. В молекуле иммуноглобулина (гл. 40) как тяжелая, так и легкая цепи образуют несколько доменов, один из которых, константный домен легкой цепи, изображен на рис. 10.1.

Все домены можно подразделить на четыре класса: α/α , β/β , α/β и $\alpha + \beta$, в зависимости от взаимного расположения в цепи α -спиральных и β -структурных участков. Примеры доменов каждого класса приведены на рис. 10.1; полипептидная цепь изображена в виде ленты, при этом α -спиральные участки представлены спиралями, β -структурные — стрелками, а нерегулярные — светлыми петлями. Боковые цепи не показаны, хотя во всех белках пространство между атомами основной цепи заполнено атомами боковых цепей. α/α -Домены состоят в основном из α -спира-

лей, β -участки в них практически отсутствуют. Спирали упакованы таким образом, что неполярные боковые цепи оказываются спрятанными внутрь. В β/β -доменах имеется несколько β -цепей и нет (или почти нет) α -спиралей. Этот класс доменов представлен на рисунке константным доменом молекулы иммуноглобулина, состоящим из двух упакованных вместе β -слоев. На диаграмме видно, что β -слои не плоские, а слегка скручены. В α/β -доменах α - и β -участки чередуются вдоль цепи. Часто β -участки образуют параллельный β -слой, окруженный α -спиралями. В $\alpha + \beta$ -доменах α - и β -участки обычно располагаются в разных сегментах полипептидной цепи.

Упаковка субъединиц в мультимерном (состоящем из нескольких субъединиц) белке осуществляется благодаря взаимодействиям того же типа, что и при образовании третичной структуры белка. Обычно субъединицы бывают упакованы довольно симметрично (хотя не всегда имеет место полная симметрия), как, например, в молекуле гемоглобина, где четыре субъединицы располагаются в вершинах тетраэдра (гл. 15).

Внутренняя подвижность белков. Из экспериментов известно, что белки не являются жесткими структурами: отдельные их части перемещаются друг относительно друга, что позволяет говорить о внутренней подвижности белков. Во многих глобулярных белках, включая четыре белка, представленных на рис. 10.1, атомы основной цепи способны смещаться на 0,01 нм относительно среднего положения, а боковые цепи, находящиеся на поверхности белковой глобулы, имеют еще большую подвижность.

11. Структура фибриллярных белков

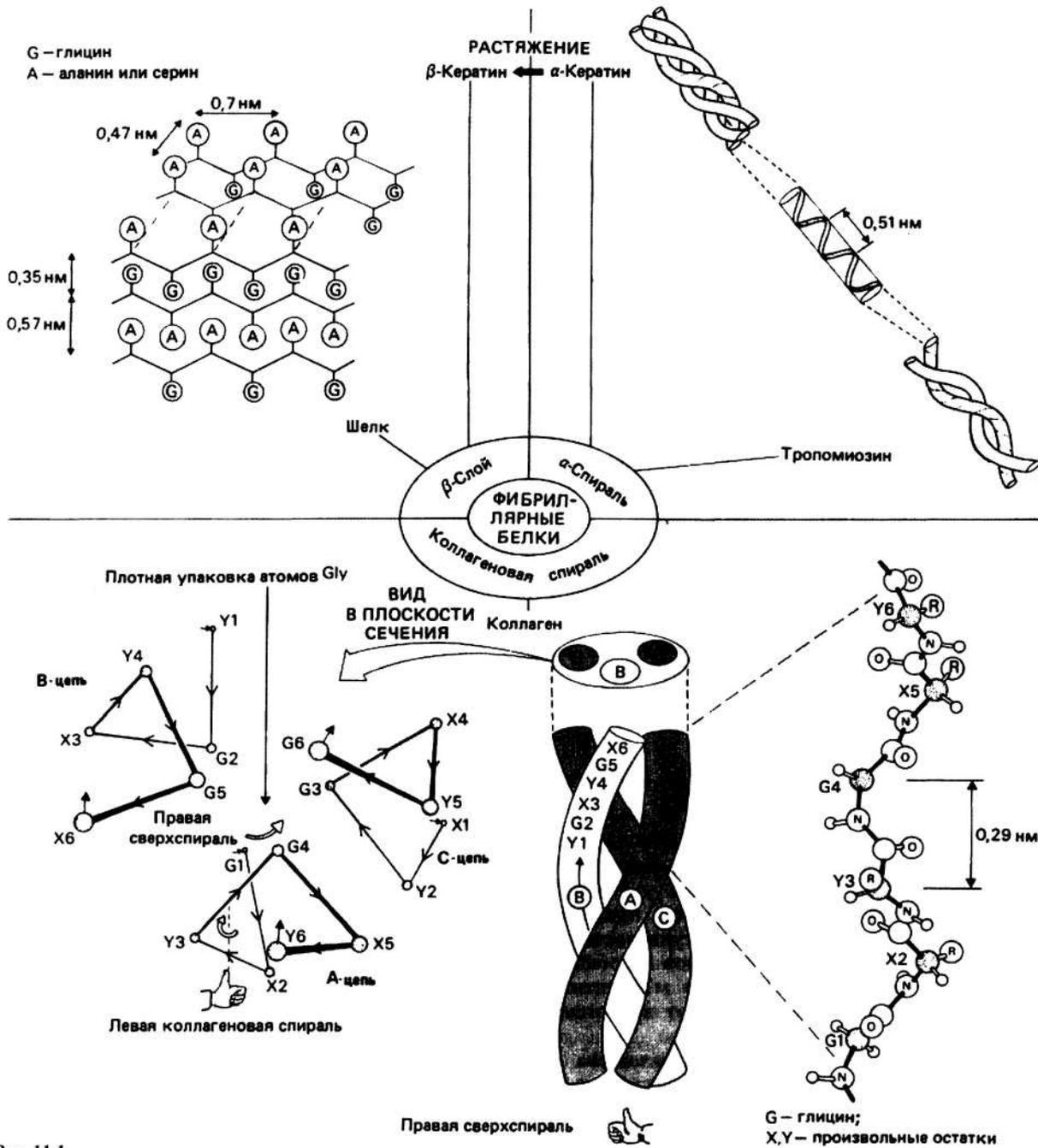


Рис. 11.1.

ФИБРИЛЛЯРНЫМИ называются белки, имеющие сильно вытянутую форму. Благодаря присущей этим белкам жесткости или эластичности они часто выполняют в живых организмах структурные функции.

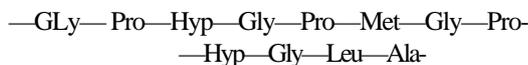
Конформацию полипептидной цепи большинства фибриллярных белков можно отнести к одному из трех типов регулярной вторичной структуры: к *коллагеновой* спирали, (β -слою, обнаруженному во многих

разновидностях *шелка*, и к α -спиральной структуре, **характерной для *a*-кератинов и тропомиозина.**

КОЛЛАГЕН наиболее распространенный белок млекопитающих, образует основу сухожилий, костей, кожи, зубов и хрящей. Структурной единицей коллагенового волокна является тропоколлагеновая молекула, состоящая из трех полипептидных цепей, каждая из которых содержит около 1000 аминокислотных остатков. В зависимости от функции коллагена его полипептидные цепи либо идентичны, либо имеют довольно близкие последовательности.

Аминокислотный состав коллагена необычен. Во-первых, примерно одну треть всех остатков составляют остатки глицина, и, во-вторых, имеется большое число остатков пролина. Кроме того, в коллагене встречаются остатки двух аминокислот, обычно не обнаруживаемых в белках, — гидроксипролина и гидроксислизина. Боковые цепи этих аминокислот содержат гидроксильную (—ОН) группу, присоединенную к одному из углеродных атомов вместо атома водорода. Гидроксилирование осуществляется специфическими ферментами после включения пролина или лизина в полипептидную цепь коллагена.

Аминокислотная последовательность большей части цепи коллагена представлена регулярно повторяющимися единицами Gly—X—Y, где X и Y могут быть произвольными аминокислотными остатками. Пролин (Pro) чаще встречается в положении X, тогда как гидроксипролин (Hyp) — преимущественно в положении Y. Типичный фрагмент последовательности коллагена выглядит следующим образом:



Такая регулярная последовательность принимает конформацию, называемую коллагеновой спиралью. В участках из первых 16 остатков у N-конца и из последних 25 остатков у C-конца полипептидной цепи коллагена подобной регулярности в чередовании аминокислотных остатков не обнаруживается. Эти сегменты, называемые телопептидами, имеют конформацию, отличную от коллагеновой спирали.

Одиночная пептидная цепь коллагена принимает форму спирали, в которой расстояние между аминокислотными остатками вдоль оси составляет 0,29 нм, а на один виток спирали приходится немного менее трех остатков. Спираль оказывается левой в том смысле, что если пальцы левой руки расположить так, чтобы они прослеживали путь G1—X2—Y3—G4, то большой палец будет указывать направление от N-к C-концу. Между атомами основной цепи одиночного полипептида водородных связей не образуется. Тем не менее такая конформация (значительно более вытянутая, чем α -спираль, у которой расстояние между остатками составляет 0,15 нм) оказывается предпоч-

тительной для полипептидной цепи, содержащей массивные пирролидиновые кольца остатков пролина и гидроксипролина.

Термин тройная коллагеновая спираль применяется для описания структуры регулярной части молекулы тропоколлагена. В тройной коллагеновой спирали три одиночные коллагеновые цепи уложены параллельно и закручены одна вокруг другой, образуя похожую на канат витую структуру. Такое закручивание оказывается возможным благодаря наличию у левых одиночных коллагеновых спиралей правой сверхспирализации, которую можно наблюдать по результирующему смещению A-цепи при переходе от G1 к G4 (G1 и G4 — это глициновые остатки, стоящие соответственно в первом и четвертом положениях). Одиночная цепь коллагена содержит примерно 1000 остатков, а длина молекулы тропоколлагена составляет при этом около 300 нм.

Глицин- единственный остаток, который может располагаться вблизи оси тройной спирали, поскольку имеющегося там свободного пространства недостаточно для размещения любой другой, большей по объему боковой цепи. На один виток одиночной цепи приходится примерно три остатка, поэтому в каждом третьем положении аминокислотной последовательности должен стоять глицин. Боковые цепи остатков X и Y направлены в сторону от оси тройной спирали и могут быть большими по объему. В тройной спирали существуют водородные связи между >N—H-группой каждого внутреннего глицинового остатка и >C=O-группой другой цепи.

Сборка коллагена начинается с синтеза в фибробластах молекул проколлагена. Проколлаген — это предшественник коллагена, имеющий дополнительные пептиды на B- и C-концах. В фибробластах молекулы проколлагена самопроизвольно сворачиваются в тройные спирали, в каждой из которых C-концы трех цепей связываются друг с другом дисульфидными мостиками. В таком виде тройные спирали секретируются из клетки и затем после удаления дополнительных пептидов проколлагена с помощью фермента, проколлагеновой пептидазы, превращаются в молекулы тропоколлагена.

Микрофибрилла представляет собой совокупность уложенных параллельно молекул тропоколлагена, каждая из которых сдвинута в продольном направлении относительно соседней на 67 нм (этот сдвиг называется D-уступом). Кроме того, между C-концом одной молекулы и N-концом следующей существует промежуток длиной 40 нм. Микрофибриллы, ассоциируя друг с другом, образуют фибриллу, а несколько фибрилл — коллагеновое волокно (рис. 11.2).

Коллагеновые волокна стабилизируются с помощью ковалентных сшивок между полипептидными цепями и в результате оказываются слаборастяжимыми и весьма прочными, так как сколько-нибудь заметное удлинение волокон требует разрыва этих сшивок.

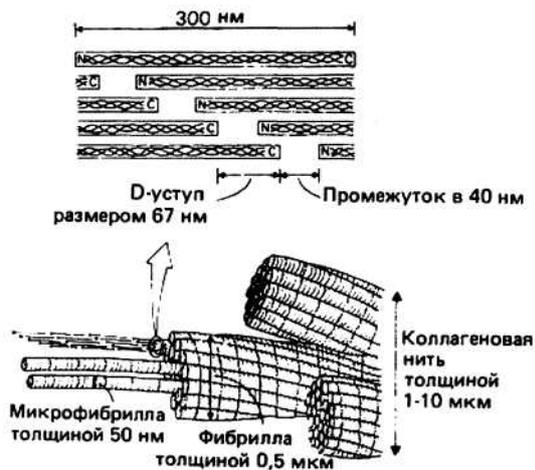


Рис. 11.2.

Соединительные ткани в таких образованиях, как кости, сухожилия и хрящи, обычно имеют сложную структуру и состоят из коллагена и других молекул, главным образом неорганических. В сухожилиях, как было показано, в промежутке между соседними коллагеновыми молекулами откладывается кальций. Аналогичная ситуация имеет место и в костях.

Шелк чаще всего имеет структуру антипараллельного β-слоя, в котором β-цепи уложены вдоль оси волокна. Во многих разновидностях шелка расстояние между β-слоями поочередно составляет то 0,35, то 0,57 нм. Аминокислотная последовательность представляет собой в основном многократное повторение фрагмента Gly—Ala—Gly—Ala—Gly—Ser. Боковые цепи всех Ala и Ser при этом располагаются с одной стороны β-слоя, а с другой стороны выступают атомы водорода глициновых остатков. β-Слои упакованы таким образом, что друг с другом контактируют одноименные их поверхности. Расстояние между слоями, контактирующими по «глициновым» поверхностям,

составляет 0,35 нм, а по поверхностям, в которых выступают остатки Ala и Ser, — 0,57 нм. Волокна шелка малорастяжимы, поскольку любое достаточно большое удлинение приводит к разрыву ковалентных связей в полипептидной цепи. Некоторая растяжимость тем не менее наблюдается и может быть обусловлена нарушением регулярности аминокислотной последовательности и появлением в цепи остатков с массивными боковыми группами, таких, как Tug, Arg, Asp и Glu. А этих местах β-структура нарушается, полипептидная цепь принимает нерегулярную конформацию и может быть растянута без разрыва ковалентных связей.

КЕРАТИН— важный белковый компонент волос, шерсти, ногтей, когтей и перьев. В одной из форм, называемой α-кератином, в основе структуры полипептидной цепи лежит правая α-спираль. Предположение о том, что кератин имеет α-спиральную конформацию, было высказано Полингом и Кори для объяснения полученных Астбюри в 30-х годах данных по дифракции рентгеновских лучей на волокнах кератина. Однако шаг кератиновой спирали составил 0,51 нм, что меньше шага стандартной ос-спирали, равного 0,54 нм. Это связано с тем, что в кератине две, а возможно и три цепи закручиваются одна вокруг другой, образуя некую витую (coiled-coil) структуру, называемую протофибриллой. 11 протофибрилл формируют микрофибриллу, а пучок микрофибрилл — кератиновое волокно. α-Кератины легко растяжимы, поскольку при вытягивании разрываются водородные связи и полипептидные цепи приобретают β-структурную конформацию. При этом образуются межцепочечные водородные связи и формируются β-слои. Кератины с такой структурой называются β-кератинами.

ТРОПОМИОЗИН— это фибриллярный белок, обнаруживаемый в мышцах (гл. 36) и состоящий из двух закрученных одна вокруг другой α-спиралей, подобно тому как это имеет место в α-кератине.

12. Принципы действия ферментов

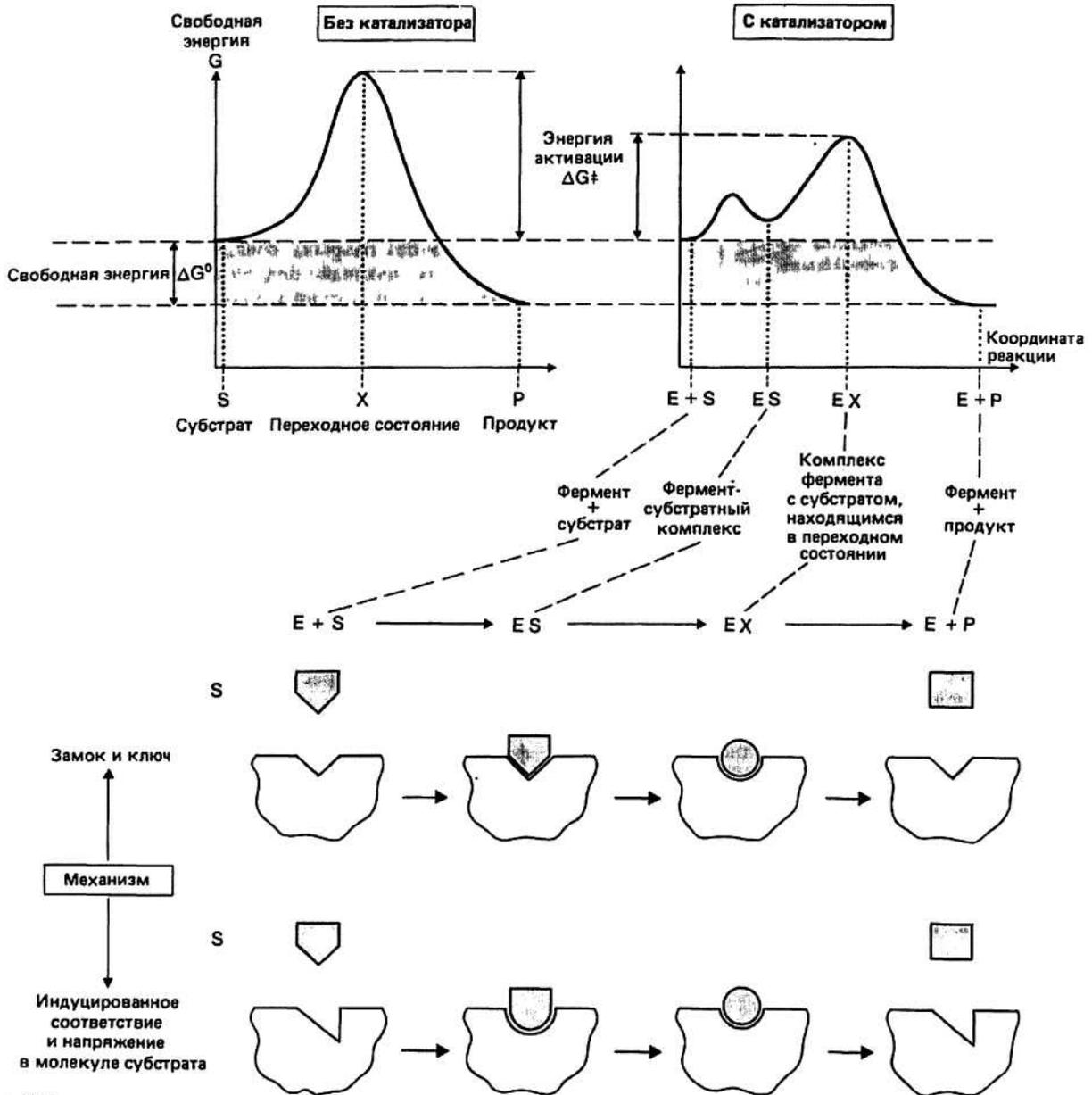


Рис. 12.1.

Фермент — это белок, который увеличивает скорость биохимической реакции (т. е. работает как катализатор). Скорость реакции при этом может возрастать до 10^{10} раз по сравнению со скоростью той же реакции в отсутствие фермента.

Субстрат - это молекула (обозначаемая S), которая после взаимодействия с ферментом (E) превращается в продукт (P).

Активный центр фермента молекулы белка, где может связываться субстрат (или субстраты) с образованием фермент-субстратного (E—S) комплекса. Активный центр почти всегда построен всего лишь из нескольких аминокислотных остатков. Хотя эти остатки пространственно сближены, в линейной белковой молекуле они часто далеко отстоят друг от друга. Как правило, формирование

E—S-комплекса происходит без образования ковалентных связей, а осуществляется за счет более слабых, но и более специфических типов взаимодействий, таких как водородные связи, солевые мостики, гидрофобные силы и плотная упаковка атомов. Однако известны исключения, когда между ферментом и субстратом формируется ковалентная связь, например при образовании промежуточного продукта в ходе функционирования ферментов, принадлежащих семейству сериновых протеиназ.

Под специфичностью фермента понимают его способность отличать свой истинный субстрат от других родственных молекул. Такая избирательность обусловлена высокой специфичностью фермент-субстратных взаимодействий. Ранняя модель это взаимодействия, называемая моделью «замок и ключа», была дополнена идеей «индуцированного соответствия» (см. ниже). Специфичность узнавания у разных ферментов значительно варьирует — некоторые ферменты могут катализировать реакцию с участием только одного субстрата, тогда как другие — с несколькими химически родственными веществами. Например, формамидаза гидролизует только формамид, тогда как амидаза гидролизует любой алифатический амид.

Аналогичный «замок-ключ» для объяснения специфичности ферментов была предложена в 90-х годах XIX в. Фишером: к ферменту (замку) подходит лишь свой субстрат (ключ).

Гипотеза «индуцированного соответствия» для объяснения специфичности ферментов была высказана Кошландом в 1959 г. Согласно этой ныне общепринятой гипотезе, связывание ферментов правильного субстрата индуцирует в белке небольшие конформационные изменения. В результате этих изменений каталитические группы фермента ориентируются таким образом, что становится возможным превращение субстрата в продукт. Дальнейшее развитие модели индуцированного соответствия связано с учетом того, что конформация субстрата при связывании с ферментом также может слегка изменяться. В этом случае говорят о напряжении в молекуле субстрата. Гипотеза о существовании конформационных изменений в ферменте и субстрате при их связывании друг с другом объяснила тот факт, что молекулы, очень похожие по форме на истинный субстрат, могут связываться с ферментом, но не превращаются в продукт, т. е. действуют как ингибиторы. Таким образом, правильный субстрат — это больше, чем просто «ключ» к соответствующему «замку».

Положение равновесия реакции не зависит от присутствия или отсутствия фермента в реакционной смеси. Рассмотрим изменение свободной энергии для обратимой реакции $S \leftrightarrow P$ (соответствующий график приведен на предыдущей странице). Свободная энергия реакции ΔG^0 равна разности свободных энергий S

и P и определяет положение равновесия реакции. В присутствии любого катализатора, в том числе и фермента, свободная энергия исходных реагентов (S) и продуктов реакции (P) не изменяется и, следовательно, не изменяется ΔG^0 .

Переходное состояние, или активированный комплекс (обозначается X), — это высокоэнергетическая промежуточная структура, которая образуется во время реакции. Разность свободных энергий исходных реагентов (т. е. субстратов) и переходного состояния называется свободной энергией активации и обозначается ΔG^\ddagger . Скорость реакции зависит от величины ΔG^\ddagger : чем она меньше, тем больше скорость реакции, и наоборот.

Фермент увеличивает скорость реакции следующими способами.

1. Понижая свободную энергию переходного состояния путем стабилизации активированного комплекса.
2. Увеличивая энергию субстрата, когда тот связывается с ферментом при образовании фермент-субстратного (E—S) комплекса. В итоге уменьшается разность свободных энергий E—S-комплекса и переходного состояния.
3. Поддерживая микроокружение активного центра в состоянии, отличном от такового в водной среде. Часто у боковых цепей аминокислотных остатков, находящихся в области активного центра, способность приобретать электрический заряд изменяется по сравнению с тем случаем, когда эти цепи целиком погружены в водную среду. В результате боковые цепи могут обладать «повышенной реактивностью».
4. Располагая реагирующие атомы в правильной ориентации и на необходимом расстоянии друг от друга, так чтобы обеспечить оптимальное протекание реакции. Столкновения атомов в отсутствие фермента очень редко приводят к химической реакции, поскольку в этом случае очень редко атомы оказываются в правильной ориентации.

Ингибиторами называются молекулы, которые, связываясь с ферментом, блокируют какую-то стадию ферментативной реакции. Ингибиторы бывают *обратимыми* и *необратимыми*. Обратимое ингибирование подразделяется на *конкурентное*, *неконкурентное* и *бесконкурентное*.

Конкурентный ингибитор — это молекула, настолько похожая по своей структуре на молекулу субстрата, что фермент не может различить их. В результате связывания конкурентного ингибитора с активным центром фермента падает концентрация E—S-комплексов и, следовательно, уменьшается скорость реакции. Ингибитор обычно в продукт не превращается.

Неконкурентный ингибитор — это молекула, связывающаяся не с активным центром, а с каким-то другим участком фермента. Поскольку связывание с неконкурентным ингибитором не мешает ферменту образовывать E—S-комплекс, этот ингибитор не по-

нижает концентрацию таких комплексов, а влияет на эффективность превращения S в P.

Бесконкурентный ингибитор— это молекула, которая связывается только с фермент-субстратным комплексом и не может связаться со свободным фермен-

том. В односубстратных ферментных системах этот тип ингибирования встречается довольно редко.

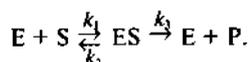
Необратимый ингибитор непрерывно модифицирует молекулы фермента, в результате чего они частично или полностью теряют свою активность.

13. Регуляция ферментативной активности



Рис. 13.1.

Кинетические свойства многих, но не всех ферментов можно объяснить в рамках модели Михаэлиса-Ментен. Согласно этой модели, субстрат S связывается с ферментом E с константой скорости k_1 . Образующийся фермент-субстратный комплекс E—S может либо диссоциировать на E и S с константой скорости k_2 либо с константой скорости k_3 превратиться в продукт P и свободный фермент:



В модели предполагается, что продукт не может обратно превращаться в субстрат, что справедливо для ранних стадий реакции, когда концентрация продукта низка. Скорость реакции v связана с концентрацией субстрата [S] следующим соотношением:

$$v = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

где V_{\max} - максимальная скорость реакции, достигающаяся в том случае, когда все молекулы фермента связаны с субстратом, а

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

K_M , константа Михаэлиса, численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции состав-

ляет половину максимальной величины. K_M — это мера сродства данного субстрата к ферменту (в том случае, когда $k_3 \ll k_2$), которое в свою очередь отражает прочность связывания субстрата с активным центром. График зависимости v от [S] представляет собой гиперболу.

График Лайнуивера-Бэрка в двойных обратных координатах. Существует альтернативный способ представления уравнения Михаэлиса-Ментен — с помощью графика двойных обратных координат, предложенного Лайнуивером и Бэрком. Перепишем уравнение в виде

$$1/v = K_M/V_{\max} \cdot 1/[S] + 1/V_{\max}.$$

Если построить зависимость $1/v$ от $1/[S]$, то мы получим прямую с наклоном K_M/V_{\max} отсекающую от оси $1/v$ отрезок длиной $1/V_{\max}$. Использование такой формы записи уравнения Михаэлиса—Ментен позволяет легко определить значения величин V_{\max} и K_M .

Конкурентные и неконкурентные ингибиторы можно отличить друг от друга по тому, как в их присутствии изменяются кинетические свойства ферментной системы. Это легче всего проиллюстрировать с помощью графика Лайнуивера—Бэрка (рис. 13.2). Если поведение фермента подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен, то это свойство фермента будет сохраняться и в присутствии ингибитора — как первого, так и второго типа. Однако при добавлении конку-

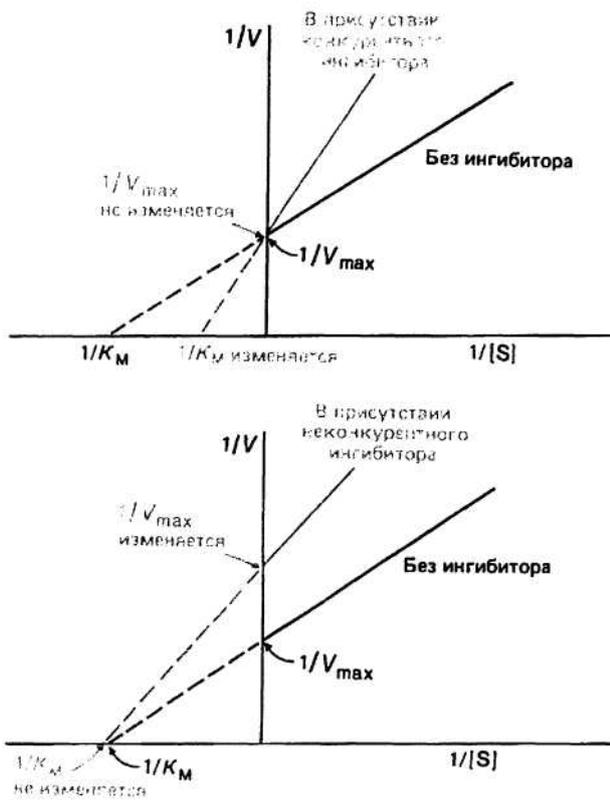


Рис. 13.2.

рентного или неконкурентного ингибитора график в двойных обратных координатах будет изменяться, причем в зависимости от типа ингибитора характер изменений будет различным.

Конкурентные ингибиторы увеличивают K_M реакции, но не влияют на V_{max} . Роль ингибитора, поскольку он конкурирует за активный центр фермента, сводится фактически к разбавлению субстрата. Следовательно, для достижения скорости реакции, равной половине V_{max} , требуется теперь большая концентрация субстрата (которая, как известно, численно равна K_M). Так как путем увеличения количества субстрата можно нейтрализовать действие ингибитора, V_{max} не меняется.

Неконкурентные ингибиторы понижают V_{max} , но не влияют на K_M . Поскольку ингибиторы этого типа не мешают связыванию субстрата с активным центром фермента, величина K_M не меняется. Механизм ингибирования состоит в снижении скорости, с которой субстрат в составе фермент-субстратного комплекса превращается в продукт, поэтому при неконкурентном ингибировании уменьшается лишь величина V_{max} .

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА может осуществляться самыми разными путями, например с помощью активации зимогена (профермента), ковалентной модификации, ингибирования по типу отрицательной обратной связи, за счет кооперативных или аллостерических эффектов.

лентной модификации, ингибирования по типу отрицательной обратной связи, за счет кооперативных или аллостерических эффектов.

Зимоген — это неактивный предшественник фермента. Чтобы зимоген превратился в активный фермент, какая-то часть (или части) его полипептидной цепи должна быть отщеплена. Например, в семействе сериновых протеиназ химотрипсиноген и трипсиноген являются зимогенами соответственно химотрипсина и трипсина.

Ковалентной модификацией называется ковалентное присоединение или отщепление от фермента небольшой химической группы, регулирующее его активность. С помощью таких модификаций обычно либо полностью неактивная форма фермента становится активной, либо, наоборот, полностью активный фермент инактивируется. Например, гликогенсинтаза из клеток млекопитающих, превращающая глюкозу в гликоген, инактивируется после ковалентного присоединения фосфатной группы к боковой цепи одного из сериновых остатков и снова активируется при отщеплении фосфата.

Ингибирование по типу отрицательной обратной связи характерно для ферментных систем, в которых субстрат претерпевает несколько последовательных превращений, причем каждая реакция катализируется своим ферментом (см., например, ферменты E_1 - E_4 на рис. 13.3). Ингибирование имеет место, если конечный продукт T блокирует одну из более ранних стадий в цепи реакций, а для этого продукт T должен быть либо структурно похожим на P (т. е. действовать как конкурентный ингибитор), либо связываться с какой-либо другой частью фермента, регулируя таким образом его активность (т. е. выступать в роли неконкурентного ингибитора).

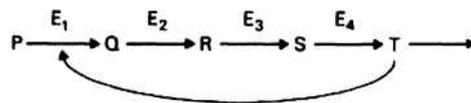


Рис 13.3

Кооперативные эффекты характерны для мульти-субъединичных белков, в том числе и для ферментов. Если имеет место кооперативный эффект, то кинетические свойства фермента уже не описываются уравнением Михаэлиса-Ментен: график зависимости v от $[S]$ в этом случае представляет собой S-образную кривую, а не гиперболу, а график Лайнуивера-Бэрка перестает быть прямой (рис. 13.1). При этом небольшое увеличение концентрации субстрата будет приводить к значительному возрастанию скорости реакции. Для объяснения этого эффекта были предложены различные модели, из которых наиболее известны модели Моно, Уаймена и Шанжэ (симметричная модель), а также Кошланда, Немети и Филмера (последовательная модель).

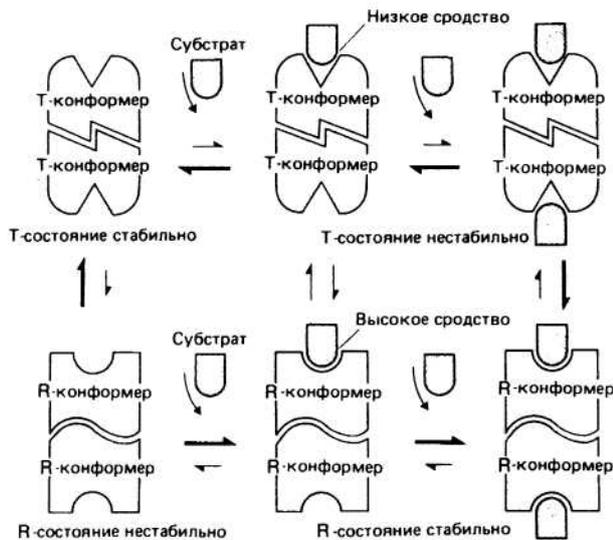


Рис. 13.4.

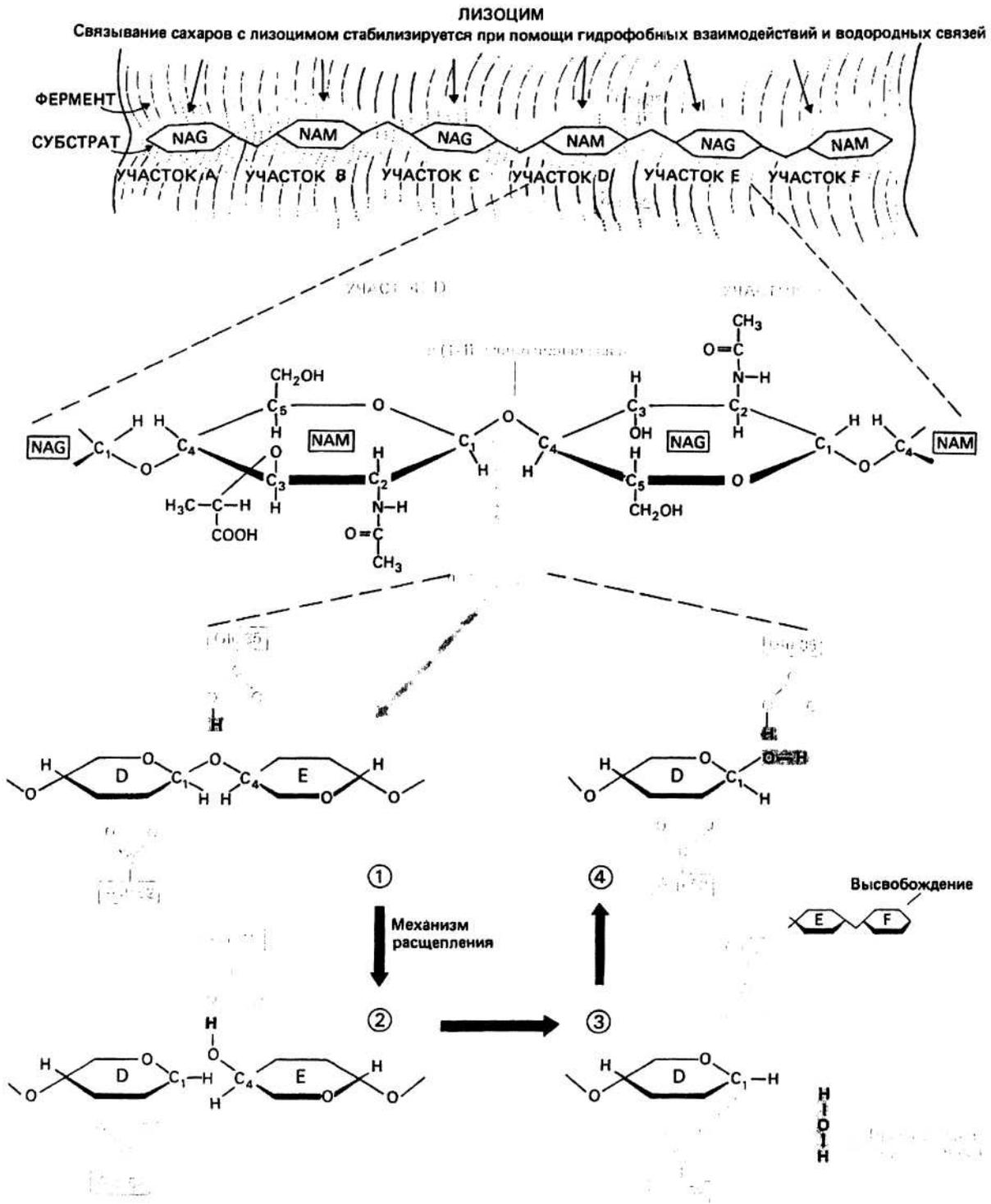
В симметричной модели предполагается, что каждый мультимерный ферментный комплекс может существовать по крайней мере в двух разных состояниях с неодинаковой четвертичной структурой, причем в каждом состоянии все субъединицы имеют одинаковую третичную структуру. В простейшей модели рассматриваются два состояния, находящиеся в равновесии друг с другом. В одном из них белок имеет высокое сродство к субстрату (R-состояние, от англ. relax — ослаблять), а в другом — низкое (T-состояние, от англ. tense - напрягать). Добавленный субстрат будет предпочтительно связываться с R-конформерами фермента, а связывание его с T-конформером приведет к возникновению напряжения в субъединицах фермента, что вызовет одновременный переход всех субъединиц в R-состояние (в котором напряжение отсутствует). При таком согласованном переходе сохраняется молекулярная симметрия каждой мультимерной молекулы. При дальнейшем добавлении субстрата все больше и больше молекул будет переходить из T- в R-состояние. Такой сдвиг равновесия в присутствии

субстрата представляет собой эффект положительной кооперативности. В результате этого эффекта график зависимости v от $[S]$ будет иметь S-образную форму (см. предыдущую страницу).

В последовательной модели предполагается что, отдельные субъединицы мультимерной молекулы могут в одно и в то же время иметь разные третичные структуры. При этом связывание субстрата одной субъединицей может вызывать изменение третичной структуры соседней субъединицы (или соседних субъединиц) и в результате увеличивать (положительная кооперативность) или уменьшать (отрицательная кооперативность) их сродство к субстрату.

Аллостерическая регуляция (от греч. *аллос* — другой и *стереос* — тело, пространство) представляет собой эффект, наблюдаемый в тех случаях, когда небольшие молекулы (эффекторы), связываясь с ферментом не в области активного центра, изменяют скорость реакции. Подобная регуляция может быть *гомотропной*, когда молекула субстрата, взаимодействуя с ферментом, изменяет его сродство к молекулам того же субстрата, и *гетеротропной*, когда сродство к субстрату изменяется при взаимодействии фермента с молекулой, не похожей на молекулы субстрата. Гомотропные и гетеротропные эффекторы могут быть *активаторами* или *ингибиторами*. Аллостерический *активатор*, действующий на фермент, описываемый симметричной моделью, будет связываться предпочтительно с R-конформером, стабилизируя это состояние. В результате активатор будет увеличивать начальную концентрацию R-конформеров по сравнению с концентрацией T-конформеров и, следовательно, увеличивать сродство фермента к своему субстрату (положительная кооперативность). Аллостерический *ингибитор*, наоборот, предпочтительно связывает и стабилизирует фермент, находящийся в T-состоянии, вызывая таким образом уменьшение сродства фермента к своему субстрату (отрицательная кооперативность). В целом роль аллостерических эффекторов заключается в том, чтобы либо расширить (в случае ингибитора), либо сузить (в случае активатора) диапазон концентраций субстрата, в котором фермент способен увеличивать скорость реакции.

14. Белки в роли ферментов: ЛИЗОЦИМ



Лизоцим — это фермент, способный разрушать определенные бактериальные клетки, расщепляя полисахаридные цепи клеточной стенки. Лишенная жесткой клеточной стенки, бактерия разрывается под действием осмотического шока, вызываемого быстрым проникновением воды внутрь клетки.

Полисахарид клеточной стенки представляет собой полимер, в котором чередуются остатки сахаров двух типов — N-ацетилглюкозамина (NAG) и N-ацетилмурамовой кислоты (NAM). Сахара, имеющие β -конфигурацию относительно аномерного C_1 атома, образуют полимерную цепь с помощью гликозидных связей между C_1 -атомом одного сахарного кольца и C_4 -атомом следующего (гл. 31).

Структура лизоцима. Лизоцим из белка куриного яйца состоит из одной полипептидной цепи, насчитывающей 129 остатков и имеющей четыре дисульфидных мостика (гл. 10). Фермент может связываться

Расщепление полисахарида осуществляется путем гидролиза гликозидной связи между сахарными кольцами, располагающимися в участках D и E. Анализ кристаллографических данных позволил предположить, что непосредственно перед и во время гидролиза сахарное кольцо в участке D имеет не обычную конформацию кресла, а конформацию полукресла, характеризующуюся тем, что в ней пять из шести атомов, образующих сахарное кольцо, лежат практически в одной плоскости (рис. 14.3)

Центральную роль в функционировании лизоцима играют остатки **глутаминовой кислоты 35** и **аспарагиновой кислоты 52**. Боковые цепи этих остатков располагаются близко к гликозидной связи (примерно на расстоянии 0,3 нм) между сахарными кольцами, локализованными в участках D и E. Glu 35 находится в неполярном окружении, и поэтому его карбоксильная группа остается протонированной (т. е.

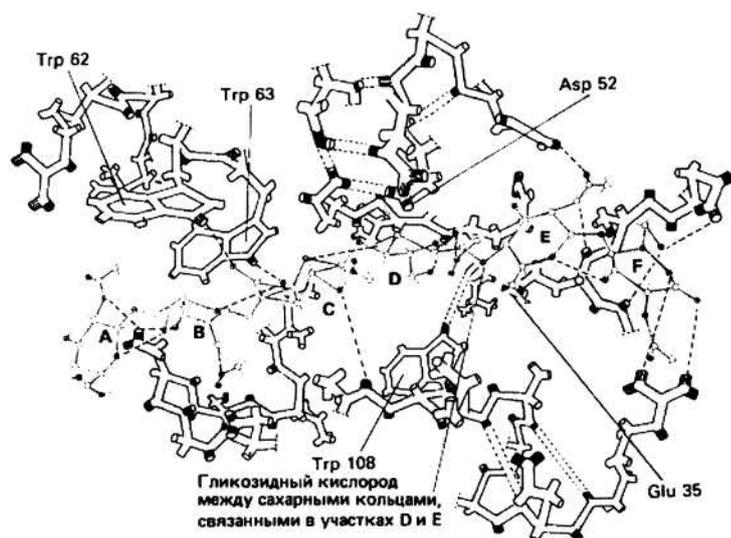


Рис. 14.2. Структура молекулы лизоцима в области активного центра. Коричневым цветом изображен связанный в активном центре субстрат (NAG-NAM). NH- и CO-группы соответственно выделены серым и черным цветами. Водородные связи изображены пунктирными прямыми. Обратите внимание на близость колец двух триптофановых остатков Trp 62 и Trp 63 к сахарам, располагающимся в участках A и B. Благодаря вандерваальсовым контактам и образованию водородных связей с этими остатками осуществляется дополнительная фиксация субстрата в активном центре.

с ингибиторами, химически сходными с полисахаридом клеточной стенки. С помощью рентгеноструктурного анализа Филлипсом и др. была определена пространственная структура белка как такового и белка, закристаллизованного вместе с ингибитором. Оказалось, что лизоцим состоит из двух доменов, образующих щель, в которой находится активный центр, способный связать гексозахарид, причем для связывания каждого из шести сахарных колец на ферменте имеется свой участок (эти участки обозначаются буквами A, B, C, D, E и F) (рис. 14.2).

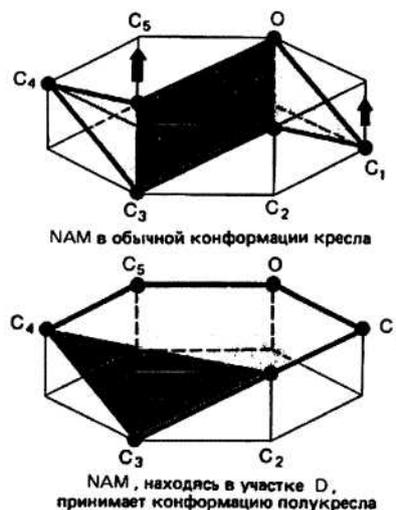


Рис. 14.3.

находится в форме $-\text{COOH}$). Окружение Asp52, наоборот, полярно, поэтому карбоксильная группа этого остатка депротонирована (т. е. находится в форме $-\text{COO}^-$).

Реакцию гидролиза можно подразделить на несколько этапов.

1. $-\text{COOH}$ -группа остатка Glu 35 предоставляет свой протон гликозидному кислороду, что приводит к разрыву связи между этим атомом кислорода и C_1 -атомом сахарного кольца, располагающегося в участке D. Получившийся в результате фрагмент исходного

полисахарида, включающей в себя сахарные кольца, которые находятся в участках E и F, является продуктом и может освободиться из комплекса с ферментом.

2. Сахарное кольцо, располагающееся в D-участке, имеет искаженную конформацию, соответствующую конформации переходного состояния. При этом C₁-атом оказывается положительно заряженным. Углеродный атом в таком состоянии называется карбоний-ионом. Он стабилизируется с помощью отрицательного заряда близко расположенного остатка Asp 52.

3. Гидроксильный ион (OH⁻), донором которого служит молекула воды из окружающей среды, присоединяется к карбоний-иону, после чего второй фрагмент расщепленного полисахарида становится продуктом реакции. Одновременно из-за связывания иона водо-

рода (H⁺) протонируется карбоксильная группа Glu 35, переходя в форму —COOH.

4. Теперь фермент находится в первоначальном состоянии и готов осуществлять следующую реакцию расщепления полисахарида.

Этот пример позволяет проследить некоторые общие принципы ферментативного катализа

1. Увеличение энергии субстрата за счет искажения структуры сахарного кольца NAM, находящегося в участке D.

2. Наличие необычного окружения Glu 35, обуславливающее появление реакционноспособного протона.

3. Правильная ориентация протона в Glu 35, необходимая для атаки гликозидной связи.

4. Уменьшение свободной энергии переходного состояния за счет стабилизации карбоний-иона карбоксильной группой остатка Asp 52.

15. Белки в роли переносчиков: глобины

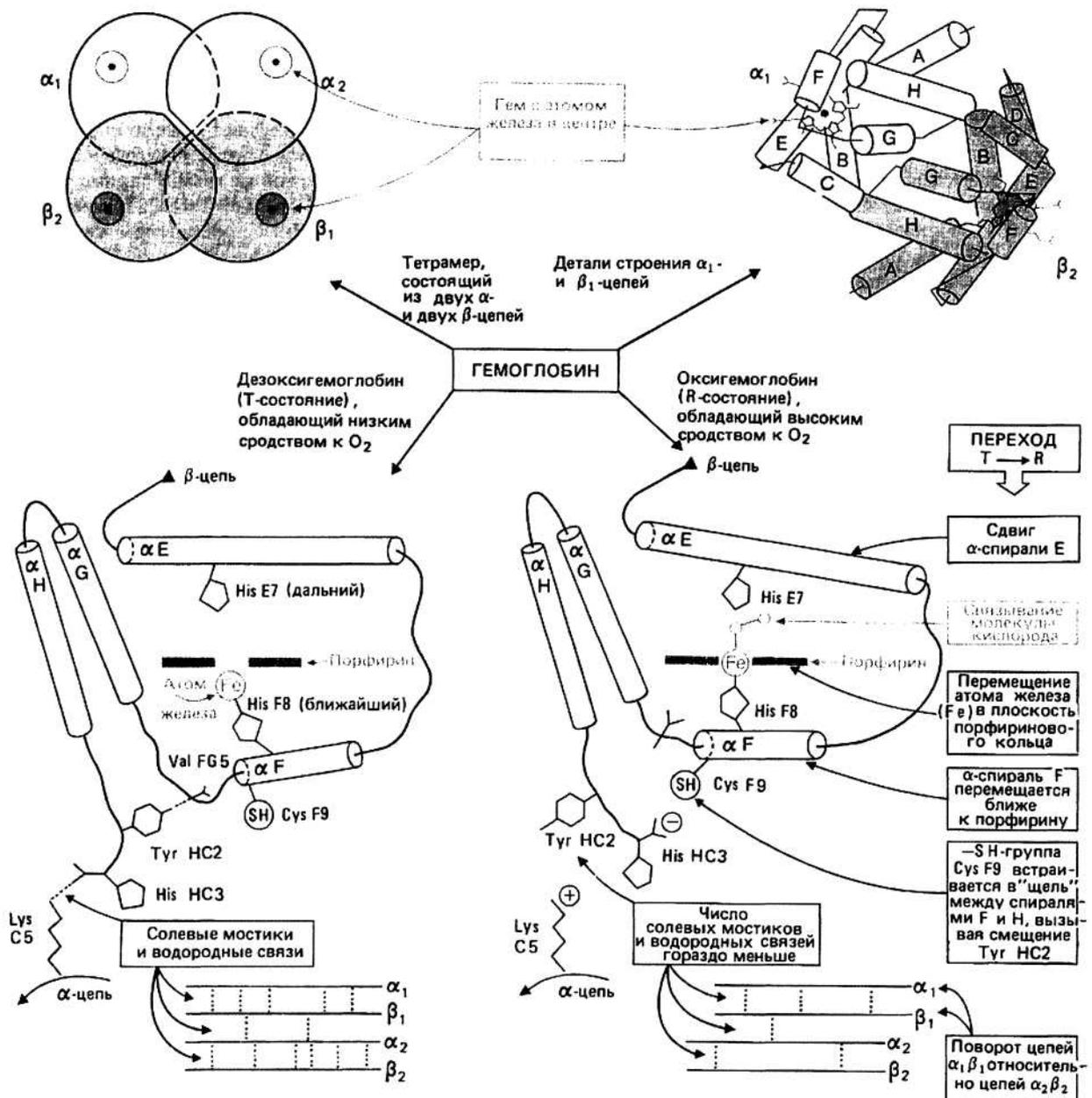


Рис. 15.1.

Гемоглобин - это белок, переносящий кислород от легких к тканям и осуществляющий транспорт углекислого газа от тканей обратно к легким. Гемоглобин локализован в красных кровяных клетках — эритроцитах. Молекула гемоглобина состоит из четырех полипептидных цепей - двух идентичных α -цепей (обозначаемых α_1 и α_2) и двух идентичных β -цепей

(обозначаемых β_1 и β_2). Каждая цепь связана с особой группой — гемом.

Миоглобин — это белок, переносящий кислород в мышечных клетках. Он состоит из одной полипептидной цепи и имеет один гем. Аминокислотная последовательность миоглобина отличается от последовательностей как α -, так и β -цепей гемоглобина, однако ме-

15. Белки в роли переносчиков: глобины

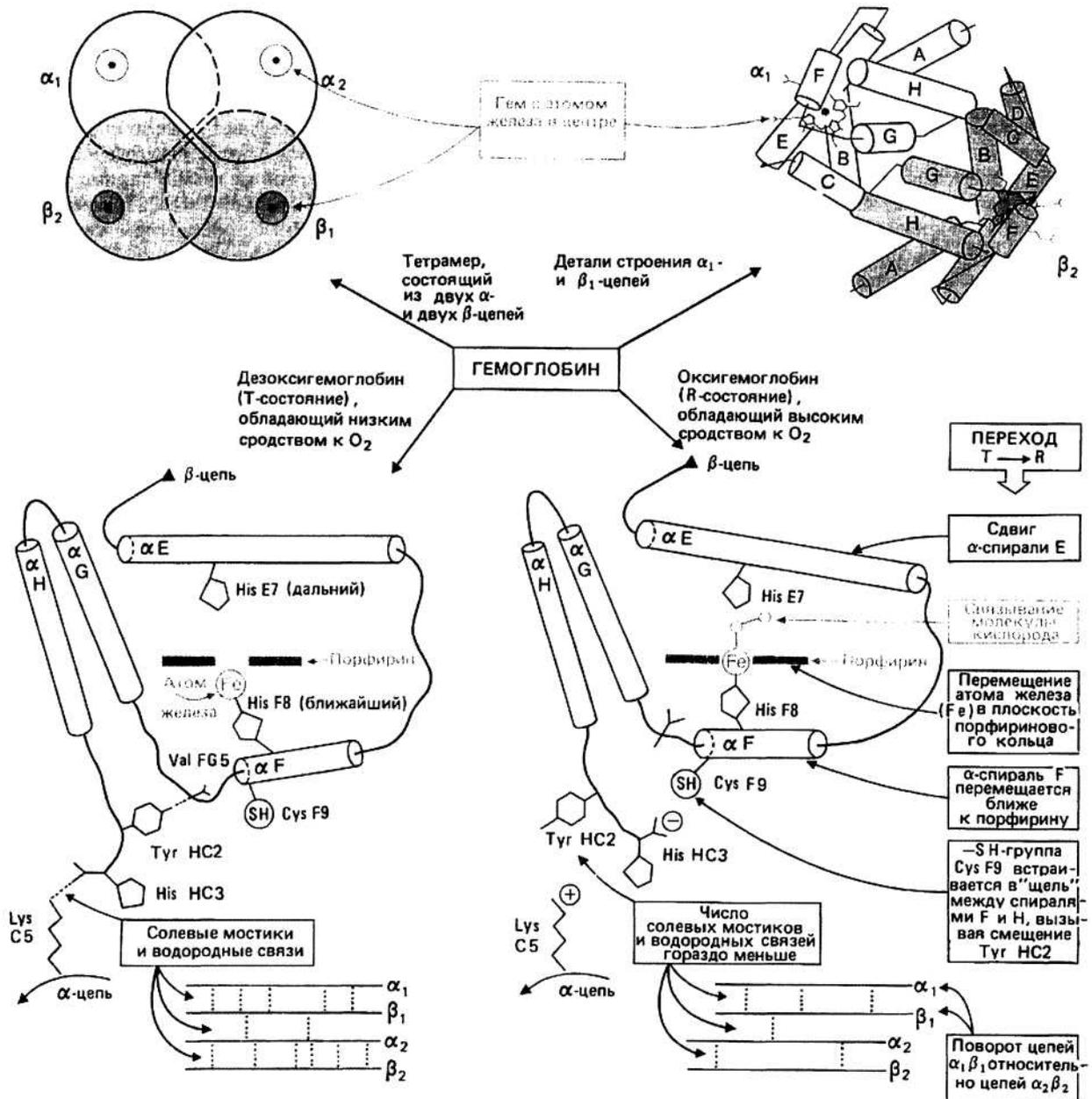


Рис. 15.1.

Гемоглобин - это белок, переносящий кислород от легких к тканям и осуществляющий транспорт углекислого газа от тканей обратно к легким. Гемоглобин локализован в красных кровяных клетках — эритроцитах. Молекула гемоглобина состоит из четырех полипептидных цепей - двух идентичных α -цепей (обозначаемых α_1 и α_2) и двух идентичных β -цепей

(обозначаемых β_1 и β_2). Каждая цепь связана с особой группой — гемом.

Миоглобин — это белок, переносящий кислород в мышечных клетках. Он состоит из одной полипептидной цепи и имеет один гем. Аминокислотная последовательность миоглобина отличается от последовательностей как α -, так и β -цепей гемоглобина, однако ме-

жду всеми тремя последовательностями имеется определенное сходство (гл. 16). В каждой цепи содержится примерно 140—150 остатков.

Используя метод рентгеноструктурного анализа, Кендрью и Перутц с сотрудниками определили пространственные структуры миоглобина и гемоглобина.

Третичная структура α - и β -цепей гемоглобина и цепи миоглобина оказалась сходной. Во всех трех полипептидах около трех четвертей остатков входит в состав ос-спиралей. Все три цепи состоят из шести длинных ос-спиральных сегментов, обозначаемых А, В, Е, F, G и Н, в каждом из которых находятся от 10 до 25 остатков (гл. 10). В области между спиральями В и Е структура цепей различается. В миоглобине имеются две дополнительные α -спирали, С и D, которые в цепях гемоглобина либо отсутствуют, либо деформированы. Общая укладка α -спиралей во всех трех цепях настолько похожа, что принято говорить о «глобиновом типе сворачивания». Соседние вдоль цепи α -спирали связаны перемычками из нескольких остатков. Эти перемычки имеют нерегулярные конформации. В глобинах остатки иногда обозначаются согласно тому, какое место по порядку они занимают и в какой α -спирали. Например, HisF8 р-цепи — это восьмой остаток в α -спирали F, ValFG5 — пятый остаток перемычки между ос-спиральями F и G, а TugHC2 — это второй остаток в С-концевом нерегулярном участке, расположенном за α -спиралью Н.

Гем состоит из атомов углерода, азота и водорода, образующих плоское кольцо, называемое порфирином. В центре этого кольца находится атом железа, связанный с атомами кольца четырьмя из шести своих возможных координационных связей.

К гему примыкают два остатка His. **Ближайший гистидин** (HisF8) связан с атомом железа через пятую координационную связь. По шестой связи присоединен кислород.

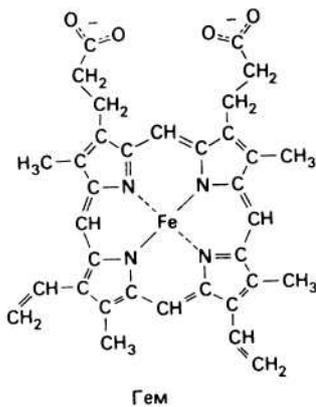


Рис. 15.2.

Дальний гистидин (HisE7) располагается с противоположной стороны порфиринового кольца по отношению к HisF8 и не образует связи с гемовым железом — здесь должно остаться достаточно свободного пространства для размещения кислорода.

Дезоксигемоглобин — это гемоглобин, не связанный с кислородом. В дезоксигемоглобине атом железа находится вне плоскости порфиринового кольца и, кроме того, имеется несколько солевых мостиков и водородных связей, которых нет в оксигенированной форме белка. Некоторые из этих связей образуются между атомами одной и той же цепи (например, водородная связь между OH-группой TugHC2 и карбонильным кислородом ValFG5 р-цепи), другие — между атомами, принадлежащими различным цепям (например, солевой мостик между LysC5 ос-цепи и концевой COO-группой р-цепи).

Оксигемоглобин — это гемоглобин, связанный с кислородом. Кислород присоединен по шестой координационной связи атома железа гема и располагается рядом с дальним остатком гистидина. При связывании кислорода атом железа перемещается в плоскость порфиринового кольца. Одновременно с этим происходят и некоторые другие конформационные изменения, в том числе сдвиг Е- и F-спиралей (рис. 15.1). Основная перестройка происходит в четвертичной структуре гемоглобина — α_1 и β_1 цепи поворачиваются как единое целое относительно α_2 - и β_2 -цепей. В результате всех этих изменений в оксигемоглобине оказывается меньше солевых мостиков, чем в дезоксигемоглобине.

Связывание кислорода миоглобином и гемоглобином можно описать с помощью кривых связывания, представленных на рис. 15.3. Степень оксигенации гемогрупп зависит от концентрации присутствующего в среде кислорода (на графике концентрация кислорода выражена в виде его парциального давления). Для миоглобина график представляет собой гипербо-

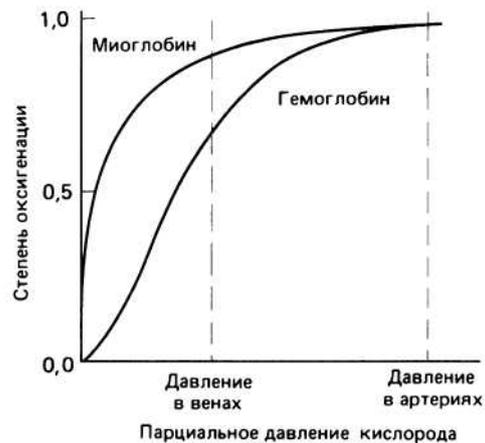


Рис. 15.3.

ду, что и следует ожидать при простом одноэтапном связывании. Однако в случае гемоглобина график имеет S-образную форму; это говорит о наличии эффекта положительной кооперативности, т. е. о том, что после оксигенации одной или большего числа субъединиц сродство остальных субъединиц к кислороду возрастает.

S-образность кривой связывания кислорода гемоглобином объясняет, каким образом в тканях происходит освобождение кислорода из этого белка. Уменьшение парциального давления кислорода при переходе от артерий к венам приводит к снижению степени оксигенации от почти 100% до примерно 75%. Кислород, диссоциировавший из комплекса с гемоглобином в венах, подхватывается миоглобином, имеющим к нему большее сродство.

Кооперативные эффекты связывания кислорода гемоглобином можно объяснить в рамках симметричной модели Моно, Уаймена и Шанжэ (гл. 13). Действительно, как и предполагается в модели, гемоглобин может находиться в двух состояниях, различающихся взаимным расположением субъединиц и числом межсубъединичных контактов. Структура белка в одном из состояний соответствует структуре дезоксигемоглобина, а в другом — структуре оксигемоглобина. В первом состоянии белок обладает меньшим сродством к кислороду и имеет больше солевых мостиков и водородных связей, чем во втором. Согласно модели Моно, Уаймена и Шанжэ, первое состояние гемоглобина — это T-форма (tense-state), а второе — R-форма (relaxed-state).

Положение равновесия между T- и R-формами зависит от концентрации кислорода — чем она выше, тем в большей степени равновесие сдвинуто в сторону R-формы. Пусть какая-то молекула гемоглобина не

связана с кислородом и при этом находится в T-состоянии. Связывание молекулы кислорода одной из цепей вызывает конформационные изменения в гемогруппе этой цепи и далее во всей субъединице. Эти изменения увеличивают вероятность перехода всей молекулы гемоглобина из T- в R-состояние. Связывание второй и третьей молекул кислорода еще больше увеличивает эту вероятность. Оказавшись в R-форме, гемоглобин еще легче связывает последнюю, четвертую молекулу кислорода. В результате гораздо более вероятно, что молекула гемоглобина не будет связывать ни одной или связывать четыре молекулы кислорода, чем какое-либо промежуточное их число.

Эффект Бора, заключающийся в высвобождении протонов при присоединении кислорода к гемоглобину, очень важен для транспорта углекислого газа из тканей к легким.

Дифосфоглицерат (ДФГ), обнаруживаемый в эритроцитах, участвует в регуляции процесса присоединения кислорода к гемоглобину. ДФГ легко образует комплекс с дезоксигемоглобином, связываясь в щели между двумя β -цепями, но обладает низким сродством к оксигемоглобину. Поэтому присутствие ДФГ в высоких концентрациях уменьшает сродство гемоглобина к кислороду и вызывает высвобождение кислорода в ткани.

Гемоглобин плода человека (фетальный гемоглобин) отличается от гемоглобина взрослых тем, что в нем две β -цепи заменены двумя γ -цепями. Гемоглобин плода связывает ДФГ менее сильно, чем дезоксигемоглобин взрослых, и поэтому имеет более высокое сродство к кислороду. В результате, когда кровь плода обогащается кислородом за счет материнской крови, что имеет место в плаценте, кислород переходит от матери к плоду с высокой эффективностью.

16. Эволюция белков

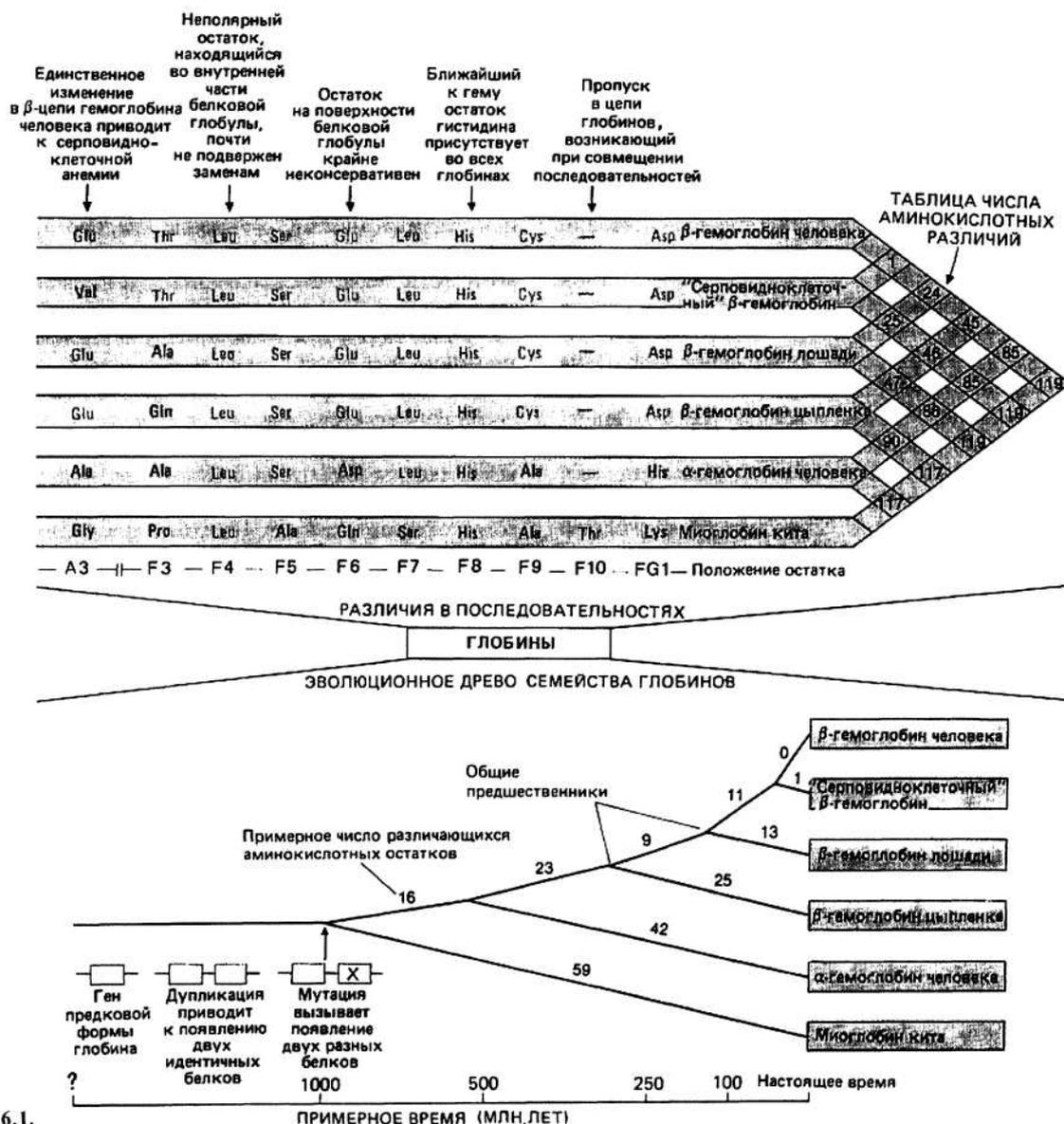


Рис. 16.1.

Глобины — это группа белков, участвующих в транспорте кислорода. Они встречаются у высших эукариот, и на примере их эволюции будет рассмотрена эволюция белков вообще.

Известные **аминокислотные последовательности** разнообразных глобинов из многих видов можно совместить друг с другом. Для этого в некоторые последовательности иногда бывает необходимо включить пропуски, как, например, в положение F10 при совмещении последовательностей α- и β-цепей гемоглобина с последовательностью миоглобина.

Инвариантным называется такой остаток, который встречается в определенном положении любой из совмещаемых последовательностей. Инвариантность почти всегда является следствием того, что данный остаток играет особую функциональную или структурную роль. Так, во всех миоглобинах и гемоглобинах в положении F8 обнаруживается His, поскольку он должен образовывать ковалентную связь с железом гема.

Термин **замена** означает изменение остатка в определенном положении одной последовательности, обнаруживаемое при совмещении ее с другой. При кон-

сервативных заменах сохраняются химические свойства боковых цепей; например, во всех глобинах остатки в положении F6 имеют полярные боковые цепи. Боковые цепи, находящиеся во внутренней части белковой глобулы, почти всегда неполярны, и эта неполярность сохраняется на протяжении всей эволюции белков. Остатки, расположенные на поверхности белков, подвергаются более частым и разнообразным заменам, поскольку в большинстве случаев на химические свойства их боковых цепей не налагается жестких ограничений.

Число различий в аминокислотных остатках для любой пары глобинов определяют, совмещая соответствующие последовательности, а результаты таких подсчетов для всего семейства глобинов могут быть представлены в виде таблицы. Для простоты часто считают, что каждый единичный пропуск эквивалентен одной замене. К примеру, при совмещении последовательностей миоглобина и α - и β -цепей гемоглобина сравнивают 155 положений и найденное число различий заносят в таблицу (рис. 16.1).

Древо родственных связей для глобинов строится на основе математического анализа числа различий в аминокислотных остатках. В результате длина «пути» от белка из одного вида до общего предшественника (точка разветвления) и затем до белка из другого вида оказывается пропорциональной числу аминокислотных различий в сравниваемых последовательностях, которое, например, в случае пары β -цепь гемоглобина цыпленка/ β -цепь гемоглобина лошади равно 47, а для пары β -цепь гемоглобина человека/ β -цепь гемоглобина лошади составляет 24.

Мутацией называется любое изменение в нуклеотидной последовательности определенного гена (гл. 27). Наиболее часто происходят так называемые точечные мутации, связанные с изменением одного азотистого основания, что влечет за собой изменение типа аминокислотного остатка в одном положении полипептидной цепи. Другие мутации приводят к вставкам или удалению одного или более аминокислотных остатков. Особым типом мутации является удвоение гена, в результате чего в организме появляются две копии одного и того же гена. Согласно теории естественного отбора, в популяции фиксируются предпочтительно выгодные мутации, т. е. мутации, дающие организму какое-то преимущество.

Дивергентная эволюция белков семейства глобинов. Все глобины имеют сходные последовательности. Этот факт объясняется происхождением их от одного общего предка. Эволюция глобинов происходила, очевидно, по дивергентному пути с помощью мутаций. Число различий в аминокислотных последовательностях между любыми двумя белками непосредственно связано с числом мутаций, зафиксированных после того, как эти два белка разошлись от своего общего предка. Поэтому древо родственных связей слу-

жит схематическим изображением эволюционного процесса и является филогенетическим деревом.

Предковый глобин как полагают, представлял собой мономерный белок с включенной в него гемогруппой и уже обладал некоторой способностью переносить кислород. В результате удвоения гена появились две его идентичные копии, которые, последовательно подвергаясь мутациям, дали начало двум разным белкам. Поскольку между $\alpha\alpha$ - и $\beta\beta$ -цепями гемоглобина существует меньше различий, чем между каждым из этих полипептидов и миоглобином, предполагают, что первоначальное удвоение гена привело к возникновению примитивных миоглобина и гемоглобина, а разделение на α - и β -цепи произошло позднее, после удвоения гена примитивного гемоглобина.

Видообразование. С помощью целого ряда методов удается проследить пути развития различных биологических видов от их общего предка. Рассмотрим с этой точки зрения ту часть филогенетического древа глобинов, которая касается β -цепей. Видно, что β -цепи лошади и человека различаются меньше, чем β -цепи цыпленка и человека. Это означает, что в эволюционном отношении человек находится ближе к лошади, чем к цыпленку. В общем случае эволюционные связи между видами, установленные на основе анализа β -цепей, довольно хорошо согласуются с соответствующими данными классической биологической таксономии. Фактически число аминокислотных различий между двумя видами может служить мерой времени, прошедшего после дивергенции их от общего предка. Значения времени, оцененные подобным способом, находятся в неплохом соответствии с аналогичными результатами, полученными с помощью других методов, таких, например, как палеонтологическое датирование.

Скорость эволюции белков можно определить как время, за которое происходит накопление в среднем 1% различий в аминокислотных последовательностях между двумя белками, дивергировавшими от общего предка. Скорость эволюции белков в пределах одного семейства постоянна (прямые на рис. 16.2), однако она сильно варьирует для белков, принадлежащих к

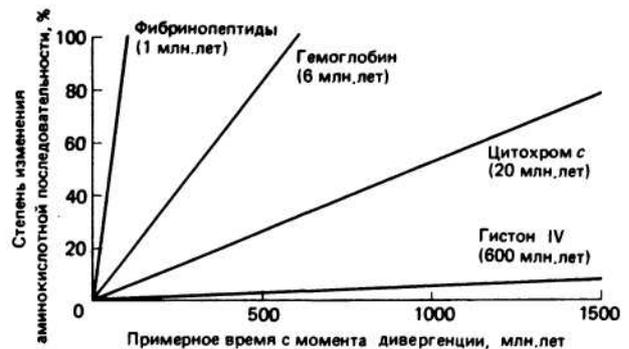


Рис. 16.2.

разным семействам, что, по-видимому, связано с разным давлением отбора. Гистон IV — это сильно основной белок, связанный с ДНК, и в сущности любое изменение его аминокислотной последовательности скорее всего нарушило бы его функцию и оказалось летальным для организма. Поэтому гистон IV эволюционирует очень медленно (1% изменений в последовательностях за 600 млн. лет). Прямо противоположным примером служат фибринопептиды — фрагменты цепи фибриногена, отщепляющиеся при превращении его в фибрин в процессе свертывания крови. Очевидно, что сохранение определенной последовательности в данном случае не столь важно, поэтому скорость эволюции фибринопептидов весьма высока (1% за 1 млн. лет). Цитохром *c* — белок, состоящий приблизительно из 105 аминокислотных остатков, — принимает участие в транспорте электронов, обнаруженном как у животных и растений, так и у бактерий. Вследствие своей широкой распространенности в природе цитохром *c* представляет собой прекрасную модель для изучения скорости эволюции белков. Скорости эволюции и цитохрома *c*, и глобинов занимают промежуточное положение между скоростями эволюции фибринопептидов и гистона IV. По сравнению с глобинами цитохром *c* эволюционирует медленнее, что говорит о более жестких ограничениях, налагаемых на структуру цитохрома *c*. Чтобы соотнести между собой временную шкалу, изображенную на рисунке, с той, которая используется в классической таксономии, нужно принять во внимание, что растения и животные дивергировали около 1200 млн. лет назад, а видообразование у млекопитающих произошло в последние 100 млн. лет.

Серповидноклеточная анемия — заболевание, возникающее при замене остатка глутаминовой кислоты в шестом положении р-цепи гемоглобина на остаток валина. Это единственное изменение приводит к уменьшению растворимости дезоксигемоглобина и к появлению у него способности агрегировать с образованием длинных волокон. В результате эритроциты приобретают вытянутую форму, напоминающую серп. Деформированные таким образом, они могут закупоривать капилляры, нарушая нормальное кровообращение, либо легко подвергаться лизису, что и является непосредственной причиной наблюдаемой

анемии. Замена Glu на Val не влияет на растворимость оксигемоглобина. Шестой остаток Р-цепи находится на поверхности тетрамерного гемоглобина. Вместо заряженной боковой цепи Glu серповидноклеточный гемоглобин несет в том же положении неполярную боковую цепь Val. В дезоксигемоглобине этот неполярный участок непосредственно контактирует с комплементарным неполярным участком, расположенным на поверхности другого тетрамерного гемоглобина, вызывая тем самым слипание молекул. Предполагают, что в оксигемоглобине комплементарный участок по каким-то причинам не может взаимодействовать с шестым Val, и поэтому агрегации не происходит.

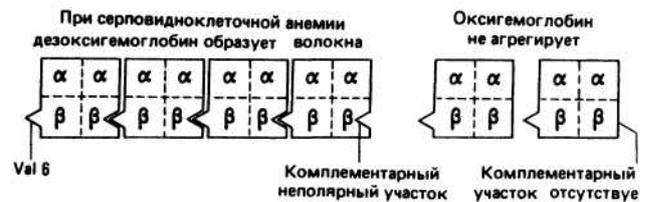


Рис. 16.3.

Пространственная структура α - и β -цепей гемоглобина человека и миоглобина кита была определена с помощью рентгеноструктурного анализа. Оказалось, что, несмотря на большое число различий в аминокислотных остатках, для всех трех белков характерен одинаковый способ трехмерной укладки цепей, известный под названием «глобинового типа сворачивания» (гл. 15). Это связано с одинаковым функциональным назначением всех трех белков — обеспечить подходящее окружение для гема, удерживающего кислород. Таким образом, выполняемая функция налагает на пространственную структуру белков более строгие ограничения, чем на их аминокислотную последовательность, и первая эволюционирует медленнее, чем вторая. Это позволяет высказать предположение о наличии эволюционных связей между различными белками (или отдельными частями различных белков), имеющими похожие пространственные структуры, даже если у этих белков не обнаруживается сходства в последовательностях.

17. Первичная структура нуклеиновых кислот

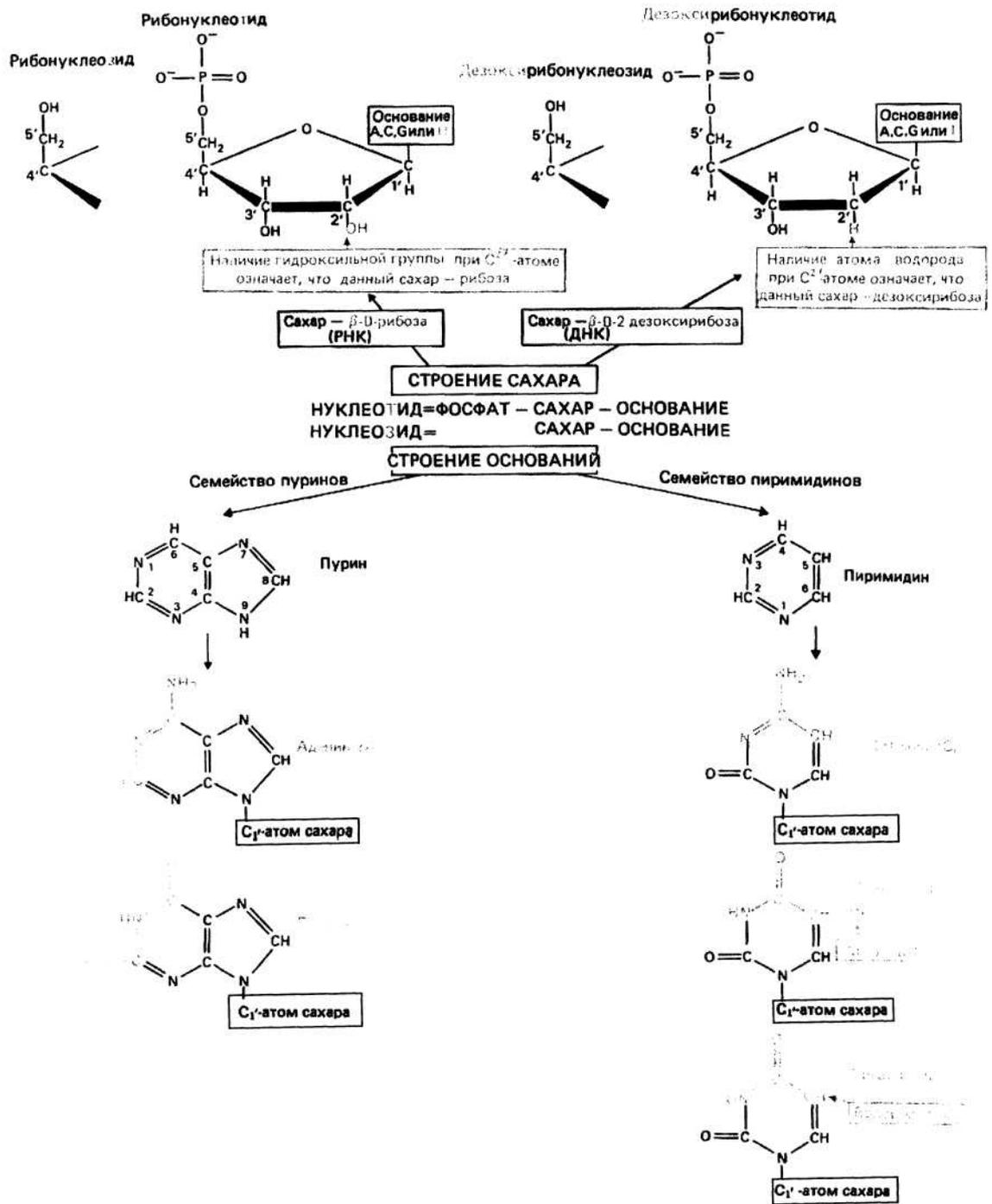


Рис. 17.1

Нуклеиновые кислоты - дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибонуклеиновая (РНК) — это полимерные макромолекулы, участвующие в хранении и переносе генетической информации. Они построены из мономерных звеньев — *нуклеотидов*.

Нуклеотид состоит из трех частей — азотистого основания, моносахарида (сахара) и одной или нескольких фосфатных групп. В составе ДНК и РНК к нуклеотидам присоединена одна фосфатная группа. *Нуклеозид* — это нуклеотид без фосфатной группы (групп). Таким образом, нуклеотиды являются фосфоэфирами нуклеозидов.

Сахар, входящий в состав нуклеотида — это пентоза, которая может присутствовать в одной из двух форм: β -D-рибозы и β -D-2-дезоксирибозы. Различие между ними состоит в том, что гидроксильная (—ОН) группа рибозы при 2'-углеродном атоме пентозы замещена в дезоксирибозе на атом водорода. Нуклеотиды, содержащие рибозу, называются рибонуклеотидами и являются мономерными звеньями РНК, а нуклеотиды, содержащие дезоксирибозу, являются дезоксирибонуклеотидами, и из них строится ДНК.

Азотистые основания представляют собой производные одного из двух соединений - пурина или пиримидина. В нуклеиновых кислотах в основном присутствуют два пуриновых производных — аденин (обозначаемый А) и гуанин (G) и три пиримидиновых — цитозин (С), тимин (Т) и урацил (U). В рибонуклеотидах используются основания А, G, С и U, а в дезоксирибонуклеотидах — А, G, С и Т. Основание присоединяется к сахару с помощью β -N-гликозидной связи, соединяющей С1'-атом пентозы с N1-атомом пиримидина или с N9-атомом пурина.

Одна, две или три фосфатные группы могут быть присоединены эфирной связью к 5'-углероду пентозы. Соответственно нуклеотиды называются нуклеозид-5'-моно-, нуклеозид-5'-ди- и нуклеозид-5'-трифосфатами и обозначаются сокращенно ХМР, ХДР и ХТР, где Х - то или иное азотистое основание. Для обозначения трех разных положений фосфата используют буквы α , β и γ . При физиологических значениях рН (близких к 7) основания не заряжены. Однако одна, две или три фосфатные группы в ХМР, ХДР и ХТР являются кислыми и несут два, три или четыре отрицательных заряда соответственно.

Номенклатура оснований, их нуклеотидов (в форме 5'-монофосфатов) и нуклеозидов приведена в табл. 17.1. Приставка перед обозначением нуклеотида указывает на то, что пентозой является дезоксирибоза.

Аденозинтрифосфат (АТР) — это главный поставщик энергии во всех клетках. Каждая из трех фосфатных групп может быть отщеплена путем гидролиза в форме ортофосфата (HPO_4^{2-}), который часто называют неорганическим фосфатом и обозначают Р_i. Гидролиз сопровождается уменьшением свободной энергии (гл. 7):

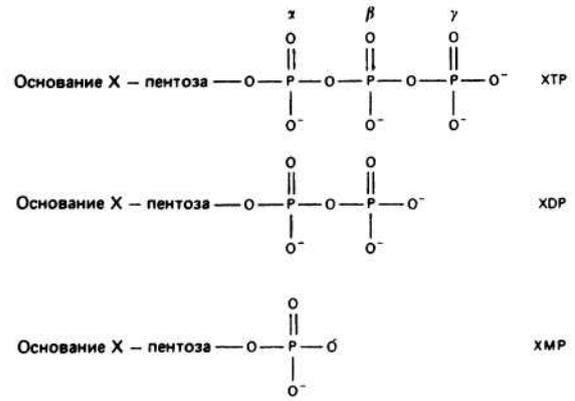
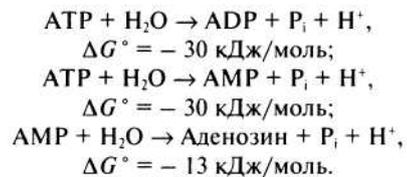


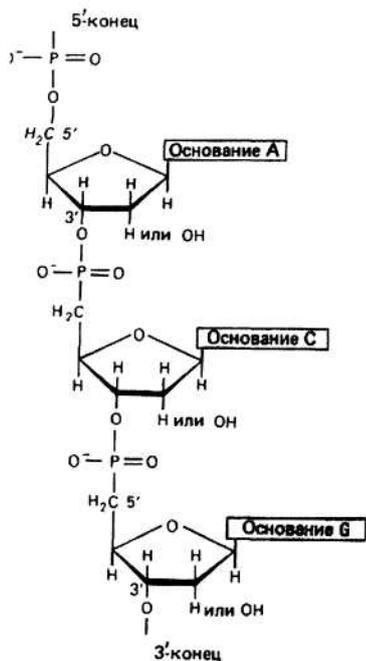
Рис. 17.2.

Таблица 17.1. Номенклатура оснований

Основание	Рибонуклеотид	Рибонуклеозид
Аденин (А)	Аденилат (АМР)	Аденозин
Цитозин (С)	Цитидилат (СМР)	Цитидин
Гуанин (G)	Гуанилит (GMP)	Гуанозин
Урацил (U)	Уридилат (иМР)	Уридин
Основание	Дезоксирибонуклеотид	Дезоксирибонуклеозид
Аденин (А)	Дезоксиаденилат (dAMP)	Дезоксиаденозин
Цитозин (С)	Дезоксицитидилат (dCMP)	Дезоксицитидин
Гуанин (G)	Дезоксигуанилат (dGMP)	Дезоксигуанозин
Тимин (Т)	Дезокситимидилат (dTMP)	Дезокситимидин



Обычно АТР, АДР и АМР в клетке находятся в комплексе с ионами магния или марганца (Mg^{2+} или Mn^{2+}). РНК и ДНК построены соответственно из связанных ковалентно рибонуклеотидных или дезоксирибонуклеотидных звеньев, образующих полинуклеотидные цепи. Звенья соединяются между собой с помощью фосфодиэфирных мостиков, связывающих 5'-гидроксильную группу одного нуклеотида и 3'-гидроксильную группу следующего. При этом образуется регулярная основная цепь фосфат—сахар—фосфат—сахар и т. д. Разные основания присоединены к сахарам аналогично тому, как присоединены боковые группы в белках. Порядок следования оснований



17.3.

вдоль цепи называется первичной структурой нуклеиновой кислоты (ср. с белками, гл. 6). Полинуклеотидная цепь обладает полярностью, и, согласно принятому соглашению, последовательность оснований читается в направлении от 5'- к 3'-углеродному атому пентозы. О первом и последнем нуклеотидах говорят, что они находятся на 5'- и 3'-концах цепи соответственно.

Часто используют упрощенную форму записи химической структуры полинуклеотида. Можно указывать просто последовательность оснований, начиная с 5'-конца молекулы, например АСГ; можно, кроме того, отметить с помощью буквы «р» положение фосфатных групп: рАрСрГ. Природу сахара указывают буквой г (рибоза) и d (дезоксирибоза): dAdCdG. Применяют и схематическую запись, в которой вертикальной чертой обозначают пентозу; к ней приписывают букву, отвечающую тому или иному основанию. Фосфатную группу, соединяющую сахара, изображают косой линией с буквой Р:

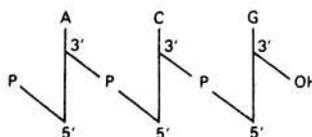


Рис. 17.4.

18. Структура ДНК

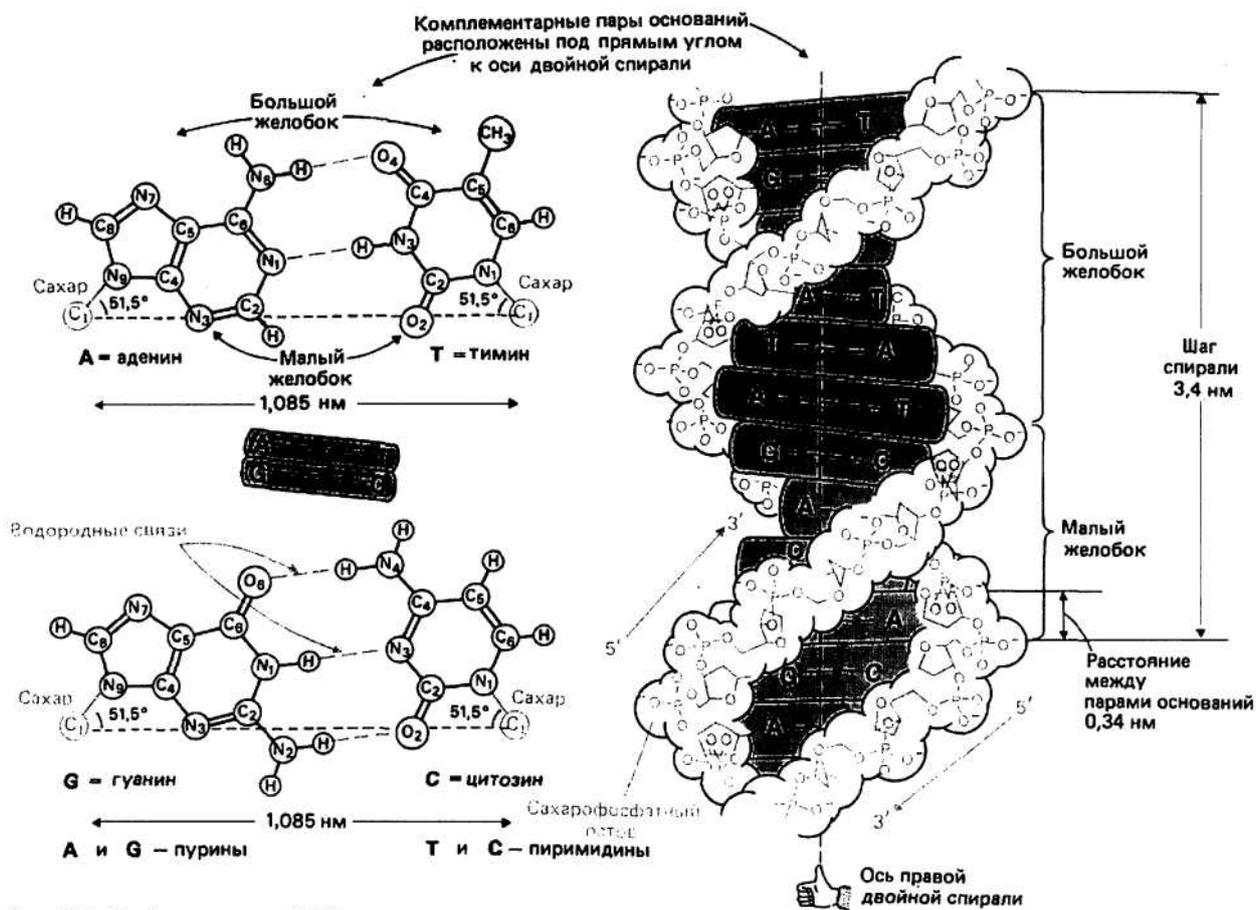


Рис. 18.1. Двойная спираль ДНК.

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота — это биологическая макромолекула, носитель генетической информации во всех эукариотических и прокариотических клетках и во многих вирусах.

Исследования на пневмококках, проведенные Эвери, Мак-Леодом и Мак-Карти в 1944 г., свидетельствовали о том, что именно ДНК является генетическим материалом. Они рассмотрели две формы бактерий — инфекционную (вирулентную, обозначаемую S), образующую гладкие колонии на агаре, и мутантную, невирулентную (обозначаемую R), образующую шероховатые колонии. Эвери и его коллеги показали, что ДНК, выделенная из убитых теплом S-бактерий, способна трансформировать невирулентную R-форму в вирулентную, причем вирулентность трансформированных R-бактерий передавалась следующим поколениям. Отсюда следовало, что ДНК несет генетическую информацию.

Исследования бактериофага T2, проведенные Херши и Чейзом в 1952 г., позволили получить дополни-

тельные данные о генетической роли ДНК. Эти авторы пытались выяснить, какой компонент вируса — ДНК или белок — ответствен за заражение бактерий *E. coli*. Они растили вирус в присутствии радиоактивных изотопов ^{32}P (чтобы пометить ДНК) и ^{35}S (чтобы пометить белок) и инфицировали этим вирусом *E. coli*. Оказалось, что инфицирующим агентом являются молекулы, содержащие ^{32}P . Таким образом, было показано, что информация, необходимая для образования новых вирусных частиц, содержится в вирусной ДНК.

ДВОЙНАЯ СПИРАЛЬ — МОДЕЛЬ СТРУКТУРЫ ДНК — была построена Уотсоном и Криком в 1953 г. Согласно этой трехмерной модели, молекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей, которые образуют правую спираль¹ относительно одной и той же оси; отсюда название — двойная спираль. Направле-

¹ Точнее — винтовую линию. — Прим. ред.

ние цепей взаимно противоположное. Сахарофосфатный остов располагается по периферии двойной спирали, а азотистые основания находятся внутри, и их плоскости перпендикулярны оси спирали.

Между основаниями образуются специфические водородные связи, в результате чего осуществляется так называемое уотсон-криковское спаривание. Аде-нин всегда образует водородные связи с тиминном, а гуанин с цитозином. Таким образом, более объемные пурины всегда спариваются с пиримидинами, имеющими меньшие размеры. Это приводит к тому, что расстояния между С1'-атомами дезоксирибозы в двух цепях оказываются одинаковыми для АТ- и СГ-пар и равными 1,085 нм. В результате АТ- и СГ-пары включаются в двойную спираль без какого-либо заметного изменения геометрии остова.

Под комплементарностью понимают взаимное соответствие последовательностей оснований в противоположных цепях ДНК. Если в одной цепи в каком-то месте стоит аденин, то в другой в этом месте должен находиться тимин, и наоборот, так чтобы между основаниями могли образовываться специфические водородные связи. Аналогично, если в одной из цепей в каком-то месте стоит гуанин, то в другой должен находиться цитозин, и наоборот. Комплементарность очень важна для копирования (репликации) ДНК (гл. 20, 21).

Соотношения между числом разных оснований в ДНК, установленные, установленные Чаргаффом и др. в 50-х годах, сыграли важную роль в построении двойной спирали. Чаргафф обнаружил, что у ДНК самого разного происхождения количество аденина равно количеству тимина, а количество гуанина — количеству цитозина, т. е. $A \equiv T$ и $G \equiv C$. Эти равенства являются следствием избирательного спаривания оснований.

Геометрия двойной спирали такова, что соседние пары оснований находятся друг от друга на расстоянии 0,34 нм и повернуты на 36° вокруг оси спирали. На один виток спирали приходится, следовательно, 10 пар оснований ($360^\circ/36^\circ = 10$), и шаг спирали равен 3,4 нм ($10 \cdot 0,34$ нм). Диаметр двойной спирали равен примерно 20 нм. В двойной спирали ДНК образуются желобки. Это связано с тем, что сахарофосфатный остов расположен дальше от оси спирали, чем основания. В двойной спирали имеются два желобка — большой и малый.

Рентгенограммы волокон ДНК, полученные Франклин и Уилкинсом между 1950 и 1953 гг., дали очень важную для построения двойной спирали информацию. Идеализированная дифракционная картина (рис. 18.2) имеет вид креста из рефлексов (пятен), образующегося из-за регулярности структуры ДНК. Расстояние между слоевыми линиями отвечает периоду 3,4 нм, т. е. шагу двойной спирали, а сильный рефлекс на 10-й слоевой линии — периоду 0,34 нм, т. е. расстоянию между парами оснований. Эти параметры относятся к В-форме ДНК (см. ниже).

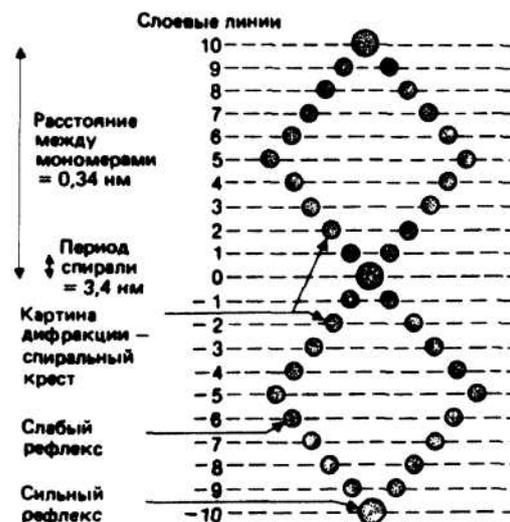


Рис. 18.2. Идеализированная картина дифракции от волокна ДНК. Анализ результатов этих измерений привел к построению модели ДНК.

Стабильность двойной связи обусловлена разными взаимодействиями. Отчасти за нее ответственны водородные связи между основаниями. Однако, по-видимому, более важную роль играет межплоскостное взаимодействие — стэкинг. При этом обеспечиваются не только выгодные вандерваальсовы контакты между атомами, но и возникает дополнительная стабилизация благодаря перекрыванию π -орбиталей атомов контактирующих оснований. Стабилизация осуществляется также за счет благоприятного гидрофобного эффекта, проявляющегося в том, что неполярные основания защищены от непосредственного контакта с растворителем. Напротив, сахарофосфатный остов с его полярными группами и заряженными атомами экспонирован, что также стабилизирует структуру.

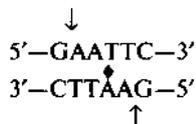
Полиморфизм ДНК — это способность двойной спирали принимать различные конформации. Рентгеноструктурные исследования кристаллов полинуклеотидов¹ выявили три основных типа структур — А-, В- и Z-формы. В-ДНК — это стандартная уотсон-криковская структура, в которой плоскости пар оснований перпендикулярны оси двойной спирали. В А-ДНК плоскости пар оснований повернуты примерно на 20° от нормали к оси правой двойной спирали. На виток спирали здесь приходится 11 пар оснований. А-ДНК образуется при высушивании волокон В-ДНК. Z-ДНК — это левая спираль с 12 парами оснований на виток. Буква Z указывает на зигзагообразную форму сахарофосфатного остова ДНК в этой форме. Плоскости оснований примерно перпендикулярны оси спирали. В клетке ДНК обычно находится в В-форме, но

¹ Коротких полинуклеотидов, так называемых олигонуклеотидов. — Прим. ред.

отдельные ее участки могут находиться в А-, Z- или даже в иной конформации¹.

Определение нуклеотидной последовательности ДНК (секвенирование) теперь не занимает много времени, и это крупное достижение позволило молекулярным биологам решить очень важную задачу определения структуры генов (гл. 26—28). Широко применяются два метода секвенирования: метод *химического расщепления* Максама и Гилберта и метод *обрыва цепи* Сэнгера и др. Каждый из них может использоваться для секвенирования фрагментов ДНК длиной лишь несколько сотен оснований. Поэтому первый этап состоит в расщеплении длинных цепей (например, целых хромосом) на фрагменты, с которыми можно вести дальнейшую работу. Для этой цели применяют *рестрицирующие ферменты*.

Рестрицирующие ферменты выделены из бактерий и бывают двух типов. При секвенировании используются только ферменты типа II, которые расщепляют (разрезают) двухцепочечную ДНК в местах со специфической последовательностью оснований, обычно имеющей размер 4—6 пар оснований (гл. 30). Рестрицирующих ферментов очень много, и каждый из них специфичен к определенной последовательности оснований. Например, фермент *EcoRI* из *E. coli* разрезает последовательность в местах, обозначенных стрелками:



Главная особенность последовательностей оснований, расщепляемых рестрицирующими ферментами, заключается в том, что они, как правило, являются палиндромами: последовательности обеих цепей, прочитываемые от 5'-к 3'-концу, оказываются одинаковыми. Такие последовательности обладают осью симметрии 2-го порядка, обозначенной на рисунке знаком \diamond .

В случае метода химического расщепления сначала метят 5'-конец молекулы ДНК радиоактивным

$^{32}\text{PO}_4$ с помощью фермента полинуклеотидкиназы. Затем ДНК обрабатывают соответствующими реагентами, расщепляющими эту цепь около определенных оснований. Такое расщепление проводят в ходе четырех параллельных реакций в условиях, когда разрыв происходит после А в одной из реакций, после G в другой, после С в третьей и после С и Т в четвертой. Условия реакций таковы, что получаются смеси, содержащие фрагменты всевозможной длины, отсчитываемой от меченого 5'-конца до каждой точки цепи, где находится данное основание. Например, если G находится в положениях 1, 5, 7 и 19 во фрагменте из 20 оснований, то одна из смесей, полученных в ходе деградации, будет содержать радиоактивные фрагменты длиной 5, 7 и 19 оснований, а также свободный G. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле каждую из четырех смесей разделяют на фрагменты разной длины. Затем гель помещают на фотопленку, на которой появляется почернение в тех местах, где находился радиоактивный материал (этот процесс называется радиоавтографией). Последовательность оснований прямо считывается с пленки, как это показано, например, на рис. 19.3.

Метод обрыва цепи использует другой подход. Он основывается на синтезе радиоактивно меченой комплементарной цепи ДНК с использованием в качестве матрицы нативной ДНК (гл. 20, 21). Синтез осуществляется с помощью фермента ДНК-полимеразы I (гл. 20, 21). В реакционной смеси присутствуют четыре немеченных дезоксирибонуклеозидтрифосфата, из которых строится комплементарная цепь ДНК. Однако помимо них в системе находится модифицированная форма одного из оснований (его 2'3'-дидезоксианалог), при включении которой рост цепи прекращается. В результате синтезируются цепочки ДНК всевозможной длины. Используются четыре реакционные смеси, в каждую из которых добавляют помимо четырех мономеров аналог одного из оснований в качестве терминатора роста цепи. Затем цепи в каждой смеси разделяют с помощью гель-электрофореза и проводят радиоавтографию. С полученной фотопленки непосредственно считывают последовательность оснований. Метод Сэнгера и др. был развит на основе более раннего, так называемого плюс-минус-метода, в котором также использовался синтез комплементарных цепей ДНК.

¹Образование Z-формы, крестообразных и иных структур стимулируется сверхспирализацией ДНК. — *Прим. ред.*

19. Структура РНК

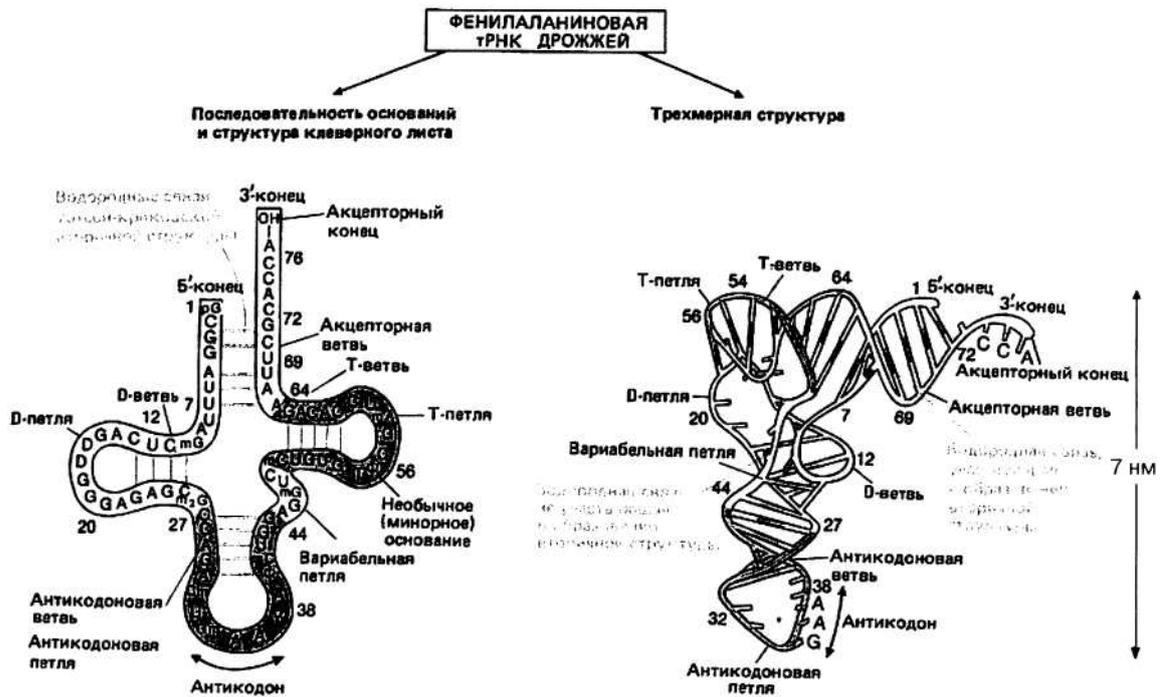


Рис. 19.1.

Рибонуклеиновые кислоты (РНК), присутствующие в клетках как про-, так и эукариот, бывают трех основных типов: информационная (матричная, мРНК), транспортная (тРНК) и рибосомная (рРНК). В ядре клеток эукариот содержится РНК четвертого типа — гетерогенная ядерная РНК (гЯРНК). У некоторых вирусов РНК служит носителем генетической информации (гл. 5). *мРНК* является копией (транскриптом) соответствующей ДНК. Этот транскрипт служит матрицей для синтеза белка. Каждые три последовательных основания мРНК (называемые кодоном) детерминируют один аминокислотный остаток. Молекулы *тРНК* переносят специфические аминокислотные остатки к определенному участку мРНК в ходе синтеза белка. В настоящее время структура тРНК хорошо из-

вестна (см. ниже). Молекулы *рРНК* встречаются в различных формах и образуют в комплексе с белками рибосому (гл. 24) — сложную органеллу, в которой происходит синтез белка.

Сведберг (S)-единица измерения коэффициента седиментации, являющегося мерой массы макромолекулы (гл. 44). Его находят, измеряя скорость осаждения молекул в центробежном поле. Значения коэффициента седиментации РНК *E. coli* приведены в табл. 19.1.

Транспортная РНК (тРНК) узнает соответствующий кодон в мРНК и переносит нужную аминокислоту к растущей полипептидной цепи. Узнавание кодона в мРНК осуществляется с помощью трех последовательных оснований в тРНК, называемых антикодо-

Таблица 19.1. Характеристики разных РНК *E. coli*

Тип РНК	Содержание, %	Коэффициент седиментации, S	Мол. масса, M _r	Число нуклеотидов
рРНК	80	23	1 000 000	3000
		6	500 000	1500
		5	35 000	100
тРНК	15	4	25 000	75
мРНК	5	4-26	25 000-1000 000	75-3000

ном. Аминокислотный остаток может присоединяться к 3'-концу молекулы тРНК. Специфичность такой системы переноса обеспечивается тем, что имеется по крайней мере одна тРНК для каждой аминокислоты. Так, тРНК для Phe обозначается тРНК_{Р_he}.

Химическая структура тРНК. Молекула тРНК состоит примерно из 75 нуклеотидов, ковалентно связанных друг с другом в линейную цепочку с мол. массой $M_r = 25000$ и коэффициентом седиментации 4S. Установлены нуклеотидные последовательности многих тРНК; первая из них — для тРНК_{Ala} из дрожжей — была определена Холл и в 1965 г. Все тРНК начинаются с фосфорилированного 5'-конца; первым основанием обычно является G. На 3'-конце всегда присутствуют три основания — CCA и концевая 3'-гидроксильная (—ОН) группа. Составляющими тРНК являются не только четыре обычных основания A, C, G и U, но также несколько необычных, или минорных, оснований. Например, в дрожжевой тРНК_{Phe} минорными основаниями являются псевдоуридин (обозначаемый Ψ), дигидроуридин (D) и основание, обозначаемое Y. Кроме того, в некоторых обычных основаниях один или два атома водорода могут быть замещены на метильные (CH₃) группы; метилированные или димети-лированные основания отмечаются соответственно с помощью символов m или t₂ при букве, обозначающей то или иное основание.

Клеверный лист — это структурное представление молекулы тРНК, полученное из условия образования максимального числа уотсон-криковских пар оснований при данной нуклеотидной последовательности. Участки, в которых с помощью водородных связей образовались такие пары оснований, называются стеблями, а одноцепочечные участки — петлями. Все известные тРНК образуют «клеверный лист» с четырьмя стеблями (акцепторным, D, антикодоновым и T) и тремя петлями (D, антикодовой и T). Некоторые тРНК имеют дополнительные петли и/или стебли (например, вариабельная петля дрожжевой тРНК_{Phe}).

Трехмерная структура дрожжевой тРНК_{Phe} была установлена с помощью рентгеноструктурного анализа кристаллов этой тРНК. Термин «вторичная структура» относится к расположению в пространстве атомов внутри стебля. Третичная структура — это пространственное расположение всех частей молекулы.

Вторичная структура Каждый стебель состоит из двух антипараллельных цепей, основания которых образуют друг с другом уотсон-криковские пары с помощью водородных связей. Такое пространственное расположение, установленное экспериментально, было правильно предсказано исходя из структуры клеверного листа. Стебли имеют форму правой двойной спирали, известной как A-форма РНК.

Двойная спираль РНК в А-форме содержит 11 пар оснований на виток, шаг спирали равен 3,1 нм. Расстояние между соседними парами оснований вдоль

оси спирали составляет 0,28 нм (3,1 нм/11); они повернуты друг относительно друга на угол 33° (360°/11). Плоскости оснований составляют ~20° с нормалью к оси двойной спирали. А-форма РНК близка к А-форме ДНК (гл. 18). РНК не способна переходить в В-форму. Это обусловлено присутствием в ней объемной 2'-гидроксильной группы рибозы, которой нет в дезоксирибозе.

Третичная структура тРНК. Молекула напоминает по форме букву Г. Она значительно более вытянута, чем глобулярные белки той же молекулярной массы. Акцепторный и Т-стебли уложены в пространстве таким образом, что образуют одну непрерывную спираль — «перекладину» буквы Г; антикодоновый и D-стебли образуют «ножку». Эти две части содержат каждая около 10 пар оснований. Почти все основания в тРНК участвуют в вандерваальсовых и гидрофобных взаимодействиях, стабилизирующих пространственную структуру молекулы.

В тРНК имеются разнообразные водородные связи. В стеблях, являющихся двойными спиралями, образуются уотсон-криковские водородные связи. Многие основания, расположенные вне стеблей, образуют водородные связи с другими основаниями, но эти связи отличаются от уотсон-криковских. Помимо этого 2'-гидроксильные группы полинуклеотидной цепи также образуют водородные связи — с основаниями и с атомами водорода основной цепи.

Антикодон молекулы тРНК — это три последовательных основания, с помощью которых распознается соответствующий кодон мРНК. Узнавание осуществляется путем образования уотсон-криковских водородных связей между основаниями кодона, с одной стороны, и антикодона — с другой, при условии что полинуклеотидные цепи антипараллельны (рис. 19.2).

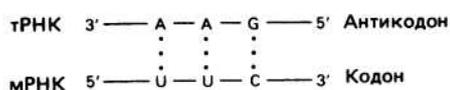


Рис. 19.2.

ДРУГИЕ МОЛЕКУЛЫ РНК. К таким молекулам относятся мРНК и одноцепочечная вирусная РНК. Их нуклеотидная последовательность также была определена экспериментально. Эти исследования показали, что отдельные участки молекул РНК могут, подобно тРНК, образовывать шпильки, стабилизированные водородными связями. Двухцепочечная вирусная РНК, по-видимому, находится в А-подобной форме. Для более подробного изучения строения всех этих молекул необходимы рентгеноструктурные исследования.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ РНК в настоящее время может осуществляться очень быстро, причем сразу для участков длиной в несколько сотен оснований. Раньше

эта процедура была весьма длительной и трудоемкой и можно было определять последовательность участков РНК длиной не более 100 оснований (как в работе Холли 1965 г.; см. выше). Ныне для этой цели используется ряд методов. Здесь применяют два основных подхода — *прямой подход* и *метод копирования*.

В случае **прямого подхода** определяют последовательность оснований в самой РНК. Сначала метят 5'-или 3'-конец молекулы РНК с помощью $^{32}\text{PO}_4$. Затем меченую цепь расщепляют с помощью ферментов, специфичных к определенным последовательностям. Проводя гель-электрофорез и радиоавтографию, получают карту, по которой находят последовательность оснований, подобно тому как это делается для ДНК (гл. 18).

В методе копирования вначале синтезируют цепочку ДНК, комплементарную РНК, и затем с помощью методов, описанных в гл. 18, определяют ее нуклеотидную последовательность. Для получения комплементарной цепи ДНК обычно используют обратную транскриптазу. Это фермент обнаружен в некоторых вирусах и осуществляет обратную транскрипцию, т. е. катализирует процесс синтеза ДНК (обозначаемой кДНК),

комплементарной РНК-матрице. (Обратная транскрипция — это процесс, играющий ключевую роль и при клонировании генов; см. гл. 30.) Пусть, например, какой-то участок РНК имеет последовательность 3'-GGGUCA. Тогда кДНК будет иметь последовательность 5'-GCCAGT. Применяв метод химического расщепления для секвенирования ДНК (гл. 18), получают радиоавтограмму, представленную на рис. 19.3.

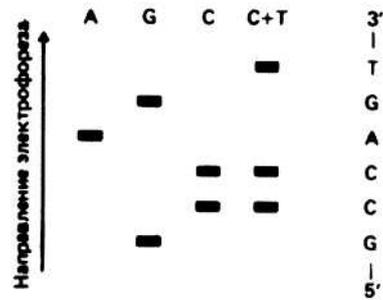


Рис. 19.3.

20. Основы репликации

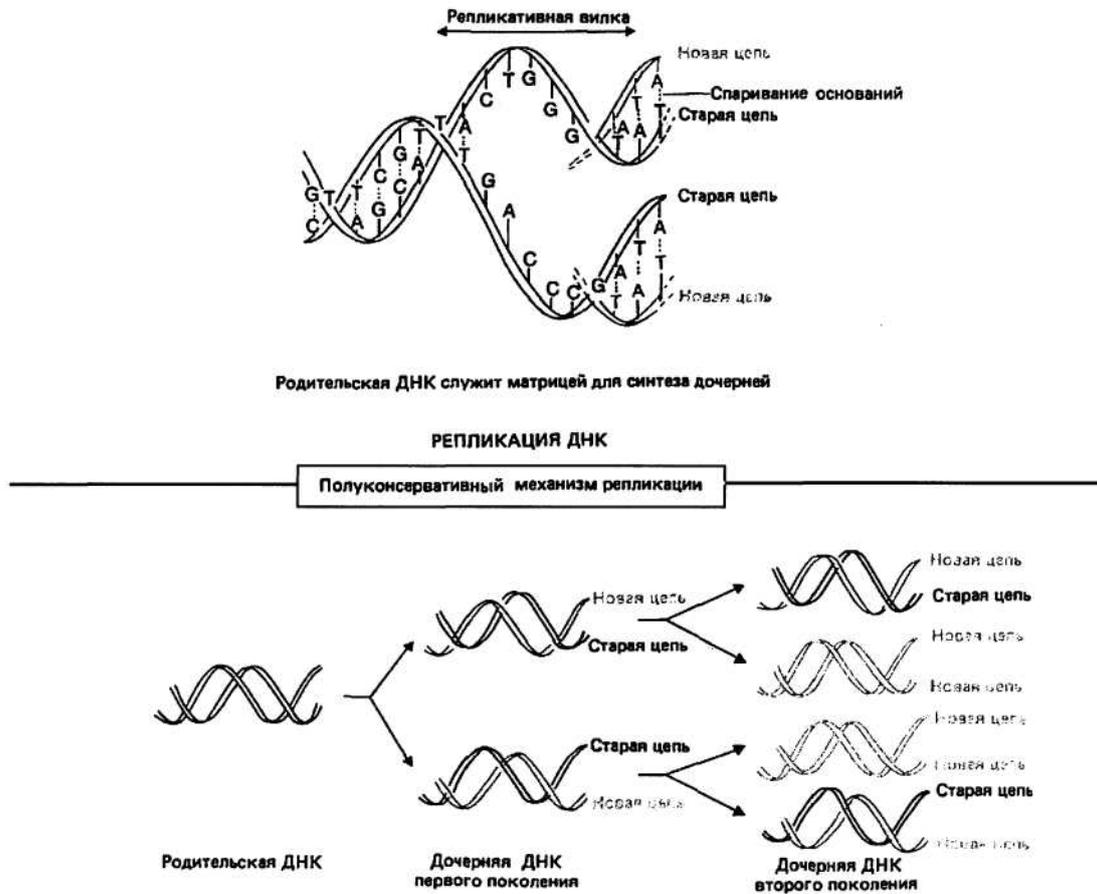


Рис. 20.1.

Репликация ДНК — это процесс, при котором информация, закодированная в последовательности оснований молекулы родительской ДНК, передается с максимальной точностью дочерней ДНК. Мы рассмотрим здесь репликацию только двухцепочечной ДНК; репликация одноцепочечной вирусной ДНК описана в гл. 4.

При полуконсервативной репликации дочерние клетки первого поколения получают одну цепь ДНК от родителей, а вторая цепь является вновь синтезированной. Такой же процесс повторяется при образовании дочерних клеток второго поколения из клеток первого поколения. Таким образом, только две из четырех дочерних клеток второго поколения содержат по одной цепи исходной родительской ДНК, образующей двойную спираль с новосинтезированной цепью. Остальные две дочерние клетки второго поколения не содержат исходной родительской ДНК. Процесс полуконсервативной репликации на протяжении двух поколений иллюстрирует рис. 20.1.

Мезельсон и Сталь в 1958 г. доказали, что репликация ДНК происходит по полуконсервативному механизму. Сначала они выращивали бактерии длительное время на среде, содержащей тяжелый изотоп азота (^{15}N), который включался в ДНК, а затем переносили их на среду, содержащую обычный (легкий) изотоп азота (^{14}N). После репликации дочернюю ДНК первого поколения фракционировали по плотности. Оказалось, что вся дочерняя ДНК однородна и имеет плотность, промежуточную между плотностью тяжелой и легкой ДНК. Следовательно, одна цепь молекулы дочерней ДНК содержала ^{15}N , а другая ^{14}N , что отвечает полуконсервативному механизму репликации.

Спаривание оснований в родительской ДНК означает, что против G в одной цепи всегда располагается C, а против A - всегда T. При репликации цепи родительской ДНК расплетаются, и каждая из них служит матрицей, определяющей последовательность оснований в новой, комплементарной цепи ДНК. Таким образом, информация, заключенная в последователь-

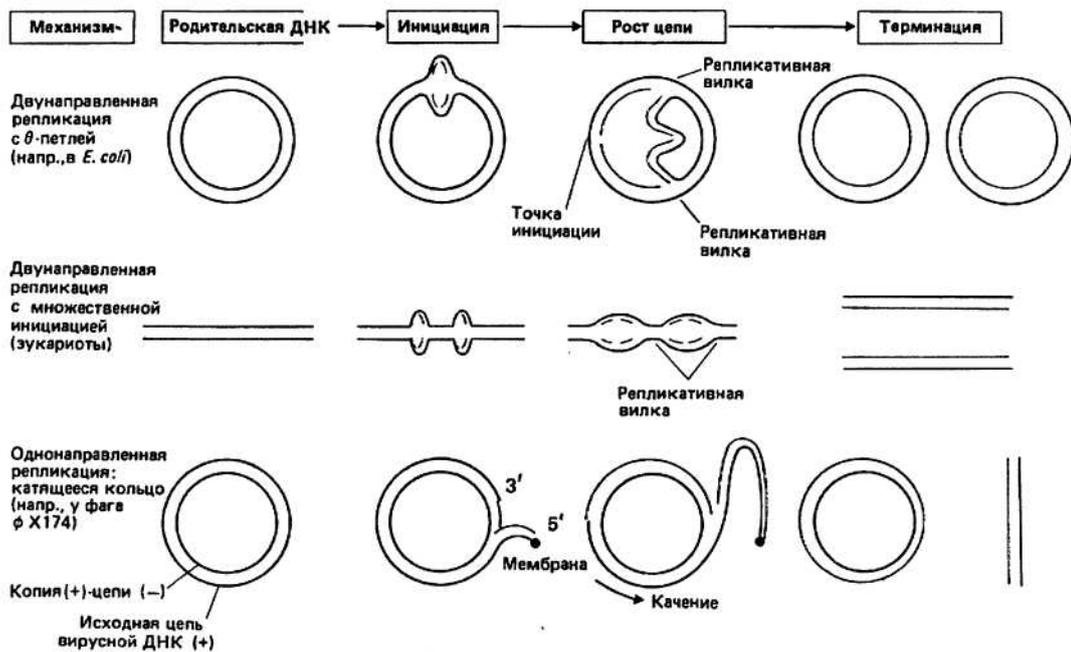


Рис. 20.2.

ности оснований ДНК, с высокой точностью передается следующему поколению.

Инициация синтеза в небольших геномах эукариот (вирусов) и прокариот (например, *E. coli*) происходит в одной строго определенной точке. Репликация ДНК у прокариот осуществляется довольно быстро: у *E. coli* ее скорость составляет 1700 пар оснований в 1 с, так что весь геном копируется за 40 мин. В более крупных клетках, например в клетках животных, репликация происходит медленнее — скорость ее составляет примерно 50 пар оснований в 1 с. Однако инициация в этом случае осуществляется сразу в нескольких местах молекулы ДНК, т. е. в ДНК эукариот образуется много единиц репликации, называемых репликаонами. В результате хромосома дрозофилы, например, состоящая из $65 \cdot 10^6$ пар оснований, реплицируется за несколько минут. Для инициации репликации двухцепочечная ДНК должна расплестись в точке начала репликации и образовать петлю (рис. 20.2).

Репликативная вилка - это та часть молекулы ДНК, которая уже расплелась и в данный момент служит матрицей для синтеза дочерней ДНК. В ходе репликации репликативная вилка перемещается вдоль молекулы.

Двунаправленная репликация — это наиболее распространенный механизм репликации ДНК. После инициации репликация идет одновременно в обоих направлениях вдоль цепи ДНК. Для осуществления синтеза двойная спираль родительской ДНК должна

раскрутиться и ее цепи должны разойтись. В этих процессах участвуют различные белки (гл. 21). В линейной ДНК раскручивание осуществляется путем вращения одной цепи вокруг другой. В двухцепочечной кольцевой ДНК, например в ДНК *E. coli*, раскручивание и репликация ведут к образованию структуры, напоминающей кольцо с внутренней петлей. Ее называют тэта-петлей, поскольку по форме она похожа на греческую букву Θ .

Кэрнс первым наблюдал такие петли с помощью радиоавтографии. Культуру *E. coli* выращивали на среде, содержащей радиоактивные нуклеотиды, которые включались в ДНК. Затем реплицирующуюся ДНК наносили на фотопленку, на которой и получалось изображение Θ -петли.

Однонаправленная репликация — более редкое явление; она наблюдается у некоторых вирусов, содержащих одноцепочечную ДНК, например у вируса ϕ X174. Однонаправленная репликация происходит после образования двухцепочечной формы ДНК в клетке-хозяине. Механизм, с помощью которого это осуществляется, называется механизмом катящегося кольца. В одной из цепей ДНК (наружной на рис. 20.2) образуется разрыв, и синтез новой цепи начинается с 3'-конца этой разорванной родительской цепи с использованием второй (внутренней) в качестве матрицы. Это приводит к вытеснению 5'-конца наружной цепи, которая впоследствии служит матрицей для синтеза другой новой цепи.

21. Репликация у прокариот

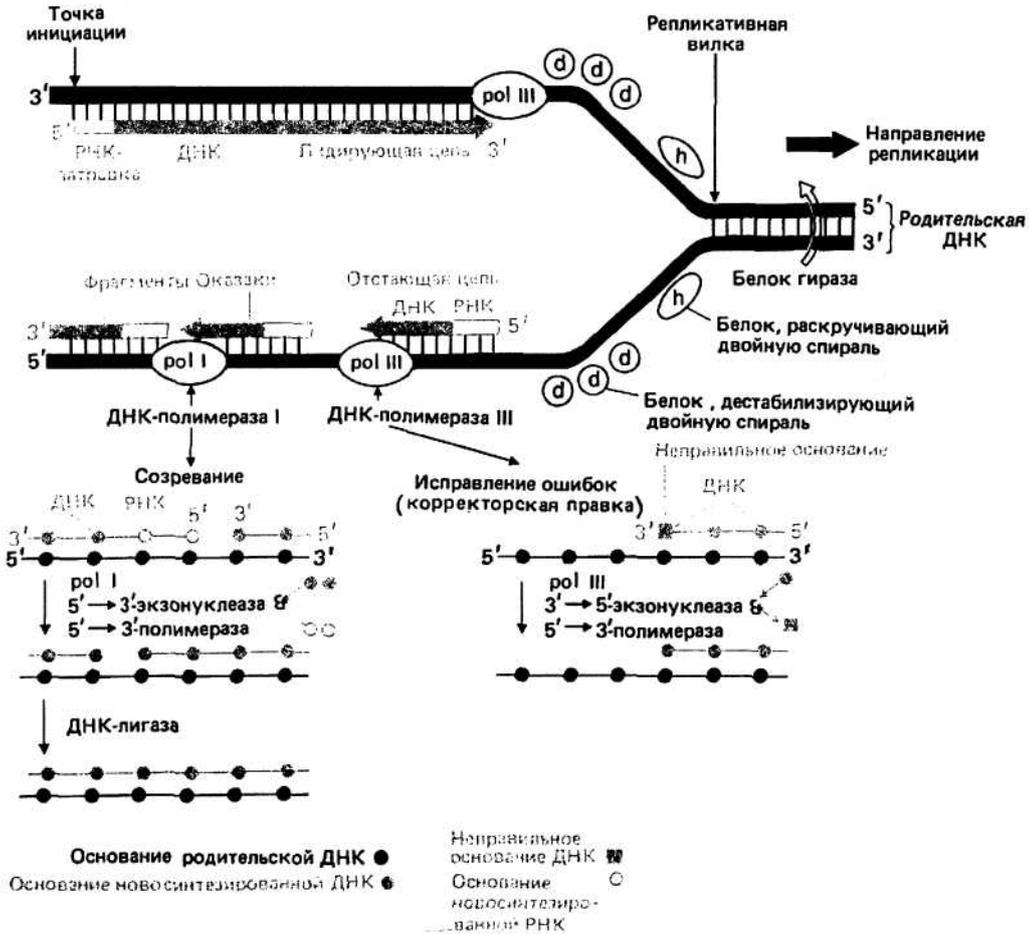


Рис. 21.1. Репликация у *E. coli*.

E. coli - это бактерия, содержащая двухцепочечную кольцевую ДНК. Репликация ДНК *E. coli* изучена весьма детально, и нам известны механизмы многих стадий этого процесса. Эти механизмы характерны для репликации всех прокариот. Аналогичным образом протекает репликация у эукариот, но в ней участвуют другие ферменты.

ДНК-полимеразы — это ферменты, участвующие в синтезе ДНК. Ферменты присоединяют нуклеотид к —ОН-группе на 3'-конце одной из цепей ДНК, которая, следовательно, растет в направлении 5' → 3'. Поэтому говорят, что данные ферменты обладают 5' → 3'-полимеразной активностью. Для синтеза новой цепи ДНК необходимы: 1) ДНК-матрица, которая может быть как в одно-, так и в двухцепочечной форме; 2) дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (АТР, СТР, ГТР и ТТР) и 3) 3'-ОН-группа нуклеиновой кислоты-затравки, к которой присоединяется следующее основание. Схема реакции показана на рис. 21.2.

Выделены три ДНК-полимеразы — I, II и III, обозначаемые polI, polII и polIII. Хотя первой была выделена polI (Корнбергом в 1958 г.), основным ферментом, катализирующим синтез растущей цепи ДНК, является polIII. PolI участвует в процессе созревания

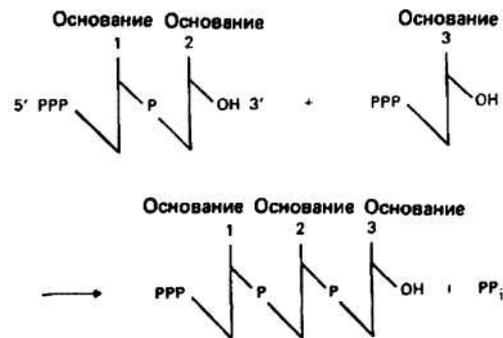


Рис. 21.2.

(см. ниже), роль роШ неясна. Помимо 5' → 3'-полимеразной активности все три фермента проявляют способность деградировать ДНК, отщепляя нуклеотиды в направлении 5' → 3', т. е. являются 5' → 3'-экзонуклеазами. PolI и роШ обладают также 5' → 3'-экзонуклеазной активностью.

Репликативная вилка – это та часть молекулы ДНК, в которой в данный момент осуществляется синтез новой ДНК. Здесь родительская ДНК расплетена и находится в одноцепочечной форме. Каждая из цепей служит матрицей для синтеза новой ДНК. В ходе синтеза репликативная вилка перемещается вдоль молекулы, и при этом расплетаются все новые участки родительской ДНК — до тех пор, пока вилка не дойдет до точки окончания синтеза (точка терминации). Поскольку ДНК-полимеразы катализируют репликацию только в направлении 5' → 3', а цепи родительской ДНК антипараллельны, только одна из новых цепей синтезируется непрерывно; она называется лидирующей. Вторая цепь, называемая отстающей, синтезируется в виде фрагментов, которые затем сшиваются (лигируются), и образуется непрерывная вторая цепь. Этот процесс называется созреванием. Фрагменты ДНК, о которых идет речь, называются фрагментами Оказаки, по имени исследователя, который их впервые обнаружил. У прокариот они имеют длину около 1000 нуклеотидов, а у эукариот — 100—200 нуклеотидов.

Для синтеза ДНК необходима **РНК - затравка**. Поскольку для своей работы ДНК-полимераза нуждается в свободной 3'-ОН-группе, возникает вопрос, как начинается синтез ДНК. В результате многочисленных исследований было показано, что синтез начинается на маленьком фрагменте РНК, выступающей в роли затравки (прайма). Сначала фермент РНК-полимераза, не нуждающийся для инициации синтеза в свободной 3'-ОН-группе, синтезирует короткую молекулу РНК (длиной 10—60 нуклеотидов), используя в качестве матрицы родительскую двухцепочечную ДНК. Эта РНК-затравка остается спаренной с расплетенной ДНК и действует как место инициации синтеза, предоставляя свою свободную 3'-ОН-группу для присоединения первого нуклеотида ДНК; эту последнюю операцию производит ДНК-полимераза III. Аналогичная затравка образуется и перед синтезом отстающей цепи, но, поскольку матрицей для ее образования служит одноцепочечная ДНК, бактерии часто используют для синтеза РНК-затравки другой фермент - праймазу. РНК-матрица удаляется из молекулы ДНК в процессе созревания с помощью роII.

При **созревании** РНК-затравка удаляется как с 5'-конца лидирующей цепи, так и с 5'-концов фрагмен-

тов Оказаки, а эти фрагменты сшиваются друг с другом. Удаление РНК-затравки осуществляется с помощью ДНК-полимеразы I, действующей как 5' → 3'-экзонуклеаза. Этот же фермент присоединяет вместо удаленной РНК дезоксинуклеотиды, используя при этом свою 5' → 3'-полимеразную активность. Наконец, фермент ДНК-лигаза соединяет в нужном порядке фрагменты ДНК, катализируя образование фосфодиэфирной связи.

«Корректорская правка» — это удаление неправильных (образующих некомплементарные пары) оснований, включенных во вновь синтезированную ДНК. Этот процесс обеспечивает чрезвычайно высокую точность репликации, отвечающую одной ошибке на 10⁹ пар оснований. Коррекция осуществляется в тех случаях, когда к 3'-концу растущей цепи присоединяется «неправильный» нуклеотид, неспособный образовывать нужные водородные связи с матрицей. Когда роIII ошибочно присоединяет неправильное основание, «включается» ее 3'—5'-экзонуклеазная активность, и это основание немедленно удаляется, после чего восстанавливается полимеразная активность. Такой простой механизм действует благодаря тому, что роIII способна работать как полимеразы лишь на совершенной двойной спирали ДНК с абсолютно правильным спариванием оснований.

Расплетание двойной спирали РНК необходимо для того, чтобы цепи ДНК могли разойтись и играть роль матриц при репликации. У *E. coli* имеется особый фермент, так называемый гер-белок, который выполняет функцию расплетания двойной спирали. Энергия, необходимая для этого, получается за счет гидролиза АТФ. Образовавшиеся при расплетании одноцепочечные участки ДНК стабилизируются в этом состоянии целым рядом белков: это белок, связывающийся с одноцепочечной ДНК, белок, дестабилизирующий двойную спираль, ДНК-связывающий белок и белок, расплетающий двойную спираль.

Топоизомеразы — ферменты, катализирующие переходы в молекулах ДНК, связанные с изменением степени сверхспирализации. ДНК, различающиеся только по степени сверхспирализации, называются топологическими изомерами или топоизомерами, отсюда и название ферментов — топоизомеразы. Одни топоизомеразы вызывают релаксацию сверхспиральной ДНК, а другие, напротив, приводят к появлению в ней сверхвитков (гл. 26). ДНК-гираза *E. coli* переводит двухцепочечную кольцевую ДНК в состояние с отрицательной сверхспирализацией. Это необходимо для снятия положительных сверхвитков, возникающих при репликации (и транскрипции; гл. 22) из-за раскручивания двойной спирали ДНК.

22. Транскрипция ДНК

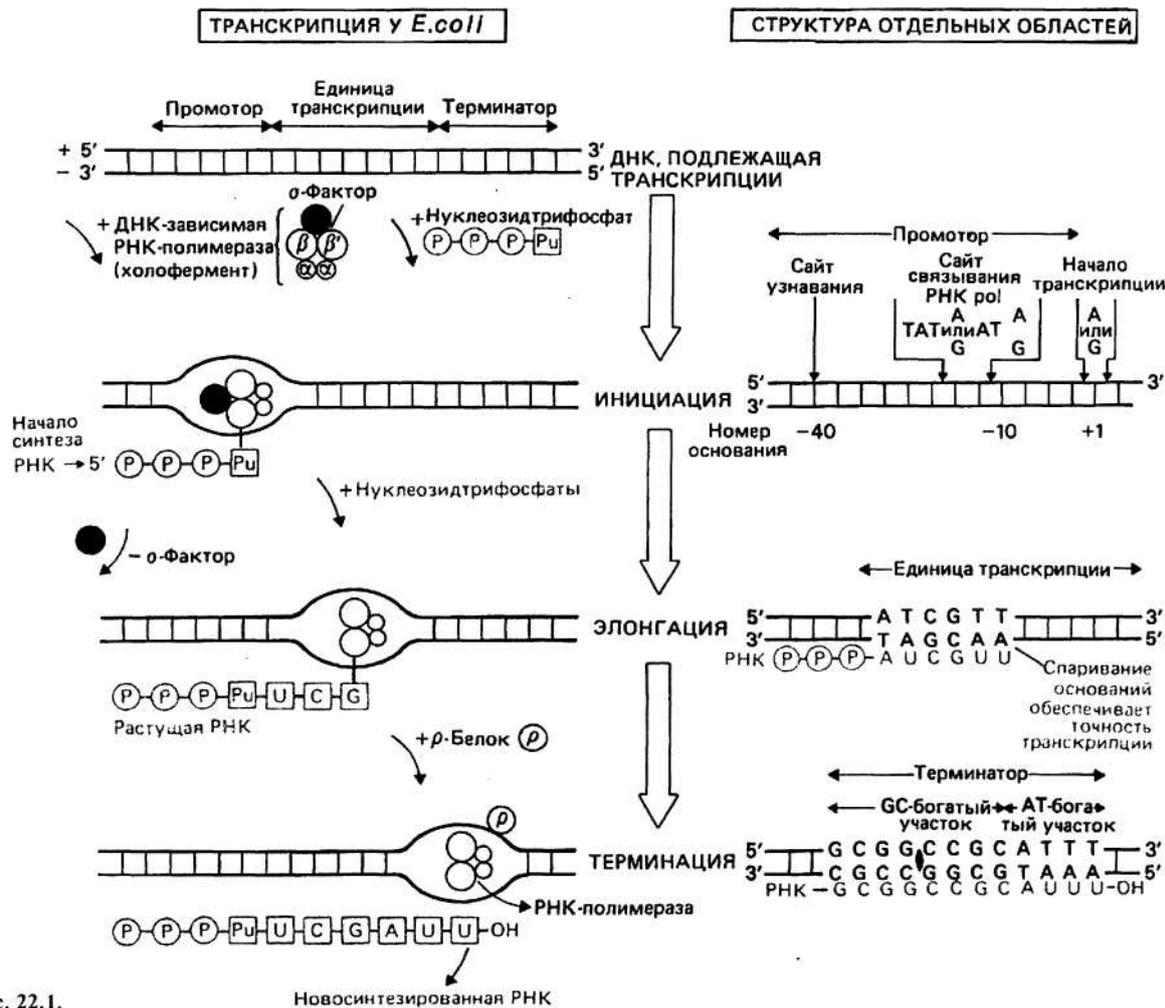


Рис. 22.1.

Транскрипция — процесс переноса генетической информации от ДНК к РНК. Все виды РНК - мРНК, рРНК и тРНК - синтезируются в соответствии с последовательностью оснований в ДНК, служащей матрицей. Транскрибируется только одна, так называемая «+»-цепь ДНК. Процесс транскрипции у прокариот и эукариот существенно различается.

ТРАНСКРИПЦИЯ У ПРОКАРИОТ

ДНК-зависимая РНК-полимераза — это фермент, катализирующий синтез РНК. Он состоит из нескольких субъединиц: двух α , одной β , одной β' и одной σ . Их комплекс называется холоферментом ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) и имеет мол. массу (M_r) около 500 000. Фермент, лишенный σ -субъединицы, называется кор-ферментом

Для инициации транскрипции необходимы холо-фермент, нуклеозидтрифосфат (всегда АТР или ГТР) и наличие специального участка в ДНК, называемого *промотором*. Когда полимеразa связывается с промотором, происходит локальное расплетание двойной спирали ДНК и образуется открытый промоторный комплекс.

Промотр - это участок молекулы ДНК, имеющий размер около 40 пар оснований и расположенный непосредственно перед участком инициации транскрипции. Синтез РНК всегда начинается с оснований А или G в «+»-цепи ДНК. Участок связывания холо-фермента расположен «левее» сайта инициации (в направлении 3' - 5' в «+»-цепи) на расстоянии примерно 10 оснований. Если сравнить последовательности оснований «+»-цепи ДНК у разных промоторов, то

мы обнаружим, что они весьма близки, хотя и не идентичны. Эта так называемая последовательность Прибнова имеет вид ТАТР_nАТР_n, где Р_n означает пурин (А или G). Таким образом, холофермент связывается со специфической последовательностью или группой последовательностей. Обычно на расстоянии около 40 оснований «левее» участка инициации находится второе место связывания РНК-полимеразы, где, как полагают, происходит связывание α-субъединицы с ДНК.

Элонгация цепи РНК — это та стадия транскрипции, которая наступает после присоединения примерно восьми рибонуклеотидов. В этот момент РНК-полимераза претерпевает структурное изменение, при котором от комплекса отделяется σ-субъединица и остается кор-фермент (α₂ββ'), катализирующий дальнейшее удлинение цепи РНК. При этом к цепи присоединяются те рибонуклеозидтрифосфаты, которые обеспечивают правильное спаривание с «←»-цепью ДНК. Движущийся вдоль ДНК кор-фермент действует подобно застежке-молнии, «раскрывая» двойную спираль, которая замыкается позади фермента по мере того, как соответствующие основания РНК спариваются с основаниями ДНК в «←»-цепи. «Раскрытая» ферментом область простирается только на несколько пар оснований. На рис. 22.2 представлена химическая реакция удлинения цепи РНК от 3'-конца.

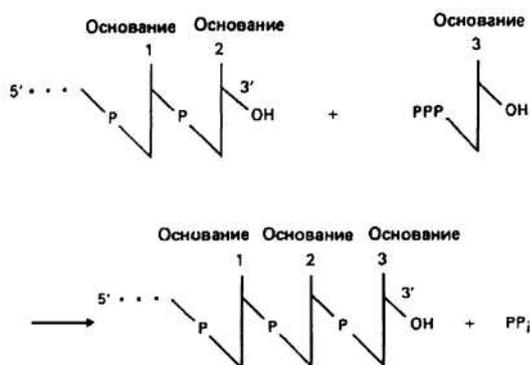


Рис. 22.2.

Терминация (прекращение роста) цепи РНК происходит на специфических участках ДНК, называемых терминаторами. Начало этих участков обычно обогащено GC-парами, а остальная последовательность — AT-парами. GC-богатый участок часто представляет собой палиндром. Это означает, что при движении вдоль «+»-цепи в одном направлении, а вдоль «←»-цепи - в противоположном читается одна и та же последовательность оснований. В остановке синтеза РНК именно на терминаторе важную роль играет р-белок.

Посттранскрипционный процессинг — это процесс созревания, при котором первичный РНК-транс-

крипт модифицируется и превращается в зрелую РНК. Характер и степень модификации РНК зависят от типа РНК.

Молекулы мРНК у прокариот не подвергаются процессингу. У некоторых бактерий транскрипция и трансляция сопряжены, т. е. происходят одновременно. 5'-конец мРНК может транслироваться на рибосоме и затем подвергаться деградации еще до завершения синтеза ее 3'-конца. Молекулы тРНК вначале синтезируются в виде про-тРНК, которая примерно на 20% длиннее, чем соответствующая тРНК. Лишние последовательности, расположенные у 5'- и 3'-концов, удаляются с помощью таких ферментов, как рибонуклеазы Q и P. Иногда молекула про-тРНК состоит из двух или более молекул тРНК, соединенных между собой. Их разделение также осуществляется с помощью рибонуклеаз. Если 3'-конец тРНК не несет концевой последовательности CCA, то эти основания присоединяются при постсинтетической модификации. Все тРНК содержат минорные основания (гл. 19), которые являются химически модифицированными формами четырех главных оснований (A, C, G и U). Эта модификация происходит после завершения транскрипции.

Гены рРНК прокариот расположены в транскрипционных блоках. Три генарРНК *E. coli* (16S, 23S и 5S) (гл. 24) располагаются вместе с генами нескольких тРНК в одном таком блоке и транскрибируются в виде одной молекулы рРНК. Эти молекулы рРНК и тРНК отделены друг от друга спейсерной РНК. Расщепление первичного транскрипта на отдельные составляющие катализирует рибонуклеаза Q; поскольку этот фермент специфичен к двухцепочечной РНК, предполагают, что в области спейсеров образуются двухцепочечные шпильки, которые фермент узнает и вырезает.

ТРАНСКРИПЦИЯ И ЭУКАРИОТ

У эукариот для транскрипции используются **три ДНК - зависимых РНК-полимеразы**. Полимераза I локализована в ядрышке, где она катализирует синтез рРНК в виде большого первичного транскрипта, содержащего молекулы рРНК 18S, 5,8S и 28S. Полимераза II находится в нуклеоплазме и, вероятно, участвует в синтезе первичного транскрипта мРНК. Полимераза III также локализована в нуклеоплазме и участвует в синтезе тРНК и 5S-рРНК.

Синтез РНК включает стадии инициации, элонгации и терминации, но в этих процессах часто принимают участие другие ферменты и последовательности оснований, чем у прокариот. Например, промоторные последовательности у эукариот отличаются от таковых у прокариот. Однако первыми основаниями, включаемыми в РНК при инициации, являются, как и у прокариот, А или G.

Молекулы мРНК обычно образуются из больших по размеру молекул-предшественников, называемых

гетерогенной ядерной РНК (гяРНК). Для образования зрелой мРНК эти молекулы подвергаются модификации по 5'- и 3'-концами и сплайсингу. После такой модификации транскрипты переносятся из ядра в цитоплазму.

Сплайсинг гяРНК — это удаление последовательностей РНК, соответствующих интронам ДНК, и соединение участков, которые транскрибированы с кодирующих последовательностей (экзонов) (гл. 27). Место сплайсинга должно быть определено с высокой точностью, поскольку ошибка даже в одно основание приведет к синтезу белка с неправильной аминокислотной последовательностью. Такая специфичность сплайсинга обеспечивается строго определенной последовательностью оснований в интроне, отвечающей обычно основаниям GU или GA в начале соответствующей РНК и основаниям AG - в конце.

Модификация 5'-конца мРНК приводит к образованию особой последовательности, называемой кэп-структурой. При модификации 3'-конца к нему присоединяется последовательность poly(A) длиной 150-200 нуклеотидов.

Процессинг тРНК у эукариот протекает по такому же механизму, как и у прокариот. Функционально активные молекулы образуются из более длинного предшественника, который подвергается расщеплению и модификации с включением минорных оснований.

Процессинг рРНК также аналогичен соответствующему процессу у прокариот. Первичный транскрипт содержит участки, отвечающие 18S-, 5,8S- и 28S-рРНК (гл. 24), разделенные спейсерами. Как и у прокариот, эти три рРНК образуются при расщеплении спейсерных последовательностей.

23. Генетический код

Первое положение (5'-конец)	Второе положение в кодоне				Третье положение (3'-конец)
	U(T)	C	A	G	
U(T)	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Терм. UAG }	UGU } Cys UGC } UGA } Терм. UGG } Trp	U(T) C A G
C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U(T) C A G
A	AUU } AUC } Ile AUA } *AUG } Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U(T) C A G
G	GUU } GUC } Val GUA } *GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U(T) C A G

* Иницирующий кодон



Рис. 23.1.

Генетический код связывает последовательность оснований данного гена или его РНК-транскрипта с аминокислотной последовательностью соответствующего белка.

Код триплетный, т. е. одна аминокислота задается последовательностью из трех нуклеотидов, называемой кодоном. В ДНК имеются четыре основания, а в белках — 20 аминокислотных остатков; синглетный код мог бы кодировать только четыре аминокислотных остатка, дублетный $4 \cdot 4 = 16$ аминокислот, а триплетный образует $4 \cdot 4 \cdot 4 = 64$ разных кодона.

Код не перекрывается т. е. в последовательности оснований ABCDEFGHI первые три основания, ABC, кодируют аминокислоту 1, DEF — аминокислоту 2 и т. д. Если бы код был перекрывающимся, то последовательность ABC кодировала бы аминокислоту 1, CDE - аминокислоту 2 и т. д. Неперекрывающийся характер кода относится только к случаю, когда рамка считывания не меняется (см. ниже). В коде отсутству-

ют запяты, т. е. нет знаков, отделяющих один кодон от другого.

Направление чтения закодированной записи — от 5'-конца к 3'-концу мРНК, являющейся транскриптом «+»-цепи ДНК, считанным с нее в направлении 5' -> 3'. Первый с 5'-конца кодон отвечает N-концевой аминокислоте полипептидной цепи. Следовательно, белки синтезируются от N-конца к С-концу.

Таблица кода указывает, какая аминокислота кодируется тем или иным кодоном (рис. 23.1). В таблице на рис. 23.1 первый (с 5'-конца) нуклеотид помещен в левом столбце, второй — в верхней строке, а третий (на 3'-конце) — в правом столбце. Из представленных в таблице 64 кодонов 61 кодон детерминирует ту или иную аминокислоту (например, CUA отвечает лейцину Leu), а три остальных кодона являются сигналами терминации (Терм.). Эти три кодона называются нонсенс-кодонами, поскольку они не определяют никакой аминокислоты. Помимо этого, когда кодоны

AUG для Met и иногда GUG для Val находятся в начале последовательности и соответствующие аминокислоты должны быть помещены в начале белковой цепи, эти аминокислоты обычно присутствуют в виде N-формильных производных (гл. 25). Когда же эти кодоны находятся в любом другом месте последовательности, то в пептидную цепь включаются нормальные Met и Val.

Таблица 23.1

Число разных кодонов	Аминокислотные остатки
6	Arg, Leu, Ser
4	Ala, Gly, Pro, Thr, Val
3	He (Терм.)
2	Asn, Asp, Cys, Gin, Glu, His, Lys, Phe, Tyr
1	Met, Trp

Код вырожден, т. е. большинство аминокислот кодируется более чем одним кодоном (см. табл. 23.1). Например, Phe кодируется двумя кодонами, UUU и UUC. Кодоны, которые определяют одну и ту же аминокислоту, называются кодонами-синонимами. Вырожденность кода, как правило, выражается в том, что у кодонов, определяющих одну и ту же аминокислоту, первые два основания фиксированы, а третье положение может занимать одно из двух, трех или четырех разных оснований. В частности, кодоны с одним из двух пиримидинов (С или U) в третьем положении всегда являются синонимами, в то время как кодоны с одним из двух пуринов (А и G) в третьем положении бывают синонимами лишь иногда. Различия по всем трем положениям наблюдаются лишь в некоторых случаях (например, UCG и AGU оба кодируют Ser).

Гипотеза «качания» была предложена Криком для объяснения вырожденности кода по третьему положению основания в кодоне. Эта гипотеза, впоследствии получившая подтверждение, состоит в том, что соответствие третьего основания кодона первому основанию антикодона тРНК является нестрогим. Часто первое положение в антикодоне тРН К бывает занято необычным основанием инозином (I), которое может образовывать водородные связи с U, С или А, находящимися в кодоне в третьем положении (рис. 23.2). Полный набор образующихся при этом пар

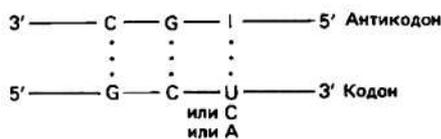


Рис. 23.2.

Таблица 23.2

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

приведен в табл. 23.2. В связи с механизмом «качания» клетке требуется меньше 64 разных тРНК. Каждая тРНК может узнавать до трех кодонов.

Химические свойства разных аминокислот находят отражение в структуре кода. Все кодоны с U во втором положении кодируют аминокислоты с гидрофобной боковой цепью (Phe, Leu, He, Met и Val). Если исключить терминирующие кодоны, то наличие А во втором положении определяет полярную или заряженную боковую цепь (Tyr, His, Gin, Asn, Lys, Asp и Glu).

Рамка считывания задает положение первого основания кодона мРНК (или гена). Поскольку код три-плетен, число возможных рамок считывания равно трем. Обычно функциональный белок синтезируется только при одной рамке считывания, но некоторые вирусы используют две или даже три рамки считывания, при этом синтезируются разные белки (гл. 27). Примером такого рода могут служить белки, кодируемые К-, С- и А-генами вируса G4 (рис. 23.1).

Мутация — это изменение в последовательности оснований генетического материала данного организма. Знание генетического кода позволяет объяснить эффект некоторых мутаций.

Молчащая мутация — это такое изменение в нуклеотидной последовательности, которое приводит к образованию синонимичного кодона, и в результате аминокислотная последовательность кодируемого белка не изменяется. Структура кода такова, что молчащие мутации часто бывают обусловлены изменениями оснований лишь в третьем положении кодона.

Замена (миссенс-мутация) ведет к замещению одной аминокислоты другой в результате такого изменения последовательности оснований, которое не приводит к образованию синонимичного кодона. Так, заболевание серповидноклеточная анемия (гл. 16) возникает в результате замены Glu на Val в шестом положении (3-цепи гемоглобина человека. Это обусловлено изменением кодона GAA на GUA, т. е. заменой А на U во втором положении.

Мутация со сдвигом рамки обусловлена вставкой или удалением (делецией) одного или большего числа оснований в последовательности, так что при этом изменяется рамка считывания. Это приводит к изменению аминокислотной последовательности белка от точки мутации до С-конца молекулы.

Универсальность генетического кода означает, что все живые организмы — эукариоты, прокариоты и ви-

русы - используют один и тот же код. Хотя, вообще говоря, это положение справедливо, проведенные сравнительно недавно (1981 г.) определения нуклеотидной последовательности митохондриальных ДНК человека и дрожжей выявили некоторые необычные факты. Например, триплет UGA не является терминирующим кодоном, а кодирует Trp, а триплеты AGA и AGC не кодируют Arg, а являются терминаторами. **Генетический код** был расшифрован в начале 60-х годов Ниренбергом, Кораной и их сотрудниками. Ниренберг получил клеточный экстракт *E. coli*, содержащий все компоненты, необходимые для синтеза белка, включая рибосомы, все тРНК и аминоксил-тРНК-синтазы (гл. 24). В систему добавляли полинуклеотид poly(U) (т. е. UUUUUU...), функционировавший как искусственная мРНК. Оказалось, что poly(U) детерминирует синтез poly(Phe) (т. е. Phe, Phe, Phe...); следовательно, триплет UUU кодирует Phe. Аналогичные опыты показали, что триплет CCC кодирует Pro, а триплет AAA — Lys. Следующий шаг заключался в использовании поли-

рибонуклеотидов, содержавших два, три или четыре разных основания, расположенных в случайном порядке. В результате этих исследований удалось определить состав других кодонов, но не последовательность оснований в них; так, было показано, что кодон, содержащий 2U и 1G, детерминирует Cys, но порядок оснований оставался неизвестным. Корана использовал полирибонуклеотиды не со случайной, а с заранее заданной последовательностью и определил структуру нескольких кодонов. Эти исследования получили дальнейшее развитие с помощью другого подхода, разработанного Ниренбергом. Он обнаружил, что тринуклеотиды вызывают связывание специфичных аминоксил-тРНК с рибосомой (гл. 24). Например, в присутствии UGU с рибосомой связывается только аминоксил-тРНК для Cys. Следовательно, UGU кодирует Cys. Три кодона, UAA, UAG и UGA, не кодируют никаких аминоксилот и называются нон-сенс-кодонами. Позднее исследования на мутантных бактериофагах показали, что эти кодоны определяют терминацию синтеза.

24. Трансляционный аппарат клетки

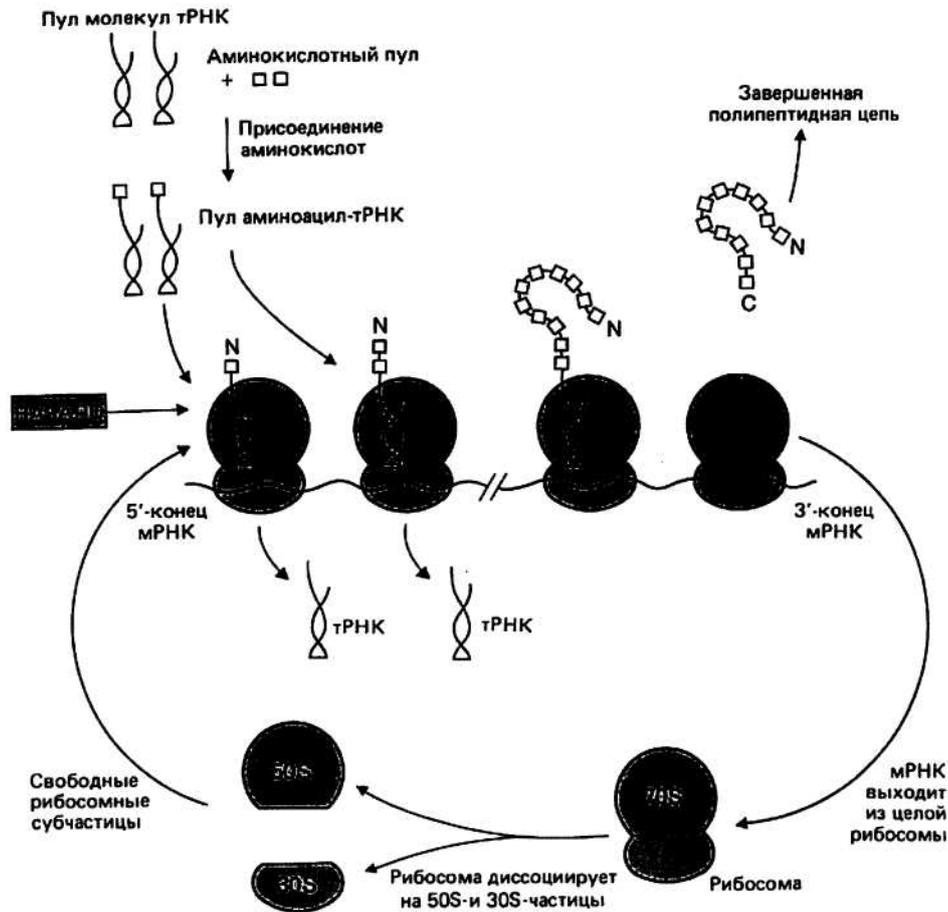


Рис. 24.1.

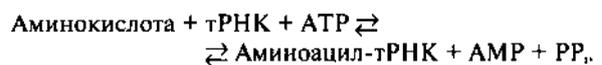
Трансляция — это процесс декодирования мРНК, в результате которого информация с языка последовательности оснований мРНК переводится на язык аминокислотной последовательности белка. В этом разделе описан трансляционный аппарат клетки; механизм трансляции рассмотрен в гл. 25.

Синтез белка осуществляется путем последовательной поликонденсации отдельных аминокислотных остатков, начиная с amino-(1M)-конца полипептидной цепи, в направлении к карбоксильному (С)-концу. Декодирование мРНК происходит соответственно в направлении 5' → 3'.

Декодирование происходит при специфическом связывании антикодона транспортной РНК (тРНК) с соответствующим кодоном мРНК (гл. 19). До такого взаимного узнавания кодона и антикодона к тРНК присоединяется соответствующий аминокислотный остаток: образуется *аминоацил-тРНК*. Этот процесс называется *активацией тРНК*. Синтез белка происхо-

дит в *рибосоме*. Все этапы этого процесса осуществляются с помощью множества разных ферментов и других белков (таких, например, как факторы инициации)(гл. 25).

Активация тРНК — это присоединение аминокислоты к 3'-концевому аденозину молекулы тРНК с образованием *аминоацил-тРНК*. Этот процесс катализируется ферментом *аминоацил-тРНК-синтетазой*, и для каждой аминокислоты существует по крайней мере один такой фермент-катализатор. Источником энергии для этого процесса служит гидролиз АТФ. Реакция выглядит следующим образом:



Аминокислота в *аминоацил-тРНК* соединена эфирной связью (—О—) с 2'- либо 3'-ОН-группой аденозина (рис. 24.2). Связывание фермента *аминоацил-тРНК-синтетазы* со своей и только своей аминокис-

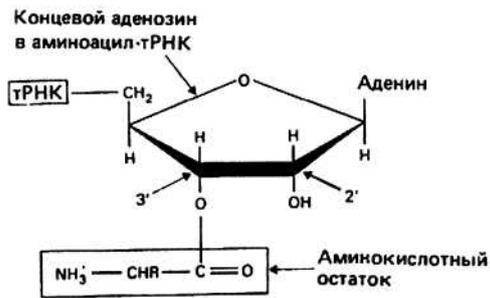


Рис. 24.2.

лотой обеспечивается с очень высокой точностью: неправильная активация тРНК приведет к тому, что в полипептидную цепь включится в данном месте не та аминокислота, которая должна была бы быть. Существует еще один механизм проверки правильности активации, часто называемый механизмом корректурной правки; суть его состоит в том, что соответствующая синтаза автоматически катализирует деацилирование любой неправильно активированной тРНК, в результате которого последняя диссоциирует на исходные составные части, т. е. на свободную аминокислоту и свободную тРНК.

Рибосома — это органелла, состоящая из двух субчастиц, на которой происходит синтез белка. Каждая субчастица представляет собой сложный комплекс из белков и молекул РНК. В течение всего процесса синтеза белка растущая полипептидная цепь, мРНК и

очередная аминоацил-тРНК остаются прикрепленными к рибосоме. Коэффициент седиментации рибосом прокариот типа *E. coli* составляет примерно 70S, а у эукариот для рибосом, обнаруживаемых в цитоплазме, он равен 80S. Митохондрии и хлоропласты — органеллы, присутствующие в эукариотических клетках, — обладают своими собственными рибосомами с коэффициентом седиментации 70S, которые во всем подобны рибосомам прокариот.

Диссоциация рибосомы на большую и малую субчастицы *in vitro* происходит при низкой концентрации Mg^{2+} . 70S-рибосома прокариот состоит из 50S- и 30S-субчастиц, а 80S-рибосома эукариот — из 60S- и 40S-субчастиц. Эти субчастицы могут в свою очередь диссоциировать на составные части — белок и рРНК (рис. 24.3) — при соответствующей химической обработке. Весовое отношение рРНК: белок для рибосом из прокариот и эукариот составляет соответственно 2:1 и 1:1.

У некоторых молекул рРНК определена нуклеотидная последовательность. При анализе этих последовательностей обнаружены участки, в которых может происходить спаривание оснований и которые могут участвовать в образовании вторичной структуры, подобно тому как это происходит в стеблях молекулы тРНК (гл. 19).

Многие рибосомные белки являются основными благодаря наличию большого числа боковых цепей Arg^+ и Lys^+ . По всей вероятности, многие из этих положительно заряженных групп взаимодействуют с от-

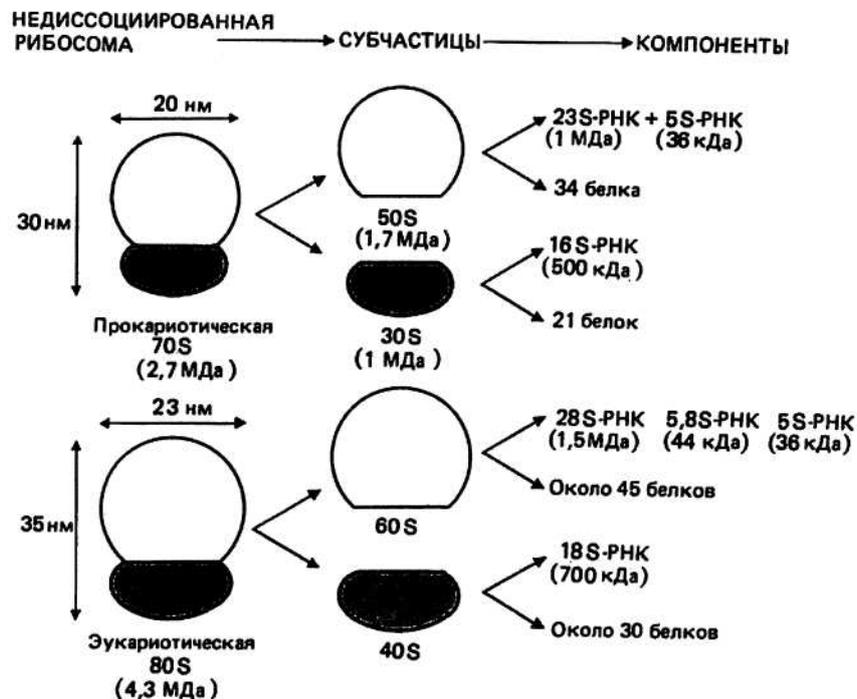


Рис. 24.3.

рицательно заряженными фосфатными группами молекул рРНК, что и стабилизирует комплекс белок—нуклеиновая кислота.

Самосборку целой функциональной рибосомы из составляющих ее белков и рРНК удалось осуществить *in vitro*. Это говорит о том, что сложная структура рибосомы обусловлена исключительно взаимодействиями между входящими в ее состав молекулами.

Строение рибосомы изучали с помощью электронного микроскопа. На рис. 24.4 представлены две взаимно перпендикулярные проекции 70S-рибосомы из *E. coli*. «Габаритные» размеры рибосом прокариот составляют примерно 20 нм в наименьшем измерении и 30 нм в наибольшем. Более крупные (80S) рибосомы эукариот подобны по форме своему аналогу из клеток

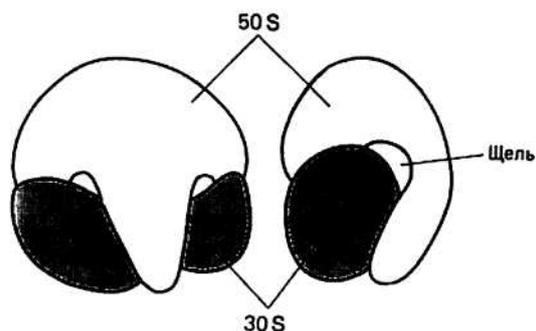


Рис. 24.4.

прокариот, но примерно в 1,15 раза больше в любом измерении (соответственно 23 нм x 35 нм).

Участки связывания на рибосоме — это места, к которым присоединяется та или иная молекула, участвующая в трансляции. Между большой и малой субчастицами рибосомы остается узкая щель (рис. 24.4), занимаемая молекулой мРНК. Подойдя к рибосоме, очередная молекула аминоацил-тРНК соединяется с участком, называемым *участком (сайтом) Л*. Другой участок, обозначаемый Р, связывается с молекулой пептидил-тРНК, несущей синтезируемую цепочку (гл. 25).

Полисома, или полирибосома, представляет собой молекулу мРНК с несколькими расположенными на ней активными рибосомами, на каждой из которых синтезируется молекула белка (рис. 24.1).

Если говорить в самых общих чертах, то синтез белка начинается с того момента, когда образуется комплекс, состоящий из большой и малой субчастиц рибосомы, мРНК и соответствующей аминоацил-тРНК. Далее целая рибосома движется вдоль мРНК от 5'- к 3'-концу. Такое перемещение сопровождается ростом полипептидной цепи. После того как синтез полипептидной цепи полностью завершен, она отходит от рибосомы, которая в свою очередь отщепляется от мРНК и диссоциирует на большую и малую субчастицы. Эти субчастицы могут теперь участвовать в синтезе другой молекулы белка; подробнее весь процесс описан в следующей главе.

25. Трансляция генетического кода

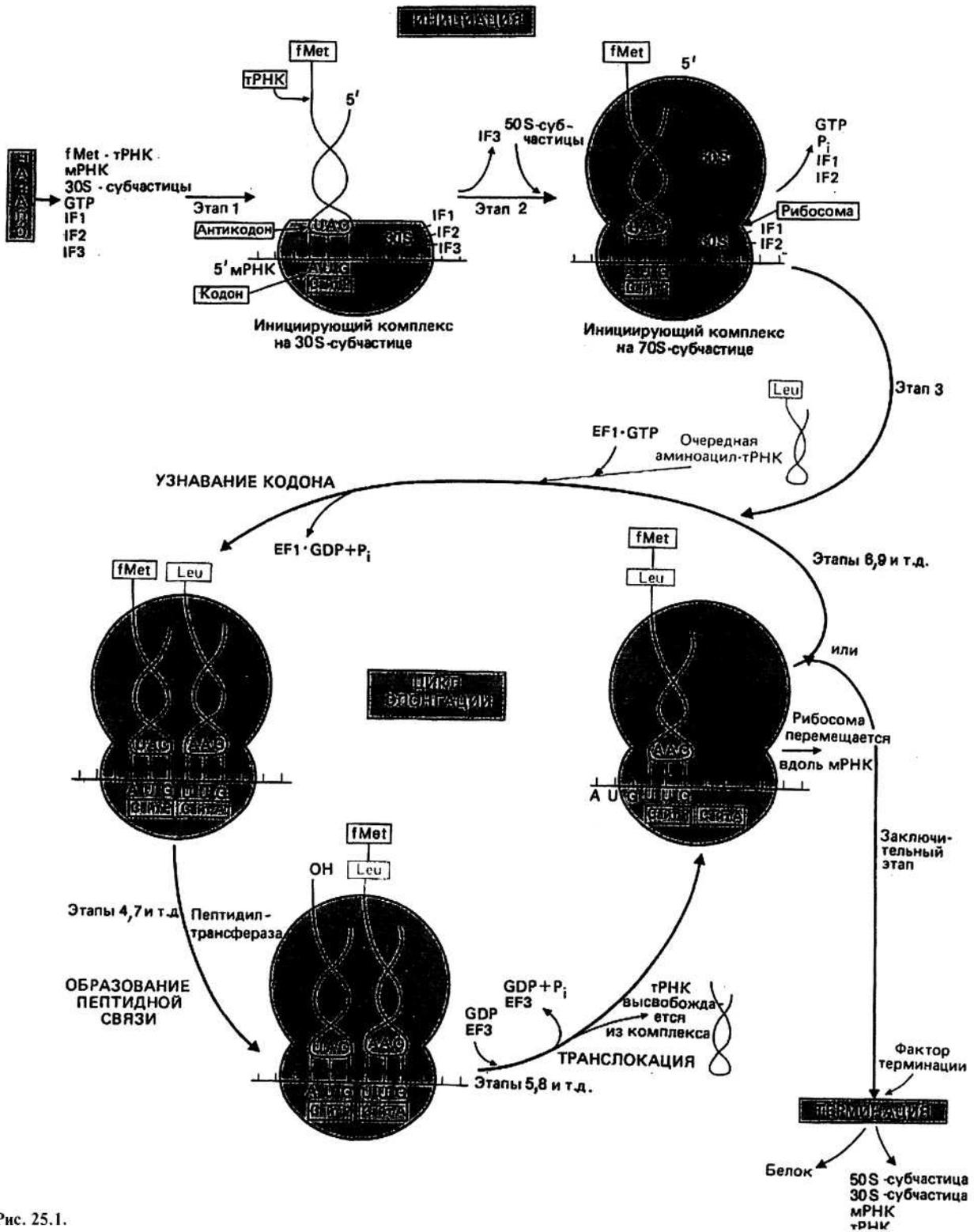


Рис. 25.1.

Механизм трансляции у прокариот мы опишем на примере *E. coli*

Стартовым сигналом к началу синтеза белка служит расположенный на мРНК кодон AUG, кодирующий метионин (Met) [иногда это кодон GUC для валина (Val)]. В растущей полипептидной цепи первым аминокислотным остатком всегда будет либо Met, либо Val. Тогда возникает законный вопрос: каким образом клетка отличает стартовый сигнал от кодонов AUG или GUC, расположенных в середине молекулы мРНК? Эта проблема решается с помощью модифицированной формы Met (или Val) и специальной иницирующей тРНК (см. ниже).

Формилметионин (fMet) и является той модифицированной формой Met, с которой начинается синтез белка. Он присоединяется к молекулам тРНК определенного типа (тРНК_f), отличным от тРНК_{Met}, посредством которых Met включается в срединную часть полипептидной цепи. И тРНК_f, и тРНК_{Met} узнают кодон AUG, но лишь тРНК_f способна присоединяться к стартовому кодону AUG.

Инициация синтеза белка начинается с момента образования иницирующего комплекса на 30S-субчастице, состоящего из мРНК, 30Э-субчастицы рибосомы и молекулы аминоксил-тРНК_f с присоединенным fMet, которая связывается с участком Р. Следующим шагом является присоединение 508-субчастицы, в результате чего образуется 70S-иницирующий комплекс. Источником энергии для инициации синтеза белка служит реакция гидролиза GTP до GDP и P_i. На этом этапе необходимы еще несколько белков, называемых факторами инициации (IF1, IF2 и IF3).

Элонгация — это последовательное включение аминокислотных остатков в состав растущей полипептидной цепи. Каждый акт элонгации состоит из **трех этапов: 1) узнавание кодона, 2) образование пептидной связи и 3) транслокация (рис. 25.1).**

Узнавание кодона заключается в связывании антикодона очередной молекулы аминоксил-тРНК с кодоном свободного участка А на рибосоме. Чтобы прикрепиться к рибосоме, тРНК с присоединенной к ней аминокислотой должна сначала образовать комплекс с белком, называемым фактором элонгации EF-Tu, или EF1, который предварительно должен быть активирован с помощью GTP. После того как произойдет связывание всего комплекса тРНК-EF1 • GTP с участком А рибосомы, осуществляется гидролиз GTP до GDP и P_i, удовлетворяющий энергетические потребности на этом этапе элонгации. Фактор EF1 • GDP, неспособный более связываться с тРНК, покидает рибосому, на которой остается аминоксил-тРНК. Регенерацию активированного фактора EF1 катализирует второй фактор элонгации, EF-Ts, или EF2, который замещает GDP в неактивированном комплексе, в результате чего образуется комплекс EF1 • EF2. Схема, иллюстрирующая эту последовательность событий, представлена на рис. 25.2.

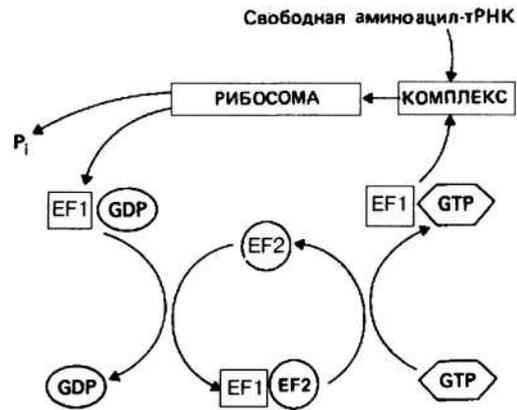


Рис. 25.2.

Образование пептидной связи происходит лишь тогда, когда оба участка, А и Р, заняты молекулами аминоксил-тРНК. Часть 508-субчастицы представляет собой фермент пептидилтрансферазу, катализирующий образование пептидной связи согласно схеме, представленной на рис. 25.3. В результате этой реакции растущая полипептидная цепь оказывается присоединенной к тРНК участка А, а тРНК участка Р высвобождается из комплекса с пептидом и несет на 3'-конце группу —ОН (рис. 25.3).

Транслокация включает три акта, катализируемых еще одним фактором элонгации, EF-G(EF3), и энергетически сопряженных с гидролизом GTP. Сначала тРНК участка Р, не связанная с пептидом, покидает рибосому, затем молекула полипептидил-тРНК переходит с участка А на Р и, наконец, рибосома перемещается вдоль мРНК на три нуклеотидных остатка в сторону 3'-конца. В результате этих трех актов освобождается участок А и экспонируется очередной кодон, что позволяет начаться следующему циклу элонгации.

Терминация т. е. окончание синтеза, происходит по команде кодонов UAA, UGA или UAG. В природе не существует таких молекул тРНК, антикодоны ко-

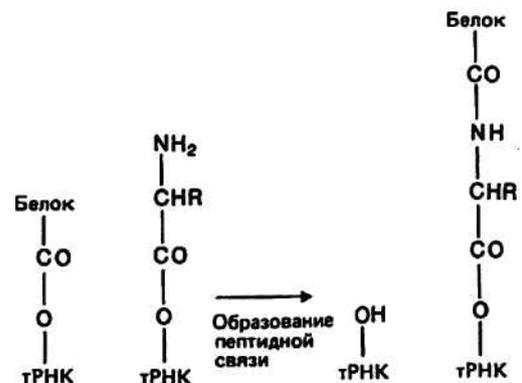


Рис. 25.3.

торых соответствовали бы этим кодоном. Вместо продолжения синтеза цепи происходит терминация, катализируемая специальными белками, которые названы факторами терминации и которые узнают терминирующие кодоны, когда свободен участок А. Эти факторы изменяют специфичность фермента пептидилтрансферазы таким образом, что происходит гидролиз связи между концевым пептидом и тРНК, а освобожденная полипептидная цепь диффундирует от рибосомы. Вслед за этим происходит диссоциация комплекса мРНК—рибосома. Далее рибосома диссоциирует на 30S- и 50S-субчастицы. После реассоциации этих субчастиц с другой молекулой мРНК весь цикл синтеза белка начинается сначала.

ТРАНСЛЯЦИЯ У ЭУКАРИОТ, осуществляющаяся в цитоплазме, включает такие же этапы, что и трансля-

ция у прокариот. Основным отличием здесь является то, что первым остатком в растущей полипептидной цепи является Met, а не fMet. Тем не менее и в этом случае есть два типа молекул тРНК, узнающих кодон AUG: один — когда кодон иницирующий, а другой — когда он кодирует Met, который должен быть присоединен в середине растущей полипептидной цепи. В роли факторов инициации и элонгации выступают различные белки. Еще одно существенное отличие состоит в том, что в цитоплазме эукариот рибосомы более крупные (80S).

У митохондрий и хлоропластов трансляция осуществляется в самих этих органеллах. Рибосомы, которые они содержат, представляют собой 70S-частицы и похожи на рибосомы бактерий. При инициации используется fMet.

26. Упаковка генетического материала

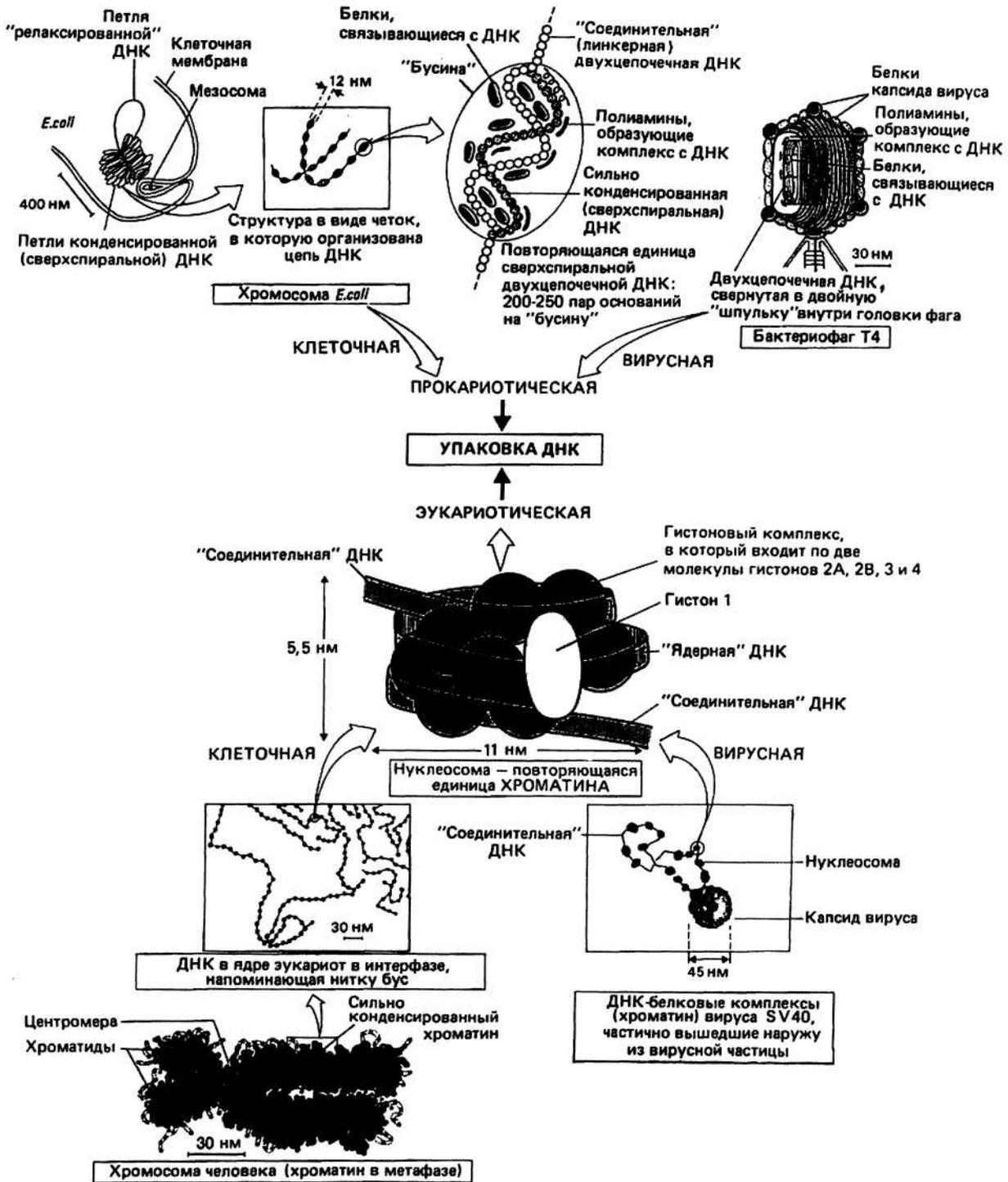


Рис.26.1.

Клетки прокариот содержат единственную копию геномной ДНК и являются, таким образом, гаплоидными. ДНК прокариотической клетки, кодирующая все клеточные белки и нуклеиновые кислоты (рРНК, тРНК и др.), входит в состав хромосомы. *E. coli*, например, содержит единственную хромосому, являющуюся комплексом из ДНК, РНК и белков. ДНК представляет собой кольцевую молекулу и содержит $4,6 \cdot 10^6$ пар нуклеотидов (или 4600 тысяч пар нуклеотидов, т.п.н.). Диаметр такого кольца составил бы примерно 1 мм, но, поскольку сама *E. coli* имеет в поперечнике менее 2 мкм, ее ДНК должна быть плотно упакована (сконденсирована), чтобы поместиться внутри клетки.

Клетки эукариот устроены сложнее, чем клетки прокариот, и все они, за исключением гамет, содержат две совершенно одинаковые копии генома; другими словами, они диплоидны. Клетка нематоды содержит ДНК примерно в 40 раз, а клетка саламандры — в 40 000 раз больше, чем *E. coli*. В клетке человека ДНК примерно в 700 раз больше, чем в *E. coli*. Поскольку принято думать, что человек — это более сложный организм, чем саламандра, приходится заключить, что на основе суммарного содержания ДНК в клетке можно лишь весьма приблизительно судить о сложности того или иного организма.

ДНК эукариотических клеток находятся в ядре в виде набора отдельных фрагментов, называемых хромосомами. Каждая хромосома может содержать ДНК в количестве от 400 (дрожжи) до 100 000 т.п.н. (человек). Если бы всю клеточную ДНК в форме простой двойной спирали вытянуть в одну линию, то она имела бы слишком большую длину (1,74 м для клетки человека) и в таком виде не поместилась бы в ядре, поэтому хромосомы должны представлять собой сильно конденсированные структуры.

Вирусы могут содержать как одно-, так и двухцепочечную ДНК, которая может быть как непрерывной, так и состоящей из фрагментов. У некоторых вирусов (например, ВТМ, реовирусы; гл. 5) генетическим материалом служит РНК, которая также может быть как одно-, так и двухцепочечной.

Число генов в различных организмах можно оценить, исходя из того, что средняя длина гена составляет 1 т.п.н. В табл. 26.1 приведены соответствующие цифры.

Конденсация двухцепочечной ДНК, в результате которой продольные размеры молекулы уменьшаются в 10 000 раз, осуществляется одним из двух способов — путем *сфероидальной намотки* (т. е. свертывания в витки по сфероидной образующей) либо через *образование сверхспиральной ДНК*. Сфероидальная намотка по сути дела имеет место только в вирусах, тогда как образование сверхспиральной ДНК происходит во всех прокариотических и эукариотических клетках и во многих вирусах, поражающих эукариот.

Таблица 26.1

Организм	Содержание ДНК (в парах нуклеотидов)	Число генов
SV40 (вирус животных)	$5,0 \cdot 10^3$	5
T4 (бактериофаг)	$2,0 \cdot 10^5$	200
<i>E. coli</i> (бактерия)	$4,6 \cdot 10^6$	4600
Гаплоидная клетка человека	$2,8 \cdot 10^9$	100 000-500 000 ¹

Сфероидальная намотка ДНК происходит так, что в результате образуется компактная «шпулька». В бактериофаге Т4 ДНК свернута в двухслойную «шпульку» внутри головки фага, имеющей форму икосаэдра. Сначала образуются витки наружного слоя, затем — внутреннего; между слоями остается некоторый просвет. Оставшийся конец ДНК проходит через оба слоя и выводится в хвостовой отросток вируса через центральное отверстие (гл. 4). В других вирусах ДНК может свертываться не совсем так, как в Т4, но во всяком случае весьма похожим образом.

Сверхспиральная (сверхскрученная) ДНК образуется при введении в двойную спираль ДНК дополнительных витков (сверхвитков). В результате в молекуле возникает напряжение, которое проявляется, в частности, в том, что ось двойной спирали сама закручивается в спираль (спирализуется), что и показано на рис. 26.2 на примере кольцевой замкнутой двухцепочечной ДНК.

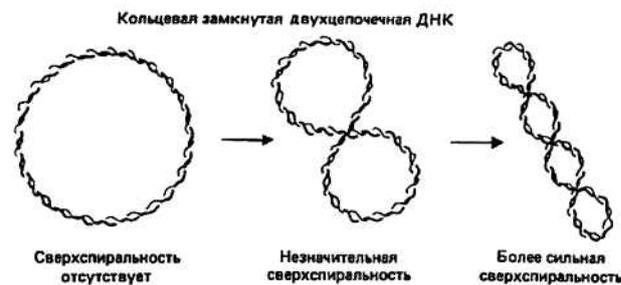


Рис. 26.2.

Стабилизация компактных форм ДНК необходима как в случае сфероидальной намотки ДНК, так и для сверхспиральной ДНК, поскольку в результате более плотной упаковки отрицательно заряженные фосфатные группы оказываются в непосредственной близости друг от друга. Взаимное отталкивание между этими группами компенсируется путем связывания их с положительно заряженными белками и с малыми молекулами, представляющими собой *полиамины*. Послед-

¹ По последним данным число генов у человека существенно меньше. — Прим. перев.

ние содержатся во всех без исключения прокариотических и эукариотических клетках, но отсутствуют во многих вирусах. К числу полиаминов, обнаруженных в эукариотических клетках, относится, например, спермидин, структура которого изображена на рис. 26.3. Специфические белки, стабилизирующие молекулу ДНК, есть в клетках любого типа, но лишь в некоторых вирусах (например, в вирусе SV40).

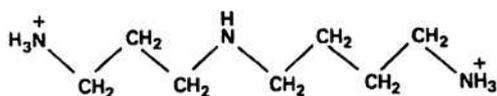


Рис. 26.3.

Упаковка ДНК в клетках прокариот имеет, вероятно, универсальный характер; покажем, как она осуществляется, например, в бактерии *E. coli*. Сверхспиральный участок ДНК в комплексе с гистоноподобными (см. ниже) белками, обладающими сродством к ДНК, и полиаминами образует «бусину» диаметром около 12 нм. Внутри бусины ось двойной спирали ДНК перекручена и образует примерно шесть витков. Бусины соединены между собой участками ДНК, в которых сверхспиральность отсутствует, и объединяются, таким образом, в структуру, напоминающую ожерелье, четки или бусы. Такая организованная в бусы ДНК образует далее большие петли, которые стабилизируются и окончательно конденсируются благодаря взаимодействию с соответствующими белками и РНК.

Упаковка ДНК в эукариотических клетках включает в себя ассоциацию сверхспиральной ДНК с различными белками (гистонами), в результате которой образуется комплекс, называемый *хроматином*. Хроматин в свою очередь образует *соленоидоподобную структуру*, с которой связываются *хромосомные структурные белки*, получившийся в конечном счете комплекс называется хромосомой.

Хроматин состоит из двухцепочечной ДНК, которая обвивается вокруг особых гранул, состоящих из специфических белков — гистонов. Так образуется структура, похожая на бусы, которую называют хроматиновым волокном. Каждая бусина, называемая нуклеосомой, имеет около 10 нм в диаметре (например, в *E. coli*). В результате конденсации ДНК в хроматин ее продольные размеры уменьшаются примерно в 5—6 раз.

Нуклеосома представляет собой сегмент двухцепочечной ДНК длиной около 200 пар оснований, нави-

тый на белковую сердцевину, состоящую из восьми молекул белков — гистонов. Ее структура, впервые установленная Клугом с сотрудниками, изображена на рис. 26.1. Нуклеосомы обнаружены во всех эукариотических клетках и в некоторых вирусах, поражающих эукариот. Гистоны представляют собой основные белки с мол. массой (А/г) от 11 300 до 21 000. Всего известно пять типов гистонов: Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4. В нуклеосомную сердцевину входит по две молекулы гистонов Н2А, Н2В, Н3 и Н4. Обращенные наружу поверхности этих белковых молекул несут положительные заряды и образуют стабилизирующий остов, вокруг которого может закручиваться отрицательно заряженная молекула ДНК. Гистон Н1 размещается на участках ДНК, соединяющих одну нуклеосому с другой; ДНК этих участков называют поэтому соединительной (или линкерной) ДНК. Поскольку Н1, по-видимому, не участвует в стабилизации структуры хромосомы, он, возможно, наряду с некоторыми другими белками, не входящими в число гистонов, играет какую-то роль в регуляции транскрипционной активности хроматина.

Соленоидоподобная структура клеточного хроматина была предложена для того, чтобы объяснить происхождение так называемых гетерохроматиновых волокон толщиной 20—30 нм, наблюдаемых в электронный микроскоп в интерфазном ядре (гл. 29). Каждый такой соленоид образуется в результате дальнейшей спирализации уже спирализованной дополнительно в области нуклеосом двойной спирали ДНК. На один виток соленоида приходится примерно 6 нуклеосом. Этот этап конденсации приводит к дальнейшему уменьшению продольных размеров ДНК — примерно в 40 раз по сравнению с размерами двухцепочечной ДНК. В настоящее время считают, что гетерохроматин представляет собой неактивную в отношении транскрипции форму хроматина. Поскольку продольные размеры ДНК в виде простой двойной спирали и той же ДНК в сильно конденсированной хромосоме различаются в 5 000—10 000 раз, осталось еще объяснить, откуда берется множитель 100–200 [$40 \cdot 100(200) = 5\,000(10\,000)$]. Пока, однако, неизвестно, как происходит дальнейшая конденсация соленоидоподобной структуры хроматина в его хромосомную форму.

Хромосомные структурные белки образуют каркас, на котором происходит окончательная конденсация хроматина в структуру с наиболее плотной упаковкой, характерной для эукариотических хромосом. Этот белковый остов не разрушается даже после удаления всех гистонов.

27. Организация генов

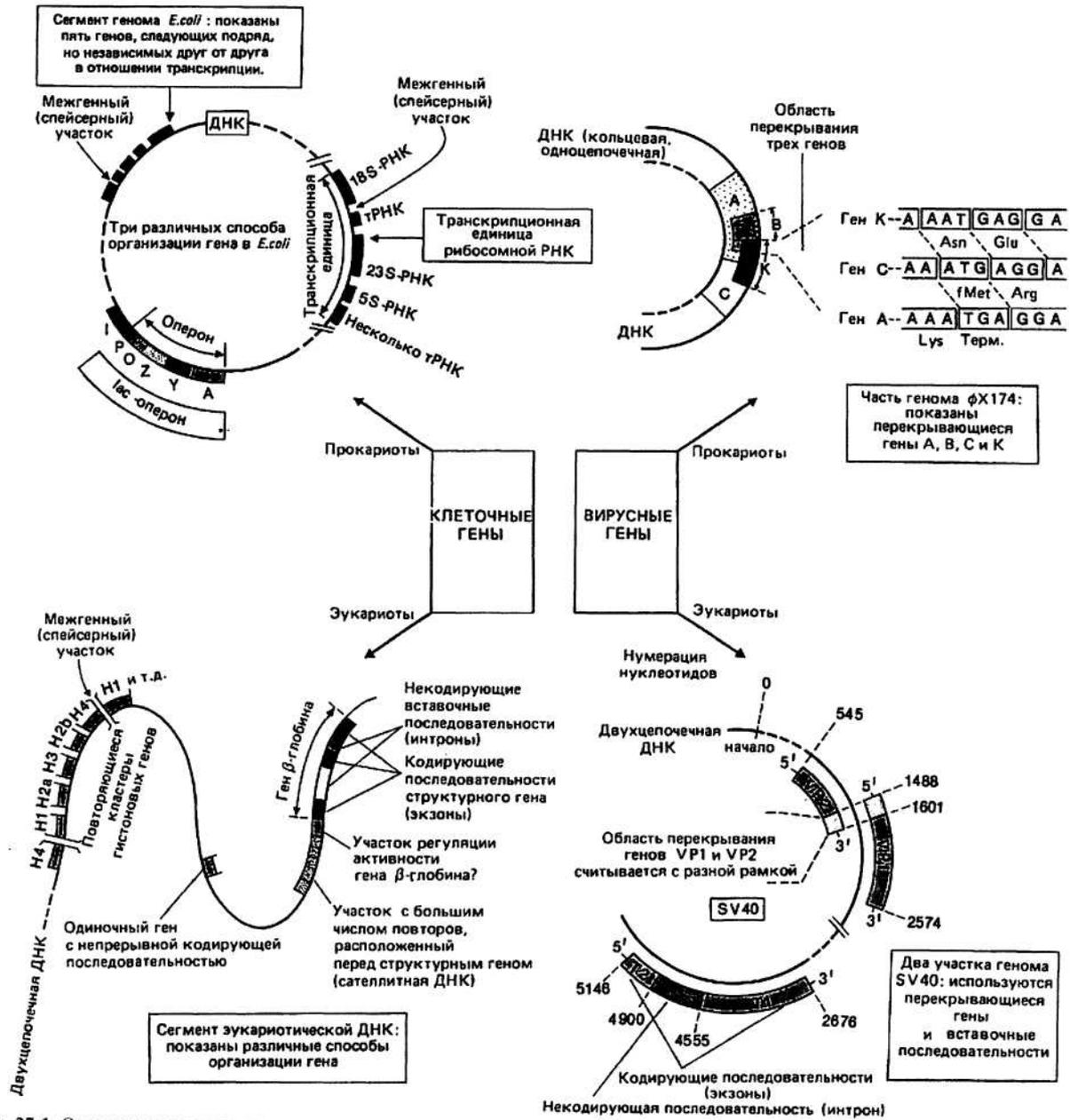


Рис. 27.1. Организация генетического материала.

Структурный ген - это наименьший отрезок ДНК или РНК, кодирующий полную аминокислотную последовательность какого-либо белка. В клетке высших организмов может содержаться до 100000 генов (по последним данным их существенно меньше). Однако ДНК в ней столько, что ее хватило бы на образование в 10 раз большего числа генов. До сих пор не вполне ясно, зачем клетке «лишняя» ДНК, хотя результаты последних исследова-

ний структуры эукариотической ДНК позволяют сделать кое-какие предположения на этот счет (см. ниже). В вирусах может быть всего лишь 5—6 генов, а геном прокариот составляет примерно 0,1% от генома высших.

ХРОМОСОМА ПРОКАРИОТ содержит примерно 2000—3000 неперекрывающихся генов, расположенных вдоль ДНК. Структурные гены подразделяются

на три основных типа: *независимые гены*, *транскрипционные единицы* (транскриптоны) и *опероны*. Кроме того, в клетке могут находиться более мелкие, автономно реплицирующиеся единицы, называемые *плазмидами*.

Независимые гены называются так потому, что их транскрипция происходит без участия каких бы то ни было механизмов регуляции транскрипционной активности в отличие от двух других классов генов. При этом говорят, что у такого гена конститутивная форма экспрессии, т. е. экспрессия без регуляции на уровне транскрипции. Всякий структурный ген представляет собой непрерывную последовательность кодонов, следующих вплотную друг за другом, а мРНК, реплицированная с такого гена, всегда моноцистронная (под цистроном понимают нуклеотидную последовательность, кодирующую целиком одну белковую цепь).

Спейсерная ДНК располагается между генами и не всегда транскрибируется. Иногда участок такой ДНК между соседними генами (так называемый спейсер) содержит какую-то информацию, относящуюся к регуляции и инициации транскрипции, но он может представлять собой и просто короткие повторяющиеся последовательности избыточной ДНК, роль которой остается неясной.

Транскрипционные единицы (транскриптоны) представляют собой группу следующих друг за другом генов, транскрибируемых совместно. Обычно это гены белков или нуклеиновых кислот, связанных между собой в функциональном отношении. Например, в *E. coli* обнаружены транскрипционные единицы, в которые входят гены различных рРНК (каждый ген — в единственном числе) и ряд генов разных тРНК. На рис. 27.1 изображена одна из таких единиц: в нее входят два гена тРНК и три гена, соответствующие трем разным рРНК. Транскрипционные единицы с тремя и даже четырьмя генами тРНК встречаются довольно часто, при этом в их расположении относительно генов рРНК не наблюдается никакой закономерности. Для этого класса генов молекула мРНК представляет собой транскрипт целой группы генов, поэтому такая мРНК называется полицистронной.

Опероны — это группы следующих подряд структурных генов, находящихся под контролем определенного участка ДНК, называемого *оператором*. Примером может служить *lac*-оперон (гл. 28), состоящий из трех структурных генов (*Z*, *Y* и *A*) и регуляторного участка ДНК, который в свою очередь состоит из двух последовательностей — промотора и оператора. Кроме того, еще один ген, ген-регулятор (*I*), кодирует белок, так называемый репрессор, с помощью которого происходит регуляция транскрипционной активности *lac*-оперона. Известно несколько метаболитов, необходимых для жизнедеятельности клетки, биосинтез или метаболизм которых контролируется фермента-

ми, кодируемыми генами, которые организованы в оперон (гл. 28). В опероне обычно не бывает спейсеров.

Плазмиды представляют собой небольшие кольцевые молекулы ДНК разной длины. Крупные плазмиды могут содержать до 100 генов. Такие плазмиды часто (хотя и не всегда) несут генетическую информацию, которая позволяет им переходить из одной клетки в другую во время процесса, называемого конъюгацией. В мелких плаزمиде число генов может составлять всего около 10, и они неспособны переходить из клетки в клетку при конъюгации. Число генов в плазмиде непостоянно. Обмен генетической информацией с геномом клетки или с другими плазмидами происходит путем переноса определенных участков плазмидной ДНК, способных к перемещению (транспозиции), с одной молекулы ДНК на другую и называемых поэтому *транспозонами*.

Транспозоны - участки ДНК, способные к перемещению с одной молекулы на другую, - часто содержат гены резистентности (нечувствительности) к антибиотикам. Гены, которые оказались в транспозоне, могут переходить от плазмид к хромосомной ДНК и обратно. Таким образом, вследствие переноса плазмид при конъюгации гены резистентности могут быстро распространяться в популяции бактерий.

ВИРУСЫ, ПОРАЖАЮЩИЕ ПРОКАРИОТ, используют в качестве генетического материала как ДНК, так и РНК. РНК в данном случае всегда бывает одно-цепочечной (гл. 5). ДНК может быть и двухцепочечной (как в бактериофагах T2, T4, T5 и T6), и одноцепочечной (как в бактериофаге фX 174). Одно из существенных различий в организации ДНК между некоторыми вирусами прокариот, с одной стороны, и прокариотическими клетками — с другой, состоит в том, что у этих вирусов в отличие от клеток есть *перекрывающиеся гены*.

Перекрывание генов наблюдается в том случае, когда одна и та же нуклеотидная последовательность кодирует два или три разных белка. Такие гены были впервые обнаружены в колифаге (т. е. бактериофаге, поражающем *E. coli*) фX174 Сэнгером с сотрудниками в 1977 г. Определив нуклеотидную последовательность фаговой ДНК, они обнаружили, что три гена (обозначаемые буквами К, С и А) занимают одно и то же положение в молекуле ДНК, но соответствующие этим генам последовательности нуклеотидов прочитываются каждая в своей системе отсчета (со своей рамкой считывания). Такое использование ДНК, хотя и дает значительную экономию генетического материала, сильно ограничивает возможность варьирования последовательности, особенно в области кодонов инициации и терминации различных белков. Так, для гена А последним основанием первого изображенного на рисунке кодона обязательно должен быть аденин, с которого начинается стартовый кодон гена С, кодирую-

ший fMet. Аналогичным образом первым основанием в третьем кодоне гена С также должен быть аденин, поскольку им оканчивается терминирующий кодон гена А.

КЛЕТКИ ЭУКАРИОТ используют в качестве генетического материала лишь двухцепочечную ДНК. Структурные гены, функционирование которых тесно связано со специфическими последовательностями в молекуле ДНК, называемыми регуляторными участками, подразделяются на *независимые гены*, *повторяющиеся гены* и *кластеры генов*. В кодирующие последовательности этих генов могут вклиниваться некодирующие, называемые *интронами*. Кроме того, между генами могут находиться участки ДНК с большим числом повторов (сателлитной ДНК) и спейсерной ДНК, транскрибируемой или нетранскрибируемой.

Независимые гены — это гены, транскрипция которых, как и у прокариот, не связана с транскрипцией других генов в рамках транскрипционной единицы. Их активность может, однако, регулироваться экзогенными веществами, например гормонами.

Повторяющиеся гены присутствуют в хромосоме в виде повторов одного гена. Ген рибосомной 5S-рНК повторяется много сотен раз, причем повторы располагаются тандемом, т. е. следуют вплотную друг за другом, без промежутков. Близкие к нему в функциональном отношении гены 5,8S-, 18S- и 28S-рНК также присутствуют в виде многочисленных повторов, но локализованы в ядрышковой ДНК.

Кластеры генов — это локализованные в определенных участках (локусах) хромосомы группы различных генов с родственными функциями. Кластеры тоже часто присутствуют в хромосоме в виде повторов. Например, кластер гистоновых генов повторяется в геноме человека 10—20 раз, образуя тандемную группу повторов.

Интроны — это участки ДНК, разбивающие экспрессируемую, т. е. кодирующую, часть гена на участки, называемые *экзонами*. Впервые феномен существования прерывистых генов был открыт при изучении аденовируса и подтвердился в 1977 г. при исследовании гена глобина мыши и рибосомных генов плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. В одном гене может находиться довольно много интронов; например, ген яичного альбумина курицы содержит 8 интронов, общая длина которых превышает сумму всех кодирующих последовательностей в этом гене. В процессе транскрипции РНК-полимераза снимает копию со всего гена. Затем специальные сплайсинг-ферменты осуществляют «монтаж» (сплайсинг) транскрипта,

т. е. вырезают интроны и «склеивают» экзоны друг с другом, в результате чего образуется зрелая, но еще немодифицированная мРНК. Чтобы подобный «монтаж» мог осуществиться, на границах интронов с экзонами в ДНК должны быть особые нуклеотидные последовательности. Такая последовательность изображена на рис. 27.2; она встречается в геноме довольно часто и после транскрипции может служить участком узнавания для сплайсинг-ферментов. Далее происходит нормальное созревание и трансляция мРНК (гл. 22).

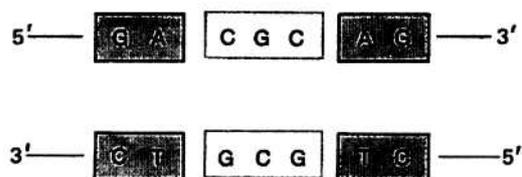


Рис. 27.2.

Сателлитная ДНК состоит из обладающих характерными особенностями нуклеотидных последовательностей (их длина может составлять от 10 до 200 нуклеотидов), которые расположены тандемно и сотни раз повторяются. Функция этой ДНК пока не выяснена.

ВИРУСЫ. ПОРАЖАЮЩИЕ ЭУКАРИОТ, используют разные формы организации гена; известны и такие вирусы, в которых есть как перекрывающиеся, так и прерывистые гены. Перекрывающиеся гены обнаружены, например, в вирусе млекопитающих SV40, в ДНК которого имеется участок (с 1488 по 1601 нуклеотидный остаток, считая от точки начала репликации), кодирующий два белка: VP1 и VP2. Таким образом, увеличение емкости генетического материала благодаря использованию нескольких систем отсчета (рамок считывания) при кодировании встречается у вирусов как прокариот, так и эукариот, но в геномах клеток ничего подобного пока не обнаружено. В вирусе SV40 есть также прерывистые гены. Один из генов поздней транскрипции, кодирующий антиген T_L (называемый обычно «большим T»: L = large = большой), расщеплен на два экзона. Длина первого экзона (T₁) составляет 246 пар оснований, второго (T₂) — 1879. Единственный разделяющий их интрон имеет в длину 345 пар оснований и вырезается из транскрипта гена T_L при сплайсинге, после чего происходит «склеивание» двух кодирующих последовательностей.

28. Регуляция экспрессии генов

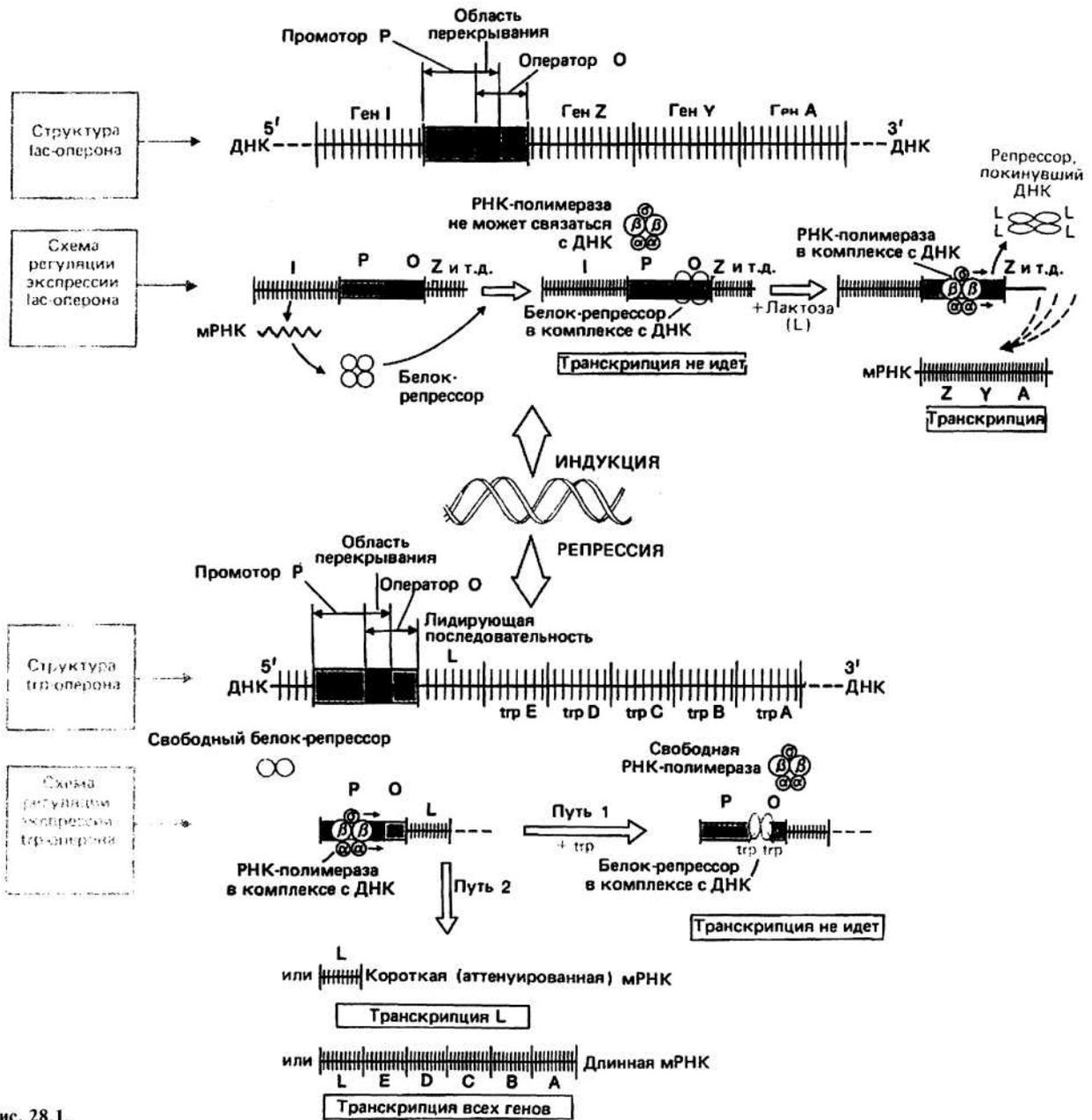


Рис. 28.1.

Экспрессия генов как у прокариот, так и у эукариот регулируется при помощи целого ряда механизмов. Некоторые из механизмов такого рода, действующие в бактериальных системах, изучены довольно хорошо, и два из них будут рассмотрены ниже, но о том, как действуют регуляторные механизмы в клетках эукариот, известно немного.

Прокариоты — это простейшие одноклеточные организмы, которым для того, чтобы выжить, требуется лишь благоприятная химическая среда. Если для обеспечения жизнедеятельности клетке необходим какой-то метаболит, она должна быть способна к синтезу ферментов, которые «пристроят» его в нужное место. Однако синтезировать такие ферменты в отсут-

ствии соответствующего метаболита было бы для клетки расточительством.

Предположение об индукции синтеза ферментов было высказано Жакобом и Моно в 1961 г. для того, чтобы объяснить, каким образом бактериальные клетки реагируют на изменения окружающей их среды. После введения в эту среду лактозы (молочного сахара) в качестве субстрата содержание в бактериальной клетке (β -галактозидазы — фермента, участвующего в расщеплении лактозы, — увеличивается в 100 раз. Такая активация транскрипции называется индукцией. Одновременно с лактазой индуцируются еще два белка: галактозидпермеаза (белок, осуществляющий транспорт лактозы через мембрану) и тиогалактозид-ацетилтрансфераза. Три структурных гена, кодирующих эти белки, обозначаются соответственно буквами Z, Y и A и вместе с операторным участком образуют так называемый *lac*-оперон. Было показано, что транскрипционная активность входящих в оперон генов регулируется четвертым, регуляторным геном. Ген-регулятор (ген I) в *lac*-системе расположен рядом со структурными генами Z, Y и A. Существование гена I было доказано генетическими методами. Когда были выделены мутантные бактерии, лишённые гена I (*I*⁻бактерии), то оказалось, что в таких бактериях экспрессия генов Z, Y и A поддерживается на высоком уровне даже в отсутствие лактозы, т. е. происходит конститутивно. После того как в *I*⁻бактерии ввели фрагмент ДНК, содержащий ген I, экспрессия генов Z, Y и A вновь стала чувствительной к присутствию лактозы. Отсюда был сделан вывод о том, что ген I кодирует какое-то диффундирующее регуляторное вещество, названное *репрессором*.

Репрессор — это белок, блокирующий транскрипцию гена. В *lac*-системе репрессор представляет собой тетрамерный белок и называется *lac*-репрессором. Он связывается с определенным участком на ДНК, который называется *оператором*.

Оператор (O) представляет собой небольшой участок ДНК, граничащий с первым структурным геном. Белок-репрессор может связываться с этим участком, блокируя тем самым инициацию транскрипции. Операторная последовательность, с которой связывается репрессор, содержит участок палиндромной ДНК. Последовательность с осью симметрии 2-го порядка, изображенная на рис. 28.2, является частью места связывания с репрессором в *lac*-опероне.

Промотор (P) — это небольшой участок ДНК перед оператором. Он служит местом связывания РНК-полимеразы. Место связывания репрессора (O) и участок P слегка перекрываются, так что, когда репрессор находится на ДНК, РНК-полимераза не может связаться с промотором и транскрипция не идет.

Индуктор — представляет собой низкомолекулярное вещество, которое связывается с репрессором и переводит его в неактивную форму, неспособную более



Рис. 28.2.

связываться с оператором. Так, в *lac*-системе индуктором является лактоза, после ассоциации с которой репрессор отсоединяется от *lac*-оператора. Индукция является одной из форм *негативной регуляции*, называемой так потому, что транскрипция может идти лишь после *удаления* репрессора. Еще одной разновидностью негативной регуляции является так называемая *катаболитная репрессия*.

Репрессия происходит тогда, когда репрессор связывается с оператором не иначе, как в комплексе с низкомолекулярным кофактором (корепрессором). Таким корепрессором часто бывает конечный продукт белкового синтеза, кодируемый опероном. Тогда, если концентрация этого продукта становится слишком высокой, он связывается с репрессором и дальнейший его синтез прекращается. Примером такой системы может служить *триптофановый оперон*.

Триптофановый оперон состоит из оператора и пяти структурных генов (A—E). Последние кодируют ферменты, участвующие в биосинтезе триптофана, одной из незаменимых аминокислот. По мере увеличения концентрации триптофана наступает момент, когда дальнейший его синтез становится нежелательным и транскрипция прекращается. «Выключение» транскрипции происходит следующим образом. Триптофан связывается с димерным репрессором (*trp*-репрессором), который кодируется отдельным, не входящим в оперон регуляторным геном. При этом происходит конформационное изменение, и открывается участок, способный связываться с операторной последовательностью в ДНК. Весь комплекс связывается далее с ДНК и блокирует место связывания с РНК-полимеразой (промотор). Это пример регуляции с помощью репрессии (путь 1 на рис. 28.1).

Вариация длины транскрипта — еще один механизм, посредством которого может осуществляться регуляция экспрессии оперонов в бактериях. Так, в *trp*-опероне помимо репрессии используется и другая система регуляции. Она связана с наличием в ДНК участка, расположенного непосредственно перед первым структурным геном (*trpE*) и называемого аттенуатором (путь 2 на рис. 28.1). Аттенуатор представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую команду, по которой происходит преждевременная терминация транскрипции. В случае *trp*-оперона при высокой концентрации триптофана 90% всех транскриптов терминируется после транскрипции

всего лишь 140 нуклеотидов и до начала транскрипции структурных *trp-генов*.

Позитивная регуляция — еще один способ регуляции экспрессии гена (на рисунке не показан). Он отличается от негативной регуляции тем, что транскрипция «включается», а не «выключается» после присоединения регуляторного белка к оперону. Корепрессор, или скорее коактиватор, присоединяется к белку-активатору; далее весь комплекс связывается с соответствующим участком на ДНК, и лишь после этого может происходить транскрипция. Примером регуляции такого типа может служить процесс, происходящий при участии катаболитного белка-активатора, коактиватором которого является сАМР (см. дополнительную литературу). В отсутствие (или при низкой концентрации) сАМР, что имеет место при размножении бактерий в присутствии глюкозы, блокируется транскрипция некоторых оперонов, в частности *lac*-оперона. Такое явление называется *катаболитной репрессией*.

ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ ОРГАНИЗМЫ в значительной части представлены многоклеточными формами с высокой специализацией клеток. Хотя во всех клетках человека содержится совершенно одинаковая ДНК, в разных тканях происходит экспрессия далеко не одинаковых наборов генов. Таким образом, должны существовать какие-то механизмы, при участии которых одни гены работают (т. е. экспрессируются), а другие нет. Для этой цели используется целый ряд механизмов: регуляция *на уровне транскрипции* и *на уровне трансляции*, *посттранскрипционная* и *посттрансляционная* регуляция и регуляция *с помощью гормонов*.

Регуляция на уровне транскрипции осуществляется при синтезе мРНК. Средние концентрации индивидуальных мРНК, транскрибируемых с разных генов, сильно отличаются друг от друга. Это обусловлено тем, например, что мРНК-копии одних генов разрушаются быстрее других, либо тем, что их синтез происходит медленнее. Регуляция может осуществляться при помощи белков, способных связываться с ДНК, и даже при помощи коротких фрагментов РНК, которые спариваются с ДНК, предположительно блокируя места прикрепления РНК-полимеразы. Таким образом скорость транскрипции может снижаться или, наоборот, повышаться.

Посттранскрипционная регуляция осуществляется на уровне процессинга мРНК. Даже в том случае, если транскрипция двух разных генов проходит с одинаковой скоростью, дальнейший процессинг мРНК, включающий модификацию 5'- и 3'-концов и сплайсинг эк-зонов, может протекать по-разному у разных мРНК.

Регуляция на уровне трансляции осуществляется за счет того, что исключается возможность использования мРНК в качестве матрицы для синтеза белка, хотя она и присутствует в цитоплазме. В ооците морского ежа, например, много мРНК, но сколько-нибудь заметного синтеза белка не происходит до тех пор, пока ооцит не будет оплодотворен. Лишь после этого молекулы мРНК подвергаются модификации, т. е. «приобретают» шпильку на 5'-конце (так называемый кэп, или «шапочку») и «шлейф» из poly (A) на 3'-конце (гл. 22), и могут далее включаться в нормальный трансляционный процесс, который завершается построением молекулы белка.

Посттрансляционная регуляция основана на том, что многие белки синтезируются в неактивной форме и должны еще пройти стадию модификации. Так, в р-клетках поджелудочной железы синтезируется не инсулин как таковой, а его предшественник, полипептидная цепь которого длиннее инсулиновой и содержит еще некоторую добавочную последовательность аминокислотных остатков. Лишь после того как эта последовательность вырезается протеолитическим ферментом, получается собственно гормон в своей функциональной форме. Таким образом, производство активного гормона может регулироваться посттрансляционным путем через регуляцию активности протеолитического фермента.

Регуляция с помощью гормонов — это частный случай регуляции на уровне транскрипции; таким путем организм заставляет клетку «включить» определенные гены в ответ на внешний стимул. Так, стероидные гормоны из тех клеток, где они были синтезированы, попадут в конечном счете в цитоплазму соответствующих клеток-мишеней, откуда специальный транспортный белок перенесет их в ядро, где они смогут активировать те или иные гены путем прямого взаимодействия с хроматином в соответствующих местах. Каждый гормон активирует свой набор генов. Таким способом обеспечивается соответствие реакции клетки роду сигнала, который клетка воспринимает через посредничество соответствующего гормона (гл. 41).

29. Клеточный цикл

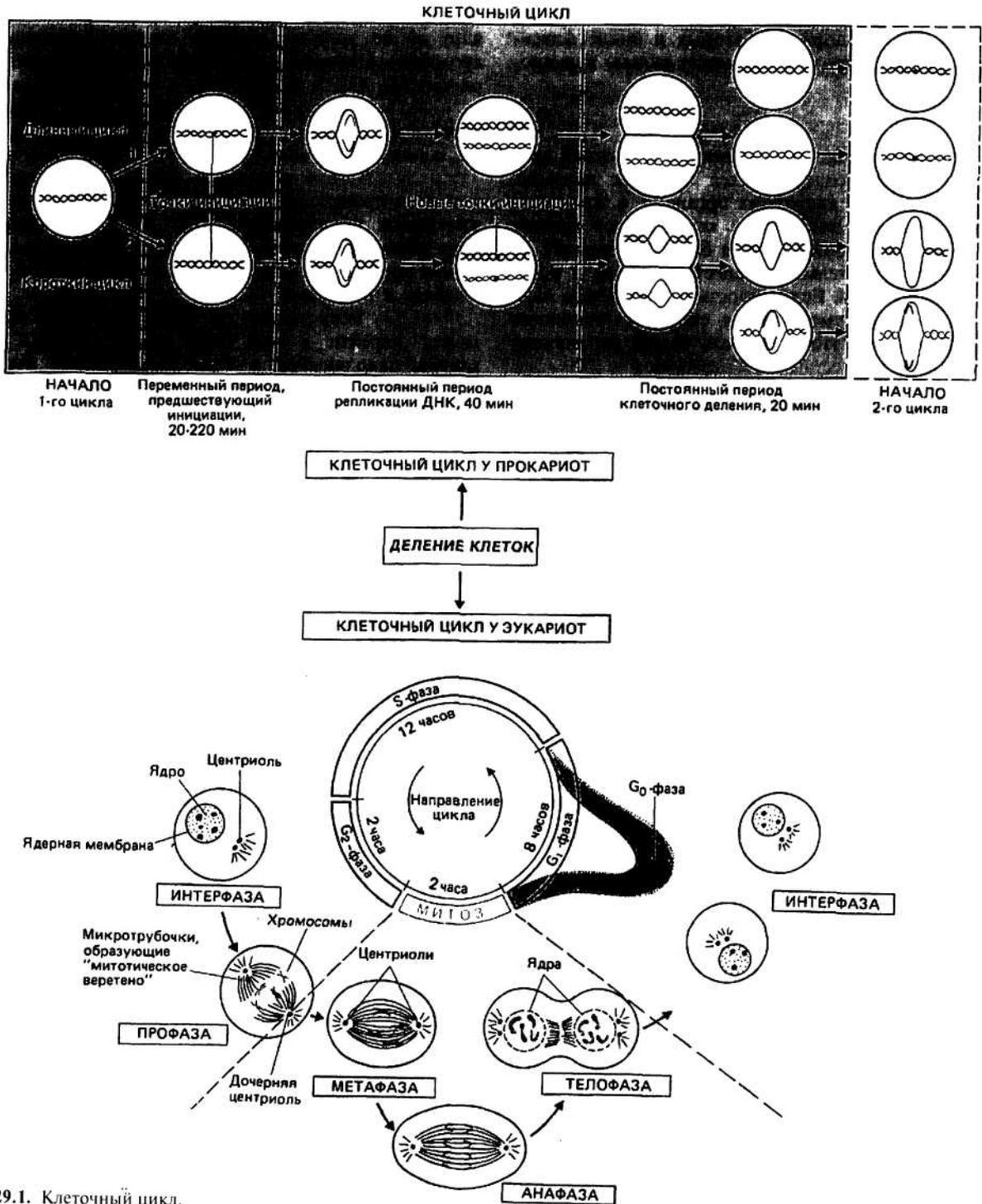


Рис. 29.1. Клеточный цикл.

Клеточный цикл — это последовательность событий, происходящих во время деления клетки, в результате которой образуются две дочерние клетки. Элементы клеточного цикла прокариотических клеток пока охарактеризованы недостаточно полно. Напротив, для эукариот четко установлен набор событий в клетке, порядок которых в цикле фиксирован, но время протекания может сильно варьировать.

ДЕЛЕНИЕ ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ включает репликацию единственной кольцевой хромосомы и всех содержащихся в клетке плазмид, а также удвоение клеточных органелл, в том числе плазматической мембраны и компонентов клеточной стенки. Скорость деления бактерий зависит от содержания питательных веществ в среде, в которой растут клетки. Если недостает каких-либо важных субстратов, уменьшается скорость инициации репликации; при этом скорость самой репликации не меняется.

Продолжительность репликации у большинства прокариотических клеток на удивление постоянна (около 40 мин). Если удвоение ДНК началось, оно продолжается до конца, независимо от любых изменений в составе питательной среды, произошедших в это время. Время, предшествующее инициации репликации ДНК, непостоянно (20—220 мин). В двух примерах на рис. 29.1 отдельно показаны длинный и короткий циклы. Длинный цикл имеет место тогда, когда велико время до начала инициации. В этом случае после начала репликации новые точки инициации в хромосоме не возникают до тех пор, пока не осуществляются все события клеточного цикла. Время, необходимое для появления новых точек инициации, непостоянно, и от него в основном зависит полная длительность клеточного цикла. Короткий цикл имеет место тогда, когда новые точки инициации возникают до полного завершения цикла репликации. Таким образом, еще до окончания деления клетки начинается следующий цикл репликации.

Инициация репликации осуществляется с помощью специфических белков. Если клетки поместить в среду без какого-либо ключевого субстрата, например триптофана, синтез белка сразу остановится. Хотя репликация ДНК и деление клетки продолжают, новый цикл репликации не начинается до тех пор, пока опять не начнется синтез белка. Отсюда следует, что инициаторы — это белки, взаимодействующие с ДНК и переводящие ее в такое состояние, в котором она способна связывать ДНК-полимеразу.

Деление клетки происходит, когда ее суммарная масса достаточна для двух клеток и когда завершилась репликация. Время, затрачиваемое на процесс деления, относительно постоянно и составляет около 20 мин.

МИТОТИЧЕСКОЕ ДЕЛЕНИЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК включает в себя ряд фаз клеточного цикла, которые в сумме для одного цикла деления могут составлять около 24 ч.

Интерфаза соответствует отрезку цикла, в течение которого ядерный хроматин распределен по ядру и не удается выявить никаких признаков хромосом. Интерфазу подразделяют на четыре периода: G_0 , G_1 , S и G_2 .

Профаза следует за интерфазой и является тем периодом после G_2 , когда становятся различимыми конденсированные хромосомы.

Митоз (М) — это период за профазой, во время которого происходит перестройка хромосом, завершающаяся образованием двух ядер и, наконец, двух дочерних клеток. Выделяют три четко различимых подпериода митоза, известных как *метафаза*, *анафаза* и *телофаза*.

Фаза G_0 непостоянна по длительности. Клетка может перейти к ней сразу после деления. О клетке, находящейся в фазе G_0 , говорят как о покоящейся, т. е. о пребывающей в неделяющемся состоянии. Клетки многих тканей взрослого организма находятся в основном именно в этом состоянии: в них не происходит репликации ДНК и может протекать лишь очень слабый синтез РНК. На переход клетки в фазу G_0 влияют такие факторы, как уменьшение количества питательных веществ, межклеточное контактное ингибирование деления и внутриклеточные регуляторы (например, в некоторых условиях циклический АМР). Когда клетка, находящаяся в фазе G_0 , подвергается действию определенных гормонов и других факторов роста, она может перейти из фазы G_0 в G_1 .

Фаза G_1 — это период, в течение которого клетка готовится к началу синтеза ДНК, осуществляемого в течение фазы S . Длительность фазы G_1 непостоянна (от нескольких часов до суток и даже больше). Почему это так, неизвестно, но при добавлении к клеткам в фазе G_1 гормонов продолжительность данной фазы часто уменьшается. Это можно объяснить увеличением скорости синтеза каких-то ключевых молекул под действием гормонов. Зачастую гормон должен находиться в клетке или на ее поверхности по крайней мере в течение 8 ч, пока сможет начаться репликация ДНК. Причина этого явления неизвестна. К концу фазы G_1 клетка полностью подготовлена к переходу к S -фазе.

Фаза S — это период, за который количество ДНК удваивается; он предшествует делению клетки на две дочерние. Длительность фазы S незначительно меняется от клетки к клетке и составляет около 6—8 часов. За репликацией ДНК можно следить, измеряя в этот период скорость включения в ДНК тимидина, меченного тритием (^3H-T). Одновременно происходит синтез РНК. Если к клеткам, находящимся в S -фазе, добавить 3H -цитидин, то радиоактивная РНК появляется вначале в ядре, а затем в цитоплазме. Хотя РНК синтезируется во время всей интерфазы, наиболее интенсивно этот процесс протекает в S -фазе. Можно остановить клетки в S -фазе, если добавить ингибиторы, такие, как актиномицин D, который бло-

кирует работу РНК-полимеразы, встраиваясь в ДНК (гл. 43). При этом клеточный цикл не может продолжаться, пока не завершится репликация ДНК. По завершении синтеза нуклеиновых кислот и после удвоения большинства других клеточных компонентов клетка переходит в фазу G_2 .

Фаза G_2 — это часть интерфазы, во время которой не происходит репликации ДНК и может идти лишь очень слабый синтез РНК, т. е. G_2 — это некий промежуточный период. В фазе G_2 содержание хромосом в клетке вдвое больше, чем в нормальной диплоидной клетке. Длительность фазы G_2 примерно 2—6 часов и относительно слабо зависит от типа клеток. В фазе G_2 происходит конденсация хроматина и исчезает ядерная мембрана. Между G_2 и М клетка проходит состояние профазы.

В профазе высококонденсированные хромосомы на самом деле оказываются состоящими из двух переплетенных, но отдельных структур, называемых *хроматидами*. Каждая хроматида — это завершенная копия двухцепочечной ДНК в комплексе с белками. Во время профазы центриоли, которые ранее поделились с образованием меньших, дочерних, центриолей, расходятся к противоположным полюсам. Виден сложный пучок микротрубочек (гл. 39), выходящих из центриолей, который называется митотическим веретеном. Оно образовано микротрубочками, распо-

ложенными между центриолями, и по форме напоминает яйцо. Эта структура выполняет в клетке функцию строительных лесов. Когда клетка входит в митоз, хромосомы связываются с «лесами», а ядерная мембрана перестает быть видимой. Хромосомы прикрепляются к микротрубочкам своими центромерами. **Митоз (М)** подразделяется на три периода: метафазу, анафазу и телофазу.

В *метафазе* хромосомы выстраиваются поперек митотического веретена, образуя метафазную пластинку. Механизм, лежащий в основе этой ориентации, неизвестен.

В *анафазе* хромосомы разделяются на составляющие их хроматиды. Каждая из хроматид от каждой пары движется к тому или другому концу митотического веретена. Движение хроматид, называемых теперь дочерними хромосомами, обусловлено сокращением микротрубочек, но детальный механизм этого процесса неизвестен. После завершения разделения хроматид клетка входит в телофазу.

В *телофазе* хроматиды деконденсируются, образуя дисперсный хроматин, и формируются ядерные мембраны. Митотическое веретено разрушается, а плазматическая мембрана перетягивается. В результате получаются две дочерние клетки. Затем каждая дочерняя клетка переходит в новый клеточный цикл в фазе G_0 или G_1 , и весь процесс повторяется.

30. Генная инженерия: клонирование генов

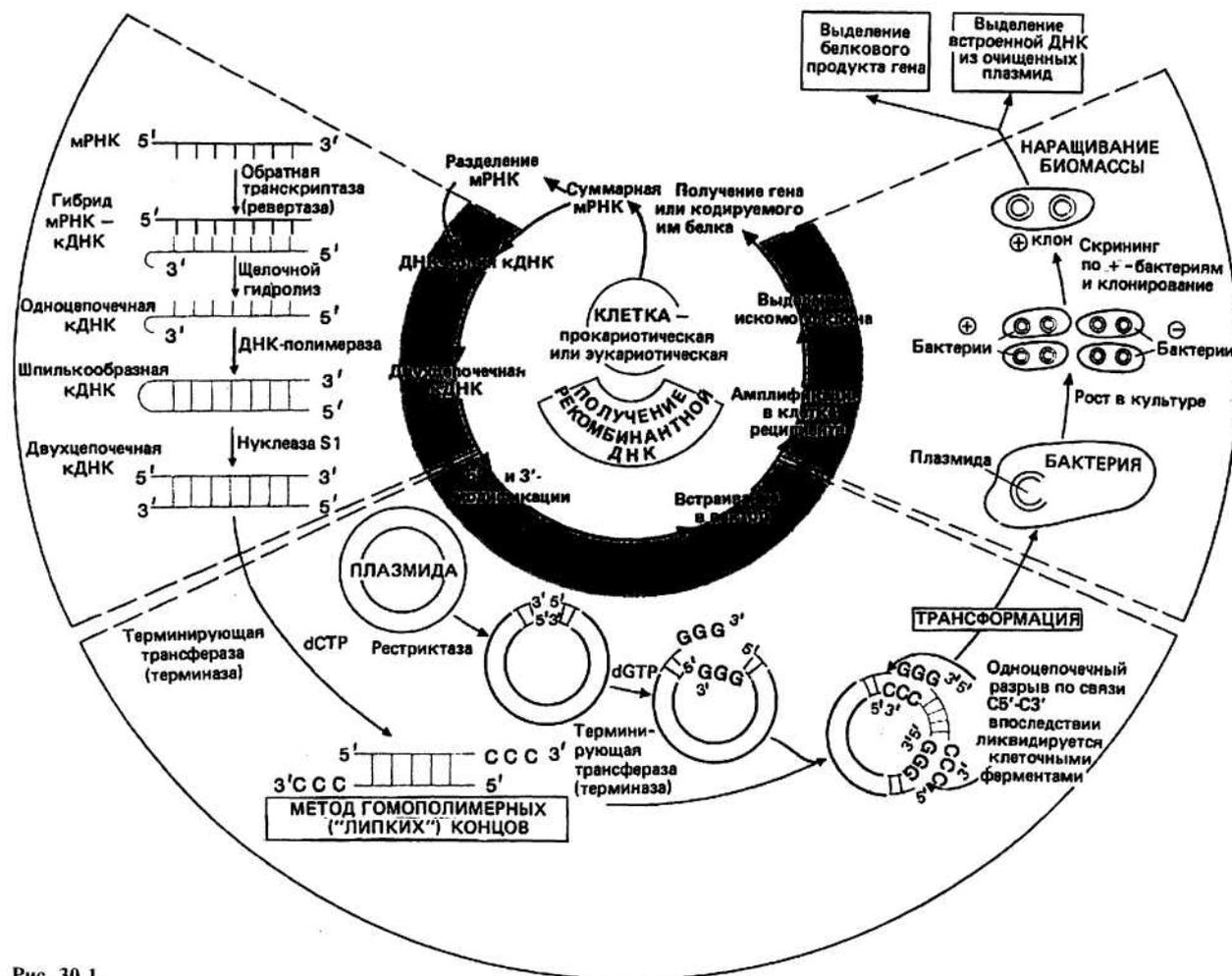


Рис. 30.1.

Клонирование генов – это процедура, включающая выделение и амплификацию отдельных генов в реципиентных клетках, про- или эукариотических. Эти клетки, содержащие нужный нам ген, можно использовать для получения либо а) большого количества белка, кодируемого данным геном, либо б) большого количества самого гена в высокоочищенном виде. В настоящее время используют две схемы клонирования гена. Согласно первой из них, геномную ДНК сначала расщепляют случайным образом с помощью рестрицирующих эндонуклеаз (см. ниже) на небольшие фрагменты примерно такой же длины, что и ген. Далее каждый фрагмент вводят с помощью вектора в реципиентную клетку, которая затем размножается, амплифицируя при этом ген или гены, содержащиеся в данном фрагменте. К этой методике мы больше возвращаться не будем. Согласно второй схеме, с инфор-

мационной РНК, выделяемой из однотипных клеток организма, снимают ДНК-копии (кДНК), которые затем вводят в реципиентные клетки, в среднем по одному гену на клетку, и амплифицируют тем же способом, что и в первом случае.

Реципиентные клетки, т.е. клетки, выбранные для клонирования гена, могут быть как про-, так и эукариотическими. Чаще всего для этой цели используют бактерии, поскольку их легко получать в большом количестве. Если, однако, ген был выделен из клеток млекопитающих по первой методике, то его нужно клонировать в клетках эукариот, например в клетках дрожжей, из-за неспособности ДНК, содержащей интроны (гл. 27), экспрессироваться в прокариотической клетке. Рассмотрим теперь вторую методику.

Матричную (информационную) РНК (мРНК) выделяют из клеток или тканей, в которых экспрессиру-

ется искомый ген. Так, для клонирования проинсулинового гена следует использовать (3-клетки поджелудочной железы, так как именно для них характерно высокое содержание проинсулиновой мРНК. Суммарную клеточную мРНК с помощью центрифугирования в градиенте сахарозы можно разделить на фракции, впрочем, довольно сильно перекрывающиеся. При такой грубой очистке число посторонних молекул мРНК в препарате уменьшается. Затем с молекул мРНК, попавших в нужный нам диапазон молекулярных масс (для белка таких размеров, как проинсулин, длина соответствующей молекулы мРНК составит примерно 25 000 нуклеотидов, или 25 т.п.н.), снимаются ДНК-копии.

Синтез ДНК - копий осуществляется ферментом, называемым обратной транскриптазой, или ревертазой (еще одно его название — РНК-зависимая ДНК-полимераза), который выделяют обычно из соответствующих РНК-содержащих вирусов. Чтобы этот фермент начал работать, требуется короткая (около 10 нуклеотидов) одноцепочечная ДНК-затравка; для этой цели, как правило, используют oligo(dT). Затравочная ДНК самопроизвольно образует двухцепочечный комплекс с отрезком poly(dA), который всегда присутствует на 3'-конце молекул эукариотической мРНК (гл. 22). По завершении стадии копирования исходную цепь РНК разрушают (деполимеризуют).

Деполимеризацию исходной РНК-цепочки осуществляют путем щелочного гидролиза. Цепи ДНК устойчивы к обработке щелочью, а РНК полностью деполимеризуется. Получившаяся в результате ДНК является одноцепочечной (оц), лишь на конце молекулы образуется «шпилька» с небольшой петлей. Такая шпилька образуется потому, что на 5'-конце большинства мРНК имеется последовательность, одна половина которой комплементарна другой (палиндром) и которая в результате копирования оказывается и в кДНК. Таким образом, концевой участок цепочки кДНК, где расположена эта последовательность, может замыкаться сам на себя с образованием петли и отрезка двойной спирали.

Двухцепочечную (дц) кДНК получают путем достраивания оц-кДНК до двухцепочечной формы, выполняемого ферментом ДНК-полимеразой I. Для того чтобы этот фермент функционировал, также в принципе требуется затравочная ДНК, однако здесь ее вполне заменяет короткий отрезок двойной спирали, образуемый шпилькой. На одном из концов такой дц-кДНК все еще остается одноцепочечная петля; она удаляется с помощью фермента нуклеазы S1. Этот фермент разрезает петлю и, кроме того, подравнивает цепочки ДНК, удаляя всю оставшуюся оц-ДНК. После такой обработки кДНК можно встраивать в вектор.

Вектор - это нечто вроде молекулярного «такси», способного переносить чужую ДНК внутрь бактериальной клетки таким образом, чтобы она могла там реплицироваться. Существует два основных типа век-

торов: бактериальные плазмиды и бактериофаги. Здесь мы рассмотрим только первый тип.

Плазмиды — это встречающиеся в клетках внехромосомные элементы, представляющие собой замкнутые кольцевые молекулы дц-ДНК (гл. 26). Они способны реплицироваться независимо от геномной ДНК бактерий. Часто плазмиды содержат гены, белковые продукты которых обеспечивают нечувствительность к тем или иным антибиотикам. Этим свойством пользуются для отделения бактерий, содержащих плазмиды («+»-бактерии), от «—»-бактерий, лишенных плазмид. Чтобы включить кДНК в плазмиду, замкнутое кольцо плазмиды надо «разомкнуть». Для этого плазмиды подвергают воздействию рестриктаз.

Рестриктаза - (гл. 18) разрезает дц-ДНК по определенным нуклеотидным последовательностям, называемым участками рестрикции (обычно это короткие палиндромные последовательности); разные рестриктазы узнают разные палиндромы. В плаزمиде, встречающихся в природе, часто бывает много таких участков для каждой из рестриктаз. Поскольку в идеальном случае нам нужна одна-единственная точка разреза, есть смысл в направленном отборе или «конструировании» плазмид с таким свойством. Например, в плазмиде pBR322, широко используемой в качестве вектора, для многих рестриктаз имеется лишь по одному участку рестрикции; в ней также имеются гены, обеспечивающие резистентность к ампициллину и пенициллину; и в ней нет некоторых «несущественных» генов, имевшихся в ее прототипе. Оставлены лишь те гены, которые необходимы для осуществления функций трансформации бактерий и репликации плазмиды.

Сшивание (лигирование) — процедура, в ходе которой чужеродная ДНК встраивается между (или сшивается с) двумя концами плазмидной ДНК с помощью фермента, называемого ДНК-лигазой. Чтобы эта операция могла осуществиться, необходимо, чтобы концы кДНК и плазмидной ДНК были «липкими». Для этого на концах должны быть оц-последовательности, способные образовывать комплекс друг с другом через спаривание оснований и обеспечивающие сцепление двух пар концов. Так образуется плазмиды, которая называется рекомбинантной. Описываемая ниже процедура, с помощью которой это достигается, называется *методом гомополимерных концов*. Существует еще одна процедура, называемая связыванием по сайтам рестрикции, но мы ее рассматривать не будем.

Метод гомополимерных концов основан на присоединении к 3'-концам цепей, образующих дц-ДНК, коротких отрезков оц-ДНК с регулярной последовательностью (гомополимерных). Если каждый подобный гомополимер состоит из нуклеотидов одного вида и если два таких гомополимера с взаимно комплементарными основаниями присоединены соответственно к плазмиде и к кДНК, то последние, оказавшись рядом, замкнутся друг на друга с образованием рекомбинантной плазмиды.

Трансформация происходит после того, как рекомбинантную плазмиду добавляют к бактерии-реципиенту: плазида проникает внутрь бактерии и включается в ее жизненный цикл. Поскольку не все бактериальные клетки в реакционной смеси будут трансформированы, желательно провести их отбор, с тем чтобы размножаться могли лишь рекомбинантные бактерии. Отбор может быть основан на том, что плазмиды обеспечивают резистентность к тем или иным антибиотикам. Это означает, что только те бактерии, в которых есть плазмиды, будут размножаться в присутствии соответствующего антибиотика.

Скрининг («просеивание») — это процедура, необходимость применения которой обусловлена тем, что в исходном препарате кДНК представлено много разных мРНК и лишь часть плазмид несет нужный нам ген. Методики, которые при этом используются, слишком специальные, и мы не будем их здесь рассматривать; подробное описание их имеется в приложен-

ных ссылках. Как только нужную нам бактерию удалось выделить, ее нетрудно клонировать и размножить в культуре. Это уже содержание следующего этапа, называемого амплификацией.

Амплификация осуществляется благодаря тому, что в одной бактериальной клетке может синтезироваться много копий интересующей нас плазмиды, а также за счет получения большого количества клеток с такими плазмидами. После выделения и очистки плазмиды обрабатывают соответствующей рестриктазой, которая вырезает встроенные в них копии искомого гена. Амплифицированный таким образом ген можно использовать для дальнейших экспериментов в области генной инженерии, аналогичных тем, что упомянуты в списке рекомендуемой литературы. Кроме того, бактерии можно применять для получения белкового продукта гена, встроенного в плазмиду, если выполняются два условия: а) происходит транскрипция этого гена и б) нужный белок секретируется бактерией.

31. Структура полисахаридов

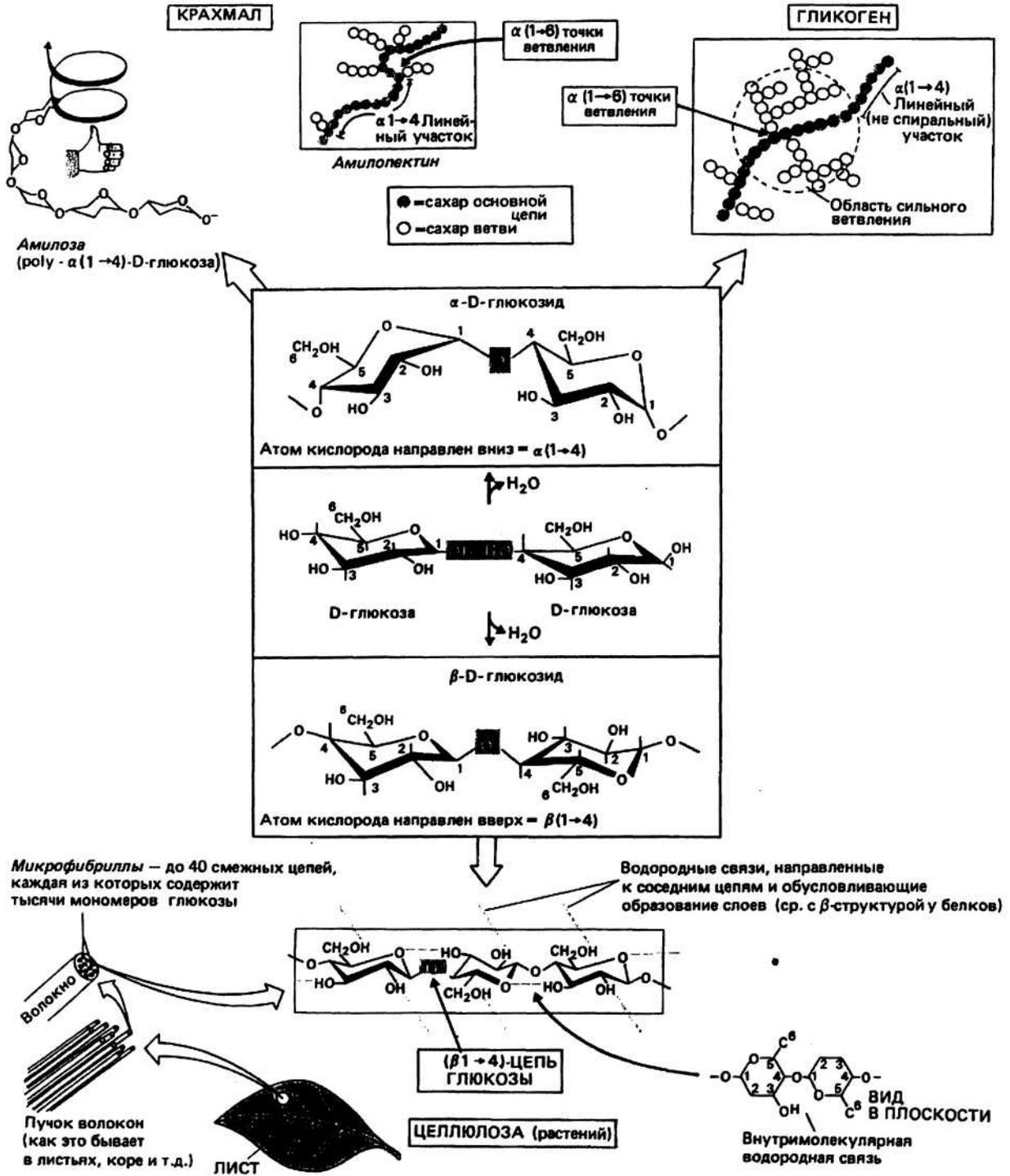


Рис. 31.1.

ПОЛИСАХАРИДЫ — это длинные цепочки из моносахаридов, соединенных гликозидными связями. Нередко полисахариды имеют линейную структуру, но могут и ветвиться. У растений и животных полисахариды играют структурную роль и служат резервным веществом. Наиболее распространенный моносахарид, чаще всего встречающийся в полисахаридах, — это шестиатомный сахар (гексоза) D-глюкоза. Из-за наличия разных способов связывания гексоз (типов гликозидной связи) и разных функциональных групп структура полисахаридов весьма разнообразна. Мы рассмотрим только пять из множества полисахаридов.

D-глюкоза — это шестиатомный моносахарид; его структура показана на рис. 31.2. Группа —ОН при атоме углерода 1 направлена либо вверх (т. е. в ту же сторону, что и атом углерода 6), и тогда образуется (β-D-глюкоза, либо вниз, и тогда получается α-D-глюкоза. Различие между этими родственными сахарами играет наиболее важную роль при образовании из них полисахаридов. Гексозы (например, D-глюкоза) могут находиться в двух стабильных конформациях, представляющих собой две разновидности конформации типа «кресла» (гл. 14): С1 и 1С. В состоянии С1 массивные ОН-группы параллельны плоскости сахарного кольца и направлены в стороны; о таких группах говорят, что они имеют *экваториальную* ориентацию. В состоянии 1С эти группы направлены вверх и вниз относительно кольца, т. е. имеют *аксиальную* ориентацию. Так как кислород — это весьма большой атом, конформация С1 более предпочтительна, поскольку при этом крупные атомы располагаются далеко друг от друга.

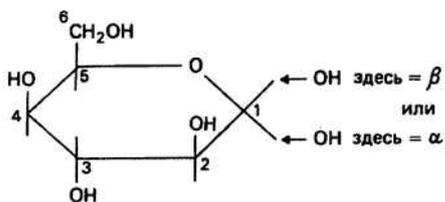


Рис. 31.2.

Гликозидная связь образуется при взаимодействии двух моносахаридов. Это эфирная связь, формирование которой сопровождается высвобождением молекулы воды (рис. 31.1). Существуют разные способы образования гликозидных связей. В линейных полисахаридах она создается между атомом С одного сахарного остатка и либо третьим, либо четвертым углеродным атомом следующего остатка; при этом оба сахара, как правило, находятся в С1-(экваториальной) конформации. Гликозидные связи обозначаются следующим образом: (β(1 → n) — это связь между атомом кислорода при атоме углерода 1 в (β-положении и углеродом n следующего сахара; в образовании свя-

зи α(1 → n) участвуют те же углеродные атомы, но теперь атом кислорода при углероде 1 занимает α-положение. Наиболее часто встречаются гликозидные связи β(1 → 4) и β(1 → 3) (примеры - *целлюлоза* и *гемицеллюлозы* растений), а также α(1 → 4) и α(1 → 6) [примеры — *крахмал* (растения) и *гликоген* (животные)]. Довольно редки связи типов (2 → 1) и (2 → 6); они обнаружены в таких соединениях, как фруктаны, содержащиеся в некоторых растениях.

ЦЕЛЛЮЛОЗА состоит из полимерных цепочек молекул D-глюкозы (до 1000 звеньев), соединенных между собой β(1 → 4)-гликозидными связями. Эти цепочки объединяются, образуя волокна. Когда молекулы глюкозы, находящиеся в С1-конформации, образуют β(1 → 4)-цепочки, формируется β-структура. Связано это с тем, что сахарные остатки, соединенные гликозидными связями, теряют полную свободу вращения вокруг С¹—О- и О—С⁴-связей из-за наличия массивных ⁶СН₂ОН-групп, и полимер приобретает конформацию, благоприятную для образования межцепочечных водородных связей, в случае когда цепочки располагаются антипараллельно.

Стенки растительных клеток состоят из большого числа β-слоев, упакованных таким образом, что направления цепей в соседних слоях оказываются противоположными. В результате образования водородных связей между слоями у растительных клеток формируется прочная защитная многослойная оболочка. Помимо целлюлозы стенки растений содержат ряд водорастворимых гемицеллюлоз, например поликсилозу (ксилан). Моносахарид ксилоза - это D-глюкоза, у которой группа ⁶СН₂ОН замещена атомом водорода. У ксилана вращение не ограничено, и он образует правую спираль с тремя мономерными единицами на один виток. Если посмотреть на молекулы целлюлозы и ксилана вдоль их длинных осей, то мы сразу поймем, почему различается растворимость этих двух компонентов клеточной стенки (рис. 31.3): у ксилана площадь гидрофильной поверхности на единицу длины цепи значительно больше и, следовательно, он лучше растворяется в воде, чем целлюлоза.

КРАХМАЛ— это резервный полисахарид растений. Он состоит из двух компонентов: α-амилозы и амило-пектина. α-Амилоза - полимер D-глюкозы, в котором мономерные единицы соединены α(1 → 4)-

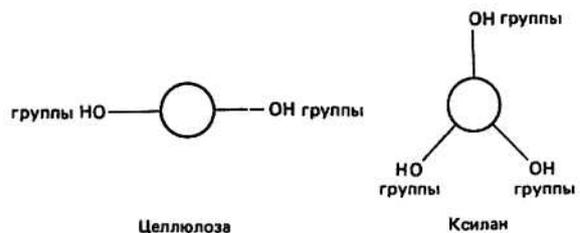


Рис. 31.3.

гликозидными связями. В случае α-связи имеет место

большая свобода вращения вокруг связей 'C—O и O—⁴C, и цепочка образует стабильную левую спираль с шестью остатками глюкозы на один виток. Любопытно, что молекулы иода по своим размерам очень точно подходят к центральной полости этой спирали и образуют комплекс, обуславливающий изменение цвета α-амилозы при иодно-крахмальном тесте. Амилопектин состоит из цепей poly(D-глюкозы) с α(1 → 4)-гликозидными связями; от этих цепей периодически отходят боковые ветви, присоединенные к основной цепи α(1 → 6)-связями. Ветви представляют собой короткие фрагменты полимера глюкозы со связями типа α(1 → 4) и не дают возможности основной цепи образовать спираль. Амилопектин имеет структуру типа куста. Вместе с α-амилозой он образует сложную сеть. Когда у организма возникает необходимость в глюкозе как источнике энергии, пищеварительные ферменты имеют возможность проникать внутрь этой структуры благодаря тому, что амилопектин делает сеть более рыхлой.

ГЛИКОГЕН— это резервный полисахарид животных; у млекопитающих его содержание наиболее высоко в печени. Гликоген тоже состоит из цепей D-глюкозы с α(1 → 4)-гликозидными связями, но у него боковые ветви, присоединенные к основной цепи связями α(1 → 6)-типа, расположены значительно чаще, чем у амилопектина. В отличие от крахмала у гликогена отсутствует спиральная структура. Молекула гликогена еще более разветвлена и ее структура поэтому еще более «открыта». Поскольку у животных этот полисахарид играет роль источника энергии, который исполь-

зуется чаще, чем соответствующее резервное вещество у растений, он должен быть легко доступен для ферментов, отщепляющих от полимерной цепи глюкозу.

ХИТИН — структурный полисахарид, основной компонент покровов тела насекомых, — формируется из цепей слегка модифицированной глюкозы. Если в глюкозе группу —OH в положении C² заменить на —NH.CO.CH₃(N-ацетил)-группу, то получится N-ацетилглюкозамин (NAG). Полимеры NAG, образованные с помощью (β(1 → 4)-связей, формируют слоистую структуру, подобную целлюлозе. Однако теперь межцепочечные водородные связи более прочные, поскольку в их образовании участвует N-ацетильная группа. Насекомые синтезируют многослойную структуру, в которой слои poly(NAG) перемежаются слоями белка, и в результате образуется чрезвычайно твердая оболочка. Это показывает, что полисахариды в комплексе с белками или пептидами способны образовывать гораздо больше разнообразных структур, чем сами по себе (гл. 35).

ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА - это полимер с чередующимися связями β(1 → 3) и β(1 → 4) между мономерами D-NAG и D-глюкуроновой кислотой (модифицированной формой NAG, у которой группа ⁶CH₂OH заменена на COOH) в следующей последовательности: [D-глюкуроновая кислота-(1 → 3)-NAG-(1 → 4)]_n. Гиалуроновая кислота является составной частью хрящей, костей и кожи и связана с другими сложными сахарами (такими, как хондроитинсульфат и кератансульфат) и с белками.

32. Липиды: 1

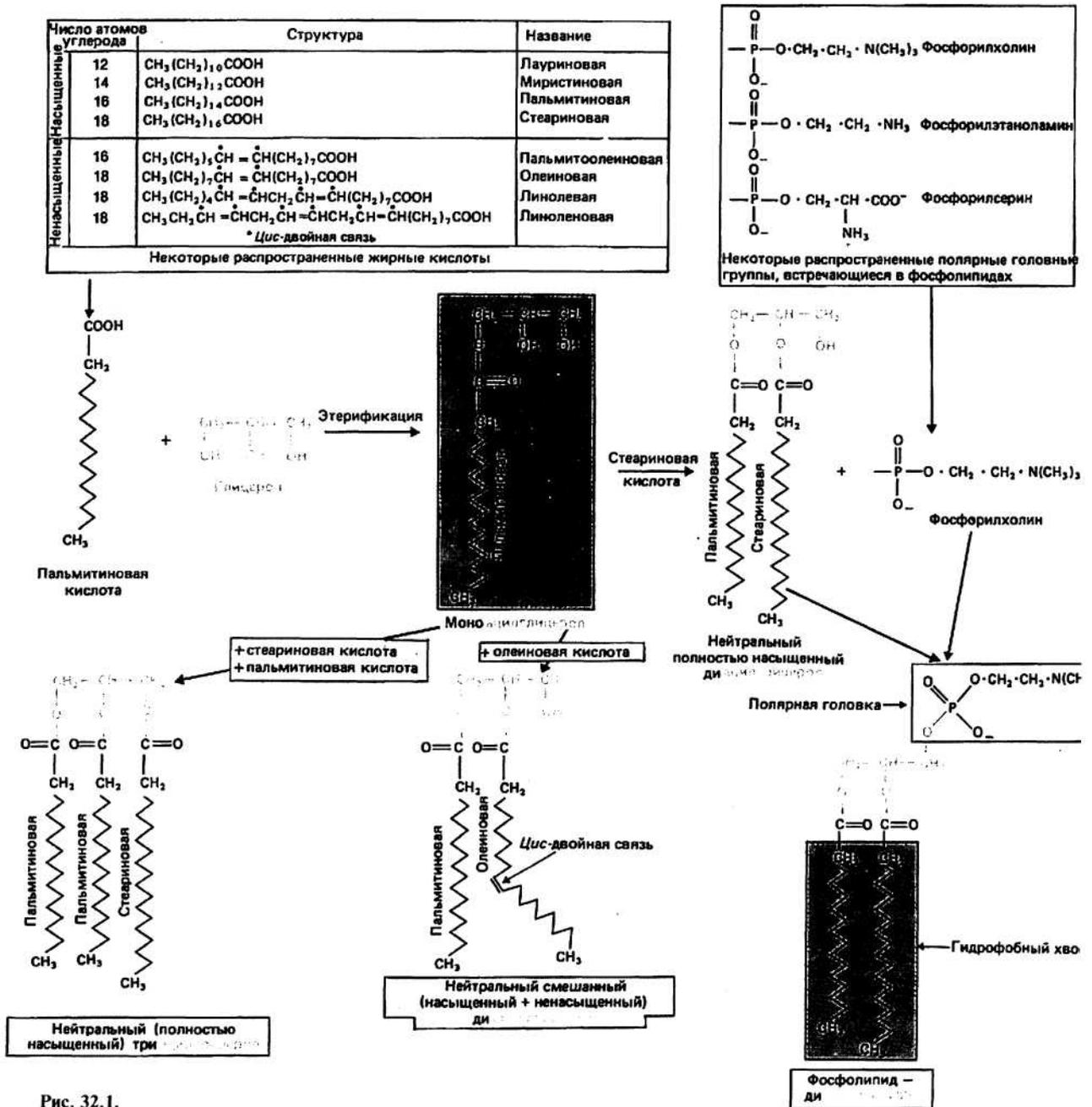


Рис. 32.1.

Липиды — это водонерастворимые органические молекулы, присутствующие во всех живых клетках и тканях. Липиды образуют множество семейств, но всех их объединяют общие отличительные свойства, обусловленные тем, что в их основе лежат углеводородные структуры. По своим биологическим функциям липиды подразделяются на три основные груп-

пы: 1) структурные и рецепторные компоненты мембран и клеточных поверхностей; 2) депо энергии; 3) «посредники» биологических сигналов. Для липидов групп 1 и 2 характерно то, что их основным компонентом являются *жирные кислоты*. В группу 3 входят витамин А, витамин Е, стероидные гормоны, которые образуют структурно изолированную группу молекул. В это

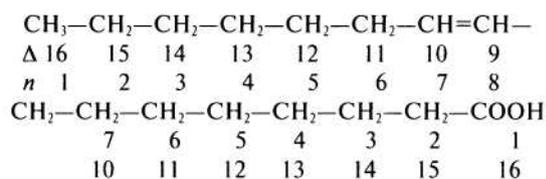
разделе мы опишем разные типы жирных кислот и те липиды, в основе которых лежит глицерол (функциональные группы 1 и 2). В гл. 33 мы рассмотрим примеры липидов, у которых в основе их структуры лежит сфингозин (функциональные группы 1 и 2). Кроме того, будут описаны структура и функция некоторых простых, или «неомыляемых», липидов (функциональная группа 3).

ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ — это длинные углеводородные цепи, несущие на одном из концов карбоксильную ($-\text{COOH}$) группу. Углеводороды могут быть *насыщенными* или частично *ненасыщенными*.

Насыщенные жирные кислоты содержат концевую метильную группу ($-\text{CH}_3$), разное число метиле-новых групп ($-\text{CH}_2-$) и концевую карбоксильную группу. В зависимости от организма их длина варьирует от C_{14} до C_{22} . При этом чаще всего встречаются жирные кислоты C_{16} (пальмитиновая) и C_{18} (стеариновая). Число атомов углерода всегда четно для насыщенных жирных кислот наземных растений, бактерий и животных, но может быть нечетным у некоторых морских организмов. У бактерий встречаются разветвленные жирные кислоты, а также гидроксид-кислоты, такие, как полимеры гидроксимасляной кислоты.

Ненасыщенные жирные кислоты содержат одну (моноеновые) или более (полиеновые) двойных связей, которые почти всегда находятся в \wedge -конформации (гл. 34). Среди моноенасыщенных кислот чаще всего встречаются C_{16} - (пальмитоолеиновая) и C_{18} - (олеиновая) кислоты, а среди триненасыщенных — C_{18} (линоленовая). Жирные кислоты с более чем одной двойной связью отсутствуют у бактерий и широко распространены у растений и животных. Если двойная связь только одна, она всегда бывает расположена между углеродными атомами 9 и 10 жирной кислоты, причем за положение 1 принимается концевой атом углерода карбоксильной группы. Другие двойные связи располагаются между атомом углерода 10 и концом цепи, несущим метильную группу; при этом между каждой парой двойных связей находится по крайней мере одна группа $-\text{CH}_2$.

Названия ненасыщенных жирных кислот образуются в соответствии с одной из двух используемых систем нумерации углеродных атомов. У жирных кислот углеродные атомы нумеруют либо с COOH - (А-система нумерации), либо с CH_3 - (Я-система нумерации) конца. Покажем это на конкретном примере ненасыщенной жирной кислоты:



Тривиальное название: пальмитоолеиновая кислота. А-Название: 16:1Д9; это означает, что двойная связь расположена через 9 атомов углерода от COOH -группы.

«-Название: 16:1 « — 7; это означает, что двойная связь расположена через 7 атомов углерода от CH_3 -конца.

Природные жирные кислоты имеют как животное, так и растительное происхождение. Животные жиры, подобные тем, что присутствуют в масле, свином сале, и т. д., — это в основном смесь насыщенных жирных кислот (40—60%) с моноенасыщенными (30—50%), в которой присутствуют следовые количества полиненасыщенных жирных кислот. Животные жиры почти всегда находятся в форме ацилглицеролов (т. е. липидов), наиболее типичные из них — триацилглицеролы (см. ниже). Растительные жиры, или, точнее, масла, обычно содержат меньше насыщенных жирных кислот (10—20%) и много ненасыщенных (80—90%). Состав ненасыщенной фракции зависит от растения; например, оливковое масло на 79% состоит из олеиновой кислоты, в то время как подсолнечное — на 75% из линолевой кислоты. Таким образом, можно говорить, что пища богата полиенами, если в ней содержится много подсолнечного (или подобного ему) масла. Основной компонент этого масла — линолевая кислота — является *незаменимой жирной кислотой*. Жирные кислоты, как правило, запасаются в организме в форме триацилглицеролов, так как свободные жирные кислоты при высоких концентрациях токсичны. Большинство жирных кислот может быть получено с пищей, но они не являются незаменимыми: эукариотические клетки могут сами их синтезировать. Но есть два исключения.

Основные незаменимые жирные кислоты — это линолевая и линоленовая. При отсутствии их в пище у человека может развиваться заболевание, характеризующееся шелушением кожи, выпадением волос и замедлением роста.

Липиды образуются в результате этерификации жирных кислот соединениями, содержащими OH -группы; как правило, это трехатомный спирт *глицерол* и аминокислота *сфингозин*. Помимо жирных кислот к спиртовому компоненту могут быть присоединены и другие группы, такие, как аминокислоты, кислоты и углеводы. Благодаря этому образуется множество различных липидов с разнообразными свойствами.

Глицерол — это трехуглеродная молекула, у которой к каждому атому углерода присоединено по одной гидроксильной (OH) группе. Жирная кислота может этерифицировать любую из трех OH -групп; при этом образуется моноацилглицерол. Этерификация жирными кислотами двух или трех гидроксильных групп приводит к образованию соответственно диацил- или триацилглицеролов. Большая часть энергии, запасаемой животными в виде «жира», содержится именно в этих формах. Ацилглицеролы — это нейтральные липиды, т. е. у них нет полярных головок. У высших рас-

тений к атому углерода в третьем положении в диацилглицероле часто присоединен гликозидной связью шестиуглеродный сахар; примером такого рода может служить галактозилдиацилглицерол. Когда к одному из трех углеродных атомов в глицероле присоединена полярная головка (например, галактоза), такой липид называют *амфипатическим*.

Для **амфипатических липидов** характерно наличие длинного гидрофобного хвоста и полярной головки, которая может нести заряд или быть незаряженной. Специфическая способность этих соединений одновременно вступать как в гидрофильные, так и гидрофобные взаимодействия делает их идеальными компонентами биологических мембран (гл. 34). Это свойство можно проиллюстрировать на опыте, в котором амфипатические липиды находятся в водном растворе при высоком или при низком отношении вода:липид. При избытке воды липиды образуют мицеллы (показаны в разрезе на рис. 32.2), в которых гидрофобные жирнокислотные хвосты находятся внутри сферической капли, а полярные головки расположены на ее поверхности и контактируют с полярным растворителем — водой. Когда липид находится в избытке, наблюдается обратная картина: полярные головки образуют центральную область сферы, включающую в себя и воду, а жирнокислотные цепи

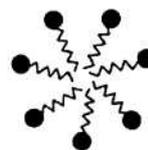


Рис. 32.2.

располагаются снаружи. Такие «вывернутые мицеллы» образуют эмульсию; это происходит в результате агрегации мицелл благодаря гидрофобным взаимодействиям между ними. Основной класс амфипатических ацилглицеролов — это *фосфоглицериды*.

Фосфоглицериды образуются в том случае, когда одна из гидроксильных групп глицерола этерифицирована фосфорной кислотой, а одна или обе оставшиеся ОН-группы — жирными кислотами (рис. 32.1). Часто к фосфатной группе бывает присоединено азотсодержащее основание; при этом образуется полярная головка с двойным зарядом (+ и —), которая, хотя и является полярной, при физиологических значениях рН может быть электрически нейтральной. Наиболее часто встречающиеся группы такого рода среди мембранообразующих фосфолипидов — это фосфорилхолин, фосфорилсерин и фосфорилэтаноламин. Вне мембран фосфолипиды встречаются редко.

33. Липиды: 2

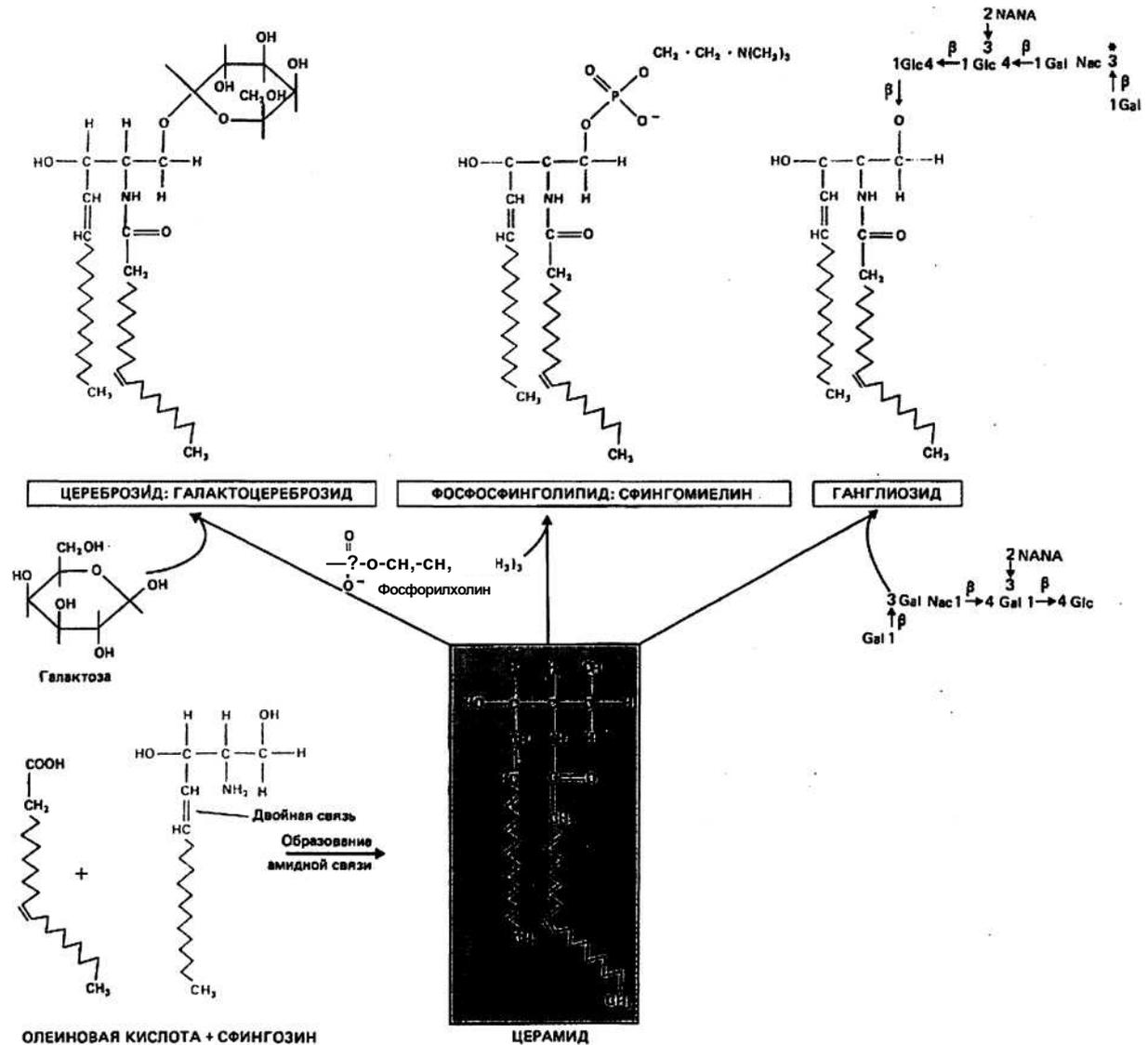


Рис. 33.1.

НЕГЛИЦЕРОЛОВЫЕ ЛИПИДЫ обнаружены во многих типах мембран вместе с липидами, в основе которых лежит глицерол. Особенно богаты ими нервные ткани, в частности мозг. Существуют три основных класса неглицероловых липидов: *цереброзиды*, *фосфосфинголипиды* и *ганглиозиды*. У всех них жирные кислоты и полярные группы связаны с молекулой сфингозина.

Сфингозин — это аминспирт с длинной углеводородной цепью. По своей структуре он очень похож на глицерол. Главные его особенности — это наличие негидролизуемой ненасыщенной углеводородной цепи,

связанной с одним из трех атомов углерода, и аминогруппы (NH_2) вместо гидроксильной (OH) группы при центральном углеродном атоме.

Церамид — это первичный сфинголипид, из которого образуются все три класса неглицероловых липидов. Он получается в результате присоединения мономерной (как правило) жирной кислоты к центральной аминогруппе сфингозина с образованием амидной связи (гл. 6).

Цереброзиды — это церамиды, к которым присоединен моносахарид, например галактоза. При этом образуется гликозидная связь между атомом C^1 — кис-

лорода сахара (C^1-OH в β -конформации; гл. 31) и атомом углерода — CH_2OH -группы сфингозина. Жирнокислотная цепь при центральной аминогруппе обычно содержит 22—26 атомов углерода; в примере, представленном на рис. 33.1, изображена олеиновая кислота — моноеновая кислота с 18 углеродными атомами. Цереброзиды обнаруживаются в высоких концентрациях в мозге и в нервной ткани млекопитающих. В других тканях галактоза часто бывает заменена на глюкозу; при этом получают глюкоцереброзиды. Цереброзиды являются также членами большой группы углеводсодержащих липидов, обычно называемых *гликолипидами*.

Фосфосфинголипиды — это церамиды, у которых оставшаяся спиртовая гидроксильная группа этерифицирована заряженной фосфатной производной, такой, как фосфорилхолин. В этом отношении они напоминают фосфоглицериды и тоже являются амфипатическими. Наиболее типичный фосфосфинголипид — это сфингомиелин, который входит в состав большинства мембран и при этом является единственным неглицероловым мембранным фосфолипидом.

Ганглиозиды — это церамиды, у которых спиртовая группа связана гликозидной связью (3-типа с коротким кислотным, как правило, разветвленным, олигосахаридом. Кислотность этого класса гликолипидов обусловлена тем, что в них всегда присутствует в качестве ветвей основной сахаридной цепи моносахарид нейраминавая кислота. Структура этого аминсахара показана на рис. 33.2. В тканях человека аминогруппа всегда ацелирована (CH_3CO); при этом сахар превращается в N-ацетилнейраминавую кислоту (NANA). У животных и растений аминогруппа часто бывает замещена сахарным остатком. Линейная часть сахаридной цепи, как правило, содержит N-ацетил галактозам и н (GalNac), галактозу (Gal) и глюкозу (Glc), связанные последовательно. На рис. 33.1 представлен ганглиозид G_M1 , типичный компонент серого вещества мозга. Ряд нарушений метаболизма объясняют дефектами именно в метаболизме ганглиозидов. Наиболее известна болезнь Тэя—Сакса, при которой ганглиозид G_M1 накапливается в ткани мозга из-за недостатка фермента, участвующего в его разрушении.

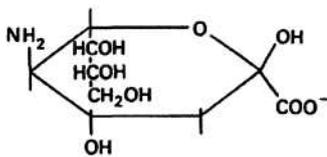


Рис. 33.2.

Простые липиды — это липиды, не содержащие жирных кислот. Иногда их называют «неомыляемыми» липидами, поскольку при щелочном гидролизе они не образуют мыльных жирных кислот. К этой

группе принадлежат жирорастворимые витамины, стероидные гормоны и некоторые другие жирорастворимые вещества. В основе всех простых липидов лежат *стероиды* и *терпены*.

Стероиды являются производными насыщенного полициклического (состоящего из нескольких сцепленных колец) углеводорода. Они присутствуют как в растениях, так и в тканях животных и выполняют различные функции: от половых гормонов у животных до предшественников витаминов у растений. Наиболее распространенный стероид у животных — это *холестерол*, структурная формула которого приведена на рис. 33.3.

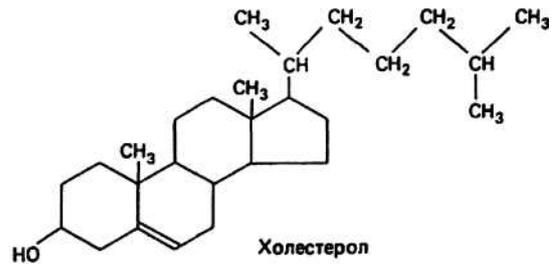


Рис. 33.3.

Холестерол — это предшественник всех стероидных гормонов у животных (например, мужского полового гормона тестостерона или женского полового гормона эстрогена). Он является также основным компонентом желчных кислот, которые после выделения их печенью попадают в тонкий кишечник, где реагируют с жирными кислотами и ацилглицеролами пищи, облегчая их всасывание. Хотя это и не очевидно, холестерол также является и слабо амфипатическим липидом, размеры и свойства которого делают его подходящим компонентом клеточной мембраны многих животных клеток (он составляет от 40 до 60% всех липидов эритроцитов млекопитающих). Жесткость полициклического кольца холестерола сообщает мембранам, в которых он присутствует, специфические свойства (гл. 34). Холестерол редко встречается в растительных клетках.

Терпены — это простые стероиды, в основе структуры которых лежит пятиуглеродный углеводород изопрен (рис. 33.4). Из молекул этого углеводорода формируются разнообразные линейные или циклические структуры, в результате чего образуется множест-

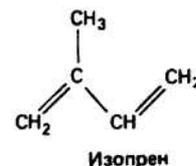


Рис. 33.4.

во веществ, таких, как «душистые» масла растений, обладающие характерным запахом (например, ментол — это терпеновое масло, выделяемое из мяты).

Витамины - это малые органические молекулы, которые проявляют высокую биологическую активность даже в очень малых концентрациях. Их подразделяют на жирорастворимые (витамины А, D, Е и К) и водорастворимые [все витамины группы В, витамины С, Н (биотин) и Р]. В данном случае для нас представляют интерес только жирорастворимые витамины, поскольку, обладая способностью растворяться в жирах, они, по всей видимости, имеют некоторое сходство с липидами. *Витамин А*, играющий

важную роль в зрении, состоит из углеводородного кольца с присоединенными к нему полярными группами и из длинной терпеновой боковой цепи. *Витамин D* существенный для метаболизма кальция и фосфора, напоминает частично разомкнутую молекулу холестерина. *Витамин Е*, играющий, в частности, роль антиоксиданта, состоит из двух сцепленных углеводородных колец с длинной разветвленной углеводородной боковой цепью. *Витамин К*, последний в этой группе, необходим для свертывания крови; по своей структуре он напоминает витамин Е, но одно из его колец — хинон, и боковая цепь имеет несколько иное строение.

34. Биологические мембраны

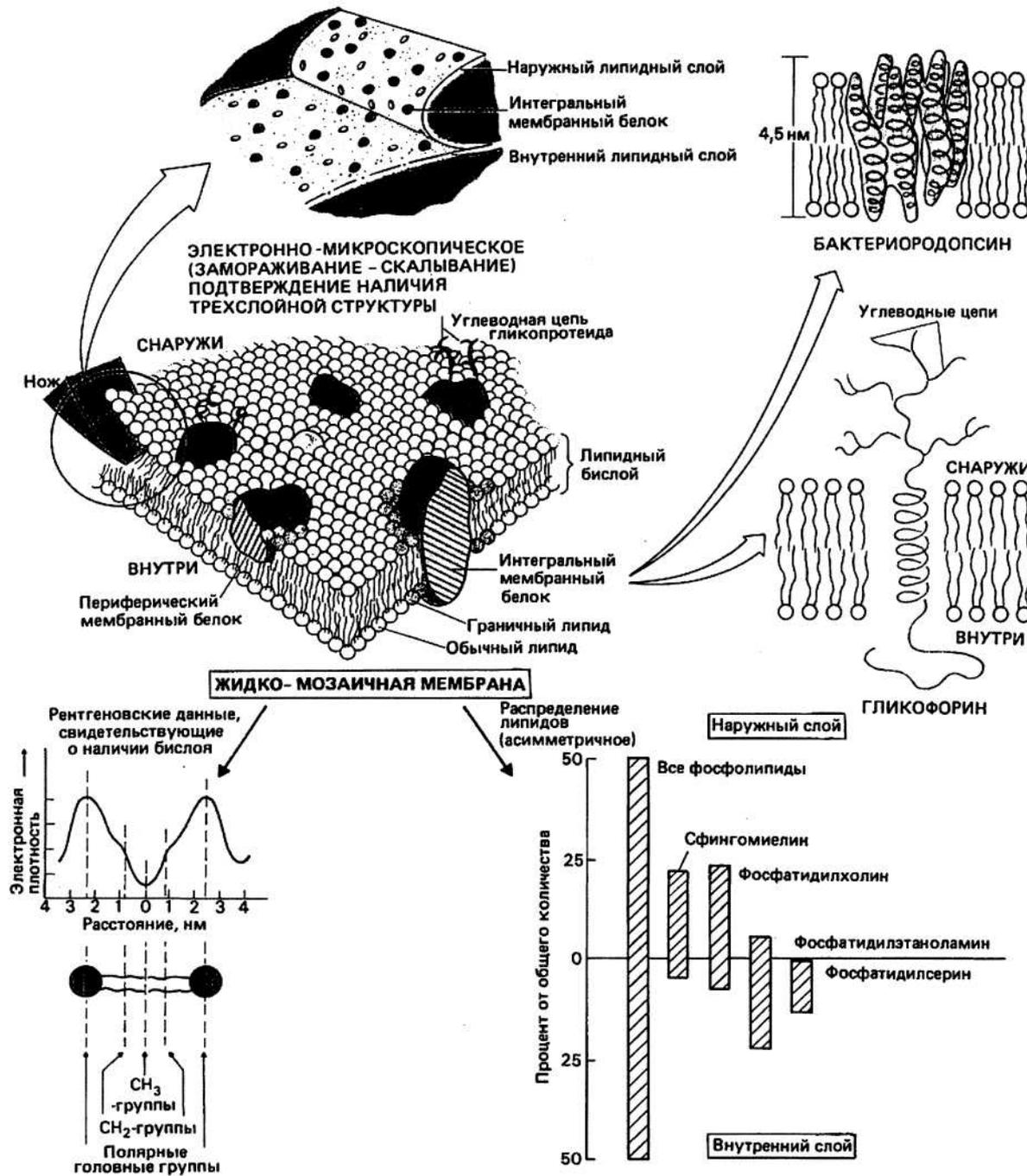


Рис. 34.1.

КЛЕТОЧНАЯ ИЛИ ПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МЕМБРАНА - это барьер, отделяющий цитоплазму всех клеток про- и эукариот от окружающей среды. Он состоит из липидов, белков и углеводов. Мембранами окружены некоторые

внутриклеточные органеллы — митохондрии, хлоропласты, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосомы и ядро. Эти барьеры отделяют функциональные единицы органелл от других клеточных компонентов.

Липиды природных мембран в основном представлены фосфолипидами, у которых одна или две жирнокислотные цепи этерифицированы либо глицеролом, либо сфингозином, а к третьему атому углерода присоединена фосфатная группа, с которой в свою очередь связана полярная группа, например холин (см. гл. 32, 33). Одна из жирных кислот часто бывает ненасыщена, при этом двойная связь почти всегда находится в \wedge ws-конформации (гл. 32). Такие стереохимические свойства оказывают большое влияние на латеральную упаковку цепей в мембране; это иллюстрирует рис. 34.2, где представлены две возможные комбинации конформаций жирных кислот.

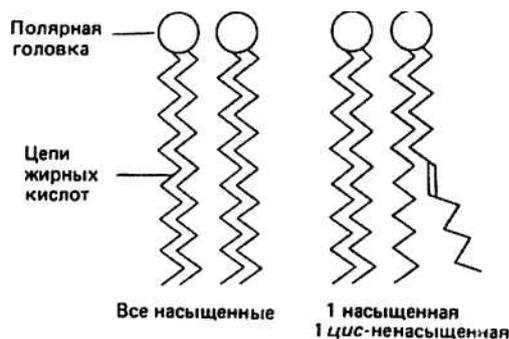


Рис. 34.2.

Липидный бислой — это структура, характерная для плазматических мембран всех живых клеток. Об этом свидетельствуют данные рентгеновской дифракции и электронной микроскопии. Толщина этого слоя составляет примерно 4—5 нм в зависимости от типов присутствующих в нем жирных кислот. Неполярные хвосты липидных молекул обращены друг к другу, а полярные головки остаются снаружи бислоя, образуя внутреннюю и наружную гидрофильные поверхности. Эта модель хорошо объясняет высокое трансмембранное электрическое сопротивление.

В клеточной мембране присутствуют белки. Впервые это предположение было высказано Даниэлли и Доусоном в 1935 г. для объяснения малого поверхностного натяжения клеточных мембран. Поскольку на границах раздела масло—вода должно возникать большое поверхностное натяжение, эти ученые постулировали, что гидрофобность жирных липидных компонентов должна компенсироваться каким-то гидрофильным белком. В 1959 г. на основании работ Робертсона, в которых он под электронным микроскопом наблюдал два электроплотных слоя мембраны, разделенных менее плотной областью шириной около 3,5 нм, была сформулирована гипотеза элементарной мембраны. Наличие электроплотных наружных слоев объяснялось тем, что с гидрофильными поверхностями, образованными липидными молекулами, связан белок. Однако против этой модели

свидетельствовали результаты электронно-микроскопических исследований препаратов мембран, полученных методом замораживания—скальвания; оказалось, что белковые молекулы располагаются не только на поверхности мембраны; есть и такие, которые пронизывают ее насквозь.

Жидкомозаичная модель структуры мембраны была предложена в 1971 г. Николсоном и Сингером. В соответствии с этой моделью, которая получила в настоящее время всеобщее признание, белки можно уподобить айсбергам, плавающим в липидном море. Существуют два типа мембранных белков: *интегральные* и *периферические*.

Интегральные белки пронизывают мембрану насквозь. Как и липиды, это амфипатические молекулы. У них есть центральное гидрофобное ядро, взаимодействующее с жирнокислотными цепями, и гидрофильные концы, контактирующие с клеточным содержимым и с окружением. Часто эти белки имеют углеводные цепи, присоединенные к той части молекулы, которая выступает во внеклеточную среду. Интегральные белки встраиваются в мембраны эндоплазматического ретикула в процессе биосинтеза. По мере их перемещения от места синтеза к аппарату Гольджи и затем к плазматической мембране они могут гликозилироваться, превращаясь, таким образом, в гликопротеины (гл. 3).

Конформация интегральных белков определяется необходимостью выполнения условия, чтобы участки полипептидной цепи, проходящие через неполярные области липидной мембраны, содержали в основном только те полярные или заряженные группы, которые взаимодействуют с группами противоположной полярности (как в случае водородной связи). Следовательно, большинство боковых цепей расположенных здесь аминокислотных остатков должны быть гидрофобными. Исключением из данного правила может служить образование гидрофильного мембранного канала для прохождения ионов. Далее, полярные группы основной цепи ($>NH$ и $>CO$) могут формировать внутрицепочечные водородные связи. В результате соответствующие участки полипептидной цепи часто образуют ос-спирали. Цепь бактериородопсина семь раз пересекает мембрану, при этом каждый раз образуется одна ос-спираль; эти ос-спирали соединяются последовательно короткими отрезками полипептидной цепи. Гликофорин фиксируется в мембране с помощью единственной ос-спирали. Часть молекулы белка, выступающая с наружной стороны мембраны, бывает связана с углеводным «хвостом».

Периферические белки не пронизывают мембрану и связаны с ней менее прочно. Связывание осуществляется либо за счет гидрофобных взаимодействий с «хвостами» липидных молекул, либо благодаря электростатическому взаимодействию с их «головками», либо и тем, и другим путем. По своей структуре периферические белки напоминают водорастворимые гло-

булярные белки (гл. 10). Они могут быть связаны с любой поверхностью мембраны и часто удаляются с помощью слабых растворов детергентов или даже солевых растворов, как в случае цитохрома *c* — периферического белка, связанного с наружной поверхностью внутренней митохондриальной мембраны.

Текучесть мембраны можно охарактеризовать скоростью латерального продольного движения липидных и белковых молекул. Эта скорость определяется жидкостными свойствами бислоя и факторами, ограничивающими подвижность, такими, как удерживание мембранных белков цитоплазматическими элементами. Скорость перемещения крупной молекулы в жидкой среде зависит от ее размеров и температуры среды. Эта скорость определяется коэффициентом диффузии D который имеет размерность $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Как правило, у крупного белка (мол. масса 10^5) в воде при 30°C D составляет порядка $5 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Измерения коэффициента диффузии мембранных белков с использованием метода флуоресцентной метки дали величину $D \sim 10^{-9}—10^{-11} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Таким образом, можно сделать вывод, что мембранные белки диффундируют в липидном бислое с такой скоростью, как если бы они находились в среде, имеющей вязкость жидкого масла.

Подвижность липидов в зависимости от относительного содержания и типа присутствующих ненасыщенных жирных кислот. Углеводородная природа жирнокислотных цепей сообщает мембране свойства, характерные для масел, причем степень близости мембраны к маслам, или ее текучесть при данной температуре, зависит от того, насколько плотно упакованы цепи. В присутствии *цис*-ненасыщенных жирных кислот силы сцепления между цепями слабее, чем в случае одних насыщенных жирных кислот, и липиды сохраняют высокую подвижность при низкой температуре. Когда силы сцепления становятся максимальными, образуется кристаллическая фаза. Если создать такие условия, чтобы эти силы были ослаблены и в то же время сохранялась упорядоченная структура, мембрана будет находиться в жидкокристаллическом состоя-

нии. Переход между этими двумя состояниями в мембранах большинства клеток осуществляется в температурном интервале от 15 до 40°C в зависимости от липидного состава.

Граничными называются липиды, которые находятся так близко к белковым молекулам, что их подвижность становится меньше, чем у основной массы липидов. Фактически они как бы «привязаны» к поверхности белковой молекулы, и влияние на подвижность может распространяться на расстоянии до двух или трех диаметров липидной молекулы от белка.

Асимметрия — это свойство, присущее всем природным мембранам. Липидные молекулы, различающиеся в основном своими головными группами, распределены между двумя слоями бислоя асимметрично. Почему в мембранах клеток разных тканей распределение липидов столь различно — неизвестно. Однако липиды, содержащие углеводы, — гликолипиды — всегда встроены в наружную часть бислоя, так что их углеводная часть направлена во внеклеточную среду. На рис. 34.1 приведено типичное распределение липидов для мембран животных клеток, хотя здесь и не представлены холестерол и минорные липиды.

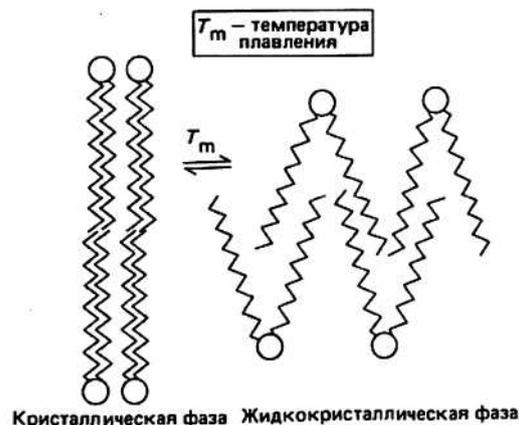
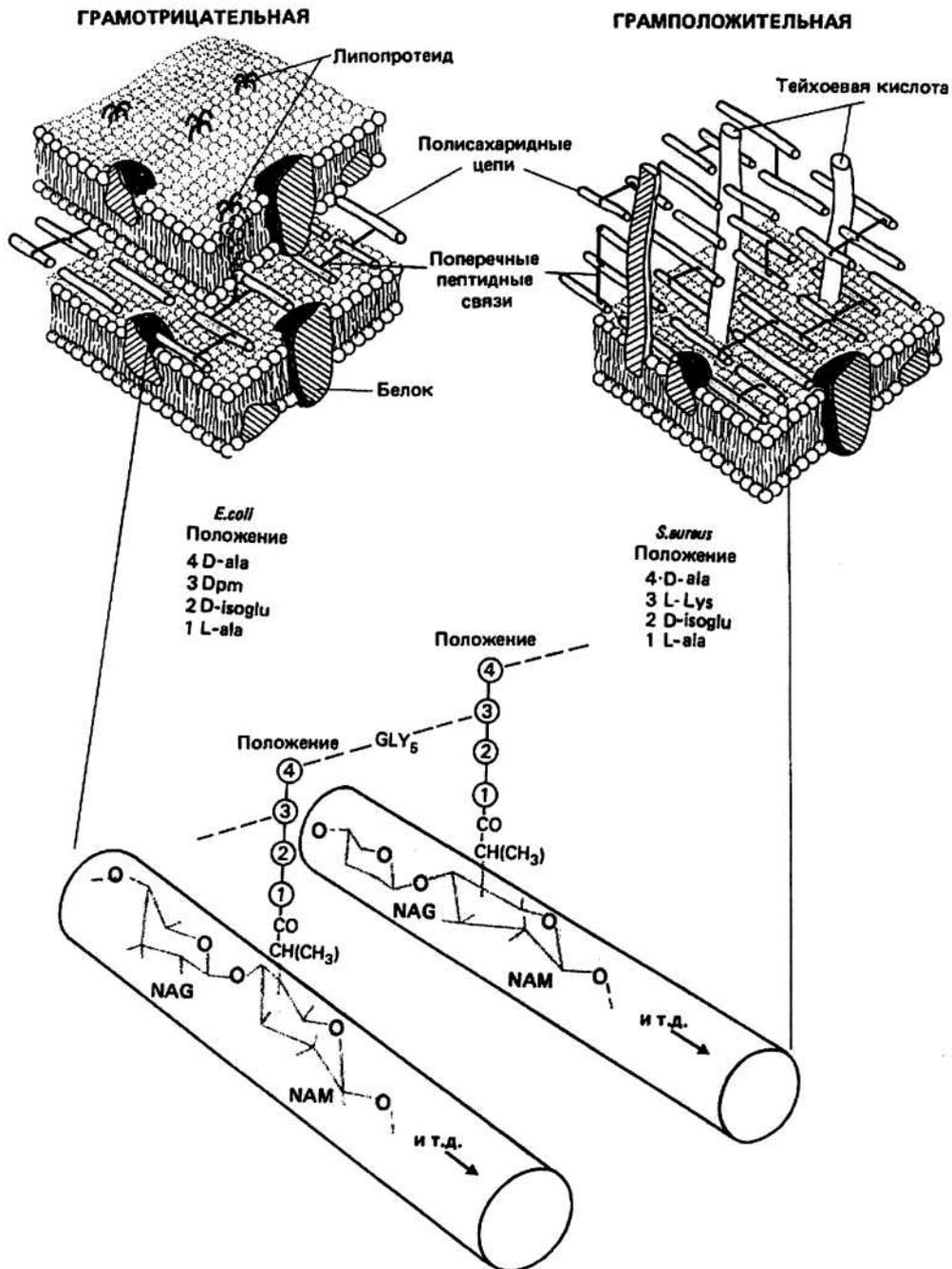


Рис. 34.3.

35. Клеточная стенка бактерий



Бактерии можно разделить на два класса в зависимости от их способности окрашиваться по методу, разработанному датским бактериологом Грамом в 1884 г. В процессе отмывки, которая следует за процедурой окрашивания, *грамположительные бактерии* удержива-

ют фиолетовый краситель, а *грамотрицательные* теряют его. Только в 60-х годах Сэлтон и другие показали, что это явление обусловлено фундаментальными различиями в структуре клеточных стенок двух указанных классов бактерий. Морфологические исследова-

ния, выполненные с помощью электронного микроскопа, показали, что грамположительные бактерии обладают однослойной электроплотной нелипидной клеточной стенкой толщиной 20—80 нм, окружающей плазматическую мембрану толщиной 7,5 нм. У грамотрицательных же бактерий клеточная стенка двуслойная. Первый слой — очень тонкая (толщиной 1 нм) нелипидная мембрана — окружен вторым: липидной мембраной толщиной 7,5 нм. Исследования мембран грамположительных и грамотрицательных бактерий методом замораживания—скалывания подтвердили, что у них имеется два и три слоя соответственно.

Клеточная стенка — это жесткая структура, которая служит для поддержания формы клетки и предотвращает ее лизис из-за осмотического шока. При обработке бактерий гидролитическим ферментом, таким, как лизоцим (гл. 14), клеточная стенка может «раствориться». В случае грамположительных бактерий после такой обработки остаются клетки, чувствительные к осмотическому шоку, имеющие только плазматическую мембрану и называемые протопластами. У грамотрицательных бактерий вторая, наружная, мембрана сохраняется и образующиеся клетки, называемые сферопластами, несколько менее чувствительны к осмотическому шоку. Материал клеточных стенок, который теряется в обоих случаях, известен как *пептидогликан*. Его также называют гликопептидом или мукопептидом.

Пептидогликан — это сложный матрикс, содержащий полисахаридные цепи, связанные друг с другом поперечными сшивками из коротких пептидных цепей. Когда гидролиз клеточной стенки бактерий любого типа проводят до расщепления ее на мономерные составляющие, единственными образующимися моносахаридами являются N-ацетилглюкозамин (NAG) и N-ацетил мурамовая кислота (NAM). OH-группы обоих моносахаридов, связанные с C-атомом, имеют (3-конформацию). Полисахарид пептидогликан — это P(1 → 4)-цепь из чередующихся Сахаров NAG-NAM. У грамположительных бактерий (например, у *Bacillus subtilis*) эти цепи образуют трехмерный волокнистый матрикс, имеющий до 40 слоев, в то время как у грамотрицательных (например, у *E. coli*) слой только один. Таким образом, толщина пептидогликанового матрикса может составлять от 1 до 80 нм. Полисахаридные цепи связаны друг с другом пептидными цепочками.

Состав пептидных поперечных сшивок был установлен с помощью кислотного гидролиза очищенного материала клеточных стенок. Были обнаружены как L-, так и D-аминокислоты. Реконструкция поперечных связей показала, что они содержат два типа структур. Во-первых, это тетрапептидный элемент, который присоединен к каждой молекуле сахара NAM, во-вторых, пептидный мостик, который соединяет между собой полисахаридные цепи через посредство *тетрапептидных элементов*.

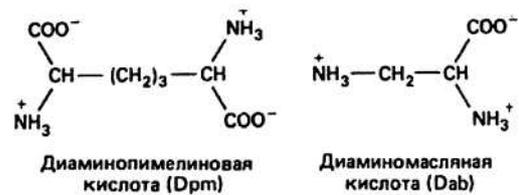


Рис. 35.2.

Тетрапептидные элементы различаются по своему составу. Они присоединены к сахару NAM через COOH-группу атома ³C. Первой аминокислотой в пептиде всегда является L-аланин (положение 1). Следующим остатком может быть D-изоглутаминовая кислота (приставка «изо» означает, что в образовании пептидной связи участвует COOH-группа боковой цепи, а группа сс-COOH основной цепи остается свободной) или какой-нибудь минорный остаток (положение 2). Третий остаток, как правило, содержит в боковой цепи аминогруппу. Обычно им является L-лизин, хотя это могут быть и L-диаминопимелиновая (Dpm) или L-диаминомасляная (Dab) кислоты (рис. 35.2). Последним остатком всегда является D-аланин (положение 4). Таким образом, тетрапептид представляет собой чередующуюся цепь из L- и D-аминокислот. Это способствует большей устойчивости его к протеолитическому расщеплению и соответственно большей жизнестойкости бактерий. Полная структура этого элемента дана на рис. 35.3. Таким образом, каждый тетрапептидный элемент одной цепи NAG—NAM связан в поперечном направлении с другими цепями NAG—NAM либо по третьему, либо по четвертому положению. Чтобы сохранилась симметрия клеточной стенки, эти связи образуются между положением 3 тетрапептидного элемента одной цепи и положением 4 другой. Так образуется непрерывная сеть поперечных связей.



Рис. 35.3.

Пептидный мостик обычно представляет собой пентапептидную цепочку, состоящую только из аминокислот с короткими боковыми цепями. Типичным мостиком является пентаглицин, хотя встречаются и мостики L-Ala₄—L-Thr и Gly₃—L-Ser₂. Ковалентные связи образуются на одном конце между COOH-группой мостика и NH₂-группой боковой цепи остатка в положении 3, а на другом — между NH₂-группой мостика и α-COOH-группой D-аланина в положении 4. Иногда бактериальная стенка оказывается весьма чувствительной к гидролитическим ферментам, таким,

как лизоцим (гл. 14). Это может быть обусловлено ее более открытой структурой из-за наличия особых пептидных мостиков, которые формируются из тетрапептидных элементов, соединенных конец к концу, так что при этом образуются длинные поперечные связи. Для появления межцепочечных связей такого типа должна быть удалена часть тетрапептидных элементов с некоторых Сахаров NAM. В результате в целом число поперечных связей уменьшается и полисахаридные цепи оказываются более доступными для гидролаз. Подходящим субстратом для исследования активности лизоцима является препарат клеточной стенки бактерий типа *Micrococcus lysodeikticus*. Сложные углеводные цепи имеются только у грамположительных бактерий. Это *тейхоевые* и *липотейхоевые кислоты*.

Тейхоевые кислоты — это цепочки из молекул глицерола или рибитола, связанных друг с другом фосфодиэфирными мостиками. На одну цепь может приходиться до 30 молекул. Кроме того, в цепочку могут быть включены остатки Сахаров или аминокислот. На рис. 35.4 показана тейхоевая кислота из *S. aureus*, построенная на основе рибитола. У некоторых видов бактерий молекулы тейхоевой кислоты, расположенные перпендикулярно поверхности плазматической мембраны, соединены с пептидогликаном через ОН-груп-

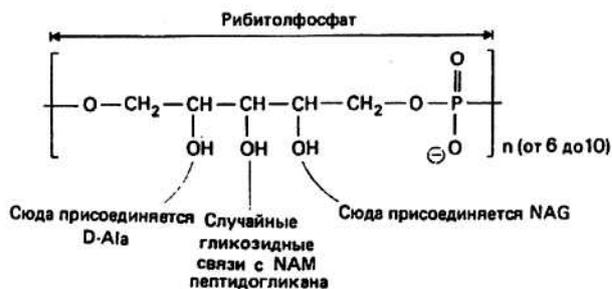


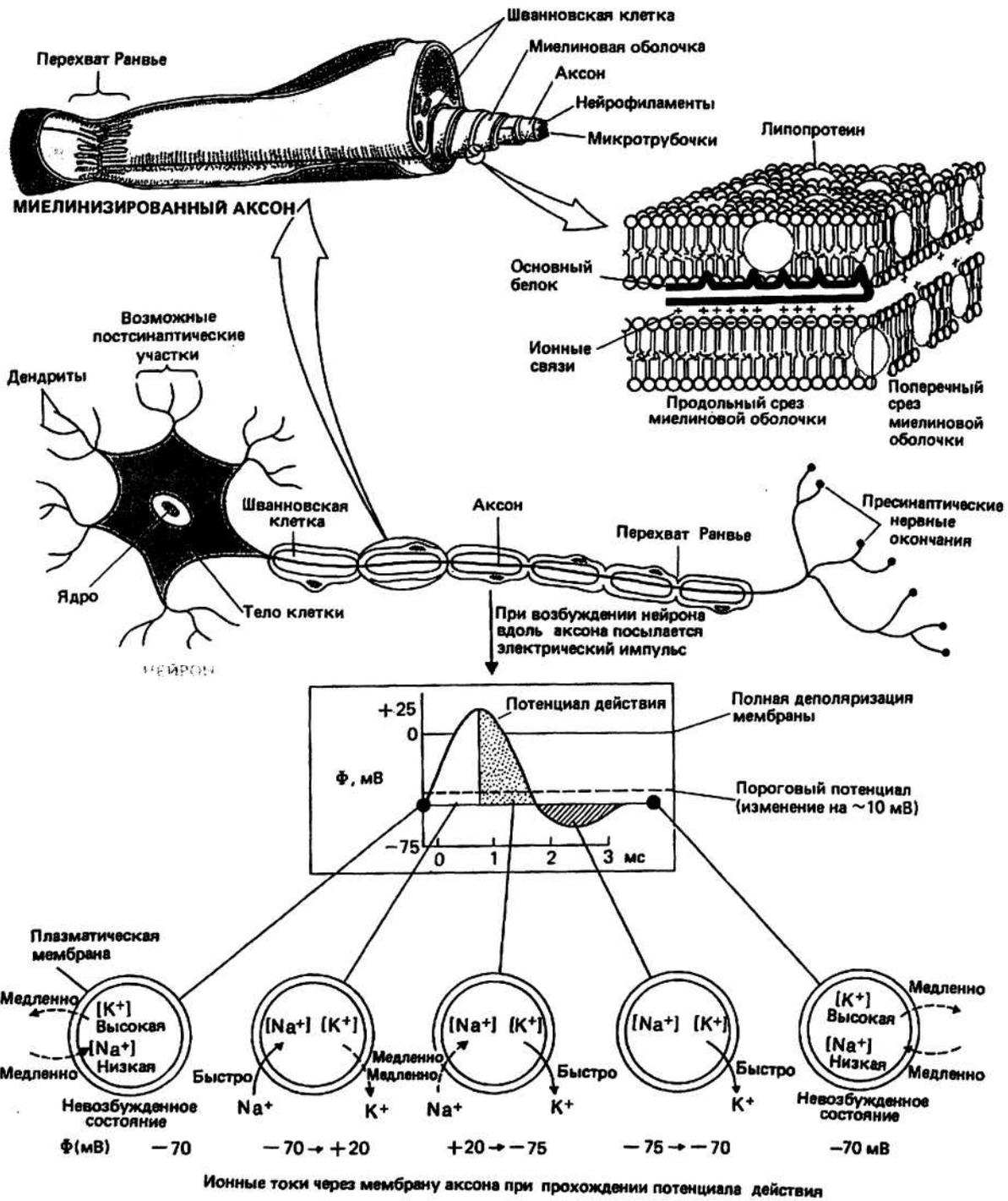
Рис. 35.4.

пу при атоме ^6C остатков NAM. Таким образом, слои пептидогликана оказываются связанными друг с другом.

Липотейхоевые кислоты подобны тейхоевым, но связаны не с пептидогликаном, а с гликолипидными молекулами, погруженными в плазматическую мембрану.

Механизм действия некоторых антибиотиков состоит в их «вмешательстве» в сборку клеточной стенки. Так, пенициллин блокирует фермент, в функцию которого входит образование поперечных связей между тетрапептидами и пептидными мостиками в реакции транспептидации (гл. 42).

36. Нервы в действии



ис. 36.1.

НЕРВЫ — длинные специализированные структуры, осуществляющие координацию функций организма и опосредующие его реакцию на различные воздействия. *Нервные клетки* (их называют также *нейронами*) есть у многих организмов. Каждая нервная клетка имеет тело и длинный отросток — *аксон*. Нервную систему позвоночных разделяют на центральную нервную систему (ЦНС) и периферическую нервную систему (ПНС). В ЦНС сходится огромное число нервов и осуществляется передача информации от одних нервов к другим. Два основных элемента ЦНС — головной и спинной мозг. ПНС состоит из двух частей: *афферентных* нервов, в которых аксоны идут от точек, воспринимающих внешние стимулы, к ЦНС, и *эфферентных* нервов, аксоны которых идут от ЦНС к тканям и органам-мишеням. Управляемые нервами органы и ткани называются *иннервируемыми*. Простейший механизм нервной регуляции — *моносинаптический рефлекс*.

МОНОСИНАПТИЧЕСКАЯ РЕФЛЕКТОРНАЯ ДУГА представляет собой нервную цепь, образованную двумя нейронами. Первый нейрон функционирует как принимающий элемент, к которому поступает стимул от чувствительной к растяжению области мышечного веретена: при растяжении мышцы механическое движение генерирует химический сигнал, который в свою очередь индуцирует электрический импульс, посылаемый по аксону этого первого, чувствительного нейрона (афферентный путь рефлекторной дуги). На конце аксона, расположенном в спинном или головном мозге, имеется особый контакт — *синапс* — со вторым, *мотонейроном*. Синапс состоит из *пресинаптического элемента*, которым является окончание афферентного нерва, и *постсинаптического элемента*, расположенного на теле мотонейрона. Эти два элемента разделены синаптической щелью. Посредством специального вещества, называемого нейромедиатором, импульс передается через синаптическую щель и затем распространяется по аксону мотонейрона (эфферентный путь рефлекторной дуги) к *эффektorному окончанию*, расположенному на мышце. Передача импульса к мышце через следующий синапс приводит к выделению кальция и сокращению мышцы (гл. 37). Таким образом растяжение мышечного веретена индуцирует рефлекторную сократительную реакцию мышцы.

Пресинаптический элемент — специализированная мембранная структура на конце нерва. В нервном окончании имеются пузырьки, содержащие нейромедиатор. Импульс, приходящий к окончанию, индуцирует слияние пузырьков с пресинаптической мембраной и выделение нейромедиатора в синаптическую щель.

Нейромедиаторы — небольшие заряженные молекулы, которые после высвобождения из пресинаптических мембран связываются с рецепторами на постси-

наптической мембране. Примерами нейромедиаторов могут служить глутамат [$^+NH_3-CH(CH_2CH_2COO)-COOH$], встречающийся главным образом в синапсах ЦНС, и ацетилхолин [$CH_3-COO-CH_2-CH_2-^+N(CH_3)_3$], использующийся преимущественно в ПНС.

Постсинаптический элемент образуется мембраной дендритов нервных клеток (в синапсах ЦНС) или чувствительной мембраной клеток ткани-мишени, иннервируемой мотонейроном (в синапсах ПНС). Мембрана мышечной концевой пластинки, заполненная множеством тесно расположенных рецепторов для нейромедиатора ацетилхолина, является постсинаптическим элементом периферического синапса на конце моносинаптической рефлекторной дуги.

Аксоны — длинные волокна, по которым передаются электрические сигналы от одного нервного окончания к следующему. У каждой нервной клетки есть только один аксон. Длина аксонов варьирует в широком диапазоне; аксоны многих мотонейронов, расположенных в ЦНС, доходят до самых удаленных частей иннервируемых ими мышц. Если аксоны покрыты изолирующей оболочкой, миелином (см. ниже), их называют *миелинизированными*. Диаметр аксонов в миелинизированных нервах варьирует в сравнительно узком диапазоне 1—20 мкм, тогда как немиелинизированные аксоны могут иметь диаметр от 0,1 до 500 мкм. Благодаря изолирующим свойствам миелина скорость прохождения импульса по миелинизированным нервам выше, чем по немиелинизированным. У млекопитающих, например, для миелинизированного нерва диаметром 20 мкм скорость проведения достигает 120 м/с, тогда как для немиелинизированного нерва диаметром 1 мкм она может составлять всего лишь 2 м/с. Отсутствие миелина может компенсироваться увеличением диаметра аксона: так, аксон кальмара (немиелинизированный) имеет диаметр 500—1000 мкм и проводит импульс со скоростью около 20 м/с.

Миелинизированные аксоны окружены специализированными глиальными клетками, вырабатывающими липопротеиновый мембранный миелин. Мембрана этих клеток наматывается на аксон, формируя многослойный чехол, который выполняет функцию изолятора. Для нейронов, входящих в состав ЦНС, образующими миелин клетками являются клетки олигодендроглии, а для нейронов ПНС — шванновские клетки. Аксон нейрона, изображенного на рис. 36.1, входит в состав периферического миелинизированного нерва. Миелиновая оболочка построена из липидной мембраны, состоящей из лецитин-холестерола и сфингомиелин-холестерола (гл. 32, 33), связанных главным образом с двумя белками, один из которых — липопротеин, а другой — основной белок. Основной белок находится на наружной поверхности мембраны (гл. 34) и благодаря этому может стабилизировать последовательные мембранные слои в миелиновом «рулете»: его положительно заряженный С-концевой

участок, выступающий в межмембранное пространство, образует ионные связи с отрицательно заряженными липидами следующего мембранного слоя. Таким образом, каждый мембранный слой прочно удерживается в контакте с соседними слоями.

Проведение нервного импульса осуществляется в виде волны деполяризации, распространяющейся вниз по аксону, от тела клетки к нервному окончанию. В каждой точке невозбужденной мембраны аксона — до того как в нее придет волна деполяризации — имеется трансмембранный потенциал (ϕ) около -70 мВ (с внутренней стороны больше отрицательных зарядов). Этот потенциал обусловлен неравномерным распределением Na^+ и K^+ между внутри- и внеклеточным пространством (гл. 38) и избирательной проницаемостью мембраны. Когда в рассматриваемую точку приходит импульс, достаточно большой, чтобы вызвать изменение ϕ , превышающее пороговую величину (около 10 мВ), открывается ряд натриевых каналов, расположенных в плазматической мембране аксона. Этим начинается цикл изменений ϕ , называемый *потенциалом действия*. У миелинизированных аксонов плазматическая мембрана контактирует с содержащей Na^+ внеклеточной жидкостью лишь в определенных точках — перехватах Ранвье — и деполяризация мембраны происходит только в области этих перехватов.

Потенциал действия возникает, когда импульс достигает перехвата и в аксон через чувствительные к трансмембранному потенциалу каналы входит Na^+ . Мембранный потенциал быстро (менее чем за 1 мс) изменяется от -70 мВ до 0 мВ (полная деполяризация) и далее до приблизительно $+20$ мВ (с внутренней стороны больше положительных зарядов). Этой фазе потенциала действия соответствует коричневая часть графика на рис. 36.1. Поскольку ионы Na^+ переносят положительные заряды внутрь клетки, эффект, вызванный первоначально стимулирующим потенциалом, усиливается, и открывается еще больше натриевых каналов. Когда все каналы в перехвате будут

открыты, величина ϕ в нем достигнет максимума. Так как аксон покрыт изолятором — миелином, область электрического тока не может эффективно распространяться вдоль аксона по мембране, и ее распространение до следующего перехвата происходит в основном через цитоплазму аксона. Восстановление поляризации происходит в результате выхода из аксона ионов K^+ , который занимает несколько больше времени (2—3 мс), чем вход Na^+ (этой фазе процесса соответствует на рис. 36.1 часть графика, покрытая точками). До тех пор пока реполяризация не закончится, перехват не может возбудиться снова (это так называемый рефрактерный период), а к тому времени, когда перехват опять будет способен к ответу, импульс уже уйдет вниз по аксону слишком далеко, чтобы вновь открыть в рассматриваемом перехвате натриевые каналы. По этой причине импульс распространяется вдоль аксона только в одном направлении. Заключительная стадия реполяризации начинается после того, как осуществляющие активный транспорт ионов АТРаза мембраны аксона восстановят нормальное соотношение концентраций Na^+ и K^+ (этой стадии соответствует заштрихованная область графика). Следует подчеркнуть, что электрические изменения на мембране аксона вызываются очень небольшими изменениями внутри- и внеклеточной концентрации ионов Na^+ и K^+ . Критическим параметром является скорость движения этих ионов через мембрану; она указана на рис. 36.1 около стрелок, показывающих направление перемещения ионов. Время прохождения потенциала действия может составлять менее $1/5$ с. У человека, например, рефлекторный ответ мышцы, разгибающей колено, занимает около 35 мс. Стимулы, поступающие к чувствительным нейронам, могут различаться по силе. Информация об интенсивности входного сигнала кодируется в виде частоты генерации потенциалов действия. Так, интенсивное сокращение мышцы индуцируется высокой частотой потенциалов действия, и наоборот.

37. Мышцы и их сокращение

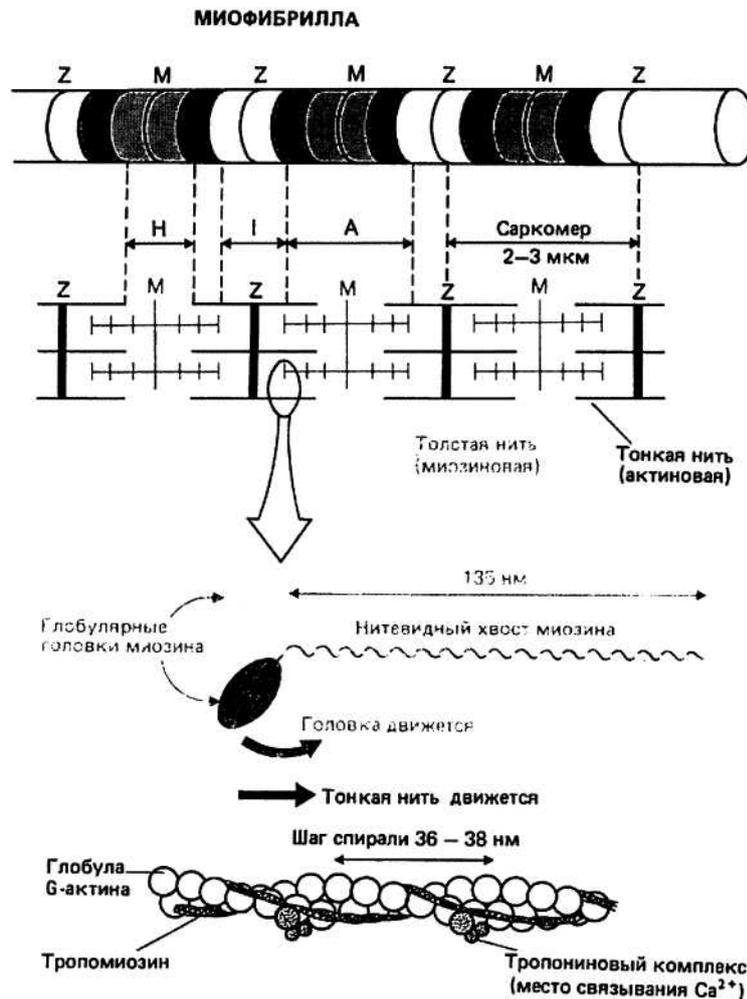


Рис. 37.1.

Мышцы позвоночных разделяют на *гладкие* и *поперечнополосатые*. Гладкие мышцы, которые при исследовании под микроскопом выглядят малоструктурированными, являются непроизвольными, т. е. не находятся под контролем воли; обычно это медленно сокращающиеся мышцы, связанные с внутренними органами. Поперечнополосатые мышцы, выглядящие под микроскопом фибриллярными, бывают двух типов — *скелетные* и *сердечная*. Сердечная мышца управляется нервами и гормонами таким образом, что она производит регулярные и самоподдерживающиеся сокращения. Скелетные мышцы являются произвольными, и, хотя они также управляются нервами и гормонами, механизм их регуляции отличается от механизма регуляции сердечной мышцы. Это раздел посвящен тонкому строению скелетных поперечнополосатых мышц.

ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТЫЕ МЫШЦЫ. Клетки, образующие эти мышцы, могут достигать нескольких миллиметров в длину и окружены электрически возбудимой мембраной — *сарколеммой*. Как правило, каждая такая клетка содержит несколько ядер и митохондрий, погруженных в жидкую фазу — *саркоплазму*. В каждой клетке имеются многочисленные тяжи, называемые *миофибриллами*, которые являются органеллами, отвечающими за сокращение.

Миофибрилла — длинная тонкая структура с перемежающимися светлыми и темными участками, что и придает мышце исчерченность под фазово-контрастным микроскопом. Светлые области — это так называемые *изотропные* полосы, или *I-полосы* (I-диски), а темные — *анизотропные* полосы, или *A-полосы* (A-диски). В центральной части A-полосы имеется несколь-

ко менее темный участок, называемый *H-зоной*, а в середине этой зоны проходит узкая темная полоска — *линия М*. Каждая I-полоса делится надвое тонкой темной *Z-линией*. Отрезок от одной *Z-линии* до другой рассматривают как структурный элемент миофибриллы, *саркомер*, многократно повторяющийся на всем ее протяжении.

Мышечные нити являются основными компонентами миофибриллы. Они бывают двух типов: толстые нити имеют диаметр 15 нм и содержат в основном нитевидный белок *миозин*, а тонкие имеют 7 нм в диаметре и состоят из *актина*, *тропомиозина* и *тропонина*. При исследовании под электронным микроскопом на поперечных срезах I-полосы видны только тонкие нити, а на срезах H-зоны A-полосы — только толстые нити. В остальных, очень темных, участках A-полосы обнаруживаются и толстые, и тонкие нити, образующие правильную гексагональную систему, в которой каждую толстую нить окружают шесть тонких.

Сокращение саркомера может приводить к уменьшению его длины от приблизительно 2,5 мкм до приблизительно 1,7 мкм. Длина A-полосы остается при этом постоянной, а I-полоса укорачивается. Это может быть объяснено с помощью так называемой модели скользящих нитей, согласно которой длина ни тонких, ни толстых нитей при сокращении саркомера не изменяется, а сближение *Z-линий* происходит за счет скольжения нитей относительно друг друга (рис. 37.2).

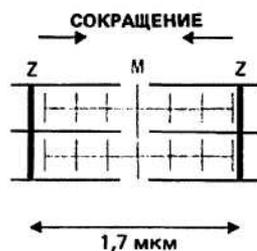


Рис. 37.2.

Миозин, основной компонент толстых нитей, построен из двух больших и четырех малых полипептидных цепей. Каждая большая цепь состоит из двух частей: вытянутого «хвоста», имеющего α -спиральную конформацию, и глобулярной «головки». Хвосты обеих больших цепей заплетены друг вокруг друга, образуя сверхскрученную структуру длиной 140 нм. Глобулярная головка каждой большой цепи находится в комплексе с двумя малыми цепями; весь комплекс также является глобулярным. Таким образом, молекула миозина имеет две глобулярные головки и один фибриллярный двухцепочечный хвост (рис. 37.3).

Актин, основной компонент тонких нитей, находится в миофибриллах в форме *F-актина* (F-фибрилярный). F-актин — это полимер, а мономерные еди-

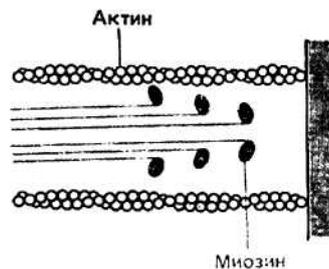


Рис. 37.3.

ницы, из которых он построен, называются *G-актином* (G-глобулярный). По своей структуре F-актин похож на две нитки бус, в которых бусинками служат молекулы G-актина; нитки закручены друг вокруг друга в спиральную структуру с шагом 36—38 нм.

Тропомиозин также является компонентом тонких нитей. Молекула тропомиозина представляет собой тяж длиной 40 нм, образованный двумя переплетающимися ос-спиральными полипептидными цепями. Тропомиозин связан с F-актином. Каждая молекула тропомиозина охватывает семь G-актиновых глобул, причем соседние его молекулы немного перекрываются между собой, так что образуется непрерывная тропомиозиновая цепь, идущая вдоль F-актинового волокна. Поскольку F-актин состоит из двух ниток, с ним, надо думать, связаны и две тропомиозиновые цепочки.

Тропонин, еще один компонент тонких нитей, является комплексом трех белков: *тропонина I*, *тропонина Г* и *тропонина С*. Он имеет в целом более или менее глобулярную форму и располагается на F-актине через правильные промежутки, равные примерно 38 нм.

АТФ обеспечивает мышечное сокращение энергией. Глобулярные головки миозина связывают АТФ и быстро гидролизуют его, но не так легко освобождают продукты гидролиза — ADP и P_i . F-актин, который связывается с миозином, образуя комплекс, называемый *актомиозином*, ускоряет отсоединение ADP и P_i от миозиновых головок. Освободившиеся АТФ-связывающие участки актомиозинового комплекса могут связать новые молекулы АТФ, но, как только это происходит, индуцируется диссоциация актомиозина на актин и миозин. Такой цикл может повторяться многократно — в присутствии достаточного количества АТФ. Описанное взаимодействие актина и миозина лежит в основе молекулярного механизма мышечного сокращения.

Цикл наклона головок миозина при мышечном сокращении включает в себя четыре стадии (рис. 37.4).

1. Миозин в толстых нитях содержит связанные ADP и P_i , но не связан с актином тонких нитей.
2. При поступлении сигнала к сокращению глобулярные миозиновые головки со связанными ADP и P_i прикрепляются к актину (образуется актомиозин).
3. Образование актомиозина ускоряет освобождение ADP и P_i , что сопровождается наклоном головок мио-

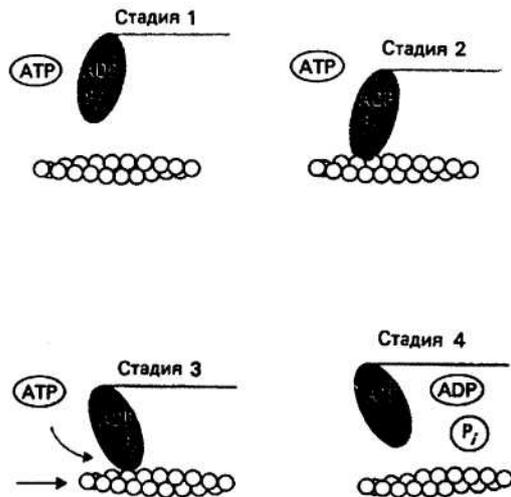


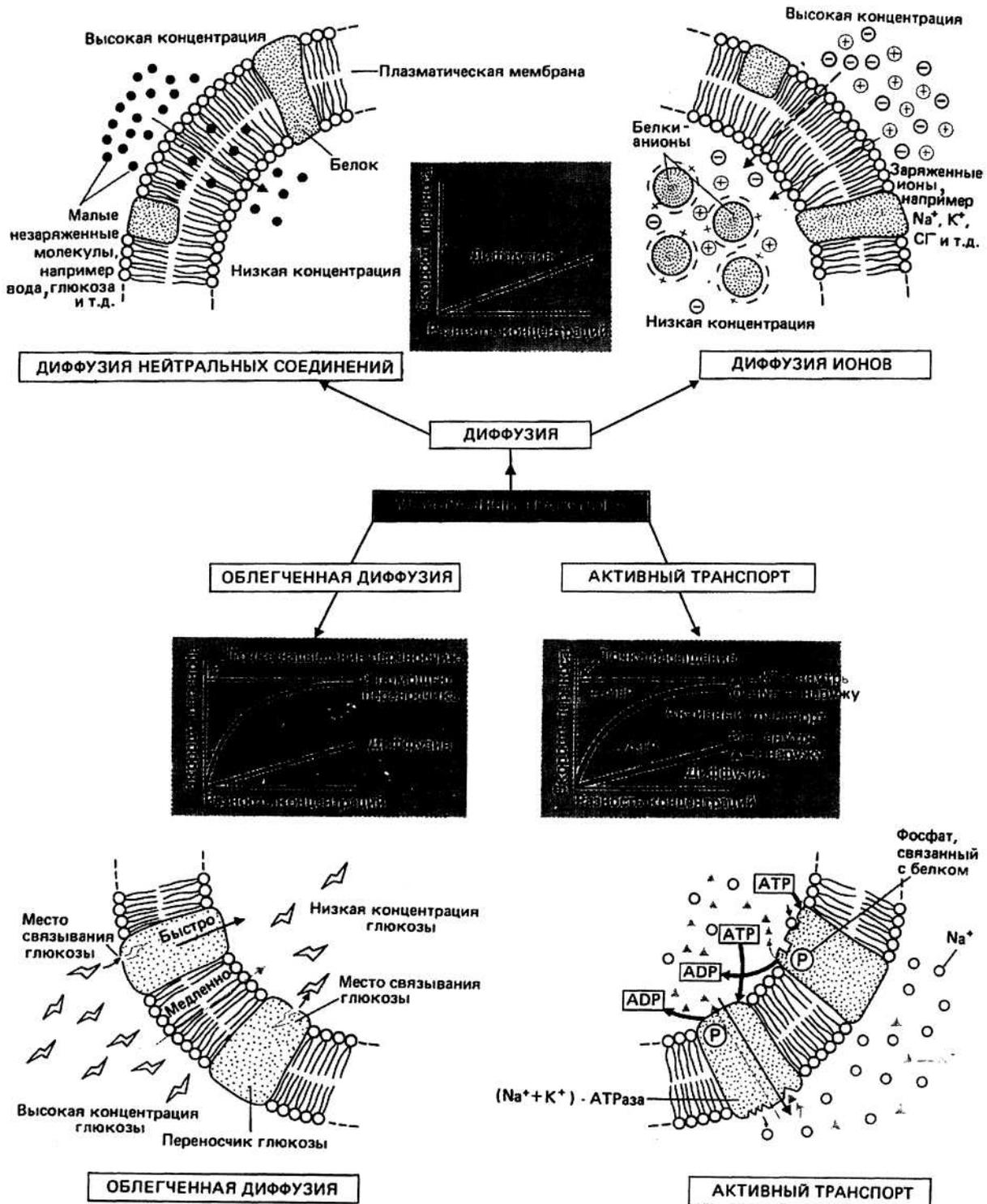
Рис. 37.4.

зина; при наклоне головки происходит скольжение все еще прикрепленной к ней тонкой актиновой нити вдоль толстой, что приводит к укорочению саркомера.

4. АТФ связывается с миозиновыми головками в актомиозине, и это приводит к отсоединению актина от миозина, после чего гидролиз АТФ миозином возвращает систему к первой фазе цикла.

Регуляция мышечной активности опосредуется ионами кальция (Ca^{2+}). При низких концентрациях Ca^{2+} тропонин и тропомиозин препятствуют взаимодействию актина с миозином. Когда приходит нервный импульс (гл. 36) и происходит деполяризация мембраны мышечных клеток, внутриклеточный уровень Ca^{2+} повышается, это вызывает Ca^{2+} -зависимое изменение конформации тропонина, которое передается тропомиозину, и в результате тропомиозин меняет свое положение на актиновой нити так, что её связывающие участки становятся доступными для головок миозина.

38. Перенос веществ через мембраны



Перенос вещества через плазматическую мембрану — это процесс, имеющий фундаментальное значение для всех живых клеток. Клетка должна иметь возможность поглощать как метаболиты, богатые энергией, так и питательные вещества и одновременно выводить наружу ненужные ей соединения. Клетки высших организмов обладают и еще одной способностью — они секретируют некие активные вещества, которые могут быть важны для жизнедеятельности других тканей или органов. Механизмы, с помощью которых малые молекулы (такие, как глицерол и глюкоза) или ионы (например, K^+ и Cl^-) могут проходить сквозь плазматическую мембрану, можно подразделить на три типа: *диффузия*, *облегченная диффузия* и *активный транспорт*.

ДИФФУЗИЯ — это процесс, в ходе которого молекулы (или ионы) переходят через мембрану из области с высокой концентрацией в область с низкой в результате броуновского движения. Чтобы понять, почему разность концентраций по обе стороны мембраны приводит к результирующему перемещению вещества в сторону малой концентрации, рассмотрим ситуацию, изображенную на рис. 38.2. Вероятность того, что молекула перейдет из отсека A_1 , в отсек B_1 в точ-

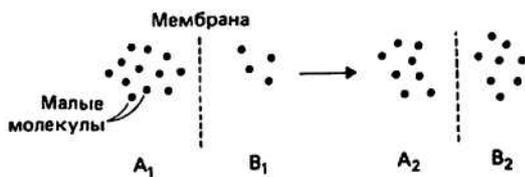


Рис. 38.2.

ности равна вероятности перехода молекулы из отсека B_1 в отсек A_1 . Но поскольку в начальный момент число молекул в A_1 больше, чем в B_1 за данное время из A_1 в B_1 переместится молекул больше, чем в обратном направлении. Такое перемещение будет продолжаться до тех пор, пока концентрации в A и B не станут одинаковыми, т. е. не будет выполняться равенство $[A]_2 = [B]_2$. Скорость перемещения в точности пропорциональна разности концентраций $[A] - [B]$. Гидрофобные вещества диффундируют через липидные мембраны быстрее, чем гидрофильные. Те молекулы, которые хорошо растворимы в гидрофобной среде (например, глицерол), легче переходят через плазматическую мембрану, чем водорастворимые молекулы. Исключением из этого правила является вода, которая, будучи весьма полярным соединением, должна была бы диффундировать значительно медленнее, чем, например, глицерол. На самом же деле скорость ее диффузии в 7 раз выше, чем у глицерола, а для природной клеточной мембраны это отношение может достигать 100. Эти наблюдения показывают, что а) белки влияют на поведение липидов и б) в некоторых случа-

ях вода может вести себя так, как будто она — липофильное вещество.

Нейтральная диффузия — это процесс, при котором через мембрану из области с высокой концентрацией в область с низкой переходят незаряженные молекулы. Скорость перехода описывается законом Фика

$$J = -D dc/dx,$$

согласно которому поток вещества (J) через мембрану пропорционален градиенту концентрации (dc/dx) молекул по обе стороны мембраны. D — константа, называемая коэффициентом диффузии и имеющая размерность $cm^2 \cdot s^{-1}$. Скорость нейтральной диффузии уменьшается с увеличением гидрофильности молекулы.

Ионная диффузия — это процесс, при котором через мембрану проходят заряженные ионы. Это пассивный процесс, и, как и в случае нейтральной диффузии, он зависит от наличия трансмембранной разности концентраций. Однако в силу того что в равновесии для сохранения электронейтральности с каждой стороны мембраны общее число положительных и отрицательных зарядов должно быть одинаковым, в уравнение Фика необходимо ввести дополнительный член. Рассмотрим клетку, содержащую полианионные (отрицательно заряженные) белки, которая находится в растворе KCl . Ионы будут диффундировать по градиенту концентрации внутрь клетки, но, поскольку белки не могут выйти наружу и заряжены отрицательно, внутрь проникнет больше ионов K^+ , чем Cl^- . В результате установится неодинаковое распределение ионов и возникнет трансмембранный электрохимический градиент. В модифицированное уравнение Фика, известное как уравнение Нернста—Планка, входит член, являющийся мерой этого градиента:

$$J = -D dc/dx + A dy/dx,$$

где A — постоянная для данного иона, dy/dx — трансмембранный градиент заряда.

Облегченная диффузия относится к процессам, при которых молекулы перемещаются из области с высокой концентрацией в область с низкой при помощи белков-переносчиков, локализованных в плазматической мембране. Процесс пассивен в том смысле, что перенос осуществляется по градиенту концентрации, и характеризуется тем, что он

- 1) специфичен для определенных молекул;
- 2) осуществляется быстрее, чем обычная диффузия;
- 3) достигает насыщения.

Специфические носители имеются для многих молекул, таких, как глюкоза, лактоза, аминокислоты, нуклеотиды, глицерол и т. д. Избирательность обусловлена наличием у переносчика стереоспецифического места связывания (например, переносчик глюкозы осуществляет транспорт только D-, но не L-глюкозы).

После связывания данной молекулы с переносчиком в последнем происходит структурный переход, в результате которого малая молекула перемещается на другую сторону мембраны. При этом скорость движения через плазматическую мембрану значительно превышает скорость простой диффузии. Вероятно, этот механизм возник в процессе эволюции для переноса тех гидрофильных молекул, которые иначе диффундировали бы через мембрану чересчур медленно, чтобы обеспечить потребности клетки. В любой конкретной клетке имеется конечное число переносчиков для данной молекулы или иона, и, когда все они заняты, скорость переноса становится максимальной. Следовательно, процесс достигает насыщения, причем кинетика переноса практически идентична таковой для простых ферментов (гл. 13). Чем больше концентрация переносимого вещества по данную сторону мембраны, тем больше переносчиков по эту сторону занято, и в результате происходит перенос на другую сторону мембраны. Когда разность концентраций равна нулю, переносчики, продолжая работать, переносят молекулы внутрь и наружу клетки с одинаковой скоростью, и поэтому в целом диффузии не наблюдается. Некоторые гормоны (гл. 41), такие, как инсулин и фактор роста эпидермиса, могут вызвать увеличение скорости диффузии при участии переносчиков сверх обычно наблюдаемой.

Под **АКТИВНЫМ ТРАНСПОРТОМ** понимают процессы, при которых ионы (или молекулы) переносятся через клеточную мембрану против градиента концентрации. Так как перенос осуществляется в термодинамически невыгодном направлении, этот процесс может идти только при наличии поступающей извне энергии. У высших организмов (например, у человека) такие активные процессы используют значительную часть потребляемой организмом энергии — примерно 30—40%. *Натрий-калиевая АТРаза* [(Na⁺ + K⁺)-АТРаза, мол. масса 250 000] — это одна из наиболее изученных систем активного транспорта. У большинства клеток поддерживаются разные концентрации

ионов Na⁺ и K⁺ внутри и снаружи клетки. Отношение концентраций для каждого из этих ионов может достигать 10—15. Обычно внутри клетки высока концентрация K⁺ и низка Na⁺, а снаружи наблюдается обратная ситуация (гл. 36). Поскольку мембрана хотя и очень слабо, но все-таки проницаема для заряженных ионов, имеет место небольшая «утечка», и концентрации этих двух ионов по разные стороны мембраны стремятся выравняться. (Na⁺ + K⁺)-АТРаза осуществляет активный транспорт ионов именно для того, чтобы предотвратить это выравнивание. Для поддержания неодинаковых концентраций Na⁺ и K⁺ за один цикл переноса через мембрану должны пройти 3 иона Na⁺ и 2 иона K⁺.

ПИНОЦИТОЗ (иногда называемый эндоцитозом) — это механизм, с помощью которого в клетку вводятся белки и другие макромолекулы в жидкой фазе. Обычно он наблюдается только у эукариотических клеток. Можно заметить, как небольшие области мембраны впячиваются и в конце концов образуют внутри клетки сферические пузырьки, которые отделяются от мембраны. Внеклеточные белки, прикрепленные к мембране в месте впячивания, оказываются внутри пузырьков. Часто потом эти пузырьки сливаются с лизосомами, содержащими гидролитические ферменты, которые разрушают введенный извне белок. Пример введения гормона описан в гл. 41.

ФАГОЦИТОЗ — это процесс, аналогичный пиноцитозу, в котором большие макромолекулярные комплексы, бактерии, вирусные частицы и т. д. поступают внутрь клетки и перевариваются там в больших пузырьках, или *вакуолях*. У одноклеточных амёб этот процесс играет большую роль в снабжении клетки питательными веществами. У многоклеточных высших организмов фагоцитоз осуществляется в основном специальными фагоцитирующими клетками (такими, как макрофаги), которые разрушают проникшие в клетку вещества до того, как они успевают вызвать ее повреждение.

39. Движение в немышечных клетках

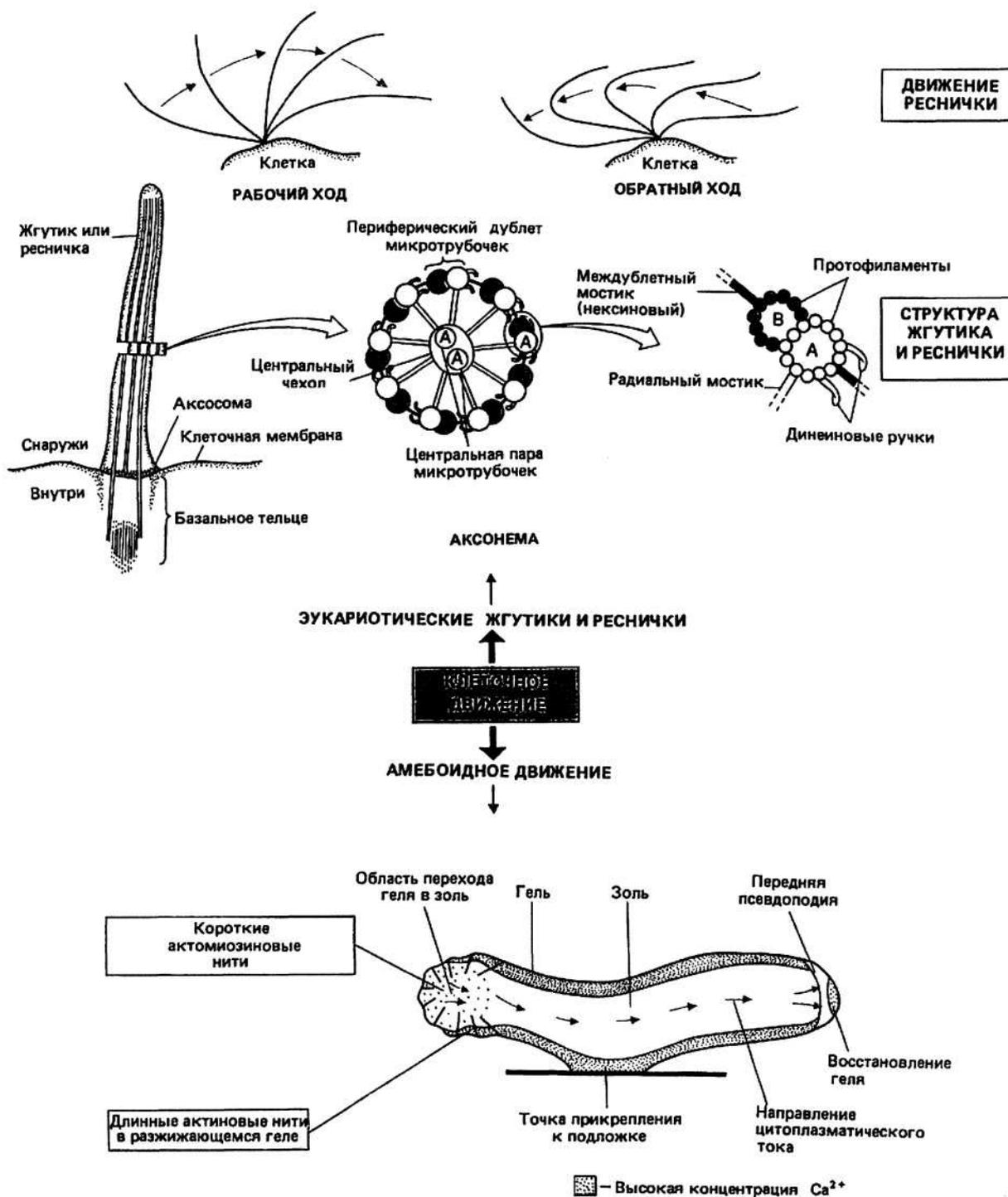


Рис. 39.1.

КЛЕТОЧНАЯ ПОДВИЖНОСТЬ - явление, свойственное как большинству одноклеточных эукариотических организмов, так и многим типам клеток многоклеточных. Хотя простейшие, клетки растений и клетки животных значительно различаются по фенотипу, механизмы, управляющие их подвижностью, обнаруживают замечательное сходство. Тот же клеточный аппарат, который контролирует движение клетки в целом, способен управлять и движением органелл внутри клетки. Все типы клеточной подвижности можно классифицировать в зависимости от того, обеспечиваются ли они *микротрубочками* или *микрофиламентами*.

МИКРОТРУБОЧКИ — длинные трубчатые структуры. Каждая микротрубочка имеет постоянный диаметр и состоит из молекул глобулярного белка *тубулина*, являющегося димером с мол. массой 110 000—120 000. Существует два типа мономеров тубулина, α и β , и димер является обычно гетеродимером — $\alpha\beta$. Микротрубочка представляет собой полый цилиндр с внешним диаметром около 24 нм и внутренним диаметром 15 нм. Длина микротрубочек варьирует от нескольких микрометров в цитоплазме большинства клеток и нескольких десятков микрометров в жгутиках и ресничках до нескольких миллиметров в аксонах нервов (гл. 36). Стенка цилиндра, имеющая толщину около 5 нм, состоит из 13 расположенных по кругу, соприкасающихся бок о бок протофиламентов, каждый из которых является полимером тубулинового гетеродимера. Вид такой микротрубочки сбоку показан на рис. 39.2. В эукариотических клетках микротрубочки могут входить в состав характерной структуры, *аксонемы* жгутиков и ресничек, отличной от структур, встречающихся в прокариотических клетках (гл. 2). Поскольку жгутики и реснички есть как у одноклеточных организмов (например, у простейших), так и у многоклеточных (например, у человека) и играют существенную роль в клеточном движении, строение

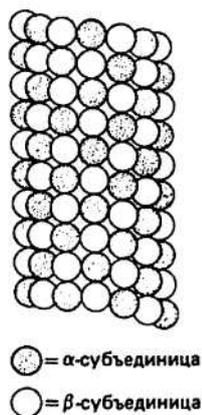


Рис. 39.2.

аксонемы будет рассмотрено в деталях (см. ниже). Находясь в цитоплазме эукариотических клеток, микротрубочки играют ключевую роль в таких процессах, как образование митотического веретена и эндоцитоз (гл. 3), а в жгутиках и ресничках они участвуют в генерации движения клеток.

Белки, ассоциированные с микротрубочками, — неотъемлемые компоненты системы микротрубочек; они играют существенную роль в регуляции таких процессов, как сборка и разборка микротрубочек и образование поперечных сшивок, связывающих микротрубочки между собой, а также с другими компонентами клетки.

Аксонема — это состоящая главным образом из микротрубочек структура, которая служит основным двигательным элементом жгутиков и ресничек. Она окружена мембраной — непосредственным продолжением плазматической мембраны клетки. *Ресничками* называются короткие (1—5 мкм) подвижные отростки клетки, присутствующие на ее поверхности в большом числе. Если же отростков лишь несколько и они длинные (до 1—2 мм), то их называют *жгутиками*. На поперечном срезе аксонемы видна центральная пара трубочек, окруженная кольцом из девяти дублетов трубочек. Аксонемные трубочки являются по своему строению либо классическими микротрубочками со стенкой, построенной из 13 протофиламентов (трубочки типа А), либо неполными трубочками из 10 протофиламентов, образующих незамкнутый — серповидный на поперечном срезе — цилиндр (трубочки типа В). В непосредственной близости от двух центральных трубочек, которые принадлежат к типу А, располагается окружающий их белковый чехол. Несколько далее находятся девять дублетов трубочек, каждый из которых состоит из трубочки типа А и присоединенной к ней трубочки типа В. В аксонеме имеются два типа постоянных мостиков: междублетные мостики, которые построены из белка *нексина* и соединяют А-трубочки дублетов с В-трубочками соседних дублетов, и радиальные мостики, которые состоят из не имеющего еще названия белка и связывают каждый дублет с центральным чехлом. На А-трубочках дублетов расположен с некоторым периодом белок *динеин*; в определенных условиях он образует междублетные мостики, которые и генерируют силу, приводящую жгутики и реснички в движение. Хотя по характеру движения реснички и жгутики немного различаются — у первых оно похоже на удар хлыста, а у вторых является волнообразным, — его молекулярная основа и в том и в другом случае одна и та же.

Модель скользящих нитей, предложенная для объяснения движения ресничек, имеет много общего с одноименной моделью, описывающей мышечное сокращение (гл. 37). В присутствии АТФ белок динеин, образующий «ручки» на А-трубочке каждого дублета, связывается с В-трубочкой соседнего дублета. Этот белок является Ca^{2+} - и Mg^{2+} -зависимой АТФазой высо-

кой мол. массы (300 000—400 000) и может находиться по меньшей мере в двух конформационных состояниях. При связывании с соседней В-трубочкой он находится в одном состоянии, а во время последующего гидролиза АТФ переходит в другое. Этот переход, сопровождающийся движением динеиновых ручек в плоскости длинной оси трубочек, приводит к смещению одних трубочек относительно других. В результате образования и диссоциации множества мостиков трубочки скользят, или, точнее, «ползут», вдоль соседних трубочек. Если скольжение будет происходить преимущественно на одной стороне аксономы, ресничка изогнется. В верхней части рис. 39.1 показан ряд последовательных положений реснички, изгибающейся в процессе биения. Бьющими ресничками клетка отталкивается от жидкой среды и таким образом перемещается в ней.

МИКРОФИЛАМЕНТЫ — нитевидные органеллы диаметром около 5 нм — встречаются в большинстве эукариотических клеток; они являются полимером глобулярного белка актина (мол. масса 43 000). Микрофиламенты располагаются в цитоплазме беспорядочно либо образуют фибриллярные пучки, например в выступающих вперед отростках движущихся клеток. У многих клеток млекопитающих пучки микрофиламентов, называемые иногда «волоконнами натяжения», формируют во время интерфазы (гл. 29) сеть, простирающуюся по всему внутриклеточному пространству. Во время митоза многочисленные микрофиламенты обнаруживаются в зоне, где происходит разделение клетки на дочерние; микрофиламенты образуют там так называемое «сократительное» кольцо. Мышечные клетки содержат также белок миозин, и в основе их движения может, по-видимому, лежать тот же тип взаимодействия актина и миозина, что и в основе мышечного сокращения. Одна из гипотез о механиз-

ме движения амебы, а именно предложенная Тейлором *модель разжижения—сокращения*, рассматривается ниже.

Модель разжижения - сокращения, описывающая механизм амебоидного движения, постулирует, что цитоплазма амебы может находиться в двух состояниях — геля и золя. Гелеобразная цитоплазма локализуется лишь в областях, непосредственно прилегающих к плазматической мембране, и содержит актиновые нити, сшитые друг с другом актинсвязывающими белками одного или нескольких типов (например, ос-актинином или филамином). Из-за наличия поперечных сшивок актиновые нити геля, хотя и контактируют с миозином, не могут участвовать в сокращении. В задней части амебы имеется область высокой концентрации Ca^{2+} , вызывающей отсоединение актинсвязывающих белков от актиновых нитей; это область перехода геля в золь. После отделения сшивающих белков другие белки (например, *виллин* и *гельзолин*) дестабилизируют длинные актиновые нити, и в результате образуются короткие нити, способные взаимодействовать с миозином. Взаимодействие с миозином приводит к сокращению, протекающему согласно классической модели скользящих нитей (гл. 37). Результатом сокращения в задней части амебы, там, где гель переходит в золь, является повышение гидравлического давления, что заставляет цитоплазму амебы перемещаться к переднему краю, в выступающую вперед псевдоподию. Как только растворимый актин и актинсвязывающие белки достигают передней части клетки, они вновь образуют гель, поддерживая таким образом постоянство соотношения между гелем и золем в амебе. Аналогичные схемы, предполагающие перемещение цитоплазмы — «цитоплазматический ток» — за счет возникающих при сокращении «толкающих» сил, предложены для объяснения движения у многих клеток высших организмов.

40. Антитела и их функции

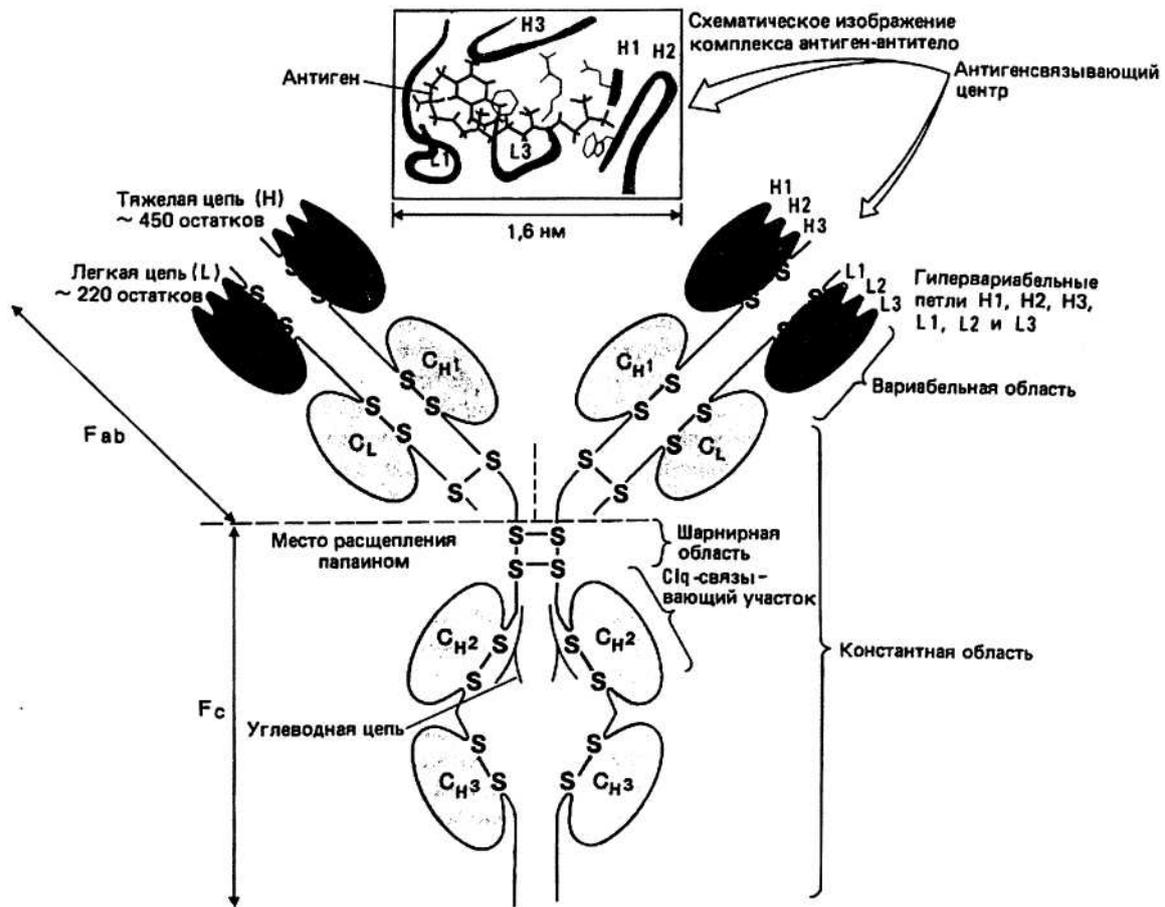


Рис. 40.1. Молекула иммуноглобулина G.

Иммунитетом называется способность организма распознавать и разрушать попавшие в него чужеродные элементы, например микроорганизмы или вирусы. Иммунная система наиболее сложно организована у млекопитающих — проникновение чужеродных веществ служит у них сигналом для запуска ряда процессов, протекающих на клеточном и молекулярном уровнях и называемых в целом *иммунным ответом*.

Иммуноглобулины, или антитела — это молекулы, циркулирующие в организме и отвечающие за распознавание чужеродных, или «не своих», элементов. За этим узнаванием следует серия реакций, составляющих *гуморальный, или опосредованный антителами, ответ*.

Антигены — это чужеродные молекулы, с которыми могут связываться антитела. Образование комплекса антиген—антитело, как правило, сопровождается запуском особого процесса, приводящего в конечном итоге к значительному увеличению концентрации соответ-

ствующих антител. Антитело специфически связывается с определенным участком антигена. Этот участок носит название *эпитоп*. Один антиген может содержать множество эпитопов. Обычно антигены представляют собой либо отдельные макромолекулы, такие, как белки, нуклеиновые кислоты, липиды или углеводы, либо комбинации макромолекул, примером которых служат наружные поверхности вирусов и бактерий.

Иммуноглобулин G (IgG), называемый также γ -глобулином, — самый распространенный иммуноглобулин. Его мол. масса равна 150 000. Молекула IgG состоит из четырех полипептидных цепей — двух идентичных тяжелых (*heavy*, H) и двух идентичных легких (*light*, L). H-цепь (мол. масса 50 000) содержит около 450 аминокислотных остатков, а L-цепь (мол. масса 25 000) — 220. Четыре цепи ковалентно связаны между собой дисульфидными мостиками (рис. 40.1).

Варибельные и константные области H- и L-цепей. Сравнение первичных структур нескольких IgG,

принадлежащих одному виду, показывает, что последовательности N-концевых половин L-цепей сильно различаются. Поэтому принято говорить, что первые (т. е. N-концевые) 110 аминокислотных остатков образуют *вариабельную (variable), или V-область*. С-концевые половины часто имеют одинаковые последовательности. Эти 110 остатков у С-конца составляют *константную (constant), или С-область*. Последовательности С-области L-цепей можно разбить на два класса. В соответствии с этим L-цепи подразделяются на два типа - каппа (κ) и лямбда (λ). В каждой из H-цепей вариабельная область длиной около 110 аминокислотных остатков также находится в N-концевой части, а остальные 340 аминокислот образуют константную область.

Гипервариабельные участки V-областей L- и H-цепей. Сравнение аминокислотных последовательностей различных V-областей L-цепей показало, что в пределах V-области имеются участки, отличающиеся чрезвычайно высокой степенью вариабельности и называемые поэтому *гипервариабельными*. L-цепь содержит три таких пространственно отделенных друг от друга участка (L1, L2 и L3 на рис. 40.1) — каждый из них состоит приблизительно из 6 остатков. Аналогично в V-области H-цепи также обнаруживаются 3 гипервариабельных участка (H1, H2 и H3). Гипервариабельные участки L- и H-цепей составляют *антигенсвязывающий центр*, т. е. ту часть молекулы Ig, которая узнает антиген. Благодаря высокой степени вариабельности гипервариабельных участков может существовать огромное число различных антигенсвязывающих центров.

Домен иммуноглобулина представляет собой структурную единицу, состоящую примерно из 100 остатков. L-цепь построена из двух доменов, соответствующих вариабельной (V) и константной (C) областям. Эти домены обозначаются V_L и C_L . В H-цепи можно выделить четыре домена: вариабельный (V_H) и 3 домена, образующих константную область (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}). Аминокислотные последовательности доменов обладают определенным сходством друг с другом. В частности, в каждом домене полипептидная цепь образует петлю (во всех доменах эти петли имеют примерно одинаковую длину), замкнутую внутрицепочечной дисульфидной связью.

Fab- и Fc-фрагменты получаются из инактной молекулы IgG путем ограниченного протеолиза полипептидной цепи с помощью папаина. Каждый фрагмент имеет мол. массу около 50 000. Два из образующихся фрагментов обладают антигенсвязывающими свойствами и называются поэтому Fab (fragment antigen binding). Третий фрагмент легко кристаллизуется и обозначается Fc (fragment crystallised). Fab состоит из одной L-цепи (домены V_L и C_L) и первой половины одной H-цепи (V_H и C_{H1}), а Fc — из вторых половин двух H-цепей, т. е. из двух C_{H2} и двух C_{H3} доменов.

Пространственная структура IgG была определена методом рентгеноструктурного анализа. Молекула IgG имеет Y-образную форму — каждая ветвь Y соответствует Fab-области, а основание Y — Fc-области. Третичные структуры всех доменов обладают большим сходством. Каждый домен длиной 110 остатков представляет собой плотно упакованную глобулу, состоящую из пары расположенных один над другим р-складчатых листов (см. рис. 10.1). Отдельные домены находятся в тесном контакте. Так, 4 домена Fab-области попарно взаимодействуют друг с другом — V_H с V_L , а C_{H1} с C_L . В Fc-области C_{H3} -домены расположены один напротив другого, а между C_{H2} -доменами локализованы две разветвленные углеводные цепи. Части полипептидной цепи, соединяющие между собой любые два домена, обычно менее плотно упакованы, чем сами домены. Область между Fab и Fc называется шарнирной, поскольку присущая ей определенная гибкость позволяет Fab-областям перемещаться относительно Fc.

Антигенсвязывающие центры находятся в верхних точках обеих ветвей Y-образной молекулы. В каждом вариабельном домене гипервариабельные участки пространственно сближены. Наличие тесного контакта между V_H - и V_L -доменами в свою очередь приводит к тому, что все гипервариабельные участки оказываются расположенными рядом, формируя таким образом антигенсвязывающий центр. Было показано, что связывание антигена с молекулой IgG может осуществляться за счет водородных связей, солевых мостиков, вандерваальсовых и гидрофобных взаимодействий. На рис. 40.1 схематически изображена локализация витамина K, в комплексе антиген (витамин K) — антитело (IgG).

Fc - область играет очень важную роль в запуске тех процессов иммунного ответа, которые в конечном итоге приводят к разрушению чужеродных элементов. Один из этих процессов состоит в последовательной активации компонентов так называемой *системы комплемента*. Первый этап заключается в связывании молекулы $C1q$ с C_{H2} -доменом IgG. $C1q$ связывается только с IgG, образовавшим комплекс с антигеном.

$C1q$ является составной частью первого компонента (C1) системы комплемента и по форме напоминает букет тюльпанов. В молекуле насчитывается 18 полипептидных цепей. Каждый «тюльпан» состоит из 3 цепей. Головка тюльпана представляет собой глобулу, а вытянутый стебель, по-видимому, имеет структуру тройной коллагеновой спирали (гл. 11). Во всяком случае, последовательность каждой цепи в стебле построена из повторяющихся триплетов —Gly—X—Y—. Для активации следующих компонентов системы комплемента несколько молекул IgG должны присоединиться к антигену и таким образом сближаться друг с другом настолько, чтобы стало возможным связывание этих IgG с головками одной и той же молекулы $C1q$ (рис. 40.2).

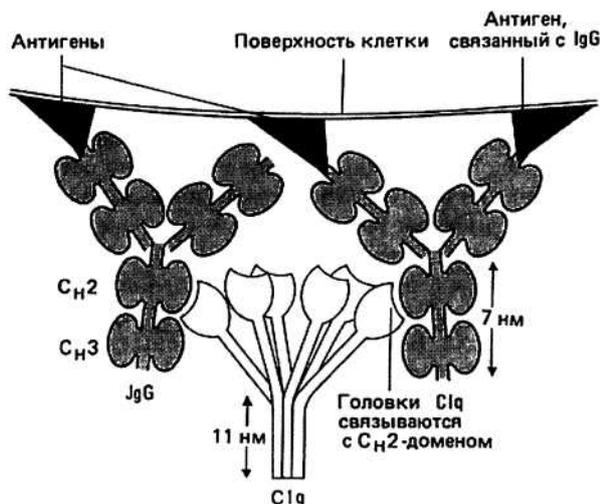


Рис. 40.2.

Разнообразие антител В течение жизни организм продуцирует огромное количество различных антител ($>10^8$) против всевозможных антигенов. Такая способность организма объясняется в настоящее время соматической перегруппировкой генов. Это означает, что при рождении в организме существует ограниченное число генов иммуноглобулинов (значительно меньше 10^8), а необходимое их разнообразие достигается благодаря перегруппировке этих генов.

Расшифровка нуклеотидных последовательностей генов - иммуноглобулинов позволила понять механизм соматической перегруппировки. Каждый V- и C-домен кодируется отдельными генами. Кроме того, ген вариабельной области разделен на различные участки. V-область легкой цепи содержит два таких участка, обозначаемых K и Y (от англ. *joining*— соединение). Расчет числа возможных VL-областей основан на тех известных в настоящее время фактах, что существует 100 различных V-участков и 5 различных J-участков, а



Рис. 40.3.

V/J-сплайсинг может осуществляться 10 способами. Следовательно, возможно образование $100 \cdot 5 \cdot 10 = 5 \cdot 10^3$ VL-областей. V-область тяжелой цепи содержит три участка, обозначаемых V, J и D (от англ. *diversity* — разнообразие). Существует приблизительно 100 V-участков, 5 J-участков и 50 D-участков, а каждое из V/J- и J/D-соединений может осуществляться 10 способами. Таким образом, возможно образование $100 \cdot 5 \cdot 50 \cdot 10 \cdot 10 = 2,5 \cdot 10^6$ VH-областей. Вместе с $5 \cdot 10^3$ VL-областями общее число возможных V_H-V_L -пар, а следовательно и различных антигенсвязывающих центров, составляет $5 \cdot 10^3 \cdot 2,5 \cdot 10^6 = 10^{10}$.

Классы иммуноглобулинов. Все известные иммуноглобулины подразделяются на 5 классов — IgG, IgA, IgM, IgD и IgE — в зависимости от характера аминокислотной последовательности константной области тяжелой цепи. Различают соответственно 5 классов этих последовательностей — γ , α , μ , δ и ϵ . У иммуноглобулинов разных классов варьирует также число пар H- и L-цепей и в некоторых случаях длина H-цепи (IgM и IgG имеют дополнительный домен C_{H4} , расположенный за C_{H3} -доменом).

Класс	Цепи	Мол. масса
IgG	$\gamma_2\kappa_2$ или $\gamma_2\lambda_2$	150 000
IgA	$(\alpha_2\kappa_2)_{1-3}$ или $(\alpha_2\lambda_2)_{1-3}$	160 000, 320 000 или 480 000
IgM	$(\mu_2\kappa_2)_3$ или $(\mu_2\lambda_2)_3$	900 000
IgD	$\delta_2\kappa_2$ или $\delta_2\lambda_2$	185 000
IgE	$\epsilon_2\kappa_2$ или $\epsilon_2\lambda_2$	200 000

41. Действие некоторых гормонов ПОЗВОНОЧНЫХ

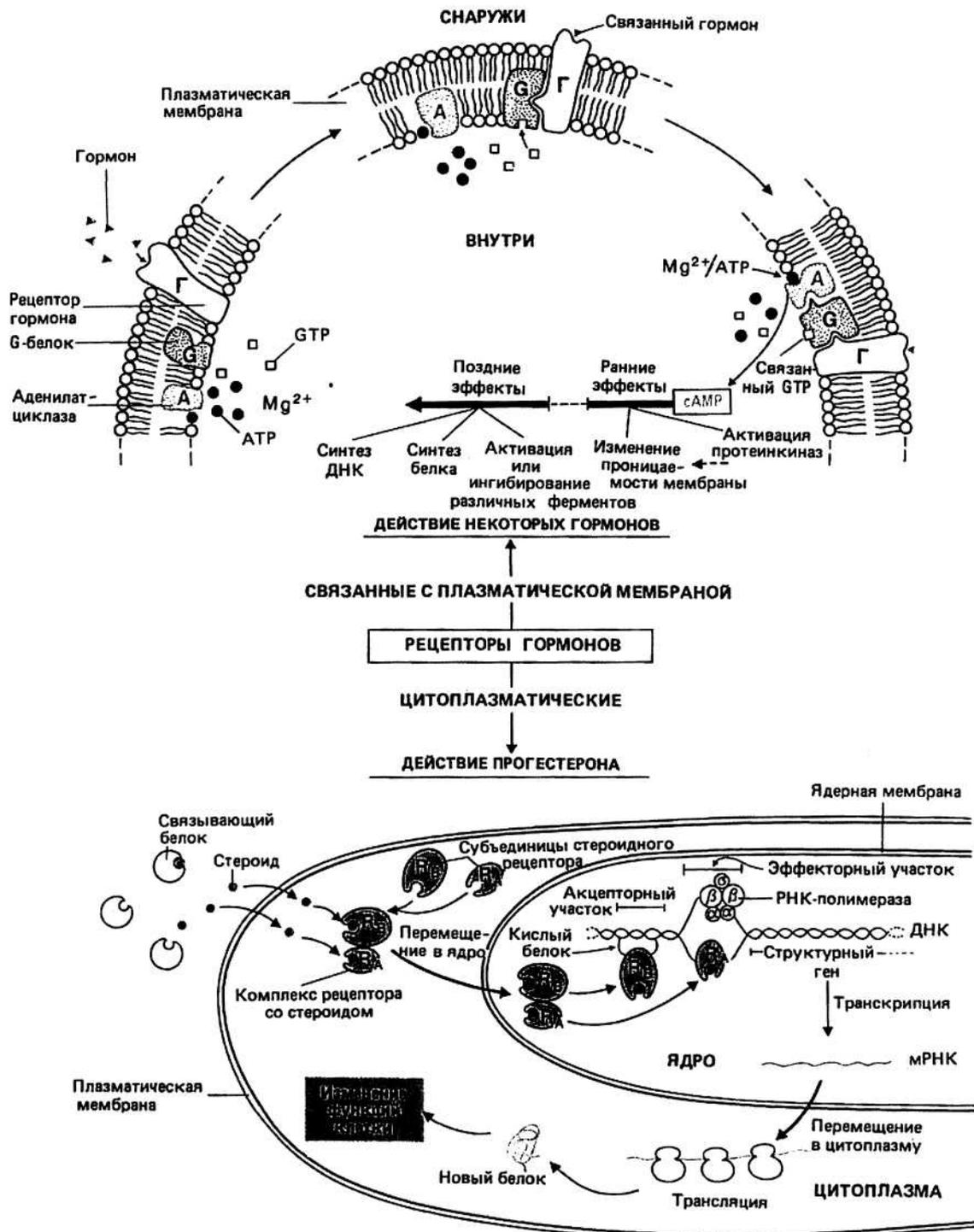


Рис. 41.1.

ГОРМОНЫ — вещества, продуцируемые специализированными тканями высших организмов и действующие как высокоспецифичные «химические сигналы». Структура гормонов крайне разнообразна: гормон инсулин, секретируемый поджелудочной железой, является белком (мол. масса 6000), а вазоактивный (т. е. влияющий на артериальное давление) амин адреналин, вырабатываемый мозговым веществом надпочечников, представляет собой небольшую ароматическую молекулу (мол. масса 172). Функция гормонов состоит в передаче информации от «клеток-датчиков», находящихся в непосредственном контакте с внешней средой. Гормоны легко распространяются по всему организму, и потому, когда они высвобождаются вырабатывающей их тканью, все ткани и органы, способные реагировать на них, делают это почти одновременно. Благодаря такой общей, согласованной реакции все части организма приходят в состояние, наиболее соответствующее условиям внешней среды.

Один и тот же гормон может вызвать изменения метаболизма в клетках разного типа. Например, повышение уровня глюкозы в крови человека после приема пищи служит для поджелудочной железы сигналом к секреции гормона инсулина, который стимулирует самые разные ткани-мишени (печень, жировую ткань, мышцы), способные утилизировать глюкозу и тем самым снижать ее концентрацию в крови. Глюкоза может затем быть использована тканями в метаболических процессах, продуцирующих энергию, или запасена в форме гликогена на будущее. Когда уровень глюкозы в крови снижается до нормального, секреция инсулина прекращается, и ткани-мишени возвращаются к такому состоянию, в каком они находились до стимуляции. Гормоны вообще мобилизуются, по-видимому, только тогда, когда метаболический статус организма нуждается в изменении. Все гормоны можно разделить на две большие группы в зависимости от того, в какой части клетки возникает первичный ответ на них: на клеточной поверхности, в результате их взаимодействия с рецепторами, связанными с плазматической мембраной, или во внутриклеточном пространстве, в результате воздействия на растворимые рецепторы в цитоплазме или ядре.

МЕМБРАННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ — это белки (нередко гликозилированные) плазматической мембраны, способные связывать гормоны. Рецепторы специфичны, и для их активации необходимо точное стерическое соответствие между ними и воздействующими на них молекулами; для каждого гормона существуют свои собственные рецепторы. Для того чтобы обладать способностью отвечать на разнообразные сигналы, поступающие из внешней среды и передаваемые с помощью гормонов, клетки должны нести на своей поверхности соответствующий набор рецепторов. Например, такая типичная клетка-мишень, какой является клетка печени, имеет рецепторы для инсулина, глюко-

гона (также полипептидный гормон), адреналина и многих других гормонов. Когда гормон подходит к клетке-мишени, он связывается со специфическими, предназначенными для него рецепторами, и это запускает цепь событий, приводящих к требуемым изменениям метаболизма. Детальный механизм того, как связывание гормона инициирует последующие события, неизвестен. Для некоторых гормонов, однако, уже идентифицированы так называемые *эффекторы*.

Эффекторы — это молекулы, которые активируются комплексом рецептора с гормоном, но не реагируют на свободный рецептор, без гормона. Согласно так называемой «гипотезе подвижных рецепторов», механизм активации включает в себя диффузию в мембране молекул — участниц процесса — и их последующую «стыковку». Наиболее изученный эффектор — аденилатциклаза, которая катализирует превращение АТФ в 3',5'-АМР (циклический АМР, или сАМР). Этот фермент может активироваться многими рецепторами, из чего следует, что: 1) сАМР способен осуществлять регуляцию различных метаболических процессов; 2) разные рецепторы, возможно, имеют сходную структуру — по крайней мере в тех частях их молекул, которые реагируют с эффектором. В примере, показанном на рис. 41.1, рецептор и эффектор не взаимодействуют друг с другом непосредственно. Промежуточный процесс, через который связывание гормона индуцирует активацию эффектора, носит название *трансдукции*, а молекула, осуществляющая его, называется *трансдуктором*.

Трансдуктором является всякая молекула, которая реагирует на образование комплекса рецептора с гормоном, но сама по себе не способна вызывать метаболические изменения иным путем, кроме как активируя эффектор.

Типичный механизм действия гормонов (таких, как адреналин или полипептид глюкагон) показан в верхней части рис. 41.1. Гормон, связавшись с рецептором, делает его способным присоединиться к трансдуктору — так называемому G-белку, который в свою очередь, после присоединения рецептора, претерпевает конформационное изменение, приводящее к формированию GTP-связывающего центра. Комплекс G-белка с GTP связывается затем с ферментом аденилатциклазой, результатом чего является активация этого фермента и образование сАМР. Даже тогда, когда гормона нет и, следовательно, молекулы G-белка находятся преимущественно в неактивной конформации (не в комплексе с GTP), фермент-эффектор все же обладает некоторой активностью. Этим объясняется тот факт, что гормоны стимулируют уже протекающие метаболические процессы, а не «включают» новые, находившиеся на нулевом уровне. Смысл использования фермента в качестве эффектора в том, что такой эффектор обеспечивает образование очень большого числа молекул сАМР и исходный «гормональный сигнал» таким образом *усиливается*. Моле-

кулы, функционирующие подобно сАМР, называют *вторым посредником*.

Второй посредник – это молекула (например сАМР, сGMP) или ион (например, Ca^{2+}); его концентрация в клетке под действием гормона возрастает. Циклический АМР способен активировать множество различных внутриклеточных ферментов, например протеинкиназу. Этот фермент состоит из двух субъединиц, одна из которых — субъединица К — обладает киназной активностью (она присоединяет группу PO_4^{2-} к белку-субстрату), а другая — субъединица R — играет регуляторную роль. Связывание сАМР индуцирует отделение субъединицы R от субъединицы К, в результате чего последняя активируется. Активная К-субъединица фосфорилирует затем другие ферменты, переводя их таким образом из неактивной формы в активную и инициируя тем самым каскад метаболических реакций. Вызываемые эффекты могут проявляться быстро (изменение проницаемости мембраны) или замедленно (активация синтеза белка и ДНК).

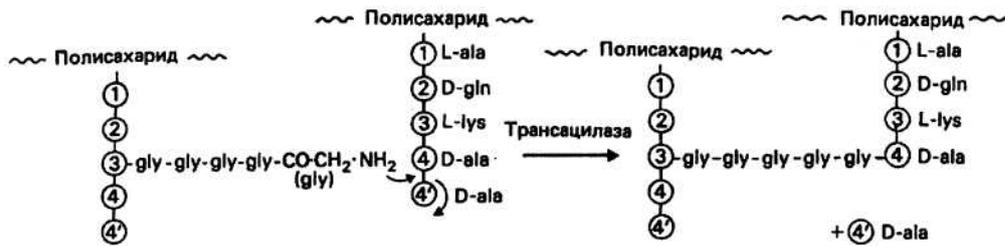
Регуляция путем снижения чувствительности к гормону может осуществляться, когда число рецепторов на клетке-мишени падает ниже уровня, необходимого для активации эффекторов. Такое состояние возникает закономерно, как одна из фаз нормального ответа. Когда клетка получает гормональный стимул, комплексы гормон-рецептор агрегируют в мембране, проникают внутрь клетки и затем разрушаются. Поскольку описанный процесс удаления рецепторов из мембраны протекает быстро, а процесс их замещения новосинтезированными или повторно использующимися рецепторами — сравнительно медленно, число рецепторов клеточной поверхности на какой-то период становится меньше минимально необходимого для обеспечения ответа на гормон. О клетке в таком состоянии говорят как о *потерявшей чувствительность* к гормону.

Цитоплазматические рецепторы — это обычно растворимые белки, способные связывать низкомолекулярные гормоны, такие, как стероиды (гл. 33). Стероиды являются высокоспециализирован-

ными гормонами, осуществляющими свое действие в ядре определенных клеток-мишеней. После выделения соответствующей тканью (например, корой надпочечников, продуцирующей более 30 различных стероидов) стероиды разносятся по организму кровотоком и благодаря жирорастворимости проникают через мембрану в цитоплазму клетки-мишени. Попав в клетку, стероиды связываются со специфическими рецепторами. Примером стероидного гормона может служить *прогестерон*, продуцируемый желтым телом и играющий важную роль в сохранении беременности и регуляции менструального цикла. Действие прогестерона опосредуется *прогестероновыми рецепторами*.

Прогестероновый рецептор представляет собой димерную молекулу; он содержится в цитоплазме клеток-мишеней, имеющихся, например, в молочной железе. Связывание прогестерона стабилизирует димерную структуру рецептора и вызывает изменение его формы. Комплекс рецептора с гормоном обладает способностью проходить через ядерную мембрану, однако механизм этого процесса неясен. Очутившись в ядре, комплекс связывается со специальными участками хроматина и изменяет скорость транскрипции определенных генов. Стимуляция транскрипции приводит к увеличению количества молекул мРНК и тем самым к повышению внутриклеточного уровня кодируемых ими белков. Поскольку прогестерон изменяет скорость транскрипции и увеличивает концентрацию мРНК, результатом его действия — как и действия других гормонов — является усиление уже протекающих метаболических процессов, а не индукция новых. Схема действия прогестерона, приведенная в нижней части рис. 41.1, представляет собой попытку наилучшим образом отразить имеющиеся экспериментальные данные. С акцепторным участком ДНК связывается В-субъединица комплекса рецептора с прогестероном, тогда как его А-субъединица присоединяется к эффекторному участку, в результате чего возрастает скорость работы РНК-полимеразы и, следовательно, количество мРНК, синтезируемой на соответствующих генах.

42. Как работают антибиотики



Образование сшивок в клеточной стенке бактерии

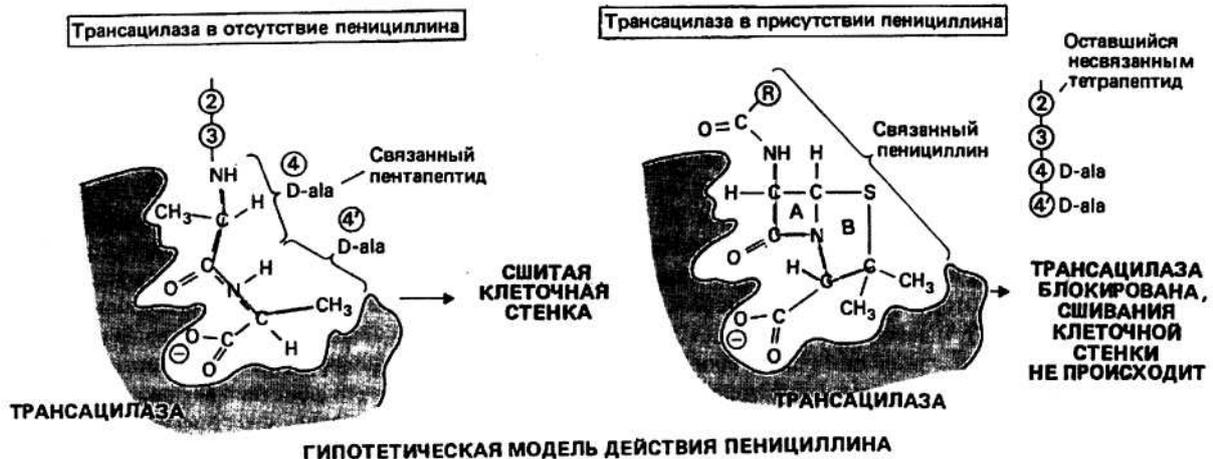


Рис. 42.1.

Антибиотики — химические вещества, продуцируемые в основном микроорганизмами и обладающие прямым и избирательным ингибирующим действием на живые клетки. Исследования Пауля Эрлиха в конце XIX в. привели к открытию химических красителей и других соединений, способных избирательно воздействовать на трипаносомы, спирохеты и прочих паразитов. Работа Эрлиха была встречена его современниками скептически, однако после открытия пенициллина Флемингом в 1928 г. и сульфамидных препаратов Домагком в 1935 г. интерес к антибиотикам возобновился, и в скором времени было найдено множество новых веществ, относимых к антибиотикам. Под термином «антибиотики» подразумевают обычно вещества с антибактериальным действием, хотя многие противовирусные и противоопухолевые препараты также являются антибиотиками. Антибиотики можно не очень строго разделить на два класса в зависимости от того, подавляют ли они рост бактериальных или эукариотических клеток.

Антибактериальные антибиотики нарушают один из метаболических процессов, что приводит либо к

подавлению роста клеток (бактериостатическое действие), либо к их гибели (бактерицидное действие). В табл. 42.1 приведены примеры некоторых широко известных антибиотиков; все эти антибиотики продуцируются грибами и актиномицетами. Как видно из таблицы, с помощью антибиотиков могут быть блокированы самые разные функции бактериальной клетки. Таблица 42.1

Название	На что действует	Характер действия
Пенициллины	Синтез клеточной стенки	Бактерицидное
Цефалоспорины	То же	»
Стрептомицин	Рибосомы (синтез белка)	»
Хлорамфеникол (левомицетин)	То же	Бактериостатическое
Тетрациклин	»	»
Новобиоцин	ДНК-гираза (репликация)	»
Рифамицин	ДНК (транскрипция)	»

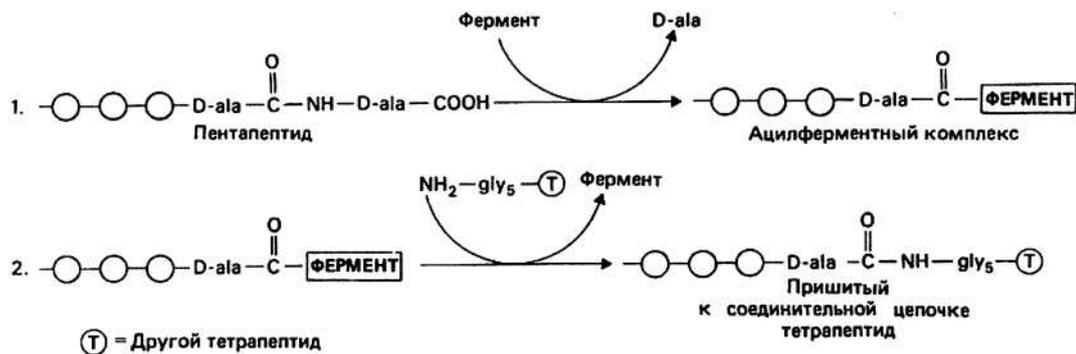


Рис. 42.2.

Выбор конкретных антибиотиков для клинического применения зависит от чувствительности к ним тех или иных бактерий и от вызываемых ими побочных эффектов. Те антибиотики, которые действуют только на функции бактерий, очевидно, более пригодны для клинических целей, чем те, которые атакуют и про-, и эукариотические клетки. Так, широкое использование пенициллина для лечения бактериальных инфекций обусловлено тем, что его действие направлено на клеточную стенку именно прокариот. Вместо пенициллина часто используется тетрациклин, который блокирует метаболический процесс, казалось бы, общий для клеток всех типов, а именно синтез белка, однако в действительности этот антибиотик высокоспецифичен именно в отношении прокариотических рибосом (гл. 24). Сейчас мы рассмотрим механизм действия пенициллина, а действие некоторых противоопухолевых препаратов будет описано в следующей главе.

ПЕНИЦИЛЛИН - природное соединение, продуцируемое плесневым грибом *Penicillium notation*. Молекула пенициллина содержит два конденсированных кольца: тиазолидиновое и β -лактамное. Группа R может быть разной. По сути дела, пенициллин представляет собой состоящий из L-цистеина и D-валина (гл. 6) циклический дипептид, к которому присоединена ацильная группа (RCO—). Связь CO—N в лактамном кольце напряжена (из-за его четырехчленности) и потому легко гидролизуется. Нестабильность этой связи являлась одной из причин, по которым Флемингу не удалось наладить клиническое применение пенициллина, хотя антибиотик был эффективен в опытах на культурах бактерий. Наиболее удовлетворительным из первоначально полученных пенициллинов оказался бензилпенициллин (пенициллин G), в котором R — бензильная группа. Первые указания на возможный механизм действия пенициллина появились в 1957 г., когда Ледерберг обнаружил, что чувствительные к этому антибиотику бактерии могут расти в его присутствии в том случае, если находятся в форме протопластов, т. е. лишены клеточной стенки. Позднее, в 1965 г., Парк и Стромингер показали, что пенициллин меша-

ет образованию сшивок на заключительном этапе синтеза клеточной стенки у бактерий. На этом этапе происходит образование пептидной связи между аминогруппой пептидного мостика и вторым от конца тетрапептида (см. рис. 42.1 и 42.2) D-ala (реакция *транспептидации*).

Транспептидация катализируется ферментом гликопептид-транспептидазой (трансацилазой). На первой стадии образования сшивки этот фермент должен связать два D-аланиновых остатка, расположенных на конце пентапептида (см. рис. 42.2; гипотетическая модель фермент-субстратного комплекса показана на рис. 42.1). Затем, удаляя концевой D-ala, фермент образует со вторым от конца D-ala ацил-интермедиат, и наконец аминогруппа соединительной цепочки атакует ацил-фермент, в результате чего образуется сшивка и высвобождается фермент. Пенициллин ингибирует эту реакцию потому, что он сходен с D-аланил-O-аланиновой группой и может занять предназначенное ей место в активном центре фермента (см. рис. 42.1). Однако дело, по-видимому, не ограничивается только связыванием пенициллина с ферментом: последний, вероятно, атакует β -лактамное кольцо, что приводит к образованию уже неспособного деацилироваться ацил-фермента (рис. 42.3), и в результате ингибирования фермента оказывается необратимым.

Резистентность к пенициллину некоторых видов бактерий, например многих стафилококков, обусловлена присутствием в них фермента β -лактамазы (пенициллиназы). Этот фермент, имеющий мол. массу около 30 000, инактивирует пенициллин, расщепляя β -лактамное кольцо.

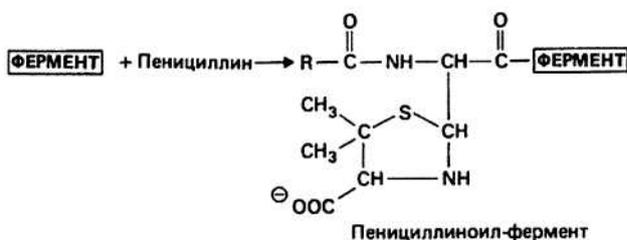


Рис. 42.3.

43. Противоопухолевые антибиотики

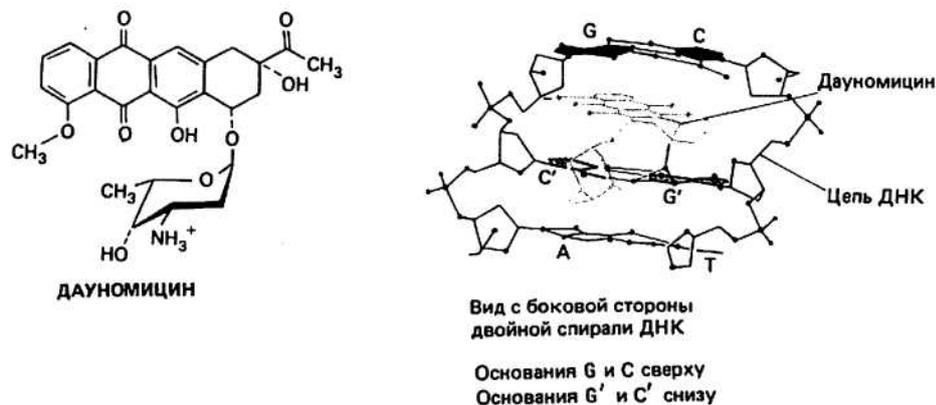


Рис. 43.1. Механизм действия встраивающегося в ДНК противоопухолевого антибиотика.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ АНТИБИОТИКИ - группа веществ, используемых для лечения различных злокачественных заболеваний; многие из этих веществ являются природными и продуцируются различными видами актиномицетов (например, *Streptomyces*). Далеко не все такие вещества токсичны только для опухолевых клеток, однако благодаря тому, что они действуют, как правило, на механизм репликации, быстро делящиеся опухолевые клетки поражаются ими в большей степени, чем нормальные.

Митомицины - антибиотики, продуцируемые стрептомицетами, которые после ферментативной перестройки *in vivo*, по-видимому, алкилируют ДНК таким образом, что в ней образуются сшивки, мешающие репликации. То, что одни опухоли чувствительны к этим антибиотикам, а другие нет, объясняется, возможно, различиями в способности клеток разных опухолей репарировать поврежденную ДНК или нейтрализовать алкилирующие агенты.

Блеомицин — содержащий серу пептид сложной структуры, который, как предполагается, действует на опухолевые клетки, вызывая разрывы в ДНК. Результат действия этого антибиотика на различные опухолевые клетки также зависит от репарирующей активности последних (крайне высокой, между прочим, у нормальных клеток).

Агенты, которые способны встраиваться в ДНК, — третий класс противоопухолевых антибиотиков. Это обычно плоские, содержащие сконденсированные кольца молекулы, которые прочно связываются с ДНК, внедряясь между соседними парами оснований в двойной спирали; тем самым они снижают степень ее спирализации. Встраивание таких молекул в ДНК обычно полностью подавляет репликацию. Таков, например, актиномицин D, часто используемый экспериментаторами для прекращения синтеза ДНК в

изучаемых клетках; он, однако, слишком токсичен для клинического применения.

Дауномицин - еще один из группы антибиотиков, действующих путем встраивания в двухцепочечную ДНК (см. рис. 43.1). Его четыре сконденсированных кольца, образующих почти плоскую структуру, способны поместиться между любыми парами оснований в двойной спирали, а аминсахар располагается в малом желобке спирали и фиксируется там водородными связями, возникающими между ДНК и кольцом, выступающим из основной плоскости конденсированной системы. Такая фиксация в структуре ДНК является, возможно, важным моментом в механизме действия дауномицина, ингибирующего активность как ДНК-, так и РНК-полимеразы. Рич и его коллеги высказали предположение, что когда РНК-полимераза на ДНК оказывается рядом со встроившимся антибиотиком, ее движение прекращается вследствие связывания с аминсахаром, однако точно механизм ингибирующего действия встраивающихся в ДНК агентов не известен. В будущем, возможно, удастся получить новые препараты рассматриваемого типа, способные направленно подавлять размножение вирусов и рост опухолей путем специфического связывания с теми нуклеотидными последовательностями в ДНК и РНК, которые принадлежат вирусу или характерны для трансформированных (т. е. опухолевых) клеток.

ИНТЕРФЕРОНЫ — белки, продуцируемые в организме многих позвоночных (в том числе и человека), обладающие противовирусным и (или) противоопухолевым действием. Интерфероны были открыты в конце пятидесятых годов двадцатого века Айзеком и Лин-денманом, показавшими, что в зараженных вирусом клетках может индуцироваться синтез одного или нескольких типов молекул, которые, будучи добавлены к клеткам, еще не имевшим контакта с вирусом, значи-

тельно снижают эффективность их последующего заражения. Это явление известно как интерференция, откуда и происходит название «интерферон». Интерфероны обладают также множеством других свойств. Значительный интерес вызывает, в частности, способность интерферонов подавлять размножение клеток, поскольку она делает их потенциальными противоопухолевыми агентами. Существуют три типа интерферонов: α , β и γ . То, какой именно интерферон будет синтезироваться зараженными клетками, зависит как от типа самих клеток, так и от типа индуктора, вызвавшего выработку интерферона. Образование

α - и β -интерферонов может быть индуцировано у самых разных клеток некоторыми вирусами и бактериями, а также двухцепочечной РНК, тогда как γ -интерферон вырабатывается лишь у ограниченного круга клеток в ответ на определенные митогены или антигенный материал, к которому клетки были предварительно сенсibilизированы. Механизм действия интерферонов активно исследуется. Уже известно, что они оказывают в клетке влияние на многие ферменты и аппарат синтеза белка, однако до детального понимания механизма вирусной интерференции еще довольно далеко.

44. Некоторые определения и физические законы

Молекулярные массы и коэффициенты седиментации некоторых макромолекул

Таблица 44.1

	Относительная молекулярная масса M_r	$s_{20,w}^0$ (в единицах Сведберга, S)
Рибонуклеаза	12 400	1,64
Тропомиозин	65 000	2,6
G-актин	41 800	3,3
α -Амилаза	52 000	4,5
Миозин	470 000	6,4
Фибриноген	330 000	7,9
Вирус кустистой карликовости томатов	10 700 000	132

¹⁾ Коэффициент седиментации молекул или частиц зависит от температуры, а также от вязкости и плотности растворителя, поэтому удобнее сравнивать между собой коэффициенты седиментации, приведенные к одинаковым условиям (т. е. измеренные в этих условиях или пересчитанные). Обычно s приводят к 20 °С и к вязкости и плотности воды: $s_{20,w}^0$. — Прим. ред.

Коэффициент седиментации s является мерой размеров и формы макромолекулы; его находят, помещая макромолекулы в очень сильное гравитационное поле, создаваемое с помощью центрифуги. Коэффициент седиментации выражают, как правило, в единицах Сведберга S:

$$1S = 10^{-13} \text{ с.}$$

Для определения молекулярных масс таким способом применяют обычно один из двух методов: метод скорости седиментации или метод равновесного центрифугирования. Опишем в общих чертах процедуру нахождения молекулярной массы с помощью метода скорости седиментации. В рамках этого метода измеряют скорость осаждения макромолекулы в том или ином растворе в известных гравитационных условиях. Далее используется соотношение

$$M_r = RTs/D(1 - \nu\rho),$$

где M_r — относительная молекулярная масса,
 R — универсальная газовая постоянная,
 T — абсолютная температура,
 D — коэффициент диффузии,
 $\bar{\nu}$ — парциальный удельный объем макромолекулы,
 ρ — плотность растворителя,
 s — измеренное значение коэффициента седиментации.

Для макромолекул с $s = 7,865S$, $D = 4,75 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, $\bar{\nu} = 0,729 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$ при $\rho = 0,9982 \text{ кг} \cdot \text{дм}^{-3}$, $T = 293 \text{ К}$ и с учетом того, что $R = 8,31 \text{ Дж} \cdot \text{К}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$, получаем

$$M_r = \frac{8,31 \cdot 293 \cdot (7,865 \cdot 10^{-13})}{4,75 \cdot 10^{-11}(1 - 0,729 \cdot 0,9982)} \text{ кг} \cdot \text{моль}^{-1} = 148 \text{ кг} \cdot \text{моль}^{-1} = 148\,000 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1} = 148\,000.$$

Если мы обратимся к табл. 44.1, то увидим, однако, что измеренное значение s не всегда дает правильную молекулярную массу; не следует забывать, что важным фактором, влияющим на величину s , является также *форма молекулы*.

Несколько полезных термодинамических соотношений

Здесь рассмотрены более подробно некоторые представления, введенные в гл. 7.

1 закон термодинамики. Если система (состоящая из каких-то материальных объектов и характеризующаяся определенными давлением, объемом и температурой) изолирована от окружающей среды, то любое изменение (например, химическая реакция), происходящее в этой системе, может привести лишь к перераспределению энергии между различными ее частями, но полная энергия системы останется неизменной независимо от того, какого типа процесс происходит. Это и есть *1-й закон термодинамики, или закон сохранения энергии*. Если же система взаимодействует с окружающей средой, то энергия системы (внутренняя энергия U) изменяется так, что

Для большинства химических реакций совершаемая

$$\Delta U = \Delta q - \Delta w, \quad (1)$$

где $\Delta U \equiv U$ (по окончании процесса) — U (до начала процесса),

Δq — тепло, поглощенное системой из окружающей среды,

Δw — работа, совершенная системой над окружающей средой (например, механическая работа, совершенная мышцами, или химическая работа, совершенная в процессе биосинтеза макромолекул).

работа — это просто та энергия, которую приходится затрачивать на расширение *в условиях противодействия* атмосферного давления (например, в том случае, когда в результате реакции происходит небольшое изменение объема). Если в системе поддерживается постоянное давление (P), равенство (1) можно написать иначе:

$$\Delta H = \Delta U + P\Delta V, \quad (2)$$

где ΔH — изменение *энтальпии* (при постоянном давлении оно совпадает с Δq), ΔU было определено выше,

а PΔV - работа, совершаемая при изменении объема. Таким образом, ΔЯ можно представить как изменение внутренней энергии системы *плюс* некоторая добавка, учитывающая работу, совершенную системой над окружающей средой.

2-й закон термодинамики. 1-й закон ничего не говорит нам о том, в каком направлении должны происходить изменения в реагирующей системе. Например, когда пуля вылетает из ружья и попадает в кусок дерева, происходящие при этом изменения энергии мы можем описывать через

- кинетическую энергию пули,
- энергию, затраченную на преодоление сил трения со стороны воздуха,
- тепловую энергию, выделяемую при торможении пули в дереве.

Если мы теперь передадим всю эту суммарную энергию неподвижной пуле в виде тепла, то, согласно 1-му закону термодинамики, пуля может, например, поглотить эту энергию и очень сильно нагреться либо тепловая энергия может перейти в кинетическую, и пуля приобретет очень большую скорость. Наш опыт говорит нам, что последнее вряд ли случится.

Таким образом, желательно иметь какой-нибудь критерий, который помог бы предсказать *вероятное* направление реакции или процесса. Такой критерий дает нам 2-й закон термодинамики, согласно которому (в одной из многих его формулировок)

- реакция скорее всего будет идти в том направлении, которое сопровождается *увеличением беспорядка* в данной системе.

Мерой этого беспорядка служит величина, называемая энтропией (*S*); соответственно Δ*S* — изменение степени неупорядоченности. Для самопроизвольной реакции обычно Δ*S* > 0. Таким образом (возвращаясь снова к нашему примеру с пулей), полученная пулей тепловая энергия реализуется просто в возрастании неупорядоченности атомов в металле через увеличение амплитуды их и до этого хаотических движений. Для того чтобы пулей можно было выстрелить без ружья, необходимо, чтобы все атомы в ней после получения тепла устремились одновременно в одном и том же направлении — событие чрезвычайно маловероятное, так как оно сопряжено с очень сильным возрастанием упорядоченности системы. Объединив 1-й и 2-й законы, мы можем сформулировать условие, которое звучит примерно так: если для какой-то реакции разность между приростом энтальпии (Δ*H*) и приростом энтропии (в тех же энергетических единицах, т. е. *T*Δ*S*) меньше нуля, т. е. если

$$\Delta H - T\Delta S < 0,$$

то эта реакция будет идти самопроизвольно. То же условие мы можем сформулировать несколько иначе, введя еще одну величину, называемую свободной энергией (*G*), и воспользовавшись равенством

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (3)$$

Тогда, если Δ*G* < 0, реакция будет идти самопроизвольно (*скорость* этого самопроизвольного процесса мы сможем оценить лишь на основе кинетических соображений); условие Δ*G* = 0 означает, что реакция пришла в состояние термодинамического равновесия; если же Δ*G* > 0, то реакция в этом направлении не пойдет.

Стандартное изменение свободной энергии (Δ*G*[°] — это Δ*G* реакции, до начала которой все исходные реагирующие вещества находятся в своих стандартных состояниях, т. е. при стандартных значениях температуры, давления и концентраций; последние одинаковы и равны 1 моль • л⁻¹. Δ*G*[°] и константа равновесия какой-либо реакции связаны между собой следующим образом. Для реакции типа $A \rightleftharpoons B$, константа равновесия которой $K' = [B]/[A]$ (где [A] и [B] — равновесные концентрации соответственно вещества А и В),

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K'. \quad (4)$$

Когда та же система *не* находится в равновесии, величина Δ*G* определяется равенством

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + RT \ln \{[B]/[A]\}. \quad (5)$$

Здесь концентрации веществ А и В уже не являются равновесными. Когда они достигнут своих равновесных значений, Δ*G* станет равным нулю и равенство (5) перейдет в равенство (4).

Стандартная свободная энергия биохимической реакции. Величина Δ*G*[°] любой реакции отвечает таким условиям, когда все реагирующие вещества находятся в своих стандартных состояниях; поэтому, если в реакции участвуют ионы H⁺, то их концентрация также должна быть равной 1 моль • л⁻¹. Следовательно, [H⁺] = 1 = 10⁰, т. е. рН = 0. Такое значение рН никак не может считаться физиологическим, поскольку большинство биохимических реакций протекает при рН = 7 или около того, поэтому удобнее пользоваться модифицированной формой Δ*G*[°], Δ*G*['], для которой все реагирующие вещества, за исключением ионов H⁺, по-прежнему находятся в своих стандартных состояниях, а концентрация последних принимается равной 10⁻⁷ моль • л⁻¹, что соответствует рН = 7. Таким образом,

$$\begin{aligned} \Delta G'^{\circ} &= \Delta G^{\circ} + 2,303 RT \log [H^+] = \\ &= \Delta G^{\circ} - 2,303 RT \text{pH} = \\ &= \Delta G^{\circ} - 2,303 RT \cdot 7. \end{aligned}$$

Литература

Работы, перечисленные в рубрике «Общие вопросы», относятся ко всем разделам, а книги и журнальные статьи, указанные в рубриках «Часть I», «Часть II» и т. д., — к соответствующим главам (они указаны в квадратных скобках).

Общие вопросы

- Alberts B., Bray D.** (1983). *The Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, New York. [Имеется перевод: Албертс Б., Брай Д. и др., Молекулярная биология клетки. — М.: Мир, 1986-1987 гг.]
- Cantor C.R., Schimmel P.R.** (1980). *Biophysical Chemistry - Part I*, W.H. Freeman, San Francisco. [Имеется перевод: Кантор Ч., Шиммель П., Биофизическая химия, т. I. — М.: Мир, 1984.]
- De Robertis E.D.P., De Robertis E.M.** (1980). *Cell and Molecular Biology*, 7th edn., Saunders College Publishing, Philadelphia.
- Dyson R.D.** (1978). *Cell Biology: A Molecular Approach*, 2nd edn., Allyn and Bacon, Boston.
- Freifelder D.** (1983). *Molecular Biology — a comprehensive Introduction to Prokaryotes and Eukaryotes*, Science Books International, Portola Valley, California.
- Metzler D.E.** (1977). *Biochemistry — the Chemical Reactions of Living Cells*, Academic Press, New York. [Имеется перевод: Мецлер Д., Биохимия. - М.: Мир, 1980.]
- Stryer L.** (1981). *Biochemistry*, 2nd edn., W.H. Freeman, San Francisco. [Имеется перевод: Страйер Л., Биохимия. — М.: Мир, 1980.]

Часть I. Клетки и вирусы

- Hopkins C.R.** (1978). *Structure and Function of Cells*, W.B. Saunders, Philadelphia [2, 3].
- Wolfe S.L.** (1982). *Biology of the Cell*, 2nd edn., Wadsworth Publishing, Belmont, California [2, 3].
- Davis B.D., Dulbecco R., Eisen N.N., Ginsberg H.S.** (1980). *Microbiology*, 3rd edn., Harper Medical, Philadelphia [4, 5].
- Pennington T.H., Ritchie D.A.** (1976). *Molecular Virology* (Outline Series in Biology), Chapman and Hall, London [4, 5].

Часть II. Белки

- Dickerson R.E., Geis I.** (1969). *The Structure and Action of Proteins*, Benjamin/Cummings, Menlo Park, California [6—16].
- Schulz G.E., Schirmer R.H.** (1979). *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, New York [6—16].
- Richardson J.S.** (1981). The anatomy and taxonomy of protein structure. In: Anfinsen C.B. et al. (eds.). *Advances in Protein Chemistry*, vol. 34, pp. 167—339 (more advanced) [10].
- Fersht A.** (1977). *Enzyme Structure and Mechanism*, W.H. Freeman, San Francisco [12—14]. [Имеется перевод: Фёршт Э., Структура и механизм действия ферментов. — М.: Мир, 1980.]
- Phillips D.C.** (1966). The three-dimensional structure of an enzyme molecule, *Scientific American*, **215**, No. 5, 78—90 [14].
- Dickerson R.E., Geis I.** (1983). *Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology*, Benjamin/Cummings, Menlo Park, California [15-16].

Perutz M.F. (1978). Hemoglobin structure and respiratory transport, *Scientific American*, **239**, No. 6, 68-86 [15-16].

Часть III. Нуклеиновые кислоты и гены

- Adams R.P.L., Burden R.H., Campbell A.M., Smellie R.M.S.** (eds.) (1976). *Davidson's Biochemistry of the Nucleic Acids*, 8th edn., Chapman and Hall, London [17].
- Freifelder D.** (1978). *The DNA Molecule: Structure and Properties*, W.H. Freeman, San Francisco [17, 18, 26].
- Kornberg A.** (1980). *DNA Replication*, W.H. Freeman, San Francisco [18, 20, 21]. [Имеется перевод: Корнберг А., Синтез ДНК. - М.: Мир, 1977.]
- Rich A., Kim S.H.** (1978). The three-dimensional structure of transfer RNA, *Scientific American*, **238**, No. 1, 52-62 [19].
- Stent G.S., Calendar R.** (1978). *Molecular-Genetics: an Introductory Narrative*, 2nd edn., W.H. Freeman, San Francisco [23, 27—29]. [Имеется перевод: Стент Г., Кэлиндар Р., Молекулярная генетика. — М.: Мир, 1981.]
- Bradbury E.M., Maclean N., Matthews H.R.** (1981). *DNA, Chromatin and Chromosomes*, Blackwell Scientific Publications, Oxford [26, 27].
- Szekely M.** (1980). *From DNA to Proteins - the transfer of genetic information*, Macmillan, London [22-25].

Часть IV. Углеводы и липиды

- Rees D.A.** (1977). *Polysaccharide Shapes* (Outline Series in Biology), Chapman and Hall, London [31].
- Candy D.J.** (1980). *Biological Functions of Carbohydrates*, Blackie, Glasgow [31, 35].
- Finean H.B., Coleman R., Michell R.H.** (1984). *Membranes and their Cellular Function*, 3rd edn., Blackwell Scientific Publications, Oxford [32-34].
- Sim E.** (1982). *Membrane Biochemistry* (Outline Series in Biology), Chapman and Hall, London [32-34].
- Singer S.J., Nicholson G.L.** (1972). The fluid-mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **175**, 720-731 [34].

Часть V. Клетки и молекулы за работой

- Bagshaw C.R.** (1982). *Muscle Contraction* (Outline Series in Biology), Chapman and Hall, London [37]. [Имеется перевод: Бэгшоу К., Мышечное сокращение. - М.: Мир, 1985.]
- Cappucinelli P.** (1980). *Motility of Living Cells* (Outline Series in Biology), Chapman and Hall, London [39]. [Имеется перевод: Каппуччинелли П., Подвижность живых клеток. - М.: Мир, 1982.]
- Capra J.D., Edmundson A.B.** (1977). The antibody combining site, *Scientific American*, **236**, No. 1, 50-59 [40].
- Leder P.** (1982). The genetics of antibody diversity, *Scientific American*, **246**, No. 5, 72-83 [40].
- Cuatrecasas P., Greaves M.F.** (1976 onwards). *Receptors and Recognition* (a series of books covering all aspects of hormone action), Chapman and Hall, London [41].
- Abraham E.P.** (1981). The beta-lactam antibiotics, *Scientific American*, **244**, No. 6, 64-74 [42].

Предметный указатель

- Цифры, стоящие в конце каждой позиции, указывают номера глав, а не страницы
- Автотрофы 2
Аденилатциклаза 41
Аденин (А) 17
Аденовирус 4
Аденозиндифосфат (ADP) см. Аденозинтрифосфат
Аденозинмонофосфат (AMP) см. Аденозинтрифосфат
Аденозинтрифосфат (АТФ) и активация тРНК К 24
--перенос веществ через мембрану 38
---- репликация ДНК 21
---- синтез белка 25
---- в мышцах 37
---- ресничках и жгутиках 39
—свободная энергия гидролиза макроэргических связей 7, 17
—синтез в клетках 2, 3
—структура 17
Адреналин 41
Адсорбция вируса 4, 5
Аксиальная (1С) конформация 31
Аксон кальмара 1, 3, 6, 36
Аксонема 39
Активатор 13
Активированный комплекс 12
Активный центр 12—14 Актин 37, 39 ос-Актинин 39 Актиномицин D 29, 43 Актиниозин 37 Аланин (Ala) 6
Аллостерические эффекты 13, 25 Амеба 1, 2, 39 Амидная плоскость 8 ос-Амилоза 31 Амилопектин 31 Аминоацил-тРНК 23—25 Аминоацил-тРНК—синтетазы 23
Аминокислотная последовательность 6
Аминокислотный остаток 6
Ампициллин 30
Амплификация в гормональной регуляции 41
—при клонировании гена 30
Анафаза 29
Анизотропные полосы (А-полосы, А-диски) 37
Антибиотики 29, 30, 35, 42, 43
Антигены 40 Антикодон 19, 23-25
Антитела см. Иммуноглобулины
Аргинин (Arg) 6 Аспарагин (Asn) 6
Аспарагиновая кислота (Asp) 6
Атомы 1, 7
Аттенуирование мРНК 28
N-ацетил глюкозам и н (NAG) 14, 31, 35
N-ацетил мурамовая кислота (NAM) 14, 35
Ацетилхолин 36
Ацилглицеролы 32, 33
Базальное тельце 39 Бактерии, антибиотики 42, 43
—гены 2, 26-30
—грамотрицательные 35
—грамположительные 2, 35
—инфицирование вирусами 4, 5
—клеточная стенка 2, 14, 29, 35, 42
—репликация 20, 21, 29
—рестрицирующие ферменты 18, 30
—структура 1, 2
—транскрипция 22
—трансляция 23—25
Бактериородопсин 2, 34
Бактериофаг Pfl 4
-T2 4, 18, 27
—T4 14, 26, 27
-T5 27
-T6 27
Бактерия *Bacillus subtilis* 35
—*E. coli*, клеточная стенка 35
----- организация генов 27
----- рестриктазы 18
----- репликация 20, 21
----- структура 2
----- транскрипция 22
----- трансляция 23—25
----- упаковка ДНК 26
—*Micrococcus lysodeikticus* 35
—*Staphylococcus aureus* 35
—пневмококк 1, 18
Белка синтез 2-5, 23-25, 28, 29, 41
Белки 6-16, 34, 37, 40, 41
—в качестве гормонов 41
----- ммуноглобулинов 40
----- ферментов 14
--- роли переносчиков 15
—глобулярные 10
—интегральные 34
—мембранные 34
—мышц 37
—периферические 34, 36
—фибрилярные 6, 9, 11, 36
—шелочные 26, 36
G-белок 41
гер-Белок см. Белок, расплетающий двойную спираль
r-Белок 22
Белок, дестабилизирующий двойную спираль 21
—расплетающий двойную спираль 21
—стабилизирующий молекулу ДНК 21, 26
Биосинтез 2, 3 Блеомицин 43 Боковая группа (цепь) 6
Бора эффект 15 Броуновской движение 38 «Бусы» из ДНК 26
Вакуоль 3, 38 Валин (Val) 6
Вандерваальсов радиус 7
Вандерваальсовы взаимодействия 7
--- в белках 8-10, 40
----- нуклеиновых кислотах 18, 19
Вектор (при клонировании) 30
Видообразование 16 Виллин 39
Вирус 4 -G4 23
—SV40 26, 27
-фX174 4, 20, 27
—без оболочки («раздетый») 4, 5
—герпеса 4
—гриппа 5
—карликовости риса 5
—колорадской клещевой лихорадки 5
—оспы 1, 4
—с оболочкой 4, 5
—табачной мозаики (ВТМ) 5
Вирусы ДНК-содержащие 1, 4
—организация генов 23, 27
—отпочковывание 4, 5
—прокариотических клеток 1, 4, 5
—размножение 4, 5
—репликация 4, 5, 20
—РНК-содержащие 1, 5
—упаковка генов 4, 5, 26
—эукариотических клеток 1, 4, 5
Витамины 32, 33, 40
Вода, диффузия 38
—структура 7
Водородные связи 7
---- антикодон—кодон 19, 23
-- в белках 9-11, 15, 34, 40
----- нуклеиновых кислотах 18, 19
----- полисахаридах 31
----- репликации ДНК 20, 21
----- транскрипции ДНК 22
Водоросли 1, 2 Волокна в жгутиках 2, 39
---- ресничках 2, 39
-ДНК 1, 18, 26
—коллагена 1, 11
—микрофиламенты 36, 37, 39
—мышечные 36, 37
—полисахаридов 31
—шелка 11
Вторичная структура белков 9 -- ДНК 18 Второй посредник 41
Вырожденность кода 23
p-Галактоз ид аза 28
Галактозидпермеаза 28
Галактоцереброзиды 33

- Ганглиозиды 33
 Гексозы 2, 31, 32
 Гексон 4
 Гель-электрофорез 18, 19
 Гем 15, 16 Гемагглютинин 5
 Гемоглобин 10, 15, 16, 23
 —плода 15
 Генная инженерия 30
 Ген-регулятор 28
 Гены вирусов 1, 4, 5, 27
 —у прокариот 1, 3, 27
 -- эукариот 1, 2, 27
 —кластеры 26
 —клеточный цикл 29
 —клонирование 30
 —независимые 27
 —перекрывающиеся 23, 27
 —повторяющиеся 27
 —регуляция экспрессии 28
 Гетерогенная ядерная РНК (гяРНК) 22
 Гетеротрофы 2
 Гиалуроновая кислота 31
 Гидроксипролин (Нур) 11
 Гидрофильные липиды 32-34
 —полисахариды 31
 Гидрофобные липиды 32-34
 —мембраны 34, 38
 —основания 17, 23
 Гидрофобная боковая группа (цепь) 6
 Гидрофобный эффект 7, 10, 18, 19, 40
 Гиперварибельные участки 40
 Гиразы 21
 Гистидин (His) 6
 Гистоны 16, 26
 Гликоген 31, 41
 Гликозидная связь 14, 31, 35
 Гликозилирование 3, 34, 40
 Гликолипиды 33, 34
 Гликопротеины 3, 34
 Гликофорин 34
 Глицерол 32—34, 38
 Глицин (Gly) 6
 Глобины 10, 15, 16
 Глутамин (Gln) 6
 Плутаминовая кислота (Glu) 6
 Глюкоза 2, 31, 38
 Глюкозиды 31
 Глюкоцереброзиды 33
 D-глюкуроновая кислота 31
Гольджи аппарат (комплекс) 3
 Гомополимерных концов метод 30
 Гормоны 5, 28-30, 32, 33, 37, 38, 41
 Грибы 1, 3
 Гуанин (G) 17
 Гуанозинтрифосфат (GTP) 17, 25

 Дауномицин 43
 Движение клеточное 2, 3, 37, 39
 Двойная спираль *см.* ДНК
 Двойные обратные координаты 13

 Дезоксигемоглобин 15, 16
 β-D-2-дезоксирибоза 17
 Дезоксирибонуклеиновая кислота *см.* ДНК
 Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты 17, 18, 21, 22
 Дезоксирибонуклеотиды 17
 Дендриты 36
 Десмосома 3
 Диаминомасляная (Dab) кислота 35
 Диаминопимелиновая (Dpm) кислота 35
 Дигидроурidin (D) 19
 2'3'-дидезоксинуклеотид 18
 Диктиосома 3
 Динеин 39
 Дисульфидный мостик 6, 10, 40
 Дифосфоглицерат (ДФГ) 15
 Дифракция на волокнах 1, 18
 Диффузия 34, 38
 —ионная 38
 —нейтральная 38
 —облегченная 38
 ДНК; A-, B-, Z-формы 18
 —двойная спираль 18
 —желобки 18
 —интеркаляция 29, 43
 —комплементарная РНК-матрице (кДНК) 19, 30
 —лигирование (сшивание) 21, 30
 —линкерная 26
 —организация генов 27
 —первичная структура 1, 17
 —полиморфизм 18
 --пространственная структура 18, 26
 —расплетание двойной спирали 21
 —репликация 4, 5, 20, 21, 29, 30
 —сателлитная 27
 —сверхспиральность 26
 —секвенирование 18
 —спейсерная 27
 —сфероидальная намотка 26
 —транскрипция 19, 22, 28, 30
 —упаковка 1—4, 26
 —«ядерная» 26
 ДНК-зависимая РНК-полимераза 22
 ДНК-копия *см.* ДНК, комплементарная РНК-матрице
 ДНК-лигаза 21
 ДНК-полимераза 4, 5, 18, 20, 21, 29, 30
 Домены 10
 —варибельные (V-домены) 40
 —иммуноглобулинов 40
 —константные (C-домены) 40
 Дочерние клетки 20, 29
 Дрозофила 20, 27

 Единица репликации (репликон) 20
 Естественный отбор 16

 Жгутик 2, 39
 Жидкокристаллическое состояние 34
 Жидкомозаичная модель 34
 Желатинозный слой (гликокаликс) 2
 Жирные кислоты 32, 33
 Жиры *см.* Триацилглицеролы

 Замена аминокислотных остатков 16
 «Замка и ключа» модель 12
 Замораживания—скальвания метод 34, 35
 Зимоген 13
 H-зона 37

 β-Изгиб 9
 Изоглутаминовая кислота 35
 Изолейцин (Ile) 6
 Изотропные полосы (1-полосы, 1-диски) 37
 Икосаэдр 1, 4, 5
 Иммунитет 40
 Иммуноглобулины (Ig, антитела) 10, 40
 Иммуноглобулин G (IgG), γ-глобулин 40
 Ингибирование по типу отрицательной обратной связи 13
 Ингибиторы в качестве антибиотиков 42, 43
 —деления клетки 29
 —лизосома 14
 —ферментов 12, 13
 Индуктор, индукция 28
 Индуцированного соответствия гипотеза 12
 Инициации фактор 25
 Инициация репликации ДНК 20, 21, 29
 —синтеза белка 23—25, 28
 —транскрипции ДНК 22, 28
 Инозин (1) 23
 Инсулин 28, 30, 41
 Интеркаляция 29, 43
 Интерфаза 26, 29, 39
 Интерфероны 43
 Интрон 22, 27, 30, 40
 Инфицирование вирусами 4, 5, 18
 Информационная РНК (матричная, мРНК) 4, 5, 19, 22-25, 27, 28, 39
 Иодно-крахмальный тест 31
 Ионная связь 7
 Ионы водорода (H⁺) 2, 3, 6, 14
 —калия (K⁺) 36, 38
 —натрия (Na⁺) 36, 38

 Капсид вируса 4, 5, 26
 Капсомер 4
 Каппа-цепи (κ-цепи) 40
 Карбоний-ион 14
 Катаболическая репрессия 28
 Катализ 12, 13
 Катащегося кольца механизм 20
 «Качания» гипотеза 23
 Кератансульфаты 31
 Кератин 9, 11
 Кислород в гемоглобине 15, 16
 Клетка прокариотическая 1, 2
 —эукариотическая 1, 3
 Клетка-мишень 41
 β-Клетки 28, 30
 Клеточная мембрана у бактерий 1, 2, 4, 5, 26, 29, 32, 34, 35, 38, 39
 -- водорослей 1, 2, 38, 39
 --- животных 1, 3—5, 29, 32, 34, 36-39, 41
 --- растений 1, 3-5, 29, 32, 34, 38, 39
 -стенка у бактерий 2, 4, 5, 14, 29, 35, 42

----- водорослей 2
----- растений 3, 29, 31
Клеточный цикл 3, 29
---G_{1r}, G_{1s}, S-, G₂-, M-фазы цикла 29
Клонирование генов 30
Коактиватор 28
Ковалентная модификация 13
Ковалентные связи 7
---в белках 6
----- липидах 32, 33
----- нуклеиновых кислотах 17
----- полисахаридах 31
Код генетический 23, 27
Кодон 19, 23-25
Кодоны-синонимы 23
Коллаген 1, 8, 9, 11
Комплементарная система 40
Комплементарность в ДНК 18, 20, 21
Конфигурация аминокислот в белках 6, 8
- определение 8
Конформация белков 8-11
-ДНК 18
- липидов 32, 33
- определение 8
- пептидной группы 8
- полисахаридов 31
- РНК 19
Конъюгация 27
Кооперативность 13, 15
Корепрессор 28
Корректорской правки механизм в активации тРНК 24
----- при репликации ДНК 21
Кор-фермент 22
Костная ткань 11
Коэффициент седиментации 1-3, 19, 22, 24, 25, 27, 44
Красители 42
Крахмал 31
Кребса цикл 2
Кристаллическая фаза 34
Кристы 3
Ксиланы (поликсилоза) 31
Кэп-структура 22, 28

Лайнуивера—*Бэрка* график 13
β-Лактамаза (пенициллиназа) 42
β-Лактамное кольцо 42
Лактоза 28
Лактозный оперон (лас-оперон) 27, 28
Ламелла 2
Лауриновая кислота 32
Легкая цепь (L-цепь) 40
Лейцин (Leu) 6
Лигирование (сшивание) ДНК 21, 30
Лизин (Lys) 6
Лизис 4, 5, 35
Лизосомы 3, 34, 38
Лизоцим вирусный 4, 5
- из белка куриного яйца 10, 14, 35
M-линия 37
Z-линия 37
Линкерная ДНК 26
Линолевая кислота 32

Линоленовая кислота 32
Липидные глобулы 2
Липиды 1-5, 32-34, 36, 38
—граничные 34
—амфипатические 32—34
Липотейхоевые кислоты 35
Лямбда-цепи (A,-цепи) 40

Матрикс 31, 35
Межгенная ДНК 27
Мезосома 2
Мейоз 3
Мембрана *см.* Клеточная мембрана и ядерная оболочка
Мембранный бислой 2, 3, 34, 36, 38
—потенциал 36, 38
Метафаза 29
Метгониин (Met) 6
Миелин 36
Микротрубочки 3, 29, 39
Микрофибриллы *см.* Волокна
Микрофиламенты 3, 36, 37, 39
Минорные основания 19, 22
Миоглобин 15, 16
Миозин 37, 39
Миофибрилла 37
Миристиновая кислота 32
Миссенс-мутация 23
Митоз 3, 29, 39
Митохонцины 43
Митохондрия 1, 3, 23, 25, 34
Михазлиса константа (*K_m*) 13
Михазлиса—*Ментен* модель 13
Мицеллы 32
Млекопитающие 1, 3, 36, 37, 39, 41
Моносахариды 17, 31
Мукопептиды 2
Мутация 16, 23
—молчащая 23
—со сдвигом рамки 23
—точковая 55
Мышечное волокно (мион) 36, 37
Мышечные нити (микрофиламенты) 37
Мышцы 11, 36, 37, 39

Напряжение в молекуле субстрата 12
Насыщенные жиры 32—34
Натрий-калиевая АТРаза 36, 38
Нейраминидаза 5
β-Нейраминовая кислота 33
Нейромедиатор ацетилхолин 36
—глутамат 36
Нейрон 36
Нейротрубочки 36
Нейрофиламенты 36
Нековалентный тип связывания 7
Нексин 39
Ненасыщенные жиры 32—34
Неорганический фосфат (P_i) *см.* Аденозинтрифосфат
Нервы 1, 36, 37
—афферентные 36
—эфферентные 36
Новобиоцин 42

Нонсенс-кодоны 23
Нуклеиновые кислоты *см.* ДНК, РНК
Нуклеосома 26
Нуклеоплазма 22

S-Образная кривая 13, 15
Обратная транскриптаза (ревертаза) 19, 30
Обрыва цепи метод 18
Одноклеточный 1-3
Оказаки фрагменты 21
Оксигемоглобин 15, 16
Оленовая кислота 32
Олигодендроглии клетки (олигодендроглиоциты) 36
Оперон 27, 28
лас-Оперон 27, 28
Опухолевые клетки 5, 43
Организация генов в ДНК 27
Основания *см.* Нуклеиновые кислоты
Основная цепь в белках 6
--нуклеиновых кислотах 17

Палиндром 18, 22, 28
Пальмитиновая кислота 32
Пенициллин 30, 35, 42
Пентозы 17
Пентон 4
Пептидилтрансфераза 25
Пептидные шивки в белках 6, 8, 25
--клеточных стенках бактерий 35, 42
Пептидогликаны 35
Первичная структура белков 1, 6
---нуклеиновых кислот 1, 17
Первичный транскрипт 22
Переходное состояние 12
Периплазматическое пространство 2
Периферическая нервная система (ПНС) 36
Петли тРНК 19
Θ-петля 20
Пиноцитоз 38
Пиримидины 17, 23
Пища 32
Плазмиды 2, 27, 30
- pBR322 30
Плазмодесма 3
Плотный контакт 3
Плюс-минус-метод 18
Подвижность белков 10
—в мембранах 34
Подвижных рецепторов гипотеза 41
Поксвирусы 4
Полиамины 26
Поликсилоза *см.* Ксиланы
Полинуклеотидкиназа 18
Полипептидная цепь 6, 8—11, 24, 25
Полисома (полирибосома) 2, 24
Половые гормоны 33
Поперечнополосатые мышцы 37
Порфирины 15
Последовательная модель, объяснение кооперативных эффектов 13

- Потенциал действия 36
 Праймаза 21
 Предсказуемость структуры белка 9, 10
Прибнова последовательность (или блок *Прибнова*) 22
 Прогестерон 41
 Проинсулин 28, 30
 Прокариот вирусы 1, 4, 5
 —клетки 1, 2
 Пролин (Pro) 6
 Промотор 22, 28
 Проникновение вирусной ДНК в клетку 4, 5
 Простейшие 39
 Пространственная (трехмерная) структура аксонемы 39
 -структура белков 8—11
 -- вирусов 4, 5
 --- гемоглобина 10, 15
 -- ДНК 18
 --- иммуноглобулинов 10, 40
 --- клеточной стенки 35
 --- лизоцима 10, 14
 --- мембранных белков 34
 --- мышц 37
 --- нервов 36
 --- полисахаридов 31
 --- рибосомы 2, 3, 24
 -- РНК 19
 --- стабильность 7, 10, 18
 Протеинкиназа 41
 Протеолипид 36
 Противовирусные препараты 43
 Протон 1—3, 14
 Протофиламенты 39
 Про-тРНК 22
 Профаза 29
 Процессинг посттранскрипционный 22, 28
 Псевдоподии 39
 Псевдоуридин (Ψ) 19
 Пурины (Pu) 17, 23
- Радиоавтография 18—20
 Разжижения—сокращения модель 39
 Разнообразие антител 40
 Рамка считывания 23, 27
Ранвье перехваты 36
 Ревертаза *см.* Обратная транскриптаза
 Регуляция активности фермента 13
 —посттрансляционная 28
 —путем снижения чувствительности 41
 — экспрессии генов 28
 Ренатурация белков 10
 Рентгеновская кристаллография 1
 -- белков 10—15
 --- вирусов 4, 5
 --- гемоглобина 10, 15, 16
 -- ДНК 18
 --- иммуноглобулинов 10, 40
 -- лизоцима 10, 14
 -- тРНК 19
 Рентгеноструктурный анализ 1, 4, 5, 10-16, 18, 19, 40
- Реовирусы 5
 Репликативная вилка 20, 21
 Репликация ДНК 4, 5, 20, 21, 29, 30
 --- по полуконсервативному механизму 4, 5, 20, 21, 29
 Репликон *см.* Единица репликации
 Репрессор 28
 Реснички 3, 39
 Рестриктаза *EcoRI* 18
 Рестрицирующие ферменты (рестриктазы) 18, 30
 Ретровирусы 5
 Рефлекс 36
 Рецептор 36, 41
 Рибитол 35
 Р-Д-рибоза 17
 Рибонуклеазы 22
 Рибонуклеиновая кислота *см.* РНК
 Рибонуклеозид 17
 Рибонуклеотид 17
 Рибосома 1-5, 23-25
 Рибосомная РНК (рРНК) 2, 3, 19, 22, 24, 27
 Рифамицин 42
 РНК, вторичная структура 19
 —гетерогенная ядерная (гЯРНК) 22
 —информационная (матричная, мРНК) 4, 5, 19, 22-25, 27, 28, 30
 —первичная структура 17
 —пространственная структура 19
 —рибосомная (рРНК) 2, 3, 19, 22, 24, 27
 —секвенирование 19
 —синтез 4, 5, 22
 —транспортная (тРНК) 19, 22-25, 27
 —упаковка 5
 —А-форма 19
 РНК-зависимая ДНК-полимераза *см.* Обратная транскриптаза
 РНК-затравка (праймер) для синтеза ДНК 21, 30
 РНК-полимераза 4, 5, 21, 22, 28
- Сарколема 37
 Саркомер 37
 Саркоплазма 37
 Сахара *см.* Моносахариды и глюкоза
 Сборка вирусной частицы 4, 5
 Сведберг (S), единица измерения *см.* Коэффициент седиментации
 Сверхспираль ДНК 21, 26
 —коллагена 11
 Световой микроскоп 1
 Свободная энергия (G) 7, 12, 44
 Сдвиг рамки 23
 Секвенирование ДНК 18, 40
 -РНК 19
 Серии (Ser) 6
 Сериновые протеиназы 13
 Серповидноклеточная анемия 16, 23
 Симметричная модель, объяснение кооперативных эффектов 13, 15
 Симметрия, модель кооперативности 13
 —у вирусов 4, 5
- Синапс 36
 Синтез белков 24, 25
 -ДНК 4, 5, 20, 21, 29, 30
 —РНК 4, 5, 22
 Скользящих нитей модель 37, 39
 Скорость деления клеток 29
 —диффузии 34, 36, 38
 —распространения нервного импульса 36
 —ферментативной реакции 12
 β -Слой (β -структура) 8-11
 —в глобулярных белках 10, 40
 полисахаридах 31
 --- фибриллярных белках 11
 —углы ϕ (фи) и Ψ (пси) 8, 9
 Созревание 21, 22
 Сокращенное обозначение аминокислот 6
 --- оснований 17
 Солевой мостик 7, 10, 12, 15, 40
 R-состояние 13, 15
 T-состояние 13, 15
 Спаривание оснований 18—20
 Спейсер 22
 Спейсерная ДНК 27
 -РНК 22
 Специфичность транспорта вещества через мембрану 38
 —ферментов 12, 13
 Сплайсинг гЯРНК 22
 —экзонов 22
 Спинной мозг 36
 Спирализация в белках 8, 9, 11
 -- ДНК 18
 -- РНК 19
 --- полисахаридах 31
 α -Спираль 8—11
 —в глобулярных белках 10, 15
 --- мембранных белках 34
 --- фибриллярных белках 11
 —структура 9
 —углы ϕ (фи) и Ψ (пси) 8, 9
 Стеариновая кислота 32
 Стебли тРНК 19
 Стереонизомерия 6
 Стероиды 32, 33, 41
 Стрептомицин 42
 β -Структура *см.* β -Слой
 Стэкинг-взаимодействие 18, 40
 Субстрат 12—14
 Сухожилия 11
 Сфероидальная намотка ДНК (РНК) 26
 Сфингозины 32—34
 Сфингомиелины 33, 34, 36
- Таксономия 16
 Тейхоевые кислоты 35
 Текучесть в мембранах 34
 Телопептиды 11
 Телофаза 29
 Температура плавления 34
 Тепловое движение 7
 Терминатор синтеза белка 23
 —транскрипции ДНК 22, 28

- Терминации фактор 25
 Терпены 33
 Тестостерон 33
 Тетрапептиды 35, 42
 Тетрациклин 42
 Тиазолидиновое кольцо 42
 Тилакоиды 3
 Тимин (Т) 17
 Тиогалактозидацетилтрансфераза 28
 Тирозин (Туг) 6
 Толстая нить 37
 Тонкая нить 37
 Тонофиламенты 3
 Топоизомеразы 21
 Точность активации тРНК 24
 - репликации ДНК 20, 21
 Трансацетилаза (гликопептид—транспептидаза) 42
 Транс-конформация в белках 8
 --- липидах 32-34
 Транскрипционная единица (транскрипционный блок, транскриптон) 22, 27
 Транскрипция ДНК 19, 22, 27, 28, 30
 Транслокация 25
 Трансляция 4, 5, 19, 23-25, 28
 Транспептидация 35, 42
 Транспозоны 27
 Транспорт активный 38
 - вещества гидрофильный 38
 - гидрофобный 38
 - воды 38
 - ионов 36, 38
 Транспортная РНК (тРНК) 19, 22-25, 27
 --- активация 24, 25
 -- «клеверный лист» (структурное представление) 19
 Треонин (Thr) 6
 Третичная структура белков 10, 34
 -- ДНК 18
 -- РНК 19
 Триацилглицерол (жиры) 32
 Триптофан (Тгр) 6
 Триптофановый оперон (*trp*-оперон) 28
 Тропоколлаген 11
 Тропомнозин 11, 36
 Тропонин 37
 Тубулин 3, 39
Тэя-Сакса болезнь 33
 Тяжелая цепь (H-цепь) 40
- Углеводороды 6, 32—34, 38
 Углеводы *см.* Полисахариды
 Ультрацентрифуга *см.* Центрифуга
 Уотсон-криковское спаривание *см.* Спаривание оснований Упаковка генов ДНК 1-4, 26
 -РНК 5
 Урацил (U) 17
 β-Участок *см.* β-Слой
- Участок А рибосомы (сайт А) 24, 25
 —Р рибосомы (сайт Р) 24, 25
 J-участок 40
- Фаг *см.* Бактериофаг
 Фагоцитоз 38
 S-фаза 29
 Фенилаланин (Phe) 6
 Ферменты 12—14
 —в синтезе белка 24, 25
 ----- ДНК 20, 21
 ----- РНК 22
 -генетически обусловленная регуляция активности 28
 —используемые вирусами 4, 5
 —лизосом 14
 —регуляция 13
 Фибринопептиды 16
Фика закон 38
 Филамин 39
 Филогенетический 16
 Флаводоксин 10
 Флагеллин 2
 Флуоресцентной метки метод 34
 А-форма РНК 19
 Формилвалин (fVal) 23, 25
 Формилметионин (fMet) 23, 25
 Фосфатидилсерина 32, 34
 Фосфатидилхолина 34, 36
 Фосфатидилэтаноламина 32, 34
 Фосфоглицериды 32, 33
 Фосфодизэфирный мостик 17, 21-23
 Фосфолипиды 32—34
 Фосфорилсерин 32
 Фосфорилхолин 32
 Фосфорилэтаноламин 32
 Фосфосфинголипиды 33
 Фотосинтез 2, 3
 Fab-фрагмент 40
 Fc-фрагмент 40
 Фруктаны 31
- Химического расщепления метод 18, 19
 Хитин 31
 Хлорамфеникол (левомицетин) 42
 Хлоропласт 1, 3, 25, 34
 Холестерол 33, 34
 Холин 32, 34
 Холофермент 22
 Хондроитинсульфаты 31
 Хроматиды 26
 Хроматин 3, 26
 Хромосома 1-3, 18, 26, 27, 29, 30
 Хромосомные структурные белки 26
 Хряц 11
- Целлюлоза 2, 3, 31
 Центральная нервная система (ЦНС) 36
 Центриоль 3, 29
- Центрифуга 1, 19, 30, 44
 Центромера 3, 26
 Церамиды 33
 Цереброзиды 33 Цефалоспорины 42
 Циклический АМР (сАМР) 28, 41
 -GMP (сGMP) 41
 Циc-конформация в белках 8
 -- липидах 32, 34
 Цистеин (Cys) 6
 Цистерна 3
 Цистин 6
 Цистрон 27
 Цитозин (C) 17
 Цитоплазма 1-5, 28, 32, 36, 38, 39, 41
 «Цитоплазматический ток» 39
 Цитоскелет 3, 39
 Цитохром с 16, 34
- Четвертичная структура 10, 15
- Шванновские* клетки 36
 Шелк 11
 «Шлейф» из poly(A) 22, 28, 30
- Эволюция 16, 23
 Эндонуклеаза 30
 Эндоплазматический ретикулум 3, 34
 Эндоситоз 2, 38
 Энергия *см.* Свободная энергия
 —в клетке 2, 3, 38
 Экваториальная (C1) конформация 31
 Экзон 22, 27, 40
 Экзонуклеазы 21
 Экзоцитоз 2
 Электрический (нервный) импульс 36
 Электронная микроскопия 1, 24, 34, 35, 37
 Электростатические эффекты 7
 Электрохимический градиент 38
 Элонгации фактор 25 Элонгация 22
 Энтальпия (Я) 7, 44
 —перехода молекулы белка из развернутого состояния в свернутое 7, 10
 Энтропия (S) 7, 44
 —перехода молекулы белка из развернутого состояния в свернутое 7, 10
 Эпитоп 40
 Эритроцит 33
 Эстроген 33
 Эукариот вирусы 1, 4, 5
 —клетки 1, 3
 Эффекторное окончание 36
 Эффекторы 41
- Ядерная оболочка 1, 3, 29, 34, 41
 Ядерные поры 3
 Ядро атома 1
 —клетки 1-3, 28, 29, 34, 36, 41
 Ядрышко 3

Оглавление

От редакторов перевода	5
Предисловие.....	6
Предисловие авторов.....	7

Часть I. Клетки и вирусы

1. Масштабы объектов молекулярной биологии. (Перевод Ю. А. Банникова)	10
2. Прокариотическая клетка. (Перевод В. А. Розенבלата)	13
3. Эукариотическая клетка. (Перевод Т. Н. Власик)	16
4. ДНК-содержащие вирусы. (Перевод В. А. Розенבלата)	19
5. РНК-содержащие вирусы. (Перевод В. А. Розенבלата)	22

Часть II. Белки

6. Первичная структура белков. (Перевод Т. Н. Власик)	25
7. Энергия и силы. (Перевод Ю. А. Банникова) ..	28
8. Конформация пептидов. (Перевод Т. Н. Власик)	31
9. Вторичная структура белков. (Перевод Т. Н. Власик)	33
10. Структура глобулярных белков. (Перевод Т. Н. Власик)	36
11. Структура фибриллярных белков. (Перевод Т. Н. Власик)	39
12. Принципы действия ферментов. (Перевод Т. Н. Власик)	42
13. Регуляция ферментативной активности. (Перевод Т. Н. Власик)	45
14. Белки в роли ферментов: лизоцим. (Перевод Т. Н. Власик)	48
15. Белки в роли переносчиков: глобины. (Перевод Т. Н. Власик)	51
16. Эволюция белков. (Перевод Т. Н. Власик)	54

Часть III. Нуклеиновые кислоты и гены

17. Первичная структура нуклеиновых кислот. (Перевод Ю. С. Лазуркина)	57
18. Структура ДНК. (Перевод Ю. С. Лазуркина) ..	60
19. Структура РНК. (Перевод Ю. С. Лазуркина) ..	63
20. Основы репликации. (Перевод Ю. С. Лазуркина)	66
21. Репликация у прокариот. (Перевод Ю. С. Лазуркина)	68

22. Транскрипция ДНК. (Перевод Ю. С. Лазуркина)	70
23. Генетический код. (Перевод Ю. С. Лазуркина) ..	73
24. Трансляционный аппарат клетки. (Перевод Ю. А. Банникова)	76
25. Трансляция генетического кода. (Перевод Ю. А. Банникова)	79
26. Упаковка генетического материала. (Перевод Ю. А. Банникова)	82
27. Организация генов. (Перевод Ю. А. Банникова) ..	85
28. Регуляция экспрессии генов. (Перевод Ю. А. Банникова)	88
29. Клеточный цикл. (Перевод А. А. Полежаева) ..	91
30. Генная инженерия: клонирование генов. (Перевод Ю. А. Банникова)	94

Часть IV. Углеводы и липиды

31. Структура полисахаридов. (Перевод А. А. Полежаева)	97
32. Липиды: 1. (Перевод А. А. Полежаева)	100
33. Липиды: 2. (Перевод А. А. Полежаева)	103
34. Биологические мембраны. (Перевод А. А. Полежаева)	106
35. Клеточная стенка бактерий. (Перевод А. А. Полежаева)	109

Часть V. Клетки и молекулы за работой

36. Нервы в действии. (Перевод В. А. Розенבלата) ..	112
37. Мышцы и их сокращение. (Перевод В. А. Розенבלата)	115
38. Перенос веществ через мембраны. (Перевод А. А. Полежаева)	118
39. Движение в немышечных клетках. (Перевод В. А. Розенבלата)	121
40. Антитела и их функции. (Перевод Т. Н. Власик)	124
41. Действие некоторых гормонов позвоночных. (Перевод В. А. Розенבלата)	127
42. Как работают антибиотики. (Перевод В. А. Розенבלата)	130
43. Противоопухолевые антибиотики. (Перевод В. А. Розенבלата)	132
44. Некоторые определения и физические законы. (Перевод Ю. А. Банникова)	134

Литература	136
------------------	-----

Предметный указатель	137
----------------------------	-----