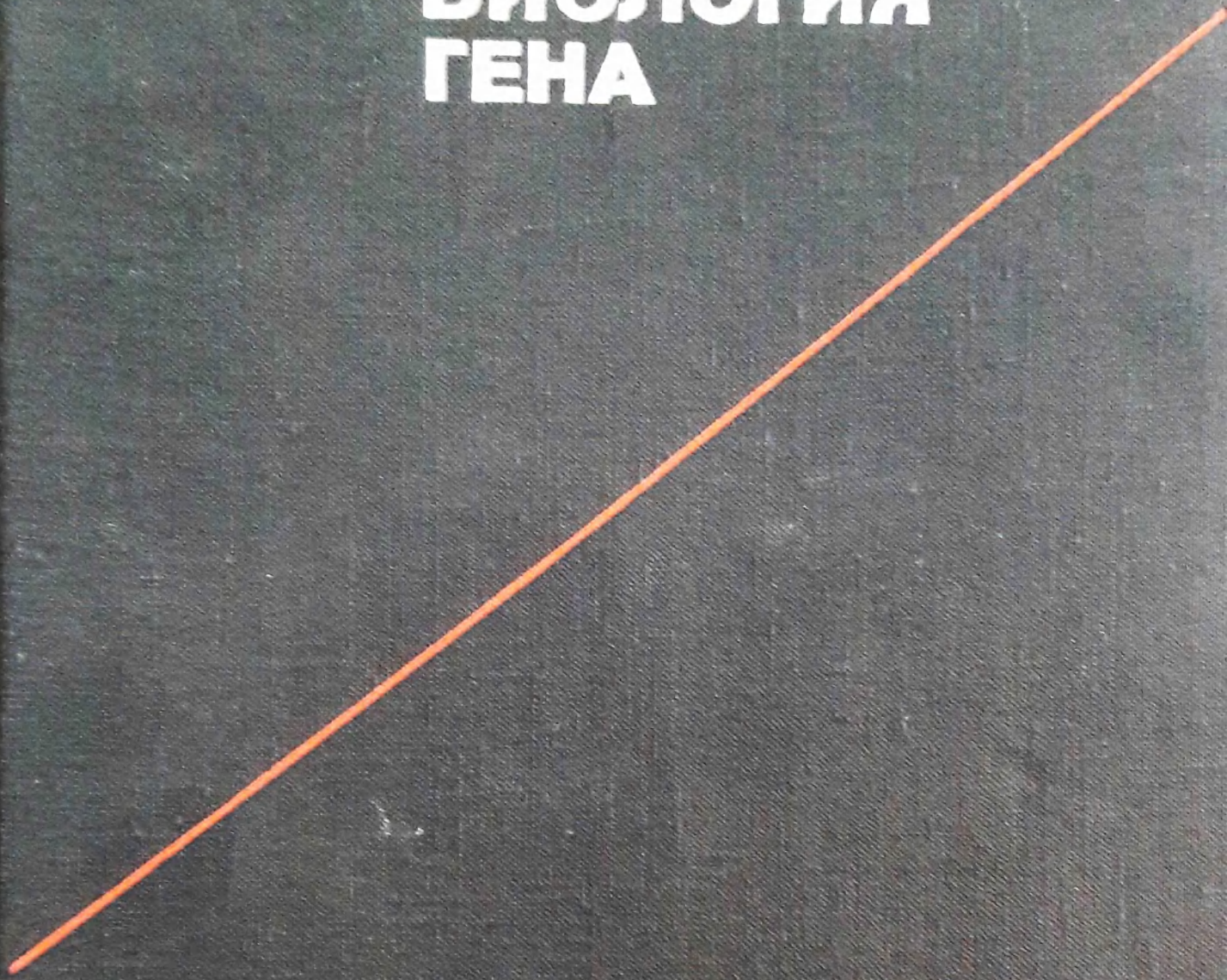
Дж. Уотсон

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ГЕНА



Дж. Уотсон

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ГЕНА

Перевод
с английского
под редакцией
академика
В. А. Энгельгардта

Издательство · Мир · Москва 1978

УДК 577+577.1
У-65

Книга, принадлежащая перу лауреата Нобелевской премии Дж. Уотсона, занимает особое место в литературе по молекулярной биологии. Она является превосходным руководством в этой новой, бурно развивающейся области биологии и суммирует самые современные данные. Рассмотрены принципы хромосомной теории наследственности, взаимодействие биологически активных молекул, структура и механизмы функционирования нуклеиновых кислот, их роль в биосинтезе белка, структура и функция мембран, роль различных регуляторов обмена веществ, вирусная теория рака, вопросы и задачи генетической инженерии. Книга написана исключительно четко, логично и читается с большим интересом.

Настоящее издание является переводом третьего, переработанного и дополненного американского издания. Перевод первого издания был выпущен издательством «Мир» в 1967 г.

Предназначена для биологов разных специальностей (молекулярных биологов, биохимиков, биофизиков, генетиков, цитологов, вирусологов, микробиологов), а также для студентов и преподавателей соответствующих специальностей.

Редакция литературы по биологии

2605070000
У $\frac{21005\text{-}128}{041(01)\text{-}78}$ 128-78

© 1976, 1970, 1965, by W. A. Benjamin, Inc.
© Перевод на русский язык, «Мир», 1978

Предисловие редактора перевода

Нет никакого сомнения в том, что советский читатель с большим удовлетворением встретит появление нового издания книги Дж. Уотсона в русском переводе. Как и при выпуске перевода первого издания (Дж. Уотсон, Молекулярная биология гена, «Мир», М., 1967), удалось преодолеть ряд трудностей технического порядка, чтобы обеспечить возможно малый разрыв в сроках опубликования оригинального английского издания и предлагаемого теперь русского перевода книги. В этом немалая заслуга переводчиков, успешно выполнивших очень большой объем работы в крайне сжатые сроки.

Едва ли нужно еще раз подчеркивать всю ценность и достоинства прекрасной книги Дж. Уотсона. Наши научные круги по достоинству оценили высокие качества этого фундаментального труда. Международная репутация «Молекулярной биологии гена» по праву такова, что позволяет говорить об этой книге, сразу завоевавшей всеобщее живейшее признание, как о значительном вкладе в научную литературу по биологии.

Третье американское издание в полной мере отражает главные тенденции ее развития, которые заложены в возрастающем внимании к объектам и системам, принадлежащим к новым, более высоким уровням организационной сложности как в структурном, так и функциональном отношении. Книга значительно выросла в объеме — целиком прибавились четыре новые крупные главы, но и те, которые сохранили прежнее заглавие, значительно расширены, во многих частях написаны почти заново. Продолжая традицию первого издания и последовательно развивая ее, новое издание с исключительной щедростью реализует принцип, проводившийся и прежде: текст сопровождается обильным иллюстративным материалом — графиками, таблицами, схемами и рисунками. Они дополняют насыщенный содержанием текст зрительным восприятием и фактической документацией в соответствии с разумным правилом, что порой важнее один раз увидеть, чем десять раз услышать (или прочитать).

Насыщенность книги научной информацией, тщательно отобранной и доведенной до самого последнего времени, делает ее незаменимым источником сведений и стимулов на путях научного поиска. Богатство сообщаемых фактов дается автором читателю через призму критического рассмотрения — часто в очень конденсированной форме, но изложенного очень четкими штрихами. Разумеется, сочетание обилия содержания с лапидарностью формы, в которую оно заключено, нередко требует от читателя внимательности и вдумчивости. Однако затраченный им труд вознагра-

ждается тем высоким удовлетворением, которое он получает от соприкосновения с неизменным богатством мыслей, увлекательными очертаниями новых задач и путей поиска. Несомненно, что книга Уотсона долгое время будет служить настольным пособием для широких кругов советских исследователей, работающих во многих соприкасающихся между собою областях — генетике и молекулярной биологии, генетической инженерии и цитологии, онкологии и вирусологии.

В переводе книги принимали участие: канд. биол. наук Н. М. Абросимова-Амельянчик (гл. 10—12, словарь терминов), А. М. Колчинский (гл. 9, 13, 14), д-р биол. наук М. И. Лерман (гл. 1—8, часть гл. 9—15, 17—20), канд. биол. наук А. В. Парин (гл. 16—20, часть гл. 15).

Академик В. А. Энгельгардт

Посвящается Лиз

Предисловие

Пожалуй, самое удивительное в современной молекулярной биологии — это то, что она не замедляет темпов своего развития. Всем нам, работающим в этой области, вероятно, трудно представить себе, что здесь еще могут возникнуть существенно новые идеи. И все-таки мы жадно набрасываемся на свежие номера научных журналов и очень часто находим в них описание новых фактов, которые нам необходимо усвоить, если мы хотим и дальше активно работать в области молекулярной биологии.

Таким образом, мы еще далеки от того дня, когда введение в молекулярную биологию можно будет преподавать как более или менее устоявшуюся дисциплину. В настоящее же время объем этого курса из года в год увеличивается. Лишь отчасти это можно объяснить желанием каждый раз по-новому оформлять материал, чтобы избавиться от скуки, неизбежно сопутствующей лекциям, если их читают по прошлогодним записям. Почти сразу же после выхода второго издания этой книги я почувствовал, что вскоре, вероятно, потребуется третье издание. При этом я опасался, что книга может сильно увеличиться в размерах, так как существовавшие ранее разграничения между молекулярной биологией и биологией клетки в настоящее время быстро исчезают. Кроме того, я непременно должен был расширить содержание книги, чтобы охватить и те вопросы, которые в прошлом можно было отнести к области чисто теоретической биологии. В результате я начал думать, не следует ли мне сократить или даже совсем выбросить значительную часть материала начальных вводных глав, чтобы книга сохранила удобный для чтения объем. Однако в конце концов я пришел к выводу, что целесообразнее все-таки дать текст, по которому студенты, еще не изучавшие генетики и биохимии, могли бы сначала ознакомиться с основами этих наук и, таким образом, не зависеть от других учебников.

Бо́льшая часть представленного в книге материала была прочитана в виде лекций студентам Гарвардского университета и Редклиффского колледжа в качестве вводного курса по биохимии и молекулярной биологии. Здесь сведены воедино все основные факты, которые должны усвоить студенты в начале своего обучения в университете, прежде чем перейти к более специализированным курсам.

Я попытался включить в книгу наиболее важные наблюдения, сделанные в самое последнее время и рискнул представить их как твердо установленные факты, хотя вполне возможно, что не все они выдержат испытание временем. Тем не менее я надеюсь, что таких случаев будет немного и все, что я написал здесь, окажется объективным отчетом о современном состоянии тех разделов биологии, которые и сейчас можно изучать на молекулярном уровне.

Многие из моих друзей, которым я показывал отдельные части этой книги во время работы над нею, прочитали их и сделали свои замечания. Особенно я хочу поблагодарить Роберта Голдмана, Элиаса Лазаридеса, Роберта Поллака и Кейта Робертса. Я обязан также Дэвиду Дресслеру

неоценимую помощь, оказанную им как в работе над рукописью, так при исправлении неудачных мест, которые иногда обнаруживались даже корректуре. Большую помощь своими знаниями при подготовке черновых ариантов рукописи оказал также Ян Коннери из Редклиффского коллед-а. Студенты Гарвардского университета Джей Баэр и Роберт Шик сыгра-и чрезвычайно большую роль в работе по исправлению корректуры, также при подготовке словаря специальных терминов и предметного ука-ателя. Я надеюсь, что в результате всех этих усилий наиболее серьезные ефекты стиля и фактические ошибки теперь устранены из текста. Однако о многих случаях стиль изложения и выбор фактических данных был бусловлен моими личными пристрастиями, поэтому только на мне лежит тветственность за все ошибки, которые могли остаться в тексте.

Разбирать мой почерк — задача не из легких, и эта книга могла поя-иться только благодаря оптимизму и настойчивости такого квалифици-ованного секретаря, как Мария Хеджес. Иллюстрации в основном были ыполнены уже упомянутым мной д-ром Кейтом Робертсом, который рабо-ает сейчас в институте имени Джона Иннеса (Норидж, Англия). Только очень немногие обладают большими способностями одновременно и в нау-ках и в искусстве, поэтому я считаю, что мне необыкновенно повезло — вновь воспользовался помощью этого незаурядного человека.

Наконец, я должен упомянуть о бесценной поддержке, оказанной мне моей женой и двумя маленькими сыновьями, которые на протяжении всех этих бесконечно долгих дней терпеливо относились к тому, что я дол-жен был снова и снова переделывать то один, то другой абзац или рисунок.

Дж. Д. Уотсон

Октябрь 1975 г.

ГЛАВА

1 Основы менделизма

Легко видеть в человеке существо совершенно особое, отличное от всех прочих живых существ. Лишь он создал сложные языки, дающие ему средство для обмена идеями и эмоциями. Он создал великие цивилизации, изменившие окружающий мир так, как не могло бы его изменить никакое другое существо. Поэтому человек всегда был склонен считать, что он занимает в природе не совсем обычное место. Эта мысль отразилась в различных религиях, с помощью которых человек пытался найти ответ на вопрос о своем происхождении и, руководствуясь им, вывести некие разумные правила поведения. Казалось естественным думать, что, поскольку жизнь каждого отдельного человека имеет начало и конец, у всего человечества в целом тоже должно быть «начало»— акт творения, во время которого был создан человек (возможно, вместе со всеми прочими формами жизни).

Около 100 лет назад Дарвин и Уоллес, создав теорию эволюции, основанную на идее выживания наиболее приспособленных, впервые серьезно поколебали эти представления. Они утверждали, что различные формы жизни изменчивы и что в природе постоянно появляются новые, слегка отличные от прежних формы животных и растений, нередко лучше приспособленные к жизни и более эффективно размножающиеся. Разрабатывая свою теорию, Дарвин и Уоллес еще не знали, в чем состоит механизм этой непрерывной изменчивости, но они понимали, что если такая изменчивость действительно составляет основу эволюции, то новые признаки организмов должны передаваться по наследству.

Вначале теория Дарвина была встречена в штыки. Больше всего нападок исходило от тех людей, которые просто не могли допустить, что человек и какая-то гнусная обезьяна имеют общего предка, пусть даже и жившего 100 миллионов лет назад. Не приняли вначале эту теорию и многие биологи, сочтя доводы Дарвина недостаточно убедительными. Агассиц, знаменитый швейцарский натуралист, работавший в то время в Гарвардском университете, много лет выступал против Дарвина и его горячего сторонника и популяризатора Гексли. Однако к концу девятнадцатого века научный спор по поводу теории Дарвина в основном закончился. К этому времени стало ясно, что объяснить современное географическое распространение растений и животных и распределение палеонтологических остатков в геологических пластах можно, только признав, что ныне живущие формы произошли от общего предка путем непрерывной эволюции. В наши дни теория эволюции получила всеобщее признание. Не признают ее только фундаменталисты, но отнюдь не из научных соображений, а из слепой приверженности религиозной догме.

Непосредственный вывод из теории Дарвина состоит в том, что жизнь на нашей планете возникла когда-то (1—2 миллиарда лет назад) в очень примитивной форме; возможно, это было что-то напоминавшее бак-

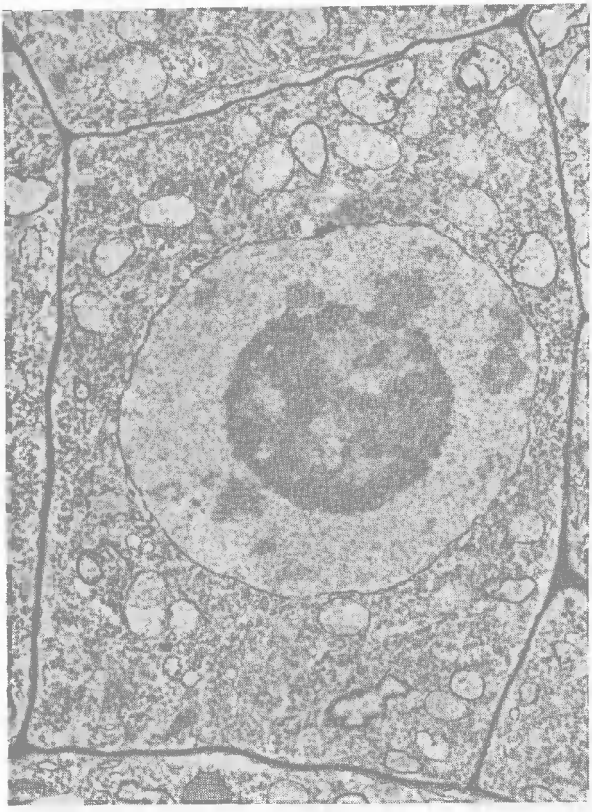


Рис. 1-1. Электронная микрофотография тонкого среза клетки африканской фиалки (*Saintpaulia ionantha*). (С любезного разрешения д-ров Портера и Ледбеттера, Биологическая лаборатория Гарвардского университета.) Хорошо видна тонкая целлюлозная клеточная стенка и ядро, содержащее ядрышко. Основное вещество цитоплазмы содержит большое количество сферических частиц, или рибосом, видимых как маленькие черные точки. Эндоплазматическая сеть видна по всей клетке.

терии — простейшие из современных живых существ. Конечно, сам факт существования бактерий убеждает нас в том, что основные черты живого присущи даже мельчайшим организмам. Однако теория эволюции приводит нас еще и к другому выводу: она указывает, что эти основные черты должны быть одинаковыми у всех живых организмов.

КЛЕТОЧНАЯ ТЕОРИЯ

К тому же заключению приводит нас и *клеточная теория*, создание которой явилось вторым важнейшим достижением биологии девятнадцатого века. Эта теория, впервые четко сформулированная в 1839 г. немецкими исследователями Шлейденом и Шванном, утверждает, что все растения

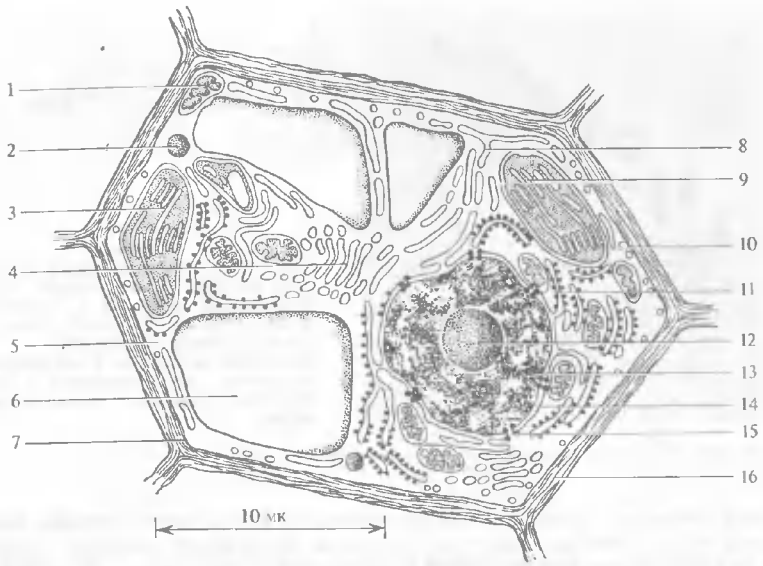


Рис. 1-2. Схематическое изображение растительной клетки, представленной на рис. 1-1. Масштабные соотношения между различными компонентами не везде соблюдены. *1* — митохондрия; *2* — жировое включение; *3* — хлоропласт; *4* — аппарат Гольджи; *5* — цитоплазма; *6* — вакуоль; *7* — плазматическая мембрана; *8* — эндоплазматическая сеть (гладкая); *9* — хлоропласт; *10* — микротрубочки; *11* — эндоплазматическая сеть (шероховатая); *12* — ядрышко; *13* — конденсированный хроматин; *14* — ядерная мембрана; *15* — пора ядерной мембраны; *16* — клеточная стенка.

и животные построены из мелких элементарных субъединиц, так называемых клеток. Все клетки окружены мембраной и обычно содержат ядро, также окруженное мембраной (рис. 1-1 и 1-2). Возникают клетки только из других клеток в процессе клеточного деления. Большинство клеток способны расти, а затем делиться на две дочерние клетки. Ядро клетки при этом также делится, и обе дочерние клетки получают по ядру.

ПРИ МИТОЗЕ ХРОМОСОМНЫЙ НАБОР НЕ ИЗМЕНЯЕТСЯ

В каждом ядре содержится определенное число продолговатых телец, которые были названы хромосомами (рис. 1-3). Перед клеточным делением каждая хромосома делится, так что получаются две новые хромосомы, совершенно такие же, как и исходная. Этот процесс (впервые его наблюдал в 1879 г. Флемминг) ведет к удвоению числа хромосом в ядре. При делении ядра две одинаковые хромосомы из каждой пары хромосом расходятся по двум дочерним ядрам (рис. 1-4). В результате этих событий (объединяемых теперь под общим названием *митоз*) каждая дочерняя клетка получает набор хромосом, точно такой же, как и у исходной родительской клетки.

На протяжении большей части жизненного цикла клетки хромосомы находятся в сильно растянутой линейной форме. Перед клеточным деле-

Рис. 1-3. Гаплоидный набор хромосом пятнистой лягушки (*Rana pipiens*). × 2125.
Фотография получена с помощью светового микроскопа. (T. E. Powell, Biological Laboratories, Harvard University.)
Показаны хромосомы в тот момент, когда две хроматиды, образовавшиеся в процессе дупликации, удерживаются вместе одной центромерой.

нием вещество хромосом конденсируется и образуются гораздо более компактные тельца. Удвоение хромосом происходит главным образом в то время, когда они находятся в растянутом состоянии, т. е. в интерфазе (различные стадии клеточного деления представлены на рис. 1-4). Однако один небольшой участок хромосомы удваивается всегда в ранней метафазе. Это так называемая *центромера* — частица, контролирующая движение данной хромосомы в процессе клеточного деления. Центромера на каждой хромосоме занимает совершенно определенное положение; на одних хромосомах она располагается посередине, а на других — ближе к одному из концов.

Когда хромосома удвоилась на всем протяжении, за исключением центромеры, мы говорим, что она состоит из двух *хроматид*. Сразу же после того, как центромера разделится, хроматиды превращаются в хромосомы, и эти дочерние хромосомы начинают удаляться друг от друга, отходя к противоположным полюсам клетки.

В метафазе хромосомы выстраиваются в определенном порядке вдоль экваториальной плоскости клетки, что сопровождается появлением *веретена*. Веретеном называется (за свою характерную форму) определенная область клетки, по которой хромосомы высших организмов перемещаются в анафазе, когда они расходятся к противоположным полюсам. Бóльшая часть пространства, занимаемого веретеном, заполнено длинными тонкими нитями, называемыми микротрубочками. С помощью этих нитей, которые прикреплены к центромерам хромосом, в основном и осуществляется перемещение последних по веретену. На стадии анафазы, когда дочерние хромосомы расходятся к полюсам веретена, центромера оказывается впереди и увлекает за собой всю хромосому

В ядре почти всех растительных животных клеток имеются ядрышки. На каждый *гаплоидный* набор хромосом приходится по меньшей мере одно ядрышко. В некоторых клетках ядрышко связано с определенной хромосомой. До последнего времени роль ядрышка оставалась совершенно неизвестной, хотя некоторые биологи и считали, что оно может участвовать в образовании веретена. Теперь, однако, у нас имеются очень веские доводы в пользу того, что ядрышко участвует в синтезе рибосом — мелких клеточных частиц, на которых синтезируются все белки.

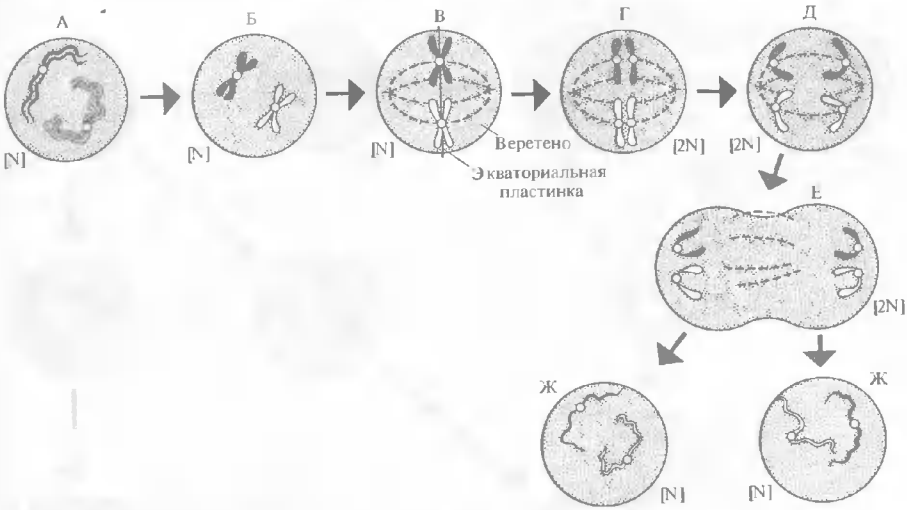


Рис. 1-4. Схема митоза в ядре гаплоидной клетки, содержащей две негомологичные хромосомы.
А. Ранняя профаза: конденсация хромосом. Каждая хромосома состоит из двух дочерних хроматид. *Б*. Профаза: укорочение и утолщение хромосом. *В*. Метафаза I: появляется аппарат веретена и хромосомы выстраиваются в экваториальной плоскости. *Г*. Метафаза II: центромера каждой хромосомы делится. *Д*. Анафаза: дочерние хромосомы движутся к противоположным полюсам при помощи нитей веретена. *Е*. Телофаза: разделение хромосом закончено. Образуются новые ядра. *Ж*. Ранняя интерфаза: клеточное деление закончено. Хромосомы удлиняются.

ПРИ МИТОЗЕ ПРОИСХОДИТ РЕДУКЦИЯ ХРОМОСОМНОГО НАБОРА

Митотический путь клеточного деления не единственный. Важным исключением являются так называемый *мейоз* — процесс образования половых клеток. При образовании половых клеток — яйца и сперматозоида — в результате двух последовательных делений число хромосом уменьшается ровно вдвое (рис. 1-5). В клетках высших растений и животных каждая хромосома представлена двумя копиями, или двумя гомологами (*диплоидное* состояние). Яйцо или сперматозоид, образовавшиеся в результате мейоза, содержат только одну из двух копий каждой хромосомы (*гаплоидное* состояние). Слияние сперматозоида с яйцом ведет к образованию *зиготы* — оплодотворенного яйца, которое содержит по два гомолога каждой хромосомы — один от отца и один от матери. Таким путем восстанавливается нормальный диплоидный набор хромосом.

У низших растений и у бактерий в отличие от высших растений и животных гаплоидное состояние является обычным, а диплоидное сохраняется лишь на протяжении очень короткого времени, непосредственно после слияния половых клеток. Как правило, мейоз наступает немедленно вслед за оплодотворением и ведет к образованию гаплоидных клеток (рис. 1-6).

Таким образом, клеточная теория учит, что все клетки возникают только из клеток. Все клетки взрослого организма (растения или животного) происходят в результате деления и роста из оплодотворенного яйца,

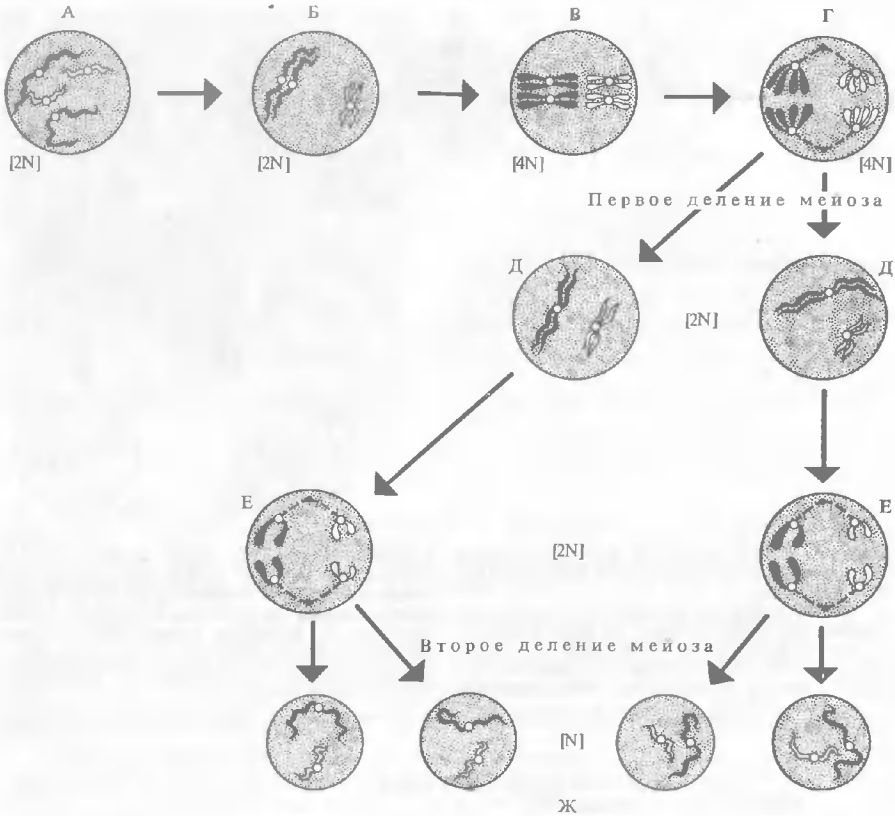


Рис. 1-5. Схема мейоза клетки, содержащей две пары гомологичных хромосом.
А. Профаза I: в этой воображаемой диплоидной клетке имеются две пары гомологичных хромосом. Хромосомы видны как одиночные нити. *Б*. Профаза Iа: гомологичные хромосомы спариваются (конъюгируют). Позднее в каждой хромосоме будут видны две хроматиды (на этой стадии происходит кроссинговер). *В*. Метафаза I: ориентация спаренных хромосом в экваториальной плоскости. Образование аппарата веретена. *Г*. Анафаза I: гомологичные центромеры движутся к противоположным полюсам веретена. Затем следует телофаза I и первое мейотическое деление заканчивается (образуется ядерная мембрана; хромосомы удлиняются). *Д*. Интерфаза II, за которой следуют профаза II и метафаза II: центромеры делятся, затем происходит миграция гомологичных хроматид к противоположным полюсам. *Е*. Анафаза II. *Ж*. Конечный результат — четыре гаплоидные клетки.

которое само образуется путем слияния двух половых клеток: сперматозоида и яйца. Все растущие клетки содержат хромосомы, обычно по две каждого типа, и новые хромосомы возникают путем деления предсуществующих.

УНИВЕРСАЛЬНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ТЕОРИИ

Хотя клеточная теория возникла из наблюдений над высшими организмами, она вполне приложима и к более примитивным формам жизни, а именно к простейшим и бактериям. Каждое простейшее и каждая бакте-

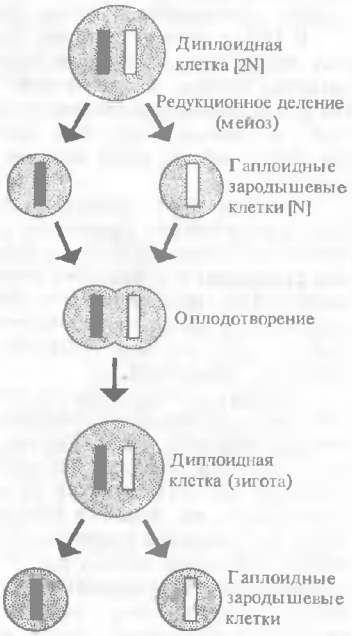


Рис. 1-16. Схема чередования гаплоидного и диплоидного состояния в половом цикле. Хромосомный набор одного родителя показан черным прямоугольником, а другого — светлым.

рия — это одна-единственная клетка. При ее делении образуется новая клетка, не отличающаяся от родительской; через некоторое время она отделяется и начинает вести самостоятельную жизнь. У высших организмов дочерние клетки не только часто остаются рядом, но и претерпевают дифференцировку, вследствие чего возникают совершенно новые типы клеток (например, первные и мышечные клетки), содержащие, однако, точно такой же хромосомный набор, как и исходная зигота. В этом случае новый организм возникает из двух высокодифференцированных клеток — сперматозоида и яйца; их слияние служит сигналом для нового цикла деления и дифференцировки.

Следовательно, хотя такой сложный организм, как организм человека, и содержит огромное количество клеток (около 5×10^{12}), все они в конéчном счете происходят из одной-единственной клетки. В оплодотворенном яйце уже заключена вся информация, необходимая для роста и развития. Сложные взаимодействия, которые мы находим у высших организмов, не являются непременным атрибутом жизни; основные свойства живого присущи также и отдельной растущей клетке.

ЗАКОНЫ МЕНДЕЛЯ

Наиболее удивительное свойство живой клетки — это ее способность к передаче наследственных признаков потомству. Само явление наследственности было, несомненно, известно с самых давних времен, когда человек обратил внимание на сходство между родителями и детьми. Однако физическая основа наследственности оставалась неизвестной до начала

двадцатого века, т. е. до того времени, когда усилиями ряда ученых была создана хромосомная теория наследственности.

В 1860 г. выяснилось, что наследственные признаки передаются потомству через сперматозоид и яйцо, а в 1868 г. Геккель, отметив, что сперматозоид состоит в основном из ядерного материала, пришел к выводу, что за наследственность ответственно ядро. Потребовалось еще почти 20 лет, чтобы убедиться в том, что хромосомы играют роль активных факторов, ибо сперва нужно было изучить детали процессов митоза, мейоза и оплодотворения.

Когда это было выполнено, стало ясно, что из всех клеточных компонентов одни только хромосомы распределяются поровну между дочерними клетками. Более того, стала ясной и необходимость тех сложных изменений хромосом, в результате которых из одного диплоидного набора в процессе мейоза образуется два гаплоидных, ибо в конечном счете именно этот процесс обеспечивает постоянство хромосомного набора. Эти факты, однако, лишь косвенно указывали на участие хромосом в передаче наследственных признаков.

Доказательства были получены на рубеже девятнадцатого и двадцатого веков, когда были открыты основные законы наследственности. Эти законы были впервые сформулированы в 1865 г. Менделем, и их стали называть законами Менделя. Однако работы самого Менделя прошли незамеченными; научная мысль в то время еще не созрела для их восприятия. Несмотря на все попытки Менделя заинтересовать своим открытием некоторых выдающихся биологов того времени, его работы были забыты и оставались забытыми вплоть до 1900 г., когда Де Фриз, Корренс и Чермак одновременно и независимо друг от друга осознали все огромное их значение. Ничего не зная о работах Менделя, эти селекционеры-растениеводы на основе собственных опытов по скрещиванию растений пришли к тем же выводам, что и Мендель.

ЗАКОН РАСЩЕПЛЕНИЯ ПРИЗНАКОВ

Мендель скрещивал различные сорта гороха, отличающиеся какими-нибудь вполне определенными признаками: формой семян (круглые или морщинистые), окраской (зеленые или желтые), длиной стебля (длинный или короткий) и т. д., а затем наблюдал появление этих признаков в потомстве. Многие исследователи до него пытались проследить закономерности в наследовании более сложных признаков и потерпели неудачу. В открытии Менделя важнейшую роль сыграло именно то обстоятельство, что он ограничил свои наблюдения совершенно четкими и сравнительно простыми различиями. Убедившись прежде всего в том, что он имеет дело с чистыми сортами, Мендель скрещивал два сорта, отличающихся только по одному признаку (например, по окраске или форме семян).

В первом поколении (F_1) все растения походили на *одного* из родителей. Например, при скрещивании сортов с зелеными и желтыми семенами все растения в F_1 имели желтые семена. Признак, проявляющийся в потомстве, был назван *доминантным*, а непроявляющийся — *рецессивным*.

Смысл этих результатов стал ясен, когда Мендель скрестил между собой растения первого поколения (F_1). При этом оказалось, что во втором поколении (F_2) у 75% потомков проявились доминантные признаки, а у 25% — рецессивные. По каждому из семи различных изученных признаков во втором поколении было получено такое же соотношение 3 : 1. От скрещивания растений F_2, обладающих рецессивными признаками, в F_3 были получены исключительно растения с рецессивными признаками, тогда как потомство от скрещивания растений F_2, обладавших доминантными признаками, разделилось на две группы: одна треть дала потомство

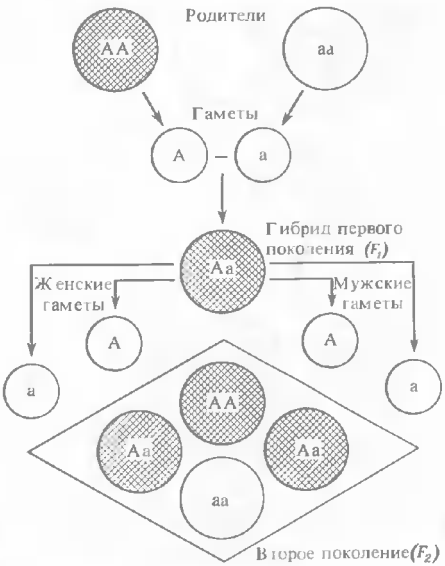


Рис. 1-7. Иллюстрация первого закона Менделя (закон расщепления признаков), объясняющая отношение 3 : 1, т. е. преобладание доминантного фенотипа над рецессивным у потомков второго поколения (F_2).
A — доминантный ген, *a* — рецессивный ген. Заштрихованный круг обозначает доминантный, а светлый — рецессивный фенотип.

исключительно с доминантными признаками, а две трети — смешанное потомство, в котором соотношение числа растений с доминантными и рецессивными признаками составило 3 : 1.

Мендель правильно истолковал свои результаты следующим образом (рис. 1-7). Каждый признак контролируется парой факторов (мы теперь называем их *генами*). Один фактор индивидуум получает от отца, а другой — от матери. Например, чистый сорт гороха с круглыми семенами содержит два гена, определяющие круглую форму семян (гены *RR*), а чистый сорт гороха с морщинистыми семенами — два гена, определяющие морщинистость (гены *rr*). Гаметы первого сорта содержат один ген *R*, а гаметы второго — один ген *r*. При скрещивании первого сорта со вторым получается растение (F_1), содержащее оба гена, *Rr*. Это растение образует, однако, круглые семена, поскольку ген *R* доминирует над геном *r*. Мы называем совокупность внешних признаков индивидуума его *фенотипом*, а его генетическую конституцию — *генотипом*. Индивидуумы с одинаковым фенотипом могут иметь различный генотип. Поэтому для определения генотипа какого-либо организма часто бывает необходимо провести ряд скрещиваний на протяжении многих поколений. Термином *гомозиготность* обозначают такое состояние, при котором отцовский и материнский гены в данной паре генов одинаковы (т. е. состояние *RR* или *rr*); противоположное состояние, при котором они не одинаковы (т. е. состояние *Rr*), обозначают термином *гетерозиготность*.

Важно отметить, что любая гамета содержит только один из каждой пары генов, имеющихся у данного организма, и что два типа гамет образуется в равных количествах. Таким образом, шансы на то, что данная гамета растения F_1 будет содержать ген *R* или ген *r*, равны (50 : 50), и получаемый результат определяется чистой случайностью. При обследовании небольшого числа особей F_2 упомянутое выше отношение редко бывает равно 3 : 1; обычно оно оказывается или несколько выше, или несколь-

44997

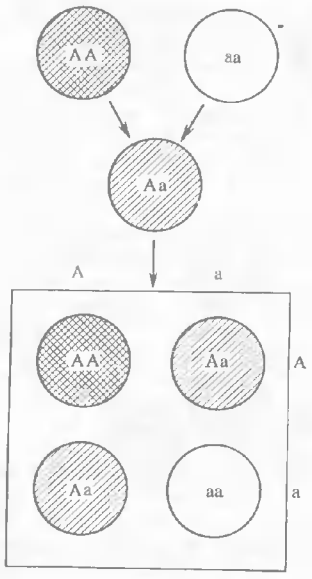


Рис. 1-8. Наследование окраски цветков у львиного зева.
Первый родитель гомозиготен по гену красной окраски (*AA*), а второй — по гену белой окраски (*aa*). Доминирования нет, и цветки гетерозиготных растений имеют розовую окраску. Потомки второго поколения образуют красные, розовые и белые цветки в соотношении 1 : 2 : 1.

ко ниже. Однако по мере увеличения числа обследуемых особей F_2 это отношение приближается к величине 3 : 1 все больше и больше.

Проявление рецессивных признаков в F_2 доказывает, что рецессивные гены в *гибридной* особи (*Rr*) не теряются и не изменяются. Кроме того, оно доказывает, что доминантные и рецессивные гены передаются потомству независимо друг от друга и, следовательно, независимо распределяются при образовании половых клеток. *Этот закон независимого расщепления часто называют первым законом Менделя.*

НЕКОТОРЫЕ ГЕНЫ НЕ ДОМИНАНТНЫ И НЕ РЕЦЕССИВНЫ

В скрещиваниях, проведенных Менделем, один из генов в каждой паре был доминантным, а другой — рецессивным. Это, однако, отнюдь не обязательно. Иногда гетерозиготный фенотип занимает промежуточное положение между двумя гомозиготными фенотипами. Например, при скрещивании двух чистых линий львиного зева (*Antirrhinum*) — красной и белой — растения F_1 имеют розовые цветки. Если эти растения F_1 скрестить между собой, то в F_2 соотношение растений с красными, розовыми и белыми цветками будет равно 1 : 2 : 1 (рис. 1-8). Таким образом, в данном случае гетерозиготу можно отличить от гомозиготы по фенотипу. Этот пример показывает, что приложимость законов Менделя не зависит от явления доминирования.

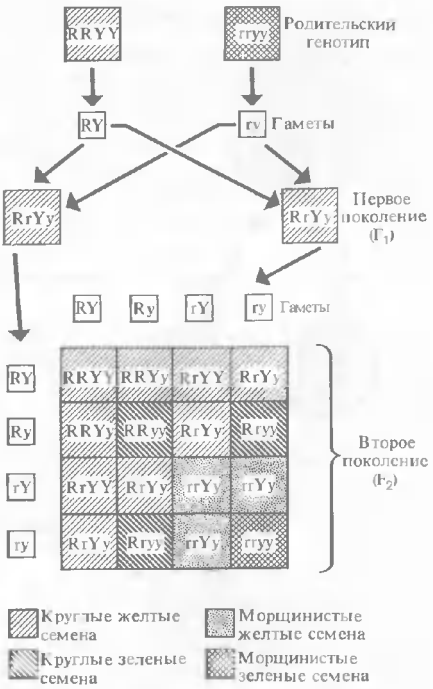


Рис. 1-9. Иллюстрация второго закона Менделя (закон независимого распределения). В этом примере прослеживается наследование желтой (*Y*) и зеленой (*y*) окраски семян, а также круглой (*R*) и морщинистой (*r*) их формы. Аллели *R* и *Y* доминируют над аллелями *r* и *y*. Генотипы родителей и потомков обозначены комбинацией указанных букв, а четыре разных фенотипа — при помощи различной штриховки.

ЗАКОН НЕЗАВИСИМОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ

Мендель провел также опыты по скрещиванию сортов гороха, отличающихся более чем одним признаком. Как и в первой серии опытов, он использовал две чистые линии, которые при самоопылении давали потомство, тождественное родительской форме. Одна из скрещиваемых линий имела круглые желтые семена, а другая — морщинистые зеленые. Поскольку гены, определяющие круглую форму и желтый цвет семян, доминируют, все потомство F_1 имело круглые желтые семена. Однако при скрещивании растений F_1 между собой в F_2 наряду с исходными фенотипами (круглые желтые и морщинистые зеленые семена) появились и два новых (*рекомбинантных*) фенотипа: морщинистые желтые и круглые зеленые семена.

И эти результаты Мендель смог объяснить, исходя из своего постулата о факторах, контролирующих отдельные признаки. Для этого ему пришлось допустить, что при образовании половых клеток гены разных пар передаются в половые клетки независимо друг от друга. Это объяснение иллюстрирует рис. 1-9. Любая данная гамета содержит лишь один ген из каждой пары генов. Таким образом, гаметы, образуемые растениями F_1 (генотип *RrYy*), будут иметь генотип *RY*, *Ry*, *rY* или *ry*, но не *Rr*, *Yy*, *YY* или *RR*. Все четыре возможных типа гамет образуются с одинаковой частотой. Гены, принадлежащие одному родителю, не проявляют тенденции оставаться вместе. Вследствие этого соотношение между фенотипами во втором поколении получается следующим: 9 (круглые желтые), 3 (круг-

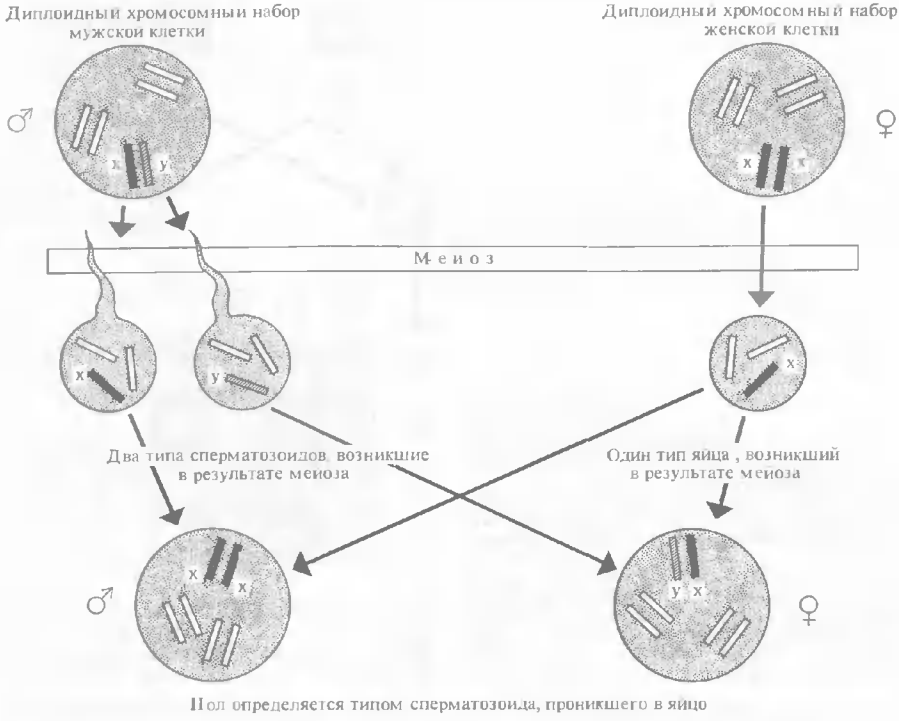


Рис. 1-10. Схема хромосомной детерминации пола.
Изображен случай, когда мужские клетки содержат одну X- и одну Y-хромосому, а женские — две X-хромосомы. Именно такая ситуация наблюдается у человека и у дрозофилы. У некоторых других видов Y-хромосома отсутствует, и поэтому диплоидная мужская клетка содержит у них на одну хромосому меньше, чем диплоидная женская клетка.

лые зеленые), 3 (морщинистые желтые) и 1 (морщинистые зеленые). *Этот феномен независимого распределения генов часто называют вторым законом Менделя.*

ХРОМОСОМНАЯ ТЕОРИЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

Отсутствие достоверных данных о поведении хромосом во время мейоза и митоза было главной причиной того, что открытие Менделя в свое время не получило признания. Однако ко времени вторичного открытия законов Менделя (1900 г.) эти данные уже имелись, и в 1903 г. американский ученый Сэттон сумел надлежащим образом их оценить. В своей классической работе «Хромосомы и наследственность» он впервые подчеркнул важность того факта, что диплоидные наборы хромосом состоят из двух морфологически сходных гаплоидных наборов и что в процессе мейоза каждая гамета получает только одну хромосому из каждой пары гомологов. Допустив, что гены являются частью хромосомы, он объяснил результаты

Менделя, используя данные о поведении хромосом в процессах клеточного деления. Далее он предположил, что гены, определяющие окраску семян (желтая или зеленая), локализованы в одной паре хромосом, а гены, определяющие форму семян (круглая или морщинистая),— в другой. Эта гипотеза объясняла экспериментально наблюдаемое расщепление признаков в потомстве — 9 : 3 : 3 : 1. Работа Сэттона не дала прямого доказательства хромосомной теории наследственности, и тем не менее она имела огромное значение, так как благодаря ей впервые были объединены две до того никак не связанные науки — генетика (опыты по скрещиванию) и цитология (изучение структуры клеток).

ХРОМОСОМЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ПОЛ

Выше мы говорили о том, что в клетках диплоидного организма каждая хромосома представлена в двух копиях. Однако из этого правила есть одно важное исключение. Еще в 1890 г. была обнаружена хромосома (тогда ее назвали добавочной, а мы теперь называем ее Х-хромосомой), которая не всегда присутствует в клетке в двух копиях. Биологическое значение этого факта было выяснено в 1905 г. американским цитологом Вильсоном и его учеником Стивенсом. Они нашли, что в клетках женских особей содержатся две Х-хромосомы, а в клетках мужских особей — только одна. Кроме того, они нашли, что у некоторых видов (включая и человека) мужские клетки содержат особую хромосому, не встречающуюся в женских клетках,— так называемую Y-хромосому. Вильсон и Стивенс указали, что такое распределение Х- и Y-хромосом может обеспечить очень простой механизм для определения пола. Каждое яйцо содержит одну Х-хромосому, и по одной Х-хромосоме содержит половина сперматозоидов. Оплодотворение яйца сперматозоидом, несущим Х-хромосому, приводит к образованию ХХ-зиготы, из которой развивается женская особь; оплодотворение сперматозоидом, не содержащим Х-хромосомы, приводит к появлению мужской особи (рис. 1-10). Эти наблюдения впервые отчетливо показали взаимосвязь между определенной хромосомой и определенным наследуемым признаком. Они также объяснили, почему мужские и женские особи возникают в одинаковых количествах.

ПРЕИМУЩЕСТВА ДРОЗОФИЛЫ В КАЧЕСТВЕ ОБЪЕКТА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В первых опытах по скрещиванию использовались лишь те генетические различия, которые уже существовали в природе. Мендель, например, для своих опытов просто брал семена обычных распространенных сортов. Существование разных форм одного и того же гена (аллелей) заставило задуматься над вопросом, как эти формы возникают. Одна из гипотез утверждает, что гены могут изменяться (мутировать), в результате чего появляются новые (мутантные) гены. Эту гипотезу впервые подверг серьезной проверке в 1908 г. выдающийся американский биолог Морган вместе со своими сотрудниками — генетиками Бриджесом, Мёллером и Стертевантом. Они работали с плодовой мушкой (дрозофилой). Дрозофила легко размножается в лабораторных условиях и каждые две недели дает новое поколение. Это очень ускоряет работу (не менее чем в 25 раз по сравнению с горохом) и, разумеется, резко сокращает затраты. Первый обнаруженный Морганом и его сотрудниками мутант — самец с белыми глазами — появился спонтанно в лабораторной культуре мух, имевших красные глаза. Поскольку все мухи, находимые в природных условиях, имели красные глаза, ген, определяющий красный цвет глаз,

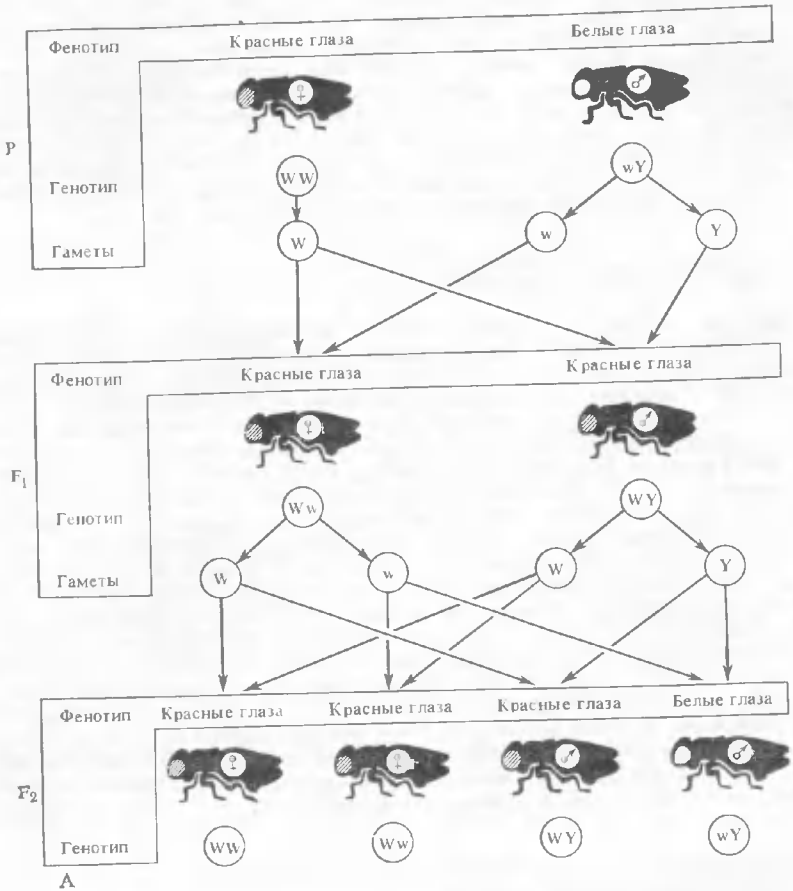
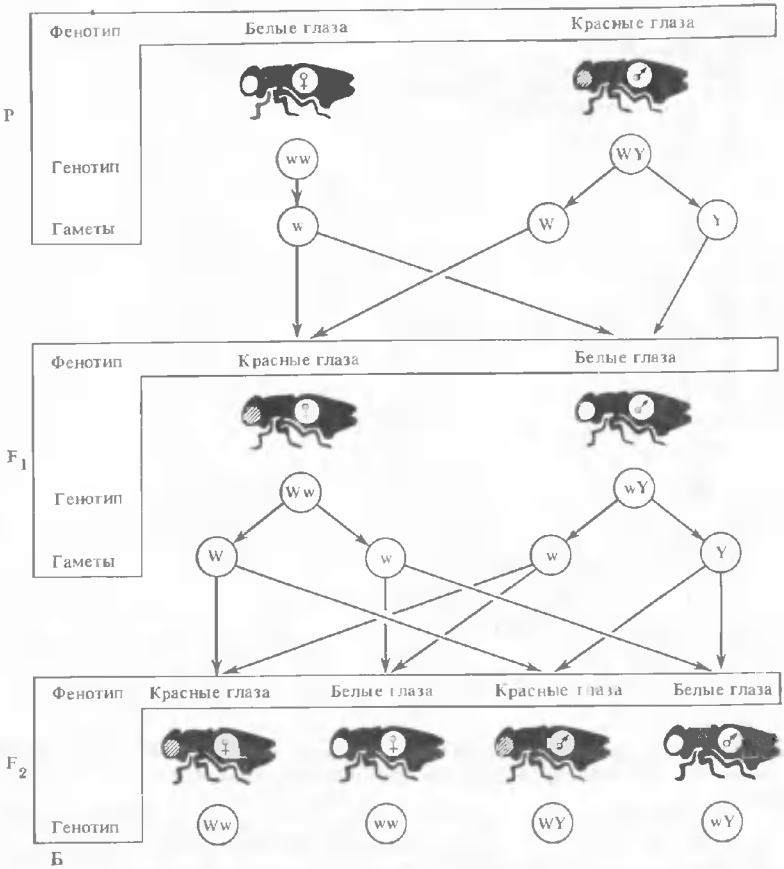


Рис. 1-11. Наследование генов, сцепленных с полом у дрозофилы.
Выражение генов, локализованных в половой хромосоме, различается у мужских и женских потомков, поскольку если имеется лишь одна X-хромосома, то локализованные в ней рецессивные гены всегда проявляются. Изображены два скрещивания, в которых участвует рецессивный ген *w* (ген белых глаз), локализованный в X-хромосоме. В случае *A* самца

был назван геном *дикого типа*, а ген, определяющий белый цвет,— *мутантным* геном (аллелем первого).

Мутант с белыми глазами был немедленно использован для скрещивания (рис. 1-11), и эти опыты дали поразительные результаты: оказалось, что мутантный ген передается потомству точно так, как передается X-хромосома. Иными словами, оказалось, что признак, контролируемый этим геном, сцеплен с полом. Возникло предположение, что данный мутантный ген локализуется в X-хромосоме рядом с генами, определяющими пол. Эта гипотеза была вскоре подтверждена новыми опытами, в которых использовались другие выделенные к тому времени мутанты. Многие из этих мутантных признаков также оказались сцепленными с полом.



Б

с белыми глазами (*wY*) скрещивают с самкой, гомозиготной по гену красных глаз (*WW*), а в случае *Б* красноглазого самца (*WY*) скрещивают с самкой, имеющей белые глаза (*ww*). Буква Y означает здесь не аллель, а Y-хромосому, присутствующую у самца вместо гомологичной X-хромосомы. В Y-хромосоме нет гена, соответствующего генам *w* или *W* X-хромосомы.

СЦЕПЛЕНИЕ С ПОЛОМ И КРОССИНГОВЕР

В основе менделевского закона независимого распределения признаков лежит тот факт, что гены, локализованные в разных хромосомах, в процессе мейоза распределяются независимо друг от друга. Часто, однако, независимого распределения не наблюдается. Это объясняется тем, что гены, о которых идет речь, локализуются в одной и той же хромосоме. Такие гены называют *сцепленными*. Когда исследователям удалось выделить достаточное количество мутантных генов, они обнаружили, что распределение этих генов в потомстве часто не подчиняется закону случая. Число сцепленных групп генов всегда в точности совпадало с гаплоидным числом

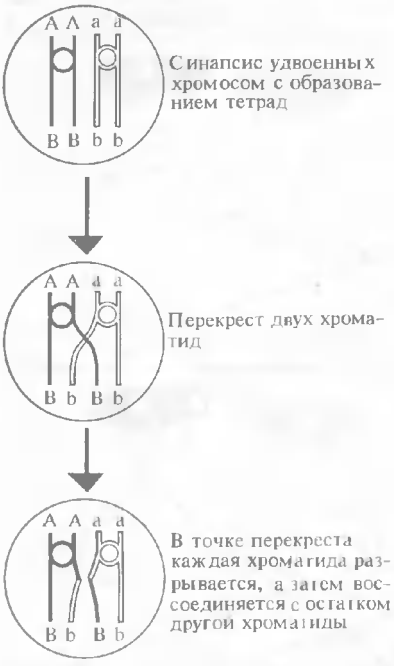


Рис. 1-12. Схема кроссинговера (по Янсенсу).

хромосом. У дрозофилы, например, имеется четыре группы сцепленных генов и четыре морфологически различимые хромосомы (в гаплоидном наборе).

В действительности, однако, сцепление никогда не бывает полным. Вероятность того, что два гена, локализованные в одной хромосоме, не разойдутся в процессе мейоза, колеблется от величины, близкой к 1, до 0,5. Это обстоятельство прямо указывает на наличие механизма, с помощью которого гомологичные хромосомы могут обмениваться генами. Такой процесс получил название *кроссинговера*. Цитологическая картина кроссинговера была впервые описана бельгийским цитологом Янсенсом. В начале мейоза гомологичные хромосомы располагаются парами параллельно друг другу (*синапсис*); на этой стадии каждая хромосома удваивается, образуя две хроматиды. Таким образом, при синапсисе четыре хроматиды оказываются расположенными рядом (тетрада). При этом они закручиваются одна вокруг другой. Янсенс предположил, что в результате напряженин, возникающего при таком скручивании, в двух соседних хроматидах могут произойти разрывы на одном уровне. Разорванные концы могут затем соединиться крест-накрест, так что фрагмент одной хроматиды соединится с фрагментом другой (рис. 1-12). Таким путем могут образоваться рекомбинантные хроматиды, содержащие участки от каждой из двух исходных гомологичных хромосом.

Морган и его ученики немедленно воспользовались выводами из этой еще не доказанной гипотезы Янсенса. Из данной гипотезы вытекает, что чем ближе друг к другу располагаются два гена на хромосоме, тем более тесно они сцеплены и, наоборот, чем они дальше, тем слабее сцепление.

Таблица 1-1 Мутации у *Drosophila melanogaster*[1]) (по данным на 1915 г.)

Мутация	Затрагиваемая область или признак	Мутация	Затрагиваемая область или признак
		Группа I	
Abnormal	Брюшко	*Lethal, 13*	Мутация летальна
Bar	Глаза	*Miniature*	Крылья
Bifid	Жилкование крыльев	*Notch*	Жилкование крыльев
Bow	Крылья	*Reduplicated*	Ножки
Cherry	Цвет глаз	*Ruby*	Цвет глаз
Chrome	Цвет тела	*Rudimentary*	Крылья
Cleft	Жилкование крыльев	*Sable*	Цвет тела
Club	Крылья	*Shifted*	Жилкование крыльев
Depressed	То же	*Short*	Крылья
Dotted	Грудь	*Skee*	То же
Eosin	Цвет глаз	*Spoon*	»
Facet	Омматидии	*Spot*	Цвет тела
Forked	Щетинки	*Tan*	Антенны
Furrowed	Глаза	*Truncate*	Крылья
Fused	Жилкование крыльев	*Vermilion*	Цвет глаз
Green	Цвет тела	*White*	То же
Jaunty	Крылья	*Yellow*	Цвет тела
Lemon	Цвет тела		
		Группа II	
Antlered	Крылья	*Jaunty*	Крылья
Apterous	То же	*Limited*	Стерниты
Arc	То же	*Little crossover*	Хромосома II
Balloon	Жилкование крыльев	*Morula*	Омматидии
Black	Цвет глаз	*Olive*	Цвет тела
Blistered	Крылья	*Plexus*	Жилкование крыльев
Comma	Грудь (отметка)	*Purple*	Цвет глаз
Confluent	Жилкование крыльев	*Speck*	Грудь (отметка)
Cream II	Цвет тела	*Strap*	Крылья
Curved	Крылья	*Streak*	Расположение щетинок
Dachs	Ножки	*Trefoil*	То же
Extra vein	Жилкование крыльев	*Truncate*	Крылья
Fringed	Крылья	*Vestigial*	То же
		Группа III	
Band	Расположение щетинок	*Pink*	Цвет глаз
		Rough	Глаза
Beaded	Крылья	*Safranin*	Цвет глаз
Cream III	Цвет глаз	*Sepia*	То же
Deformed	Глаза	*Sooty*	Цвет тела
Dwarf	Размеры тела	*Spineless*	Щетинки
Ebony	Цвет тела	*Spread*	Крылья
Giant	Размеры тела	*Trident*	Расположение щетинок
Kidney	Глаза	*Truncate intensf.*	Крылья
Low crossing over	Хромосома III	*Whitehead*	Расположение щетинок
Maroon	Цвет глаз		
Peach	То же	*White ocelli*	Омматидии

Продолжение табл. 1-1

Мутация	Затрагиваемая область или признак	Мутация	Затрагиваемая область или признак
		Группа IV	
Bent	Крылья	*Eyeless*	Глаза

1) Мутации, перечисленные в этой таблице, распадаются на четыре группы сцепления. Число хромосом у дрозофилы также равно четырем, и это привело к выводу, что гены находятся в хромосомах. Следует отметить, что мутации в разных генах могут по-разному изменять один и тот же признак, например цвет тела.

Это дает возможность составлять своего рода карты хромосом, на которых указано относительное расположение генов (гл. 7). К 1915 г. более 85 мутантных генов было локализовано в четырех группах сцепления, или четырех хромосомах дрозофилы (табл. 1-1). В опубликованной позднее книге «Механизм менделевской наследственности» Морган показал всеобщую приложимость хромосомной теории наследственности — концепции, вставшей в один ряд с теорией эволюции и клеточной теорией, создание которых явилось важнейшим этапом на пути познания природы жизни.

КРАСНЫЙ ЦВЕТ ГЛАЗ У ДРОЗОФИЛЫ КОНТРОЛИРУЕТСЯ МНОГИМИ ГЕНАМИ

Даже при беглом просмотре перечня мутантных генов, приведенного в табл. 1-1, бросается в глаза одно важное обстоятельство: много разных генов оказывает влияние на один и тот же фенотипический признак. 13 генов из этого перечня определяют, например, цвет глаз. У мух, гомозиготных по какой-либо мутантной форме одного из этих генов, глаза не красные, а какого-нибудь другого цвета, типичного для данного мутантного гена (например, алого или цвета киновари). Таким образом, не существует однозначного соответствия между генами и такими сложными признаками, как цвет глаз или форма крыла. Появление каждого сложного признака определяется рядом событий, и каждое из этих событий контролируется особым геном. Всякая сложная машина состоит из множества различных деталей, и каждая из них выполняет какую-нибудь определенную роль. Поломка любой из этих деталей выведет машину из строя. Автомобиль непригоден к эксплуатации, если обнаружилась неисправность в моторе, или отказали тормоза, или не работает бензонасос. Но это, конечно, не означает, что только от этой одной детали (из-за которой он вышел из строя) зависит его нормальная работа.

МУТАЦИОННАЯ ПРИРОДА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ

Теперь нам становится понятной природа той наследственной изменчивости, которая встречается во всем живом мире и которая составляет основу процесса эволюции. При удвоении хромосомы гены обычно копируются совершенно точно. Однако изредка при таком копировании в генах происходят изменения (*мутации*), в результате чего появляются измененные формы генов. Большинство таких измененных генов (хотя и не все) функционируют хуже, чем ген дикого типа. Мутации должны быть редкими; если бы они происходили часто, т. е. если бы много генов мутировало во время каждого клеточного деления, то потомки не походили бы на своих родителей. В то же время редкие мутации (происходящие с небольшой,

но вполне определенной частотой) очень выгодны организмам, ибо они служат постоянным источником изменчивости, которая дает возможность животным и растениям приспосабливаться к постоянно меняющимся условиям внешней среды.

Странно, что представители «классической» биологии, решавшие в то время все вопросы, касавшиеся эволюционных взаимоотношений между различными формами жизни, не оценили немедленно результаты, полученные генетиками-менделистами. Возникли сомнения относительно того, могут ли подобные генетические изменения обусловить развитие совершенно новых структур, например крыльев и глаз. Биологи классической школы полагали, что должны существовать какие-то более эффективные «макромутации», за счет которых и совершаются крупные эволюционные сдвиги.

Однако постепенно эти сомнения рассеялись главным образом благодаря работам генетиков-математиков Райта, Фишера и Холдейна. Эти ученые, исходя из возраста биосферы, рассчитали, что при таких сроках даже относительно небольшая частота мутирования (вроде той, какую мы находим у дрозофилы) достаточна, чтобы обеспечить накопление выгодных для вида признаков, если только мутации обеспечивают этому виду хотя бы слабое преимущество при отборе. В 30-х годах биологи сами начали переосмысливать свои взгляды на происхождение видов и усваивать работы генетиков математической школы. Среди этих дарвинистов нового толка следует назвать Дж. Гексли (внука Т. Гексли, который первым горячо пропагандировал дарвиновское учение), генетика Добжанского, палеонтолога Симпсона и орнитолога Майра. Все эти ученые в 40-х годах опубликовали работы, в которых каждый в своей области показал, что дарвинизм и менделизм согласуются между собой и дополняют друг друга.

ПЕРВЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПРИРОДЕ ГЕНОВ И О МЕХАНИЗМЕ ИХ ДЕЙСТВИЯ

Почти немедленно после вторичного открытия законов Менделя генетики занялись построением гипотез о химической структуре генов и о механизме их действия. Это, однако, не дало никаких ощутимых результатов, поскольку природа генетического материала в то время оставалась еще неизвестной. Даже обнаружение в хромосомах нуклеиновых кислот и белков ничему не помогло, так как структура этих соединений еще не была расшифрована. Наиболее плодотворной оказалась мысль о том, что гены должны так или иначе самовоспроизводиться; при каждом удвоении хромосом все гены должны копироваться, и притом с высокой степенью точности. Осознание этого факта немедленно привело к постановке важнейшей химической проблемы: каким образом может осуществляться столь точное копирование какой-либо сложной молекулы?

Некоторые физики тоже заинтересовались генами, и, когда в конце 20-х годов родилась квантовая механика, возникла надежда, что именно теоретическая физика поможет раскрыть истинную природу гена. Правда, эту надежду разделяли немногие. Трудно было ожидать, чтобы физики или химики (пусть даже и самые ярые приверженцы «чистой теории») занялись веществом, структура которого все еще оставалась невыясненной. В то время был известен, пожалуй, только один факт, над которым им стоило задуматься. В 1927 г. Мёллер открыл, что рентгеновские лучи вызывают мутации. Поскольку вероятность попадания пропорциональна размеру мишени, для крупного гена вероятность быть поврежденным под действием облучения должна быть больше, чем для мелкого, и, следовательно, относительная частота мутирования того или иного гена дает возможность определять его относительные размеры. Однако для того,

чтобы на этом общем принципе можно было основывать какие-либо расчеты, требовалось вводить еще целый ряд специальных допущений. Поэтому даже исследователи, занимавшиеся такими расчетами, сами не принимали своих результатов всерьез.

ПЕРВЫЕ ПОПЫТКИ ОБНАРУЖИТЬ СВЯЗЬ МЕЖДУ ГЕНАМИ И БЕЛКАМИ

В этой области наиболее плодотворным оказалось изучение того, как изменения в генах влияют на белки, присутствующие в клетке. Вначале такого рода исследования упирались в целый ряд трудностей, ибо, в сущности, ничего еще не было известно о белках таких сложных органов, как, например, глаз или крыло. Вскоре, однако, стало ясно, что гораздо легче изучать гены, контролирующие простые метаболические функции. Одним из первых удачных опытов оказалось изучение наследственного заболевания, связанного с нарушением аминокислотного обмена. У человека возникают спонтанные мутации, в результате которых нарушается обмен одной из аминокислот, а именно фенилаланина. В крови у индивидуумов, гомозиготных по данному мутантному гену, накапливаются токсические количества фенилаланина, поскольку их организм не способен разрушать фенилаланин, поступающий с пищей. Существование подобных заболеваний (так называемых *врожденных нарушений обмена*) привело в 1909 г. английского врача Гэррода к мысли, что ген дикого типа ответствен за присутствие определенного фермента и что у индивидуумов, гомозиготных по соответствующему мутантному гену, данный фермент отсутствует.

Эта общая гипотеза Гэррода о существовании зависимости между генами и ферментами была использована в 30-х годах при изучении пигментов, обусловливающих цвет глаз насекомых и окраску цветков. В обоих случаях были получены доказательства того, что определенный ген контролирует совершенно определенный этап в процессе образования пигмента. Однако глубже изучить взаимосвязь между генами и белками в то время не удалось, потому что исследователям не была известна структура соответствующих белков. Не удалось доказать ни того, что большинство генов контролирует синтез белков (уже тогда предполагали, что все ферменты имеют белковую природу), ни того, что все белки синтезируются под контролем генов.

Уже в 1935 г. генетикам менделевской школы стало ясно, что подобные эксперименты вряд ли смогут что-нибудь дать для выяснения механизма действия гена, хотя они и сыграли несомненную роль в установлении основных закономерностей менделевского наследования. Требовалось найти объект, более пригодный для химического анализа. В то же время было ясно, что химия нуклеиновых кислот и белков разработана еще совершенно недостаточно для того, чтобы можно было приступить к серьезному химическому изучению даже наиболее подходящих биологических систем. К счастью, это не помешало исследователям заняться генетикой организмов, в химическом отношении значительно более простых, а именно генетикой грибов, бактерий и вирусов. Ниже мы увидим, что необходимые химические данные были получены как раз к тому времени, когда генетики оказались уже в состоянии надлежащим образом их использовать.

ВЫВОДЫ

Изучение живых организмов на биологическом уровне привело к трем важнейшим обобщениям: 1) к теории эволюции путем естественного отбора (сформулированной Дарвином и Уоллесом), согласно которой все сложные

современные формы растений и животных возникли в результате непрерывного усложнения из более примитивных организмов; 2) к клеточной теории, утверждающей, что все организмы построены из клеток, и 3) к хромосомной теории наследственности, суть которой состоит в том, что наследственность определяется хромосомами.

Все клетки содержат хромосомы. Перед клеточным делением (митозом) хромосомы удваиваются, благодаря чему каждая из двух дочерних клеток получает такой же набор хромосом, как и у материнской клетки. В гаплоидных клетках обычно присутствует только по одной копии каждой хромосомы; в диплоидных клетках обычно имеется по две копии (пары гомологичных хромосом). Диплоидная клетка возникает при слиянии мужской и женской гаплоидных клеток (т. е. в процессе оплодотворения), а гаплоидные клетки образуются из диплоидной в результате особого типа клеточного деления (мейоза), при котором число хромосом уменьшается вдвое (редукция хромосомного набора).

Хромосомы определяют наследственность, так как в хромосомах находятся гены. Гены были открыты Менделем в 1865 г., однако все значение этого открытия стало ясным лишь в начале XX в. Каждый ген может существовать во многих различных формах, которые называются аллелями. Мендель предположил, что каждый индивидуум наследует от каждого из родителей по одному гену для каждого признака и что каждому наследственному признаку соответствует один ген. Физической основой этого явления служит распределение хромосом в процессе мейоза. Гомологичные хромосомы распределяются между гаплоидными клетками по закону случая. Если два гена находятся в одной хромосоме, то они обычно передаются потомству вместе (сцепленные гены). Гены, контролирующие разные признаки, иногда передаются независимо друг от друга; это происходит потому, что они находятся в разных хромосомах. Сцепление при всех условиях редко бывает полным, так как гомологичные хромосомы в процессе мейоза, когда они лежат рядом друг с другом, часто разрываются и разорванные концы соединяются крест-накрест (явление кроссинговера). После кроссинговера гены, первоначально находившиеся в отцовской хромосоме, оказываются соединенными с генами, происходящими из материнской хромосомы.

Разные аллели одного и того же гена возникают благодаря наследуемым изменениям (мутациям) исходного гена. В норме гены чрезвычайно стабильны и при удвоении хромосом копируются совершенно точно. Мутации происходят редко и обычно влекут за собой неблагоприятные последствия для организма. Однако вообще процесс мутирования играет положительную роль, так как накопление редких полезных мутаций создает основу той генетической изменчивости, которая необходима для эволюции.

На протяжении многих лет для генетиков оставались загадкой как структура генов, так и те химические механизмы, с помощью которых гены определяют различные признаки клеток. После того как было описано достаточное число спонтанных мутаций, стало ясно, что между геном и признаком не существует простого соотношения и что все сложные признаки организма контролируются многими генами. Гэррод еще в 1909 г. высказал весьма плодотворную мысль, что гены влияют на синтез ферментов. Однако для химического изучения взаимосвязи между генами и белками классические объекты менделевской генетики (такие, как кукуруза, мышь и даже дрозофила) оказались малопригодными. Для этих исследований совершенно незаменимыми стали значительно более простые организмы — грибы, бактерии и вирусы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Swanson C. P., The Cell, 3rd ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1969. Введение в основы клеточной теории.

Moore J., Heredity and Development, 2nd ed., Oxford University Press, 1972. Прекрасно написанное введение в генетику и эмбриологию, в котором особое внимание уделено истории развития этих наук.

Sturtevant A. H., Beadle G. W., An Introduction to Genetics, Dover, New York, 1962. Эта книга, впервые опубликованная в 1939 г. и недавно переизданная, остается классическим изложением результатов генетических исследований, проведенных на дрозофиле.

Srb A., Owen R., Edgar R., General Genetics, 2nd ed., Freeman, San Francisco, 1965. Эта книга, хотя и сильно устарела, тем не менее остается хорошим введением в генетику.

Peters J. A., Classic Papers in Genetics, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1959. Сборник, в который включены многие из наиболее значительных работ по генетике, опубликованных до работы Бензера по анализу тонкой структуры гена.

Moore J., Readings in Heredity and Development, Oxford University Press, 1972. В эту книгу вошли многие статьи, сыгравшие решающую роль в развитии хромосомной теории наследственности.

Sturtevant A. H., A History of Genetics, Harper and Row, 1965. История генетики, написанная ученым, который внес большой вклад в развитие этой науки.

Carlson E. J., The Gene Theory: A Critical History, W. B. Saunders, Philadelphia, 1966. В этой книге рассматривается развитие генетических идей от Менделя до наших дней.

Mayr E., Animal Species and Evolution, Harvard University Press, Cambridge, 1963. Наиболее полное изложение фактов, подтверждающих теорию эволюции.

Lewontin R. C., The Genetic Basis of Evolutionary Change, Columbia University Press, 1974. (Р. Левонтин, Генетические основы эволюции, изд-во «Мир», М., 1978.) Совсем недавно написанная книга, в которой дан глубокий анализ эволюционного процесса.

ГЛАВА 2

Клетка подчиняется законам химии

Еще во времена Дарвина химики задавали себе вопрос, не подчиняются ли живые клетки тем же законам, что и неживые системы. К этому времени было уже доказано, что в живых клетках нет никаких особых, только для них характерных атомов. Очень рано была выяснена также и первостепенная роль углерода, главного компонента почти всех биологических молекул. Современное разделение химии на органическую и неорганическую отражает некогда существовавшую тенденцию рассматривать соединения углерода, входящие в состав живых тканей, как особую группу, отличную от всех прочих веществ. Теперь мы знаем, что это разделение является искусственным и не имеет под собой никакой биологической основы, так как химическими методами совершенно невозможно отличить соединения, синтезированные в лаборатории, от соединений, синтезированных клеткой.

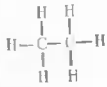
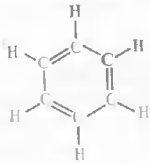
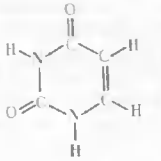
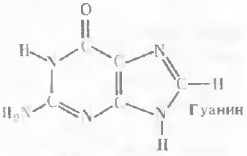
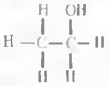
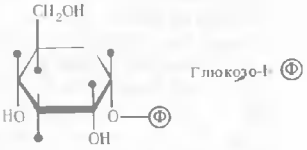
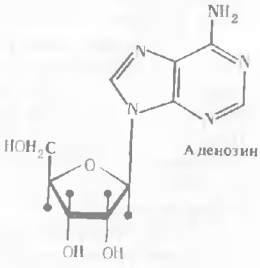
Однако в первой четверти нашего века многие биологи и химики все еще полагали, что в живых системах, помимо обычных химических законов, действует еще и некая жизненная сила, присущая только живому. Этот запоздалый «витализм» можно было бы в какой-то мере объяснить слабыми успехами биохимии. Методами органической химии удалось выяснить структуру только относительно небольших молекул, вроде глюкозы (табл. 2-1), но среди исследователей все более крепло убеждение, что жизненно важную роль играют очень крупные молекулы (мы называем их теперь макромолекулами), а исследовать строение таких молекул было бы не под силу даже лучшим химикам-органикам.

На протяжении многих лет самым главным классом макромолекул считались белки, потому что все больше и больше данных показывало, что ферменты имеют белковую природу. Правда, вначале еще шли споры о том, можно ли считать ферменты макромолекулами, но в 1926 г. эти споры прекратились после того, как Самнер доказал, что выделенный им кристаллический белок представляет собой фермент (уреазу). Однако и это открытие не рассеяло атмосферу таинственности, окружавшую белки. Их сложная структура не поддавалась расшифровке при помощи тех методов, которыми в то время располагала химия. Поэтому вплоть до 1940 г. некоторые ученые все еще продолжали считать, что белковые молекулы обладают какими-то особыми свойствами, присущими только живым системам.

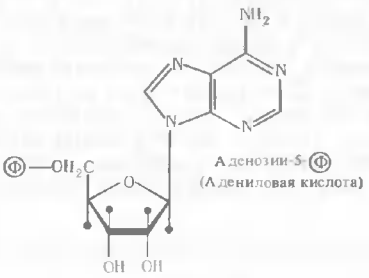
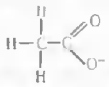
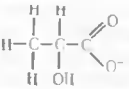
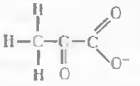
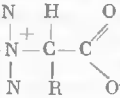
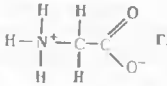
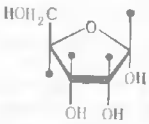
В то время многие предполагали, что и гены, по всей вероятности, имеют белковую природу. Прямых доказательств этого не было, но чисто умозрительным путем многие приходили к выводу, что гены должны быть именно белками, тем более что белки уже были обнаружены в хромосомах. Правда, в хромосомах всегда присутствовал и другой компонент, а именно нуклеиновые кислоты, но их считали соединениями низкомолекулярными и, следовательно, неспособными нести достаточный объем генетической информации.

Дело усугублялось еще и тем, что некоторые ученые склонны были усматривать нечто уникальное в трехмерной организации клетки и связы-

Таблица 2-1 Некоторые важные классы низкомолекулярных биологических веществ

Класс	Характеристика	Пример
Алифатические углеводороды	Линейные или разветвленные молекулы, содержащие только углерод и водород	 Этан
Ароматические углеводороды	Углеводороды циклического строения с сопряженными двойными связями	 Бензол
Пиримидины	Гетероциклические ароматические соединения ($C_4H_4N_2$ или его производные)	 Урацил
Пурины	Гетероциклические ароматические соединения ($C_5H_4N_4$ или его производные)	 Гуанин
Спирты	Углеводороды, у которых один или несколько водородов заменены ОН-группой	 Этанол
Эфиры фосфорной кислоты	Образуются из спиртов и фосфорной кислоты путем удаления молекулы воды	 Глюкозо-Ф
Нуклеозиды	Содержат сахар (пентозу), соединенный с пурином или пиримидином связью C—N	 Аденозин

Продолжение табл. 2-1

Класс	Характеристика	Пример
Нуклеотиды	Фосфорные эфиры нуклеозидов	 Аденозин-5-Ⓟ (Адениловая кислота)
Карбоновые кислоты	Углеводородный скелет, содержащий одну или несколько COO^--групп	 Уксусная кислота
Оксикислоты	Замещенный углеводородный скелет, содержащий OH^- и COO^--группу	 Молочная кислота
Кетокислоты	Замещенный углеводородный скелет, содержащий кетогруппу и COO^--группу	 Пировиноградная кислота
Аминокислоты	Содержат NH_2- и COOH-группу: обе группы заряжены. Общая формула  где R — боковая группа, характерная для данной аминокислоты. Всего имеется 20 различных аминокислот	 Глицин
Сахара (моносахариды)	Полигидроксисоединения, содержащие C—O-группу (альдегиды и кетоны). Наиболее часто встречаются соединения, содержащие 3 атома углерода (триозы), 4 (тетрозы), 5 (пентозы) и 6 (гексозы)	 Рибоза

вать жизнедеятельность именно с этой организацией. Отсюда иногда делали вывод, что безнадежно даже и пытаться понять все химические взаимодействия, протекающие в клетке. Чаще, однако, приходили к другому заключению: утверждали, что сущность жизни мы сможем понять лишь после того, как будут открыты какие-то новые законы природы, не менее важные, чем, например, закон о клеточном строении организмов или об эволюции всего живого. Однако все эти полумистические рассуждения

никогда не вели к серьезным экспериментам, да и вообще не поддавались проверке просто в силу крайней своей неопределенности. Лишь биохимики и физики сумели добиться определенных успехов, так как они упорно и терпеливо искали новые подходы для изучения все более и более сложных биологических структур. Но и тут до триумфа было еще очень далеко. Химики и биологи часто вели свои поиски в совершенно разных направлениях и нередко оказывались даже во враждебных лагерях. Некоторые биологи утверждали, что химия вообще по самой своей природе не в состоянии дать настоящий ответ на главные вопросы биологии. Где-то в подсознании биолога всегда гнездилась мысль, а может быть, правильнее сказать, надежда, что мир живых существ отделен от унылого и бездушного мира химических лабораторий чем-то большим, нежели простое различие в размерах или в степени сложности.

КОНЦЕПЦИЯ ПРОМЕЖУТОЧНОГО ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Как только химики-органики научились идентифицировать некоторые соединения, из которых построена клетка, стало ясно, что молекулы питательных веществ, попав в организм, подвергаются в нем весьма радикальным превращениям. Ни один вид пищи не содержит всех тех различных молекул, которые присутствуют в клетке. Более того, в некоторых случаях практически все органические молекулы, присутствующие в организме, синтезируются в нем самом. Чтобы убедиться в этом, достаточно проследить за клетками, растущими на питательной среде определенного состава, например за дрожжевыми клетками, для которых единственным источником углерода служит глюкоза. Попав в клетку, глюкоза претерпевает ряд химических превращений, в результате которых образуются различные вещества, необходимые для построения новых структурных компонентов клетки. Обычно такие превращения включают не один, а несколько этапов, и на каждом этапе возникает свой особый промежуточный продукт. Эти промежуточные продукты часто не несут в клетке никаких специальных функций; они не более как звенья в цепи синтеза какого-нибудь необходимого структурного компонента, например аминокислоты.

Всю совокупность различных химических реакций, протекающих в клетке, называют клеточным *обменом* или клеточным *метаболизмом*. Разные типы молекул, участвующие в этих реакциях, объединяют общим термином *метаболиты*. Под *промежуточным обменом* понимают те химические реакции, в результате которых молекулы различных питательных веществ превращаются в «строительные блоки» клетки.

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ЭНЕРГИИ В РЕАКЦИЯХ ОКИСЛЕНИЯ — ВОССТАНОВЛЕНИЯ

В середине XIX в. было выяснено, что только часть пищи, поглощаемой животными или бактериями, превращается в новые строительные блоки клетки; все остальное сжигается, т. е. окисляется кислородом до CO_2 и воды с выделением энергии. Приблизительно в то же время стало ясно, что в зеленых растениях происходят обратные процессы. В общем виде это можно изобразить так:

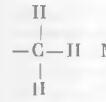
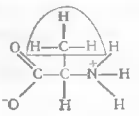
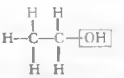
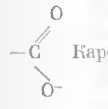
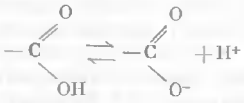
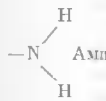
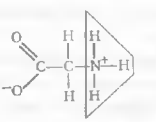
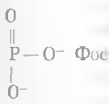
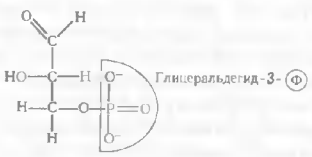
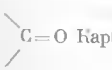
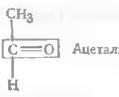
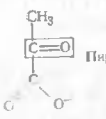
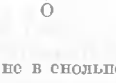
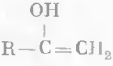
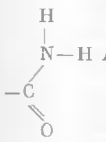
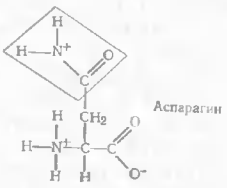
Дыхание (у растений и животных):

$$C_6H_{12}O_6 \text{ (глюкоза)} + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \text{Энергия (в форме тепла)}. \quad (2\text{-}1)$$

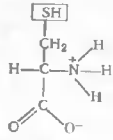
Фотосинтез (только у растений):

$$6CO_2 + 6H_2O + \text{Энергия (солнечная радиация)} \rightarrow C_6H_{12}O_6 \text{ (глюкоза)} + 6O_2. \quad (2\text{-}2)$$

Таблица 2-2 Важные функциональные группы биологических молекул

Группа	Пример соединения	Биологическое значение
 Метил	 Метильная группа аланина	Нерастворима в воде; не образует водородных связей
Гидроксил	 Этанол	Растворима в воде; образует водородные связи
 Карбоксил	Уксусная кислота	Обычно заряжена  Хороший акцептор водородных связей
 Аминогруппа	 Глицин	Часто заряжена $-NH_2 + H^+ \rightleftharpoons NH_3^+$ Образует водородные связи
 Фосфатная	 Глицеральдегид-3-Ⓟ	Всегда заряжена отрицательно; образует водородные связи с водой, поэтому хорошо растворима
 Карбонил	 Ацетальдегид  Пируват	Образует водородные связи; обычно существует в кетоформе  а не в енольной форме 
 Амидная	 Аспарагин	Образует водородные связи (и аминогруппа, и карбонил образуют прочные водородные связи)

Продолжение табл. 2-2

Группа	Пример соединения	Биологическое значение
—S—H Сульфгидрильная	 Цистеин	Две —SH-группы легко окисляются с образованием (—S—S—)-связи (дисульфидная связь); —SH-группы образуют очень слабые водородные связи

Оба эти уравнения можно считать суммой длинного ряда окислительно-восстановительных реакций.

В процессе дыхания органические молекулы, например глюкоза, окисляются молекулярным кислородом с образованием C=O-связей (табл. 2-2). Эти связи содержат *меньше* свободной энергии (т. е. такой энергии, которая может быть использована для совершения определенной работы), чем исходные связи: C—H, C—OH и C—C. Поэтому в процессе дыхания энергия выделяется точно так же, как при сгорании глюкозы в калориметрической бомбе до CO_2 и H_2O с выделением тепла. В процессе фотосинтеза, наоборот, энергия световых квантов используется для восстановления CO_2 с образованием соединений, содержащих *больше* свободной энергии.

Когда эти соотношения удалось выяснить в общих чертах, никто еще четко не представлял себе, как может использоваться энергия, высвобождающаяся в процессе дыхания. Было только ясно, что она должна быть доступной в какой-то удобной форме, чтобы организм мог использовать ее для выполнения различных функций, например для мышечного сокращения или для избирательного переноса молекул через клеточную мембрану. Уже и тогда казалось невероятным, чтобы энергия, доставляемая с пищей, выделялась в форме тепла, так как при физиологических значениях температуры тепловая энергия не может эффективно использоваться для синтеза новых химических связей. Таким образом, вместе с пробуждением интереса к химическим основам жизни возникла и одна из самых важных проблем: каким образом энергия, выделяющаяся в процессе дыхания, переводится в форму, которая может быть использована в организме?

БОЛЬШИНСТВО РЕАКЦИЙ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ ПРОИСХОДИТ БЕЗ ПРЯМОГО УЧАСТИЯ КИСЛОРОДА

Поскольку кислород необходим для жизни животных, естественно было думать, что он непосредственно участвует в окислении всех углеродных соединений. Однако на самом деле большая часть реакций биологического окисления протекает в отсутствие кислорода. Все такие реакции являются по существу реакциями дегидрогенирования (впервые предположение об этом выдвинул еще в 1912 г. немецкий химик Виланд). Соединение окисляется, если из его молекулы удаляется два атома водорода (рис. 2-1). Однако нельзя просто удалить эти атомы; они должны быть перенесены на другую молекулу, которая вследствие этого восстанавливается (рис. 2-2). В таких реакциях, как и во всех реакциях окисления—восстановления, одна молекула всегда окисляется, а другая восстанавливается. Роль акцепторов водорода выполняют несколько различных типов молекул. Это срав-

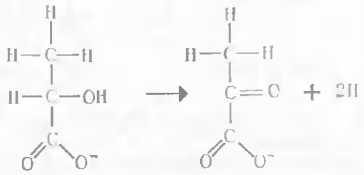


Рис. 2-1. Окисление молекулы органического вещества путем отщепления двух атомов водорода.
Представлено окисление лактата до пирувата.

нительно небольшие (мол. вес ~500) органические молекулы, которые, соединяясь со специфичными белками, образуют активные ферменты. Белковый компонент такого соединения сам по себе не обладает ферментативной активностью. Активность возникает только после присоединения низкомолекулярного «партнера». Небольшие молекулы, от которых зависит активность фермента, называются *коферментами* (отметим, что не все коферменты заняты в реакциях окисления — восстановления; некоторые из них участвуют в других метаболических процессах).

Первые сведения об участии коферментов в реакциях окисления — восстановления появились еще в 1910 г., но только в 30-х годах биохимики осознали, что эти соединения играют важнейшую роль. Благодаря работам выдающегося немецкого биохимика Отто Варбурга, а также двух шведских биохимиков, Эйлера и Теорелла, было выяснено строение и установлен характер действия ряда наиболее важных коферментов, а именно никотинамидадениндинуклеотида (НАД; ранее был известен под названием дифосфопиридиннуклеотид или ДПН; рис. 2-3), флавинмононуклеотида (ФМН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД).

Коферменты, подобно ферментам, не расходуются в процессе реакции и потому могут функционировать многократно. Это объясняется тем, что присоединенные ими атомы водорода не остаются в их молекуле, а переносятся (в следующей реакции окисления — восстановления) на другой кофермент или непосредственно на молекулярный кислород (рис. 2-4). Таким образом, коферменты постоянно окисляются и вновь восстанавливаются. Что же касается кислорода, то, хотя он непосредственно и не требуется для той или иной конкретной реакции, он все же в конечном счете часто бывает необходим, чтобы окислить молекулы кофермента и сделать их вновь пригодными для выполнения их функций — присоединения атомов водорода (или электронов).

РАСПАД ГЛЮКОЗЫ

Много ранних работ по промежуточному обмену было посвящено превращениям глюкозы. Глюкозу изучали не только потому, что она играет ключевую роль в клеточном обмене, но еще и с чисто практической целью, так как этиловый спирт, получаемый в процессе приготовления вина, образуется в результате распада глюкозы. Еще в 1810 г. Гей-Люссак обнаружил, что этиловый спирт образуется при сбраживании глюкозы, а в 1837 г. была установлена роль, которую играют в этом процессе дрожжи. Появление спирта в вине не является спонтанным процессом; обычно спирт образуется только в присутствии живых дрожжевых клеток.

Важную роль в изучении превращений глюкозы сыграли работы Пастера. Он обнаружил, что кислород не нужен для распада глюкозы. Чтобы как-то отличить этот анаэробный процесс от реакций, протекающих с участием кислорода, он присвоил ему особое название *брожение*.

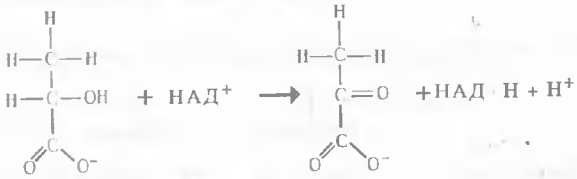


Рис. 2-2. Участие НАД в окислении лактата до пирувата.
НАД служит окислителем, а лактат — донором водорода.

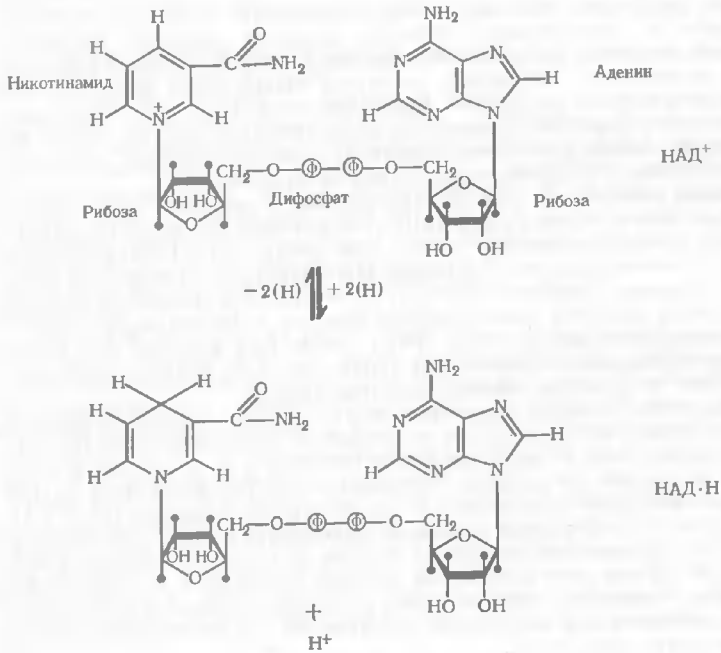


Рис. 2-3. Окисление и восстановление кофермента.
Представлены окисленная (НАД) и восстановленная (НАД·Н) формы очень важного кофермента — никотинамидаденинди нуклеотида. НАД служит акцептором атома водорода, а НАД·Н — донором. Отщепление атомов водорода снижает свободную энергию молекулы, а присоединение, наоборот, увеличивает ее.

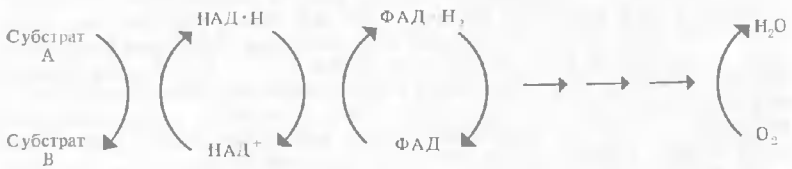


Рис. 2-4. Перенос пары атомов водорода от одного кофермента к другому.
В этой цепи реакций конечным акцептором водорода является кислород (O_2). ФАД — это флавинаденинди нуклеотид, который существует не в свободном состоянии, а в соединении со специфичным белком, с которым он образует флавопротеид.

Пастер показал также, что этиловый спирт не единственный продукт брожения; помимо него, образуются еще молочная кислота и глицерин.

Дальнейшие успехи в этой области связаны с открытием Бюхнера. В 1897 г. Бюхнер обнаружил, что брожение может идти и в отсутствие живых клеток; оказалось, что бесклеточный экстракт дрожжей обладает способностью превращать глюкозу в спирт. Это открытие имело не только теоретическое значение. Благодаря ему исследователи получили систему, на которой было гораздо удобнее изучать отдельные этапы брожения. К бесклеточной системе легко добавлять различные компоненты (которые предположительно участвуют в изучаемой реакции), и при необходимости легко их из нее исключать, тогда как при работе с живыми клетками трудно, а иногда и вообще невозможно добиться того, чтобы то или иное вещество проникло в клетку через клеточную мембрану, не претерпев при этом никаких изменений.

После работ Бюхнера на протяжении 40 лет многие крупные биохимики (в Англии, например, Гарден и Йонг, в Германии — Эмбден и Мейергоф) изучали отдельные этапы распада глюкозы. Все они при этом использовали бесклеточные экстракты дрожжей. В этот период было сделано весьма важное обобщение. Выяснилось, что изученная последовательность реакций (она получила название путь Эмбдена — Мейергофа; рис. 2-5) характерна не только для спиртового брожения, протекающего с участием дрожжей; во многих других случаях использование глюкозы тоже идет по этому пути. Чрезвычайно важное открытие было сделано Мейергофом. Он обнаружил, что в мышце, сокращающейся в отсутствие кислорода, резервный гликоген распадается с образованием глюкозы, которая затем превращается в молочную кислоту (анаэробный *гликолиз*). Таким образом, стало ясно, что энергию для мышечного сокращения поставляет та же цепь реакций (путь Эмбдена — Мейергофа), которая служит источником энергии и углерода у микроорганизмов. Именно в это время начали складываться представления о единстве биохимических процессов. Согласно этим представлениям, основные биохимические реакции, от которых зависит рост и деление клеток, одинаковы или почти одинаковы во всех живых клетках — бактериальных, растительных и животных. Эта мысль была воспринята как нечто совершенно естественное многими вдумчивыми биологами, ибо она непосредственно вытекала из признания теории эволюции. Ведь если человек и рыба произошли от общего предка, то нет ничего удивительного в том, что многие компоненты их клеток одинаковы.

РОЛЬ ФОСФОРА И СИНТЕЗ АТФ

Уже в 1905 г. выяснилось, что фосфор играет важную роль в метаболизме. Изучая спиртовое брожение, Гарден и Йонг обнаружили, что оно может происходить лишь в том случае, если в среде присутствует неорганический фосфат (PO_4^{3-}; в дальнейшем мы будем обозначать символом (Ф) эту группировку, присоединенную к атомам углерода связью —С—О—(Ф)). Вслед за тем был выделен ряд фосфорилированных промежуточных продуктов обмена. Однако значение этих фосфорилированных промежуточных продуктов оставалось неясным еще целых 25 лет. В 1930 г. Мейергоф и Липман установили, что энергия, высвобождаемая при разрыве химических связей в молекулах пищевых веществ, улавливается и запасается в клетке именно благодаря образованию фосфоэфирных связей. В процессе брожения образуются различные промежуточные продукты (например, D-1,3-дифосфоглицериновая кислота), которые содержат так называемые высокоэнергетические фосфатные связи (подробнее об этом см. в гл. V). Высокоэнергетические фосфатные группы (рис. 2-6) обычно переносятся на акцеп-

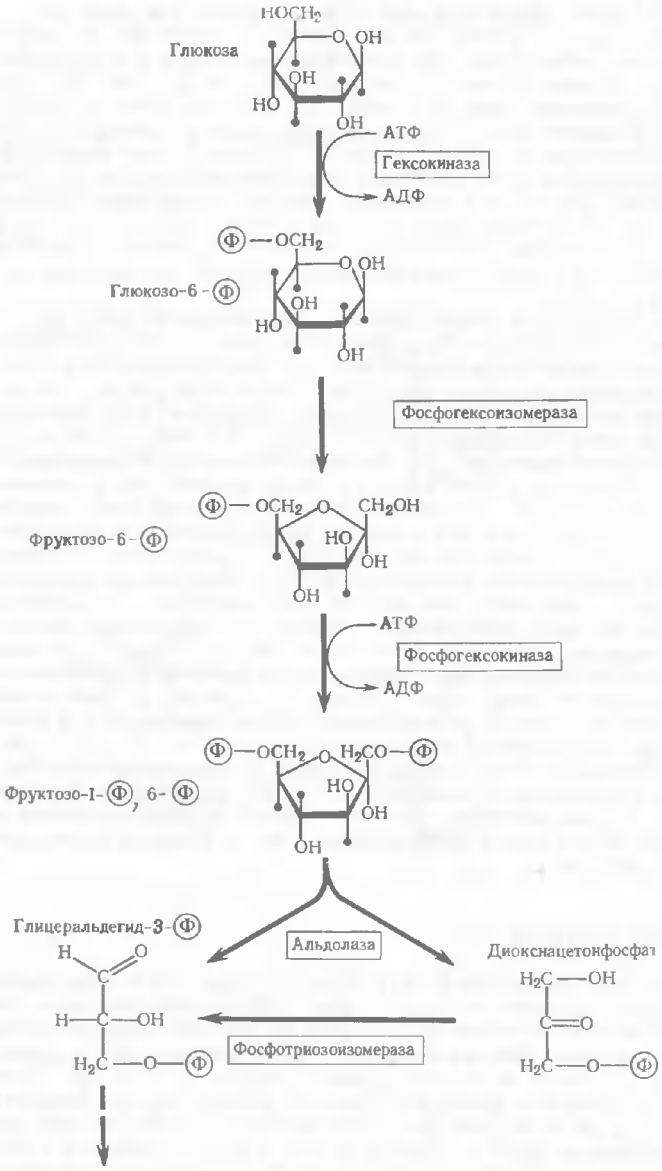


Рис. 2-5. Ступенчатый распад глюкозы до пирувата.
Эту цепь последовательных реакций часто называют путем Эмбдена — Мейергофа.

торные молекулы, где они могут служить источником химической энергии для жизненно важных процессов, например для движения, биолюминесценции или для эффективного биосинтеза необходимых клетке веществ (гл. 5 и 6). Среди таких акцепторов главную роль играет аденозиндифосфат (АДФ; рис. 2-7). В результате присоединения высокоэнергетической фосфатной группы к аденозиндифосфату образуется *аденозинтрифосфат* (АТФ):

$$\text{АДФ} + \text{Ⓟ} \rightleftharpoons \text{АТФ}.$$

Обнаружение того факта, что АДФ играет роль акцептора, а АТФ — роль донора высокоэнергетических фосфатных групп,— одно из важнейших открытий современной биологии. До этого открытия способ, при помощи которого клетка обеспечивает себя энергией, оставался загадкой. Ученые ломали голову над тем, как совместить жизнь со вторым законом термодинамики, согласно которому в замкнутой системе энтропия (мера неупорядоченности) должна непрерывно возрастать. Кажущийся парадокс нашел свое объяснение после того, как выяснилось, каким образом клетка может запасать и использовать энергию, извлеченную из пищевых веществ. В то время еще не были известны механизмы улавливания солнечной энергии в процессе фотосинтеза. Теперь мы знаем, что и солнечная энергия тоже первично аккумулируется путем образования АТФ.

БОЛЬШИНСТВО СПЕЦИФИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ РЕАКЦИЙ КАТАЛИЗИРУЕТСЯ СПЕЦИФИЧНЫМИ ФЕРМЕНТАМИ

Мы теперь знаем, что большинство специфичных метаболических реакций катализируется специфичными ферментами. Однако исследователи пришли к этой мысли лишь после того, как было изучено достаточное число различных метаболических путей. Когда стали известны отдельные этапы распада глюкозы по пути Эмбдена — Мейергофа, то оказалось, что для каждого такого этапа необходим свой особый фермент (рис. 2-5). Каждый фермент проявляет свое действие, вступая в соединение с молекулами, участвующими в реакции (*субстратами* данного фермента). Например, глюкоза и АТФ являются субстратами фермента гексокиназы. Когда они взаимодействуют на поверхности молекулы гексокиназы, концевая фосфатная группа АТФ переносится на молекулу глюкозы и образуется глюкозо-6-фосфат.

Существо действия фермента определяется его способностью ускорять (*катализировать*) реакции, идущие с образованием или с разрывом специфичных ковалентных связей (т. е. таких связей, в которых атомы удерживаются вместе благодаря обобществлению электронов). В отсутствие ферментов ковалентные связи в биологических молекулах по большей части чрезвычайно стабильны и разрываются лишь при высоких (нефизиологических) температурах; так, например, неферментативное окисление глюкозы кислородом идет в сколько-нибудь заметной степени только при температурах порядка нескольких сотен градусов. Следовательно, ферменты должны каким-то образом снижать ту температуру, при которой данная связь утрачивает свою стабильность. Физико-химик сказал бы, что фермент снижает *энергию активации*. Только недавно стало возможным дать объяснение тому, как это происходит на молекулярном уровне. Эта возможность появилась благодаря выяснению для ряда ферментов их трехмерной (пространственной) структуры, что позволило дать убедительные химические теории природы их действия.

Таким образом, у нас нет никаких оснований считать, что ферментативный катализ подчиняется каким-то еще не открытым законам химии. Мы можем привести в качестве примера многие молекулы известной струк-

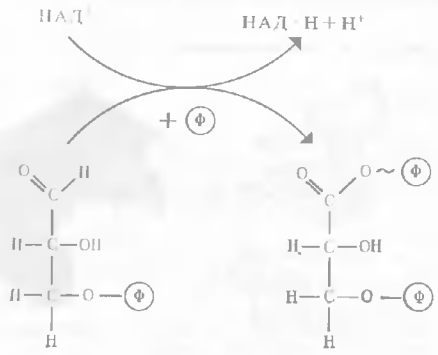


Рис. 2-6. Образование высокоэнергетической фосфоэфирной связи, сопряженное с окислением глицеральдегид-3-фосфата при помощи НАД.

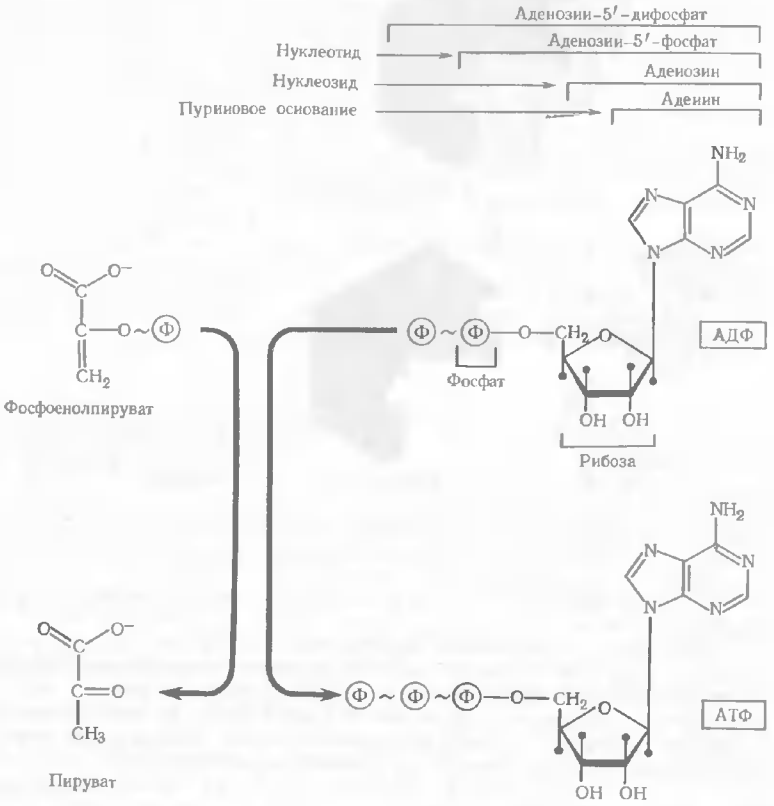


Рис. 2-7. Образование АТФ (аденозин-5′-трифосфата) из АДФ с использованием высокоэнергетической фосфоэфирной связи фосфоенолпирувата.
Символ ~ означает высокоэнергетическую связь.

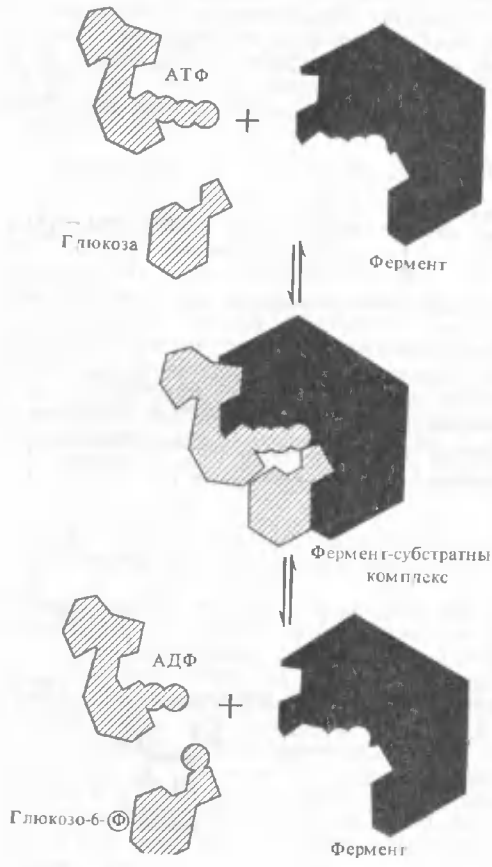


Рис. 2-8. Образование фермент-субстратного комплекса и продуктов реакции.

туры, которые способны ускорять неферментативные реакции между другими молекулами.

Очень важная особенность ферментов состоит в том, что они не расходуются в процессе реакции. Когда реакция заканчивается, фермент высвобождается; после этого он может присоединять новые молекулы субстрата, т. е. функционировать вновь (рис. 2-8). По биологической шкале времени (секунды — годы) ферменты работают чрезвычайно быстро: некоторые из них катализируют до 10^6 превращений в минуту (в отсутствие фермента за этот срок может вообще не произойти ни одного эффективного столкновения молекул субстрата).

Однако не все ферментативные реакции специфичны. Существует, например, ряд ферментов, катализирующих распад различных белков до аминокислот. Эти ферменты специфичны лишь в том смысле, что они катализируют распад ковалентной связи определенного типа, в данном случае пептидной связи, и совсем не способны осуществлять, скажем, гидролиз фосфодиэфирной связи в молекулах нуклеиновых кислот.

КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ ПИРУВАТА [1]. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПИРУВАТА В ЦИКЛЕ КРЕБСА

Одновременно с изучением брожения и гликолиза предпринимались попытки выяснить механизм образования АТФ в присутствии кислорода. Когда удалось определить количество АТФ, образующееся в процессе брожения и гликолиза, стало ясно, что оно очень мало по сравнению с общим количеством АТФ, которое клетка продуцирует в аэробных условиях. Это означает, что синтез АТФ в аэробных условиях не прекращается на стадии пирувата и что пируват сам подвергается дальнейшим превращениям с участием кислорода и освобождением энергии.

Понять, как это происходит, помогли открытия, сделанные Сцент-Дьёрдьи, Марциусом и Кребсом. Эти исследователи обнаружили существование особого цикла реакций (мы называем его теперь *циклом Кребса*). В результате этих реакций происходит окислительный распад пирувата с образованием CO_2 и отщеплением нескольких пар атомов водорода, которые акцептируются окисленными коферментами. Прежде чем вступать в цикл Кребса, пируват превращается в ацетил-КоА. (Ранее, когда это соединение еще не было идентифицировано, его называли «активным ацетатом»; химическую его природу выяснил Липман в 1949 г.; рис. 2-9.) Ацетил-КоА соединяется с оксалоацетатом, что приводит к образованию цитрата. За этим следует еще ряд этапов (не менее девяти; рис. 2-10), которые в общей сложности дают две молекулы CO_2 и четыре пары атомов водорода. Эти пары атомов водорода никогда не существуют в свободном состоянии: отщепляясь, они непосредственно передаются на молекулы специфичных коферментов.

Таким образом, цикл Кребса можно рассматривать как специальный механизм для расщепления ацетил-КоА на два типа продуктов: двуокись углерода — продукт полного окисления, не могущий служить источником энергии, и восстановленные коферменты, окисление которых у организма, растущего в аэробных условиях, является главным источником энергии.

ОКИСЛЕНИЕ ВОССТАНОВЛЕННЫХ КОФЕРМЕНТОВ ДЫХАТЕЛЬНЫМИ ФЕРМЕНТАМИ

В цикле Кребса не участвует молекулярный кислород. Он включается в процесс позже, после ряда дополнительных окислительно-восстановительных реакций, в которых атомы водорода (или электроны) переносятся с помощью целого ряда сопряженных между собой ферментов, содержащих атомы железа и часто объединяемых под общим названием дыхательные ферменты.

Первые указания на существование этих ферментов были получены еще в конце XIX в., однако значение этой группы биокатализаторов удалось должным образом оценить лишь в период с 1925 по 1940 г. Этим мы обязаны главным образом Варбургу, а также Давиду Кейлину. Еще до сегодняшнего дня не вполне точно установлено число ферментов, участвующих в этих реакциях. Однако правильность общей картины не вызывает сомнения. На рис. 2-11 представлена в общем виде цепь дыхательных реакций.

Процесс дыхания состоит из ряда сопряженных окислительно-восстановительных реакций, каждая из которых сопровождается выделением энергии. Следовательно, энергия, заключенная

[1] Названия «пируват» и «пировиноградная кислота» обычно употребляются как синонимы. Строго говоря, пируват — это отрицательно заряженный ион. Точно так же молочную кислоту часто называют лактатом, глутаминовую — глутаматом, лимонную — цитратом и т. д.

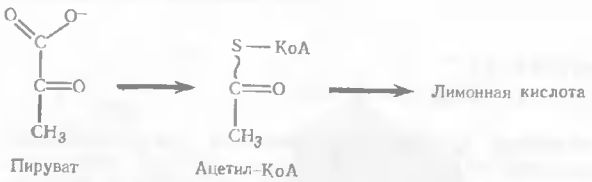


Рис. 2-9. Превращение пирувата в ацетил-КоА.
В действительности это превращение протекает через ряд стадий, в которых принимают участие тиаминпирофосфат и липоевая кислота. Ацетил-КоА является очень важным промежуточным продуктом и образуется не только из глюкозы через пируват, но также и в результате распада жирных кислот.

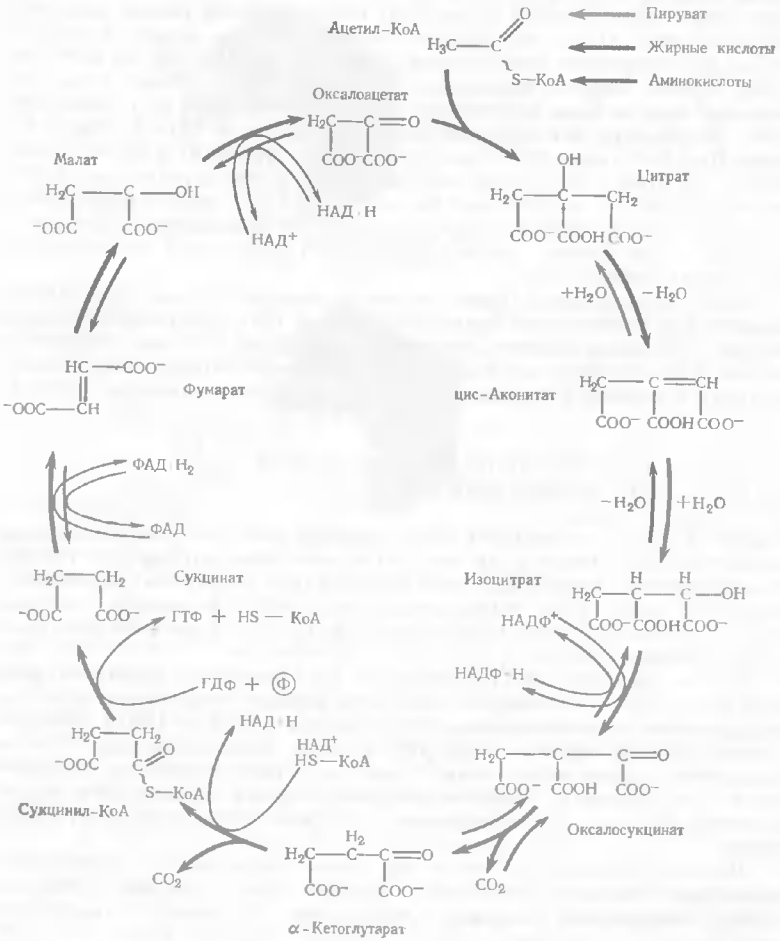


Рис. 2-10. Цикл лимонной кислоты (часто называемый циклом Кребса).

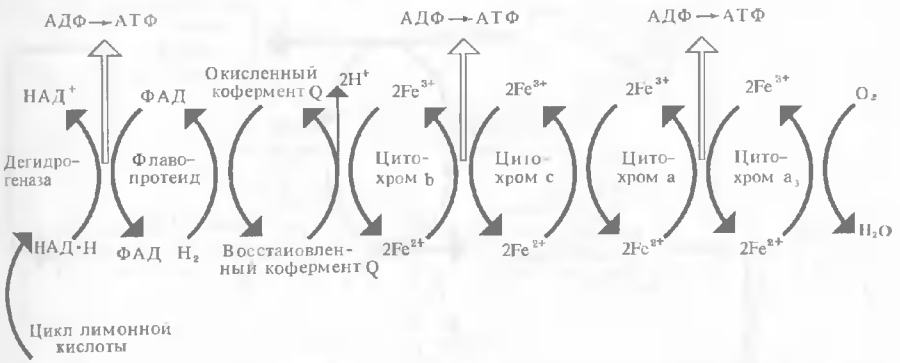


Рис. 2-11. Дыхательная цепь.
Схематически представлены окислительно-восстановительные реакции, в которых высвобождается небольшими порциями энергия, запасенная в НАД·Н. Пока еще не установлено, все ли цитохромы функционируют в одном цикле. Окончательно не определено также, на каких этапах происходит образование АТФ.

в молекулах восстановленных коферментов, выделяется не вся сразу, а небольшими порциями. Если бы НАД·Н непосредственно окислялся молекулярным кислородом, то выделялось бы большое количество энергии и этот процесс не мог бы быть эффективно сопряжен с образованием высокоэнергетических связей АТФ.

ОБРАЗОВАНИЕ АТФ В ПРИСУТСТВИИ КИСЛОРОДА (ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ)

С 1925 по 1940 г. биохимики изучали главным образом судьбу атомов водорода (или электронов) в реакциях окисления — восстановления, сопряженных с освобождением энергии. Лишь в конце этого периода они заинтересовались вопросом о том, в какой форме выделяется эта энергия. В 1938—1940 гг. датский исследователь Калькар и русский ученый Белицер обнаружили в бесклеточной системе образование АТФ, сопряженное с окислительно-восстановительными реакциями.

Ближайшие годы не принесли, однако, быстрых успехов, так как большую часть ферментов, участвующих в этих реакциях, не удавалось выделить в чистом виде. Эти трудности были преодолены лишь после того, как было показано, что местом *окислительного фосфорилирования* в растительных и животных клетках являются крупные, сложно организованные субклеточные частицы — *митохондрии*. В опытах с интактными митохондриями легко наблюдать окислительное фосфорилирование с образованием АТФ; этот феномен впервые продемонстрировали в 1947 г. американские ученые Ленинджер и Кеннеди. В настоящее время доказано, что при прохождении через дыхательную цепь одной пары атомов водорода образуется три молекулы АТФ. Однако есть основания думать, что дыхательная цепь состоит по меньшей мере из шести отдельных окислительно-восстановительных стадий. Возможно, в дальнейшем окажется, что на каждой такой отдельной стадии образуется по одной молекуле АТФ.

Грубые подсчеты показывают, что в дыхательных процессах выделяется в 20 раз больше энергии, чем при первичном распаде глюкозы до пиро-

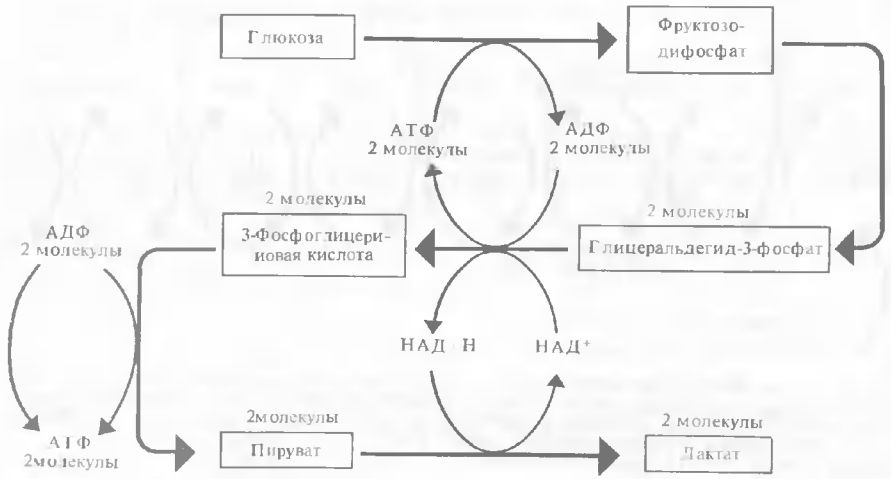


Рис. 2-12. Сбраживание глюкозы до молочной кислоты.
НАД·Н, возникший в процессе образования пирувата, окисляясь, восстанавливает пируват до лактата. В присутствии кислорода НАД·Н окисляется в дыхательной цепи и лактат не образуется.

виноградной кислоты. Именно этим объясняется более эффективный рост клеток в аэробных условиях по сравнению с анаэробными. В отсутствие кислорода пируват не может накапливаться, так как его образование (рис. 2-5) зависит от присутствия невосстановленного НАД. Между тем количество последнего в клетках точно так же, как и количество других коферментов, очень невелико. При окислении глюкозы в отсутствие кислорода НАД быстро превращается в НАД·Н. Таким образом, для непрерывного образования АТФ в отсутствие кислорода (при брожении) должно происходить окисление восстановленного НАД·Н. Часто это окисление идет за счет восстановления самого пирувата, для которого НАД·Н служит донором водорода. Именно этим объясняется образование молочной кислоты как в процессах анаэробного роста многих бактерий, так и при анаэробном сокращении мышц (рис. 2-12).

ОБРАЗОВАНИЕ АТФ В ПРОЦЕССЕ ФОТОСИНТЕЗА

Известно, что источником пищи для микроорганизмов и животных служат в конечном счете зеленые растения. Следовательно, солнечная энергия должна каким-то образом превращаться в энергию химических связей. Как именно это происходит, не удавалось выяснить до тех пор, пока не была изучена в общих чертах энергетика бактериальной и животной клетки. В 1959 г. главным образом благодаря работам американского биохимика Арнона было установлено, что первичное действие световых квантов заключается в фосфорилировании АДФ до АТФ.

Это фосфорилирование происходит в хлоропластах — сложных, содержащих хлорофилл частицах, которые найдены в большинстве клеток, способных использовать солнечную энергию. Таким образом, регулируе-

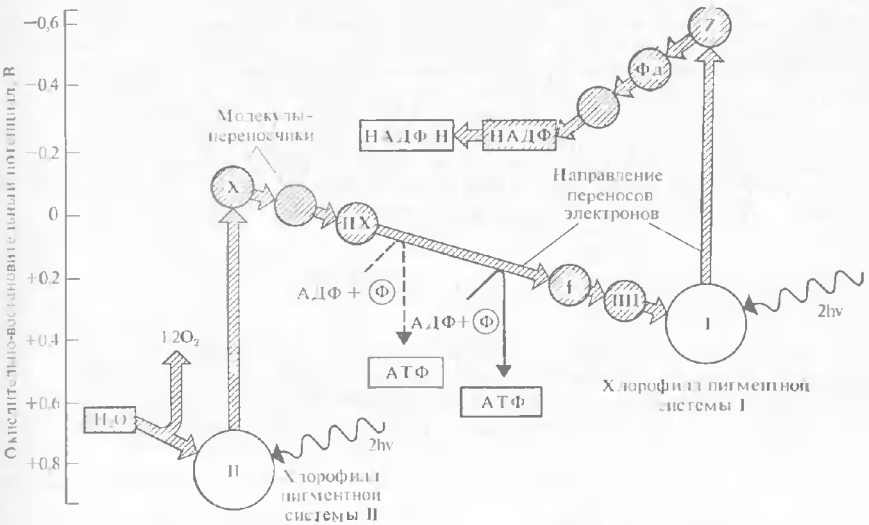


Рис. 2-13. Общая схема движения пары электронов от воды к НАДФ, сопряженного с образованием одной или, возможно, двух молекул АТФ в процессе фотосинтеза.
Образующиеся НАДФ·Н и АТФ используются для включения CO_2 в углеводы. Электрон, возбужденный при поглощении фотона пигментной системой II, проходит затем через ряд молекул переносчиков в ходе окислительно-восстановительных реакций к хлорофиллу пигментной системы I. Здесь он замещает электрон, который освобождается после поглощения еще одного фотона, а затем проходит через другой ряд переносчиков и восстанавливает НАДФ. АТФ синтезируется где-то между переносчиками ПХ и f. Электрон, освобождающийся в системе II, замещается электроном воды, что сопряжено с выделением кислорода. (ПХ — пластохинон, f — цитохром *f*, ПЦ — пластоцианин, Фд — ферредоксин).

мое освобождение энергии в растениях зависит от того же носителя энергии, что и в бактериальных и животных клетках,— АТФ. Детали этого фундаментального процесса остаются еще неизвестными. Первичным актом должно быть поглощение светового кванта молекулой зеленого пигмента хлорофилла и перевод одного из ее электронов на более высокий энергетический уровень.

Затем эта энергия каким-то еще не совсем понятным образом постепенно освобождается в цепи сопряженных окислительно-восстановительных реакций при участии определенных молекул цитохромов (рис. 2-13). Таким образом, оказывается, что окислительное фосфорилирование и фотофосфорилирование являются поразительно сходными процессами; принципиальное различие между ними заключается только в способе первоначального поступления энергии.

Важно подчеркнуть уникальный характер фотосинтеза — это единственный процесс, при котором клетка использует энергию, отличную от энергии химических связей. Все остальные важнейшие клеточные реакции сопровождаются уменьшением количества энергии, заключенной в химических связях. На первый взгляд представляется правдоподобным, что способность к фотосинтезу была присуща самым первым, примитивным формам жизни. Однако трудно допустить, чтобы у этих ранних форм жизни имелись столь сложные структуры, как хлоропласты (которые,

как мы знаем, необходимы для фотосинтеза). Гораздо больше оснований полагать, что на заре истории Земли сама химическая среда обеспечивала образование большого числа углеродсодержащих соединений за счет использования солнечной энергии. Эти спонтанно возникшие органические молекулы служили источником энергии и пищей для ранних форм жизни. Когда масса живого вещества увеличилась, а запасы этих молекул истощились, начался бурный отбор таких клеток, в которых возникли фотосинтезирующие структуры, способные вырабатывать органические молекулы. В наше время практически вся глюкоза образуется за счет энергии, улавливаемой в процессе фотосинтеза.

ХИМИО-ОСМОТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ОБРАЗОВАНИЯ АТФ ИЗ АДФ И ФОСФАТА

Сначала казалось очевидным, что энергия, которая освобождается в окислительно-восстановительных реакциях с участием цитохромов, мгновенно запасается в форме богатых энергией соединений, способных фосфорилировать АДФ до АТФ. Однако примерно двадцать лет поисков не дали

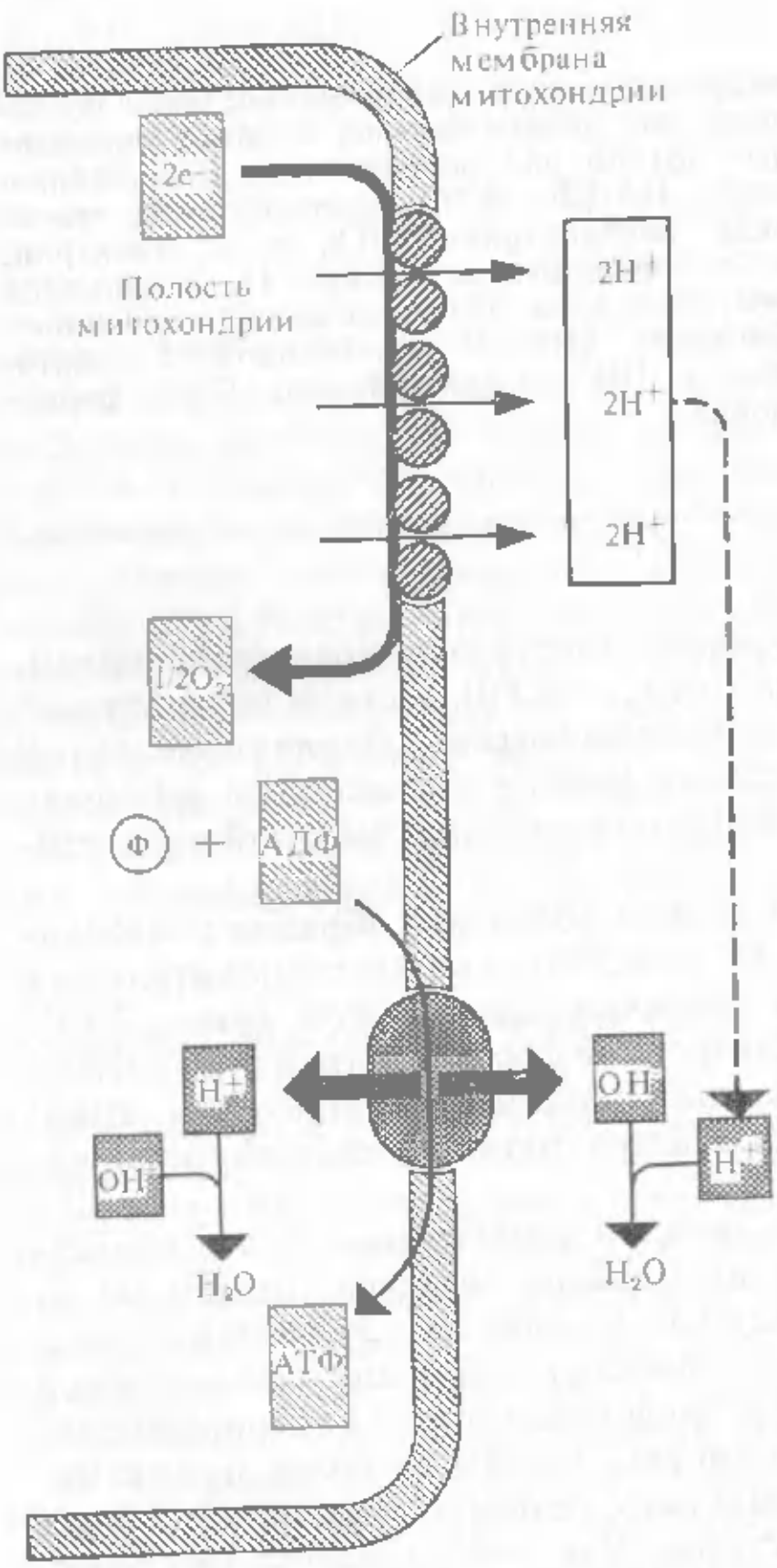


Рис. 2-14. Общая схема, иллюстрирующая химио-осмотическую теорию образования АТФ из АДФ и Ф.
Два электрона проходят по цепи связанных с мембраной цитохромов, и в результате возникает градиент ионов водорода, направленный перпендикулярно поверхности мембраны. Этот градиент затем обеспечивает синтез АТФ, сопряженный с образованием воды.

доказательств существования хотя бы одного такого промежуточного соединения. Непонятно было также наблюдение, что только интактные митохондрии и хлоропласты образуют АТФ. Для сопряжения окислительно-восстановительных реакций и образования АТФ необходимы неповрежденные наружные мембраны. Разрешение этих неожиданных затруднений было достигнуто в начале 60-х годов благодаря работам английского биохимика Питера Митчелла. Он предположил, что цитохромы в мембранах располагаются таким образом, что это приводит к образованию градиентов ионов H^+, причем с внешней стороны мембраны митохондрий (хлоропластов) создается более высокая концентрация ионов H^+, чем с внутренней. Отдельные цитохромные компоненты располагаются так, что при прохождении каждой пары электронов по дыхательной цепи от НАД к O_2 три пары ионов H^+ перемещаются наружу; благодаря этому и создаются градиенты. Они используются затем для обеспечения энергией реакции соединения АДФ и фосфата с образованием АТФ (рис. 2-14). Это объяснение, известное как *химио-осмотическая теория*, было вначале весьма скептически встречено биохимиками, привыкшими к поиску все новых богатых энергией промежуточных продуктов. В настоящее время, однако, идея Митчелла признана одним из важных теоретических достижений современной биохимии.

ВИТАМИНЫ И ФАКТОРЫ РОСТА

Хотя и существует ряд микроорганизмов, способных довольствоваться глюкозой в качестве единственного источника энергии и углерода (примером может служить *E. coli*), для всех высших животных и некоторых бактерий одной глюкозы недостаточно. Так, например, в организме крысы не могут синтезироваться 11 из 20 аминокислот, входящих в состав его белков, и, значит, в пищевой рацион этого животного должны входить определенные количества этих 11 аминокислот.

Помимо таких веществ (необходимых факторов роста), выполняющих важную роль в построении структурной основы клеток, многим организмам часто требуются в очень малых количествах те или иные специфичные органические соединения. Эти соединения были названы витаминами. В течение многих лет их функция оставалась загадочной. Теперь мы знаем, что витамины тесно связаны с коферментами. Некоторые из них сами функционируют как коферменты, а другие являются предшественниками коферментов (например, витамин ниацин используется для синтеза НАД). Тот факт, что коферменты, подобно ферментам, способны функционировать многократно, объясняет, почему витамины нужны только в следовых количествах.

Таким образом, сама потребность в том или ином веществе как в факторе роста или витамине не представляет собой чего-то необычного; с химической точки зрения она легко объяснима. По всей вероятности, в процессе эволюции какие-то гены, контролирующие синтез определенных веществ, утрачивались, и вследствие этого возникала потребность в доставке этих веществ извне, с пищей. Сохранение гена, обеспечивающего синтез какого-либо вещества, в избытке имеющегося в пище, не давало бы организму никакого преимущества в отборе.

ЛАБИЛЬНОСТЬ БОЛЬШИХ МОЛЕКУЛ

Биохимики добились выдающихся успехов в изучении свойств малых молекул, например аминокислот и нуклеотидов. С макромолекулами до 1950 г. дело обстояло значительно хуже. Единственным подлинным

достижением было исследование некоторых полисахаридов, например гликогена. Полисахариды более доступны для изучения, так как это регулярные полимеры, построенные из одинаковых субъединиц — молекул глюкозы. Однако выяснение строения полисахаридов не оказало большого влияния на развитие биологии. В структурном отношении полисахариды мало интересны; единственная их роль заключается в том, что они служат резервом глюкозы. Значительно больший интерес вызывали белки и нуклеиновые кислоты: первые — потому что многие из них являются ферментами, а вторые — потому что им приписывали важную роль в механизме наследственности. Однако долгое время ни те, ни другие не поддавались изучению.

Главным препятствием оказывалась малая устойчивость этих соединений по сравнению с обычными низкомолекулярными веществами. При повышенных значениях температуры и нефизиологических значениях pH состояние их изменяется (происходит так называемая *денатурация*) и они нередко выпадают из раствора в неактивной форме. Поэтому при их выделении необходимо соблюдать большие предосторожности; часто всю процедуру выделения проводят при температурах, близких к 0°. Вначале думали, что только белки подвержены денатурации, однако в настоящее время ясно, что и нуклеиновые кислоты денатурируются в процессе выделения, если не принимать необходимых мер.

До 1945 г. при изучении низкомолекулярных веществ основным орудием исследователя были обычные методы органической химии. Поэтому успех биохимика, изучающего промежуточный обмен веществ, часто зависел от его опыта в области органической химии. Однако в работе с белками и нуклеиновыми кислотами на первых этапах исследования вообще невозможно было прибегать к аналитическим методам органической химии. Прежде чем приступить к изучению структуры белка, исследователь должен был потратить очень много труда, чтобы убедиться в том, что ему удалось получить, во-первых, химически чистый и, во-вторых, биологически активный материал. Для этого прежде всего требовалось разработать специальные методы выделения белков, исключающие обычное для органического анализа использование кислот и щелочей. Затем нужно было иметь методы, дающие возможность судить о гомогенности продукта и о размерах молекул. При этом, естественно, нельзя было обойтись без физической химии; в результате возникла новая область — исследование физико-химических свойств макромолекул в растворах. Эта область занималась, например, такими вопросами, как осмотические свойства растворов макромолекул и движение макромолекул в электрическом и центробежном полях.

Вероятно, самым важным вкладом физической химии в изучение биологических макромолекул было изобретение в 1920 г. ультрацентрифуги (т. е. центрифуги с большими скоростями вращения, что обеспечивает быструю седиментацию белков и нуклеиновых кислот). Этот прибор изобрел шведский ученый Сведберг, именем которого названа единица седиментации (ее обозначают символом S). Ультрацентрифуги, снабженные оптической системой регистрации, позволяют точно измерять скорость седиментации молекул в растворе. Это дало возможность определить молекулярные веса ряда белков и прийти к заключению, что белки, подобно низкомолекулярным соединениям биологического происхождения, представляют собой дискретные (в отношении веса и формы) классы молекул. Одновременно было показано, что молекулярные веса белков сильно варьируют в пределах от 10 000 до 1 000 000.

ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИИ

В начале XX в. работами выдающегося немецкого химика Эмиля Фишера было установлено, что молекулы белков построены из аминокислот, соединенных между собой пептидными связями. Однако выяснение точного порядка расположения аминокислот в белках оставалось до 1951 г. неразрешимо трудной задачей. Это объяснялось частично тем, что встречающиеся в природе 20 различных аминокислот входят в состав различных белков в разных соотношениях. До 1942 г. проблема разделения и идентификации аминокислот представлялась очень сложной и поэтому большинство химиков-органиков предпочитало работать с более простыми молекулами.

Положение резко изменилось в 1942 г., когда английские ученые Мартин и Синдж изобрели метод разделения аминокислот в двух разных растворителях (распределительная хроматография). Особенно плодотворной оказалась методика разделения на полосках бумаги. Благодаря ей количественный анализ аминокислотного состава белков превратился в обыденную лабораторную процедуру. Новыми методами немедленно воспользовался английский биохимик Сэнгер. Он применил их для выяснения первичной структуры белкового гормона инсулина (гл. 4). Работа Сэнгера явилась важной вехой на пути изучения белков. Она показала, что каждый индивидуальный тип белковых молекул характеризуется определенной последовательностью аминокислот.

КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКА

Не менее важную роль сыграло использование рентгеноструктурного анализа. Метод рентгеноструктурного анализа основан на дифракции рентгеновских лучей кристаллами; исследование дифракционных картин позволяет получить данные о расположении в пространстве всех атомов изучаемой структуры. Первый успех в применении рентгеноструктурного анализа связан с именем английского ученого Брэгга, исследовавшего в 1912 г. структуру кристаллов NaCl. Этот успех немедленно вызвал к жизни поток новых исследований на более сложных объектах.

В ранних работах по рентгеноструктурному анализу малых молекул поступали следующим образом: сначала строили предположения относительно возможной структуры и расчетным путем получали дифракционные картины для этой структуры, а затем сопоставляли опытные и расчетные данные. Такой способ вполне практичен, когда речь идет об относительно простых структурах, но обычно он оказывается непригодным при исследовании более сложных молекул. Потребовалась вся огромная проницательность, проявленная Брэггом, а также крупным американским химиком Полингом, чтобы выяснить (в 20-х годах) структуру некоторых сложных неорганических силикатов. Было ясно, однако, что молекулы белков слишком сложны для того, чтобы их трехмерную структуру могли «угадать» даже самые лучшие химики. Исследователи, изучавшие белки при помощи рентгеноструктурного анализа, отдавали себе отчет в том, что до появления каких-либо новых методов они так и не смогут удовлетворить любопытство биохимиков, жаждущих узнать, что же все-таки представляют собой белки.

Первые серьезные исследования белков методом рентгеноструктурного анализа начались в середине 30-х годов в лаборатории Бернала в Кембридже (Англия). Здесь было показано, что очень хорошие результаты часто можно получить, если вести работу не с сухими, а с влажными кристаллами белка. К сожалению, в то время еще не представлялось возможным дать логически обоснованное истолкование полученных данных. И тем не менее ученик Бернала, Перутц, предпринял начиная

с 1937 г. настойчивые исследования с целью установить структуру белка гемоглобина. Гемоглобин был выбран по ряду причин — не только потому, что это важнейший белок животных, но также еще и потому, что его легко получить в значительных количествах и что он образует кристаллы, которые прекрасно подходят для рентгеноструктурного анализа. Однако многие годы ни Перутцу, работавшему с гемоглобином, ни Кендрью, начавшему в 1947 г. изучать мышечный белок миоглобин, не удавалось получить существенных результатов. Миоглобин, подобно гемоглобину, способен соединяться с кислородом, но обладает тем преимуществом, что его молекулы в 4 раза меньше (мол. вес 17 000).

В течение всего этого бесплодного периода можно отметить лишь одно достижение. Полинг, исходя из стереохимических соображений, сделал правильное предположение, что аминокислоты, связанные в полипептидную цепь, должны стремиться к образованию спиральных конфигураций; развивая эту мысль, он в 1951 г. указал, что спиральная конфигурация цепи, которую он назвал α-спиралью (более подробно об этом см. в гл. 4), должна быть важнейшим элементом в белковой структуре. Правильность теории Полинга была вскоре подтверждена Перутцем, который показал, что синтетические полипептиды, построенные из остатков только одной аминокислоты, существуют в виде α-спиралей.

Лишь к 1959 г. Перутц и Кендрью добились успеха. В 1953 г. было сделано важнейшее открытие: оказалось, что присоединение тяжелого атома (металла) к молекуле белка обеспечивает возможность расшифровки дифракционных картин и, следовательно, выяснение истинной структуры. В течение нескольких последующих лет (главным образом благодаря быстродействующим электронным вычислительным машинам) эти методы использовались в таких масштабах, о которых ранее нельзя было и мечтать. Вскоре, к великой радости всех исследователей, удалось выяснить структуру миоглобина и гемоглобина. Обе молекулы оказались чрезвычайно сложными. Выяснилось, что некоторые участки цепей обнаруживают конфигурацию α-спирали, тогда как другие не имеют какой-либо регулярной структуры. Наряду с этим было показано, что конфигурация этих макромолекул подчиняется тем же химическим законам, которые определяют форму молекул меньших размеров. Следовательно, в построении белковых молекул не было обнаружено каких-либо новых закономерностей, до того не встречавшихся в природе. Впрочем, для биохимиков это не было неожиданностью.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ «АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ» ФЕРМЕНТОВ

На протяжении десятилетий химики-органики занимались умозрительными рассуждениями на тему о том, каким образом боковые цепи определенных аминокислот могли бы ускорять химические реакции, но только детальное изучение трехмерной структуры ферментов могло дать убедительное объяснение их каталитического действия. Впервые это было сделано в Лондоне в 1967 г., когда Филлипс и его сотрудники из Королевского института расшифровали структуру фермента лизоцима. Знание трехмерной конформации молекулы фермента позволило им предложить точный химический механизм, с помощью которого лизоцим расщепляет определенные полисахаридные цепи на составляющие их остатки сахара. Эта работа наряду с аналогичными работами других ученых (в настоящее время установлена конформация свыше пятидесяти ферментов) продемонстрировала, что химические механизмы реакций, катализируемых ферментами, могут быть изучены так же подробно, как и наиболее известные реакции в органической химии.

Особенно изящным было однозначное установление механизма действия ряда протеолитических ферментов, катализирующих разрыв определенных связей в белковых цепях. Как показало проведенное в последнее время изучение трехмерной структуры трипсина и химотрипсина, форма их молекул весьма сходна, а их активные центры содержат много одинаковых аминокислот. Три из этих аминокислот, а именно серин, гистидин и аспарагиновая кислота, непосредственно участвуют в каталитическом акте, и каждый из остатков выполняет одну и ту же функцию в обоих ферментах (рис. 2-15). Теперь мы понимаем, что данные об аминокислотной последовательности сами по себе редко дают содержательную информацию о том, как функционирует белок. Поэтому все возрастающее число ученых, занимающихся химией белка, становятся специалистами по рентгеноструктурному анализу, чтобы удержаться на переднем крае своей области науки.

ОТКРЫТИЕ ЭВЕРИ: НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ МОГУТ СЛУЖИТЬ НОСИТЕЛЯМИ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

До 1944 г. число химиков, работавших с нуклеиновыми кислотами, было совершенно ничтожным по сравнению с отрядом, штурмовавшим проблему белка. Было известно, что существуют две нуклеиновые кислоты: *дезоксирибонуклеиновая кислота* (ДНК) и *рибонуклеиновая кислота* (РНК), однако строение их в то время еще не было выяснено даже в самых общих чертах. ДНК была обнаружена только в ядрах, но, несмотря на это, большинство исследователей считало, что она, вероятно, не является генетическим веществом, ибо химики полагали, что все четыре типа нуклеотидов (гл. 3) присутствуют в молекуле ДНК в эквимолярных количествах, а сама молекула построена, подобно гликогену, из одинаковых повторяющихся структур (тетрануклеотидная гипотеза).

В середине 30-х годов шведские химики Хаммарстен и Касперсон при помощи физико-химических методов обнаружили, что у препаратов ДНК, приготовленных в мягких условиях, молекулярный вес превышает 500 000, а это, как известно, больше, чем молекулярный вес большинства белков. В это же самое время американец Стэнли и англичане Боуден и Пири выделили ряд вирусов растений и на основе их анализа высказали предположение, что все вирусы содержат нуклеиновые кислоты. Это уже наводило на мысль о том, что нуклеиновые кислоты могут выполнять генетические функции.

Однако первое подлинное доказательство генетической роли нуклеиновых кислот было получено несколько позднее в работе известного американского микробиолога Эвери и его сотрудников Мак-Леода и Мак-Карти из Рокфеллеровского института в Нью-Йорке. В 1944 г. они сделали важное открытие — показали, что генетические свойства пневмококков могут быть специфически изменены с помощью высокомолекулярной нативной ДНК.

Это открытие, хотя следствия его были оценены не сразу, резко стимулировало более детальное химическое исследование нуклеиновых кислот. Биохимик Чаргафф, воспользовавшись методом распределительной хроматографии на бумаге, изучил нуклеотидный состав молекул ДНК из ряда различных источников. В 1947 г. он установил, что количества четырех нуклеотидов в молекулах ДНК неодинаковы и что соотношение между ними в ДНК разных видов организмов различно. Эти данные показали, что различия между молекулами ДНК более значительны, чем это допускалось гипотезой тетрануклеотидного строения. Отсюда естественно вытекало предположение, что порядок расположения нуклеотидов в молекуле как-то связан с ее генетической специфичностью.

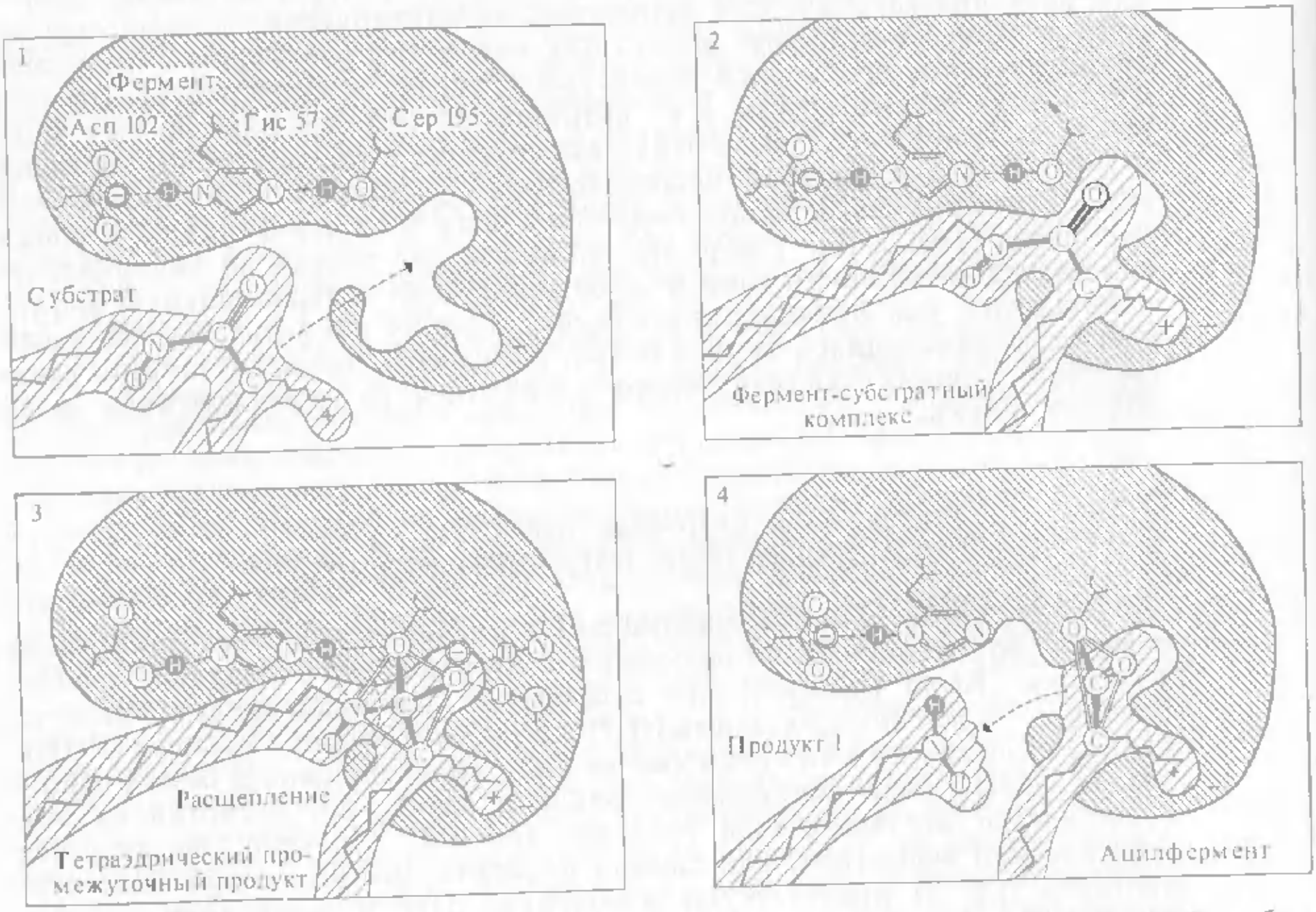
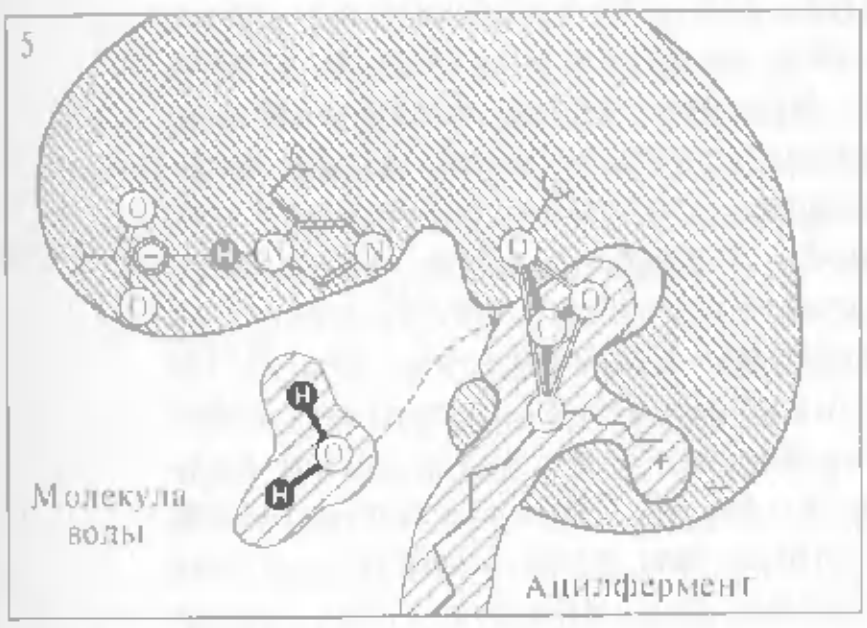


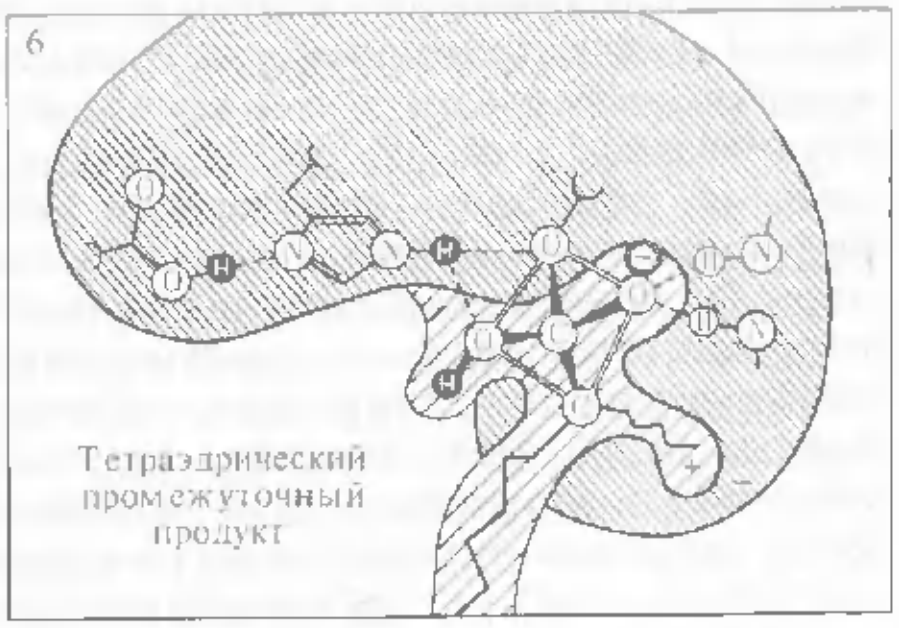
Рис. 2-15. Участие определенных аминокислотных остатков трипсина в каталитическом расщеплении пептидной связи (R. Stroud, Scientific American, июль 1974).
Механизм каталитического действия трипсина способствует формированию промежуточных состояний реакции и облегчает переход от одного промежуточного состояния к другому, что в конечном итоге приводит к ускорению гидролиза пептидной связи. Сначала фермент и субстрат должны сблизиться (*1*) и образовать правильно ориентированный комплекс (*2*). Затем атом кислорода серина 195 ковалентно связывается с углеродом субстрата и в результате образуется тетраэдрический промежуточный комплекс (*3*); протон серина 195 переносится на азот субстрата. При переносе протона пептидная связь расщепляется и освобождается первый продукт (*4*). Оставшийся комплекс называется ацилферментом; при его

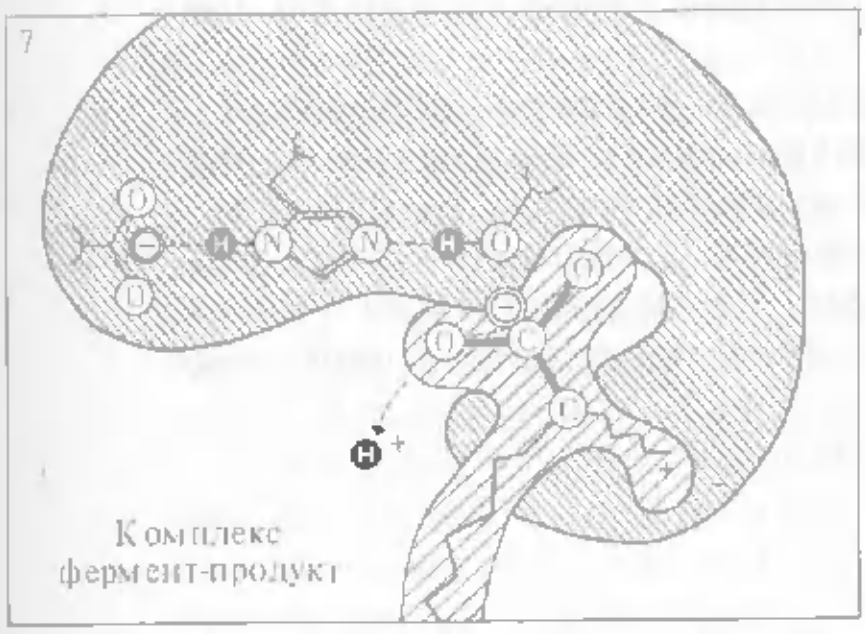
В последующие несколько лет исследования Чаргаффа показали, что относительное содержание четырех оснований не является случайным. Количество аденина в препаратах ДНК всегда было равно количеству тимина, а количество гуанина — количеству цитозина. Однако фундаментальное значение этих взаимоотношений не могло быть надлежащим образом оценено до тех пор, пока исследователи не обратились к изучению трехмерной структуры ДНК.

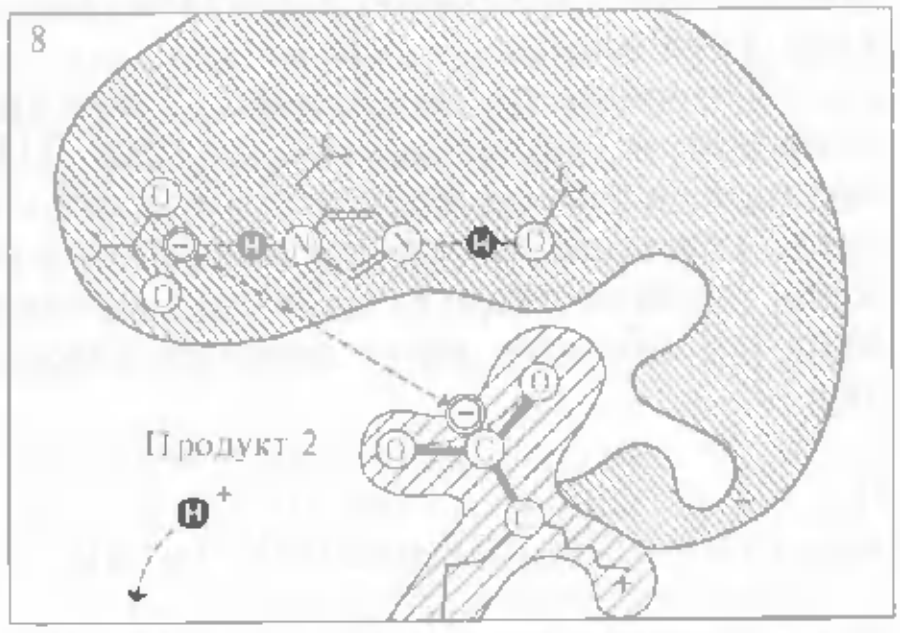
ДВОЙНАЯ СПИРАЛЬ

Одновременно с первыми немногочисленными работами по рентгеноструктурному анализу белков были предприняты еще более робкие попытки заняться расшифровкой рентгенограмм ДНК. Первые рентгенограммы ДНК на препаратах, приготовленных Хаммарстеном и Касперсоном, получил еще в 1938 г. английский ученый Астбюри, но лишь в послевоенные годы (1950—1952) Уилкинс и Франклин, работавшие в Королевском колледже в Лондоне, добились получения высококачественных рентгено-









расщеплении в ходе реакций, являющихся симметричными по отношению к реакциям первой половины каталитического процесса, происходит регенерация свободного фермента. В реакцию вступает молекула воды (*5*), ее гидроксильная группа присоединяется к остатку молекулы субстрата, что приводит к образованию еще одного тетраэдрического промежуточного комплекса (*6*). Ион водорода молекулы воды переносится на серин 195, при этом ковалентная связь между ферментом и субстратом расщепляется (*7*). В результате образуется второй продукт реакции (*8*); его удаление ускоряется благодаря отталкиванию между отрицательно заряженными карбоксильными группами продукта и аспарагиновой кислоты 102. Гистидин 57 и аспарагиновая кислота 102 принимают участие в переносах протона.

грамм ДНК. Однако в то время еще не была полностью выяснена природа химических связей между нуклеотидами, из которых построена молекула ДНК. Выяснить ее удалось в 1952 г. группе химиков-органиков, работавших в Кембридже (Англия) в лаборатории Александра Тодда.

Интерес к α-спиралям Полинга породил в 1951 г. изящную теорию, позволявшую предсказывать вид рентгенограмм для различных спиральных структур. Эта теория давала возможность легко проверить методом проб и ошибок различные гипотезы относительно структуры ДНК. В 1953 г. Крик и Уотсон, работавшие тогда в лаборатории Перутца и Кендрью в Англии, нашли правильное решение, установив, что молекула ДНК имеет форму двойной спирали и состоит из двух комплементарных цепей (подробнее об этом см. в гл. 9). Чтобы прийти к этому правильному решению, потребовалось найти такую конфигурацию, которая была бы стереохимически наиболее выгодной и в то же время не противоречила бы данным рентгеноструктурного анализа (полученным группой Уилкинса).

Обнаружение двуспиральной структуры ДНК произвело подлинную революцию в генетике. Ген перестал быть чем-то таинственным. Свойства его можно было теперь изучать уже не только в экспериментах по скре-

щиванию. Он стал вполне реальным «молекулярным» объектом, и химики получили возможность судить о нем уверенно, как они это делали в отношении молекул меньших размеров, таких, как пируват или НАД. Особо важную роль сыграло при этом даже не то, что структура была наконец установлена, а то, что эта структура оказалась именно такой. Пока природа ее оставалась неизвестной, существовало смутное опасение, что ее раскрытие не принесет ничего неожиданного, ничего такого, что позволило бы понять, как гены реплицируются и функционируют. К счастью, искомый ответ оказался чрезвычайно интересным. Выяснилось, что ДНК построена из двух спирально закрученных комплементарных полинуклеотидных цепей. Это позволяло предположить, что одна из двух цепей служит той поверхностью (той матрицей), на которой образуется другая. Если бы такое положение подтвердилось (теперь мы уже знаем, что оно подтвердилось!), то фундаментальную проблему репликации гена, которая столько лет оставалась загадкой для генетиков, можно было бы считать решенной.

В течение последующих 22 лет проводились различные эксперименты с целью установить, как именно ДНК контролирует события в клетке на молекулярном уровне. Эти исследования привели к ряду непредвиденных открытий, касающихся функций генетического материала. Поскольку речь впервые идет о событиях исключительно на молекулярном уровне, всю эту область исследований естественно назвать молекулярной генетикой.

ЦЕЛЬ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

До недавнего времени наследственность представлялась одним из самых загадочных свойств живого. Трудно переоценить важность того факта, что современные данные по структуре ДНК практически достаточны для понимания всех главных особенностей феномена наследственности на молекулярном уровне. Мы видим теперь, что на основе законов химии можно понять не только структуру белка; все известные нам явления из области наследственности также подчиняются этим законам. В настоящее время почти все биохимики убеждены в том, что и другие свойства живых организмов (например, такие, как активный перенос через клеточную мембрану, мышечное сокращение, передача нервного импульса, процессы, лежащие в основе слухового восприятия и памяти) могут быть полностью поняты на молекулярном уровне, на основе координированных взаимодействий больших и малых молекул. Многое уже известно относительно менее сложных проявлений жизни, и это позволяет верить, что если исследования в других областях молекулярной биологии будут развиваться столь же интенсивно, как в молекулярной генетике, то это в конечном счете приведет нас к полному выяснению всех важнейших атрибутов живого.

ВЫВОДЫ

Рост и деление клеток основаны на тех же самых законах химии, которые управляют поведением молекул вне клеток. Клетки не содержат каких-либо атомов, которых нет в окружающей неживой природе; они не синтезируют таких молекул, которые химики не могли бы когда-нибудь синтезировать искусственно. Поэтому никакой особой химии живого не существует. Биохимик имеет дело вовсе не с особыми химическими законами. Биохимиком мы называем химика, который изучает свойства молекул, обнаруживаемых в живой клетке (биологических молекул).

Рост и деление клеток зависят от наличия доступных форм химической энергии. Первичным источником энергии служат световые кванты; их энергия в процессе фотосинтеза преобразуется в энергию ковалентных связей клеточных молекул. Многие из этих веществ используются затем в качестве пищи различными микроорганизмами и животными. Первые триумфы биохимии связаны именно с выяснением того, как молекулы пищевых веществ превращаются в различные компоненты клетки и как энергия переходит при этом в доступную для клетки форму. Энергия, содержащаяся в молекулах пищевых веществ, заключена главным образом в ковалентных связях восстановленных углеродных соединений; она освобождается при окислительно-восстановительных превращениях этих молекул. Для большинства форм жизни конечным окисляющим агентом служит молекулярный кислород. Продуктами полного окисления таких органических молекул, как глюкоза, являются CO_2 и H_2O.

Однако большая часть органических молекул не окисляется непосредственно кислородом. Эти молекулы окисляются другими органическими молекулами, часто коферментами, например коферментом НАД. Восстановленный кофермент (например, НАД·Н) сам затем окисляется другой молекулой (такой, как ФАД) с образованием нового восстановленного кофермента ($ФАД \cdot H_2$) и исходного первого кофермента в окисленной форме (НАД). После ряда таких циклов в реакцию вступает молекулярный кислород, и окислительно-восстановительная цепь реакций заканчивается образованием воды (H_2O).

Энергия, освобождающаяся в окислительно-восстановительных процессах, не выделяется полностью в виде тепла. Более половины этой энергии запасается путем образования новых химических связей. В этих превращениях главную роль играют атомы фосфора. Фосфорные эфиры — промежуточные продукты превращений — содержат больше доступной энергии, чем большинство известных соединений. Богатые энергией фосфатные группы переносятся на акцепторные молекулы. Наиболее важным акцептором таких групп является АДФ, который после присоединения одного фосфатного остатка переходит в АТФ. Недавние эксперименты показали, что фосфорилирование АДФ до АТФ составляет также первую стадию фотосинтеза (в этом случае его называют фотофосфорилированием). Превращение АДФ→АТФ занимает центральное место в энергетике клетки.

Еще несколько лет назад наши знания о таких крупных молекулах, как белки и нуклеиновые кислоты, были несравненно менее достоверными, чем сейчас. Эти молекулы по своим размерам на несколько порядков превышают самые крупные из «малых молекул», изучаемых в органической химии (молекулярные веса белков и нуклеиновых кислот лежат в пределах 10^4—10^9). Белки и нуклеиновые кислоты очень сложны, и лишь недавно были разработаны физические и химические методы, позволяющие с разных сторон подойти к изучению их структуры. Наиболее важные из этих методов: распределительная хроматография, аналитическое ультрацентрифугирование и рентгеноструктурный анализ, приспособленный к изучению крупных молекул. В настоящее время нам уже известны практически все важнейшие особенности структуры таких белков, как миоглобин, гемоглобин и трипсин, а также генетического материала — ДНК. Во всех случаях в полной мере сохраняют свою силу химические законы, приложимые к малым молекулам. Обнаружение двуспиральной структуры ДНК оказало огромное влияние на развитие биологии. Сама природа этой структуры подсказала возможный механизм репликации генов, и это произвело революцию во взглядах биологов на наследственность. Достигнутые успехи укрепляют нашу уверенность в том, что совершающийся сейчас в биологии сдвиг — переход к исследованию биологических явлений на молекулярном уровне (молекулярная биология) — позволит нам в недалеком будущем понять все основные свойства живого.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Lehninger A. L., Bioenergetics, 2nd ed., Benjamin, Menlo Park, California, 1971. Прекрасное введение в изучение химических реакций, с помощью которых клетки улавливают, сохраняют и используют химическую энергию. Особое внимание обращено на образование АТФ в митохондриях и хлоропластах.

Conn E. E., Stumpf P. K., Outlines of Biochemistry, 3rd ed., Wiley, New York, 1971. Последнее, третье издание вводного курса метаболических процессов.

Loewy A., Siekevitz P., Cell Structure and Function, 2nd ed., Holt, New York, 1969. (А. Лёви, Ф. Сикевиц, Структура и функции клетки, изд-во «Мир», М., 1971.) Основы физиологии клетки; особое внимание уделяется проблемам многоклеточной организации.

Edelstein S. J., Introductory Biochemistry, Holden-Day, San Francisco, 1973. Вводный курс, в котором одинаково подробно рассматривается метаболизм малых и больших молекул.

Baldwin E., Dynamic Aspects of Biochemistry, 3rd ed., Cambridge, New York, 1959. (Имеется 1-е изд. Э. Болдуин, Основы динамической биохимии, ИЛ, М., 1949.) Это один из немногих учебников биохимии, который можно назвать классическим. Сегодня лучше всего читаются главы, посвященные участию коферментов в процессе переноса водорода.

Kalckar H. M., Biological Phosphorylations, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1969. Книга содержит ряд классических статей, которые позволили понять универсальную роль высокоэнергетических связей.

Lipmann F., Wanderings of a Biochemist, John Wiley, 1971. Взгляд в прошлое на ту важнейшую роль, которую автор книги сыграл в открытии высокоэнергетических связей.

Fruton J. S., Molecules and Life, Wiley-Interscience, 1972. Подробное руководство по истории биохимии.

Watson J. D., The Double Helix, Atheneum, New York, 1968. Личный взгляд автора на историю открытия двойной спирали.

Olby R., The Path to the Double Helix, University of Washington Press, 1975. Превосходное изложение истории изучения ДНК, написанное профессиональным историком науки.

ГЛАВА

3 Химия бактериальной клетки

Способность к росту и делению — одна из главных особенностей живых клеток. Во время этих процессов питательные вещества, поглощаемые из внешней среды, превращаются в компоненты самих клеток. Скорость роста у разных клеток чрезвычайно сильно варьирует, но, вообще говоря, самые мелкие клетки растут быстрее всего. В оптимальных условиях некоторые бактерии удваивают свое число в течение 20 мин, тогда как крупные клетки млекопитающих по большей части делятся не чаще одного раза в сутки. Однако независимо от величины интервала между делениями при каждом делении число всех молекул клетки должно удвоиться. Поэтому для ответа на вопрос «что такое жизнь?» необходимо выяснить, как клетка удваивает число своих молекул или как реплицируются биологические молекулы в процессе клеточного роста.

БАКТЕРИИ СПОСОБНЫ РАСТИ В ПРОСТЫХ, ХОРОШО КОНТРОЛИРУЕМЫХ УСЛОВИЯХ

До недавнего времени самые фундаментальные вопросы, связанные с ростом и делением клеток, изучали на микроорганизмах, главным образом на бактериях. Эта тенденция возникла вовсе не потому, что бактерии представляются нам более важным объектом, нежели высшие организмы. Люди, естественно, стремятся узнать возможно больше о том, как устроен их собственный организм, и применить эти знания в борьбе с болезнями, угрожающими их существованию. Однако даже поверхностного взгляда достаточно, чтобы понять, что изучение химии высших организмов сопряжено с очень большими трудностями. В человеческом организме содержится около 5×10^{12} клеток, и поведение каждой из них теснейшим образом связано с поведением многих других клеток. Поэтому очень трудно при изучении роста отдельной клетки в многоклеточном организме исключить влияние окружающих клеток.

Немало усилий было приложено, чтобы разработать методику, которая позволила бы изучать рост клеток многоклеточных организмов в изолированных системах. В подобных экспериментах (речь идет о так называемых *культурах тканей*) небольшие группы клеток или даже единичные клетки помещают в строго определенные лабораторные условия — в растворы, содержащие различные компоненты пищи. Вначале почти все такие опыты кончались неудачей, так как клетки почти неизменно погибали; теперь же (отчасти потому, что мы теперь лучше знаем пищевые потребности клеток) культуры обычно удается поддерживать: клетки растут и делятся, образуя большое число новых клеток. Изучение таких свободно растущих клеток (как растительных, так и животных) дало немало сведений относительно способности клеток к агрегации, т. е. к объединению в организованные группы, состоящие из одинаковых клеток (иными словами, в ткани). Более того, удалось проследить, как ткани

объединяются в пробирке в образования, морфологически воспроизводящие строение небольших участков отдельных органов, например печени или почек. Однако клетки в культуре тканей все же не являются идеальным объектом для изучения процессов клеточного роста и деления. Хотя многие клетки высших организмов растут in vitro изолированно, нужно всегда помнить о том, что это для них не совсем нормальный способ существования, и если не принимать мер предосторожности, то они обычно быстро агрегируют, так что получаются многоклеточные образования. Таким образом, даже в настоящее время выращивание изолированных клеток высших организмов связано с трудностями и отнимает много времени.

Иначе обстоит дело с многими одноклеточными микроорганизмами. Такие клетки обычно нормально растут в свободном состоянии и сразу же отделяются друг от друга после завершения клеточного деления. Поэтому эти одноклеточные организмы очень легко выращивать в строго определенных лабораторных условиях, которые не так уж сильно отличаются от естественных условий их обитания. Многие бактерии в отличие от клеток млекопитающих хорошо растут на простых питательных средах. Например, кишечная палочка (*E. coli*) растет в водном растворе, содержащем только глюкозу и различные неорганические соли. Ниже показан состав такой среды [1].

NH_4Cl	1,0 г	Na_2HPO_4	6,0 г
$MgSO_4$	0,13 »	Глюкоза	4,0 »
KH_2PO_4	3,0 »	Вода	1000 мл

Для роста бактерий обычно не требуется каких-либо особых источников углерода. Большинство бактерий легко адаптируется к тем органическим молекулам, которые могут использоваться в качестве источника углерода и энергии. Глюкозу можно заменить различными другими органическими веществами; при этом, как правило, чем более разнообразен набор вносимых в среду веществ, тем быстрее растут клетки. Если, например, *E. coli* растет на среде, содержащей только глюкозу, то при 37° С для удвоения клеточной массы требуется 60 мин; но если к глюкозе добавить различные аминокислоты, а также пуриновые и пиримидиновые основания (предшественники нуклеиновых кислот), то удвоение массы происходит уже за 20 мин. Этот эффект объясняется прямым включением указанных соединений в белки и нуклеиновые кислоты, благодаря чему клетка избавляется от необходимости синтезировать «строительные блоки». Однако существует известный предел для времени, в течение которого происходит удвоение клеточной массы (его обычно называют временем генерации): даже при самых благоприятных условиях роста бактерии не способны делиться быстрее чем каждые 20 мин.

E. COLI — ОРГАНИЗМ, НАИБОЛЕЕ ПОЛНО ИЗУЧЕННЫЙ НА МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ

В течение последних 30 лет число работ с *E. coli* и эволюционно близкими ей организмами непрерывно росло. Этот организм очень мал, хорошо культивируется в лабораторных условиях и не патогенен; именно поэтому он изучается сейчас наиболее интенсивно (если, разумеется, не считать человека). Конечно, многие другие бактерии обладают точно такими же преимуществами, и в свое время выбор пал на *E. coli*, в сущности говоря,

[1] Для роста *E. coli* требуются также и следы других ионов (например, Fe^{2+}), но их обычно не добавляют, так как они содержатся в виде примесей в других солях и воде.

случайно. Однако, поскольку серьезные работы были начаты именно с *E. coli*, переключаться на другие организмы уже не было оснований. Число работ с этим объектом продолжает увеличиваться и теперь, так как наряду с химическими исследованиями ведутся также и успешные генетические работы. Благодаря этому генетика *E. coli* изучена значительно лучше, чем генетика любой другой бактерии или низшего растения.

Как мы увидим дальше, совместное применение генетических и биохимических методов оказалось столь действенным, что использование в биохимических исследованиях организмов, у которых генетический анализ невозможен, часто представляется просто нецелесообразным.

Клетка *E. coli* (рис. 3-1) — это палочка длиной около 2 мкм и диаметром 1 мкм. Она растет в длину и затем делится пополам с образованием двух одинаковых палочек. Лучше всего клетки *E. coli* растут при 37° С; это, очевидно, объясняется тем, что они часто паразитируют в кишечнике млекопитающих. Однако и при более низкой температуре клетки растут и регулярно делятся, но только эти процессы сильно замедлены: при прочих оптимальных условиях время генерации составляет при 20° С около 120 мин.

Число клеток и их величину часто определяют с помощью светового (или электронного) микроскопа. Однако, рассматривая клетку в микроскоп, мы обычно не знаем, жива она или мертва. Это можно точно определить, лишь наблюдая рост и деление клетки, для чего небольшое количество клеток высевают на поверхность застывшего агара, содержащего все необходимое для их роста (рис. 3-2). Если клетка жива, то она делится, дочерние клетки также делятся, и через некоторое время (12—24 ч при 37° С) на агаре образуются отдельные скопления бактериальных клеток (*колонии*). Каждая такая колония состоит из потомков одной-единственной клетки.

Бактерии можно выращивать и в жидких питательных средах. Если в питательную среду внести небольшое количество быстро делящихся клеток, взятых из такой же среды, то они продолжают делиться через определенные промежутки времени и каждый раз за время генерации удваивают свое число. Таким путем количество клеток увеличивается по экспоненциальному закону (рис. 3-3). Этот *экспоненциальный рост* продолжается до тех пор, пока условия (из-за непрерывного увеличения числа клеток) не перестанут быть оптимальными.

Обычно в первую очередь ограничивает рост нехватка кислорода. Когда число клеток мало, им достаточно кислорода, диффундирующего из воздуха в жидкую питательную среду, но с увеличением числа клеток потребность в кислороде возрастает. Часто кислород вводят, пропуская ток газа через среду или энергично взбалтывая ее. Однако даже при очень хорошей аэрации скорость роста начинает снижаться (и сами клетки оказываются мельче), когда число клеток достигнет 10^9 на 1 мл. При плотности 5×10^9 на 1 мл рост прекращается вообще по еще не ясным причинам. *Кривая роста* — это кривая, описывающая увеличение числа клеток как функцию времени.

В большинстве растущих бактериальных культур клетки делятся неодновременно, так что даже если культура возникла из одной клетки, то через несколько генераций в ней можно найти клетки на самых разных стадиях клеточного цикла. Такой рост называют *несинхронизированным*. За последние 10 лет были разработаны приемы, позволяющие выделять бактериальные клетки, находящиеся на одной и той же стадии клеточного цикла. Это обеспечивает *синхронизированный рост* на протяжении нескольких генераций (рис. 3-4). В дальнейшем кривая роста по указанной выше причине вновь приближается к кривой несинхронизированного роста.

В процессе экспоненциального роста каждая клетка содержит от двух до четырех хромосом. Все эти хромосомы являются потомками исход-

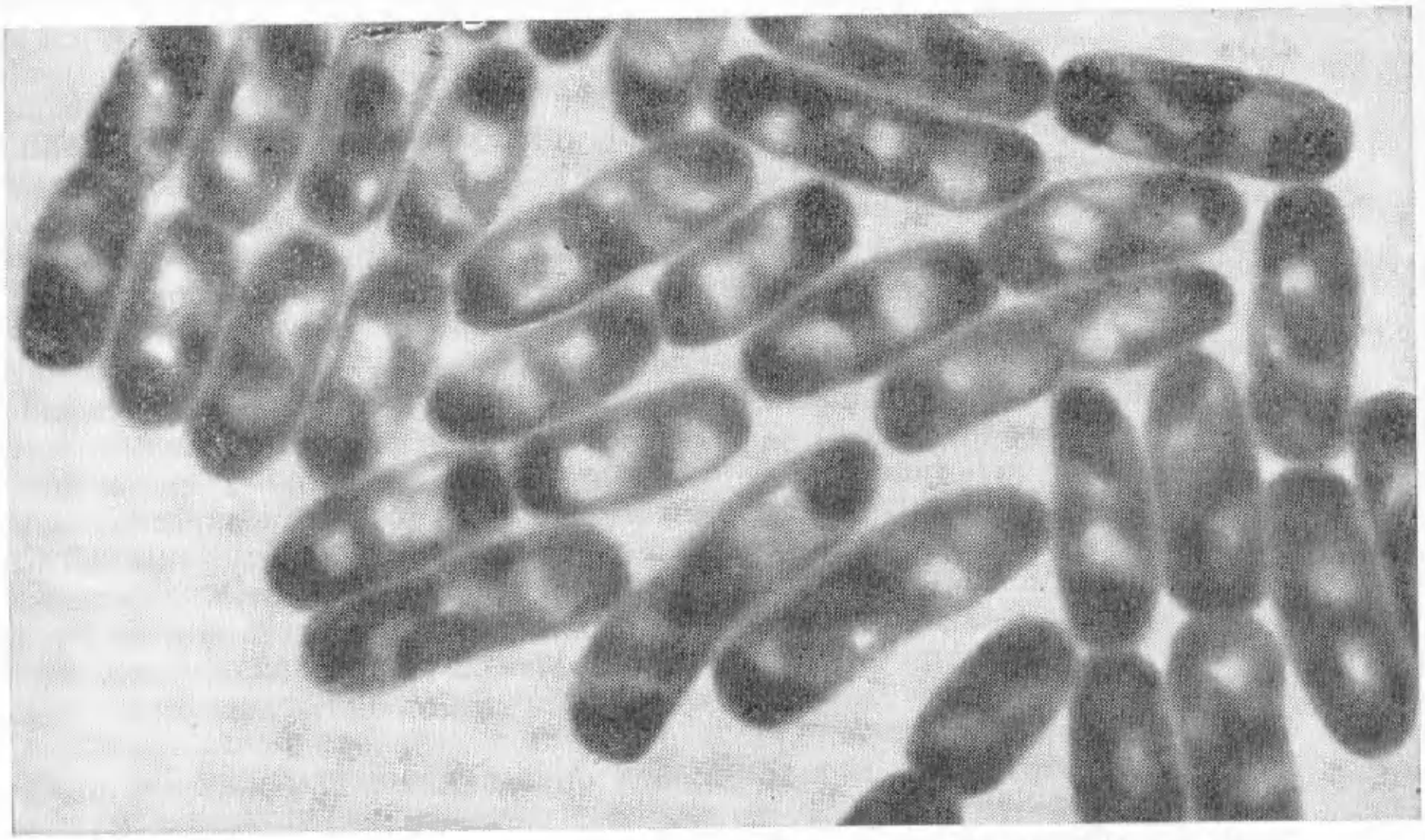


Рис. 3-1. Электронная микрофотография группы клеток *E. coli*; × 12 000. (Фотография получена в лаборатории д-ра Келленбергера, Женевский университет.)
Свертлые области — участки, где сосредоточена ДНК.

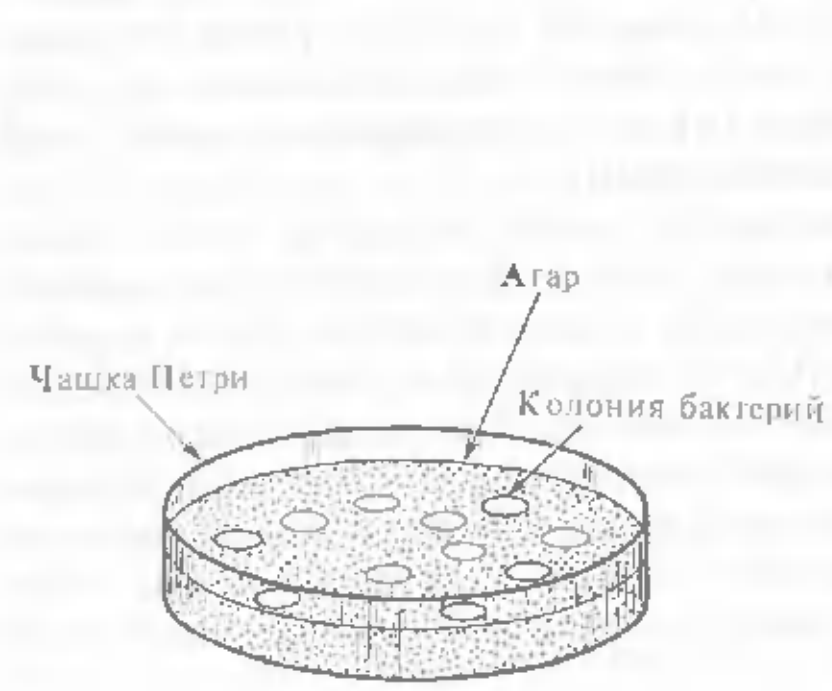


Рис. 3-2. Размножение отдельных бактериальных клеток на плотной питательной среде, приведшее к образованию видимых невооруженным глазом колоний.
Клетки *E. coli* обычно малоподвижны, и поэтому после деления первые две дочерние клетки и все их потомки остаются рядом друг с другом. Через 24 ч (при 37° С) каждая клетка, высеянная на агар, дает плотную массу новых клеток — колонию.

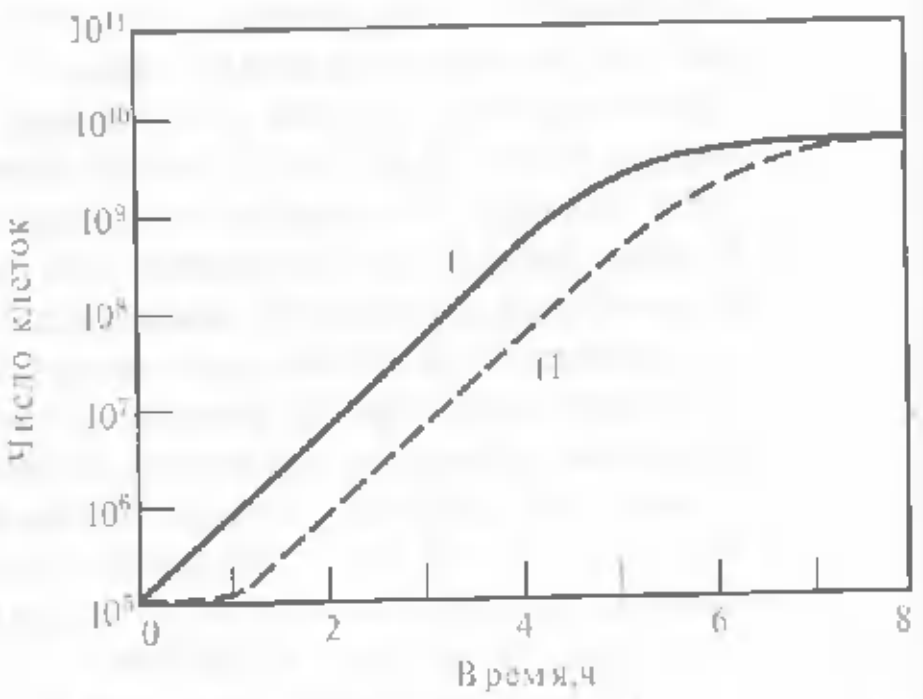


Рис. 3-3. Кривые роста *E. coli* при 37° С. *I* — рост клеток *E. coli* в богатой питательной среде (глюкоза, соли, аминокислоты, пурины, пиримидины) после внесения в нее 10^5 клеток, взятых в фазе экспоненциального роста; *II* — те же условия, но клетки для засева среды взяты, когда культура уже почти достигла насыщения (в этом случае экспоненциальный рост начинается не сразу, а после некоторого лаг-периода, равного примерно 1 ч).

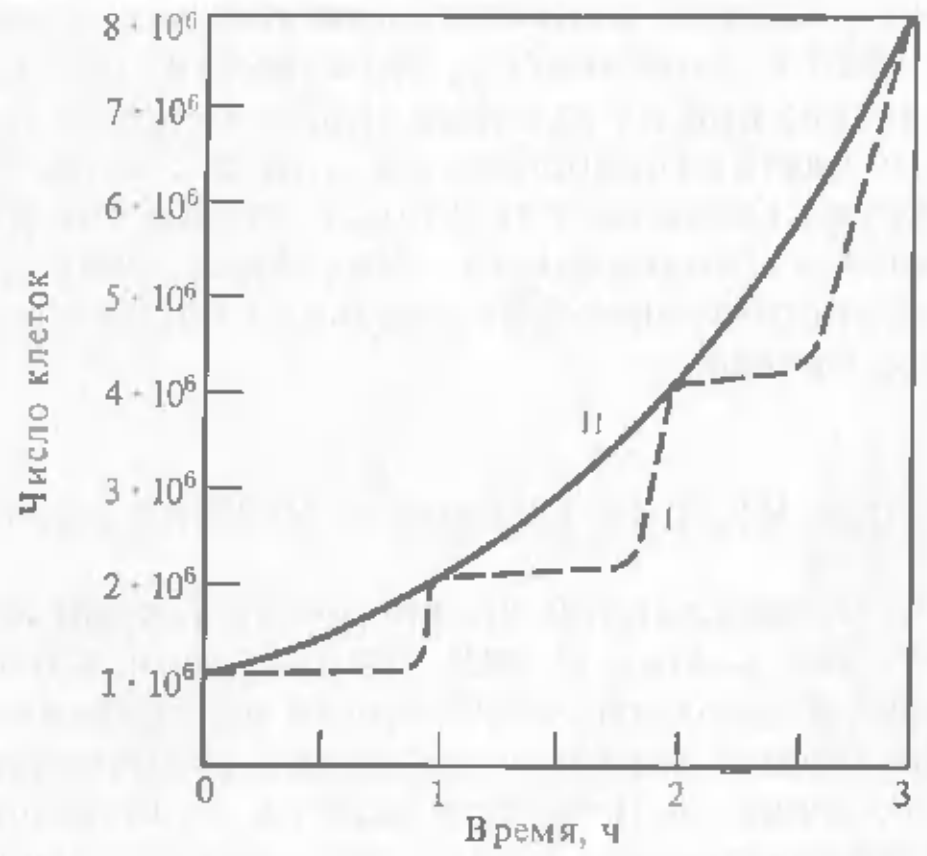


Рис. 3-4. Пример, показывающий, что степень синхронизации роста заметно уменьшается во втором и третьем циклах.
I — синхронизированная культура *E. coli*, использующая глюкозу в качестве единственного источника углерода; *II* — несинхронизированная культура.

ной родительской хромосомы, так что по своей генетической конституции они тождественны. Почему каждая нормальная клетка содержит несколько одинаковых хромосом, остается пока неизвестным. Такое накопление хромосом не является обязательным условием жизненного цикла *E. coli*, так как при плохих условиях питания удвоение хромосом иногда отстает от клеточного деления, и тогда появляются жизнеспособные клетки, содержащие только одну хромосому (рис. 3-5).

У клеток *E. coli*, так же как и у большинства (а может быть, и у всех) бактерий, хромосомы не заключены в ядерную мембрану. Структурного разграничения между ядром и цитоплазмой у них нет. Тем не менее цитологи часто называют область, занятую хромосомой, *ядерной областью*. Термин этот нельзя считать удачным. Еще совершенно неясно, какой механизм обеспечивает расхождение хромосом при клеточном делении. Нет никаких данных о наличии у бактерий веретена. По всей вероятности, веретено — это специализированная структура, возникшая в процессе эволюции уже после того, как произошла дифференцировка клетки на ядро и цитоплазму. Таким образом, единственное, что объединяет митоз в клетках высших организмов и в бактериальных клетках,— это точное удвоение и расхождение хромосом.

Рис. 3-5. Жизненный цикл клеток *E. coli*. При оптимальных условиях роста жизненный цикл клеток *E. coli* длится около 20 мин при 37° С. В этих условиях клетка *E. coli* содержит в среднем от двух до четырех хромосом (в зависимости от стадии деления). Все эти хромосомы являются потомками одной и той же родительской хромосомы, и поэтому в генетическом отношении они одинаковы.

Долгое время считалось, что у бактерий, и в частности у *E. coli*, нет полового процесса, при котором происходит слияние клеток. Однако в 1946 г. выяснилось, что существуют мужские и женские бактериальные клетки; при их слиянии (происходящем очень редко) образуются диплоидные клетки (подробнее об этом см. в гл. 7). Эти диплоидные клетки существуют очень недолго: после одного или двух делений клетки снова оказываются гаплоидными. Механизм расхождения хромосом (в результате которого происходит редукция числа хромосом) пока неясен, как и в случае митоза.

ДАЖЕ МЕЛКИЕ КЛЕТКИ — КРАЙНЕ СЛОЖНЫЙ ОБЪЕКТ

На молекулярном уровне очень трудно изучать даже такую мелкую клетку, как клетка *E. coli*. Химику мысль о том, что мы когда-нибудь сумеем понять основные особенности организации этой клетки, может показаться на первый взгляд совершенно неправдоподобной. В химических масштабах даже мельчайшая клетка чудовищно сложна. Хотя клетка *E. coli* приблизительно в 500 раз меньше любой растительной или животной клетки (у которой диаметр равен в среднем 10 мкм), она тем не менее весит около 2×10^{-12} г, что соответствует молекулярному весу 10^{12} дальтон [1]. Этот вес, в сущности столь ничтожный, для химика просто огромен, так как он в 6×10^{10} раз превосходит вес одной молекулы воды (мол. вес равен 18). Более того, за этой массой скрывается высокоорганизованный комплекс очень большого числа углеродсодержащих молекул.

По своей химической природе эти молекулы, казалось бы, бесконечно разнообразны, но, по счастью, их можно сгруппировать в несколько четко различимых классов. В каждый из таких классов попадают молекулы, содержащие некоторые общие группировки атомов. Главных классов четыре: углеводы, липиды, белки и нуклеиновые кислоты (табл. 3-1). Многие молекулы содержат химические группы, характерные для нескольких классов; их классификация по необходимости носит произвольный характер. В клетке имеется также много молекул меньшего размера (например, аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, различные коферменты), мельчайшие молекулы (например, O_2 и CO_2) и большое число электрически заряженных неорганических ионов (например, Na^+, K^+ и PO_4^{3-}). Наконец, есть в клетке и вездесущая H_2O, служащая растворителем для большинства биологических молекул; в этом растворителе легко происходит диффузионное перемещение молекул из одной области клетки в другую.

Электронная микрофотография очень тонкого среза клетки *E. coli* (рис. 3-6) позволяет составить представление об организации этой клетки. Снаружи клетка окружена жесткой оболочкой — мозаичной структурой, состоящей из белков, полисахаридов и липидов и имеющей толщину 100 Å. Непосредственно под ней находится эластичная клеточная мембрана толщиной также 100 Å, состоящая в основном из белков и липидов. Эта мембрана полупроницаема, и именно она определяет, какие молекулы поступают в клетку или выходят из нее. Жизненно важна способность мембраны поддерживать градиент концентрации, поскольку концентрация многих молекул (больших и малых) внутри клетки значительно выше, нежели во внешней среде. Это касается как неорганических ионов (например, K^+ и Mg^{2+}), так и важнейших органических молекул. Мембрана должна активно препятствовать диффузии молекул во внешнюю среду, где их концентрация значительно ниже. Схематически строение

---

[1] Дальтон — единица, используемая для выражения молекулярного веса (= $1{,}65 \cdot 10^{-24}$ г).— *Прим. перев.*

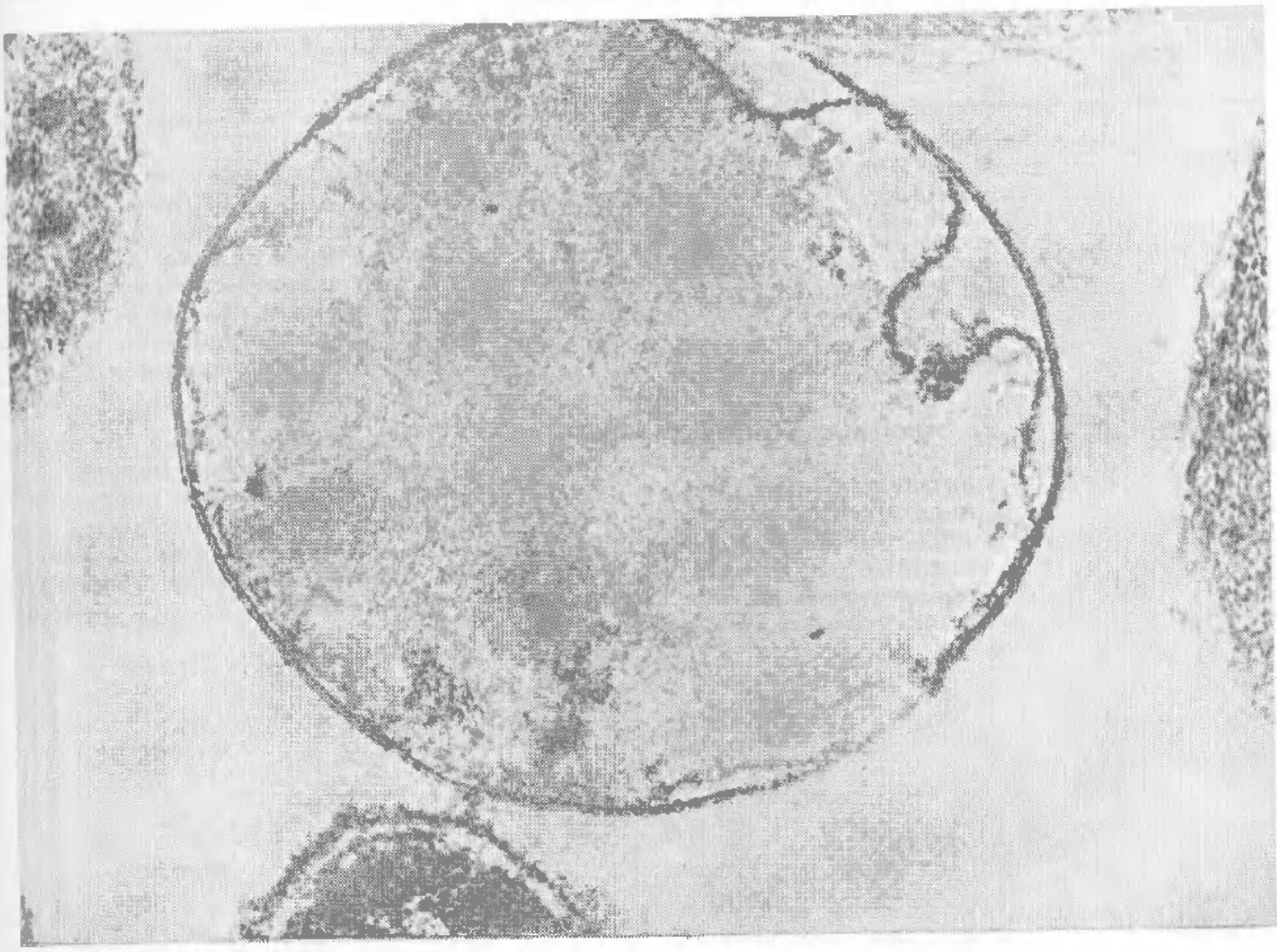


Рис. 3-6. Электронная микрофотография сверхтонкого среза клетки *E. coli*; × 105 000. (Предоставлена Келлоцбергером.)
Внешняя оболочка играет защитную роль. Под ней находится клеточная мембрана, которая регулирует проницаемость. Обычно клеточная мембрана плотно примыкает к оболочке, здесь же для большей наглядности представлен случай, когда она от нее отстает.

типичной клетки *E. coli* представлено на рис. 3-7. Приблизительно $^1/_5$ часть внутреннего объема клетки занята дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК) — веществом, ответственным за передачу генетической информации от одной клетки к другой. Вокруг области, занятой ДНК, располагается 20 000—30 000 сферических частиц диаметром 200 Å. Это рибосомы, обычно они присутствуют в клетке в виде агрегатов, которые называются полирибосомами. Рибосомы представляют собой клеточные центры белкового синтеза и содержат приблизительно 40% белка и 60% рибонуклеиновой кислоты (РНК). Остальное пространство в клетке занимают вода и растворенные в ней ферменты, а также большое число различных малых молекул.

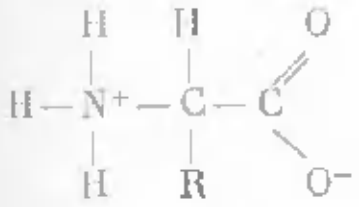
В настоящее время мы можем лишь приблизительно определить число разных типов молекул, содержащихся в клетке *E. coli*, так как непрерывно поступают сообщения о вновь открытых веществах. Наиболее вероятной можно считать величину порядка 3000—6000 (табл. 3-2). Одни вещества (например, H_2O и CO_2) химически просты; другие (например, глюкоза или аденин) более сложны, но и они вполне доступны для изучения с помощью современных химических методов. Наконец, третьи (в особенности белки и нуклеиновые кислоты) имеют очень крупные молекулы, так что даже в настоящее время их химическое строение с величайшим

Таблица 3-1 Главные классы биологических молекул

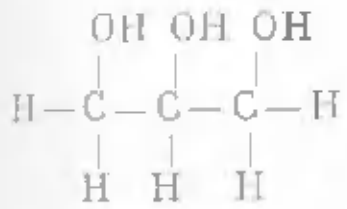
Класс	Общие данные	Функция
Белки	Молекулы содержат C, H, O, N и иногда S; построены из аминокислот	Большинство белков — это ферменты. Некоторые, присутствующие в организме в больших количествах, используются для построения различных важных структур, например клеточной оболочки, клеточной мембраны, рибосом, миофибрилл, нервных волокон и т.д.
Липиды	Не растворяются в воде. Построены из глицерина и трех остатков высших жирных кислот (триглицериды). Иногда одна из жирных кислот замещается холином (лецитины) или глицерин замещается сфингозином. Многие липиды содержат фосфор (фосфолипиды)	Триглицериды — главный источник запасенной энергии. Они распадаются с образованием ацетил-КоА. Фосфолипиды — необходимый компонент всех мембран. Их нерастворимость в воде регулирует проницаемость
Углеводы	Молекулы содержат C, H и O, обычно в соотношениях, близких к 1 : 2 : 1. Полисахариды построены из простых сахаров (моносахаридов), таких, как глюкоза и галактоза. В некоторых случаях сахар содержит аминогруппу (пример: глюкозамин)	Некоторые (например, целлюлоза и пектин) используются для построения прочных защитных клеточных оболочек; другие (например, гликоген) являются запасной формой глюкозы
Нуклеиновые кислоты	Длинные линейные молекулы, содержащие P, а также C, H, O и N; построены из пентозных нуклеотидов	Клетки содержат два главных класса нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) — первичный генетический компонент всех клеток — и рибонуклеиновые кислоты (РНК), участвующие в синтезе белков. Некоторые вирусы содержат РНК в качестве генетического материала

трудом поддается изучению. Большинство этих крупных молекул вообще еще детально не изучалось, так как их чрезмерная сложность отпугивала химиков и все работы сосредоточивались на относительно небольшом числе этих веществ. Таким образом, мы вынуждены признать, что структуру клетки никогда не удастся выяснить так, как было выяснено, например, строение молекул воды или глюкозы. Останется неизвестным точное строение большей части крупных молекул, и даже их относительное размещение в клетке если и можно будет установить, то лишь в самых общих чертах.

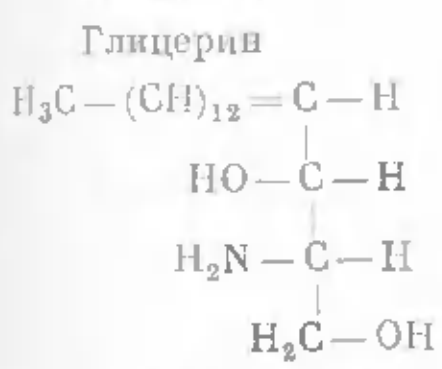
Строительные блоки



Аминокислота

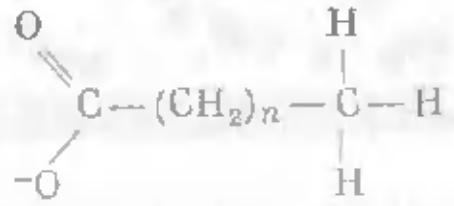


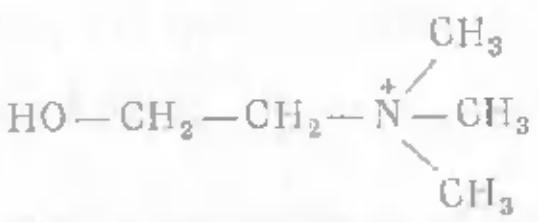
Глицерин



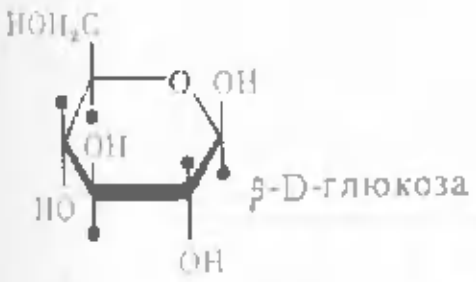
Сфингозин

Жирные кислоты; n обычно равно 16 или 18

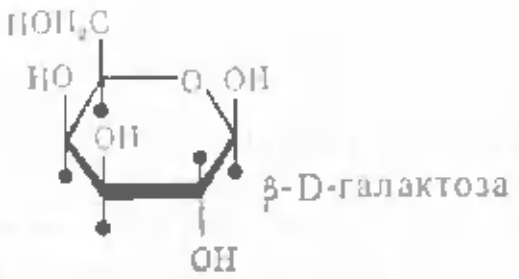




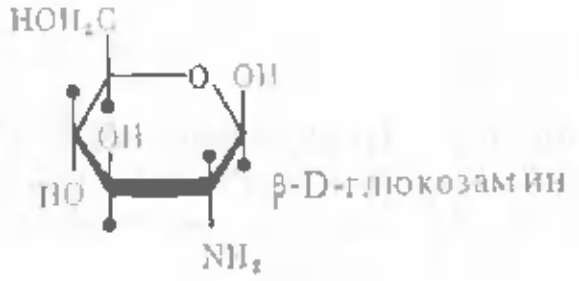
Холин



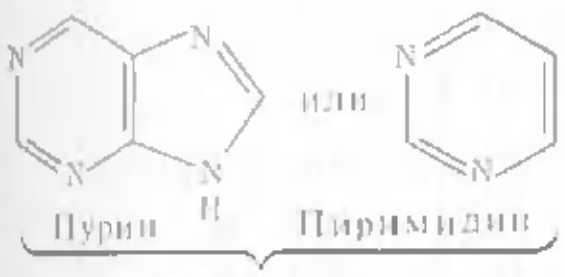
β-D-глюкоза



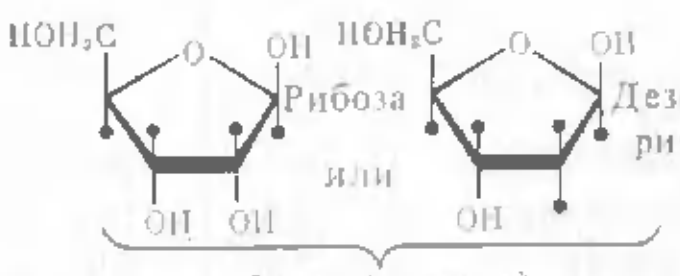
β-D-галактоза



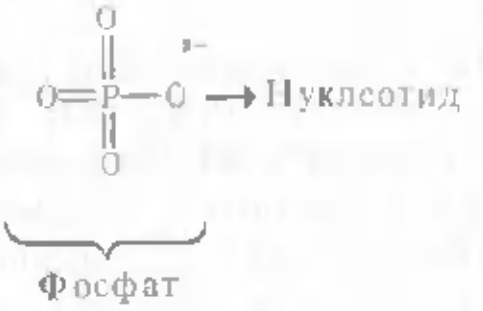
β-D-глюкозамин



Основания



Сахар (пентоза)



Фосфат

Нуклеотид

Не удивительно поэтому, что многие химики, начавшие с энтузиазмом изучать «жизнь», через некоторое время молча вернулись в лоно чистой химии. Другие оказались упорнее. Перспективы работы представились им в более оптимистическом свете, когда они уяснили: 1) что все макромолекулы представляют собой полимеры, построенные из более мелких единиц; 2) что в клетке имеются строго определенные последовательности химических реакций (метаболические пути) и 3) что существует верхний предел числа ферментов (а следовательно, и малых молекул), задаваемый постоянством количества ДНК в клетке.

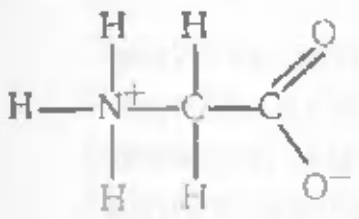
Рис. 3-7. Схематическое изображение клетки *E. coli*, содержащей две идентичные хромосомы.

Таблица 3-2 Приблизительный химический состав быстро делящихся клеток *E. coli* [1])

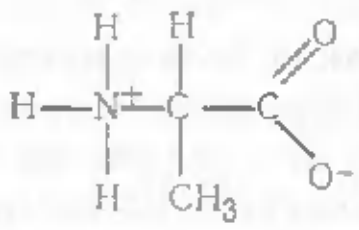
Компонент	Процент от общего веса клетки	Средний молекулярный вес	Приблизительное число на клетку	Число разных типов
H_2O	70	18	$4 \cdot 10^{10}$	1
Неорганические ионы (Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+}, Cl^-, PO_4^{3-}, SO_4^{2-} и т. д.)	1	40	$2{,}5 \cdot 10^8$	20
Углеводы и их предшественники	3	150	$2 \cdot 10^8$	200
Аминокислоты и их предшественники	0,4	120	$3 \cdot 10^7$	100
Нуклеотиды и их предшественники	0,4	300	$1{,}2 \cdot 10^7$	200
Липиды и их предшественники	2	750	$2{,}5 \cdot 10^7$	50
Другие малые молекулы (гем, хиноны, продукты распада питательных веществ и т. д.)	0,2	150	$1{,}5 \cdot 10^7$	250
Белки	15	40 000	10^6	2000—3000
Нуклеиновые кислоты ДНК	1	$2{,}5 \cdot 10^9$	4	1
РНК	6			
16S-РНК		500 000	$3{,}10^4$	1
23S-РНК		1 000 000	$3 \cdot 10^4$	1
тРНК		25 000	$4 \cdot 10^5$	60
мРНК		1 000 000	10^3	1000

[1]) Вес одной клетки равен 10^{12} дальтон.

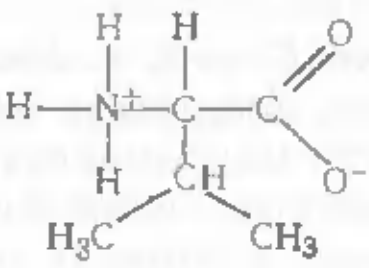
L-Глицин (Гли)



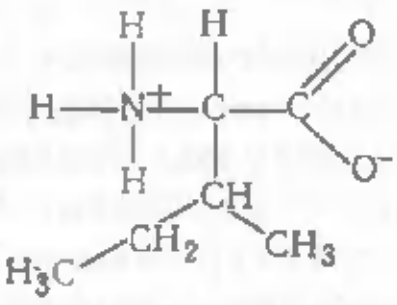
L-Аланин (Ала)



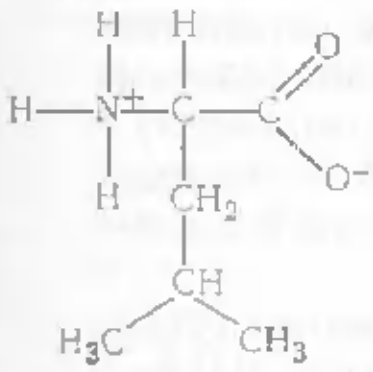
L-Валин (Вал)



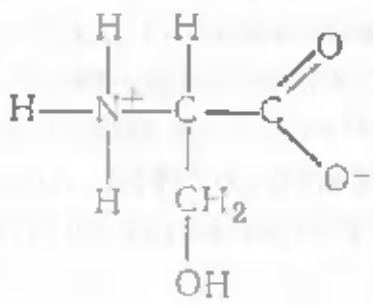
L-Изолейцин (Иле)



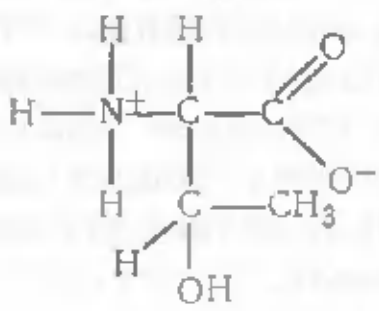
L-Лейцин (Лей)



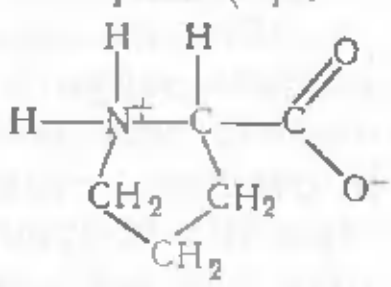
L-Серин (Сер)



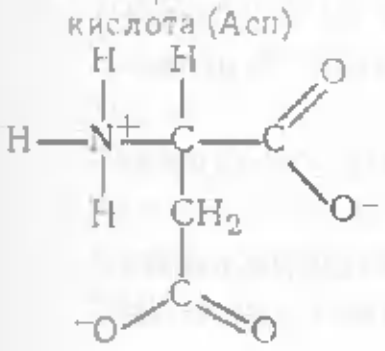
L-Треонин (Тре)



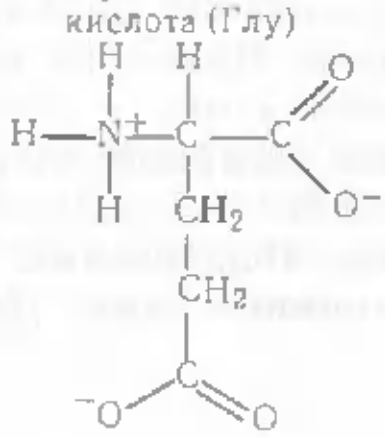
L-Пролин (Про)



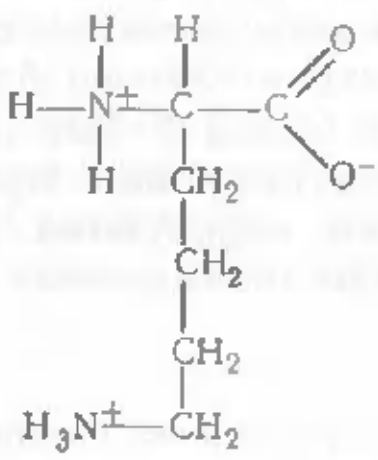
L-Аспарагиновая кислота (Асп)



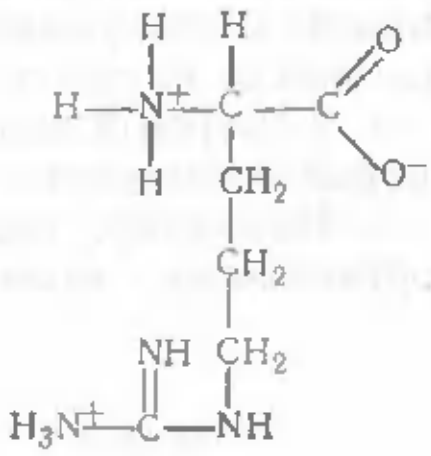
L-Глутаминовая кислота (Глу)



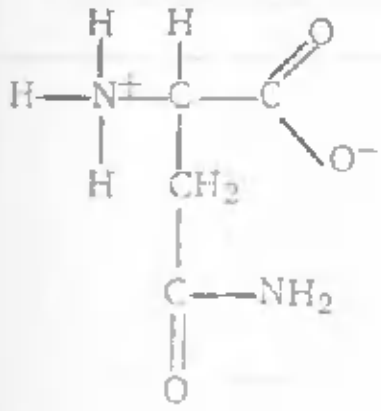
L-Лизин (Лиз)



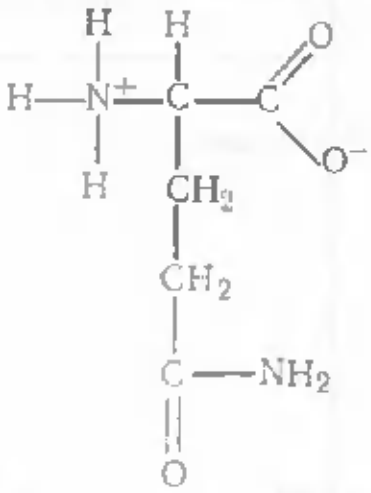
L-Аргинин (Арг)



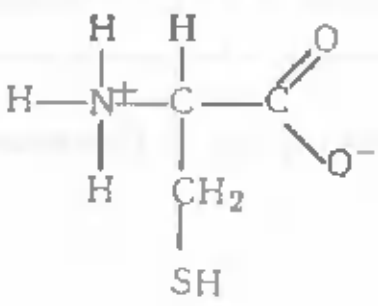
L-Аспарагин (Асн)



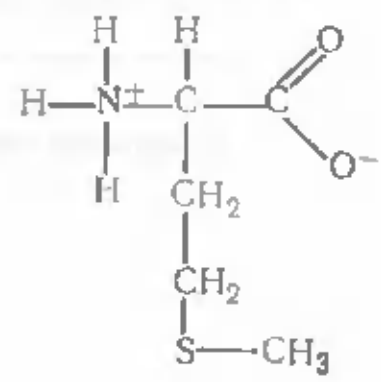
L-Глутамин (Глн)



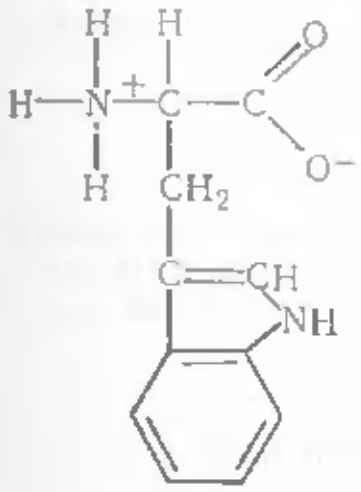
L-Цистеин (Цис)



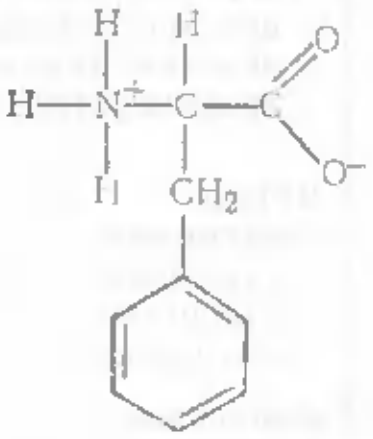
L-Метионин (Мет)



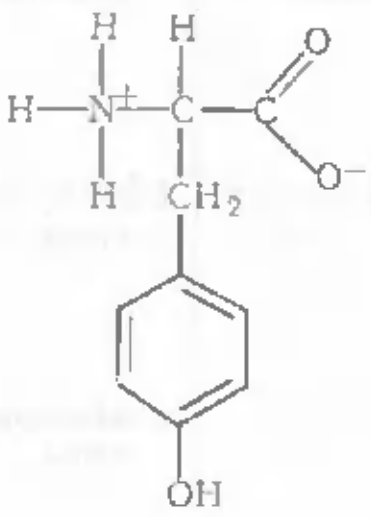
L-Триптофан (Три)



L-Фенилаланин (Фен)



L-Тирозин (Тир)



L-Гистидин (Гис)

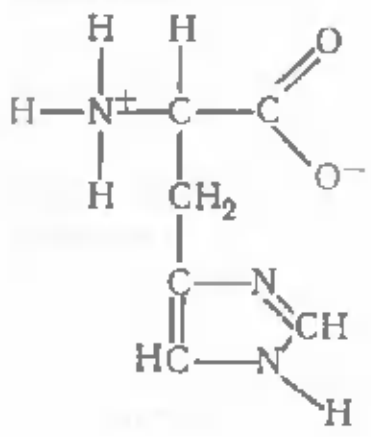


Рис. 3-8. Двадцать аминокислот, из которых строятся белки.

МАКРОМОЛЕКУЛЫ ПОСТРОЕНЫ ИЗ ЛИНЕЙНО СЦЕПЛЕННЫХ МАЛЫХ МОЛЕКУЛ

Основную массу клетки *E. coli*, так же как и всех других клеток, составляют (если, разумеется, исключить воду) крупные молекулы, или макромолекулы. Большинство макромолекул — это белки, из которых половина — ферменты. Остальные белки используются для построения таких структур, как рибосомы, клеточная оболочка и т. д. Из табл. 3-2 видно, что число атомов в макромолекулах в 25—50 раз больше, чем в малых молекулах.

Может создасться впечатление, что биохимики, изучающие биосинтез макромолекул, имеют дело с необычайно сложной задачей, ибо они должны понять, как все это огромное число атомов соединяется в молекулу. К счастью, открытие трех общих закономерностей, лежащих в основе строения макромолекул, делает эту задачу при всей ее трудности в принципе все же разрешимой.

1. Все макромолекулы являются полимерами и образуются путем конденсации более мелких молекул. Таким образом, биосинтез макромолекулы состоит из двух стадий: 1) образования мономера и 2) соединения их в совершенно определенном порядке. Примером подобного процесса может служить строительство блочного дома.

2. Строительные блоки любой данной макромолекулы имеют одинаковые химические группировки (табл. 3-3).

Например, белки образуются путем конденсации азотсодержащих органических молекул, называемых аминокислотами. Две аминокислоты

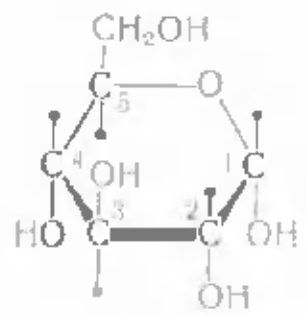
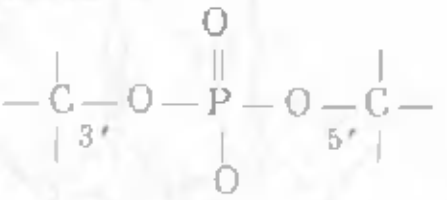
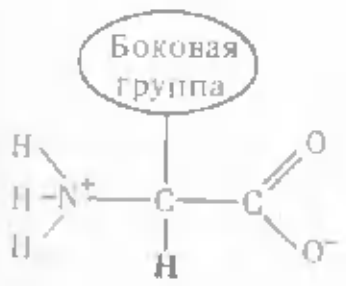
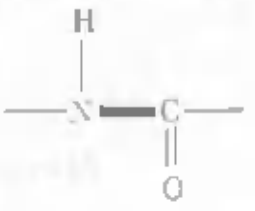
Таблица 3-3 Структурная организация некоторых важных биологических макро

Макромолекула	Мономер	Число различных мономеров
Гликоген (полисахарид)	Глюкоза	Один
ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота)	Дезоксинуклеотиды	Четыре: дезоксиаденилат дезоксигуанилат дезокситимидилат дезоксицитидилат
РНК (рибонуклеиновая кислота)	Рибонуклеотиды	Четыре: аденилат гуанилат уридилат цитидилат
Белок	L-аминокислоты	Двадцать: глицин, аланин, серин и т. д.

соединяются между собой при помощи пептидной связи. Существует около 20 различных аминокислот. У всех этих аминокислот в определенном участке молекулы имеется одна и та же группировка атомов; к этому участку присоединены боковые группы, характерные для каждой аминокислоты (рис. 3-8). Таким образом, молекула каждой аминокислоты содержит *специфическую* часть (боковую группу) и *неспецифическую* часть. Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) также образуются путем соединения более мелких молекул, называемых нуклеотидами. Нуклеотиды РНК, содержащие сахар рибозу, называются рибонуклеотидами, а нуклеотиды ДНК, в состав которых входит сахар дезоксирибоза,— дезоксирибонуклеотидами (рис. 3-9). Нуклеотиды всегда соединяются между собой при помощи связей, в образовании которых участвует фосфатная группа и гидроксильная группа сахара (табл. 3-3); такая связь называется фосфодиэфирной связью. Молекула каждого нуклеотида, подобно молекуле аминокислоты, содержит специфическую и неспецифическую части. Фосфат и сахар составляют неспецифическую часть молекулы нуклеотида, а пуриновое или пиримидиновое основание — специфическую. В состав ДНК и РНК входят четыре главных основания: два пурина и два пиримидина.

3. Большинство макромолекул (нуклеиновые кислоты, белки и некоторые полисахариды) — это *линейные* агрегаты, в которых структурные элементы (мономеры) соединены друг с другом при помощи химических связей между атомами упомянутых неспецифических участков. Линейная конфигурация определяется тем, что большинство структурных элементов содержит только два атома, способных участвовать в образовании

молекул

Общая формула мономера	Длина цепи (фиксирована или нет)	Связь между мономерами
	Неопределенная; может быть > 1000	1,4-гликозидная связь C—O—C 1 4
Пурин — Дезоксирибоза — Фосфат или Пиримидин — Дезоксирибоза — Фосфат	Задана генетически; может быть $> 10^7$	3,5-фосфодиэфирная связь 
Пурин — Рибоза — Фосфат или Пиримидин — Рибоза — Фосфат	Задана генетически; часто > 3000	3,5-фосфодиэфирная связь
	Задана генетически; обычно варьирует от 100 до 1000	Пептидная связь Пептидная связь 

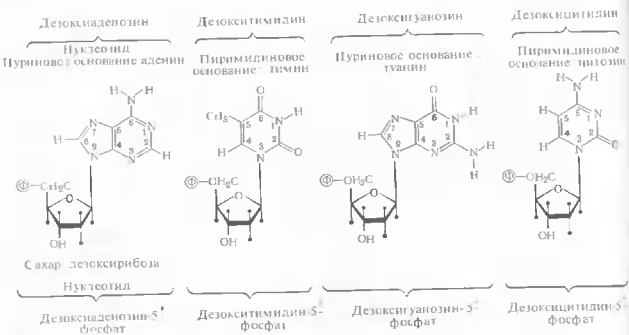
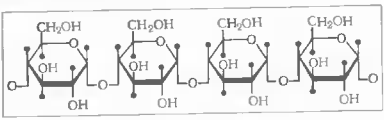
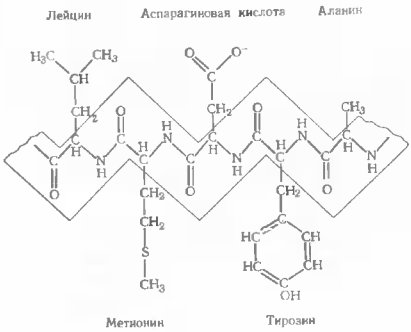


Рис. 3-9. Важнейшие нуклеотиды, входящие в состав ДНК



А



Б

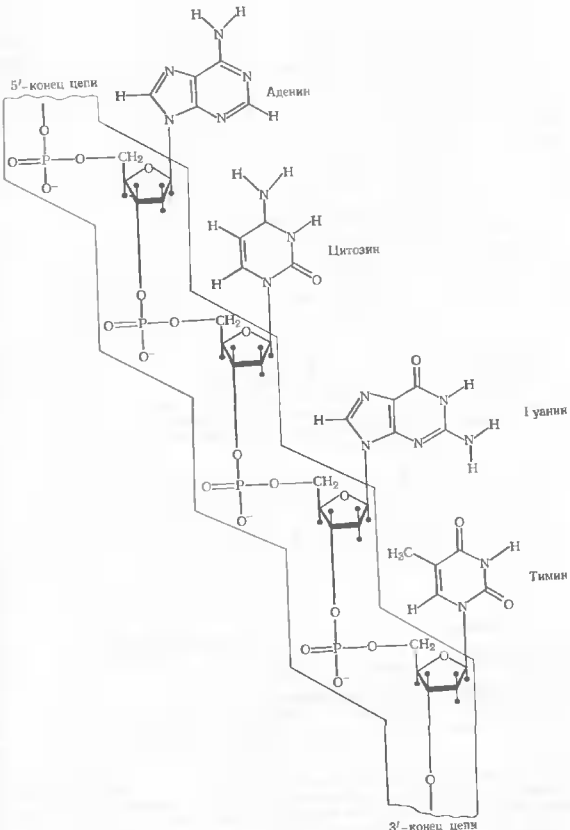


Рис. 3-10. Структура некоторых биологических макромолекул (выделенная часть формулы — остов макромолекулы).
А. Строение небольшого участка цепи гликогена, построенного из остатков глюкозы. *Б.* Часть полипептидной цепи белка (аминокислоты слева направо: лейцин, метионин, аспарагиновая кислота, тирозин и аланин). *В.* Часть полинуклеотидной цепи ДНК.

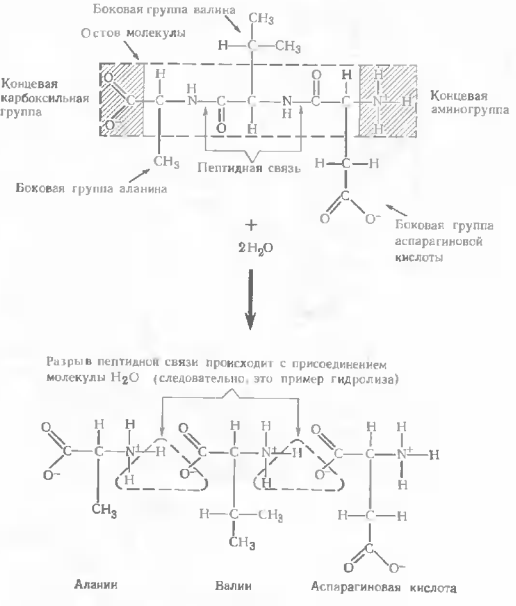


Рис. 3-11. Гидролиз полипептида до аминокислот.
В качестве примера взят очень простой полипептид, содержащий всего три аминокислоты.

связей с соседними субъединицами. В каждой такой макромолекуле значительная ее часть построена из повторяющихся одинаковых химических групп (так называемый *остов* молекулы; рис. 3-10).

Характерная особенность всех этих биологических полимеров состоит в том, что мономеры в цепи полимера содержат на два атома водорода и один атом кислорода меньше, чем те же мономеры в свободном состоянии. Таким образом, синтез сопровождается выделением воды. Когда происходит распад полимера на мономеры, по месту каждой связи присоединяется одна молекула воды (рис. 3-11).

Процессы распада, связанные с присоединением воды, известны как реакции гидролиза. Существует много различных типов гидролитических реакций, так как большое число низкомолекулярных веществ распадается

при добавлении воды на еще более мелкие молекулы. При условиях, нормальных для клетки, жизненно важные полимеры или низкомолекулярные соединения крайне редко подвергаются гидролизу. Однако гидролиз ускоряется в присутствии специфических ферментов. Так, например, ферменты пепсин и трипсин специфически катализируют гидролитический распад белков.

РАЗЛИЧИЕ МЕЖДУ РЕГУЛЯРНЫМИ И НЕРЕГУЛЯРНЫМИ ПОЛИМЕРАМИ

Табл. 3-3 иллюстрирует важные различия между полисахаридами типа гликогена, с одной стороны, и белками и нуклеиновыми кислотами — с другой. Полисахариды построены обычно как *регулярные* (или полурегулярные) цепочки, содержащие один или два различных типа моносахаридов; в отличие от них белки содержат двадцать различных аминокислот, а нуклеиновые кислоты — четыре различных типа нуклеотидов. Кроме того, порядок расположения мономеров в цепях нуклеиновых кислот и белков в высшей степени *нерегулярен* и сильно варьирует у разных типов молекул. Синтез полисахарида из моносахаридов сводится к образованию одинаковых связей в молекуле; синтез нуклеиновых кислот и белков требует, помимо этого, участия эффективного механизма, который выбирает и помещает на место следующий по порядку мономер.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ

Мы можем непосредственно убедиться в том, что все молекулы в клетке образуются путем химических превращений из молекул пищевых веществ, если мы будем выращивать клетки *E. coli* в простой неорганической среде, содержащей глюкозу (стр. 62). В этих условиях глюкоза является единственным источником углерода, и, следовательно, весь углерод, входящий в состав различных молекул клетки, происходит из нее (лишь очень небольшая часть образуется из CO_2). Глюкоза в результате химических превращений распадается на более мелкие фрагменты, и из них (а также и из самой глюкозы) образуются более крупные молекулы, такие, как нуклеотиды или гликоген. Все эти превращения (обычно объединяемые под общим названием *промежуточный обмен веществ*) чрезвычайно сложны и в большинстве случаев всякий биохимик сосредоточивает свои усилия на изучении лишь весьма ограниченного их числа.

К счастью, в последнее время начинают выявляться некоторые общие закономерности метаболизма. На рис. 3-12 представлены наиболее важные типы химических превращений глюкозы после ее поступления в клетку *E. coli*. Большая часть сведений об этих процессах была получена в опытах с веществами, меченными радиоактивными изотопами. Если, например, клетки *E. coli* поместить на несколько секунд в среду с ^{14}C-глюкозой, то метку почти немедленно можно будет обнаружить в соединениях, близких по строению к глюкозе, например в глюкозо-6-фосфате. В аминокислоты и нуклеотиды метка перейдет позднее. Разница во времени будет, очевидно, определяться числом тех реакций, которые ведут от глюкозы к соответствующим метаболитам.

Рис. 3-12 показывает, что судьба соединений, играющих ключевую роль в процессе распада глюкозы, может быть различной. Они могут, например, полностью распадаться в цепи реакций Эмбдена — Мейергофа, в цикле Кребса или в дыхательной цепи с образованием CO_2 и H_2O, что сопровождается превращением АДФ в АТФ. Вместо этого некоторые промежуточные продукты обмена могут быть использованы в качестве

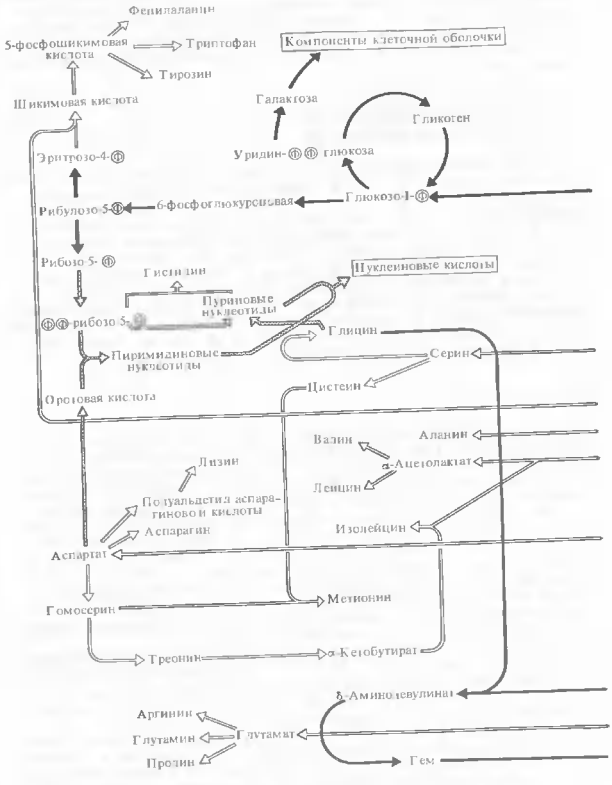
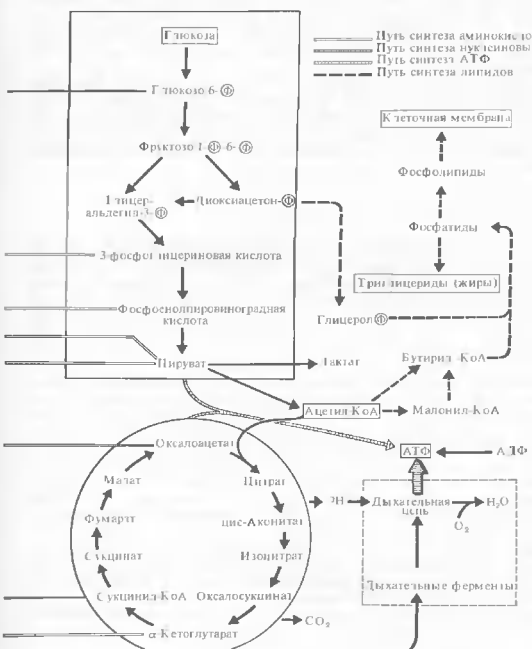


Рис. 3-12. Схематическое изображение некоторых основных метаболических путей *E. coli*.

исходных продуктов для целой серии химических реакций, ведущих к синтезу жизненно важных соединений, таких, как аминокислоты и нуклеотиды. Так, например, диоксиацетонфосфат служит предшественником глицерина, который входит в состав липидов, а 3-фосфоглицериновая кислота



является исходным продуктом в серии реакций, ведущих к образованию аминокислот серина, глицина и цистеина.

Связанные между собой группы реакций биосинтеза (и реакций распада) носят название *метаболических путей*. Молекула, однажды вступив-

шая на тот или иной путь, часто не имеет выбора — она подвергается ряду строго определенных химических превращений. Не все пути линейны; некоторые из них разветвляются. Промежуточный продукт обмена в точке разветвления может превратиться в одно из двух или нескольких возможных соединений. Такие промежуточные продукты, способные подвергаться различным превращениям, очень важны в обмене веществ. Особое место занимают глюкозо-6-фосфат, пируват, α-кетоглутарат и оксалоацетат, каждое из этих соединений является исходным продуктом ряда важных метаболических путей. Быть может, самое важное из соединений такого рода — это ацетилкофермент А (ацетил-КоА); он служит главным предшественником липидов, и он же содержит активный ацетат, питающий цикл лимонной кислоты.

Однако у большинства молекул их метаболическая судьба предопределена значительно более строго. «Средняя» молекула может либо превратиться в вещество X, либо быть использована в качестве промежуточного продукта при биосинтезе вещества Y; соответственно можно полагать, что она способна специфически взаимодействовать лишь с двумя различными ферментами.

ПУТИ РАСПАДА ОТЛИЧАЮТСЯ ОТ ПУТЕЙ БИОСИНТЕЗА

Если клетки *E. coli* используют глюкозу в качестве единственного источника углерода, то все аминокислоты, образующиеся в этих клетках, должны синтезироваться из производных глюкозы. Следовательно, должны существовать различные пути биосинтеза для каждой из двадцати аминокислот (рис. 3-12). Однако *E. coli* может расти и в отсутствие глюкозы, используя в качестве единственного источника углерода какую-либо одну из двадцати аминокислот. Этот факт говорит о том, что должны существовать также и двадцать путей распада аминокислот, т. е. процессов, в результате которых углерод и азот аминокислот освобождаются с образованием ацетил-КоА. Эти соединения в дальнейшем могут быть использованы для синтеза других аминокислот. Существуют также пути распада различных липидов, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, многих пентоз и гексоз и т. д. Большинство путей распада строго специфично и поэтому в клетке *E. coli* можно обнаружить значительное число (200—300) различных продуктов распада. У других бактерий, в частности у *Pseudomonas*, это число должно быть еще большим, так как они способны расщеплять значительно более широкий набор органических соединений, нежели *E. coli*.

Напрашивается вывод, что пути распада и пути биосинтеза не одинаковы. Это и не удивительно. Как мы увидим ниже, в гл. V, для большей части реакций биосинтеза требуется энергия, и потому они связаны с расщеплением АТФ, тогда как реакции распада должны служить не только источником атомов углерода и азота (для построения скелета молекул), но еще и источником АТФ.

ЗНАЧЕНИЕ ОГРАНИЧЕННОГО КОЛИЧЕСТВА ДНК

Изощренный в рассуждениях химик отнесется не без доли скепсиса к схеме, представленной на рис. 3-12. При всей четкости и наглядности этой схемы она не может заставить нас забыть тот факт, что чуть ли не каждую неделю ученые открывают какой-нибудь новый фермент, а значит, и новую метаболическую реакцию. Естественно возникает вопрос: не представляет ли рис. 3-12 слишком упрощенную и неполную картину метаболизма в клетке *E. coli*? Это действительно было бы так, если допустить,

что, скажем, существуют не один или два, а пятьдесят или сто разных путей распада глюкозы или соответственно двадцать различных путей, ведущих к биосинтезу каждого нуклеотида, каждой аминокислоты и т. д.

Есть, однако, простой способ удостовериться в том, что число еще не известных нам метаболических реакций, протекающих в клетке *E. coli*, не может быть очень большим.

В основу доказательства кладется факт, который мы рассмотрим подробно в следующих главах. Речь идет о том, что порядок расположения нуклеотидов (последовательность нуклеотидов) в ДНК несет генетическую информацию, которая определяет порядок чередования аминокислот в молекулах белков. В настоящее время установлено, что каждую аминокислоту кодирует тройка (триплет) нуклеотидных пар. Таким образом, чтобы закодировать какой-нибудь белок, состоящий из 300 аминокислот, требуется 900 пар нуклеотидов. Так как молекулярный вес одной пары нуклеотидов равен 660, то для каждого такого белка необходим фрагмент ДНК с молекулярным весом $660 \cdot 900 \cong 6 \cdot 10^5$. Следовательно, число различных белков в клетке не может превышать отношение ДНК/$(6 \cdot 10^5)$, где в числителе стоит количество ДНК, имеющееся в гаплоидной клетке.

Эта же величина может быть использована и для оценки числа различных типов низкомолекулярных веществ, присутствующих в клетке. Большинство белков клетки выполняет функции ферментов, и каждый из них катализирует определенную метаболическую реакцию. Если мы узнаем, сколько в среднем ферментов принимает участие в метаболических превращениях одного низкомолекулярного вещества, то мы сможем примерно определить, сколько типов таких веществ имеется в клетке. В настоящее время можно с достаточным приближением считать, что в обмене одного какого-либо низкомолекулярного вещества участвует не более двух ферментов.

НЕ МЕНЕЕ $^1/_6$ (А МОЖЕТ БЫТЬ, И $^1/_3$) ВСЕХ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ, ПРОТЕКАЮЩИХ В КЛЕТКАХ *E. coli*, НАМ УЖЕ ИЗВЕСТНЫ

Количество ДНК в гаплоидной клетке *E. coli*, согласно наиболее надежным определениям, равно $2{,}5 \cdot 10^9 \pm 0{,}5 \cdot 10^9$. Это количество соответствует 3000—4500 различным белкам (среднего молекулярного веса) и позволяет предположить, что число разных типов низкомолекулярных соединений в такой клетке не превышает 2000. Рассматривая табл. 3-2, мы с удовлетворением убеждаемся в том, что 800—1000 из этих соединений нам уже известны. Следовательно, мы уже знаем не менее $^1/_6$, а возможно, и более $^1/_3$ всех метаболических реакций, происходящих в клетке *E. coli*. Это заключение весьма утешительно и дает основание ожидать, что в ближайшие 20—25 лет мы сумеем описать практически все метаболические реакции, протекающие в клетке *E. coli*. Таким образом, даже очень осторожному химику, если только он надлежащим образом информирован, не следует смотреть на бактериальную клетку как на безнадежно сложный объект. Напротив, у него есть теперь все основания для оптимизма, ибо он (в отличие от его коллеги, изучавшего клетку сто лет назад) наконец в достаточной мере вооружен для того, чтобы полностью охарактеризовать все главнейшие черты живого.

ВЫВОДЫ

На химическом уровне даже мельчайшая клетка представляется невообразимо сложной. Большинство ученых, интересующихся проблемами клеточного роста и деления, в настоящее время работают с бактериаль-

ными клетками, примерно в 500 раз меньшими, чем средняя клетка высших растений или животных. Чаще всех других используется бактерия *E. coli*. Эта клетка весит $2 \cdot 10^{-12}$ г (10^{12} дальтон), из которых ~70% приходится на долю воды. Число разных соединений в клетке *E. coli* лежит, по-видимому, в пределах 3000—6000. Около половины этого числа составляют малые молекулы, а остальные — макромолекулы. Естественно, что в ближайшем будущем у нас нет надежды выяснить трехмерную структуру всего этого огромного числа молекул. Однако нам теперь известны некоторые общие закономерности клеточной химии, и это делает возможным выяснение механизма клеточного роста даже без точного знания молекулярной структуры всех компонентов клетки. Мы знаем, например, что все макромолекулы клетки — это полимеры, построенные из значительно меньших единиц (мономеров); белки построены из аминокислот, а нуклеиновые кислоты — из нуклеотидов. Большинство полимеров (включая все белки и нуклеиновые кислоты) — линейные молекулы, и это также упрощает дело.

Еще одна обнаруженная закономерность вносит упрощение в кажущуюся сложность промежуточного обмена. Как правило, то или иное соединение не может непосредственно превращаться в большое число других соединений. Каждое соединение служит одним из звеньев в цепи реакций, ведущих либо к распаду молекул пищи, либо к биосинтезу необходимых клеточных компонентов, например аминокислот или жирных кислот. Клеточный метаболизм есть не что иное, как сумма большого числа таких серий реакций, или метаболических путей, связанных между собой так, что продукты путей распада могут быть использованы на путях биосинтеза.

Степень сложности метаболизма зависит от количества генетической информации в организме, носителем которой является ДНК. Количество ДНК в клетке определяет верхний предел числа различных ферментов, которые может образовать данная клетка. *E. coli* обладает таким количеством ДНК, которое может кодировать от 3000 до 4500 различных белков. К настоящему времени в клетке *E. coli* обнаружено около 800 разных типов малых молекул. Это означает, что нам уже и сейчас известна по меньшей мере одна шестая всех метаболических реакций, протекающих у этого организма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Sistrom W., Microbial Life, 2nd ed., Holt, New York, 1969. Краткое введение в биологию и химию микроорганизмов.

Stanier R. Y., Doudoroff M., Adelberg E. A., The Microbial World, 3rd ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1970. Великолепный труд по микробиологии, который может быть прочитан любым студентом младших курсов.

Davis B. D., Dulbecco R., Eisen H. N., Ginsberg H. S., Wood W. B., Jr., McCarty M., Microbiology, 2nd ed., Harper and Row, 1973. Объемистое, но очень хорошее введение в микробиологию, написанное для студентов-медиков, но пригодное для гораздо более широкого круга читателей.

ГЛАВА 4

Важное значение слабых химических взаимодействий

До сих пор мы сосредоточивали свое внимание на отдельных органических соединениях и, следуя классической органической химии, особенно интересовались ковалентными связями в молекулах этих соединений. Однако такой подход явно недостаточен при описании клетки; здесь мы должны выяснить также точную форму молекул и узнать природу факторов, связывающих молекулы различных соединений в организованные структуры. Молекулы распределяются в клетке не случайно, и мы должны решить вопрос о том, какие химические законы управляют этим распределением. Очевидно, что здесь речь не может идти о ковалентных связях, так как атомы, связанные ковалентно, принадлежат одной и той же молекуле.

Организация различных молекул в надмолекулярные структуры осуществляется в клетке при помощи химических связей, значительно более слабых, чем ковалентные. Атомы, связанные ковалентно, способны к слабым взаимодействиям с близлежащими атомами. Эти взаимодействия, иногда называемые *вторичными связями*, существуют и между атомами разных молекул и в пределах одной и той же молекулы. Слабые связи важны не только в качестве факторов, определяющих, какие молекулы будут соседствовать друг с другом; они также задают форму гибких молекул, таких, как полипептиды и полинуклеотиды. Поэтому нам необходимо понять природу слабых химических взаимодействий и выяснить, почему их «слабый» характер делает их столь незаменимыми для клетки. Из вторичных связей наиболее важны связи, обусловленные существованием вандерваальсовых сил, водородные связи и ионные связи.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОНЯТИЯ «СВЯЗЬ» И НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ХИМИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ

Химическая связь — это сила притяжения, которая удерживает атомы друг возле друга. Агрегаты конечного размера называются молекулами. Когда-то считали, что в образовании молекул участвуют только ковалентные связи, но теперь известно, что более слабые силы притяжения также очень важны для стабилизации многих макромолекул. Мы знаем, например, что четыре полипептидные цепи гемоглобина объединяются в одну частицу под действием слабых сил. Поэтому теперь принято слабые положительные взаимодействия тоже называть химическими связями, несмотря на то что сами по себе они не способны прочно связать атомы друг с другом.

Химические связи можно охарактеризовать различным образом. Наиболее четкой характеристикой химической связи служит ее прочность. Прочные связи почти никогда не распадаются при физиологических температурах; поэтому атомы, связанные ковалентно, всегда принадлежат одной и той же молекуле. Слабые связи легко разрушаются, и поэтому отдельные слабые связи существуют очень недолго. Лишь

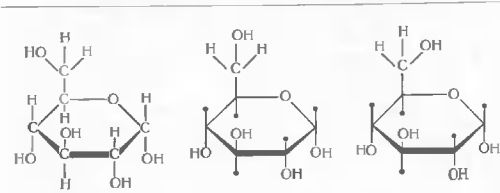


Рис. 4-1. Вращение вокруг C_5—C_6-связи в молекуле глюкозы.
Эта углерод-углеродная связь является ординарной связью, и поэтому возможна любая из трех изображенных конфигураций (*А*, *Б* и *В*)

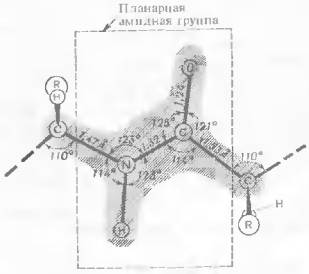
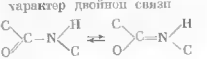


Рис. 4-2. Плоская конфигурация пептидной связи (Pauling, The Nature of the Chemical Bond, 3rd ed., Cornell Univ. Press, Ithaca, N.Y., 1960, p. 498).
Представлена небольшая часть растянутой полипептидной цепи. Все атомы в заштрихованной рамке располагаются в одной плоскости. Поскольку пептидная связь имеет частично характер двойной связи



вращение вокруг нее почти невозможно, однако вокруг двух оставшихся связей, также определяющих конфигурацию полипептида, возможно вращение.

упорядоченные группы таких связей могут существовать длительное время. Прочность связи коррелирует с расстоянием между атомами, так что два атома, соединенные прочной связью, всегда ближе друг к другу, чем те же атомы, соединенные слабой связью. В качестве примера укажем, что расстояние между атомами водорода в молекуле водорода (H : H) равно 0,74Å , а между атомами водорода, которые связаны вандерваальсовыми силами,—1,2Å .

Другой важнейшей характеристикой является максимальное число связей, которое способен образовать данный атом. Число ковалентных связей, которые образует атом, характеризует его валентность. Кислород, например, двухвалентен; он не может образовать более двух ковалентных связей. В случае вандерваальсовых связей, т. е. там, где лимитирующий фактор имеет чисто стерическую природу, возможно большее число вариаций. Тут число возможных связей ограничивается лишь числом атомов, которые могут одновременно касаться друг друга. Образование водород-

ных связей сопряжено с рядом ограничений. Ковалентно связанный атом водорода обычно участвует в образовании лишь одной водородной связи, а атом кислорода редко образует более двух водородных связей.

Угол между двумя связями, в которых участвует один и тот же атом, называется углом связи. Величина угла между двумя определенными ковалентными связями приблизительно постоянна. Если, например, атом углерода имеет четыре ординарные связи, то они направлены к вершине тетраэдра (угол связи — 109°). В противоположность этому углы между слабыми связями довольно сильно варьируют.

Связи различаются также по допускаемой ими степени свободы вращения. Ординарная ковалентная связь допускает свободное вращение связанных атомов (рис. 4-1), а двойные и тройные связи являются совершенно жесткими. Например, карбонил (C=O) и иминогруппа N—H пептидной связи расположены в одной плоскости (рис. 4-2), так как пептидная связь имеет частично характер двойной связи. Более слабые ионные связи имеют совершенно иной характер. Они не накладывают никаких ограничений на ориентацию связанных атомов.

ХИМИЧЕСКИЕ СВЯЗИ ОБЪЯСНИМЫ НА ОСНОВЕ ЗАКОНОВ КВАНТОВОЙ МЕХАНИКИ

До создания в 20-х годах квантовой теории атома (квантовой механики) природа прочных и слабых связей оставалась для химиков загадкой. С появлением квантовой теории химики получили возможность подвести прочную теоретическую основу под различные ранее сформулированные эмпирические законы. Стало ясно, что все химические связи, как слабые, так и прочные, основаны на электростатических силах. Квантовомеханическое истолкование было дано не только для ковалентной связи (обобществление электронов), но также и для слабых связей.

ОБРАЗОВАНИЕ ХИМИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ СОПРОВОЖДАЕТСЯ ИЗМЕНЕНИЕМ ФОРМ ЭНЕРГИИ

Спонтанное образование связи между двумя атомами всегда сопровождается освобождением некоторого количества внутренней энергии атомов и ее переходом в другую форму энергии. Чем прочнее связь, тем большее количество энергии выделяется при ее образовании. Таким образом, реакция связывания между двумя атомами A и B описывается выражением

$$A + B \rightarrow AB + \text{Энергия}, \qquad (4\text{-}1)$$

где AB — полученное соединение.

Скорость реакции пропорциональна частоте столкновений между атомами A и B. Единицей для измерения энергии чаще всего служит калория — количество энергии, которое необходимо для того, чтобы нагреть 1 г воды от 14,5 до 15,5° С. Изменение энергии в химических реакциях выражают по большей части в килокалориях на моль, так как изменение энергии в пересчете на моль химических связей составляет величину порядка нескольких тысяч калорий.

Химические связи не вечны — существуют силы, способные их разрушать. Важнейшим источником этих сил является тепловая энергия. Столкновения с быстро движущимися молекулами или атомами могут разрушать химические связи. В момент соударения некоторая часть кинетической энергии движущейся молекулы передается атомам другой молекулы. Чем быстрее движется молекула (т. е. чем выше температура), тем больше вероятность разрыва связи при столкновении. Следовательно,

с повышением температуры стабильность данного вещества снижается. Разрыв связи описывается выражением

$$AB + Энергия \rightarrow A + B. \qquad (4\text{-}2)$$

Количество энергии, необходимое для разрыва какой-нибудь связи, всегда равно тому количеству, которое выделяется при ее образовании. Это равенство следует из первого закона термодинамики, согласно которому энергия не создается и не исчезает (исключение составляет взаимопревращение массы и энергии).

РАВНОВЕСИЕ МЕЖДУ ОБРАЗОВАНИЕМ И РАЗРЫВОМ СВЯЗЕЙ

Из сказанного выше следует, что каждая связь является результатом действия двух противоположных сил — образующих связь (электростатические взаимодействия) и разрушающих связь. При достижении равновесия в замкнутой системе в каждый момент времени число вновь образованных связей точно равно числу разрушенных. Согласно закону действия масс, процесс описывается выражением

$$K_{eq} = \frac{[AB]}{[A] \times [B]}, \qquad (4\text{-}3)$$

где K_{eq} — константа равновесия; [A], [B] и [AB] — концентрация молекул A, B и AB в моль/л. Независимо от того, какая смесь молекул имеется в начале реакции (только свободные A и B, только AB или смесь A, B и AB), в состоянии равновесия отношение их концентраций определяется величиной K_{eq}.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ

Когда реакция приближается к равновесию, это всегда сопровождается превращением одних форм энергии в другие. Биологу удобнее выражать эти превращения, пользуясь представлением о *свободной энергии*, заимствованным из физической химии. Свободную энергию обозначают символом G[1]. Мы не станем излагать здесь термодинамическую теорию свободной энергии и не будем рассматривать вопрос о том, чем эта форма отличается от всех других известных форм энергии. Читателю, желающему более подробно ознакомиться с проблемой, следует обратиться к специальному руководству по химической термодинамике. Для наших целей достаточно отметить, что *свободная энергия означает энергию, способную производить работу*.

Из второго закона термодинамики следует, что при самопроизвольных химических реакциях свободная энергия всегда уменьшается (ΔG отрицательно). Когда система достигает равновесия, дальнейшего изменения свободной энергии не происходит ($\Delta G = 0$). Следовательно, состояние равновесия для замкнутой системы — это такое состояние, при котором ее свободная энергия находится в минимуме.

Потеря свободной энергии при достижении равновесия сопровождается либо превращением энергии в тепло, либо возрастанием энтропии. Мы не будем пытаться подробно изложить здесь представления об энтропии (для этого также следует обратиться к руководству по химической термодинамике); нам достаточно знать, что энтропия является мерой неупо-

[1] В США до недавнего времени свободную энергию обозначали символом F. Однако теперь в международной литературе по физической химии чаще пользуются символом G в честь великого физика XIX в. Гиббса.

рядоченности системы. Чем больше неупорядоченность системы, тем больше ее энтропия. Возрастание энтропии означает, что многие самопроизвольные химические реакции протекают без выделения тепла. Так, например, при растворении NaCl в воде тепло не выделяется, а поглощается, и тем не менее свободная энергия этой системы снижается, так как увеличивается неупорядоченность распределения ионов Na^+ и Cl^-, когда они из твердой фазы (т. е. из кристаллов) переходят в жидкую.

K_{eq} ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНО СВЯЗАНО С ΔG

Совершенно очевидно, что чем прочнее данная связь, иными словами, чем большим изменением свободной энергии (ΔG) сопровождается ее образование, тем большее число атомов в системе находится в связанном состоянии. Это может быть выражено количественно и следующем виде:

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq}, \text{ или } K_{eq} = e^{-\Delta G/RT}, \qquad (4\text{-}4)$$

где R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура, $e = 2{,}718$, $\ln K$ — логарифм K при основании e и K_{eq} — константа равновесия. Подставив величины $R = 1{,}987$ кал/(моль·град) и $T = 298$ (для 25° С), мы увидим, что при низких значениях ΔG (порядка 2ккал/моль) реакция синтеза практически идет до конца, если все реагенты присутствуют в молярных концентрациях:

K_{eq}	ΔG, ккал/моль	K_{eq}	ΔG, ккал/моль
0,001	4,089	10,0	—1,363
0,01	2,726	100,0	—2,726
0,1	1,363	1000,0	—4,089
1,0	0		

КОВАЛЕНТНЫЕ СВЯЗИ — ОЧЕНЬ ПРОЧНЫЕ СВЯЗИ

Изменение свободной энергии при возникновении ковалентных связей, т. е. при образовании молекулы из свободных атомов, например таких, как водород или кислород, очень велико. ΔG лежит обычно в пределах от —50 до —110 ккал/моль. Из уравнения (4-4) следует, что K_{eq} такой реакции соответственно велико и, следовательно, концентрация свободных атомов водорода и кислорода должна быть очень мала. Если, например, исходная концентрация реагирующих атомов составляет 1 моль/л, а ΔG реакции равно —100 ккал/моль, то при достижении равновесия лишь один из 10^{40} атомов остается несвязанным.

СВОБОДНАЯ ЭНЕРГИЯ ОБРАЗОВАНИЯ СЛАБЫХ СВЯЗЕЙ ЛЕЖИТ В ПРЕДЕЛАХ 1—7 ККАЛ/МОЛЬ

В биологических системах главную роль играют три типа слабых связей: связи, обусловленные вандерваальсовыми силами, водородные связи и ионные связи. Иногда, как мы это увидим ниже, различие между ионной и водородной связью проводится, в сущности, произвольно.

Наиболее слабыми являются вандерваальсовы связи. Энергия этих связей (1—2 ккал/моль) лишь незначительно превышает кинетическую энергию теплового движения. Энергия водородной и ионной связей лежит в пределах 3—7 ккал/моль.

В растворах почти все молекулы образуют определенное число слабых связей с ближайшими атомами. Все молекулы способны к образованию вандерваальсовых связей; водородные и ионные связи также могут образовываться между молекулами (ионами), имеющими дополнительный

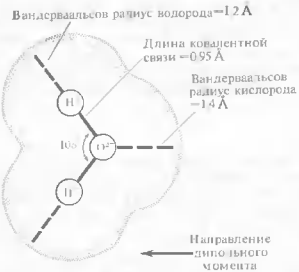


Рис. 4-3. Структура молекулы воды.

заряд или такими, у которых заряд поляризован. Некоторые молекулы могут, следовательно, участвовать в образовании нескольких типов слабых связей. Однако из термодинамических соображений следует, что молекулы должны всегда стремиться к образованию более прочных связей.

ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ СЛАБЫЕ СВЯЗИ ПОСТОЯННО ОБРАЗУЮТСЯ И РАЗРУШАЮТСЯ

Энергия самой прочной из слабых связей всего лишь в 10 раз больше кинетической энергии теплового движения при 25 °С (0,6 ккал/моль). Так как в распределении кинетической энергии частиц имеется значительный разброс, при физиологических температурах всегда существуют молекулы, кинетическая энергия которых достаточна для разрушения слабых связей.

ОБРАЗОВАНИЕ И РАЗРУШЕНИЕ СЛАБЫХ СВЯЗЕЙ ПРОИСХОДЯТ БЕЗ УЧАСТИЯ ФЕРМЕНТОВ

Среднее время жизни одной слабой связи составляет лишь доли секунды, а это означает, что клетка не нуждается в специальном механизме для того, чтобы ускорять образование и разрушение слабых связей. Поэтому ферменты никогда не принимают участия в такого рода реакциях.

РАЗЛИЧИЕ МЕЖДУ ПОЛЯРНЫМИ И НЕПОЛЯРНЫМИ МОЛЕКУЛАМИ

В основе всех типов слабых взаимодействий лежит притяжение между электрическими зарядами. Разделение электрических зарядов может быть постоянным или временным в зависимости от природы взаимодействующих атомов. Так, например, в молекуле кислорода (O : O) электроны распределены симметрично и атомы не несут заряда. В противоположность этому в молекуле воды (H : O : H) заряд поляризован, так как спаренные электроны распределены неравномерно (рис. 4-3). Они

более прочно связаны с атомом кислорода, который поэтому несет значительный отрицательный заряд; уравновешивающий его положительный заряд несут совместно два атома водорода. Центры этих зарядов удалены друг от друга и создают дипольный момент молекулы. Вследствие неравномерного обобществления электронов сродство связанных атомов к электронам оказывается различным. Атомы, проявляющие тенденцию притягивать электроны, называются электроотрицательными, а атомы, легко отдающие электроны,— электроположительными.

Молекулы, подобные H_2O, у которых имеется дипольный момент, получили название *полярных молекул*. *Неполярные молекулы* не имеют эффективного дипольного момента. В молекуле метана (CH_4), например, атомы водорода и углерод имеют одинаковое сродство к валентным электронным парам, и поэтому ни атом углерода, ни атомы водорода не несут существенного заряда.

На распределение заряда в молекуле (особенно если это полярная молекула) может влиять соседство других молекул. Под влиянием соседней молекулы неполярная молекула может оказаться слегка поляризованной. Даже соседство другой неполярной молекулы будет изменять неполярную молекулу, индуцируя флуктуации в распределении заряда. Такие индукционные эффекты вызывают, однако, не столь сильное разделение зарядов, как в полярных молекулах, что в конечном счете ведет к более слабым химическим взаимодействиям.

ВАНДЕРВААЛЬСОВЫ СИЛЫ

При значительном сближении двух атомов между ними возникает неспецифическое притяжение, которое называют вандерваальсовым взаимодействием. Оно основано не на постоянном разделении зарядов, а на индуцированной флуктуации зарядов, возникающей в результате сближения молекул. Следовательно, такая связь может возникать между всеми типами молекул, как полярными, так и неполярными. Сила взаимодействия этого типа обратно пропорциональна шестой степени расстояния между взаимодействующими группами (рис. 4-4).

При еще меньших расстояниях начинают играть роль более значительные вандерваальсовы силы отталкивания. Это отталкивание обусловлено взаимопроникновением электронных оболочек соприкасающихся атомов. На определенном расстоянии, характерном для каждого атома, вандерваальсовы силы притяжения и отталкивания уравновешиваются. Это расстояние называется вандерваальсовым радиусом атома (рис. 4-5). Ниже приведены вандерваальсовы радиусы некоторых атомов.

	Вандерваальсов радиус, Å
H	1,2
N	1,5
O	1,4
P	1,9
S	1,85
CH_3-группа	2,0
Полутолщина ароматической молекулы	1,7

Когда расстояние между двумя атомами равно сумме их вандерваальсовых радиусов, величина энергии связи возрастает пропорционально размеру взаимодействующих атомов. В среднем она не превышает 1 ккал/моль, что лишь ненамного больше кинетической энергии теплового движения при комнатной температуре (0,6 ккал/моль).

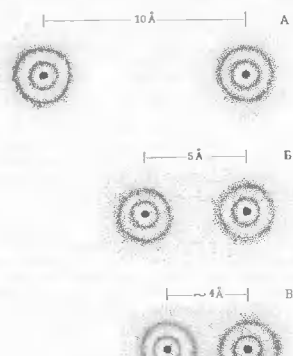


Рис. 4-4. Схема, иллюстрирующая вандерваальсовы силы притяжения и отталкивания между одноатомными молекулами инертного благородного газа (аргона) в зависимости от расположения внешних электронов (Pauling, General Chemistry, 2nd ed., Freeman, San Francisco, 1953, p. 322).
А. Слабое вандерваальсово притяжение. *Б*. Очень сильное вандерваальсово притяжение. *В*. Вандерваальсово притяжение, уравновешенное силами отталкивания, возникшими в результате взаимопроникновения внешних электронных слоев.

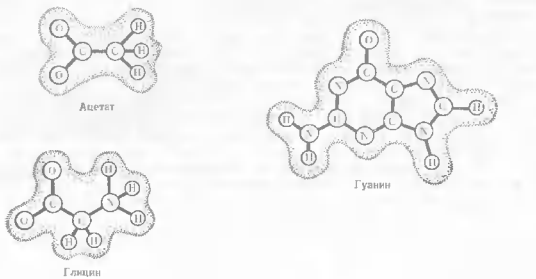


Рис. 4-5. Схематическое изображение некоторых молекул.
Контурной линией обозначены вандерваальсовы радиусы атомов.

Из сказанного следует, что вандерваальсовы силы притяжения эффективны при физиологических температурах только в тех случаях, когда много атомов одной молекулы одновременно взаимодействует со многими атомами другой молекулы. Лишь при этом условии энергия взаимодействия больше, чем тенденция к диссоциации, обусловленная беспо-

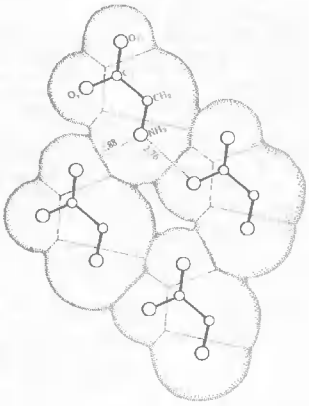


Рис. 4-6. Расположение молекул в плоскости кристалла, образованного аминокислотой глицином (Pauling, The Nature of the Chemical Bond, 3rd ed., Cornell Univ. Press, Ithaca, N.Y., 1960, p. 262).
Упаковка молекул определяется вандерваальсовыми радиусами атомных групп. Исключение составляют контакты N—H...O, поскольку в этом случае расстояния между атомами H и O вследствие образования водородной связи укорочены.

Рис. 4-7. Схема, иллюстрирующая комплементарность конфигураций поверхностей антигена и антитела, что обусловливает образование вторичных связей между ними.

рядочным тепловым движением. Для обеспечения эффективного взаимодействия между несколькими атомами поверхности соприкасающихся молекул должны точно соответствовать друг другу, так как расстояние между двумя взаимодействующими атомами не должно заметно превышать сумму их вандерваальсовых радиусов (рис. 4-6). Сила взаимодействия быстро падает до нуля, если это расстояние оказывается хотя бы немногим больше указанной величины. Таким образом, наиболее прочные вандерваальсовы связи возникают тогда, когда одна из молекул содержит «полость», в которую проникает комплементарная по форме группа атомов другой молекулы (рис. 4-7). Именно такая ситуация имеет место, например, при взаимодействии антигена с соответствующим антителом (гл. 19). Энергия взаимодействия может при этом достигать 10 ккал/моль, так что комплекс антиген — антитело распадается очень редко. Многие полярные молекулы редко участвуют в образовании вандерваальсовых связей. Это объясняется тем, что при образовании других типов связей они могут терять больше свободной энергии.

ВОДОРОДНЫЕ СВЯЗИ

Водородная связь образуется вследствие притяжения между ковалентно связанным атомом водорода, обладающим некоторым положительным зарядом, и отрицательно заряженным ковалентно связанным акцепторным атомом (рис. 4-8). Например, водородный атом иминогруппы (N—H) притягивается отрицательно заряженным атомом кислорода кетогруппы (C=O). Иногда атомы, участвующие в образовании водородной связи, принадлежат группам, обладающим единицей заряда (NH_3^+ или COO^-). В других случаях донорный водородный атом и его отрицательно заряженный акцептор обладают зарядом <1.

Биологически наиболее важные водородные связи образуются за счет атомов водорода, связанных ковалентно с кислородом (O—H) или азотом

Таблица 4-1 Приблизительная длина биологически важных водородных связей

Связь	Приблизительная длина связи, Å	Связь	Приблизительная длина связи, Å
O—H·····O	2,70±0,10	N—H·····O	3,04±0,13
O—H·····O⁻	2,63±0,10	N⁺—H·····O	2,93±0,10
O—H·····N	2,88±0,13	N—H·····N	3,10±0,13

(N—H). В качестве отрицательно заряженных акцепторов также обычно выступают атомы азота или кислорода. В табл. 4-1 перечислены наиболее важные водородные связи. Энергия водородной связи лежит в пределах 3—7 ккал/моль, большие величины соответствуют большей разнице в заря-

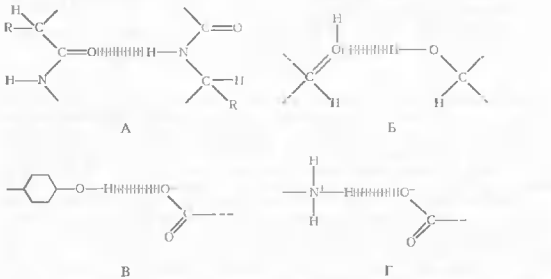


Рис. 4-8. Типы водородных связей, встречающихся в биологических молекулах.
А. Водородная связь между пептидными группами. *Б*. Водородная связь между двумя гидроксильными группами. *В*. Водородная связь между заряженной карбоксильной группой и гидроксилом тирозина. *Г*. Водородная связь между заряженной аминогруппой и заряженной карбоксильной группой.

Рис. 4-9. Прочность водородных связей в зависимости от их направленности.
А. Направление водородной связи совпадает с направлением ковалентной связи O—H, что увеличивает прочность водородной связи.
Б. Водородная связь образует угол с ковалентной и поэтому оказывается менее прочной.

дах между донорными и акцепторными атомами. Таким образом, водородные связи слабее ковалентных, но значительно прочнее вандерваальсовых. Следовательно, водородная связь сближает атомы на расстояния, меньшие, чем сумма их вандерваальсовых радиусов, но большие, чем длина ковалентных связей.

В отличие от вандерваальсовых связей водородные связи имеют направленный характер. В наиболее прочных водородных связях атом водорода расположен по прямой, соединяющей донорный и акцепторный атомы (рис. 4-9); если же водородная связь располагается под углом к ковалентной, то ее энергия выражается намного меньшей величиной. Наконец, водородные связи значительно более специфичны, нежели вандерваальсовы, так как они возникают только при наличии в молекулах вполне определенных донорных и акцепторных групп.

НЕКОТОРЫЕ ИОННЫЕ СВЯЗИ ЯВЛЯЮТСЯ В СУЩНОСТИ ВОДОРОДНЫМИ СВЯЗЯМИ

Многие органические молекулы содержат ионные группы, несущие одну или несколько единиц положительного или отрицательного заряда. Отрицательно заряженные мононуклеотиды содержат, например, фосфатные группы (PO_3^{2-}), а все аминокислоты (за исключением пролина) имеют отрицательно заряженную карбоксильную группу (COO^-) и положительно заряженную аминогруппу (NH_3^+). Эти заряды обычно взаимно нейтрализуются, если группы располагаются на близком расстоянии. Электростатические силы, действующие между противоположно заряженными группами, называют ионными связями. Средняя энергия ионной связи в водных растворах составляет 5 ккал/моль.

Во многих случаях заряд ионизованной органической молекулы нейтрализуется либо неорганическими катионами, такими, как Na^+, K^+ или Mg^{2+}, либо неорганическими анионами, например Cl^- или SO_4^{2-}. В водных растворах нейтрализующий катион или анион не может занять фиксированное положение, так как он обычно гидратирован и вследствие этого непосредственно не связывается с заряженной группой. Поэтому принято считать, что в водных растворах электростатическое взаимодействие с гидратированными неорганическими катионами или анионами не играет существенной роли при определении конфигурации органических молекул.

Вместе с тем если между противоположно заряженными группами может возникнуть водородная связь, то эта связь всегда строго направлена. Например, между COO^-- и NH_3^+-группами часто возникает прочная связь. Так как такие связи прочнее, чем связи между группами, заряд которых меньше единицы, их длина соответственно меньше. Прочная водородная связь может образоваться также между группами, одна из которых несет единицу заряда, а другая — меньший заряд. Так, например, водород, принадлежащий аминогруппе ($—NH_3$), прочно связывается с атомом кислорода карбоксильной группы (COO^-).

ДЛЯ СЛАБЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НЕОБХОДИМО, ЧТОБЫ ПОВЕРХНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ МОЛЕКУЛ БЫЛИ КОМПЛЕМЕНТАРНЫМИ

Слабые связи лишь тогда эффективны, когда взаимодействующие поверхности располагаются на очень близком расстоянии одна от другой. Такая близость возможна только в том случае, если поверхности молекул имеют *комплементарные структуры*, так что выступающая группа (или положительный заряд) на одной поверхности соответствует полости (или отрицательному заряду) на другой. Иными словами, взаимодействующие молекулы должны подходить друг к другу, как ключ к замку. В клетке такие условия часто означают, что некоторые молекулы вряд ли вообще когда-нибудь взаимодействуют друг с другом, так как они не обладают свойствами, необходимыми для подобных взаимодействий. Например, некоторые (полярные) молекулы содержат донорные атомы водорода, но не содержат соответствующих акцепторов, тогда как другие, наоборот, содержат акцепторы и не содержат донорных групп или атомов. В то же время многие клеточные молекулы способны к эффективному взаимодействию друг с другом. Наиболее важным примером такого рода могут служить молекулы воды.

МОЛЕКУЛЫ ВОДЫ ОБРАЗУЮТ ВОДОРОДНЫЕ СВЯЗИ

В физиологических условиях молекулы воды редко диссоциируют с образованием H^+ и OH^--ионов; они существуют в виде полярных молекул H—O—H. Атомы водорода и кислорода образуют прочные водородные связи. Атом кислорода в молекуле H_2O может связываться с двумя внешними атомами водорода, а атом водорода может связываться лишь с одним

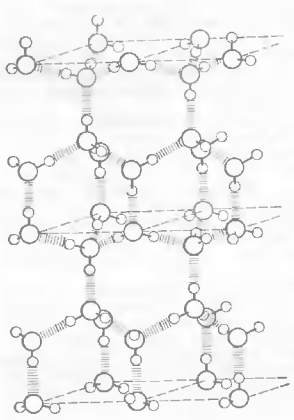


Рис. 4.10. Схематическое изображение решет
ки, образованной молекулами H_2O (Pauling
The Nature of Chemical Bond, 3rd ed., Cornell
Univ. Press, Ithaca, N.Y., 1960,
p. 465).
(Атомы кислорода представлены большими
кружками, а атомы водорода — малыми
Благодаря энергетически выгодному образо
ванию специфических водородных связей меж
ду молекулами H_2O эти молекулы распола
гаются в вершинах смежных тетраэдров.
Хотя жесткость такой организации зависи
от температуры, нарисованная здесь структура
преобладает как в воде, так и в кристаллах
льда.

ближайшим атомом кислорода. Эти связи направлены к вершинам тетраэдра (рис. 4-10), так что каждая молекула воды и в твердом состоянии стремится образовать связи с четырьмя другими молекулами (расположенными в вершинах тетраэдра). В кристаллах льда эти связи носят жесткий характер и расположение молекул фиксировано в пространстве. Выше точки плавления льда (0 °С) под влиянием кинетической энергии теплового движения водородные связи разрываются и молекулы постоянно меняют своих ближайших соседей. Однако даже тогда, когда вода находится в жидком состоянии, большинство ее молекул в каждый данный момент связано четырьмя прочными водородными связями.

СЛАБЫЕ СВЯЗИ МЕЖДУ МОЛЕКУЛАМИ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Хотя средняя энергия вторичной связи мала в сравнении с энергией ковалентной связи, тем не менее она достаточно велика по сравнению с энергией теплового движения, чтобы обеспечить возможность образования в водных растворах вторичных связей между большинством известных молекул. Вводя поправку на большую концентрацию молекул в жидкости, можно найти соотношение между числом связанных и свободных молекул по уравнению (4-4), из которого следует, что такие низкие энергии взаимодействия, как 2—3 ккал/моль, вполне достаточны и обеспечивают образование максимального числа прочных вторичных связей при физиологических температурах.

Специфическая структура раствора в каждый данный момент сильно зависит от природы растворенных молекул не только потому, что каждая молекула имеет свою вполне определенную форму, но также еще и потому, что молекулы сильно различаются по типу вторичных связей, которые они способны образовать. Эти различия означают, что данная молекула будет стремиться к перемещению до тех пор, пока она не образует с другой молекулой самую прочную из возможных для нее вторичных связей.

Растворы, разумеется, не статичны. Под разрушающим влиянием теплового движения специфическая структура раствора постоянно меняется, принимая различные конфигурации (с приблизительно одинаковым содержанием энергии). Не менее важно для биологических систем и то, что в процессе метаболизма непрерывно происходит превращение одних веществ в другие, а вследствие этого автоматически изменяется и характер вторичных связей, которые могут образоваться. Таким образом, структура клеточных растворов постоянно нарушается не только под влиянием теплового движения, но также и в результате метаболических превращений растворенных веществ.

ОРГАНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЫ, СПОСОБНЫЕ К ОБРАЗОВАНИЮ ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ, РАСТВОРИМЫ В ВОДЕ

Энергия водородной связи в расчете на одну атомную группу значительно больше, чем энергия вандерваальсовой связи. Поэтому если молекула способна к образованию водородных связей, то она преимущественно их и образует. Если мы, например, попробуем смешать воду с бензолом, т. е. с соединением, которое не может образовать водородные связи, то быстро произойдет разделение этих двух веществ, так как молекулы воды образуют друг с другом водородные связи, а молекулы бензола соединяются вандерваальсовыми силами. Органическое вещество, неспособное к образованию водородных связей, практически невозможно растворить в воде.

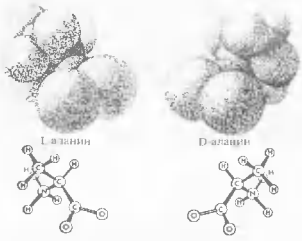


Рис. 4-11. Стереоизомеры аминокислоты аланина (Pauling, General Chemistry. 2nd ed., Freeman, San Francisco, 1958, p. 598).

В то же время полярные молекулы, вроде глюкозы и пировиноградной кислоты, которые содержат большое число групп, способных к образованию прочных водородных связей (=O или —OH), до некоторой степени растворимы в воде (гидрофильны в отличие от гидрофобных соединений). Это оказывается возможным потому, что при проникновении этих молекул в решетку воды взамен разрушенных водородных связей между молекулами воды немедленно образуются новые водородные связи между водой и глюкозой. Однако возникающая при этом новая структура раствора обычно энергетически менее выгодна, чем структура чистой воды, и потому даже для наиболее полярных соединений существует некий предел растворимости.

Таким образом, почти все вещества, постоянно присутствующие в клетке (поступающие в клетку с пищей или образующиеся в ней в процессе биосинтеза), не полностью растворимы в воде. Молекулы этих веществ благодаря тепловому движению непрерывно сталкиваются с молекулами других веществ, и это происходит до тех пор, пока они не найдут комплементарные поверхности других молекул и не соединятся с ними, высвободив при этом молекулы воды, которые могут теперь связаться друг с другом.

УНИКАЛЬНАЯ ФОРМА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ. ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ОБ ИЗБИРАТЕЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ

Хотя число разных групп, из которых построены клеточные молекулы (т. е. групп OH, NH_2, CH_3 и т. д.), ограниченно, тем не менее эти молекулы весьма избирательно взаимодействуют друг с другом. Обусловлено это тем, что каждая молекула обладает уникальными свойствами в смысле возможности соединения с другими молекулами. Очень ярким примером этого служит специфичность в отношении стереоизомеров. Белки, например, всегда построены из L-аминокислот и никогда не содержат D-изомеров (рис. 4-11). D- и L-аминокислоты имеют одни и те же ковалентные связи, но по своей способности связываться с асимметричными молекулами они нередко отличаются очень сильно. Вследствие этого большинство ферментов специфично в отношении L-аминокислот. Если какая-либо L-аминокислота способна связываться с определенным ферментом, то ее антипод — соответствующая D-аминокислота — таким свойством не обладает.

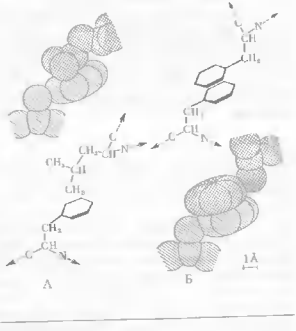


Рис. 4-12. Примеры вандерваальсовых (гидрофобных) связей между неполярными боковыми группами аминокислот (Scherada, in The Proteins, H. Neurath (ed.), 2nd ed., Vol. 1, Acad. Press, N.Y., 1963, p. 527). Отдельные атомы водорода не показаны. Для большей ясности вандерваальсовы радиусы уменьшены на 20%. Представлены связи: фенилаланина и лейцина (*А*); фенилаланина и фенилаланина (*Б*).

Существует общее правило, согласно которому большинство молекул в клетке способно образовывать хорошие «слабые» связи лишь с небольшим числом типов молекул. Частично это объясняется тем, что все молекулы в биологических системах существуют в водном окружении. Образование связи между какими-либо молекулами в клетке зависит не только от того, способны ли эти молекулы вообще связываться друг с другом, но также и от того, обеспечит ли образование данной связи максимальное число водородных связей в водном растворе.

Сильно выраженная способность воды отталкивать неполярные группы обусловливает эффект, который принято называть *гидрофобным связыванием*. Некоторые химики склонны называть гидрофобными все связи, возникающие между неполярными группами *в водном растворе* (рис. 4-12). Термин этот не совсем удачен, так как речь идет в сущности не об образовании связей, а об их отсутствии. (Связи, которые неполярные группы стремятся образовать между собой, обусловлены вандерваальсовыми силами притяжения.) Однако этот же термин часто и очень удобен, ибо он подчеркивает тот факт, что неполярные группы стремятся расположиться так, чтобы не контактировать с молекулами воды.

Для примера рассмотрим различие в энергии связывания в водном растворе аланина и глицина с какой-нибудь третьей молекулой, поверхность которой комплементарна поверхности молекулы аланина. Аланин отличается от глицина присутствием в его молекуле одной метильной группы. Когда аланин связывается с какой-нибудь третьей молекулой, вандерваальсов контакт его метильной группы дает 1 ккал/моль, между тем как при взаимодействии глицина эта энергия не выделяется. Используя уравнение (4-4), можно подсчитать, что одно только это небольшое различие в энергии связывания приведет к тому, что аланин будет связываться в 6 раз эффективнее, чем глицин. Присутствие метильной группы в молекуле аланина нарушает структуру решетки воды значительно больше, чем это делает водородный атом, имеющийся в боковой группе глицина. Пока мы еще не в состоянии сказать, как велика поправка, которую нужно внести, чтобы учесть разрушающее воздействие боковых гидрофобных групп на структуру воды. Новейшие расчеты говорят о том, что гидрофобная сила, с которой вода стремится вытолкнуть аланин, направ-

ляя его к упомянутой третьей молекуле, на 2—3 ккал/моль больше, чем та же сила в случае глицина.

Итак, мы приходим к важному выводу, что разница в энергии связывания двух очень сходных молекул (отличающихся наличием неполярной группы) с какой-либо третьей молекулой в водной среде клетки по крайней мере на 2—3 ккал/моль больше, нежели в неводных растворителях. Часто эта разница составляет 3—4 ккал/моль, так как реагирующие молекулы содержат и полярные группы, способные к образованию водородных связей.

ПРЕИМУЩЕСТВО РЕАКЦИЙ, ПРИ КОТОРЫХ ΔG ЛЕЖИТ В ПРЕДЕЛАХ 2—5 ККАЛ/МОЛЬ

Мы видели, что энергия одной вторичной связи (2—5 ккал/моль) достаточна, чтобы обеспечить преимущественное связывание данной молекулы с некоторой группой других молекул. Не менее важно и то, что эти энергетические различия сравнительно малы, так как если бы энергия вторичных связей была в несколько раз больше, то внутриклеточное пространство имело бы жесткую оргавизацию типа кристаллической. В этом случае разрушение вторичных связей происходило бы крайне редко и скорость диффузии была бы низкой, что несовместимо с существованием клетки.

ФЕРМЕНТЫ ПРИСОЕДИНЯЮТСЯ К СУБСТРАТАМ ПРИ ПОМОЩИ СЛАБЫХ СВЯЗЕЙ

Вторичные силы — это те силы, за счет которых осуществляется присоединение ферментов к субстратам. Обычно ферменты имеют сродство лишь к собственным субстратам и не связываются без разбора с любыми молекулами.

Поскольку ферменты катализируют реакцию в обоих направлениях, они должны иметь сродство ко всем компонентам реакции. В некоторых специальных случаях удается рассчитать константу равновесия для реакции связывания фермента с одним из его субстратов и с ее помощью, исходя из уравнения (4-4), вычислить ΔG этой реакция. Этот расчет позволяет установить, какого типа связь образуется. Величина ΔG в пределах 5—10 ккал/моль означает, что в реакции образования фермент-субстратного комплекса принимает участие достаточно прочная вторичная связь или несколько таких связей. Особенно важно отметить, что энергия образования фермент-субстратного комплекса никогда не бывает особенно большой, благодаря чему эти комплексы могут возникать и распадаться быстро под действием беспорядочного теплового движения. Этот факт объясняет, почему ферменты функционируют так быстро (иногда до 10^6 актов катализа в секунду). Если бы ферменты и субстраты были связаны более прочно, катализ осуществлялся бы значительно медленнее.

ФОРМА БОЛЬШИНСТВА МОЛЕКУЛ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ СЛАБЫМИ СВЯЗЯМИ

У целого ряда веществ распределение ковалентных связей в молекуле автоматически определяет форму молекулы. Такое постоянство формы характерно для молекул с ковалентными связями, вокруг которых свободное вращение невозможно. Внутреннее свободное вращение может происходить только в том случае, если атомы или группы связаны орди-

парной связью (например, метильные группы в этане ($H_3C—CH_3$) свободно вращаются вокруг углерод-углеродной связи).

Когда в образовании связи участвует более одной пары электронов, свободное вращение вокруг нее невозможно: атомы, соединенные такой связью, должны лежать в одной плоскости. Пурины и пиримидины благодаря ароматическим кольцам представляют собой плоские молекулы (толщиной 3,4 Å). *Молекулы ароматических соединений* имеют вполне определенную форму. Они почти всегда плоские независимо от того, в какой среде они в данный момент находятся.

В противоположность этому молекулы, содержащие ординарные связи (допускающие свободное вращение), могут, казалось бы, существовать во многих различных формах. Однако эта теоретическая вероятность фактически редко реализуется, так как возможные трехмерные конфигурации таких молекул различаются между собой по числу достаточно прочных вторичных связей, которые данные конфигурации допускают. Вообще говоря, существует лишь одна-единственная конфигурация, отличающаяся существенно меньшей величиной свободной энергии по сравнению со всеми другими геометрически возможными конфигурациями.

Два класса вторичных связей могут играть важную роль в определении трехмерной структуры молекулы. К первому относятся внутримолекулярные вторичные связи, образуемые между атомами, ковалентно связанными в цепочки. Внутримолекулярные вторичные связи часто обусловливают складывание линейной молекулы, благодаря которому атомы, далеко отстоящие друг от друга и не связанные непосредственной ковалентной связью, могут контактировать между собой. Такие молекулы приобретают в конце концов компактную (глобулярную) форму. Ко второму классу относятся внешние (межмолекулярные) связи, образуемые между атомами, не связанными ковалентно. Молекулы, у которых оптимальная трехмерная конфигурация достигается за счет межмолекулярных вторичных связей, часто имеют растянутую (фибриллярную) форму.

В настоящее время не существует простой количественной теории, позволяющей описать форму макромолекулы исходя из ее строения; и хотя одна из конфигураций молекулы белка или нуклеиновой кислоты может быть энергетически более выгодной, чем все остальные, вывести эту конфигурацию из данных об энергиях связей мы пока еще не в состоянии. Причин для этого две. Одна — чисто умозрительная. Число возможных конфигураций для молекулы нуклеиновой кислоты или белковой молекулы (пусть даже относительно небольшой) огромно. Чтобы рассчитать сумму энергий всех слабых связей для всех возможных конфигураций при помощи современных приемов построения молекулярных моделей, потребовались бы годы работы. (В будущем положение может, разумеется, измениться: использование электронно-вычислительных машин может до некоторой степени упростить эту задачу.) Другая причина заключается в том, что мы еще очень мало знаем о природе слабых связей, во многих случаях мы не знаем точно ни энергии связи, ни величины угла между связями.

В настоящее время трехмерная структура белков и нуклеиновых кислот может быть установлена лишь с помощью рентгеноструктурного анализа. К счастью, эти исследования уже начали раскрывать некоторые общие принципы, исходя из которых можно строить заключения о том, какие именно слабые химические взаимодействия играют решающую роль в создании трехмерной структуры макромолекул. В частности, выявляется особо важное значение взаимодействия макромолекул с водой, т. е. с веществом, которое преобладает во всех клетках.

ИНОГДА ПОЛИМЕРНЫЕ СТРУКТУРЫ ИМЕЮТ СПИРАЛЬНУЮ КОНФИГУРАЦИЮ

Выше мы отмечали, что полимерные молекулы, такие, как белки и нуклеиновые кислоты, имеют правильно построенные (регулярные) линейные скелеты, в которых многократно повторяются те или иные группы (например, —CO—NH—).

Часто эти регулярно повторяющиеся группы организованы в спиральную конфигурацию, поддерживаемую вторичными связями. Спираль является естественной конформацией для регулярных линейных полимеров, так как в ней все мономерные группы ориентированы одинаково по отношению к молекуле в целом (рис. 4-13). Вследствие этого каждый мономер образует такие же вторичные связи, как и любой другой. Если регулярный линейный полимер не спирализован, то различные мономеры образуют неодинаковые вторичные связи. Ясно, что если один какой-нибудь набор вторичных связей намного сильнее, чем любой другой, то результатом этого должно быть нестабильное состояние молекулы. Таким образом, характерная для спирали винтовая симметрия не определяется

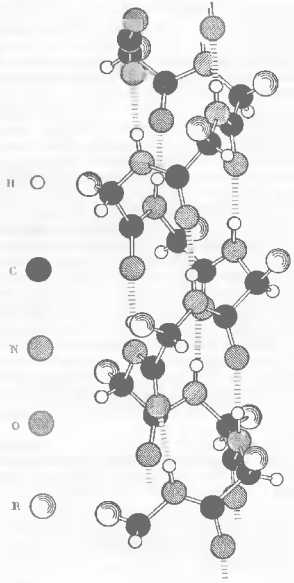


Рис. 4-13. Спиральная конфигурация полипептидной цепи (α-спираль) (Pauling, The Nature of the Chemical Bond, 3rd ed., Cornell Univ. Press, Ithaca, N.Y., 1960, p. 500).
Все атомы, составляющие остов молекулы, имеют одинаковую ориентацию. Структура напоминает винтовую лестницу, в которой «ступеньками» служат остатки аминокислот. Каждый остаток занимает вдоль оси спирали расстояние 1,5 Å. Шаг спирали равен 5,3 Å (следовательно, в одном витке умещается 3,6 остатка). Спираль стабилизируется водородными связями между карбонильной группой одного остатка аминокислоты и иминогруппой другого (четвертого по счету) остатка.

какой-либо особой формой молекулы мономера, а возникает как естественное следствие того расположения мономеров в макромолекуле, которое по своей стабильности намного превосходит все другие типы расположения.

Важно помнить, что большинство биополимеров не принадлежит к категории регулярных полимеров, построенных из одинаковых мономерных единиц. У таких биополимеров к регулярно построенному скелету присоединены различные боковые группы. Именно так построены, например, все белки и нуклеиновые кислоты. В этих случаях, по-видимому, не обязательно ожидать образования спиральной структуры, так как трехмерная структура, энергетически выгодная для упаковки остова, часто создает невыгодные условия для образования связей боковыми группами. Трехмерная структура многих нерегулярных полимеров действительно представляет собой некий компромисс между различными тенденциями: стремлением регулярно построенного остова образовать спиральную конфигурацию и стремлением боковых групп придать остову такую конфигурацию, которая обеспечивала бы максимальную прочность вторичных связей, образованных этими боковыми группами.

СТРУКТУРА БЕЛКА ОБЫЧНО НЕРЕГУЛЯРНА

В случае белков «спор» между боковыми группами и группами остова разрешается обычно в пользу боковых групп, так что большинство аминокислот, входящих в молекулу белка, не участвует в образовании регулярной спирали (более подробно об этом см. в гл. 6). Это объясняется тем, что почти половина боковых групп имеет неполярный характер и может контактировать с водой, лишь поглощая большое количество свободной энергии. Поначалу такое заключение оказалось для многих химиков неожиданностью. Эти исследователи исходили из того, что группы остова образуют прочные водородные связи, тогда как неполярные боковые группы могут образовать лишь более слабые вандерваальсовы связи. Однако их рассуждения были ошибочными, ибо они не учитывали, с одной стороны, возможности образования межмолекулярных водородных связей между полярными группами остова и водой, а с другой стороны, не менее важное обстоятельство, состоящее в том, что для внедрения неполярных боковых групп в решетку структурированной воды необходима затрата значительного количества свободной энергии.

Из сказанного следует любопытный вывод, что в водных растворах макромолекулы, содержащие большое число неполярных боковых групп, будут более стабильными, нежели молекулы, содержащие главным образом полярные группы. Если разрушить полярную молекулу, стабилизированную большим числом внутримолекулярных водородных связей, то уменьшение свободной энергии системы оказывается обычно небольшим, так как полярные группы после разрушения молекулы могут образовать водородные связи с молекулами воды. В противоположность этому при разрушении молекул, имеющих много неполярных групп, уменьшение свободной энергии системы бывает обычно значительно большим, так как в этом случае разрушение структуры молекулы с неизбежностью приводит к внедрению неполярных боковых групп в решетку воды.

ДНК МОЖЕТ ОБРАЗОВАТЬ РЕГУЛЯРНУЮ СПИРАЛЬ

На первый взгляд может показаться, что ДНК способна к образованию регулярной спирали еще в меньшей степени, нежели нерегулярная полипептидная цепь. Ведь последовательность оснований в ДНК нерегулярна,

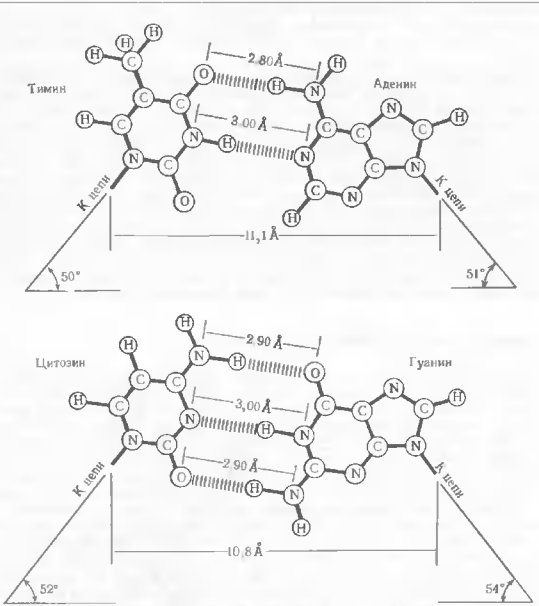


Рис. 4-14. Пары азотистых оснований ДНК, соединенных водородными связями.
Аденин всегда связан с тимином двумя водородными связями, а гуанин с цитозином — тремя. Благодаря тому что меньшее по величине основание (пиримидин) всегда спаривается с большим (пурином), углеводно-фосфатные остовы цепей могут иметь одинаковые конфигурации. Все указанные водородные связи являются прочными связями, поскольку в каждой из них атом водорода лежит на одной прямой с донорным и акцепторным атомами.

и, кроме того, сами основания имеют гидрофобный характер. Пурины (аденин и гуанин) и пиримидины (тимин и цитозин), хотя они и содержат полярные группы (C=O и NH_2), почти совершенно нерастворимы в воде, так как плоская структура делает их полностью гидрофобными.

Однако вопреки всем этим соображениям молекулы ДНК имеют, как правило, регулярную спиральную конфигурацию. Это объясняется тем, что молекулы ДНК состоят обычно из двух комплементарных полинуклеотидных цепей (более подробно об этом см. в гл. 9). Внутримолекулярные и межмолекулярные вторичные связи стабилизируют структуру такой молекулы. Две цепи удерживаются вместе благодаря водородным связям между комплементарными пуринами и пиримидинами (образующими пары оснований; рис. 4-14). Аминогруппа аденина всегда связана водородными

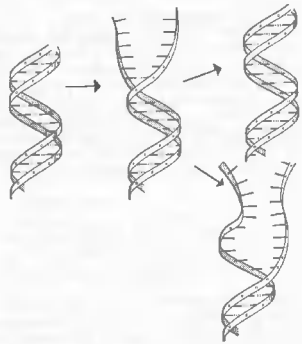


Рис. 4-15. Разрыв концевых водородных связей в ДНК при хаотическом тепловом движении.
Вероятность немедленного восстановления разорванных связей очень велика, поскольку внутренние водородные связи продолжают удерживать обе цепи вместе. Показана также значительно более редко реализующаяся возможность — разрыв остальных водородных связей и расхождение цепей.

связями с кетогруппой тимина, а кетогруппа гуанина — с аминогруппой цитозина. Кроме того, практически все расположенные на поверхности атомы сахара и фосфатной группы образуют водородные связи с водой.

Пары оснований располагаются во внутренней части молекулы ДНК. Благодаря такому расположению плоские молекулы оснований лежат одна над другой, как монеты в стопке, что уменьшает возможность контакта с молекулами воды. Для одиночной полинуклеотидной цепи такое строение было бы гораздо менее выгодным. Одиночная цепь не могла бы иметь регулярного остова, так как молекулы пиримидинов меньше молекул пуринов, и, значит, угол поворота спирали был бы неодинаковым в разных участках цепи. Соединение оснований в пары в двухцепочечной ДНК делает регулярную структуру возможной, так как все пары оснований имеют один и тот же размер.

ДНК УСТОЙЧИВА ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Очень большая устойчивость двухцепочечной ДНК при физиологических температурах объясняется двумя причинами. Во-первых, разрушение двойной спирали приводит к распаду регулярных водородных связей и к возникновению контакта между гидрофобными основаниями и водой. Во-вторых, индивидуальные молекулы ДНК имеют *очень большое число слабых связей*, организованных таким образом, что их разрушение представляет собой кооперативный процесс. Хотя тепловое движение постоянно разрушает водородные связи на концах молекулы ДНК, цепи обычно не расходятся, так как водородные связи в середине спирали еще сохраняются (рис. 4-15). Разрушенная связь чаще всего тут же снова восстанавливается. Иногда, разумеется, вслед за первой связью разрывается вторая и т. д., но такие множественные разрывы исключительно редки, и если двойная спираль стабилизируется более чем десятью нуклеотид-

ными парами, то она оказывается очень устойчивой при комнатной температуре.

Те же принципы лежат и в основе устойчивости большинства белков. Стабильная форма белковой молекулы никогда не определяется лишь одной или двумя слабыми связями, а всегда — совместным действием большого числа слабых связей.

С повышением температуры (за пределы физиологической) кооперативно организованные водородные связи становятся все менее устойчивыми. При этом возрастает вероятность одновременного разрыва нескольких слабых связей. После разрыва значительного числа связей молекула обычно теряет свою исходную форму (процесс *денатурации*) и приобретает неактивную (*денатурированную*) конфигурацию.

ПОЧТИ ВСЕ КРУПНЫЕ БЕЛКОВЫЕ МОЛЕКУЛЫ И БОЛЬШИНСТВО МОЛЕКУЛ СРЕДНЕГО РАЗМЕРА ПРЕДСТАВЛЯЮТ СОБОЙ АГРЕГАТЫ, ПОСТРОЕННЫЕ ИЗ МЕНЬШИХ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ

Выше мы подчеркивали, какое огромное значение для выяснения структуры макромолекул имело то обстоятельство, что макромолекулы — это полимеры, построенные из небольших регулярных мономеров, например из аминокислот. В настоящее время установлено, что большинство очень крупных белковых молекул представляет собой агрегаты из нескольких полипептидных цепей, содержащих до 400 аминокислотных остатков. В организме млекопитающих имеется, например, белок ферритин, который служит резервом атомов железа. Его молекулярный вес равен 480 000, однако молекула его состоит не из одной длинной цепи, насчитывающей около 4000 аминокислот, а из двадцати цепей по 200 аминокислот в каждой. Белковому компоненту вируса табачной мозаики приписывали вначале чудовищный молекулярный вес: 36 000 000. Позднее, однако, оказалось (гл. 15), что белковая оболочка каждой вирусной частицы состоит из 2150 одинаковых белковых субъединиц, содержащих по 158 аминокислот каждая. Даже белки со значительно меньшим молекулярным весом часто оказываются построенными из нескольких полипептидных цепей. Молекула гемоглобина (мол. вес 64 500) состоит из четырех полипептидных цепей (две α-цепи и две β-цепи), каждая из которых имеет молекулярный вес около 16 000.

В молекулах трех упомянутых белков, так же как и во многих других, субъединицы удерживаются вместе вторичными связями. Этот факт был установлен с помощью агентов, о которых известно, что они разрывают только вторичные связи (таким агентом является, например, мочевина). Однако иногда субъединицы могут соединяться и при помощи ковалентных связей. В молекуле инсулина, например, между двумя полипептидными цепями образуются дисульфидные связи (—S—S—).

СУБЪЕДИНИЦЫ ЭКОНОМИЧНЫ

Построение полимеров из мономерных единиц и использование самих полимерных молекул в качестве субъединиц для построения еще более крупных молекул отражает некий общий принцип образования сложных структур, действующий в живой и неживой природе.

Преимущества этого принципа определяются тем, что вред от ошибок, допущенных в процессе созидания, оказывается значительно меньшим, если не все неправильные детали включаются в готовый продукт. Сравним, например, два различных пути построения сложной молекулы, содержа-

щей 1 000 000 атомов. По схеме *а* мы построим структуру сразу, присоединяя атом к атому; по схеме *б* мы вначале построим 1000 небольших субъединиц, состоящих каждая из 1000 атомов, а затем объединим эти субъединицы в конечный продукт, т. е. в агрегат, построенный из 1 000 000 атомов. Допустим, что в обоих случаях мы совершаем случайные ошибки и что вероятность попадания какого-нибудь атома в неправильное положение равна 10^{-5}. Примем также, что каждая ошибка ведет к образованию неактивного продукта.

По схеме *а* на каждую молекулу продукта придется в среднем по 10 ошибок, и, следовательно, мы вообще почти не получим активных молекул. В то же время по схеме *б* количество неправильно построенных субъединиц составит всего только 1%. Если при построении макромолекул эти субъединицы могут быть как-то исключены, то активный продукт легко образуется и клетка вообще практически никак не ощутит присутствия 1% неактивных субъединиц. Этот принцип лежит в основе работы сборочных поточных линий, используемых в машиностроительной и на автомобильных заводах. На каждой стадии сборки негодные полуфабрикаты отбрасываются. Раньше это делалось вручную, а теперь ту же роль на многих участках выполняют автоматы. В клетке контроль часто обеспечивается высокой специфичностью ферментов; если, например, при сборке полимера попадается неправильно построенный мономер, то он обычно не включается в макромолекулу, так как полимеризующий фермент «не узнает» такой мономер. В других случаях неправильно построенные субъединицы бывают лишены способности спонтанно включаться в устойчивый молекулярный агрегат, что также обеспечивает их «выбраковку».

ПРИНЦИП САМООРГАНИЗАЦИИ

Небольшая величина ΔG (1—5 ккал/моль), характерная для образования слабых связей, означает, что спонтанно образоваться могут не только одиночные слабые связи, но и сложные структуры, стабилизируемые такими связями. Под влиянием теплового движения раскрученная полипептидная цепь может принимать самые разнообразные случайные конформации. С термодинамической точки зрения большая часть этих конформаций нестабильна. Однако тепловое движение неизбежно приводит в соприкосновение группы, способные к образованию прочных вторичных связей. Эти группы стремятся и в дальнейшем оставаться вместе, так как при их объединении теряется *большое свободной энергии*, чем может быть получено при разрыве связей. Таким путем, в результате ряда случайных движений, полипептидная цепь постепенно приобретает конформацию, в которой все или почти все атомы имеют фиксированное положение.

Агрегация отдельных молекул также происходит спонтанно. Наглядным примером этого может служить такой белок, как гемоглобин (рис. 4-16). Под влиянием агентов, разрывающих слабые связи (например, мочевины), молекула этого белка может быть разделена на две половинки с молекулярным весом 32 000 каждая. Если затем удалить мочевину, то половинки быстро соединятся вновь с образованием исходной функционально активной молекулы. Поверхностная структура этих половинок в высшей степени специфична, так что они взаимодействуют только друг с другом и не взаимодействуют ни с какими другими молекулами в клетке.

Аналогичным образом на основе общего принципа самоорганизации образуются также крупные и более сложные клеточные структуры, например мембраны и клеточные стенки. И те и другие представляют собой мозаичные образования, построенные из большого числа различных молекул, как крупных (белки), так и гораздо более мелких (липиды). В настоя-

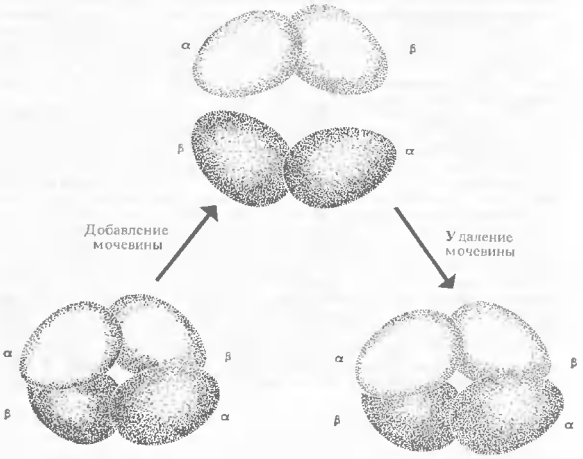


Рис. 4-16. Образование активной молекулы гемоглобина из двух половинок. Молекула гемоглобина содержит две α-цепи и две β-цепи. В растворе мочевины (реагент, дестабилизирующий слабые связи) нативная молекула распадается на две половинки, каждая из которых содержит одну α- и одну β-цепь. После удаления мочевины половинки вновь соединяются, образуя целую молекулу.

щее время практически ничего не известно о точной организации молекул в этих очень крупных и сложных структурах. Тем не менее все говорит о том, что молекулы, входящие в состав этих структур, образуют прочные связи только с другими молекулами в клеточной мембране (или клеточной стенке). Особенно отчетливо это видно на примере липидов, которые совершенно нерастворимы в воде, так как содержат длинные неполярные углеводородные цепи. Новообразованные липиды легко присоединяются вандерваальсовыми связями к другим липидам мембраны (или оболочки) и значительно труднее переходят в водную (полярную) среду клетки.

ВЫВОДЫ

При многих химических событиях в клетке не происходит образования или разрыва ковалентных связей. Локализация в клетке большинства молекул зависит от действия «слабых» (вторичных) сил притяжения или отталкивания. Кроме того, слабые силы определяют форму многих молекул, особенно макромолекул. Наиболее важную роль играют водородные, вандерваальсовы и ионные связи. Несмотря на то что эти связи относи-

тельно слабы, они все же достаточно прочны, чтобы обеспечить надлежащее взаимодействие между молекулами или между группами в пределах одной молекулы. Так, например, поверхность одной молекулы фермента имеет строго определенную структуру, обеспечивающую специфическое взаимодействие с субстратом.

Образование любых химических связей, как слабых, так и прочных (ковалентных), подчиняется законам термодинамики. Связь образуется легко, если ее образование сопровождается выделением свободной энергии ($\Delta G < 0$). Для разрыва связи необходима затрата такого же количества энергии. Так как при образовании ковалентной связи между атомами выделяется много свободной энергии, разрыв ковалентных связей почти никогда не происходит спонтанно. В противоположность этому свободная энергия образования слабых связей лишь в несколько раз превышает кинетическую энергию теплового движения при физиологических температурах. Поэтому одиночные слабые связи часто образуются и разрушаются в живых клетках.

Молекулы, содержащие полярные (заряженные) группы, взаимодействуют совершенно иначе, нежели молекулы с неполярными группами (в которых заряд распределен симметрично). Полярные молекулы способны к образованию достаточно прочных водородных связей, а неполярные молекулы могут образовать лишь ван-дер-ваальсовы связи. Важнейшую роль среди полярных молекул играют молекулы воды. Каждая молекула воды может образовать четыре прочные водородные связи с соседними молекулами воды. В отличие от полярных молекул, которые в различной степени растворимы в воде, неполярные нерастворимы в ней, так как они не могут образовать водородных связей с ее молекулами.

Любая данная молекула имеет свою характерную форму, и это определяет число типов молекул, с которыми она может образовать прочные вторичные связи. Сильное вторичное взаимодействие требует наличия комплементарных поверхностей у взаимодействующих молекул (взаимоотношения типа ключ и замок), а также участия большого числа атомов. Одна или две вторичные связи легко разрушаются, но одновременное возникновение большого числа таких связей приводит к образованию устойчивых агрегатов. Двойная спираль ДНК никогда не разрушается спонтанно, и этот факт свидетельствует об исключительной устойчивости подобных агрегатов. Построение таких агрегатов может происходить спонтанно путем постепенного, шаг за шагом, образования упорядоченных связей (принцип самоорганизации).

Форма полимерных молекул определяется вторичными связями. Все биополимеры содержат ординарные связи, вокруг которых возможно свободное вращение. Однако молекулы биополимеров не существуют в различных конфигурациях (как этого можно было бы ожидать), так как лишь одна из возможных конфигураций содержит минимум свободной энергии. В конечном счете образуется именно эта, энергетически выгодная конфигурация. Некоторые полимерные молекулы имеют правильно построенный спиральный остов, стабилизированный регулярными внутримолекулярными вторичными связями между отдельными группами остова. Однако образование регулярных спиральных структур оказывается невозможным, если в спиральной структуре боковые группы располагаются так, что они не могут образовать энергетически выгодных слабых связей. С такой ситуацией мы встречаемся во многих белках, где нерегулярное расположение неполярных боковых групп вынуждает остов принимать в высшей степени неправильную конфигурацию, позволяющую боковым группам образовать друг с другом ван-дер-ваальсовы связи. Но нерегулярное расположение боковых групп не во всех случаях препятствует образованию спиральных структур. Так, например, в молекуле ДНК благодаря специфическому спариванию пуринов с пиримидинами

в двойной спирали неполярные ароматические группы оказываются упакованными, наподобие стопки монет, во внутренней части макромолекулы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Lehninger A. L., Bioenergetics, 2nd ed., Benjamin, Menlo Park, California, 1971. В нескольких первых главах, написанных для студентов биологов младших курсов, кратко изложены законы термодинамики.

Blum H. F., Time's Arrow and Evolution, Harper, New York, 1962. Гл. 3 представляет собой весьма доступное введение в термодинамику в приложении к биологическим системам.

Klotz I. M., Energy Changes in Biochemical Reactions, Academic, New York, 1967. (И. Клотц, Энергетика биохимических реакций, изд-во «Мир», М., 1970.) Несколько более сложное обсуждение законов термодинамики в приложении к биологическим системам.

Pauling L., The Nature of the Chemical Bond, 3rd ed., Cornell University Press, Ithaca, New York, 1960. Одна из величайших классических книг во всей химической литературе; изложение структурной химии, в котором уделяется значительное внимание водородным связям.

Morowitz H. J., Entropy for Biologists, Academic, New York, 1970.

ГЛАВА

5

Сопряженные реакции и реакции переноса групп

В предыдущей главе мы рассмотрели образование слабых связей с точки зрения термодинамики. Каждый раз мы задавались вопросом: что должно при этом происходить — выделение или поглощение свободной энергии? Ибо только при отрицательном ΔG реакция оказывается термодинамически возможной и может протекать самопроизвольно. Это справедливо и в отношении ковалентных связей, несмотря на то что в образовании и распаде этих связей обычно участвуют ферменты.

На первый взгляд может показаться, что образование многих важных ковалентных связей (особенно в макромолекулах) происходит вопреки законам термодинамики, так как свободная энергия при этом возрастает. Кое-кто склонен был даже думать, что клетки обладают неким особым свойством, которое позволяет им функционировать с нарушением законов термодинамики, и что в этом-то и заключается настоящий «секрет жизни».

Теперь, однако, мы знаем, что в процессах биосинтеза никакого нарушения законов термодинамики не происходит. Просто механизм этих реакций отличается от того, который им первоначально приписывали. В действительности, например, нуклеиновые кислоты не образуются путем прямой конденсации нуклеозидфосфатов, гликоген не синтезируется непосредственно из остатков глюкозы, а белки не строятся путем простого соединения аминокислот. Сначала указанные мономеры превращаются (с использованием энергии АТФ) в богатые энергией активированные предшественники, и только затем эти последние спонтанно (с участием специфических ферментов) соединяются, образуя макромолекулы. Для иллюстрации сказанного мы подробно рассмотрим в этой главе термодинамический аспект биосинтеза двух типов связей: пептидной (в белках) и фосфодиэфирной (в нуклеиновых кислотах). Сначала, однако, мы кратко коснемся некоторых общих термодинамических свойств ковалентных связей.

МОЛЕКУЛЫ ПИЩЕВЫХ ВЕЩЕСТВ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИ НЕСТАБИЛЬНЫ

Так как энергия различных ковалентных связей неодинакова, количество свободной энергии, заключенное в разных веществах, сильно варьирует. Например, ковалентная связь между кислородом и водородом значительно прочнее, чем между водородом и водородом или кислородом и кислородом. Поэтому образование связи О—Н за счет О—О или Н—Н будет сопровождаться освобождением энергии. Энергетические соображения говорят о том, что в достаточно концентрированной смеси кислорода и водорода будет образовываться вода.

Таким образом, молекула, содержащая слабые ковалентные связи, обладает большим количеством свободной энергии, нежели молекула, содержащая прочные связи. На первый взгляд это заключение кажется почти парадоксальным, так как из него вытекает, что чем прочнее связь,

тем меньше энергии может быть получено при ее разрушении. Однако этот парадокс легко разрешается, если мы вспомним, что уже в процессе образования очень прочной связи выделяется большое количество свободной энергии. Следовательно, наилучшими пищевыми веществами (наилучшим источником энергии) являются те вещества, у которых молекулы термодинамически неустойчивы в силу того, что они содержат слабые ковалентные связи. Глюкоза, например,— превосходное пищевое вещество, так как при ее окислении кислородом до CO_2 и H_2O выделяется много свободной энергии. И наоборот, CO_2 не может служить пищевым веществом (для животных), потому что в отсутствие донора энергии (АТФ) она не может спонтанно (даже с помощью специфических ферментов) превратиться в более сложные органические соединения. Растения используют CO_2 в качестве первичного источника углерода только благодаря тому, что энергия, улавливаемая при фотосинтезе, служит для образования АТФ.

НАПРАВЛЕНИЕ РЕАКЦИИ И СКОРОСТЬ РЕАКЦИИ

Химические реакции, в которых одни вещества превращаются в другие, обладающие меньшим запасом свободной энергии, при физиологических температурах в отсутствие катализатора со сколько-нибудь заметной скоростью не идут. Это объясняется тем, что даже «слабая» ковалентная связь в действительности очень прочна и лишь весьма редко разрывается под влиянием теплового движения в клетке. Для разрыва ковалентной связи в отсутствие катализатора необходима энергия, чтобы оттолкнуть друг от друга связанные атомы. Отделившись, эти атомы могут затем объединиться с новыми партнерами и образовать более прочные связи. Энергия, выделяемая в этом процессе рекомбинации, равна энергии, затраченной на разрыв старой связи, плюс разность между энергией старой и новой связи (рис. 5-1).

Энергия, необходимая для разрыва старой ковалентной связи при каком-либо молекулярном превращении, называется *энергией активации*. Энергия активации обычно меньше, чем энергия исходной связи, так как при активации, вообще говоря, свободные атомы не образуются, а происходит лишь определенная молекулярная перестройка. Между двумя реагирующими молекулами должно произойти столкновение, в результате которого образуется короткоживущий молекулярный комплекс (*активированное состояние*). В активированном состоянии связи благодаря тесной близости двух молекул лабилизуются, так что для разрыва связи требуется теперь меньше энергии, нежели для разрыва той же связи в свободной молекуле.

Следовательно, большинство реакций, происходящих в клетке, описывается выражением

$$(A—B)+(C—D)\rightarrow(A—D)+(B—C)-\Delta G. \qquad (5\text{-}1)$$

Согласно закону действия масс, для данной реакции получаем

$$K_{eq}=\frac{[A—D][C—B]}{[A—B][C—D]}, \qquad (5\text{-}2)$$

где [A — B], [C — D] и т. д.— концентрации реагентов в моль/л; K_{eq} — константа равновесия, связанная с ΔG уравнением (4-4).

Как правило, энергии активации лежат в пределах от 20 до 30 ккал/моль, и поэтому активированное состояние никогда не возникает при физиологических температурах. Высокие энергии активации следует рассматривать как барьер, препятствующий спонтанной перестройке ковалентных связей в клетке.

Рис. 5.4. Энергия активации химической реакции $(A - B) + (C - D) \rightarrow (A - D) + (C - B)$.

Этот барьер исключительно важен. Если бы его не было, жизнь была бы невозможна, так как свободная энергия всех атомов была бы минимальной и нельзя было бы хоть на время сохранить энергию для будущей работы. Но жизнь была бы невозможна и в том случае, если бы у клетки не было средства избирательно снижать энергии активации определенных реакций. Это снижение необходимо еще и для того, чтобы рост клеток мог происходить с достаточной скоростью, т. е. чтобы он чрезмерно не нарушался какими-либо случайными деструктивными воздействиями, например ионизирующим или ультрафиолетовым излучением.

ФЕРМЕНТЫ СНИЖАЮТ ЭНЕРГИЮ АКТИВАЦИИ

Ферменты совершенно необходимы для жизни, так как они снижают энергии активации различных реакций. Функция ферментов заключается в ускорении жизненно важных химических реакций путем снижения их энергии активации до величины, при которой реакция может протекать под воздействием теплового движения. В присутствии специфичного фермента уже не существует эффективного барьера, препятствующего быстрому образованию продуктов реакции с наименьшим содержанием свободной энергии. Ферменты никогда не влияют на состояние равновесия реакции: они только ускоряют достижение равновесия. Если термодинамическое равновесие неблагоприятно для образования данного вещества, то и в присутствии фермента это вещество накапливаться не будет.

Ферменты необходимы практически для всех молекулярных перестроек, происходящих в клетке, и это означает, что, зная только величину свободной энергии тех или иных веществ, мы еще не в состоянии ответить на вопрос о том, будет ли в действительности происходить энергетически возможная реакция. Всегда необходимо учитывать и скорость реакции. Лишь в тех случаях, когда клетка обладает подходящим ферментом, соответствующая реакция будет иметь реальное значение.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ЦЕПЬ РЕАКЦИЙ ХАРАКТЕРИЗУЕТСЯ СНИЖЕНИЕМ СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ

С точки зрения термодинамики все реакции обмена (метаболические пути) должны характеризоваться снижением свободной энергии. Это очевидно в отношении процессов распада, в которых термодинамически нестойкие пищевые вещества превращаются в более устойчивые соединения (напри-

мер, CO_2 и H_2O) с выделением тепла. Все процессы распада служат двум главным целям. Эти цели: 1) образование низкомолекулярных органических соединений, используемых в качестве промежуточных продуктов в процессах биосинтеза, и 2) улавливание значительной части свободной энергии, освобождающейся при расщеплении пищевых веществ, в форме, способной производить работу; эта цель достигается путем сопряжения некоторых реакций распада с реакциями образования определенных веществ, содержащих высокоэнергетические связи, например АТФ.

Однако не вся свободная энергия, заключенная в пищевых веществах, превращается в свободную энергию соединений, содержащих богатые энергией связи. Если бы это было не так, то процессы распада шли бы без снижения свободной энергии и, следовательно, отсутствовала бы движущая сила, вызывающая распад пищевых веществ. На самом деле оказывается, что все процессы распада сопровождаются превращением почти половины свободной энергии, заключенной в пищевых веществах, в тепло или энтропию. Так, например, в настоящее время полагают, что приблизительно 40% свободной энергии, выделяющейся при распаде глюкозы в клетке, используется для образования высокоэнергетических соединений, а остальная энергия рассеивается в виде тепла и расходуется на увеличение энтропии системы.

ГИДРОЛИЗ ВЫСОКОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ ПРОТЕКАЕТ С ВЫДЕЛЕНИЕМ БОЛЬШОГО КОЛИЧЕСТВА СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ

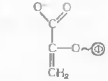
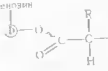
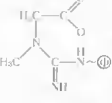
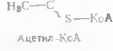
Высокоэнергетические соединения содержат связи, гидролиз которых сопровождается значительным снижением свободной энергии (5 ккал/моль и более). Сами связи тоже называют высокоэнергетическими связями. В сущности, этот термин не точен, так как велика не энергия связи, а свободная энергия ее гидролиза; однако он широко употребляется, и для удобства мы также будем им пользоваться и будем помечать такую связь символом ~.

Средняя энергия гидролиза высокоэнергетической связи (7 ккал/моль) несоизмеримо меньше, чем общее количество энергии, выделяющееся при полном распаде молекулы глюкозы в одну стадию (688 ккал/моль). Поэтому полный распад молекулы глюкозы в одну стадию был бы неэффективен в смысле образования высокоэнергетических связей. Это, несомненно, главная причина того, что биологический распад глюкозы протекает ступенчато, через много стадий. Количество энергии, высвобождаемой на каждой стадии, имеет тот же порядок величины, что и свободная энергия гидролиза одной высокоэнергетической связи.

Наиболее важным высокоэнергетическим соединением является АТФ. АТФ образуется за счет энергии, выделяющейся в процессах распада, или энергии солнца (фотосинтез) из неорганического фосфата (Ф) и АТФ (гл. 2 и 3). Существует также и много других важных соединений этого класса. Некоторые из них образуются непосредственно в процессах распада, другие синтезируются с использованием свободной энергии АТФ. В табл. 5-1 приведены важнейшие типы высокоэнергетических связей. В образовании каждой такой связи участвует либо атом фосфора, либо атом серы. Высокоэнергетические пирофосфатные связи АТФ образуются путем соединения фосфатных групп. Однако пирофосфатная связь — не единственный вид высокоэнергетической фосфатной связи: присоединение фосфатных групп к атому кислорода карбоксильной группы создает высокоэнергетическую ацильную связь.

В настоящее время известно, что высокоэнергетические связи, в образовании которых участвуют атомы серы, играют почти такую же важную

Таблица 5-1 Важнейшие типы высокоэнергетических связей

Класс соединений	Пример	ΔG реакции, ккал/моль
Пирофосфат	Ⓟ ~ Ⓟ Пирофосфат	Ⓟ ~ Ⓟ ⇌ Ⓟ + Ⓟ $\Delta G = -6$
Нуклеозиддифосфаты	Аденозин—Ⓟ ~ Ⓟ (АДФ)	АДФ ⇌ АМФ + Ⓟ $\Delta G = -6$
Нуклеозидтрифосфаты	Аденозин—Ⓟ ~ Ⓟ ~ Ⓟ (АТФ)	АТФ ⇌ АДФ + Ⓟ $\Delta G = -7$ АТФ ⇌ АМФ + Ⓟ ~ Ⓟ $\Delta G = -8$
Енолфосфаты	 Фосфоенолпируват (ФЕП)	ФЕП ⇌ Пируват + Ⓟ $\Delta G = -12$
Аминоацил-аденилаты		АМФ ~ АА ⇌ АМФ + АА $\Delta G = -7$
Гуанидинфосфаты	 Креатинфосфат	Креатин ~ Ⓟ ⇌ Креатин + Ⓟ $\Delta G = -8$
Тиоэфиры	 Ацетил-КоА	Ацетил-КоА ⇌ КоА—SH + Ацетат $\Delta G = -8$

роль в обмене энергии, как и связи с участием атомов фосфора. Наиболее важным соединением со связью этого типа является ацетил-КоА, который служит главным источником энергии при биосинтезе жирных кислот.

Широкий диапазон величин ΔG у различных богатых энергией связей (табл. 5-1) означает, что термин *высокоэнергетическая связь* применяется в известной степени произвольно. Обычно критерием служит возможность сопряжения гидролиза этой связи с другой реакцией, ведущей к биосинтезу какого-либо важного вещества. Так, например, свободная энергия гидролиза глюкозо-6-фосфата составляет 3—4 ккал/моль. Этой энергии явно недостаточно для синтеза, скажем, пептидной связи, и поэтому данное соединение не включают в список высокоэнергетических соединений.

ВЫСОКОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ НЕОБХОДИМЫ ДЛЯ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Часто для образования крупной молекулы из «строительных блоков» требуется затрата свободной энергии. Однако реакции биосинтеза, подобно реакциям распада, не могли бы происходить, если бы они не сопровождались общим уменьшением свободной энергии системы. Отсюда следует,

что для многих биосинтетических процессов необходим внешний источник свободной энергии. Таким источником служат высокоэнергетические соединения. Образование многих ковалентных связей в реакциях биосинтеза сопряжено с одновременным распадом высокоэнергетических связей и притом так, что общее изменение свободной энергии системы всегда отрицательно. Поэтому время жизни высокоэнергетических связей в клетке обычно очень невелико. Почти тотчас же после образования они разрываются ферментативным путем, доставляя энергию, необходимую для завершения другой реакции.

Не все стадии того или иного биосинтетического процесса требуют затраты свободной энергии; нередко лишь одна или две реакции протекают с одновременным распадом высокоэнергетических связей. Иногда это объясняется тем, что даже в отсутствие внешнего источника энергии ΔG благоприятствует протеканию реакции в нужном направлении. В других случаях ΔG приближается к нулю, а иногда может быть несколько больше нуля. Однако такие небольшие положительные величины ΔG не влияют на ход процесса, если следующая реакция в цепи сопровождается гидролизом высокоэнергетической связи. Результирующее значение имеет сумма всех изменений свободной энергии в цепи сопряженных реакций. Сравнительно небольшое (80 : 20) смещение K_{eq} какой-нибудь реакции в сторону распада не будет играть существенной роли, если следующая реакция данного биосинтетического пути резко (100 : 1) смещена в сторону синтеза.

Аналогичным образом не все реакции распада приводят к образованию высокоэнергетических связей. Так, например, лишь на двух этапах гликолиза генерируется АТФ. Более того, существуют даже цепи реакций распада, в которых один или два этапа протекают с одновременным разрывом высокоэнергетических связей. Примером опять-таки может служить гликолиз. На каждые четыре молекулы АТФ, образуемые в процессе гликолиза, расходуются две молекулы АТФ. В данном случае, разумеется, как и во всех других энергодающих процессах, общее число новообразованных высокоэнергетических связей должно превышать число разрушенных.

ПЕПТИДНЫЕ СВЯЗИ ГИДРОЛИЗУЮТСЯ СПОНТАННО

В зависимости от природы аминокислот при образовании дипептида расходуется от 1 до 4 ккал/моль свободной энергии. Эта величина ΔG с ростом полипептидной цепи все больше и больше снижается; для бесконечно длинной цепи ΔG составляет около 0,5 ккал/моль. Снижение отражает тот факт, что свободные заряженные NH_3^+- и COO^--группы на концах цепи благоприятствуют гидролизу соседних пептидных связей (т. е. разрыву с присоединением молекулы воды).

Положительные значения ΔG уже говорят о том, полипептидная цепь не может быть синтезирована из свободных аминокислот. Кроме того, мы должны учитывать и тот факт, что концентрация воды в клетке значительно превышает (обычно более чем в 100 раз) концентрацию других молекул. Равновесие всех реакций, в которых участвует вода, резко смещено поэтому в сторону присоединения воды. Это отчетливо видно при рассмотрении констант равновесия. Например, для реакции образования дипептида

$$\text{Аминокислота (a)} + \text{Аминокислота (b)} \rightarrow \text{Дипептид (a—b)} + H_2O. \quad (5\text{-}3)$$

Константа равновесия K_{eq} равна

$$K_{eq} = \frac{[\text{a—b}]}{[\text{a}]\,[\text{b}]\,[H_2O]}; \quad (5\text{-}4)$$

где концентрации даны в молях на литр.

Поэтому для данной величины K_{eq} (зависимость которой от ΔG дается выражением $\Delta G = -RT \ln K$) значительно большая концентрация воды означает соответственно меньшую концентрацию дипептида. Таким образом, относительные концентрации реагентов очень важны. Простой расчет показывает, что гидролиз может часто протекать спонтанно даже тогда, когда ΔG негидролитической реакции составляет —3 ккал/моль.

Теоретически, следовательно, белки неустойчивы и за достаточно длительное время должны спонтанно распадаться до свободных аминокислот. Вместе с тем нам известно, что без участия специфичных ферментов скорость этого спонтанного распада чрезвычайно мала, так что он не имеет существенного значения в обмене веществ. Однажды образовавшись, белок сохраняет устойчивость до тех пор, пока он не будет разрушен под действием специфичных ферментов.

СОПРЯЖЕНИЕ РЕАКЦИЙ, ДЛЯ КОТОРЫХ $\Delta G < 0$, С РЕАКЦИЯМИ, ДЛЯ КОТОРЫХ $\Delta G > 0$

Для соединения аминокислот в полипептидную цепь белка необходима затрата свободной энергии. Раскрытие важнейшей роли АТФ (в качестве донора энергии) помогло выяснить, как это происходит. АТФ содержит три фосфатные группы, присоединенные к молекуле аденозина (аденозин—О—Ⓟ~Ⓟ~Ⓟ). Когда при гидролизе отщепляются одна или две концевые группы ~Ⓟ, свободная энергия системы значительно снижается.

$$\underset{(\text{АТФ})}{\text{Аденозин—О—Ⓟ}\sim\text{Ⓟ}\sim\text{Ⓟ}} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \underset{(\text{АДФ})}{\rightarrow \text{Аденозин—О—Ⓟ}\sim\text{Ⓟ}} + \text{Ⓟ} \quad (\Delta G = -7 \text{ ккал/моль}). \tag{5-5}$$

$$\underset{(\text{АТФ})}{\text{Аденозин—О—Ⓟ}\sim\text{Ⓟ}\sim\text{Ⓟ}} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \underset{(\text{АМФ})}{\rightarrow \text{Аденозин—О—Ⓟ}} + \text{Ⓟ}\sim\text{Ⓟ} \quad (\Delta G = -8 \text{ ккал/моль}). \tag{5-6}$$

$$\underset{(\text{АДФ})}{\text{Аденозин—О—Ⓟ}\sim\text{Ⓟ}} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \underset{(\text{АМФ})}{\rightarrow \text{Аденозин—О—Ⓟ}} + \text{Ⓟ} \quad (\Delta G = -6 \text{ ккал/моль}). \tag{5-7}$$

Свободная энергия, выделяющаяся при всех этих реакциях распада ($\Delta G < 0$), по абсолютной величине намного превышает свободную энергию, затрачиваемую на образование полимерных молекул из мономерных строительных блоков ($\Delta G > 0$). Важнейшая особенность биосинтетических реакций, для которых $\Delta G > 0$, состоит в том, что они сопряжены с реакциями распада, для которых $\Delta G < 0$, но значительно больше по абсолютной величине. При биосинтезе белка образование каждой пептидной связи ($\Delta G = +0{,}5$ ккал/моль) сопряжено с реакцией распада АТФ до АМФ и пирофосфата ($\Delta G = -8$ ккал/моль). В этих условиях (избыток выделяющейся свободной энергии равен —7,5 ккал/моль) равновесие реакции всегда сдвинуто в сторону синтеза белка.

АКТИВАЦИЯ ПУТЕМ ПЕРЕНОСА ГРУППЫ

Когда АТФ гидролизуется до АДФ и Ⓟ, большая часть свободной энергии выделяется в виде тепла. Так как тепловая энергия не может быть использована для образования ковалентных связей, то при сопряжении двух реакций — одной с положительным, а другой с отрицательным ΔG — эти реакции не могут протекать раздельно. Сопряженная реакция включает и себя две или более последовательные реакции, которые всегда являются *реакциями переноса групп*. Так называются реакции, в которых

реагирующие молекулы не окисляются и не восстанавливаются, а обмениваются функциональными группами. Ферменты, катализирующие реакции переноса групп, были названы *трансферазами*.

В реакции

$$A-X+B-Y \rightarrow A-B+X-Y \qquad (5\text{-}8)$$

компоненты A и B обмениваются группами X и Y. При реакциях переноса, даже происходящих в водной среде, вода не принимает участия в реакции. Реакцию, в которой участвует вода:

$$A-B+H-OH \rightarrow A-OH+BH, \qquad (5\text{-}9)$$

называют *гидролизом*, а ферменты, катализирующие реакцию гидролиза,— *гидролазами*.

Нас интересуют здесь такие реакции переноса, в которых переносятся группы, участвующие в образовании высокоэнергетических связей. Когда такая группа переносится на подходящий акцептор, то характер связи сохраняется и в новой молекуле. Таким образом, при переносе группы происходит также и перенос высокоэнергетической связи от одной молекулы к другой. Например, в уравнениях (5-10) и (5-11) показано, как энергия связей АТФ переносится при образовании ГТФ (одного из предшественников в биосинтезе РНК):

$$\underset{(\text{АТФ})}{\text{Аденозин}-\textcircled{P}\sim\textcircled{P}\sim\textcircled{P}} + \underset{(\text{ГМФ})}{\text{Гуанозин}-\textcircled{P}} \rightarrow \underset{(\text{АДФ})}{\text{Аденозин}-\textcircled{P}\sim\textcircled{P}} + \underset{(\text{ГДФ})}{\text{Гуанозин}-\textcircled{P}\sim\textcircled{P}} \qquad (5\text{-}10)$$

$$\underset{(\text{АТФ})}{\text{Аденозин}-\textcircled{P}\sim\textcircled{P}\sim\textcircled{P}} + \underset{(\text{ГДФ})}{\text{Гуанозин}-\textcircled{P}\sim\textcircled{P}} \rightarrow \underset{(\text{АДФ})}{\text{Аденозин}-\textcircled{P}\sim\textcircled{P}} + \underset{(\text{ГТФ})}{\text{Гуанозин}-\textcircled{P}\sim\textcircled{P}\sim\textcircled{P}} \qquad (5\text{-}11)$$

Молекула ГТФ, содержащая высокоэнергетическую группу $\textcircled{P}\sim\textcircled{P}$, способна спонтанно соединяться с другой молекулой; таким образом, ГТФ представляет собой пример так называемой *активированной молекулы*; соответственно процесс переноса высокоэнергетических групп называется *активацией группы*.

МНОГООБРАЗИЕ РЕАКЦИЙ ПЕРЕНОСА ГРУПП С УЧАСТИЕМ АТФ

В гл. 2 мы подчеркнули ключевую роль процесса синтеза АТФ в улавливании энергии пищевых веществ. При окислительном и фотосинтетическом фосфорилировании энергия используется для синтеза АТФ из АДФ и фосфата:

$$\text{Аденозин}-\textcircled{P}\sim\textcircled{P}+\textcircled{P}+\text{Энергия} \rightarrow \text{Аденозин}-\textcircled{P}\sim\textcircled{P}\sim\textcircled{P}. \qquad (5\text{-}12)$$

Так как АТФ является благодаря этому своеобразным биологическим аккумулятором высокоэнергетических групп, он должен использоваться для инициирования различных реакций, в которых эти группы переносятся на низкоэнергетические молекулы, придавая им потенциальную способность реагировать спонтанно.

Центральная роль АТФ основывается на том факте, что его молекула содержит две высокоэнергетические связи, при распаде которых освобождаются определенные группы. На рис. 5-2 показаны три такие группы, источником которых служит АТФ: 1) $\textcircled{P}\sim\textcircled{P}$ — пирофосфатная группа, 2) $\sim$АМФ — аденозинмонофосфат и 3) $\sim\textcircled{P}$ — фосфатная группа. Важно отметить, что эти высокоэнергетические группы сохраняют большое количество энергии лишь тогда, когда они переносятся на подходящие акцепторные молекулы. Так, например, хотя перенос группы $\sim\textcircled{P}$ на группу

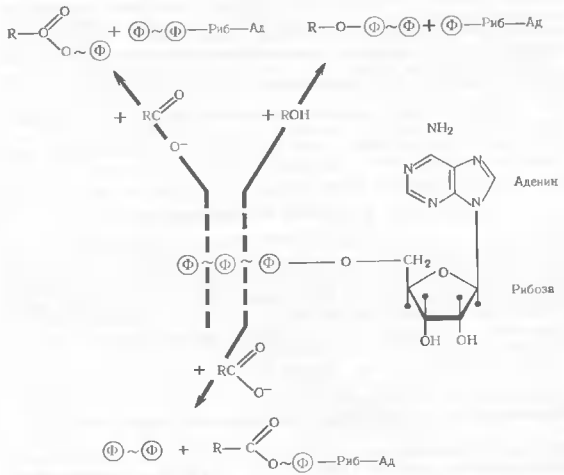
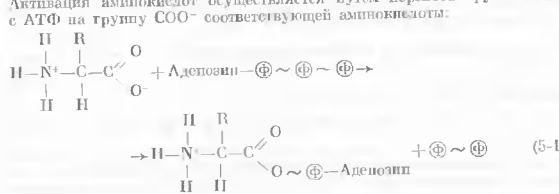


Рис. 5-2. Реакции переноса групп, образующимся из АТФ и имеющих важное значение.

COO^- приводит к образованию высокоэнергетической ацилфосфатной ($COO \sim Ⓟ$) группы, образование глюкозо-6-Ⓟ (т. е. перенос той же группы $\sim Ⓟ$ на гидроксил молекулы сахара) представляет собой такую реакцию, в которой высокоэнергетические связи уже не возникают (уменьшение свободной энергии при реакции гидролиза глюкозо-6-Ⓟ меньше 5 ккал/моль).

АКТИВАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ ПУТЕМ ПРИСОЕДИНЕНИЯ АТФ

Активация аминокислот осуществляется путем переноса группы АМФ с АТФ на группу COO^- соответствующей аминокислоты:



(R в данном случае обозначает боковую группу аминокислоты). Специфические ферменты, катализирующие реакции этого типа, называются *аминоацилсинтетазами*. С точки зрения термодинамики активированная аминокислота способна принять участие в синтезе белка. Однако аминоациладенилаты не являются прямыми предшественниками белков. По причине, которую мы объясним и гл. 11, для синтеза необходим еще один перенос активированной аминокислоты на конец молекулы тРНК:

$$\text{АА} \sim \text{АМФ} + \text{тРНК} \rightarrow \text{АА} \sim \text{тРНК} + \text{АМФ}. \qquad (5\text{-}14)$$

В дальнейшем пептидная связь образуется путем конденсации молекулы АА ~ тРНК с концом растущей полипептидной цепи:

АА ~ тРНК + Растущая полипептидная цепь (n аминокислотных остатков) → тРНК + Растущая полипептидная цепь ($(n + 1)$ аминокислотный остаток). (5-15)

Таким образом, последняя стадии этой «сопряженной реакции», так же как и других сопряженных реакций, обязательно завершается удалением активирующей группы и превращением высокоэнергетической связи в связь, при гидролизе которой выделяется меньше свободной энергии. Сопряженная реакция является источником свободной энергии, которая сдвигает равновесие в сторону синтеза белка.

ПРЕДШЕСТВЕННИКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ АКТИВИРУЮТСЯ ПУТЕМ ПРИСОЕДИНЕНИЯ ПИРОФОСФАТНЫХ ГРУПП

Оба типа нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) построены из мононуклеотидов (нуклеозидфосфатов). Однако с точки зрения термодинамики мононуклеотиды еще в меньшей степени, чем аминокислоты, способны соединяться друг с другом. ΔG гидролиза фосфодиэфирной связи равно —6 ккал/моль. Это означает, что нуклеиновые кислоты могут спонтанно (с малой скоростью) гидролизоваться до мононуклеотидов. Поэтому для синтеза нуклеиновых кислот в еще большей степени, чем для синтеза белков, важно использование активированных предшественников.

Непосредственными предшественниками ДНК и РНК являются нуклеозид-5′-трифосфаты. Предшественниками ДНК служат дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ (д обозначает «дезокси»-), а предшественниками РНК — АТФ, ГТФ, ЦТФ и УТФ. Таким образом, АТФ не только главный источник высокоэнергетических групп в реакциях переноса, но, кроме того, еще и прямой предшественник РНК. Три остальных предшественника РНК образуются в реакциях переноса групп, подобных приведенным в уравнениях (5-10) и (5-11). Дезоксинуклеозидтрифосфаты образуются в основном таким же путем — после синтеза дезоксимононуклеотидов эти последние превращаются в соответствующие трифосфаты в результате переноса фосфатных групп с АТФ:

$$\text{Дезоксинуклеозид—Ⓟ} + \text{АТФ} \rightarrow \text{Дезоксинуклеозид—Ⓟ} \sim \text{Ⓟ} + \text{АДФ} \qquad (5\text{-}16)$$

$$\text{Дезоксинуклеозид—Ⓟ} \sim \text{Ⓟ} + \text{АТФ} \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{Дезоксинуклеозид—Ⓟ} \sim \text{Ⓟ} \sim \text{Ⓟ} + \text{АДФ} \qquad (5\text{-}17)$$

Трифосфаты могут затем соединяться и образовывать полинуклеотиды, в которых мономеры удерживаются вместе фосфодиэфирными связями. В этой реакции одна из пирофосфатных связей разрывается и выде-

ляет пирофосфат:

Дезоксинуклеозид—Ⓟ ~ Ⓟ ~ Ⓟ +

+ Растущая полинуклеотидная цепь (n нуклеотидов) → Ⓟ ~ Ⓟ +

+ Растущая полинуклеотидная цепь ($(n+1)$ нуклеотид). (5-18)

В отличие от реакции образования пептидной связи, для которой $\Delta G < 0$, ΔG в этой реакции несколько больше нуля (~0,5 ккал/моль). Поскольку нуклеотиды фактически образуются именно таким путем, естественно возникает вопрос: где источник необходимой для этого энергии?

ЗНАЧЕНИЕ ВЫДЕЛЕНИЯ ПИРОФОСФАТА ПРИ СИНТЕЗЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Свободная энергия, необходимая для синтеза нуклеиновых кислот, черпается за счет расщепления высокоэнергетической связи в молекуле пирофосфата, возникшей одновременно с образованием высокоэнергетической фосфодиэфирной связи. Все клетки содержат активный фермент пирофосфатазу, который немедленно расщепляет образующийся пирофосфат:

$$Ⓟ \sim Ⓟ \rightarrow 2Ⓟ \quad (\Delta G = -7 \text{ ккал/моль}). \qquad (5\text{-}19)$$

Большое снижение свободной энергии означает, что реакция практически необратима, иными словами, пирофосфат при этом только разрушается и никогда не синтезируется вновь.

Общая константа равновесия двух реакций, а именно реакции присоединения нуклеозидмонофосфата к растущей полинуклеотидной цепи (уравнение 5-18) и сопряженной с ней реакции расщепления пирофосфата (уравнение 5-19), зависит от суммы ΔG обеих реакций: (0,5 ккал/моль) + + (−7 ккал/моль). Полученная величина ΔG (−6,5 ккал/моль) говорит о том, что нуклеиновые кислоты почти никогда не распадаются с образованием соответствующих нуклеозидтрифосфатов.

Здесь перед нами наглядный пример того, что часто лишь общее изменение свободной энергии *во всей цепи реакций* определяет возможность протекания какой-либо из реакций в этой цепи. Реакция, для которых ΔG мало и положительно и которые поэтому не могли бы идти самопроизвольно, часто являются важным звеном в цепи реакций, где за ними следует реакция с отрицательным ΔG. Мы всегда должны помнить, что ни одна реакция (и даже ни одна цепь реакций) не протекает изолированно и что на равновесие постоянно влияет либо добавление, либо, наоборот, удаление различных метаболитов.

РАСЩЕПЛЕНИЕМ ПИРОФОСФАТА СОПРОВОЖДАЕТСЯ БОЛЬШИНСТВО БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Синтез нуклеиновых кислот — не единственная реакция, направление которой определяется выделением и расщеплением пирофосфата (Ⓟ ~ Ⓟ). В действительности почти во всех биосинтетических процессах имеется одна или несколько стадий, связанных с выделением пирофосфата. Возьмем в качестве примера активацию аминокислот путем присоединения АМФ. ΔG этой реакции несколько больше нуля, но выделение пирофосфата и его последующий гидролиз ($\Delta G < 0$) создают условия для протекания реакции в нужном направлении.

Значение реакции гидролиза пирофосфата и ее универсальный характер четко выступают, если рассмотреть гипотетический случай и допу-

стить, что клетке пришлось бы синтезировать нуклеиновые кислоты не из нуклеозидтрифосфатов, а из нуклеозиддифосфатов. В этом случае образование фосфодиэфирных связей остова происходило бы с выделением фосфата, а не пирофосфата. Однако фосфодиэфирные связи в присутствии значительных количеств фосфата нестойки, так как при их образовании выделяется очень мало свободной энергии. Поэтому данная биосинтетическая реакция была бы легко обратимой: накопление фосфата по закону действия масс сдвинуло бы реакцию в сторону распада нуклеиновой кислоты. Более того, поскольку клетке для роста необходима довольно высокая концентрация фосфата, единственный выход из положения — удаление образующегося фосфата — был бы, очевидно, для нее закрыт. Таким образом, не случайно предшественниками нуклеиновых кислот служат именно нуклеозидтрифосфаты.

В силу тех же причин во всех клетках роль донора высокоэнергетических групп играет АТФ, а не АДФ. Первоначально биохимикам могло показаться странным, что клетка отдает такое предпочтение АТФ. Однако теперь мы знаем, что с АДФ реакция во многих случаях была бы легко обратимой.

ВЫВОДЫ

На первый взгляд может показаться, что многие биосинтетические реакции в клетке протекают с нарушением закона термодинамики, согласно которому самопроизвольное течение реакции возможно лишь при условии снижения свободной энергии системы (при отрицательном ΔG). В частности, например, так на первый взгляд обстоит дело с реакцией образования белков из аминокислот, для которой ΔG положительно. Однако это кажущееся несоответствие легко разъясняется всякий раз, как нам удается установить истинную природу реакции. Белки, например, синтезируются не из свободных аминокислот: свободные аминокислоты сначала ферментативным путем превращаются в активированные производные, и только эти последние затем в присутствии специфических ферментов спонтанно соединяются и образуют нужный продукт.

Многие биосинтетические реакции являются *сопряженными реакциями*. В такой системе одна из реакций поставляет свободную энергию, необходимую для спонтанного течения другой. Универсальным источником энергии в клетке служит АТФ, образующийся из АДФ и неорганического фосфата либо в процессах распада (брожение или дыхание), либо при фотосинтезе. АТФ содержит несколько высокоэнергетических связей; гидролиз этих связей протекает с большим отрицательным ΔG. Группы, соединенные такими связями, называют высокоэнергетическими группами. В реакциях переноса высокоэнергетические группы могут быть переданы другим молекулам, а эти последние служат затем непосредственными предшественниками в биосинтетических реакциях.

Аминокислоты активируются путем присоединения адénозинмонофосфатных групп, поставщиком которых служит АТФ. При этом образуются аминоацил-адénилаты (АА ~ АМФ). Энергия связи в молекуле аминоацил-адénилата имеет ту же величину, что и в молекуле АТФ. Тем не менее реакция синтеза аминоацил-адénилата протекает до конца, потому что образующийся в этой реакции пирофосфат гидролизуется пирофосфатазой и, следовательно, обратная реакция

$$Ⓟ \sim Ⓟ + АА \sim АМФ \rightarrow АТФ + АК$$

не может иметь места.

Почти во всех биосинтетических реакциях выделяется пирофосфат. Этот пирофосфат по мере образования ферментативно разрушается (пре-

вращается в фосфат), вследствие чего обращение биосинтетической реакции оказывается невозможным. Широкое использование этого процесса объясняет, почему АТФ, а не АДФ является универсальным донором энергии. АДФ не мог бы поставлять высокоэнергетические группы и одновременно в качестве «побочного» продукта образовывать пирофосфат.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Mahler H. R., Cordes E. H., Biological Chemistry, 2nd ed., Harper and Row, New York, 1971. Очень подробный учебник для студентов старших курсов и аспирантов, включающий все разделы биохимии.

Lehninger A. L., Biochemistry, 2nd ed., 1975, Worth Publishing Company, New York, 1970. Превосходный учебник по общей биохимии, содержащий множество наглядных иллюстраций.

Streyer H., Biochemistry, Freeman, San Francisco, 1975. Совсем недавно изданный отличный учебник, в котором излагаются основополагающие принципы биохимии; содержит многоцветные иллюстрации.

White A., Handler P., Smith E. L., Principles of Biochemistry, 5th ed., McGraw-Hill, New York, 1971. Обзор биохимии клетки, особенно удачно описан промежуточный метаболизм.

Wood W. B., Wilson J. H., Benbow R. M., Hood L., Biochemistry: A Problems Approach, Benjamin, Menlo Park, California, 1974. Очень полезный и очень современный учебник, в котором обращается особое внимание на нерешенные проблемы.

Krebs H. A., Kornberg H. L., A Survey of the Energy Transformation in Living Material, Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exptl. Pharmakol., 49, 212 (1957). Этот содержательный обзор — один из тех немногих обзоров в биохимии, которые можно назвать классическими. Хотя многие излагаемые в нем представления изменились в ходе дальнейших исследований, его все еще очень полезно прочитать.

Kornberg A., «On the Metabolic Significance of Phosphorolytic and Pyrophosphorolytic Reactions». In: M. Kasha and B. Pullman (eds.), Horizons in Biochemistry, pp. 251–264, Academic Press, New York, 1962. (См. «Горизонты биохимии», стр. 191, изд-во «Мир», М., 1964.) В этой короткой статье приводится подробная аргументация, свидетельствующая о большом значении освобождения пирофосфата.

ГЛАВА

6 Концепция матричных поверхностей

Химику теперь известны некоторые важные «секреты жизни», от которых зависит способность клетки к росту и делению.

Во-первых, ему известно, что клетка окружена сложно организованной мембраной, способной (благодаря своей избирательной проницаемости) поддерживать концентрацию веществ в клетке на более высоком уровне, нежели в окружающей среде.

Во-вторых, он знает о существовании ферментов, катализирующих реакции, в результате которых отдельные составные части пищи превращаются в компоненты клетки. Наконец, в-третьих, он знает, что источником энергии, необходимой для биосинтетических процессов, служит либо поглощенная пища, либо солнечный свет.

Во всех клеточных процессах важнейшая роль принадлежит белкам. Только эти макромолекулы, построенные из 20 различных аминокислот, обладают достаточной специфичностью, чтобы образовывать избирательно проницаемые мембраны или катализировать высокоспецифичные химические превращения. Мы должны, таким образом, добавить к числу «секретов жизни» также и способность клетки синтезировать нужное количество специфичных белков. На первый взгляд может показаться, что при ферментативном синтезе белка это требование легко и автоматически выполняется. Однако биосинтез белков не подчиняется обычным правилам синтеза низкомолекулярных веществ. Это станет ясно, когда мы рассмотрим ферментативный синтез молекул постепенно возрастающей сложности.

СИНТЕЗ МАЛЫХ МОЛЕКУЛ

Рассмотрим сначала, как синтезируется аминокислота серин в клетках *E. coli*, растущих на среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода. На рис. 6-1 представлен путь синтеза серина из 3-фосфоглицериновой кислоты, образующейся при обычном распаде глюкозы (рис. 2-6). Серин может распадаться (через ряд промежуточных стадий, пока еще детально не изученных) до простейшей аминокислоты — глицина. В каждой стадии участвует специфичный фермент, способный реагировать лишь с соответствующим («правильным») субстратом. Все остальные 18 аминокислот синтезируются подобным же образом. Исходным соединением для синтеза служит какой-нибудь метаболит, образующийся в процессе распада глюкозы. Этот метаболит подвергается ряду ферментативных превращений, которые приводят в конце концов к образованию нужной аминокислоты. Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды (строительные блоки для синтеза ДНК и РНК) также синтезируются в ходе последовательных реакций из более мелких молекул — продуктов распада глюкозы.

Реакции, ведущие к образованию одного из пиримидиновых нуклеотидов, а именно уридин-5′-фосфата, представлены на рис. 6-2. Синтез пуриновых нуклеотидов, у которых молекулярный вес выше, включает

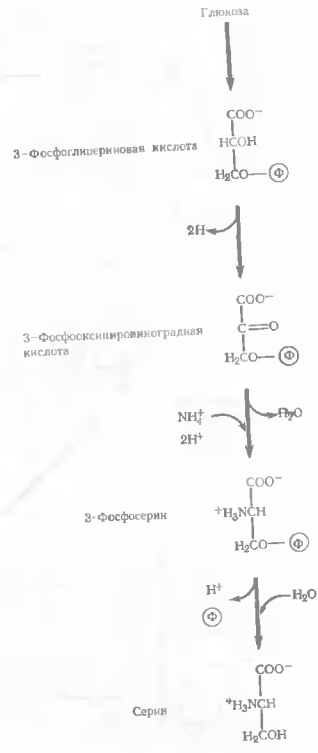


Рис. 6-4. Биосинтез серина.

большее число стадий. Однако он основывается на тех же принципах: 1) каждая стадия процесса катализируется своим особым ферментом и 2) весь процесс в целом ведет к выделению свободной энергии.

Это выделение энергии (обычно в виде тепла) означает, что термодинамическое равновесие благоприятствует биосинтезу необходимых для клеточного роста веществ. Часто один из субстратов реакции активируется благодаря взаимодействию с АТФ; при этом к атому, который должен участвовать в образовании будущей связи, присоединяется высокоэнер-

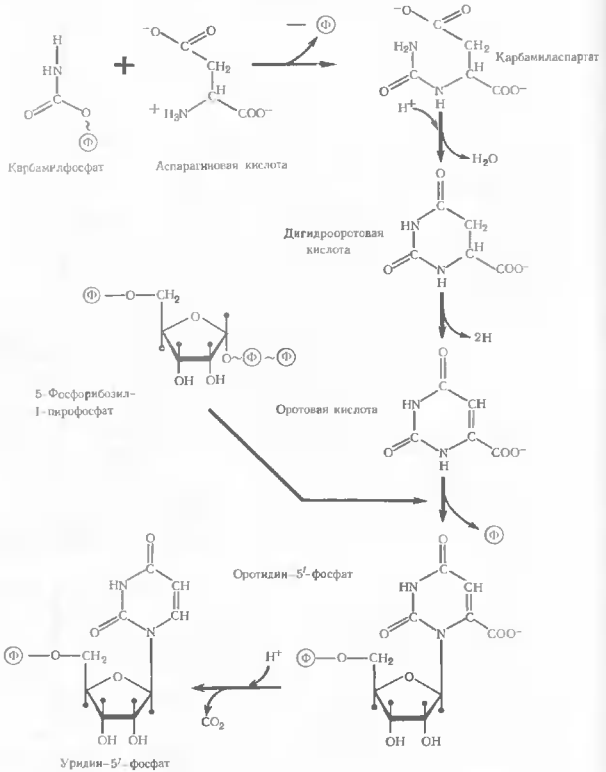


Рис. 6-2. Биосинтез уридин-5′-фосфата.

тетическая группа: фосфатная (~Ⓟ), пирофосфатная (~Ⓟ ~ Ⓟ) или остаток адениловой кислоты (~АМФ). Типичный пример — превращение рибозо-5-Ⓟ в 5-фосфорибозиламин (ФРА) (рис. 6-3). Это превращение (одна из начальных стадий в процессе биосинтеза пуриновых нуклеотидов) проходит в два этапа: сначала рибозо-5-Ⓟ реагирует с АТФ, образуя

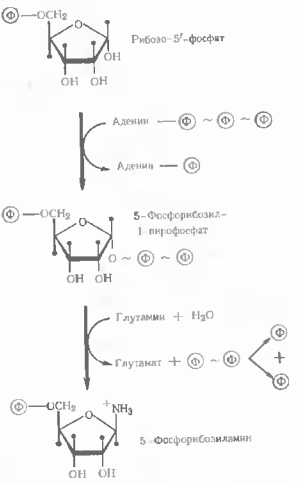


Рис. 6-3. Начальные этапы синтеза пуринов.

АМФ и 5-фосфорибозилпирофосфат, а затем последний вступает в реакцию с глутамином, что приводит к образованию 5-фосфорибозиламина, пирофосфата и глутаминовой кислоты.

Равновесие первой реакции благоприятствует накоплению 5-фосфорибозилпирофосфата, так как свободная энергия пирофосфатной связи в АТФ больше, чем энергия фосфодиэфирной связи (С—О—Ф) в продукте реакции. Равновесие второй реакции благоприятствует синтезу 5-фосфорибозиламина, потому что пирофосфатаза удаляет пирофосфат.

Оба этапа биосинтеза сопровождаются поэтому выделением энергии в виде тепла. В противоположность этому разность между энергией первоначальной связи С—О в молекуле рибозо-5-Ф и энергией новообразованной связи С—N невелика, и, значит, активация с участием донора энергии является необходимым условием для этой биосинтетической реакции. Однако активация не является обязательной для всех без исключения реакций биосинтеза. Иногда при биосинтезе энергия новообразованных ковалентных связей оказывается намного меньшей, чем энергия связей исходных молекул.

СИНТЕЗ МОЛЕКУЛ «СРЕДНЕЙ ВЕЛИЧИНЫ»

Биосинтез хлорофилла (рис. 6-4) может служить хорошим примером такого процесса. Синтезировать хлорофилл лабораторным путем удалось совсем недавно, и даже первоклассному химику-органику его строение

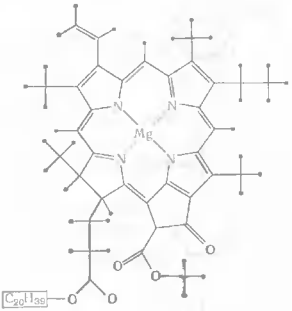
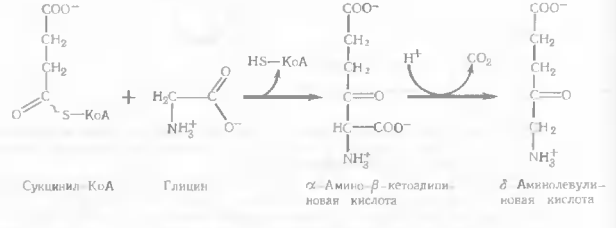
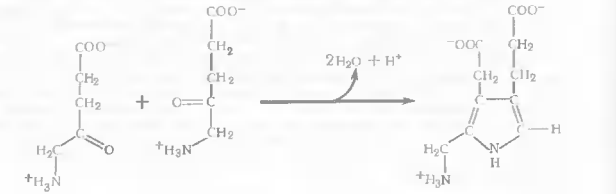


Рис. 6-4. Структура хлорофилла.



Сукцинил-КоА Глицин α-Амино-β-кетоадипиновая кислота δ-Аминолевулиновая кислота



δ-Аминолевулиновая кислота (2 молекулы) Порфобилиноген

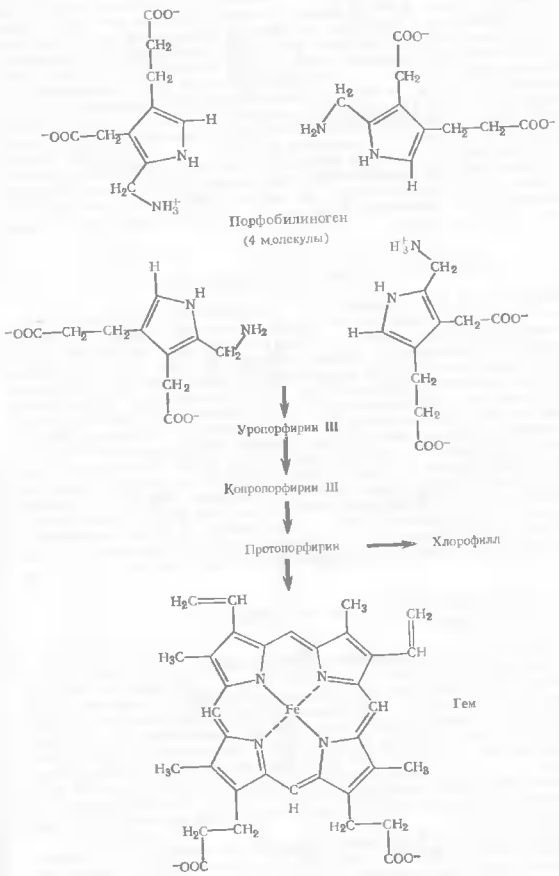


Рис. 6-5. Путь биосинтеза порфирина

представляется чрезвычайно сложным. Молекула хлорофилла (мол. вес 892) содержит порфириновое кольцо, к которому присоединен спирт фитол с длинной неразветвленной цепью. Процесс биосинтеза хлорофилла известен сейчас лишь в общих чертах. По всей вероятности, две упомянутые части молекулы синтезируются раздельно и лишь позднее соединяются. В настоящее время накоплено больше всего сведений о биосинтезе порфиринового кольца (рис. 6-5). Известно, что целый ряд специфичных ферментов участвует в превращениях предшественников порфирина (глицина и сукцинил-КоА). Представленная на рис. 6-5 схема не содержит каких-либо качественно новых черт, отличающих биосинтез молекул такой степени сложности от биосинтеза какого-нибудь низкомолекулярного вещества. В обоих случаях необходимо участие специфичных ферментов и благоприятный характер термодинамического равновесия. Различие и здесь чисто количественное: для синтеза крупной молекулы требуется участие многих различных ферментов, а также доставка большего количества энергии извне.

СИНТЕЗ РЕГУЛЯРНОГО ОЧЕНЬ КРУПНОГО ПОЛИМЕРА

Молекулярный вес гликогена часто превышает 1×10^6. Тем не менее для образования гликогена из глюкозы достаточно четырех различных ферментов, так как гликоген — это полимер, построенный из одних только повторяющихся остатков глюкозы. На рис. 6-6 представлена схема биосинтеза гликогена из глюкозы. Показаны реакции, в результате которых глюкоза активируется по первому углеродному атому, после чего происходит полимеризация. Для полимеризации требуется только один фермент, так как почти все связи в полимере одинаковы. Остатки глюкозы соединены гликозидными связями между первым и четвертым углеродными атомами соседних остатков, $C_1—O—C_4$. Значительно реже включается другой фермент, образующий 1,6-гликозидные связи; это обусловливает разветвленное строение молекулы. Мы видим, следовательно, что число ферментов, необходимых для синтеза какой-нибудь молекулы, не обязательно зависит от ее размера, а скорее определяется ее сложностью. Химики легко установили строение гликогена, но и биохимики быстро выяснили механизм биосинтеза этой макромолекулы.

НЕКОТОРЫЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ О СТРУКТУРЕ БЕЛКОВ

Прежде чем мы займемся проблемой синтеза белков, нам следует подробнее познакомиться с их структурой. Белки — чрезвычайно сложные макромолекулы, так как они построены из двадцати различных типов аминокислот. Таким образом, химик-органик должен выяснить, во-первых, природу связи между отдельными аминокислотами и, во-вторых, порядок их чередования в данной линейной полипептидной цепи. Биохимик же хотел бы узнать, как происходит соединение отдельных аминокислот и какие механизмы используются для определения порядка чередования аминокислот во время синтеза. Вопрос о порядке чередования аминокислот является наиболее сложным как для химиков, так и для биохимиков.

Только в 1953 г. была впервые выяснена последовательность аминокислот в одном из белков — инсулине, молекула которого относительно невелика (всего 51 аминокислота; рис. 6-7). В настоящее время известны последовательности большого числа различных белков. Один из самых крупных — это химотрипсиноген, молекула которого содержит 246 амино-

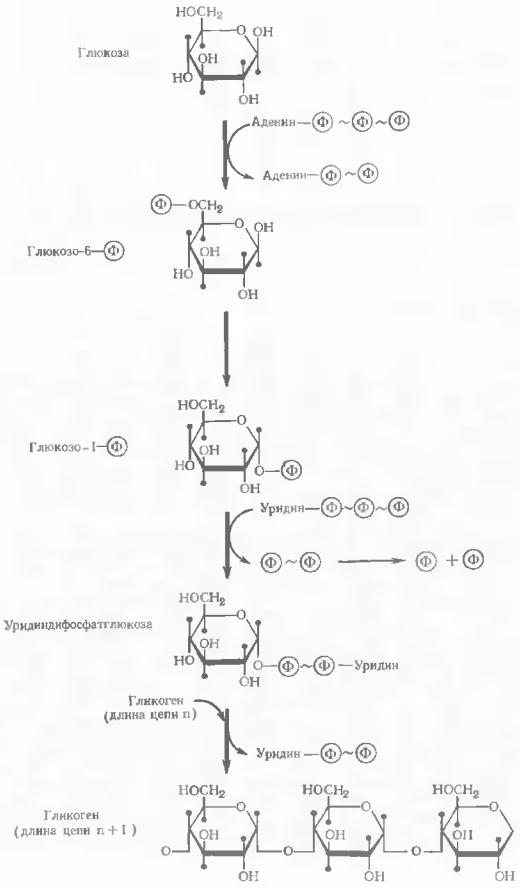


Рис. 6-6. Биосинтез гликогена из глюкозы.

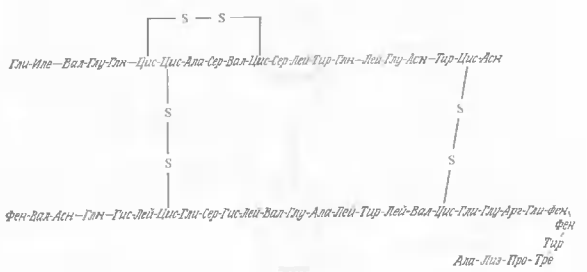


Рис. 6-7. Последовательность аминокислот в бычьем инсулине.

кислот. Химотрипсиноген превращается в химотрипсин, который катализирует гидролиз определенных пептидных связей. Над определением последовательности аминокислот в молекуле химотрипсиногена (рис. 6-8) несколько талантливых химиков работали на протяжении ряда лет (в общей сложности около 15 человеко-лет). В наше время усовершенствование аналитических методов делает подобные исследования значительно более легкими. Теперь для определения структуры относительно небольшого белка может быть достаточно (при удачном стечении обстоятельств) менее одного года работы.

Помимо вопроса о порядке чередования аминокислот, встает также проблема укладки полипептидной цепи в уникальную трехмерную структуру. Нормальное функционирование почти всех белков зависит не только от правильного чередования аминокислот в цепи, но также и от точной укладки полипептидной цепи в пространстве. Как мы уже отмечали в гл. 4, полипептидный остов не является совершенно жестким; многие атомы остова сохраняют способность к свободному вращению и могут занимать различное положение. Однако в силу тенденции к образованию максимального числа слабых связей данный белок обычно принимает вполне определенную уникальную конформацию. Существуют достаточно убедительные косвенные доказательства того, что в одинаковых условиях все молекулы белка, имеющие тождественные последовательности аминокислот, имеют также и тождественные «нативные» конфигурации. Эти представления получили и прямое подтверждение в экспериментах по определению полной трехмерной структуры белка миоглобина. На рис. 6-9 представлена структура миоглобина, установленная при помощи рентгеноструктурного анализа. Несмотря на то что молекула миоглобина невероятно сложна, при детальном изучении ее структуры можно уловить одну важную особенность, которая определяет собой ее общую конформацию: пептидная цепь уложена таким образом, что группы, способные притягиваться друг к другу, оказываются рядом.

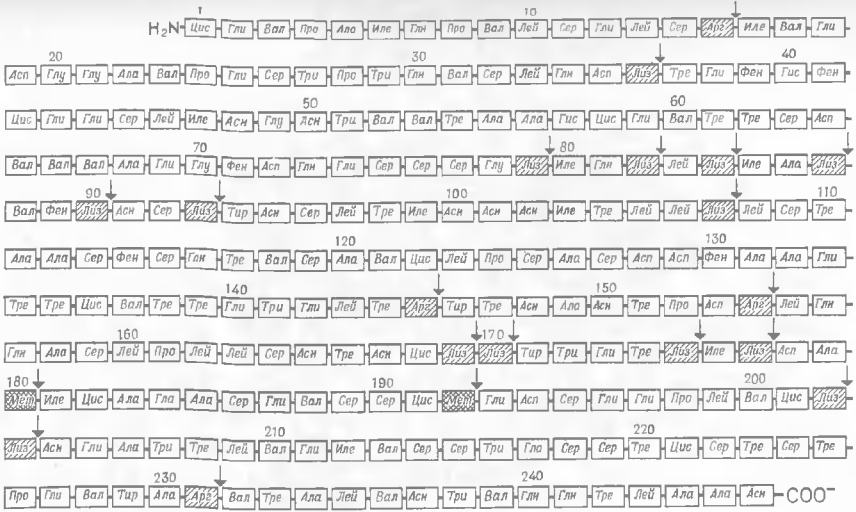


Рис. 6-8. Последовательность аминокислот в химотрипсиногене.

Решающим этапом в установлении таких белковых последовательностей является получение небольших хорошо охарактеризованных полипептидных фрагментов. Для этой цели используется, например, фермент трипсин, который расщепляет пептидные связи рядом с остатками аргинина и лизина со стороны их карбоксильных групп, образующиеся при этом так называемые стратегические фрагменты сыграли неоценимую роль при установлении почти всех расшифрованных последовательностей белков. Более крупные фрагменты обычно получают при помощи обработки бромцианом, который расщепляет пептидные связи со стороны карбоксильной группы значительно более редко встречающейся в белках аминокислоты метионина.

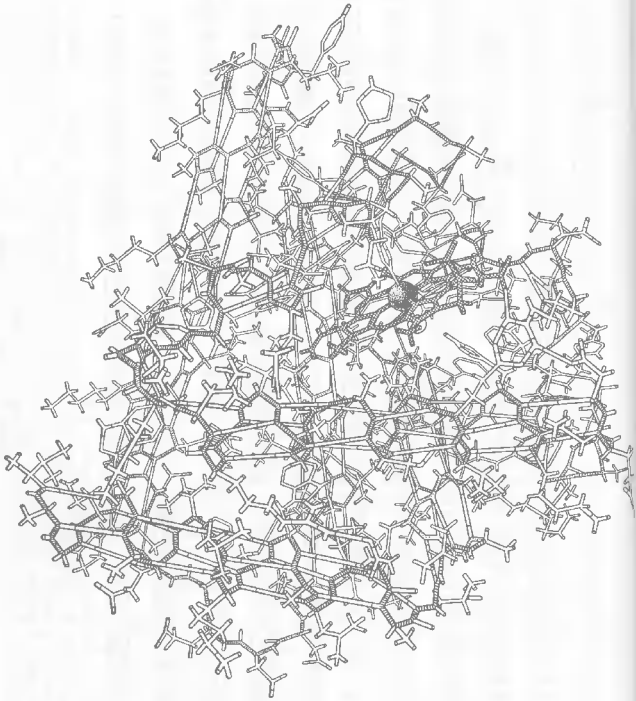


Рис. 6-9. Трехмерная структура миоглобина, установленная при помощи рентгеноструктурного анализа (Kendrew, Sci. Am., 205, 100—101, 1961). Полипептидный остов показан косой штриховкой, группы гема — перекрестной.

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА

Миоглобин, содержащий 153 аминокислоты, относится к числу тех весьма многочисленных белков, молекула которых состоит из одной полипептидной цепи. Многие другие белки состоят из двух или нескольких цепей.

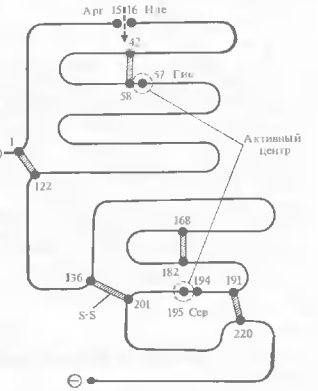


Рис. 6-10. Расположение S—S-связей в молекуле химотрипсиногена.
Интактная молекула химотрипсиногена не обладает ферментативной активностью. Она становится активной после расщепления (ферментативным путем) пептидной связи между аминокислотами в положениях 15 и 16 и последующего отщепления остатков 14 и 15. Активный продукт носит название химотрипсина. Трехмерная структура химотрипсина установлена с помощью рентгеноструктурного анализа, изучен также и механизм его ферментативного действия. В активный центр химотрипсина входит остаток серина в положении 195, остаток аспарагиновой кислоты в положении 102 и остаток гистидина в положении 57; поэтому цепь фермента складывается таким образом, чтобы эти три аминокислоты сблизились друг с другом.

Так, например, в молекуле гемоглобина (мол. вес 64 500) имеются четыре полипептидные цепи. Число полипептидных цепей и порядок чередования аминокислот в цепях определяет то, что мы называем *первичной структурой белка*. Если в молекуле белка содержится несколько полипептидных цепей, то они часто удерживаются вместе вторичными связями. В других случаях (как, например, в молекуле инсулина; рис. 6-7) цепи удерживаются дисульфидными связями (S—S). Дисульфидные связи также играют очень важную роль и в поддержании жесткой формы одиночной полипептидной цепи. В молекуле химотрипсиногена имеется пять дисульфидных мостиков, которые соединяют между собой определенные остатки цистеина (рис. 6-10).

В молекуле некоторых белков имеется небелковая группа, от которой зависит специфическая функция данного белка. Такие группы называются *простетическими*. Часто роль простетических групп играют металлорганические соединения. Гем — простетическая группа гемоглобина и миоглобина — представляет собой металлорганическое соединение, близкое по структуре к порфириновому компоненту хлорофилла. Способность миоглобина и гемоглобина связывать кислород зависит именно от гема, который соединяется с кислородом.

Характерная особенность простетических групп состоит в том, что в отсутствие полипептидного партнера их функциональная активность всегда очень низка. Например, гем сам по себе может только необратимо соединяться с кислородом. Лишь когда гем входит в состав гемоглобина или миоглобина, эта реакция обратима. Гем, связанный с белком, в условиях пониженного содержания кислорода может отщеплять присоединенный кислород.

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА (СКЛАДЧАТЫЙ СЛОЙ ИЛИ СПИРАЛЬ)

Термином *вторичная структура* обозначают регулярные конфигурации полипептидного остова молекулы белка. По своей вторичной структуре белки разделяются на два класса. Полипептидные цепи могут быть полностью растянуты в длину и стабилизированы водородными связями, соединяющими разные цепи. Так возникает β-структура, имеющая слоистый характер. Водородные связи образуются между группами N—H...O=C двух соседних цепей (рис. 6-11). Образованию таких структур благоприятствует наличие в цепи большого числа остатков глицина и аланина. Эти структуры обнаружены главным образом в белках шелка.

Второй, гораздо более важный тип регулярной организации полипептидной цепи возникает благодаря образованию водородных связей между разными группами одной и той же цепи. Такие водородные связи закручивают полипептидный остов в спираль. Важнейшим типом полипептидной спирали является α-спираль, которую мы рассмотрели в гл. 4 (рис. 4-13). Рентгеноструктурный анализ миоглобина выявил, что большие участки полипептидного остова этого белка имеют форму α-спирали. Имеются также данные, указывающие на наличие α-спиралей во многих других белках.

ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА КРАЙНЕ НЕРЕГУЛЯРНА

Трехмерная структура белка называется его *третичной структурой*. Третичная структура часто крайне нерегулярна. Практически ни один белок не существует в форме простой спирали: во многих белках имеются как спирализованные, так и неспирализованные участки, а в некоторых белках спирализованных участков, по-видимому, вообще почти нет. Существует ряд стереохимических причин, по которым (несмотря на почти регулярное расположение водородных связей в остове) участки с конфигурацией α-спирали и другими регулярными конфигурациями встречаются в цепи относительно не столь часто. Одна из таких причин — это неспособность пролина (который не содержит аминогруппы) к образованию водородных связей. Поэтому там, где стоит пролин, регулярное рас-

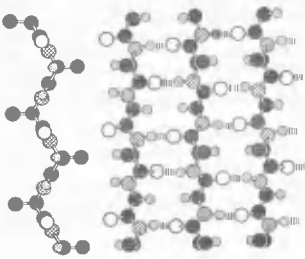


Рис. 6-11. Вытянутые полипептидные цепи образуют складчатый слой, стабилизируемый водородными связями (β-конфигурация) (Pauling, The Nature of the Chemical Bond, 3rd ed., Cornell Univ. Press, Ithaca, N.Y., p. 501).

положение водородных связей нарушается. Другая причина состоит в образовании дисульфидных мостиков (S—S) между остатками цистеина. Когда эти остатки цистеина принадлежат одной и той же полипептидной цепи, спиральная конфигурация, естественно, оказывается нарушенной.

Однако, пожалуй, самой важной причиной наличия в молекуле белка участков с нерегулярной структурой является различная природа боковых групп. Каждая боковая группа стремится к образованию энергетически наиболее выгодных вторичных связей с другими группами. Например, свободная гидроксильная группа тирозина стремится занять положение, удобное для образования водородной связи. Значительная энергия, которой обладает такая связь, была бы потеряна, если бы, например, эта группа оказалась расположенной вблизи гидрофобной боковой группы изолейцина.

Более того, боковые группы некоторых аминокислот (например, валина или лейцина) очень мало растворимы в воде, тогда как боковые группы других аминокислот (глутаминовая кислота, лизин) отличаются, наоборот, очень высокой растворимостью. Таким образом, уже из чисто химических соображений становится понятным, почему в молекуле миоглобина все нерастворимые в воде боковые группы оказываются сцепленными между собой внутри молекулы, а на поверхности располагаются группы, легко растворимые в воде. Трехмерная конфигурация представляет собой энергетически наиболее выгодную организацию полипептидной цепи. Каждая последовательность аминокислот приобретает свою «нативную» конфигурацию, которая характеризуется максимальным числом выгодных контактов между различными группами и окружающей средой. Эта точка зрения получила прямое подтверждение в интереснейших экспериментах по *ренатурации* белков, *денатурированных* нагреванием или какими-либо иными воздействиями. Когда денатурированные цепи — беспорядочно ориентированные и биологически неактивные — постепенно переводятся в нормальные условия, некоторые из них вновь спонтанно приобретают свою нативную конформацию, что сопровождается полным восстановлением биологической активности.

ДИСУЛЬФИДНЫЕ СВЯЗИ (S—S) МЕЖДУ ПОДХОДЯЩИМИ ПАРТНЕРАМИ ОБРАЗУЮТСЯ СПОНТАННО

Во многих случаях при ренатурации денатурированного белка требуется образование не только термодинамически выгодных слабых связей, но и определенных дисульфидных мостиков. Это было впервые обнаружено в опытах с рибонуклеазой, молекула которой (одна полипептидная цепь) состоит из 124 аминокислот, соединенных четырьмя дисульфидными мостиками. Нативная конфигурация рибонуклеазы, в которой она биологически активна, может быть разрушена в результате восстановления дисульфидных групп меркаптоэтанолом в 8 М растворе мочевины (рис. 6-12). После удаления мочевины и окисления SH-групп кислородом воздуха восстанавливаются дисульфидные связи, тождественные тем, какие имелись в исходной молекуле. Благодаря тому что цепь принимает исходную конформацию, только вполне определенные SH-группы оказываются рядом и образуют мостики (после окисления).

Следовательно, образование S—S-мостиков не является движущей силой ренатурации; скорее оно стабилизирует уже готовую конфигурацию цепи. Наличие или отсутствие S—S-связей не вызывает необходимости в пересмотре основного постулата, согласно которому конформация белка определяется последовательностью аминокислот в цепи.

Рис. 6-12. Схема, иллюстрирующая судьбу S—S-связей в процессе денатурации и ренатурации белка.
После удаления денатурирующих агентов у большей части полипептидных цепей восстанавливается нативная конфигурация и исходные S—S-связи; лишь немногие цепи, скручиваясь, переходят в неактивную форму с иными S—S-связями.

ФЕРМЕНТЫ САМИ ПО СЕБЕ НЕ МОГУТ ОПРЕДЕЛЯТЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ АМИНОКИСЛОТ В ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ БЕЛКА

Мы видели, что последовательность аминокислот в полипептидной цепи определяет собой трехмерную структуру данного белка. Вернемся теперь к вопросу о механизме установления этой последовательности, так как именно к нему сводится в конечном счете сущность проблемы биосинтеза белка. По сравнению с ним вопрос о механизме образования связей между отдельными аминокислотами менее сложен. Поскольку аминокислоты связаны между собой лишь одним типом связи (пептидной связью), есть все основания считать, что в данном процессе участвует только один фермент или небольшое их число.

Однако если даже мы допустим, что для каждой аминокислоты имеется свой специфичный фермент, помещающий ее в надлежащее место, то и это не поможет нам решить задачу. В самом деле, при таком механизме потребовалось бы столько специфичных ферментов, сколько аминокислот содержится в данном белке. Но все известные ферменты — сами белки, и, значит, потребовался бы еще ряд ферментов для синтеза этих ферментов и так далее. Получается заколдованный круг. Чтобы вырваться из него, пришлось бы допустить существование необычайно сложно переплетенной сети синтезов, в которой фермент катализирует много различных реакций. Только при таком допущении можно (и то с большой натяжкой!) представить себе как-то функционирующую клетку. Между тем весьма маловероятно, чтобы большинство белков выполняло более одной какой-либо функции. Все имеющиеся сейчас данные свидетельствуют как раз об обратном — о том, что каждый белок обладает только каким-то одним, свойственным ему действием.

Таким образом, приходится отбросить мысль о том, что последовательность аминокислот в полипептидной цепи устанавливается с помощью большого набора специфичных ферментов. Вместо этого мы можем допустить существование особой специфической поверхности, или *матрицы* (рис. 6-13), на которой аминокислоты (или их активированные производные) выстраиваются в порядке (строго определенном для каждого белка)

Рис. 6.13. Схема образования полимерной молекулы на поверхности матрицы.

и связываются друг с другом под действием общего для всех белков фермента, катализирующего образование пептидных связей. Матрицы должны, очевидно, обладать способностью прямо или косвенно воспроизводить самих себя. Это означает, что новые матрицы должны образовываться в результате точного копирования старых. И в этом случае мы, по-видимому, не можем допустить участия специфичных ферментов, ибо такое допущение вновь возвратило бы нас к исходному парадоксу: «Фермент не может синтезировать фермент».

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С МАТРИЦЕЙ ОСНОВАНО НА ОТНОСИТЕЛЬНО СЛАБЫХ СИЛАХ

Итак, существование белков зависит от существования высокоспецифичных молекул-матриц. Более того, сами матрицы должны быть макромолекулами по крайней мере такой же величины, как и образуемая ими полипептидная цепь. Это становится очевидным при рассмотрении законов, которым подчиняется избирательное связывание мономеров матрицами. Прежде всего мы убеждаемся в том, что между матрицей и мономерами не образуется ковалентных связей. Взаимодействие их основано на неферментативном образовании слабых связей типа ионных, водородных и ван-дерваальсовых.

Так как слабые силы действуют лишь на очень коротких расстояниях (<5 Å), между матрицей и мономерами необходим, очевидно, очень тесный атомный контакт. Отсюда следует, что специфические контактные участки матрицы должны иметь размеры порядка размеров боковых групп аминокислоты.

ПРИТЯЖЕНИЕ ПРОТИВОПОЛОЖНОГО ИЛИ ПРИТЯЖЕНИЕ ПОДОБНОГО?

Здесь мы рассмотрим вопрос о том, может ли полипептидная цепь служить матрицей для своего собственного биосинтеза. Если бы это было возможно, то это значительно упростило бы химические предпосылки жизни. Пробле-

ма синтеза белка и проблема воспроизведения матриц сведись бы при этом в конечном счете к одному и тому же. Излишними оказались бы все биохимические сложности, связанные с необходимостью поддерживать существование особого класса матричных молекул. Однако такая воображаемая схема не находит подтверждения при более тщательном знакомстве с химическими свойствами боковых групп аминокислот. Не существует, например, никаких химических причин, в силу которых боковая группа валина на нашей воображаемой матрице должна была бы избирательно притягивать к себе другую молекулу валина. В сущности ни одна из боковых групп аминокислот не проявляет специфического сродства к боковой группе другой такой же аминокислоты. Гораздо легче представить себе взаимодействие между молекулами с противоположными или комплементарными свойствами. В самом деле, отрицательно заряженные группы всегда притягивают положительно заряженные, а атомы водорода образуют водородные связи лишь с электроотрицательными атомами. Подобно этому специфические вандерваальсовы силы притяжения могут возникать лишь между молекулами, поверхности которых подходят друг к другу, как ключ к замку.

Остается еще один, формальный способ спасти наши гипотетические белковые матрицы. Можно было бы допустить, что существует 20 различных специфических молекул (по числу аминокислот) и что у каждой такой молекулы есть две совершенно одинаковые поверхности, комплементарные (по заряду или по форме) данной аминокислоте. Тогда участие таких молекул «посредников» дало бы возможность аминокислотам выстраиваться в надлежащем порядке вдоль полипептидной матрицы. Однако нет никаких экспериментальных данных, которые говорили бы в пользу существования подобных молекул-«посредников». Зато обнаружен особый класс молекул-матриц (нуклеиновые кислоты), о котором мы еще будем говорить позднее.

ХИМИЧЕСКИЕ ДОВОДЫ ПРОТИВ СУЩЕСТВОВАНИЯ БЕЛКОВЫХ МАТРИЦ

Неспособность белков выполнять функцию матриц может зависеть от строения боковых групп аминокислот. У белковой матрицы специфичность могла бы определяться только боковыми группами аминокислот, а их строение иногда слишком сходно, чтобы обеспечить достаточную точность копирования, необходимую для существования клетки. Например, изолейцин отличается от валина, а аланин от глицина только присутствием одной дополнительной метильной группы. Если копируемые структуры настолько сходны, то может ли какой-нибудь процесс копирования с достаточной точностью их различать? Ответ на этот вопрос частично зависит от того, что понимать под «достаточной точностью». Некоторые соображения говорят о том, что при копировании молекулы, ответственной за наследственность, частота ошибок для каждой аминокислоты не должна превышать $1 : 10^8$. Вместе с тем не существует химических реакций, которые могли бы с такой большой точностью различать молекулы, отличающиеся лишь одной метильной группой (ошибки происходят при этом с частотой не ниже $1 : 10^6$). Более того, определяя точность воспроизведения белков в процессе биосинтеза, мы убеждаемся в том, что для некоторых аминокислот она не превышает 99,9%. Следовательно, белки не обладают свойствами, которые необходимы молекулам, ответственным за передачу наследственных признаков.

ВЫВОДЫ

Большинство клеточных реакций зависит от присутствия специфичных ферментов и от внешнего источника энергии (солнце или пища), который необходим для генерации высокоэнергетических соединений, подобных АТФ. Биосинтез низкомолекулярных метаболитов и таких крупных молекул, как хлорофилл, протекает через ряд промежуточных стадий, почти каждая из которых катализируется своим особым ферментом.

Естественно, возникает проблема: каким образом осуществляется биосинтез самих ферментов?

Если бы для синтеза каждого фермента использовался целый ряд других ферментов, то их число было бы очень большим. Все ферменты сами белки, т. е. очень крупные молекулы, построенные из 20 разных типов аминокислот, соединенных в особой последовательности, характерной для каждого белка. Средний белок содержит 300—500 аминокислот, и если бы последовательность аминокислот в белке определялась специфичными ферментами, то число ферментов тоже должно было бы достигать 300—500.

Ясно, что такая схема нереальна. Определение последовательности аминокислот в белках осуществляется при помощи молекул матриц. Эти матрицы, как и белки, тоже макромолекулы. Аминокислоты избирательно связываются с поверхностью матрицы и благодаря этому выстраиваются в надлежащем порядке. Для синтеза каждого белка существует своя особая матрица. Связывание аминокислот с матрицей не требуют специфичного фермента и осуществляется за счет слабых (вторичных) сил. Каждая из 20 различных аминокислот связывается с определенным участком матрицы.

Когда клетка растет и делится, число матриц удваивается. Матрицы белкового синтеза должны играть роль матриц и при своем собственном воспроизведении. Белки по ряду химических причин не могут быть матрицами; они не в состоянии обеспечить достаточную точность копирования. Все клетки содержат особый класс молекул, специально приспособленных для выполнения роли матриц в биосинтезе белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Kornberg A., DNA Synthesis, Freeman, San Francisco, 1974. (А. Корнберг, Синтез ДНК, изд-во «Мир», М., 1977.) Глава 2 представляет собой великолепный обзор по биосинтезу пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

Dickerson R. E., Geis I., The Structure and Action of Proteins, Harper, and Row, New York, 1969. Изумительно иллюстрированный вводный курс, в котором обсуждаются способы укладки полипептидных цепей.

Wood W. B., Wilson J. H., Benbow R. M., Hood L., Biochemistry: A Problems Approach, Benjamin, Menlo Park, California, 1974. Первая треть этого весьма полезного «проблемного учебника» посвящена структуре и функции белка.

Bernhard S., Enzymes: Structure and Function, Benjamin, Menlo Park, 1968. Короткое, но превосходное введение к курсу изучения белков как ферментов.

«Structure and Function of Proteins at the Three Dimensional Levels», Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology XXXVI, 1972. Наиболее полный из опубликованных до сих пор обзоров по структуре белка; содержит много стереоскопических рисунков, дающих представление о трехмерной структуре белков.

Neurath H., Hill R. L. (eds.), The Proteins, Volume 1, 3rd ed., Academic Press, New York, 1975. Первый том новой серии статей по всем аспектам структуры и функции белков для студентов старших курсов и аспирантов.

Perutz M. F., «The Hemoglobin Molecule», Scientific American, November 1964, pp. 64—76. Рассмотрено многое из того, что известно в настоящее время об архитектуре молекулы гемоглобина в присутствии или в отсутствие кислорода.

Phillips D., «The Three-Dimensional Structure of an Enzyme Molecule». In: R. H. Haynes and P. C. Hanawalt (eds.), The Molecular Basis of Life, Freeman, San Francisco, 1968, pp. 52—64. Описание изящной работы по изучению структуры лизоцима — первого фермента, для которого удалось найти соответствие между структурой и функцией.

Stroud R. M., «A Family of Protein-Cutting Proteins», Scientific American, July 1974. Замечательно иллюстрированная статья, описывающая структуру и функционирование трипсин- и химотрипсиноподобных белков.

Dickerson R. E., «The Structure and History of an Ancient Protein», Scientific American, August 1972. Великолепно иллюстрированное введение в изучение структуры белка на примере эволюции структуры цитохрома *c*.

Muller H. J., «The Gene», Proc. Roy. Soc. (London), B134, 1—37 (1947). Лекция, прочитанная в 1945 г., в которой выдающийся генетик рассматривает историю концепции гена и рассуждает о том, каким образом он мог бы функционировать в качестве матрицы.

ГЛАВА

7 Организация генов в хромосомах

Как мы уже видели, химические соображения говорят о том, что белки не могут выполнять роль матриц, необходимых для определения последовательности аминокислот при биосинтезе белков. Поэтому мы вынуждены искать другой класс молекул, которые могли бы функционировать как матрицы в белковом синтезе и в то же время обладали бы способностью к самовоспроизведению. Направление наших поисков в этой области полностью определяется данными современной генетики. Эта бурно развивающаяся наука с поразительной точностью раскрыла механизм участия хромосом в передаче наследственных признаков. Благодаря генам, расположенным в хромосомах, дочерняя клетка обычно подобна родительской. Главной задачей генетиков всегда было выяснение механизма, обеспечивающего это подобие. Поэтому наряду с работами по локализации генов они пытались также исследовать и важнейший вопрос о том, как гены контролируют клеточные процессы на химическом уровне. Однако мутации, которые они изучали, нелегко поддавались такого рода анализу. В 1920-х и 1930-х годах (как, впрочем, и теперь) фактически ничего еще не было известно о биохимических основах развития.

По счастью, мутации, изменяющие цвет глаз и окраску цветков, оказались удобными для химического исследования. У дрозофилы, например, мутации многих генов ведут к изменению цвета глаз. Известно, что цвет глаз непосредственно зависит от присутствия особых окрашенных веществ — пигментов. Это и дало возможность провести биохимические исследования того, как же, собственно, изменение гена приводит к изменению цвета глаз (вместо красных глаз — белые). Оказалось, что у мутантных особей глаза вообще не содержат пигмента. Естественно было предположить, что у них отсутствует фермент, необходимый для синтеза пигмента. Позднее это предположение переросло в гипотезу, согласно которой гены непосредственно контролируют биосинтез всех белков — как ферментных, так и неферментных.

Когда эта гипотеза получила широкое признание (после 1946 г.), генетики начали изучение более сложной проблемы: каким образом гены определяют природу образующихся белков? Однако успехи на этом поприще были весьма умеренными до тех пор, пока химики не доказали однозначно (в начале 1950-х годов), что белки представляют собой линейные полимеры, построенные из 20 различных аминокислот. После этого генетикам, склонным к теоретическим построениям, было уже легко высказать предположение, что хромосомы несут генетическую информацию о последовательности аминокислот в белках, и предсказать, что изучение структуры генов поможет выяснить молекулярную структуру матриц, определяющих эту последовательность. Их предсказание полностью оправдалось. Но прежде чем углубляться в эту проблему, нам следует рассмотреть некоторые генетические концепции.

В МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЕ ХРОМОСОМ МНОГОЕ ЕЩЕ ОСТАЕТСЯ НЕЯСНЫМ

Даже сегодня мы еще, в сущности, очень мало знаем о молекулярной структуре хромосом. Особенно это верно в отношении сложных хромосом высших растений и животных. Главный химический компонент хромосом у бактерий и вирусов, а также у высших организмов — это дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Хромосомы высших организмов содержат также и значительное количество белка (до 65% у высших растений и животных).

Большая часть хромосомных белков относится к классу гистонов. Все гистоны имеют основный характер (несут положительный заряд); считается, что, взаимодействуя с ДНК, они частично нейтрализуют ее отрицательные заряды. Однако истинная функция гистонов остается пока неизвестной. До 1943 г. некоторые биологи приписывали им роль носителя генетической информации, но постоянство структуры гистонов на протяжении эволюции, обнаруженное в последнее время, свидетельствует против их существенной генетической роли. Все более распространенным становится мнение, что гистоны выполняют скорее структурные функции и играют ключевую роль в спирализации и деспирализации хромосом в течение клеточного цикла.

Вплоть до настоящего времени электронная микроскопия мало что дала для изучения структуры хромосом у высших организмов. Это особенно бросается в глаза при сопоставлении с успехами, достигнутыми в исследовании тонкой структуры мышцы и нерва. Неудачи объясняются *неправильной* формой не только растянутых (интерфазных), но даже и уплотненных (метафазных) хромосом. На молекулярном уровне различные белки мышцы собраны в толстые параллельные пучки волокон. В противоположность этому расположение хромосом в клетке совершенно неправильно; на тонком срезе невозможно проследить даже контур хромосомы, не говоря уже о деталях ее молекулярной структуры. Таким образом, чисто морфологические исследования почти не дают нам сведений об организации генов в хромосоме; единственный способ атаковать проблему заключается в использовании генетических скрещиваний. К счастью, как мы увидим ниже, разрешающая сила этого последнего метода исключительно велика.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СКРЕЩИВАНИЯ

Природа выработала целый ряд способов, с помощью которых генетический материал различных организмов может объединяться (генетическое скрещивание) и претерпевать генетические рекомбинации. Существование всех этих способов, обозначаемых общим термином *половой процесс*, сильно ускоряет ход эволюции, ибо благодаря им несколько полезных мутаций могут соединиться в геноме какой-нибудь одной клетки гораздо быстрее, чем если бы эти мутации накапливались в данной клетке обычным путем. Однако мы сейчас не будем рассматривать значение полового процесса для эволюции. Нас здесь интересует лишь использование полового процесса при генетическом анализе для локализации генов в хромосомах.

Чтобы определить локализацию тех или иных генов методом генетических скрещиваний, прослеживают, как эти гены передаются гаплоидным сегрегантам. Если гены располагаются в разных хромосомах, то в потомстве они распределяются независимо и вероятность того, что они попадут в одну и ту же гаплоидную клетку, равна 0,5. Гены, находящиеся в одной хромосоме, всегда оказываются вместе. Исключение возможно лишь в том случае, если при делении произойдет *кроссинговер*, или *перекрест*,

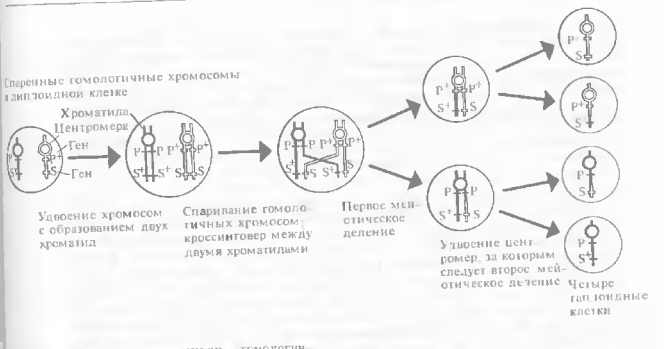


Рис. 7-1. Кроссинговер между гомологичными хроматидами в процессе мейоза.

Кроссинговер происходит во время мейоза на стадии *спаривания* гомологичных хромосом. Механизм этого спаривания еще совершенно не изучен. Несомненно, этот процесс очень специфичен, так как в пары всегда объединяются хромосомы, содержащие одинаковые гены. Иногда в спаренных хромосомах происходят разрывы (на одном и том же уровне), а затем концы разорванных хромосом соединяются крест-накрест. В результате такого процесса возникают *рекомбинантные* хромосомы, которые содержат и отцовские и материнские гены. Кроссинговер значительно увеличивает частоту генетических рекомбинаций. Процесс этот, вообще говоря, распространен очень широко (если не считать некоторых особых случаев). Однако частота его сильно варьирует в зависимости от объекта; в среднем на каждый акт спаривания гомологичных хромосом приходится от одного до нескольких кроссинговеров.

Все ранние сведения о локализации генов были получены из наблюдений над выщеплением генов при типичном процессе мейоза. Исследования проводились на объектах, у которых мужские и женские половые клетки, сливаясь, образуют диплоидную зиготу. В такой зиготе одна половина хромосом ведет свое происхождение от матери, а другая — от отца. В процессе мейоза регулярно происходит редукция числа хромосом. Кроссинговер всегда происходит после того, как родительские хромосомы расщепятся на две хроматиды (удерживаемые вместе общей *центромерой*). В каждый кроссинговер вовлекаются только две хроматиды. Таким образом, в каждой паре гомологов, состоящей из четырех хроматид, две хроматиды оказываются рекомбинантными и две сохраняют родительский тип (рис. 7-1). (Это вовсе не означает, что половина хроматид, возникших в процессе мейоза, имеет родительский генотип. Каждая хроматида в любой паре с равной вероятностью может быть вовлечена в кроссинговер, так что если даже она не участвует в данном кроссинговере, то у нее еще есть шанс вступить в другой.)

СОСТАВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КАРТ ХРОМОСОМ

Явление кроссинговера дает нам возможность определять порядок расположения генов в хромосомах. Для многих хромосом вероятность кроссинговера по всей длине одинакова, и, значит, чем дальше друг от друга находятся гены, тем больше вероятность того, что в промежутке между ними произойдет разрыв, который приведет к генетической рекомбинации. Найденные в опытах частоты рекомбинаций используются для построения генетических карт хромосом. Этот метод особенно удобен в тех случаях, когда имеют дело с гаплоидным потомством, и, следовательно, вопрос о доминантности отпадает. Рассмотрим поведение трех генов, находящихся в одной хромосоме гаплоидного организма. Взаимное расположение этих генов можно определить при помощи трех скрещиваний, в каждом из которых прослеживается поведение двух генов (*двухфакторное* скрещивание). Скрещивание X (между a^+b^+ и ab) дает четыре типа потомков: два родительских генотипа (a^+b^+ и ab) и два рекомбинантных (a^+b и ab^+). Аналогично этому скрещивание Y (между a^+c^+ и ac) наряду с двумя родительскими типами дает рекомбинантные (a^+c и ac^+), а скрещивание Z (между b^+c^+ и bc) — тоже родительские типы и два рекомбинантных (b^+c и bc^+). В каждом скрещивании отношение между потомками родительского и рекомбинантного типов характеризуется вполне определенной величиной. Рассмотрим случай, когда при скрещивании X число рекомбинантов составляет 30%, при скрещивании Y — 10% и при скрещивании Z — 25%. Ясно, что в этом случае гены a и c расположены ближе друг к другу, чем гены a и b или гены b и c, и что разница в генетическом расстоянии между a и b, с одной стороны, b и c — с другой — невелика. Этим данным более всего отвечает расположение acb (рис. 7-2).

Правильность расположения генов, установленного в двухфакторных скрещиваниях, можно обычно подтвердить с помощью *трехфакторного* скрещивания. Если в нашем гипотетическом случае проследить поведение всех трех генов ($a^+b^+c^+ \times abc$), то обнаружится шесть рекомбинантных генотипов (рис. 7-3). Они распадаются на три класса, в каждый класс входит пара реципрокных (взаимодополняющих) рекомбинантов. Рекомбинанты, встречающиеся в наименьшем количестве, представляют собой продукт двойного кроссинговера. Часто исследуя этот класс, можно сразу же подтвердить (или опровергнуть) ту последовательность генов, которая была выведена из двухфакторных скрещиваний. В частности, данные рис. 7-3 подтверждают последовательность acb, ибо только при таком расположении генов наиболее редкими могут оказаться рекомбинанты с генотипами a^+cb^+ и ac^+b.

Существование множественных кроссинговеров означает, что частота рекомбинаций между крайними маркерами a и b (ab) обычно меньше, чем сумма частот рекомбинаций между a и c и c и b (ac и cb). Для более точного определения расстояния между крайними маркерами мы вычисляем вероятность кроссинговера между a и c при наличии кроссинговера между c и b, и наоборот. Первая вероятность равна $(ac \times cb)$, а вторая $(cb \times ac)$. Вычитая эту вероятность из суммы частот рекомбинаций

$$ab = ac + cb - 2\,(ac)\,(cb),$$

мы можем более точно оценить частоту рекомбинаций. Данная простая формула применима во всех случаях, когда возникновение одного кроссинговера не влияет на вероятность возникновения другого. К сожалению, точность локализации генов часто снижается из-за явления *интерференции*, которая может либо увеличивать, либо снижать вероятность коррелированных перекрестов.

На основе очень большого числа подобных скрещиваний было сделано важное заключение: все гены в хромосоме расположены линейно,

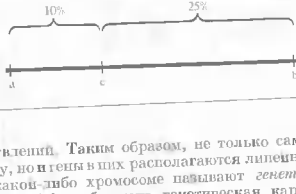


Рис. 7-2. Предположительная локализация трех генов на основе трех двухфакторных скрещиваний (см. текст).

без каких бы то ни было разветвлений. Таким образом, не только сами хромосомы имеют линейную форму, но и гены в них располагаются линейно. Схему расположения генов на какой-либо хромосоме называют *генетической картой* хромосомы. На рис. 7-4 изображена генетическая карта одной из хромосом дрозофилы. Расстояния между генами на карте измеряются в так называемых *единицах карты*. Каждая такая единица соответствует частоте рекомбинаций 1%. Следовательно, если частота рекомбинаций между двумя генами составляет 5%, то расстояние между ними равно 5 единицам карты. Из-за существования двойных кроссинговеров точное расстояние между двумя генами можно получить обычным путем только в тех случаях, когда гены располагаются на хромосоме достаточно близко друг к другу.

Даже когда два гена расположены на концах очень длинной хромосомы, они вследствие множественности кроссинговеров будут обнаруживаться в потомстве вместе (т. е. в сцепленном состоянии) не менее чем в 50% случаев. Гены будут расходиться, если между ними произойдет 1, 3, 5, 7 и т. д. кроссинговеров, и передаваться совместно, если число кроссинговеров будет четным (2, 4, 6, 8 и т. д.). В силу этого на начальном этапе генетического анализа какого-либо организма практически невозможно определить, принадлежат ли два гена к разным хромосомам или они расположены на противоположных концах одной и той же длинной

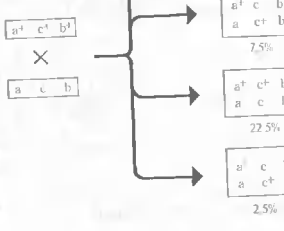


Рис. 7-3. Использование трехфакторных скрещиваний для локализации генов.
Класс реципрокных рекомбинантов, встречающийся с самой низкой частотой, возникает в результате двойного кроссинговера. Частоты, указанные для разных классов рекомбинантов, рассчитаны теоретически для бесконечно большого числа скрещиваний. При исследовании конечного числа потомков результаты несколько отличаются от теоретических вследствие статистических флуктуаций. *А*. Родительские типы. *Б*. Класс, возникающий в результате разрыва между *a* и *c*. *В*. Класс, возникающий в результате разрыва между *c* и *b*. *Г*. Класс, возникающий в результате разрыва между *a* и *c*, а также между *c* и *b*.

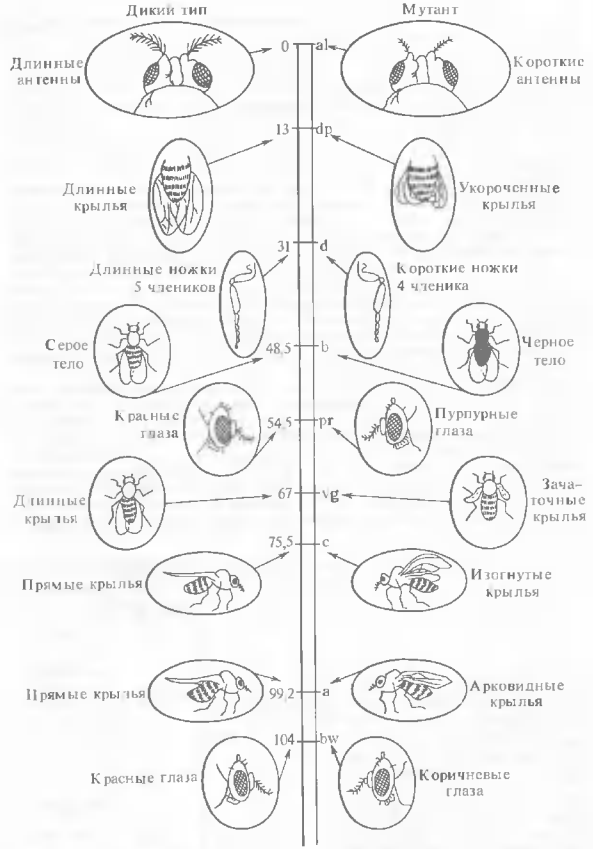


Рис. 7-4. Участок генетической карты *Drosophila melanogaster* (хромосома 2).

хромосомы. После локализации большого числа генов часто обнаруживается, что какие-нибудь два гена, которые считались расположенными в разных хромосомах, на самом деле находятся в одной хромосоме. Так, например, на протяжении многих лет считалось, что гены фага Т4 сгруппированы в трех отдельных хромосомах, и лишь локализация вновь открытых генов позволила установить, что у этого фага имеется только одна хромосома.

Важно помнить, что генетическая карта, построенная на основе частот рекомбинации, отражает истинные относительные расстояния между маркерами только в том случае, если вероятность кроссинговера по всей длине хромосомы одинакова. Поэтому, как только генетики начали составлять генетические карты, перед ними встала задача отыскать такой метод, который позволил бы связать расположение маркеров на генетической карте с подлинным физическим расположением соответствующих участков на хромосоме. В настоящее время мы располагаем целым рядом методов, с помощью которых часто (*но не всегда*) удается это сделать. Некоторые методы слишком сложны, и мы не будем их здесь касаться, но один мы все же рассмотрим в разделе, посвященном генетической карте *E. coli*.

ВАЖНОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАБОТ С МИКРООРГАНИЗМАМИ

Основные идеи классической генетики были развиты на основе работ с многоклеточными организмами — растениями и животными. Однако теперь предпочитают работать с микроорганизмами (если только какие-нибудь особые причины, экономические или социальные, не вынуждают нас изучать совершенно определенный организм, например человека или кукурузу). Микроорганизмы имеют ряд важных преимуществ. Прежде всего, они обычно гаплоидны, так что отпадает необходимость учитывать доминантность или рецессивность. Поскольку мутации по большей части рецессивны, их, как правило, вообще невозможно обнаружить в присутствии гена дикого типа. У диплоидов часто только после целого ряда генетических скрещиваний удается выявить какой-нибудь мутантный ген, между тем как в гаплоидном организме мутантный ген обнаруживается почти немедленно. Крайне важно и то, что микроорганизмы размножаются очень быстро. Естественно, что работать с бактериями, делящимися каждые 20 мин, гораздо легче, чем работать с растениями, например с кукурузой, которая дает максимум два поколения в год.

Шестьдесят лет назад весьма привлекательным объектом казалась дрозофила, жизненный цикл которой длится 14 дней. Однако дрозофила — малопригодный объект для изучения таких фундаментальных проблем молекулярной биологии, как природа генов и механизм их действия.

В наше время излюбленные объекты генетики — это дрожжи, плесневые грибы, бактерии и вирусы. Успешное развитие генетики микроорганизмов началось около 35 лет назад. До того казалось, что мельчайшие размеры делают микробы совершенно непригодными для каких бы то ни было генетических исследований. У микроорганизмов нет легко различимых морфологических признаков (таких, как красные глаза дрозофилы), и поэтому исследователи не представляли себе, как можно выявить у них мутации. До 1945 г. вообще считалось, что у микроорганизмов нет хромосом, а некоторые биологи склонялись к мысли, что у них нет даже и генов.

МУТАГЕНЫ КАК ОРУДИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ранюю эпоху классической генетики исследователи изучали мутации, возникшие спонтанно. Теперь в генетических исследованиях все шире применяются различные агенты, индуцирующие мутации: ультрафиолетовые лучи, ионизирующее излучение, определенные химические вещества. Такие агенты (их называют *мутагенами*) значительно ускоряют работу по выделению мутантных генов. Долгое время самым мощным мутагеном считали различные формы излучения. Теперь более популярны химические мутагены, так как они более активны и вызывают мутирование большого числа генов. При обработке бактерий нитрозогуанидином мутирует, например, около 1% генов, причем эти мутации не летальны.

Ни один из известных мутагенов не обладает избирательным действием: все гены под действием данного мутагена мутируют с равной вероятностью. Механизм мутагенеза до недавнего времени оставался абсолютно неизвестным. Однако сейчас, когда уже доказаны генетическая функция ДНК, появилась возможность строить гипотезы о том, как именно действуют различные химические мутагены (подробнее об этом см. в гл. 9).

МУТАЦИИ У БАКТЕРИЙ. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАКТОРОВ РОСТА

Интенсивное развитие генетики бактерий началось после того, как в 1944 г. были получены мутантные формы бактерий, утратившие способность синтезировать некоторые необходимые метаболиты. Известно, например, что дикий тип *E. coli* хорошо растет на среде, в которой единственным источником углерода служит глюкоза. Теперь, однако, получены мутант-

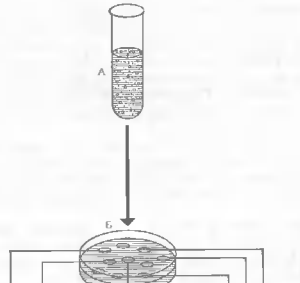


Рис. 7-5. Выделение мутанта *E. coli*, нуждающегося в определенном факторе роста.
А. Клетки *E. coli* обрабатывают мутагеном (нитрозогуанидином). *Б*. Обработанные клетки высевают на богатую агаризованную среду, на которой выживние клетки размножаются и образуют колонии. *В*. В редких случаях клетки не могут расти на минимальной среде вследствие мутации, нарушившей синтез какого-либо вещества. Чтобы быстро идентифицировать это вещество (фактор роста), клетки выращивают на минимальной среде, добавляя к каждой пробе какое-либо одно соединение из тех, которые присутствуют в богатой среде. *Г*. Большинство клеток нормально растет на минимальной среде, содержащей только неорганические соли и глюкозу.

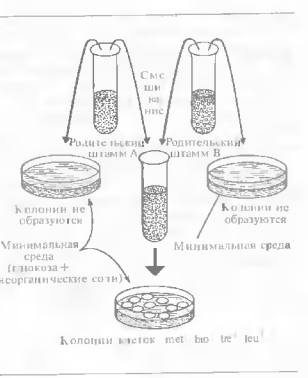


Рис. 7-6. Использование потребности в определенном факторе роста для демонстрации полового процесса у *E. coli*. Ibr⁻ — потребность в треонине, leu⁻ — потребность в лейцине; met⁻ — потребность в метионине; bio⁻ — потребность в биотине; lac⁺ — способность сбраживать лактозу, lac⁻ — неспособность сбраживать лактозу; T1ˢ — чувствительность к фагу T1, T1ʳ — устойчивость к фагу T1. Очень маленькая часть клеток принадлежит к типу met⁺bio⁺thr⁻leu⁺. Они возникают в результате генетической рекомбинации, что доказывается поведением маркеров lac и T1. Помимо исходных типов lac⁻T1ˢ и lac⁺T1ʳ, обнаруживаются типы lac⁻T1ʳ и lac⁺T1ˢ.

ные штаммы *E. coli*, способные расти только в присутствии еще какого-нибудь метаболита (*фактора роста*). Такого рода мутации были обнаружены еще раньше (в 1941 г.) у гаплоидного организма *Neurospora crassa* (плесневый гриб). Выявить их очень легко: для этого достаточно выращивать культуру предполагаемого мутанта в присутствии определенного метаболита, например аргинина, и без него (рис. 7-5). Если действительно произошла мутация, нарушившая биосинтез аргинина, то мутанты будут расти только при добавлении этой аминокислоты в среду. Этим методом (с помощью мутагенов) было получено большое число мутантных форм, лишенных способности синтезировать различные соединения.

Другой важный тип мутаций, используемый в генетике бактерий, — это мутации, изменяющие устойчивость к тем или иным ядам, например к антибиотикам. Известно, что небольшие дозы стрептомицина быстро убивают клетки *E. coli*. Однако иногда (правда, очень редко) возникают мутанты, устойчивые к стрептомицину (Str^R). Возникают также мутанты, устойчивые к фагам. Так, например, одна из мутаций штамма B *E. coli* (кстати, очень часто используемая в различных исследованиях) сообщает ему устойчивость к фагу T1. Такой мутант обозначают символом B/1. Соответственно мутанты, устойчивые к фагам T2 и T4, обозначают символами B/2 и B/4. Существуют также мутантные штаммы *E. coli*, неспособные использовать в качестве единственного источника углерода лактозу, галактозу или мальтозу.

Вскоре после получения мутаций всех этих трех типов были проведены эксперименты, продемонстрировавшие у *E. coli* генетические рекомбинации (а следовательно, и половой процесс) (рис. 7-6). Соответствующие мутантные гены бактерий использовались, во-первых, как маркеры для построения генетических карт хромосом и, во-вторых, для обнаружения генетических рекомбинаций, происходящих в любой данный момент лишь в очень небольшой доле популяции клеток. У *E. coli* простые морфологические наблюдения над культурой клеток не дают возможности выявить слияние клеток и генетические рекомбинации. Чтобы обнаружить рекомбинацию, необходимо было создать такие условия, при которых могли бы расти только рекомбинантные клетки, а клетки

родительских типов были бы обречены на гибель, с этой целью использовали родительские штаммы, нуждавшиеся в специальных факторах роста и потому неспособные расти на минимальной среде.

Для проведения эксперимента смешивали два мутантных штамма, из которых каждый нуждался в каких нибудь факторах роста (например, один — в лейцине и треонине, а другой — в биотине и метионине), а затем высевали их на минимальную питательную среду. Родительские штаммы в этих условиях гибли; выживало только небольшое число клеток, которые, следовательно, не нуждались в указанных факторах роста. Каким-то путем эти клетки получили нормальные («дикие») копии всех мутантных генов. Этот результат явно указывал, что у *E. coli* имеет место половой процесс, при котором хромосомы двух клеток соединяются. Во время этого процесса благодаря кроссинговеру одна из хромосом может получить полный набор нормально функционирующих генов. В дальнейшем генетический анализ подтвердил это предположение. За последние 10 лет очень много исследований было проведено с *E. coli*, и теперь среди прочих генетических объектов это, пожалуй, наиболее полно изученный объект.

ВИРУСЫ ТАКЖЕ ИМЕЮТ ХРОМОСОМЫ

Даже у вирусов наследственность определяется хромосомами. Эти возбудители болезней, значительно более мелкие, чем бактерии, могут проникать в клетку (заражать ее) и, размножаясь там, давать многочисленное потомство. Вирусных заболеваний известно очень много; укажем в качестве примеров катар верхних дыхательных путей, грипп и полиомиелит. Вирусы очень тесно связаны с клеткой-хозяином и не способны размножаться вне клетки.

Почти у всех (а может быть, и у всех) видов животных и растений существуют свои вирусы. Есть вирусы даже у бактерий; их обычно называют бактериофагами или просто фагами. Размножение вируса в клетке по большей части приводит к гибели клетки, чем и объясняются болезнетворные свойства вирусов.

Наши знания по генетике некоторых бактериофагов пополняются очень быстро и, по сути дела, одновременно с развитием генетики бактерий. До 1940 г. генетики вирусов практически не существовало. Большинству исследователей вирусы казались слишком мелкими и потому слишком трудным для изучения объектом (исключение составляли, разумеется, те случаи, когда необходимость борьбы с каким нибудь вирусным заболеванием вынуждала заниматься его возбудителем). Вирусы нельзя увидеть в световой микроскоп, и раньше их обычно обнаруживали лишь по способности убивать клетки. Теперь положение благодаря ряду обстоятельств изменилось. Во-первых, было обнаружено, что с фагами очень легко ставить опыты и что система фаг — бактерия идеально приспособлена для изучения общих проблем, связанных с воспроизведением и действием генов. Во-вторых, оказалось, что вызывать мутации у фагов, пожалуй, еще легче, чем у бактерий.

Величина и химический состав вирусов варьируют очень сильно (рис. 7-7). Исследователи далеко не сразу сумели оценить биологическое значение этого объекта. Долгое время их интересовал вопрос: можно ли считать вирусы живыми? Теперь мы знаем, что каждый вирус — это небольшое количество генетического вещества, заключенное в защитную оболочку. Благодаря этой оболочке (богатой белком) вирус может переноситься из клетки в клетку. Новообразованные вирусные частицы во всем подобны родительским, так как хромосомы и те и других одинаковы. Вирусы, очевидно, можно считать «живыми» не в большей мере, чем изо-

Рис. 7-7. Различие в размерах и форме некоторых вирусов.

тированные хромосомы клеток; и те и другие могут воспроизводиться только внутри клетки. Изучение вирусов дает нам ценнейшую информацию о процессах, происходящих в живой клетке.

Вирусы — почти уникальный объект, ибо только благодаря им мы теперь имеем системы, на которых чрезвычайно удобно изучать последствия быстрого введения нового генетического материала в клетку.

РАЗМНОЖЕНИЕ ВИРУСА НЕ СВЯЗАНО С ПОСТЕПЕННЫМ УВЕЛИЧЕНИЕМ ЕГО РАЗМЕРОВ

Молодая клетка обычно растет до тех пор, пока масса ее не удвоится; после этого она делится (митоз) на две одинаковые дочерние клетки. Вирусы размножаются иначе. Они образуются не путем деления уже существующих более крупных частиц (все вирусные частицы в данной популяции по своей массе приблизительно одинаковы). При размножении вируса исходная — родительская — частица сначала исчезает: она разрушается и хромосома вируса выходит из своей защитной оболочки, чтобы сыграть роль матрицы при синтезе новых вирусных компонентов. Это так называемый скрытый период. Распад родительской частицы — непременная особенность размножения вируса, так как хромосома, заключенная в белковую оболочку, не может служить матрицей для синтеза новых вирусных хромосом и новых белковых молекул оболочки.

ВИРУСЫ — ЭТО ПАРАЗИТЫ НА ГЕНЕТИЧЕСКОМ УРОВНЕ

В большинстве случаев вирусные хромосомы (а они, как мы это увидим позже, всегда состоят из нуклеиновых кислот) строятся из тех же четырех главных типов нуклеотидов, из которых построены хромосомы клеток. То же можно сказать и о строительных блоках белков. Все эти предшественники, равно как и энергия, необходимая для биосинтеза вирусных компонентов, поставляются клеткой-хозяином.

Иными словами, вирусы — облигатные паразиты. Невозможно представить себе размножение вируса вне клетки, так как именно клетка доставляет вирусу, с одной стороны, все необходимые вещества, а с другой — рибосомы, т. е. тот аппарат, который осуществляет синтез белка. Таким образом, главной характерной чертой вирусов является их неспособность самостоятельно синтезировать белки, а вовсе не их малая величина. Чтобы получить возможность размножаться, вирус должен ввести свою нуклеиновую кислоту в жизнеспособную клетку. Именно этот признак позволяет нам отграничивать вирусы, в том числе и крупные (например, вирус оспы), от очень мелких одноклеточных организмов, например от риккетсий. Риккетсии — тоже облигатные паразиты, но они содержат как ДНК, так и РНК и размножаются путем роста и деления. Их клеточная мембрана ни на одном этапе жизненного цикла не разрушается, и, более того, они имеют свой собственный аппарат, при помощи которого они синтезируют белок.

ВИРУСЫ БАКТЕРИЙ (ФАГИ) — ОЧЕНЬ УДОБНЫЙ ОБЪЕКТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выше мы уже отмечали, что с точки зрения генетики самые интересные вирусы — это вирусы бактерий. Открытие бактериофагов (в 1914 г.) вызвало поначалу большую сенсацию, так как возникла надежда, что благодаря им будет найден эффективный и простой путь борьбы с инфекционными болезнями. К сожалению, эта надежда не оправдалась. Выяснилось, что бактерии в результате мутаций быстро приобретают устойчивость к фагам. После этого интерес к фагам почти повсеместно угас, и никто вплоть до 1930-х годов не занимался механизмом их размножения. В кон-

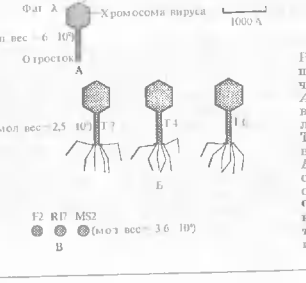


Рис. 7.8. Некоторые вирусы бактерий, играющие важную роль в исследованиях по химической генетике.
А. Фаг λ. Этот фаг, размножающийся в клетках *E. coli*, изучен лучше всех других лизогенизирующих вирусов. *Б.* Фаги Т2, Т4 и Т6. Эти морфологически идентичные вирусы (также размножающиеся в клетках *E. coli*) близки между собой и в генетическом отношении. Среди современных генетических объектов они изучены наиболее полно. *В.* Фаги F2, R17 и MS2. Это группа самых мелких вирусов *E. coli*. Они стали известны только в последние годы, но изучение их подвигается очень быстрыми темпами.

це 30-х годов небольшая группа биологов и физиков, заинтересовавшихся проблемой воспроизведения генов, начала изучать процесс размножения некоторых фагов *E. coli*. Этот объект был избран потому, что работать в лаборатории с бактериальными клетками значительно проще, чем с растительными или животными.

Почти вся работа велась с ограниченным числом фагов, получивших произвольные обозначения, например Т1, Т2, Р1, F2 и λ (рис. 7-8). К настоящему времени наиболее хорошо изучены среди них родственные штаммы Т2, Т4, Т6 и λ. Механизм размножения этих фагов в общих чертах одинаков. Жизненный цикл фага начинается в момент соприкосновения фаговой частицы с чувствительной клеткой. Фаг прикрепляется своим отростком к клеточной оболочке. С помощью фермента, который имеется в отростке, он разрушает небольшой участок клеточной стенки и через образовавшееся маленькое отверстие вводит свою хромосому в клетку. Здесь хромосома удваивается, дочерние хромосомы в свою очередь также удваиваются, и это продолжается до тех пор, пока не образуется от 100 до 1000 новых хромосом. Новообразованные хромосомы фага одеваются в защитные оболочки (тоже новообразованные), так что сразу возникает большое количество вполне сформировавшихся фаговых частиц. Жизненный цикл заканчивается распадом (*лизисом*) бактериальной клетки и выходом фаговых частиц в окружающую среду.

ФАГИ ОБРАЗУЮТ СТЕРИЛЬНЫЕ ПЯТНА

Присутствие жизнеспособных фаговых частиц легко обнаружить, вылив раствор, содержащий данный вирус, на поверхность плотной питательной среды, на которой быстро размножаются чувствительные к этому вирусу бактерии. Если раствор не содержит вирусных частиц, то бактерии, размножаясь, быстро образуют на поверхности среды сплошной слой (газон бактерий). Но если в растворе присутствует хотя бы одна вирусная частица, то она прикрепится к какой-нибудь бактериальной клетке, проникнет в нее и начнет в ней размножаться. Через 15—60 мин после заражения наступит лизис и из разрушенной клетки выйдет наружу потомство вируса — несколько сотен новых вирусных частиц. Каждая из них способна

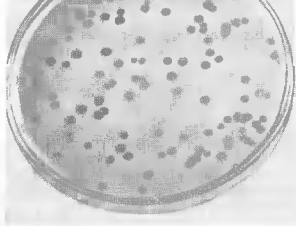


Рис. 7-9. Стерильные пятна фага Т2 на газоне *E. coli*, растущем на чашке Петри (Stent, Molecular Biology of Bacterial Viruses, Freeman, San Francisco, 1963, p. 41).

проделать то же самое. После ряда таких циклов все бактериальные клетки, находившиеся поблизости от первой зараженной клетки, будут убиты и образуется так называемое *стерильное пятно*. В зоне пятна все клетки разрушены, и потому на газоне живых бактерий такие пятна выглядят как небольшие дырки (рис. 7-9).

ХРОМОСОМЫ ВИРУСОВ ИНОГДА ВКЛЮЧАЮТСЯ В ХРОМОСОМУ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА

Не все вирусы бактерий (например, фаг λ), проникнув в клетку, начинают в ней размножаться; иногда вместо них хромосома включается в определенный участок хромосомы бактерий. В дальнейшем она ведет себя во всех отношениях уже просто как часть бактериальной хромосомы, удваиваясь вместе с этой последней перед каждым клеточным делением (рис. 7-10). Вирусную хромосому, включившуюся в хромосому клетки, называют *профагом*; бактерии, несущие профаг,— *лизогенными бактериями*, а вирусы, хромосомы которых способны включаться в хромосому клетки,— *лизогенизирующими вирусами* в отличие от *лизирующих*, которые, проникнув в клетку, всегда размножаются в ней. Часто трудно бывает определить, с какой бактерией мы имеем дело — лизогенной или нелизогенной. С уверенностью судить об этом можно лишь после того, как хромосома вируса выйдет из интегрированного состояния и начнется процесс размножения вируса, который в конце концов приведет к появлению новых вирусных частиц. В чем причина того, что лишь некоторые вирусы способны вступать в лизогенную ассоциацию, и какое преимущество обеспечивает им такая ассоциация — на эти вопросы мы пока не имеем ответа.

До недавнего времени совершенно неизвестным оставался и механизм перехода вирусной хромосомы в состояние профага. Теперь получены убедительные генетические данные, которые показывают, что включение вирусной хромосомы в бактериальную происходит путем кроссинговера между хромосомой бактерии-хозяина и *кольцевой* хромосомой вируса. Непосредственно перед включением хромосома вируса принимает кольцевую форму и прикрепляется к совершенно определенному участку хромосомы бактерии. После этого обе хромосомы разрываются и концы их соединяются крест-накрест, в результате чего профаг оказывается включенным в хромосому клетки-хозяина (рис. 7-11). Освобождение профага происходит обратным путем: во время кроссинговера два конца профага соединяются и он отделяется от хромосомы бактерии. После этого свободный вирусный геном начинает размножаться точно так же, как это делает геном любого лизирующего вируса.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛОВОГО ПРОЦЕССА ДЛЯ СОСТАВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КАРТЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ХРОМОСОМЫ

У многих организмов, очень широко используемых для изучения механизма репликации и действия генов, не существует мейоза в его типичной форме. Когда у бактерий был впервые открыт половой процесс, естественно было предположить, что и у них он протекает, как обычно, т. е. путем слияния двух половых клеток с последующим расхождением генетических детерминантов во время мейоза. Однако теперь мы знаем, что жизненный цикл *E. coli* имеет ряд особенностей, которые осложняют генетический анализ у этого организма. Осложнения связаны именно с природой полового процесса. У *E. coli*, как и у высших организмов, имеются

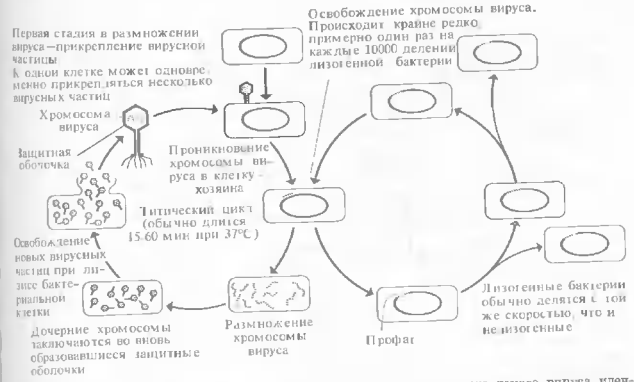


Рис. 7-10. Жизненный цикл лизогенизирующего вируса бактерии.
После проникновения хромосомы вируса в клетку-хозяина эта хромосома в одних случаях начинает немедленно размножаться, подобно лизирующему вирусу, а в других — переходит в состояние профага. Литическая фаза жизненного цикла такого вируса идентична полному жизненному циклу лизирующего вируса. Лизирующие вирусы бактерий называются так потому, что их размножение приводит к разрыву (лизису) бактериальной клетки.

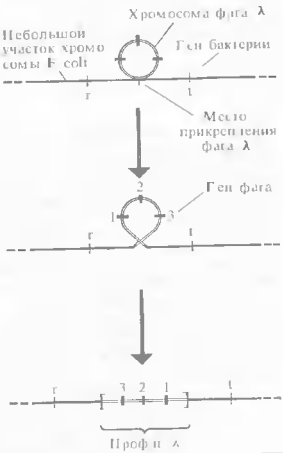


Рис. 7-11. Включение хромосомы фага λ в хромосому *E. coli* путем кроссинговера

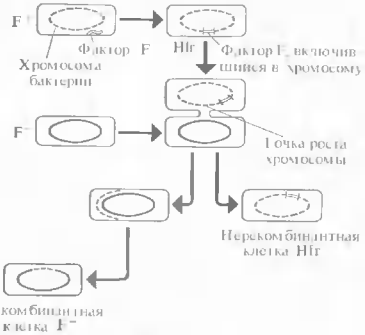


Рис. 7.12. Половой процесс у *E. coli*.
Примитивный половой процесс, имеющийся у *E. coli*, сводится к переносу хромосомы из мужской клетки в женскую. После того как фактор F прикрепится к мужской хромосоме, мужская клетка, превратившаяся теперь в клетку Hfr, может перенести свою хромосому в женскую клетку. Когда клетки Hfr и F− соединятся между собой мостиком, хромосома Hfr разрывается и начинает удваиваться в точке внедрения фактора F. Свободный конец одного из дочерних сегментов хромосомы Hfr начинает перетекать в клетку F− При 37° С для переноса всей хромосомы требуется около 90 мин, однако обычно клетки расходятся еще до того, как вся хромосома успеет перейти. Фактор F по большей части не передается, так как он всегда располагается на дистальном конце хромосомы, который переносится крайне редко. Затем между генетическим материалом донора и хромосомой F− происходит кроссинговер. Гаплоидное состояние восстанавливается путем элиминации избыточных генов, которые не вошли в состав полных хромосом. Обнаружение рекомбинантов (которые учитываются по присутствию различных Hfr- и F−-генов) дает возможность составлять генетические карты.

мужские и женские клетки. Половой процесс начинается с того, что мужская и женская клетки соединяются при помощи тонкого мостика (рис. 7.12). По этому мостику хромосома мужской клетки начинает переходить в женскую клетку. Обычно всей хромосоме не удается перейти; конъюгация прерывается и клетки расходятся еще до того, как завершится переход. Поэтому у *E. coli* настоящие диплоидные клетки образуются очень редко; по большей части дело ограничивается появлением частичных диплоидов. В таких частично диплоидных клетках может происходить кроссинговер между женской хромосомой и мужской хромосомой (или чаще ее фрагментом). Процесс завершается клеточным делением и образованием гаплоидных потомков.

Половые различия между мужской и женской клетками определяются присутствием особого генетического фактора, так называемого *полового фактора*, или фактора F (от англ. fertility — плодовитость). Этот фактор присутствует в мужских клетках (клетки F^+) и отсутствует в женских клетках (клетки F^-). Половой фактор может существовать в двух взаимоисключающих состояниях: либо как составная часть хромосомы *E. coli*, либо как очень маленькая свободная кольцевая хромосома, удваивающаяся при каждом клеточном делении. Во втором случае клетки F^+ лишь потенциально являются мужскими, так как они не могут внести свою хромосому

в клетки F^-, чтобы это было возможным, фактор F должен быть включен в бактериальную хромосому. Клетки, содержащие такой интегрированный фактор F, называют клетками Hfr (от англ. high frequency of recombination — высокая частота рекомбинаций).

Существует ряд штаммов Hfr, отличающихся друг от друга положением фактора F на хромосоме. До недавнего времени у нас не было никакой правдоподобной гипотезы относительно включения фактора F в хромосому. Поверхностные данные позволяют предположить, что фактор F, точно так же как хромосома лизогенизирующих фагов, имеет кольцевую форму и включается в хромосому бактерии путем кроссинговера.

Фактор F и хромосомы лизогенизирующих фагов относятся к группе так называемых *эписом*. Эписома — это такая генетическая частица, которая может существовать в двух состояниях — автономном и интегрированном. Наличие эписом доказано пока только у бактерий; однако некоторые данные позволяют предположить, что животные и высшие растения тоже имеют эписомы.

Первоначально казалось, что неполный перенос мужской хромосомы в женскую клетку осложняет генетический анализ у бактерий. Однако вскоре выяснилось одно важное обстоятельство. Оказалось, что первым входит в женскую клетку всегда один и тот же конец мужской хромосомы (строго определенный для каждого штамма Hfr) и что чем ближе тот или иной ген мужской клетки к этому концу, тем чаще он включается в рекомбинантную хромосому. Конъюгацию можно прерывать искусственно в любой намеченный момент (для этого клетки встряхивают в смесителе Уорринга). Если прервать ее достаточно рано, то окажется, что в женскую клетку успели проникнуть только гены, находящиеся у самого переднего конца мужской хромосомы. Эти опыты дают возможность определять положение генов на хромосоме *E. coli* по времени, необходимому для того, чтобы соответствующие мужские аллели проникли в женскую клетку.

ХРОМОСОМЫ БАКТЕРИЙ ИМЕЮТ КОЛЬЦЕВОЕ СТРОЕНИЕ

Генетическая карта, на которой расстояния выражены в единицах времени, совпадает с картой, составленной путем измерения частот рекомбинаций. Оказалось, что гены бактерий (табл. 7-1) располагаются линейно и в этом отношении напоминают гены высших организмов. Однако есть и одно важное отличие: генетическая карта *E. coli* замкнута, т. е. имеет форму кольца (фиг. 7-13). Для того чтобы мужская хромосома могла начать переходить в женскую клетку, в определенной ее точке должен произойти разрыв. Если бы место разрыва не было строго предопределено, то мы не наблюдали бы у данного штамма всегда одну и ту же последовательность в передаче мужских генов. В то же время у разных штаммов места разрыва не совпадают. Это объясняется тем, что разрыв происходит всегда в той точке, где в хромосому включен фактор F. Известен, например, штамм Hfr, который в первую очередь передает в женскую клетку гены, ответственные за синтез треонина и лейцина, и штамм, у которого первым передается ген, контролирующий синтез метионина. Существование многочисленных штаммов Hfr с разными точками разрыва сыграло очень большую роль в локализации генов *E. coli*. Если бы у всех штаммов разрыв происходил в одной и той же точке, то вряд ли можно было бы вообще локализовать те гены, которые должны были бы передаваться последними (так как вся хромосома целиком передается чрезвычайно редко).

Мы мало знаем о природе сил, под действием которых мужская хромосома переходит в женскую клетку. Имеются косвенные данные, говорящие в пользу того, что этот процесс может быть связан с удвоением хромосомы. Если это так, то мужская хромосома не просто разрывается и начинает

Таблица 7.1 Ключ к генетической карте хромосомы *E. coli* [1])

Генетический символ	Мутантный признак	Затронутые ферменты и реакции
ara D *ara A* *ara B* *ara C*	Неспособность использовать арабинозу в качестве источника углерода	L-рибулозо-5-фосфат-4-эпимераза L-арабинозоизомераза L-рибулокиназа
arg B *arg C* *arg H* *arg G* *arg A* *arg D* *arg E* *arg F*	Потребность в аргинине	N-ацетилглутамат-синтетаза N-ацетил-γ-глутамокиназа Дегидрогеназа полуальдегида N-ацетил-γ-глутаминовой кислоты Ацетилорнитин-δ-трансаминаза Ацетилорнитиназа Орнитинтранскарбамилаза Синтетаза аргининянтарной кислоты Аргининосукциназа
aro A, B, C *aro D*	Потребность в некоторых ароматических аминокислотах и витаминах	Превращение шикимовой кислоты в 3-енолпируилшикимат-5-фосфат Биосинтез шикимовой кислоты
azi	Устойчивость к азиду натрия	
bio	Потребность в биотине	
cys A *cys B* *cys C*	Потребность в цистеине	Превращение 3-фосфоаденозин-5-фосфосульфата и сульфид Превращение сульфата в сульфид, 4 известных фермента
dap A *dap B*	Потребность в диаминопимелиновой кислоте (компонент клеточной оболочки)	Синтетаза дигидродипиколиновой кислоты Десацилаза N-сукцинилдиаминопимелиновой кислоты
dap+hom	Потребность в гомосерине и диаминопимелиновой кислоте	Дегидрогеназа полуальдегида аспарагиновой кислоты
Dsd	Неспособность использовать D-серин в качестве источника азота	Дезаминаза D-серина
fla	Отсутствие жгутиков	
gal A *gal B* *gal D*	Неспособность использовать галактозу в качестве источника углерода	Галактокиназа Галактозо-1-фосфат-уридилтрансферза Уридин-дифосфогалактозо-4-эпимераза
gua	Потребность в гуанине	
H	Присутствие H-антигена	
his	Потребность в гистидине	10 известных ферментов [2])
ile	Потребность в изолейцине	Треонидезаминаза
ilv A *ilv B* *ilv C*	Потребность в изолейцине и валине	α-Окси-β-кето-ректоизомераза Дегидраза α, β-диоксиизовалерьяновой кислоты [2]) Трансаминаза B
ind (индол)	Неспособность использовать триптофан в качестве источника углерода	Триптофаназа
λ	Хромосомная область, в которую обычно включается профаг	
lac Y	Неспособность поглощать β-галактозиды	Галактозидпермеаза
lac Z	Неспособность использовать лактозу в качестве источника углерода	β-Галактозидаза

Продолжение табл. 7-1

Генетический символ	Мутантный признак	Затронутые ферменты и реакции
lac O	Конститутивный синтез белков лактозного оперона (гл. 14)	Оператор
leu	Потребность в лейцине	3 известных фермента[2])
lon (удлиненная форма)	Образование нитей и чувствительность к облучению нарушены	
ps	Потребность в лизине	Декарбоксилаза диаминопимелиновой кислоты
lys+met	Потребность в лизине и метионине	
λ rec, mal A	Устойчивость к фагу λ и неспособность использовать мальтозу	Рецептор фага λ пермеаза мальтозы
mal B	Неспособность использовать мальтозу в качестве источника углерода	Амидомальтаза (?)
met A *met B* *met F* *met E*	Потребность в метионине	Синтез эфира гомосерина и янтарной кислоты Синтез цистатионина Редуктаза 5, 10-метилентетрагидрофолата
mtl	Неспособность использовать маннит в качестве источника углерода	Маннитдегидрогеназа (?)
muc	Образование мукоидных колоний	Регуляции синтеза капсульных полисахаридов
O	Имеется О-антиген	
pan	Потребность в пантотеновой кислоте	
phe A, B	Потребность в фенилаланине	
pho	Неспособность использовать эфиры фосфорной кислоты	Щелочная фосфатаза
pl	Клеточная оболочка имеет пили (пили)	
pro A *pro B* *pro C*	Потребность в пролине	
pur A	Потребность в определенных пуринах	Аденилосукцинатсинтетаза
pur B		Аденилосукциназа
pur C, E		5-аминоимидазолрибонуклеотид → 5-аминоимидазол-4-(N-сукцинокарбоксимид)-рибонуклеотид
pur D		Биосинтез 5-аминоимидазолрибонуклеотида
pyr A	Потребность в урациле и аргинине	Карбаматкиназа
pyr B	Потребность в урациле	Аспартаттранскарбамилаза
pyr C		Дигидроороташа
pyr D		Дегидрогеназа дигидроороговой кислоты
pyr E		Пирофосфорилаза оротидиловой кислоты
pyr F		Декарбоксилаза оротидиловой кислоты
R arg	Конститутивный синтез аргинина (гл. 14)	Репрессор ферментов биосинтеза аргинина
R gal	Конститутивный синтез галактозы	Репрессор ферментов биосинтеза галактозы
R1 pho R2 pho	Конститутивный синтез фосфатазы	Репрессор щелочной фосфатазы

Продолжение табл. 7.1

Генетический символ	Мутантный признак	Затронутые ферменты и реакции
R try	Конститутивный синтез триптофана	Репрессор ферментов биосинтеза триптофана
RC (регуляция синтеза)	Неконтролируемый синтез РНК	
rha	Неспособность использовать рамнозу в качестве источника углерода	
ser A *ser B*	Потребность в серине	3-фосфоглицератдегидрогеназа; фосфосеринфосфатаза
str	Устойчивость к стрептомицину или зависимость от него	
suc	Потребность в янтарной кислоте	
T1, T5 rec	Устойчивость к фагам T1 и T5 (мутанты B/1.5)	Отсутствуют рецепторы для фагов T1 и T5
T1 rec	Устойчивость к фагу T1 (мутанты B/1)	Отсутствует рецептор для фага T1
T6, colK rec	Устойчивость к фагу T6 и колицину K	Отсутствуют рецепторы для фага T6 и колицина
T4 rec	Устойчивость к фагу T4 (мутанты B/4)	Отсутствуют рецепторы для фага T4
thi	Потребность в тиамине	
thr	Потребность в треонине	
thy	Потребность в тимине	Тимидилатсинтетаза
trp A	Потребность в триптофане	Триптофансинтетаза (белок A)
trp B		Триптофансинтетаза (белок B)
trp C		Индол-3-глицерофосфатсинтетаза
trp D		Фосфорибозилантранилаттрансфераза
trp E		Антранилатсинтетаза
tyr	Потребность в тирозине	
uvr A	Устойчивость к ультрафиолетовым лучам	Повреждения, возникшие в ДНК под влиянием облучения, восстанавливаются
xyl	Неспособность использовать ксилозу в качестве источника углерода	

[1]) Каждый ген или группа генов обозначены принятыми символами. Указаны мутантные признаки и (тем, где это известно) затронутые мутацией ферменты и реакции.
[2]) Указаны ферменты, контролируемые гомологичным геном у *Salmonella typhimurium*.

переходить в женскую клетку. Можно думать, что разрыв инициирует цикл репликации хромосомы и что в женскую клетку переносится по мере образования одна из двух дочерних хромосом. Перенос хромосомы может, таким образом, сопутствовать синтезу новой хромосомы (целой или фрагмента).

Биологическое значение такого кольцевого строения бактериальной хромосомы пока еще совершенно не ясно. Кольцевое строение имеют и ви-

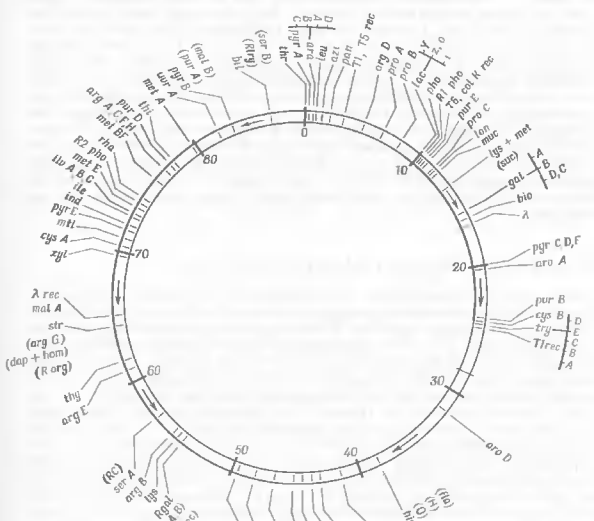


Рис. 7-13. Генетическая карта *E. coli*.
Символы указывают локализацию генов (значение символов см. в табл. 7-1). Символы в скобках относятся к тем генам, локализация которых установлена в настоящее время лишь приблизительно. Числа, разделяющие карту на интервалы времени, соответствуют времени (в минутах), необходимому для проникновения соответствующего сегмента мужской хромосомы в женскую клетку. Для полного переноса хромосомы требуется, как предполагают, около 89 мин. Стрелками отмечены точки, в которых происходит разрыв различных Hfr-хромосом до начала переноса в женскую клетку; направление стрелок указывает направление переноса (Taylor, Thoman, Genetics, 50, 667, 1964).

русные хромосомы, так что *E. coli* в этом смысле не составляет исключения. Мы еще вернемся к этому вопросу, когда познакомимся более подробно с химическим строением хромосом.

ПЛАЗМИДЫ

Помимо половых факторов, несущих гены, которые непосредственно участвуют в половом процессе, большинство бактерий содержит также и другие кольцевые хромосомные элементы, реплицирующиеся независимо от бактериальной хромосомы. Все они называются *плазмидами* в отличие

от *эписом* — генетических элементов (подобных половым факторам), которые постоянно включаются в основную бактериальную хромосому и исключаются из нее. Размеры плазмид необычайно широко варьируют: молекулярный вес некоторых из них не превышает $1 \cdot 10^6$ (они содержат всего 1—3 гена), в то время как размер других достигает 10—20% размера основной хромосомы. К наиболее обычным независимым плазмидам относятся многие *факторы переноса устойчивости* (RTF), обеспечивающие множественную устойчивость бактерий к ряду различных антибиотиков (например, к ампициллину, стрептомицину и тетрациклину). Многие из этих плазмид присутствуют в клетке во множестве копий (от 10 до 50) и удваиваются независимо от основной хромосомы. Автономно реплицирующиеся плазмиды способны обеспечить, по-видимому, наиболее эффективный способ увеличения числа генов, сообщающих клетке устойчивость к антибиотикам.

ФАГИ ИНОГДА ПЕРЕНОСЯТ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ГЕНЫ

Конъюгация не единственный способ передачи генетического материала. Гены могут переноситься из одной бактериальной клетки в другую фагами. Такой перенос носит название *трансдукции*. Трансдукция оказывается возможной, если в процессе размножения фага одна из частиц случайно захватит какой-то фрагмент хромосомы клетки-хозяина (обычно очень небольшой, менее 1—2%). Подобные частицы по большей части биологически неактивны, так как их собственная хромосома неполноценна или даже отсутствует вообще. Однако если *трансдуцирующий фаг* прикрепляется к какой-нибудь бактериальной клетке, то он впрыскивает в нее захваченный ранее фрагмент. Попав в клетку, этот фрагмент может оказаться вовлеченным в кроссинговер с клеточной хромосомой. Если трансдуцирующий фаг выращивался на одном бактериальном штамме, а затем инфицировал другой, то генотип инфицированного штамма в результате такого кроссинговера может измениться (рис. 7-14). Допустим, что у нас имеется препарат фага P1, выращенный на штамме *E. coli*, который сбраживает лактозу, и что некоторые частицы в этом препарате несут бактериальный ген lac^+ (этим символом обозначается ген, контроли-

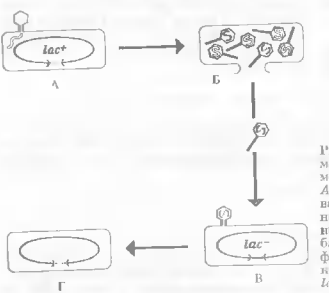


Рис. 7-14. Пассивный перенос генетического материала от одной бактерии к другой с помощью фага-переносчика (трансдукция).
А. Заражение *E. coli* фагом P1. *Б.* Образование большого числа полноценных вирусных частиц и некоторого количества дефектных частиц, несущих небольшой фрагмент бактериальной хромосомы. *В.* Прикрепление фага P1, трансдуцирующего фрагмент lac^+, к клетке lac^- *E. coli*. *Г.* Включение фрагмента lac^+ в хромосому клетки путем кроссинговера.

рующий сбраживание лактозы). Если теперь этим фагом инфицировать штамм, лишенный способности сбраживать лактозу (штамм lac$^-$), то некоторая доля бактерий lac$^-$ перейдет в форму lac$^+$ в результате генетической рекомбинации.

Трансдукция — очень редкое явление, и потому естественно было бы думать, что вряд ли ее можно использовать для изучения структуры хромосом. Между тем она оказывается чрезвычайно полезной, когда нужно ответить на вопрос, насколько близко друг к другу находятся какие-либо два гена и в каком порядке они располагаются. Дело в том, что одна трансдуцирующая фаговая частица может захватить лишь очень небольшое число бактериальных генов и, следовательно, трансдуцироваться совместно могут только гены, расположенные близко друг к другу. Определяя относительную частоту совместной трансдукции каких-либо генов, мы вместе с тем можем очень точно определить и относительное расположение этих генов.

ПЕРЕНОС ОЧИЩЕННОГО ХРОМОСОМНОГО МАТЕРИАЛА

Генетическая рекомбинация, происходящая после введения в клетку очищенного хромосомного материала (ДНК), получила название *трансформации*. Именно это явление позволило осуществить идентификацию генетического материала, т. е. установить, что таким материалом является ДНК. Трансформация была открыта в 1928 г. в опытах с бактериями *Diplococcus pneumoniae* (возбудители пневмонии). Наблюдения показали, что если к убитым нагреванием клеткам патогенного штамма пневмококков добавить суспензию живых клеток непатогенного штамма, то некоторые из живых клеток превратятся в патогенные. Наследственная природа этого превращения была доказана в последующих опытах с потомками трансформированных клеток. Оказалось, что и они в свою очередь обладают способностью превращать непатогенные клетки в патогенные. Опыты эти навели на мысль, что хромосомы патогенных клеток, убитых нагреванием (теперь мы знаем, что это ДНК), не распадаются, а высвобождаясь из мертвых клеток, могут проникать через клеточную стенку в живые клетки и вступать в генетическую рекомбинацию с хромосомами этих последних (рис. 7-15).

Дальнейшие исследования полностью подтвердили это генетическое истолкование явления трансформации. Было показано, что патогенность определяется присутствием гена *S* (от англ. smooth — гладкий), который контролирует химический состав клеточной стенки и определяет ее способность к образованию полисахаридной капсулы. Если вместо гена *S* в клетке присутствует его аллель *R* (от англ. rough — шероховатый), то капсула не образуется и клетка не обладает патогенностью.

Таким образом, в первых опытах наблюдалась трансформация только одного признака — химического состава капсулы. Теперь мы знаем, что любой ген может быть изменен путем введения в клетку очищенного хромосомного материала. Явление трансформации тоже можно использовать для определения того, насколько тесно сцеплены гены, так как фрагменты хромосом, передающихся этим путем, обычно весьма невелики. Однако у большинства бактерий вызвать трансформацию очень трудно, и это до сих пор ограничивало применимость данного метода при решении генетических проблем. У *E. coli*, например, наилучшие результаты при локализации генов дает трансдукция, а не трансформация. Но есть и исключения: в опытах с *Bacillus subtilis* используют трансформацию, так как для этой бактерии не найдено трансдуцирующих фагов.

После того как трансформация была обнаружена у бактерий, много предположений высказывалось по поводу возможности трансформации

Рис. 7-15. Трансформация определенного генетического признака бактериальной клетки (*Diplococcus pneumoniae*) после добавления убитых клеток другого, генетически отличного штамма.
Показана R-клетка, которая получает хромосомный фрагмент, содержащий ген *S*. В действительности большая часть клеток получает какие-нибудь другие фрагменты хромосомы, так что эффективность трансформации по данному гену обычно составляет менее 1%.

у других организмов, особенно у млекопитающих, и в частности у человека. Однако до сих пор все исследования давали отрицательный результат, если не считать некоторых особых случаев, когда введение хромосомы вируса превращало нормальные клетки в раковые. Впрочем, здесь мы, по-видимому, имеем дело не с изменением какого-то уже существующего гена, а с эффектом введения совершенно нового генетического материала.

Как бы то ни было, но мы пока не в состоянии ответить на вопрос, применим ли этот тип генетического анализа к высшим организмам; экспериментальные данные для этого недостаточны.

ФАГИ ТОЖЕ МУТИРУЮТ

Стерильные пятна, которые образуют дикий тип фага, весьма характерны, так что по этому признаку его легко отличить от других, генетически не родственных фагов. Так, например, стерильные пятна фага T2 легко узнать среди пятен, образованных фагом λ или фагом F2. Еще важнее то обстоятельство, что морфология стерильных пятен может изменяться в результате мутации. Биохимическая основа этих различий нам еще не известна, но это не имеет значения; главное, что эти различия всегда воспроизводятся и что их легко уловить. Просматривая тысячи стерильных пятен, мы всегда можем проверить, нет ли среди них пятна, отличающегося по своей морфологии от пятна дикого типа. Таким путем удалось обнаружить большое число мутантных фагов (рис. 7-16) с измененной морфологией мутантных пятен.

Еще один класс составляют мутации, влияющие на способность фага прикрепляться к бактерии-хозяину. Дикий тип фага T2 не может размножаться в клетках *E. coli* B/2, так как он не может к ним прикрепиться (это объясняется тем, что у клеток штамма B/2 в результате мутации поверхность изменена). Однако существуют мутанты фага T2 (их обозначают символом T2h), способные размножаться на штамме B/2. Эти мутанты могут прикрепляться к клеткам B/2, так как мутация соответствующим образом изменила у них орган прикрепления (нити отростка).

Известен большой и очень важный класс мутантов, которые могут размножаться при 28° С, но не размножаются при 42° С. Мутация, обусловливающая такую чувствительность к температуре, принадлежит к ка-

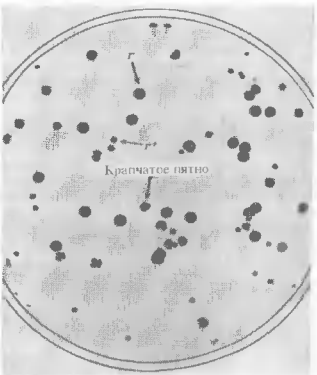


Рис. 7-16. Стерильные пятна, образованные мутантным фагом.
Видны стерильные пятна дикого типа T2r⁺ и вариантные T2r (быстро лизирующий мутант). Появление крапчатых стерильных пятен обусловлено совместным размножением фагов с двумя разными генотипами (r⁺ и r) в одном и том же инфекционном центре (*Stent*, Molecular Biology of Bacterial Viruses, Freeman, San Francisco, 1963, p. 177).

тегории *условных леталей*. Мы пока еще не знаем точной причины того, почему эти фаги не размножаются при высоких температурах; можно только предполагать, что высокая температура нарушает трехмерную структуру какого-то белка, необходимого для их репродукции. Этот тип мутаций стал объектом интенсивного изучения в силу того, что большое число вирусных генов мутирует к температурочувствительной форме. Когда мы выделяем какой-нибудь мутант, неспособный размножаться при высокой температуре, трудно сказать, где локализуется мутация: она может оказаться в любом из многих различных генов.

Существование условно летальных мутаций дало возможность генетикам найти мутантные формы почти для всех генов фагов λ и Т4. Хотя генетическая рекомбинация у фагов была обнаружена только в 1945 г., фаг Т4 можно считать сейчас, пожалуй, наиболее хорошо изученным генетическим объектом.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СКРЕЩИВАНИЯ МЕЖДУ ФАГАМИ

В одной бактериальной клетке может размножаться несколько фагов. Если к одной клетке прикрепится одновременно несколько фаговых частиц, то каждая из них введет в клетку свою хромосому и в клетке образуется большое число копий этих различных хромосом. До тех пор пока хромосомы существуют в свободном состоянии (т. е. пока они не заключены в защитную оболочку), между ними может происходить кроссинговер (рис. 7-47). Это можно показать, заразив клетки одновременно двумя или несколькими фагами с разными генотипами. В потомстве фагов при таком скрещивании обнаружатся рекомбинантные типы. Легко, например, получить мутант фага Т4, отличающийся от дикого типа двумя мутациями: первая из них затрагивает ген h, благодаря чему мутант может размножаться на *E. coli* B 4 (штамм бактерии, устойчивый к фагу дикого типа), а вторая — ген r, вследствие чего мутант образует более крупные и более светлые стерильные пятна, нежели фаг дикого типа. Этот двойной мутант обозначают через Т4hr, а фаг дикого типа через Т4h$^+$r$^+$. Если клетки *E. coli* заразить одновременно обоими фагами Т4h$^+$r$^+$ и Т4hr, то в потомстве обнаружатся четыре типа частиц: с родительскими генотипами (h$^+$r$^+$ и hr) и с рекомбинантными генотипами (hr$^+$ и h$^+$r) (рис. 7-48).

Частота рекомбинаций зависит от природы мутантов, участвовавших в скрещивании. Для некоторых пар маркеров частота рекомбинации достигает почти 50%, для других она ниже 50%, а в ряде случаев рекомбинаций вообще не удается получить. Это позволяет считать, что генетическая карта вирусов также не имеет разветвлений. Действительно, генетический анализ большого числа независимо полученных мутантов полностью подтвердил такое заключение. Из всех известных нам генетических карт лучше всего изучена сейчас генетическая карта фага Т4 (рис. 7-49). Она тоже замкнута в форме кольца, как и у *E. coli*. Мы не знаем, у всех ли вирусов хромосома имеет форму кольца. Однако некоторые косвенные данные позволяют думать, что это именно так в ряде случаев там, где ранее предполагалось наличие линейной структуры, на самом деле структура оказалась замкнутой, кольцевой.

ПРИ СКРЕЩИВАНИИ ВИРУСОВ ПРОИСХОДЯТ МНОГОКРАТНЫЕ СПАРИВАНИЯ

Итак, мы убедились в том, что по своей структуре хромосома вируса существенно не отличается от хромосомы клетки. Однако для скрещивания вирусов характерно одно важное отличие, которое следует подчеркнуть.

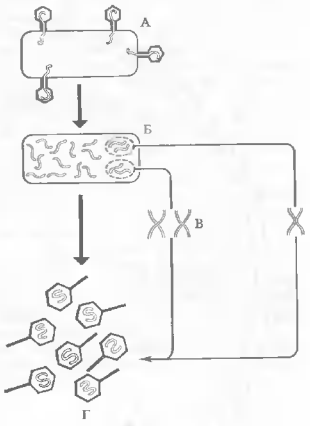


Рис. 7-47. Генетическая рекомбинация между фагами при заражении бактерии несколькими фаговыми частицами, имеющими разный генотип.
А. Несколько вирусных хромосом могут одновременно проникать в клетку-хозяина. *Б*. Каждая вирусная хромосома реплицируется, так что образует много одинаковых копий. *В*. В зараженной клетке происходит кроссинговер между парами одинаковых или разных хромосом. Кроссинговер происходит в тот период, когда хромосомы существуют в свободном состоянии. *Г*. Потомство фага, появляющееся при смешанном заражении, представляет собой конечный продукт целой серии спариваний и кроссинговеров.

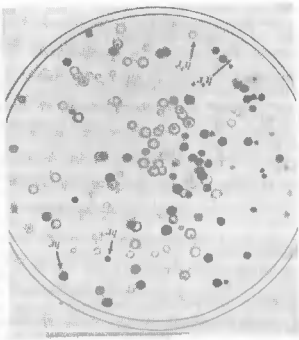


Рис. 7-48. Стерильные пятна, появляющиеся после заражения бактерий фагами T2hr и T2h$^+$r$^+$.
Для обнаружения всех четырех генотипов (hr, h^+r^+, h^+r, hr^+) используется техника посева на смешанный газон штаммов B и B/2. Только фаги, обладающие геном h, могут убивать клетки обоих штаммов, B и B/2. Фаги, несущие ген h^+, убивают только клетки штамма B, и образованные ими стерильные пятна кажутся мутными из-за присутствия живых клеток штамма B/2 (Stent, Molecular Biology of Bacterial Viruses, Freeman, San Francisco, 1963, p. 185).

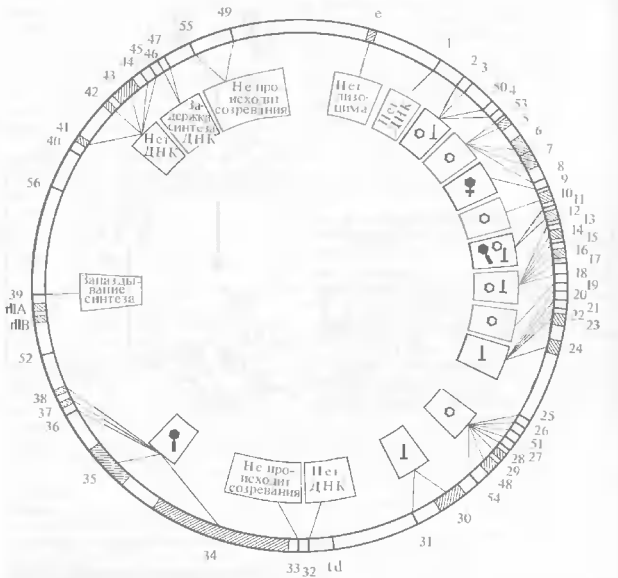


Рис. 7-19. Генетическая карта фага Т4 (Edgar, Epstein, The Genetics of a Bacterial Virus, Sci. Amer., p. 78, February, 1965).
Числами обозначены 56 генов, в которых были локализованы условно летальные мутации. Их существование в качестве отдельных генов было доказано при помощи тестов на комплементацию (гл. 8). Для некоторых генов указана минимальная длина (заштрихованные участки), длина других генов (светлые участки) пока еще не установлена. В квадратиках указан характер мутаций: это либо неспособность синтезировать какое-нибудь вещество, либо отсутствие какого-нибудь компонента вирусной частицы (обнаруженное при электронно-микроскопическом исследовании зараженных клеток). Гены, располагающиеся в левой верхней части схемы, контролируют функции, связанные с первой половиной жизненного цикла фага. Остальные гены функционируют во второй половине жизненного цикла. Как осуществляется такое разделение функций во времени, пока еще не ясно.

При типичном мейозе в клетке каждая хромосома спаривается со своим гомологом только один раз; при скрещивании же вирусов спаривание (а следовательно, и кроссинговер) может происходить многократно на протяжении всего того периода, пока вирусные хромосомы существуют в клетке в свободном состоянии. Таким образом, любая данная хромосома может принять участие в нескольких актах спаривания и кроссинговера. Это легко продемонстрировать, заразив клетку тремя вирусными части-

цами, несущими разные генетические маркеры. В потомстве вирусов обнаружатся отдельные частицы, несущие все три маркера, иными словами, получившие по фрагменту от трех разных хромосом. Следовательно, потомство от скрещивания вирусов представляет собой продукт ряда отдельных актов спаривания и кроссинговера. Частота кроссинговера у разных вирусов очень сильно варьирует: у фага Т4 на каждый цикл размножения приходится 5—10 кроссинговеров, а у фага λ — только 0,5. Множественность кроссинговеров не является препятствием к составлению генетических карт, поскольку общее правило, согласно которому тесно сцепленные гены редко рекомбинируются, остается в силе.

Другое отличие от типичного мейоза состоит в том, что вирусные частицы не подразделяются на мужские и женские. Половую дифференциацию можно рассматривать как средство, обеспечивающее слияние клеток двух генетически различных организмов. Вирусным частицам нет необходимости в таком слиянии; у них генетические рекомбинации происходят всякий раз, как хромосомы двух разных вирусов попадают в одну и ту же клетку-хозяина. В клетке, зараженной несколькими вирусами, кроссинговеры могут происходить как между разными, так и между одинаковыми хромосомами, поэтому только часть кроссинговеров приводит к появлению рекомбинантных хромосом. Доказано, что и при заражении клетки одной вирусной частицей может происходить кроссинговер. Этот кроссинговер, разумеется, нельзя обнаружить методом генетического анализа, так как у всех частиц потомков хромосомы оказываются одинаковыми; продемонстрировать его можно только при помощи вирусов, меченных изотопами (гл. 9).

ВЫВОДЫ

Хромосомы определяют наследственные свойства всех клеток. В них находятся особые генетические факторы, получившие название генов. Гены располагаются в хромосомах в линейном порядке. Каждый ген влияет на какой-нибудь признак клетки строго специфическим образом. Об этом свидетельствуют резкие изменения, которые можно наблюдать в клетках после наследственного изменения структуры генов (т. е. после мутаций). Мутации могут изменить, например, цвет глаз или размеры тела. Спонтанно мутации возникают редко, но частоту их появления можно повысить с помощью некоторых химических веществ или излучения (мутагенные факторы).

Большинство ранних генетических исследований было проведено на больших и сложных диплоидных организмах — растениях и животных. Теперь излюбленным объектом для изучения природы генов и механизма их действия стали гаплоидные организмы, такие, как бактерии и их вирусы (бактериофаги). Их главное преимущество состоит в том, что они легко размножаются в строго определенных лабораторных условиях и обладают очень коротким жизненным циклом.

Мутации, изменяющие у бактерий потребность в факторах роста, а также устойчивость к определенным антибиотикам и вирусам, особенно удобны для изучения, потому что дикий тип можно легко отделить от мутанта. Этим же преимуществом обладают и мутации, влияющие на способность фага размножаться в клетках определенных штаммов бактерий и на его чувствительность к температуре.

Порядок расположения генов на хромосоме определяют, изучая расщепление в генетических скрещиваниях. Рекомбинация аллелей может быть обусловлена как случайным расщеплением хромосом, так и кроссинговером между гомологичными хромосомами. Мы можем определить, как локализуются данные гены — на разных хромосомах или на одной и

той же, ибо в первом случае они распределяются в потомстве случайно (так же, как и хромосомы), а во втором обнаруживают сцепление (>50%). Кроссинговер между гомологичными хромосомами дает возможность определять относительное расположение генов на хромосоме, т. е. составлять хромосомные карты. Чем дальше друг от друга отстоят какие-нибудь два гена, тем чаще между ними кроссинговер. В опытах с тремя маркерами (трехфакторные скрещивания) наиболее редкий тип рекомбинантов возникает в результате двойного кроссинговера; обнаружение этого типа рекомбинантов дает возможность проверить результаты ряда двухфакторных скрещиваний, поставленных с теми же маркерами.

В настоящее время большинство генетических скрещиваний, предпринимаемых для изучения природы генов, проводится на бактериях и фагах, у которых нет мейоза в его типичной форме. При скрещивании бактерий кроссинговеры происходят обычно между интактной хромосомой одной клетки и фрагментом хромосомы другой. Генетические рекомбинации у бактерий могут быть результатом: 1) спаривания мужской и женской клетки (конъюгация), 2) переноса генов бактериальной клетки фагом (трансдукция) или 3) введения в клетку чужеродной ДНК (трансформация). Скрещивания у фагов могут происходить при одновременном заражении бактерии двумя или несколькими фагами с разными генотипами; при этих скрещиваниях циклы спаривания и кроссинговера повторяются много раз. Хотя эти явления несколько затрудняют изучение генетики фагов и бактерий, оно тем не менее подвигается очень успешно, из всех хромосом в настоящее время лучше всего изучены хромосомы *E. coli* и фага T4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Hayes W., The Genetics of Bacteria and Their Viruses: Studies in Basic Genetics and Molecular Biology, 2nd ed., Wiley, New York, 1969. (Имеется перевод 1-го изд.: У. Хэйс, Генетика бактерий и бактериофагов, изд-во «Мир», М., 1965.) Исчерпывающее описание генетических систем вирусов и бактерий, показывающее, каким образом они были использованы при установлении основных принципов молекулярной генетики.

Stent G. S., Molecular Biology of Bacterial Viruses, Freeman, San Francisco, 1963. (Г. Стент, Молекулярная биология вирусов бактерий, изд-во «Мир», 1965.) Немного устаревший, но прекрасный вводный курс к изучению мира бактериофагов.

Adelberg E. A. (ed.), Papers on Bacterial Genetics, 2nd ed., Little, Brown, Boston, 1966. Сборник важнейших статей, в которых рассматривается развитие генетики бактерий.

Stent G. S. (ed.), Papers on Bacterial Viruses, 2nd ed., Little, Brown, Boston, 1965. Сборник статей, способствовавших развитию современных исследований бактериальных вирусов.

Whitehouse H. L. K., Towards an Understanding of the Mechanism of Heredity, 2nd ed., Edward Arnold, London, 1969. Хороший учебник общей генетики, в котором особое внимание уделено кроссинговеру.

Herskowitz I. H., Principles of Genetics, MacMillan, New York, 1973. Великолепный современный учебник.

Goodenough U., Levine R. P., Genetics, Holt, Rinehart and Winston, New York, 1974. Прекрасно иллюстрированный учебник, в котором подробно излагается молекулярная генетика.

Miller J., Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972. (Дж. Миллер, Эксперименты в молекулярной генетике, изд-во «Мир», М., 1976.) Превосходный лабораторный практикум, являющийся одновременно учебником по молекулярной генетике для аспирантов и студентов старших курсов.

Clowes R., «The Molecule of Infectious Drug Resistance», Scientific American, April 1973. Молекулярная биология одной из плазмид, играющих важную роль в медицине.

Meynell G. G., Bacterial Plasmids, MacMillan Press, London; MIT Press, Cambridge, 1973. (Г. Мейнелл, Бактериальные плазмиды, изд-во «Мир», М., 1976.) Учебник повышенного типа, в котором уделено особое внимание генетическим и молекулярным аспектам.

ГЛАВА

8 Структура и функции гена

На протяжении многих лет считалось, что кроссинговер может происходить только между генами, но не в пределах одного гена. Хромосому представляли себе при этом как определенный набор генов, расположенных линейно и удерживаемых вместе каким-то негенетическим материалом, как бусы на нитке. Теперь мы знаем, что это представление совершенно неверно. Дело обстоит, вероятно, как раз наоборот: все кроссинговеры происходят путем разрыва и воссоединения самих генетических молекул. Ошибочное мнение сложилось, видимо, в силу того, что кроссинговер между двумя далеко расположенными участками хромосомы обнаружить значительно легче. Рекомбинация между соседними участками происходит очень редко; чтобы все-таки ее выявить, нужно обследовать очень большое число потомков. Именно по этой причине внутригенную рекомбинацию у высших организмов практически не удавалось наблюдать. Даже у дрозофилы, которую изучали особенно интенсивно, трудно обследовать больше чем 50 000 потомков от одного скрещивания. Между тем новейшие методы позволяют проверять очень быстро миллионы потомков от скрещивания плесневых грибов, дрожжей, бактерий и вирусов. При помощи этих организмов очень легко показать, что кроссинговер может обусловить рекомбинацию генетического материала в пределах одного гена. Каждый ген состоит из ряда различных участков, которые могут мутировать и между которыми может происходить кроссинговер. На этом основывается весьма эффективный метод изучения топологической структуры генов.

ВНУТРИГЕННЫЕ РЕКОМБИНАЦИИ ДАЮТ ВОЗМОЖНОСТЬ СОСТАВЛЯТЬ КАРТЫ ГЕНОВ

Наиболее интересные данные по тонкой структуре гена получены на генах rIIA и rIIB бактериофага T4. Эти лежащие рядом гены влияют на длину жизненного цикла данного фага; поэтому мутации в обоих генах отражаются на величине стерильных пятен, образуемых фагом. Мутации rIIA или rIIB могут сократить жизненный цикл фага T4 в клетке *E. coli*. Обычно клетки, зараженные диким типом фага T4, лизируются и освобождают потомство фага лишь через несколько часов после заражения. Мутанты rII всегда вызывают более быстрый лизис клеток (обозначение r происходит от англ. rapid — быстрый, а цифра II означает, что существуют и другие гены, также обусловливающие быстрый лизис). Из-за ускорения лизиса мутантные стерильные пятна оказываются крупнее, чем пятна дикого типа. Мутанты rII очень удобны для работы еще и тем, что даже среди очень большого числа мутантов легко обнаружить совсем ничтожное число частиц дикого типа. Фаг дикого типа и мутант rII одинаково быстро размножаются в клетках *E. coli* B, но на другом штамме, K12 (λ), способен размножаться (и, значит, образовывать стерильные пятна) только дикий тип; мутант rII на этом штамме не размножается. Если при генети-

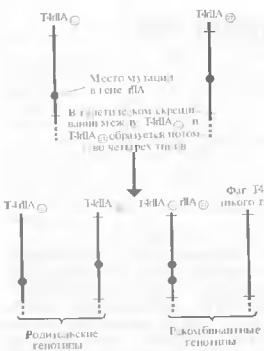


Рис. 8-1. Использование мутаций *T4rII* для демонстрации внутригенного кроссинговера. В результате скрещивания возникает равное число частиц дикого типа и двойных r-рекомбинантов. Рекомбинанты дикого типа обнаруживаются легко, поскольку только они способны образовывать стерильные пятна на газоне штамма K12 (λ). Значительно труднее идентифицировать двойные рекомбинанты rIIA$_B$rIIA$_C$, так как образуемые ими стерильные пятна неотличимы от пятен, образуемых одиночными мутантом. Для обнаружения этих рекомбинантов выделяют большое число потомков с r-фенотипом и скрещивают их с обоими родительскими r-штаммами. Двойные r-мутанты узнают благодаря тому, что они не образуют рекомбинантов дикого типа ни с одним из одиночных r-мутантов.

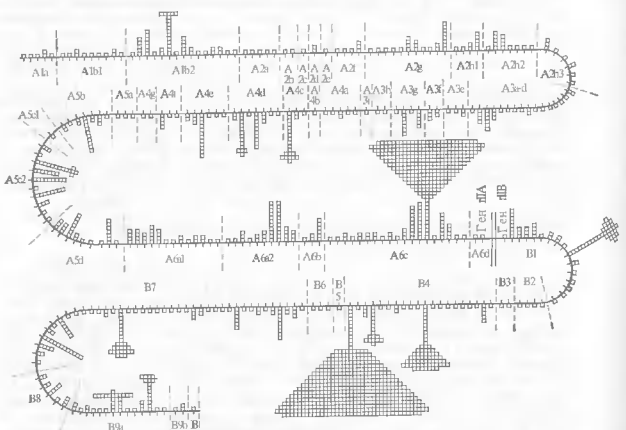


Рис. 8-2. Генетическая карта двух генов (*rIIA* и *rIIB*) фага T4 (Benzer, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 47, 410, 1961).
Эта карта демонстрирует локализацию большого числа различных мутаций в определенных участках гена (*A1a*, *A1b1* и т. д.). Порядок расположения мутаций внутри данного участка в большинстве случаев еще не установлен. Каждый квадратик соответствует одному мутационному событию в данном участке хромосомы. В некоторых участках (так называемые горячие точки) мутации происходят значительно чаще, чем в других.

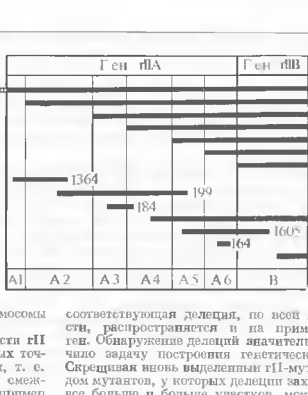


Рис. 8-3. Делеции в области rII хромосомы фага T4.
Около 10% спонтанных мутаций области rII не удается локализовать в определенных точках. Они представляют собой делеции, т. е. результат выпадения большого числа смежных участков. Некоторые делеции, например делеция 1272, захватывают оба гена: rIIA и rIIB. Маленькие светлые прямоугольники (за пределами области *rII*) указывают, что соответствующая делеция, по всей вероятности, распространяется и на примыкающий ген. Обнаружение делеций значительно облегчило задачу построения генетических карт. Скрещивая вновь выделенный rII-мутант с рядом мутантов, у которых делеции захватывают все больше и больше участков, можно очень быстро определить положение новой мутации на генетической карте. На данной карте размеры гена rIIB произвольно уменьшены.

ческом скрещивании двух мутантов rII образуются рекомбинанты дикого типа, то их можно селективно учитывать на штамме K12 (λ), на котором только они будут образовывать стерильные пятна. Таким образом удается легко обнаружить одну частицу дикого типа среди 10^6 частиц.

В общей сложности было выведено и использовано в опытах по скрещиванию свыше двух тысяч независимо возникших мутаций генов rIIA и rIIB. В типичном опыте клетки *E. coli* заражали двумя фаговыми частицами, каждая из которых несла какую-нибудь независимо полученную мутацию rIIA (или rIIB). При размножении частиц происходила генетическая рекомбинация. Потомство фагов испытывали затем на штамме *E. coli* K12 (λ), чтобы выявить рекомбинанты дикого типа. В очень большой доле скрещиваний удавалось обнаружить нормальные фаговые частицы, и это показывает, что рекомбинация действительно происходит *в пределах* данного гена (рис. 8-1). Если бы рекомбинации происходили только *между* генами, то рекомбинанты дикого типа не могли бы возникнуть при скрещивании, в котором оба партнера несли мутации в одном и том же гене. Что касается частот рекомбинаций, то в опытах с разными мутациями был найден широкий спектр величин (точно так же, как и для мутаций в разных генах). Этот разброс величин говорит о том, что некоторые мутации располагаются близко, а другие далеко друг от друга. Локализация мутаций дала возможность составить генетические карты обоих генов rII. Из рассмотрения этих карт вытекают следующие важные выводы:

1. В пределах гена имеется большое число различных участков, способных мутировать (мутирующие участки). Это число для обоих генов (rIIA и rIIB) имеет порядок 1000—1500 (рис. 8-2).

2. Генетические карты обоих генов строго линейны, что указывает на линейность структуры самих генов.

3. Большинство мутаций представляют собой изменения в какомнибудь одном мутирующем участке. Гены, содержащие такие мутации,

могут вновь перейти в исходную форму (т. е. вернуться к дикому типу) в результате второй мутации в том же участке (такая мутация называется *обратной*).

4. Другие мутации обусловливают выпадение значительной области генетической карты. Это результат физической утраты (*делеции*) соответствующей части гена (рис. 8-3). При делециях, захватывающих более одного мутирующего участка, весьма мала вероятность обратной мутации к исходной форме гена.

Аналогичными методами была изучена тонкая структура также и ряда других вирусных и бактериальных генов. Длина генетических карт у разных генов варьирует, и это позволяет думать, что продукты генов неодинаковы по величине. Хотя ни одно из этих исследований не было столь исчерпывающим, как изучение тонкой структуры области *rII*, вывод во всех случаях оказался одним и тем же: все гены содержат очень большое число мутирующих участков и участки эти располагаются строго линейно. Современное определение гена гласит: *ген — это дискретная область хромосомы, ответственная за образование определенного клеточного продукта; он состоит из ряда линейно расположенных единиц, потенциально способных к изменению (мутирующих участков); каждый такой участок может существовать в нескольких альтернативных формах, и между разными участками может происходить кроссинговер.*

ТЕСТ НА КОМПЛЕМЕНТАЦИЮ ПОЗВОЛЯЕТ ОПРЕДЕЛИТЬ ЛОКАЛИЗАЦИЮ ДВУХ МУТАЦИЙ В ПРЕДЕЛАХ ОДНОГО ГЕНА

Поскольку мутации генов rIIA и rIIB имеют одинаковое фенотипическое выражение (увеличение размера стерильных пятен), естественно спросить: почему, собственно, мы говорим о двух генах? Не проще ли рассматривать оба эти участка хромосомы как две части одного и того же гена? Ответ на это прост. Если клетки *E. coli* K12 (λ) заразить одновременно мутантами T4rIIA и T4rIIB, то оба вируса размножатся и дадут потомство (рис. 8-4).

Рис. 8-4. Схема, иллюстрирующая подразделение области *rII* на два различных гена, которые могут дополнять друг друга при смешанном заражении клеток мутантами rIIA и rIIB. *А.* Одновременное заражение клеток *E. coli* K12 (λ) двумя фагами, каждый из которых несет определенную rIIA-мутацию. *Б.* Одновременное заражение клеток *E. coli* K12 (λ) двумя фагами, несущими различные rIIB мутации. *В.* Одновременное заражение клеток *E. coli* K12 (λ) двумя фагами, из которых один несет rIIA-мутацию, а другой rIIB-мутацию. В потомстве фага преобладают частицы с родительскими генотипами (T4rIIA и T4rIIB), не кроме них, есть и небольшое число частиц дикого типа и типа T4rIIArIIB, возникших в результате кроссинговера.

Однако при одновременном заражении таких же клеток двумя различными мутантами T4rIIA или двумя различными мутантами T4rIIB вирусы размножаться не будут. Отсюда прямо следует, что гены rIIA и rIIB выполняют разные функции (каждая из которых необходима для размножения на *E. coli* K12 (λ)).

При заражении только одним мутантом T4rIIA ген rIIB функционирует нормально, но мутантный ген rIIA не образует активного продукта, вследствие чего размножение оказывается невозможным. Совершенно так же обстоит дело и при заражении одним только мутантом T4rIIB. Размножение происходит только при одновременном заражении клеток двумя мутантами, rIIA и rIIB. При этом каждая из мутантных хромосом образует активный продукт, который не может образовать другая. Таким образом, хромосомы дополняют друг друга (или, как говорят, они *комплементируют* друг друга), если мутации находятся в разных генах. В этом и состоит *тест на комплементацию*. (Внутригенный кроссинговер, приводящий к появлению рекомбинантов дикого типа, не мешает постановке этого теста, так как число рекомбинантов дикого типа, возникших вследствие кроссинговера, очень мало; комплементация же разных мутантных генов обеспечивает образование нормального числа потомков.)

Тест на комплементацию с мутантами фага поставить очень легко: для этого достаточно одновременно заразить бактерию двумя разными мутантами, ибо при этом клетка автоматически получает по одной копии каждой мутантной хромосомы. Значительно труднее провести такой тест с нормальной гаплоидной клеткой, например с клеткой *E. coli*. К счастью, определенные генетические приемы (слишком сложные, чтобы описывать их здесь) позволяют получать штаммы, у которых отдельные участки хромосомы удвоены (частично диплоидные штаммы). Это часто дает возможность установить, что данный участок хромосомы контролирует образование нескольких различных продуктов и что, следовательно, он содержит не один ген (как полагали до того), а соответствующее число разных генов.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

Мысль о существовании прямой связи между генами и ферментами зародилась еще в 1909 г. при изучении обмена фенилаланина у больных, страдающих определенным наследственным заболеванием. Однако гипотеза «один ген — один фермент» завоевала всеобщее признание лишь в 1940 е годы, после того как был выделен и исследован ряд мутантов *E. coli* и нейроспоры, нуждающихся в тех или иных факторах роста. Одно из первых доказательств справедливости этой гипотезы было получено при изучении механизма биосинтеза аргинина. Путь биосинтеза аргинина начинается с глутаминовой кислоты и включает восемь последовательных этапов, каждый из которых катализируется особым ферментом (рис. 8-5). По числу этапов были выделены мутанты; у каждого из них мутация нарушила ту или иную совершенно определенную ферментативную реакцию. Это заставило предположить, что синтез каждого фермента контролируется отдельным геном. Предположение подтвердилось, когда выяснилось, что в экстрактах мутантных клеток отсутствует в каждом случае совершенно определенный фермент. Другой прекрасный пример подобных взаимоотношений — это механизм биосинтеза гистидина (рис. 8-6). Известен ряд мутаций, каждая из которых обусловливает утрату какого-нибудь из десяти ферментов, необходимых для биосинтеза этой аминокислоты.

Ферменты не единственные белки, непосредственно контролируемые генами. Каждый отдельный белок контролируется своим особым геном. Одно из первых четких доказательств правильности этих представлений

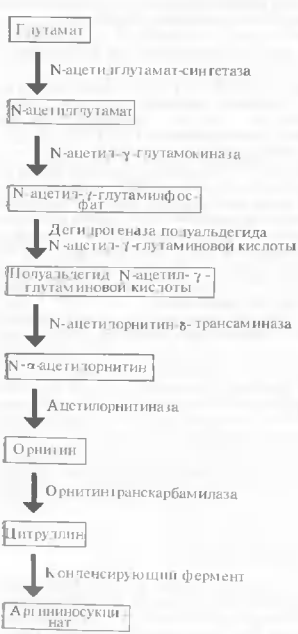


Рис. 8-5. Путь биосинтеза аргинина у *E. coli*.

было получено при изучении гемоглобина людей, страдающих серповидноклеточной анемией. Генетическая природа этого заболевания хорошо изучена. Если у какого-нибудь индивидуума в обеих гомологичных хромосомах присутствует соответствующий ген (*s*), то такой индивидуум страдает тяжелой анемией, при которой эритроциты имеют серповидную форму. Если же имеется только один ген *s*, а гомологичная хромосома несет нормальный аллель (+), то эритроциты имеют почти нормальную форму, а анемия клинически почти не проявляется. Оказалось, что точно таким же образом коррелируют с генотипом организма и свойства гемоглобина. При генотипе *ss* весь гемоглобин принадлежит к аномальному типу (что

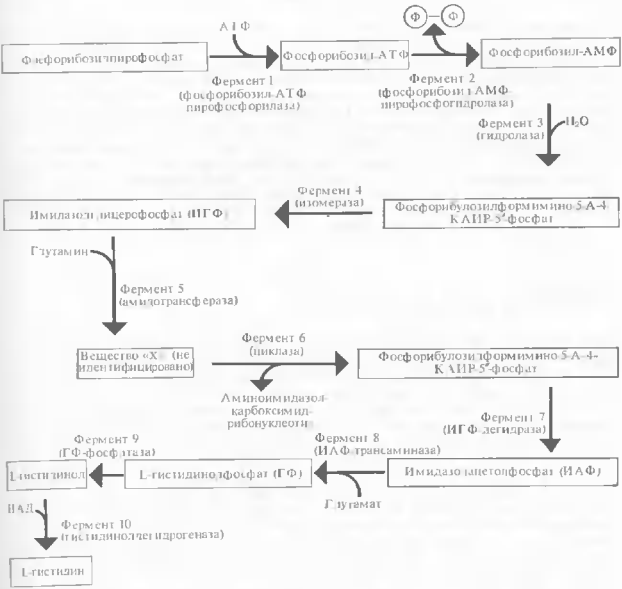


Рис. 8-6. Путь биосинтеза гистидина у *Salmonella typhimurium*.
Эта бактерия генетически близка *E. coli*, и гены в ее хромосоме располагаются, по-видимому, так же, как и у *E. coli*. (Сокращение 5-А-4-КАИР обозначает 5-амино-4-карбоксамидоимидазол-рибонуклеозид.)

проявляется в его измененной растворимости), а при генотипе $+/s$ половина синтезирующегося гемоглобина относится к нормальному типу, а половина — к серповидноклеточному.

Однако даже в настоящее время часто еще очень трудно идентифицировать белок, синтезируемый под контролем данного гена. Особенное разочарование в этом отношении вызывает положение с генами rII фага T4. К сожалению, до сих пор не известны те биохимические изменения, в силу которых мутанты rII образуют более крупные стерильные пятна; более того, несмотря на все усилия, никому еще не удалось обнаружить в клетках *E. coli*, инфицированных фагом дикого типа, какие-либо белки, которых нет в клетках, инфицированных мутантами. Поэтому в настоящее время среди исследователей преобладает стремление изучать те гены, белковые продукты которых известны и легко доступны для анализа.

ОДИН ГЕН — ОДНА ПОЛИПЕПТИДНАЯ ЦЕПЬ

До недавнего времени мысль о взаимосвязи между генами и белками принято было формулировать словами: «один ген — один белок (фермент)». Теперь мы знаем, что ближе к истине другая формулировка: «один ген — одна полипептидная цепь». Когда белок состоит более чем из одной полипептидной цепи, каждая цепь синтезируется отдельно, и лишь затем они соединяются в готовый продукт. Нередко гены, контролирующие синтез двух или нескольких полипептидных цепей, входящих в состав данного белка, располагаются рядом, но, вообще говоря, это не обязательно. Так, например, гены, контролирующие синтез α- и β-цепей гемоглобина, не сцеплены между собой. Положительный тест на комплементацию свидетельствует, таким образом, не о том, что два данных гена контролируют синтез двух разных белков, а о том, что эти гены контролируют синтез двух разных полипептидных цепей (которые, однако, могут входить в состав одного и того же белка).

РЕЦЕССИВНЫЕ ГЕНЫ ЧАСТО ОБРАЗУЮТ НЕАКТИВНЫЕ ПРОДУКТЫ

Большинство мутантных генов рецессивно по отношению к соответствующим генам дикого типа. Этот факт, казавшийся некогда загадочным, в настоящее время можно в какой-то мере объяснить исходя из взаимоотношений гена и фермента. Рецессивный фенотип часто возникает как следствие *полной* неспособности мутантных генов обеспечить синтез функционального белка (фермента). В гетерозиготах дело обстоит иначе. В каждой гетерозиготной клетке всегда присутствует одна «хорошая» копия данного гена и, значит, некоторое количество нормального продукта гена. Поскольку в гетерозиготах имеется только один аллель дикого типа, можно было бы предположить, что и нормального продукта в них меньше, чем в клетках с двумя такими аллелями. Если бы это было так, то фенотип гетерозиготы должен был бы, очевидно, быть промежуточным между фенотипами двух гомозигот. Между тем в действительности этого не наблюдается. Возможно, что в гетерозиготных клетках какие-то регуляторные механизмы побуждают ген дикого типа вырабатывать больше активного продукта, чем он вырабатывает в гомозиготной клетке. Можно также думать, что число молекул фермента оказывается достаточным для осуществления реакции, несмотря на то что оно ниже нормы. В гл. 14 мы обсудим вопрос о механизмах, контролирующих скорость действия гена.

ГЕНЫ С ВЗАИМОСВЯЗАННЫМИ ФУНКЦИЯМИ ЧАСТО РАСПОЛАГАЮТСЯ РЯДОМ

Еще лет десять назад генетики считали, что гены располагаются в хромосомах в чисто случайном порядке. Не удавалось уловить никакой тенденции к объединению у генов, контролирующих взаимосвязанные функции. Теперь благодаря развитию генетики вирусов и бактерий получены указания, что значительная часть генов объединена в группы по функциональному признаку. Две главные причины дали возможность уловить эту закономерность.

Первая из них состоит в том, что многие современные генетики изучают мутации, непосредственно воздействующие на биосинтез известных клеточных веществ. До начала работ с микроорганизмами в качестве генетических маркеров использовались обычно очень сложные признаки (например, цвет глаз или форма крыла). Развитие столь сложного органа,

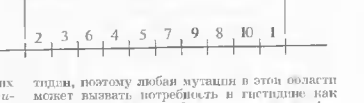


Рис. 8-7. **Группировка генов, участвующих в биосинтезе гистидина у *Salmonella typhimurium*.**
Порядок расположения генов в гистидиновой области определен в опытах с трансдуцирующим фагом. Каждый ген ответствен за синтез одного из 10 ферментов, необходимых для превращения фосфорибозилпирофосфата в гистидин, поэтому любая мутация в этой области может вызвать потребность в гистидине как факторе роста. Гены обозначены номерами 1—10: фермент 1 катализирует первую реакцию данного биосинтетического пути, фермент 2 — вторую и т. д. (названия ферментов приведены на рис. 8-6).

как крыло или глаз, недоступно для химического истолкования; в основе подобных процессов лежит значительное число *не связанных между собой химических реакций*, и выпадение любой из них может обусловить, например, неправильную форму крыла. Поэтому не удивительно, что гены, контролирующие развитие крыльев у дрозофилы, локализованы во всех четырех ее хромосомах. В противоположность этому мутация, проявляющаяся в неспособности клетки синтезировать относительно простое соединение, например аминокислоту серин, обусловливается скорее всего выпадением какой-либо одной из небольшого числа *взаимосвязанных химических реакций*. Если функционально связанные гены действительно располагаются в хромосоме рядом, то это, очевидно, легче обнаружить при изучении мутаций, которые нарушают совершенно определенную категорию химических реакций.

Вторая причина — широкое использование в исследованиях такого теста, как тест на комплементацию. Этот тест нередко позволяет установить, что какой-нибудь химический феномен значительно сложнее, чем предполагалось первоначально. Типичным примером может служить выявление в области rII двух генов: rIIA и rIIB. С помощью теста на комплементацию было во многих случаях показано, что та или иная область, которую рассматривали как один ген, на самом деле ответственна за ряд различных, но взаимосвязанных функций. Впоследствии обычно удавалось в подобных случаях обнаружить ряд химических реакций (иными словами, ферментов), контролируемых данной областью хромосомы. Один из наиболее наглядных примеров — биосинтез гистидина у *E. coli*. Тридцать лет назад мы бы предположили, что серия мутаций, блокирующих синтез гистидина и локализующихся в одной и той же области хромосомной карты, затрагивает только один ген. Теперь в этой области идентифицированы десять различных генов (рис. 8-7), каждый из них контролирует один из десяти ферментов, участвующих в биосинтезе гистидина. Область, контролирующая биосинтез триптофана, тоже содержит группу генов; здесь располагаются пять генов, контролирующих отдельные этапы биосинтеза этой аминокислоты.

Первоначально предполагали, что порядок расположения генов в такой группе соответствует ходу биосинтетического процесса, т. е. отражает последовательность участия отдельных ферментов. Однако позднее обнаружилось несколько исключений из этого правила. Известно, например, что два первых фермента, начинающих процесс биосинтеза гистидина, располагаются на противоположных концах области, занятой группой гистидиновых генов.

Не только гены, контролирующие биосинтез важнейших метаболитов, расположены группами; в группы могут быть объединены также и гены,

контролирующие последовательные реакции распада пищевых веществ. В распаде галактозы участвуют, например, три специфических фермента, а использование лактозы контролируется двумя или, возможно, тремя генами. Другой, не менее интересный пример группового расположения касается генов, контролирующих синтез структурных белков оболочки фага Т4: в одной области фаговой хромосомы расположены гены, ответственные за синтез белков головки, а в другой — гены, управляющие синтезом белков, из которых состоят нити отростка фага.

Группировка взаимосвязанных генов определяется тем обстоятельством, что не все гены хромосомы функционируют в одно и то же время (подробнее мы будем говорить об этом в гл. 14). Существуют механизмы «включающие» и «выключающие» гены. Так, например, гены, контролирующие обмен лактозы, функционируют лишь в том случае, если клетки растут на среде с лактозой; если же лактоза в среде отсутствует, то этим генам, очевидно, нечего делать. Включение или, наоборот, выключение лактозных генов осуществляется особым соединением — репрессором. Как мы увидим в гл. 14, способность репрессоров одновременно контролировать синтез нескольких белков находится в прямой зависимости от того факта, что соответствующие гены физически примыкают друг к другу.

ДОКАЗАТЕЛЬСТВА ТОГО, ЧТО ГЕНЫ КОНТРОЛИРУЮТ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ АМИНОКИСЛОТ В БЕЛКАХ

Первые доказательства того, что гены определяют последовательность аминокислот в белках, были получены при изучении гемоглобина людей, страдающих серповидноклеточной анемией. Молекула гемоглобина дикого типа содержит полипептидные цепи двух видов: α-цепи и β-цепи. Молекулярный вес одной полипептидной цепи равен 16 100. В молекулу гемоглобина входят две α-цепи и две β-цепи, так что ее молекулярный вес равен ~64 500. Синтез α- и β-цепей контролируется разными генами; поэтому

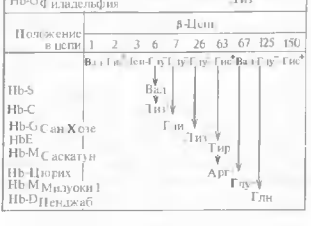


Рис. 8-8. Замены аминокислот в мутантных типах гемоглобина человека.

одиночная мутация может вызывать изменения либо в α-цепи, либо в β-цепи, но не в обеих одновременно. Серповидноклеточный гемоглобин отличается от нормального первичной структурой β-цепи: в положении 6 эта цепь содержит вместо глутаминовой кислоты (присутствующей у нормального гемоглобина) валин (рис. 8-8). В остальном аминокислотные последовательности мутантного и нормального гемоглобинов тождественны. Это показывает, что мутация в гене ведет к определенному изменению в матрице для гемоглобина, и потому естественно ожидать, что вся информация о последовательности аминокислот в молекуле гемоглобина заключена в соответствующих генах. Анализ аминокислотных последовательностей в других мутантных гемоглобинах, полученных от людей, страдающих иными формами анемии, подтвердил эти ожидания. Оказалось, что каждый вид анемии характеризуется замещением какой-либо аминокислоты в определенном участке полипептидной цепи.

На практике, однако, не представляется возможным установить корреляцию между изменениями в аминокислотной последовательности различных гемоглобинов и локализацией соответствующих мутаций на генетической карте. Причина этого заключается в том, что млекопитающие — вообще слишком неудобный объект для широких экспериментов по скрещиванию. Анализ такого типа возможен лишь у микроорганизмов, т. е. у тех объектов, генетика которых значительно лучше изучена.

КОЛЛИНЕАРНОСТЬ ГЕНА И ЕГО ПОЛИПЕПТИДНОГО ПРОДУКТА

Триптофан-синтаза *E. coli* — один из ферментов, участвующих в биосинтезе триптофана (рис. 8-9). Именно на этом ферменте лучше всего изучена зависимость между последовательностью мутирующих участков в гене и последовательностью аминокислотных замен в белковом продукте этого гена. Молекула триптофан-синтазы состоит из двух легко отделяющихся друг от друга полипептидных цепей А и В. Ни та, ни другая цепь сама по себе не обладает ферментативной активностью. Было выделено большое число мутантов *E. coli*, неспособных синтезировать триптофан. У них отсутствовала функционально полноценная А-цепь и, следовательно, не было активного фермента. Генетический анализ этих мутантов показал, что образование неактивной А-цепи может быть следствием изменения во многих мутирующих участках. После того как была проведена тщательная локализация мутаций, выяснилось, что все они могут быть размещены на линейной генетической карте (рис. 8-10). В дальнейшем удалось выделить А-цепи у большинства изученных мутантов и сравнить их аминокислотные последовательности с последовательностью А-цепи дикого типа, содержащей 267 аминокислот. Этих данных вполне достаточно, чтобы убедиться в том, что расположение мутации внутри гена коррелирует с расположением аминокислотных замен в полипептидном продукте этого гена. Поскольку и гены и полипептиды имеют линейную структуру, проще всего было предположить, что последовательность аминокислотных замен совпадает с последовательностью соответствующих мутаций в гене. Это и было весьма убедительно доказано в 1964 г. Выяснилось, что локализация всех аминокислотных замен точно коррелирует с локализацией соответствующих мутаций на генетической карте. Следовательно, имеется полная коллинеарность тех и других (рис. 8-10). Отсюда вытекает, что положение каждой аминокислоты в полипептидной цепи определяется особым участком гена.

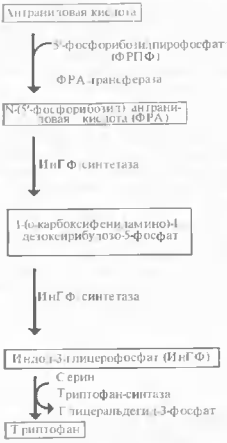


Рис. 8-9. Последние этапы в пути биосинтеза триптофана.

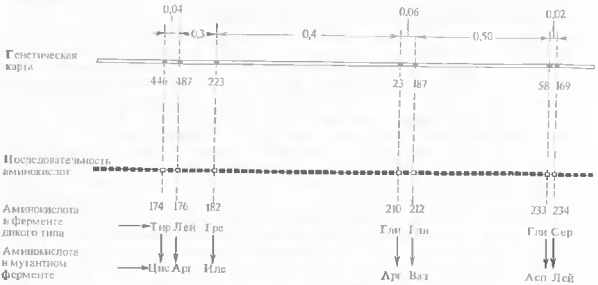


Рис. 8-10. Коллинеарность гена и его белкового продукта.
В качестве иллюстрации приведена генетическая карта одной четвертой части гена, кодирующего последовательность аминокислот в белке А триптофан-синтазы *E. coli*. Числа со стрелками (←0,04→ и т. п.) выражают расстояния на карте (частоты рекомбинаций) между различными мутациями (*A446*, *A487* и т. п.), затрагивающими синтез триптофан-синтазы. Числа, относящиеся к последовательности аминокислот, обозначают положение данной аминокислоты в белке А, содержащем 267 аминокислотных остатков. NH_2-конец отрезка цепи находится слева на схеме.

МУТИРУЮЩИЙ УЧАСТОК МОЖЕТ СУЩЕСТВОВАТЬ В НЕСКОЛЬКИХ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ФОРМАХ

В неактивной триптофан-синтазе, выделенной из разных мутантов, замены аминокислот не всегда совпадают, даже если мы имеем дело с разными мутациями *в одном и том же* мутирующем участке гена (доказательством того, что мутации затрагивают один и тот же участок, служит отсутствие рекомбинантов дикого типа). Так, например, у разных штаммов бактерий мутация в одном и том же мутирующем участке может привести к замене глицина либо валином, либо глутаминовой кислотой. Этот результат означает, что мутирующий участок может существовать по крайней мере в трех альтернативных формах. В следующей главе мы обсудим экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что мутирующие участки — это дезоксинуклеотиды, из которых построены гены (участки молекулы ДНК). Известно всего четыре типа дезоксинуклеотидов, и, следовательно, можно думать, что генетический анализ никогда не выявит больше четырех альтернативных конфигураций для какого бы то ни было мутирующего участка.

ОДНА АМИНОКИСЛОТА ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ НЕСКОЛЬКИМИ СОСЕДНИМИ МУТИРУЮЩИМИ УЧАСТКАМИ

Между мутирующими участками и аминокислотами не существует соотношения 1 : 1. Напротив, генетические данные показывают, что многие, если не все, аминокислоты определяются совместным действием нескольких соседних участков. Доказательства этого были получены при изучении замен аминокислот в положении 210 упомянутого фрагмента триптофан-синтазы (рис. 8-10). Из дикого типа *E. coli* под действием мутагена был получен мутант A23, у которого глицин в этом положении заменен аргинином, и мутант A46, у которого глицин заменен глутаминовой кислотой. Различие между мутантами A23 и A46 касается разных мутирующих участков, так как при генетическом скрещивании этих мутантов получаются рекомбинанты дикого типа (у которых в положении 210 стоит глицин; рис. 8-11). Если бы обе мутации затрагивали один и тот же мутирующий участок, то рекомбинанты дикого типа, конечно, не могли бы образоваться, но очень низкая частота рекомбинаций указывает на то, что данные мутации, по-видимому, находятся рядом.

Другого рода данные в пользу того же заключения были получены из наблюдений над действием мутагенов на сами мутанты A23 и A46. Оказалось, что при этом можно получить новые штаммы, у которых в положении 210 снова стоит глицин. Эти обратные мутации скорее всего восстанавливают в участке первичной мутации исходную конфигурацию (т. е. конфигурацию дикого типа). Однако при обработке мутагенами появляются также и штаммы, у которых в положении 210 произошло новое замещение. Очень важно то обстоятельство, что типы возможных замен у штаммов A23 и A46 различны. У штамма A23 стоящий в положении 210 аргинин может замещаться, помимо глицина (обратная мутация), также серином и треонином, тогда как у штамма A46 мутации ведут к замене глутаминовой кислоты на аланин и валин (опять-таки не считая глицина). У штамма A23 мутации никогда не приводят к замене на аланин и валин, а у штамма A46 — к замене на треонин и серин. Это было бы очень трудно объяснить исходя из допущения, что данным двум мутациям (A23 и A46) соответствуют различия в конфигурации одного и того же мутирующего участка. Если же эти мутации затрагивают два разных мутирующих участка, то тогда объяснить наблюдаемые соотношения можно. Так, например, можно представить себе, что для замены аргинина валином требуется изменение обоих участков; это совместное изменение должно, очевидно, происходить со

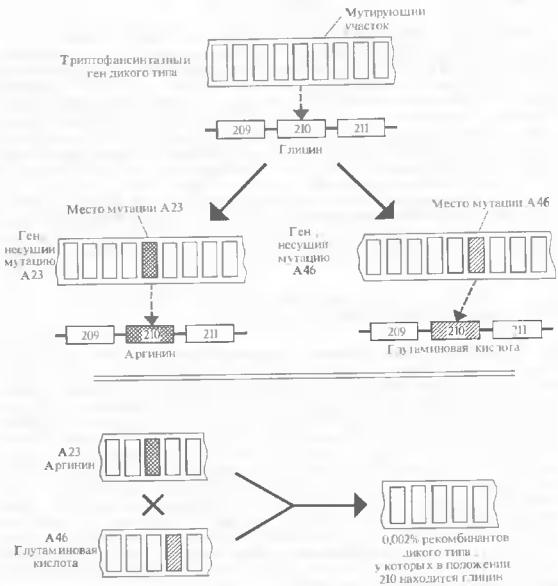


Рис. 8-11. Схема, показывающая, что одна аминокислота контролируется более чем одним мутирующим участком (подробное объяснение см. в тексте).

столь низкой частотой, что выявить его в опытах с обычными мутагенами будет невозможно.

Описанные эксперименты сами по себе позволяют оценить лишь минимальное число мутирующих участков, определяющих одну аминокислоту. Мы видим, что это минимальное число равно двум. Чтобы оценить верхний предел, исследования такого типа надо провести в гораздо большем масштабе.

В следующей главе мы будем говорить о других данных, на основе которых был сделан вывод, что одну аминокислоту определяют три мутирующих участка (нуклеотида).

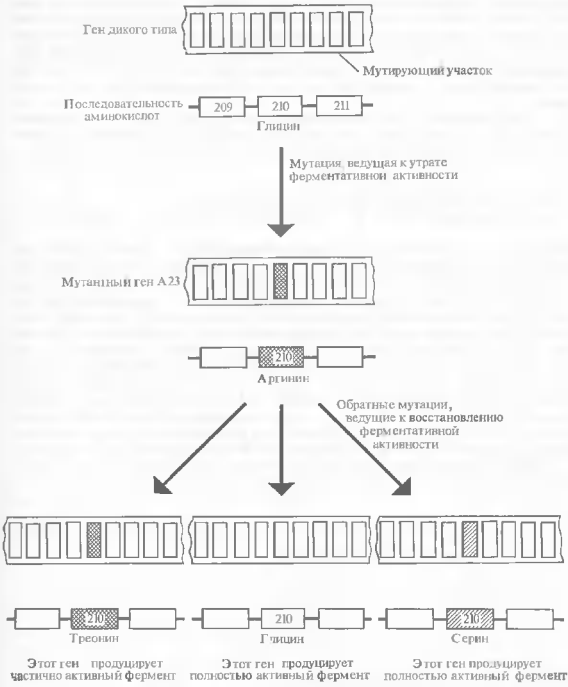


Рис. 8-12. Многие замены аминокислот не ведут к утрате ферментативной активности (подробное объяснение см. в тексте).

Мы совершенно произвольно выбрали для рассмотрения мутации, возникающие в одном и том же мутирующем участке.

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА НЕ СВЯЗАНА С КАКОЙ-ТО ОДНОЙ УНИКАЛЬНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ АМИНОКИСЛОТ

Наличие у данного белка ферментативной активности не связано с какой-либо уникальной последовательностью аминокислот. В этом можно убедиться, наблюдая новые штаммы, полученные из штаммов А23 и А46 под действием мутагенов. Действительно, и глицин и серин в положении 210 обеспечивают одинаковую активность фермента (рис. 8-12), тогда как при

замещении глицина треонином активность фермента снижается. Мы теперь располагаем уже большим числом данных, которые говорят о том, что замены аминокислот во многих участках полипептидной цепи существенно не влияют на каталитическую активность белка. Однако естественно полагать, что какая-то одна из возможных последовательностей наилучшим образом соответствует потребностям данной клетки. По-видимому, это именно та последовательность, которая определяется аллелем дикого типа.

Если даже все другие последовательности почти столь же эффективны, то все же в процессе эволюции они, очевидно, должны элиминироваться, и сохраниться может, по всей вероятности, только наиболее удачная.

«ОБРАТНЫЕ» МУТАЦИИ ВЫЗЫВАЮТ ИНОГДА ЗАМЕНУ АМИНОКИСЛОТЫ В КАКОМ-НИБУДЬ ДРУГОМ УЧАСТКЕ

Обнаружение мутаций, при которых неактивный мутантный фермент превращается в активный в результате замены еще одной аминокислоты (в другом участке полипептидной цепи), подтверждает предположение о том, что строго заданная последовательность аминокислот не является необходимой для обеспечения ферментативной активности. У мутанта A46, синтезирующего неактивную триптофан-синтазу, содержащую в положении 210 аргинин, изредка возникают новые мутации в совершенно другом участке гена, приводящие к синтезу активного фермента. Одна из таких мутаций, A446, отстоит от первой мутации на расстояние, равное одной десятой длины всего гена (рис. 8-13). Двойной мутант A46A446 синтезирует активный фермент, в молекуле которого имеются две замены: аргинин вместо глицина в положении 210 и цистеин вместо тирозина в положении, отстоящем от первой замены на 36 аминокислотных остатков.

Вторую замену можно изучить независимо от первой. Для этого получают рекомбинанты, которые несут одну только мутацию A446. Самое

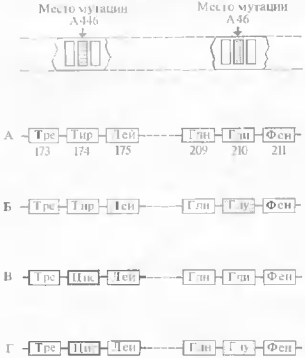


Рис. 8-13. Реверсия (супрессия) мутантного фенотипа второй мутацией, в другом участке того же самого гена.
А. Активный фермент дикого типа. *Б*. Неактивный фермент мутанта A46. *В*. Неактивный фермент мутанта A446. *Г*. Активный фермент двойного мутанта A46A446.

замечательное, что мутация A446 сама по себе тоже приводит к синтезу неактивного фермента. Мы видим, таким образом, что при сочетании в полипептидной цепи двух определенных замен может возникнуть трехмерная конфигурация, обеспечивающая активность фермента. Однако такой результат получается редко; так, например, двойные мутанты, несущие мутации A446 и A23 или A446 и A187, не образуют активного фермента. Сейчас еще преждевременно строить гипотезы о том, как именно различные аминокислотные остатки организованы в трехмерной конфигурации этого белка и почему ферментативной активностью обладают не все, а только некоторые последовательности аминокислот. Такого рода анализ станет возможным лишь после того, как будет выяснена трехмерная структура триптофан-синтазы.

ВЫВОДЫ

Кроссинговер может происходить в пределах одного гена, и это дает возможность локализовать мутации внутри гена. Мутирующие участки в генах располагаются строго линейно (подобно генам в хромосомах). Средний по размеру ген содержит много мутирующих участков (от 500 до 1500). Иногда не сразу удается определить, содержит ли данная область хромосомы один ген или более. Ответить на этот вопрос можно, вводя в клетку две хромосомы с мутацией в данной области или их фрагменты (тест на комплементацию). Если мутанты функционально дополняют друг друга, то они несут мутации в разных генах.

Гены контролируют фенотип клетки, так как от них зависит, какие именно белки может синтезировать данная клетка. Каждый ген отвечает за синтез особого полипептида. Функция генов состоит в том, что они определяют последовательность аминокислот в белках. Это убедительно доказывается обнаружением многих мутаций, под влиянием которых синтезируется белок, отличающийся от белка дикого типа заменой одной единственной аминокислоты. Мутантные гены обычно рецессивны, так как мутация нарушает способность синтезировать соответствующий белок. В гетерозиготах, содержащих такие мутантные гены, ген дикого типа доминирует, ибо он обеспечивает синтез достаточного количества белка, а тем самым и проявление дикого фенотипа.

Получены надежные доказательства коллинеарности генов и их белковых продуктов: мутации, локализующиеся в концевом участке гена, изменяют последовательность аминокислот на конце полипептидной цепи и т. д. Гены, контролирующие ряд взаимосвязанных биохимических реакций, часто располагаются группами, рядом друг с другом. Изучение различных мутантных форм А белка триптофан-синтазы показывает, что мутирующий участок может существовать не менее чем в трех альтернативных состояниях (в следующей главе мы увидим, что это число, как полагают, равно точно четырем). Опыты с триптофан-синтазой доказали также, что каждая аминокислота определяется более чем одним мутирующим участком (как мы увидим ниже — тремя) и что ферментативная активность обеспечивается не только одной, уникальной, последовательностью аминокислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Pontecorvo G., Trends in Genetic Analysis, Columbia University Press, New York, 1958. Весьма доступно изложенное раннее исследование тонкой структуры гена.

Benzer S., «The Fine Structure of the Gene», Scientific American, January 1962, pp. 70—84. Четкое описание классических исследований гена rII фага T4, выполненных автором.

Hartman P. E., Suskind S. R., Gene Action, 2nd ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1969. Ясно написанная книга о работе гена, дает представление о многих подробностях экспериментов, позволивших сделать выводы об общих принципах.

Ingram V. M., The Hemoglobins in Genetics and Evolution, Columbia University Press, New York, 1963. Описание многочисленных случаев, когда гемоглобин был использован для установления важных биологических принципов. Обсуждение аномальных молекул гемоглобина особенно тесно связано с материалом, изложенным в настоящей главе.

Yanofsky C., «Gene Structure and Protein Structure», In: Hanawalt P. C. and Haynes R. H. (eds.), The Chemical Basis of Life, San Francisco, 1973. Введение к классической работе автора по триптофан-синтазной системе.

ГЛАВА

9 Репликация ДНК

Генетика учит нас, что информация о последовательности аминокислот в белках заключена в длинных полимерных цепях молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты, или ДНК (в гл. 15 мы увидим, что хромосомы некоторых вирусов не содержат ДНК, а состоят из химически очень близкого соединения — рибонуклеиновой кислоты, или РНК). Хотя ДНК была впервые обнаружена в хромосомах около 70 лет назад, как генетический материал ее удалось идентифицировать всего каких-нибудь 30 лет назад, и даже после этого многие генетики все еще продолжали считать, что некоторую часть генетической информации несет в себе белковый компонент хромосом. Однако сейчас мы уже не сомневаемся в том, что носителями генетической информации являются какие-либо другие вещества, помимо нуклеиновых кислот.

Теперь возникает химическая проблема: как осуществляется перенос информации на молекулярном уровне? Встает также вопрос о том, каким образом в процессе удвоения хромосом происходит точное копирование молекул ДНК. В 1943 г., когда была доказана генетическая роль ДНК, не приходилось и думать о том, чтобы браться за разрешение этих проблем. В то время сведения о структуре ДНК были еще чрезвычайно скудны. Известно было, что это очень длинная макромолекула (рис. 9.1), однако степень ее сложности оставалась неясной. Высказывались опасения, что структура ДНК в разных генах различна и что даже в простейших случаях выяснение этой структуры должно быть сопряжено с почти непреодолимыми трудностями. Более того, некоторые исследователи считали, что и после того, как мы установили структуру одной или нескольких различных молекул ДНК, мы все-таки не сможем понять, каким образом ДНК служит матрицей в процессе самовоспроизведения или как она определяет последовательность аминокислот в белках. К счастью, эти опасения оказались напрасными. Прошло всего десять лет с того времени, как выяснилось, что трансформирующим фактором является ДНК, и в 1953 г. была уже создана модель ДНК (двойная спираль). Эта модель легко объясняла, каким образом генетическая информация может быть записана в молекулах ДНК, и в то же время позволяла высказать предположения о химическом механизме самовоспроизведения этих молекул. С этого момента начался совершенно новый этап в изучении гена. Генетики, строя свои гипотезы, могли теперь исходить уже не только из результатов генетических скрещиваний. Они получили возможность истолковывать эти результаты, сопоставляя их со структурой ДНК. Как следствие этого некоторые вопросы, ранее не поддававшиеся систематическому изучению (такие, например, как, механизм действия мутагенов), получили новую рациональную основу для более углубленной разработки.

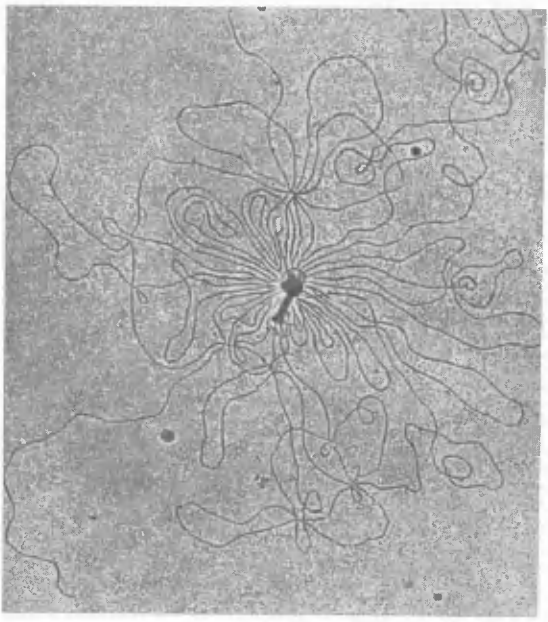


Рис. 9-1. Электронная микрофотография ДНК фага T2; × 100 000. (Kleinschmidt A. K. et al., Biochem Biophys. Acta, 61, 857, 1962).

ГЕН — ЭТО (ПОЧТИ ВСЕГДА) ДНК

Первое серьезное указание на генетическую роль ДНК было получено в опытах по генетической трансформации пневмококков (гл. 7). Вскоре после того, как обнаружилось, что клеточные экстракты способны вызывать такого рода трансформацию, были начаты тщательные химические исследования с целью выяснения природы трансформирующего фактора. В то время почти все исследователи считали, что гены имеют белковую природу. Поэтому, когда Эвери и его сотрудники в 1943 г. сообщили, что трансформирующим фактором является ДНК (рис. 9-2), это оказалось для многих неожиданностью. Авторы пришли к данному выводу на основании экспериментов с дезоксирибонуклеазой. Оказалось, что под дей-

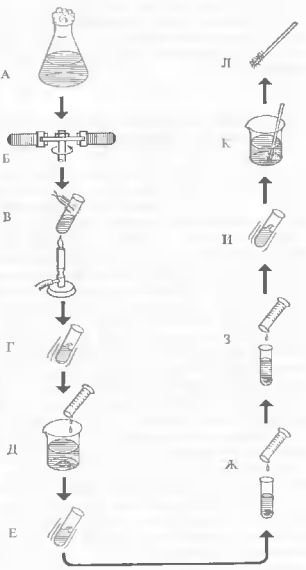


Рис. 9-2. Химический метод, использованный в первых работах по выделению химически чистого трансформирующего агента (Stahl F. W., The Mechanics of Inheritance, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1964, рис. 2.8).
А. Капсульные пневмококки выращивают в питательной среде. *Б.* Осаждают клетки центрифугированием. *В.* Ресуспендируют в растворе соли (NaCl); нагревают до 65°С для инактивации ферментов, разрушающих трансформирующую активность. *Г.* Промывают раствором соли; встряхивают с дезоксихолатом натрия для экстрагирования водорастворимых компонентов клетки. *Д.* Клетки удаляют центрифугированием и к надосадочной жидкости добавляют 3—4 объема этанола. *Е.* Осадок отделяют и сушат (дезоксихолат остается в растворе), затем растворяют в растворе соли и этот раствор взбалтывают с хлороформом для экстрагирования белков. *Ж.* Хлороформ удаляют и к раствору вновь добавляют этанол, полученный осадок вновь растворяют в растворе соли. *З.* Добавляют ферменты, разрушающие капсульные полисахариды, опять осаждают этанолом; растворяют в растворе соли. *И.* Взбалтывают с хлороформом для удаления добавленных ферментов. *К.* Добавляют по каплям этанол и размешивают палочкой, наматывая на нее нити выпадающего осадка. *Л.* Нити снимают с палочки и промывают смесью этанола и раствора соли. Полученный продукт представляет собой химически чистую ДНК.

ствием дезоксирибонуклеазы (фермента, специфически разрушающего ДНК) трансформирующая активность исчезала. Рибонуклеаза (разрушает РНК) и протеолитические ферменты (разрушают белки) не вызывали такого эффекта.

КОЛИЧЕСТВО ДНК В ХРОМОСОМАХ ПОСТОЯННО

Хотя выводы из опытов по трансформации были весьма четкими и однозначными, мысль о широкой их приложимости вначале отнюдь не встретила сочувствия. Многие были настроены крайне скептически и полагали, что вряд ли этот феномен удастся наблюдать у каких-либо иных форм, помимо некоторых штаммов бактерий. Таким образом, фундаментальное значение открытия Эвери было оценено далеко не сразу.

Подтверждение генетической роли ДНК было получено при изучении химии хромосом. ДНК обнаруживалась почти исключительно в ядрах, и обычно ее не находили там, где не было выраженных хромосом. Более того, оказалось, что количество ДНК в диплоидном наборе хромосом дан-

ного организма постоянно, в гаплоидных половых клетках содержится вдвое меньшее количество ДНК. В пользу генетической роли ДНК свидетельствовала и ее метаболическая стабильность. В отличие от многих других клеточных молекул ДНК стабильна: атомы, однажды включенные в ее состав, не покидают молекулу, пока поддерживается нормальный рост клетки.

ГЕНЫ ВИРУСОВ ТАКЖЕ ПРЕДСТАВЛЯЮТ СОБОЙ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Еще более убедительные доказательства генетической роли нуклеиновых кислот были получены при изучении вирусов и зараженных вирусами клеток. К 1950 г. оказалось возможным получить ряд вирусов в чистом виде и определить природу молекул, из которых они состоят. Эти исследования привели к важному обобщению. Выяснилось, что все без исключения вирусы содержат нуклеиновые кислоты. Поскольку в то время становилось все более ясным, что вирусы содержат генетический материал, естественно возник вопрос, не является ли нуклеиновокислотный компонент вируса хромосомой этого вируса? Первые убедительные данные на этот счет были получены в результате использования изотопной метки при изучении репродукции фага Т2. Фаг Т2 состоит из ДНК и покрывающей ее защитной белковой оболочки, построенной из ряда различных белков. Белок метили радиоактивной серой (^{35}S), а ДНК — радиоактивным фосфором (^{32}P). Если пометить фаг таким образом, то можно проследить судьбу ДНК и белка в новом цикле размножения, установив, как распределилась метка в потомстве фага.

Опыты дали вполне однозначные результаты (рис. 9-3). В потомстве фага обнаруживался (в довольно значительном количестве) только ^{32}P, т. е. та метка, которой была помечена нуклеиновая кислота. Меченый белок родительского фага потомству не передавался. Более того, выяснилось, что при заражении фагом в клетку вообще проникает очень мало фагового белка: почти весь белок присоединяется к клеточной стенке и остается здесь, не выполняя уже никакой функции после того, как ДНК проникла в клетку. Это было отчетливо показано в опыте, в котором зараженные фагом бактерии после проникновения в них фаговой ДНК энергично встряхивались (в смесителе). Пустые белковые оболочки

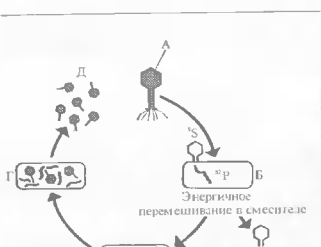


Рис. 9-3. Демонстрация того факта, что только ДНК фага Т2 переносит генетическую информацию и что белковая оболочка выполняет защитную функцию, облегчая перенос ДНК в новые клетки.
А. Фаг, у которого белок оболочки помечен радиоактивной серой (^{35}S), а ДНК — радиоактивным фосфором (^{32}P). *Б*. Препарат фага смешивают с суспензией бактериальных клеток. Фаговые частицы прикрепляются к клеткам. *В*. Хромосома фага в клетке-хозяине. *Г*. Размноженные хромосомы фага (т. е. фаговая ДНК) в отсутствие защитной оболочки. *Д*. Дочерние фаговые частицы, выходящие из клетки; у некоторых из них в хромосоме присутствует ^{32}P, но ни у одной в оболочке не содержится ^{35}S.

отрывались при этом от клеток, но способность зараженных бактерий поддерживать размножение фага ни в какой мере не изменялась.

С некоторыми вирусами удается теперь провести даже еще более наглядный эксперимент в том же плане. Выяснилось, например, что очищенная ДНК вируса полиомы мыши может проникать в мышиные клетки и инициировать цикл размножения вируса, завершающийся образованием многих тысяч новых вирусных частиц.

Главная функция вирусного белка состоит, следовательно, в защите генетически активного нуклеиновокислотного компонента при переносе его из одной клетки в другую. Нет никаких оснований приписывать какую-либо генетическую роль молекулам белка.

ДНК ИМЕЕТ ОБЫЧНО СТРУКТУРУ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ

Главная характерная особенность ДНК состоит в том, что ее молекула составлена из двух комплементарных очень длинных полимерных цепей, закрученных в правильную двойную спираль (рис. 9-4 и 9-5). Диаметр этой спирали равен примерно 20 Å, а шаг (расстояние между витками) — 34 Å. Каждая цепь — это полинуклеотид (рис. 3-10), т. е. регулярный полимер, в котором остатки сахара двух соседних нуклеотидов связаны при помощи фосфатных групп. На каждый виток спирали приходится 10 нуклеотидных пар, расстояние между азотистыми основаниями равно 3,4 Å. Имеются нуклеотиды четырех главных типов. Каждый из них содержит остаток дезоксирибозы, фосфатную группу и пуриновое или пиримидиновое основание (рис. 3-9). В состав ДНК входят два пиримидина — тимин (Т) и цитозин (Ц) — и два пурина — аденин (А) и гуанин (Г). В образовании связи между сахаром и фосфатом всегда принимают участие одни и те же группы. Поэтому углеводно-фосфатный остов молекулы имеет регулярную структуру. В противоположность этому последовательность пуриновых и пиримидиновых остатков вдоль цепи в высшей степени нерегулярна, каждая молекула ДНК данного типа характеризуется своей особой последовательностью этих остатков. Пуриновые и пиримидиновые основания — это плоские, плохо растворимые в воде молекулы, которые стремятся расположиться друг над другом (в виде стопки монет) перпендикулярно оси спирали.

Две цепи удерживаются вместе при помощи водородных связей между парами оснований. Аденин всегда спаривается с тимином, а гуанин с цитозином (рис. 4-14). Спаривание происходит только таким образом; два пурина занимали бы слишком много места, а два пиримидина, наоборот, — слишком мало, так что регулярная спираль образоваться бы не могла. Строгая специфичность спаривания обусловливает комплементарность последовательностей оснований в двух цепях, закрученных в двойную спираль. Если, например, в одной из цепей имеется последовательность АТГТЦ, то в другой цепи будет стоять ТАЦАГ. Кроме того, из строгой специфичности спаривания (А··· Т и Г··· Ц) по стереохимическим соображениям вытекает, что цепи имеют противоположную направленность, т. е. они *антипараллельны*. Следовательно, если повернуть спираль на 180°, то ее внешний вид не изменится (рис. 9-6).

Существенная химическая особенность ДНК связана также с положением водородных атомов в пуриновых и пиримидиновых основаниях. До 1953 г. многие полагали, что некоторые атомы водорода в гетероциклах оснований очень мобильны и мигрируют от одного атома азота или кислорода к другому. Теперь мы знаем, что хотя такая миграция (называемая таутомерным превращением) возможна, она происходит крайне редко и большую часть времени атомы водорода остаются в фиксированном

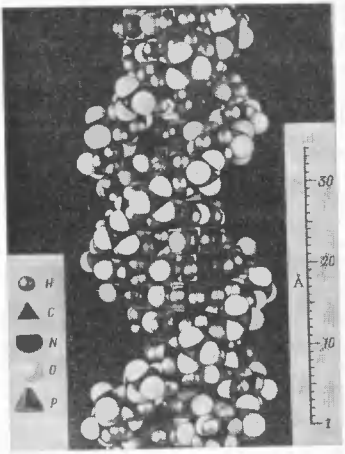


Рис. 9-4. Пространственная модель двухцепочечной молекулы ДНК. Размеры кружков соответствуют ван-дер-ваальсовым радиусам различных атомов, входящих в состав молекулы. (С любезного разрешения Уилкинса.)

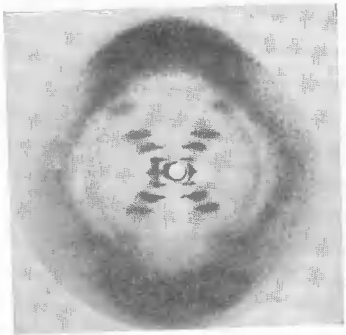


Рис. 9-5. Рентгенограмма, сыгравшая решающую роль в выяснении структуры ДНК. Она была получена Розалиндой Франклин зимой 1952—1953 гг. в Лондонском Королевском колледже (Franklin R. E., Gosling R., Nature, 171, 740, 1953).
Эта фотография экспериментально подтвердила предположение о спиральной структуре молекулы ДНК. Крестообразное расположение рефлексов (плотность рефлексов измеряется по почернению рентгеновской пленки) доказывает, что структура является спиральной. Сильно затемненные верхние и нижние области фотографии говорят о том, что плоские кольца пуриновых и пиримидиновых оснований (толщиной 3,4 Å) расположены стопкой перпендикулярно оси спирали.

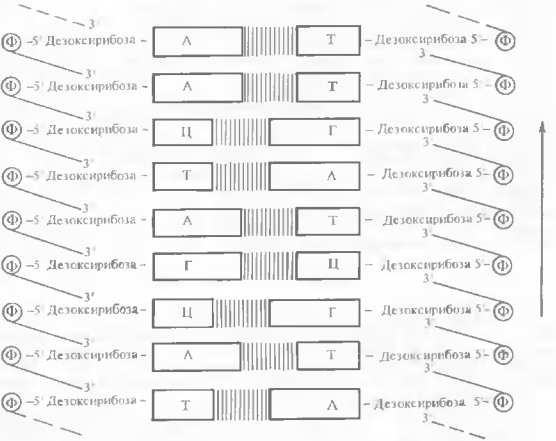


Рис. 9-6. Схема, иллюстрирующая специфическое спаривание оснований в двойной спирали ДНК, отсутствие ограничений в последовательности расположения оснований вдоль одной цепи и антипараллельность двух цепей, т. е. противоположное направление 3', 5'-фосфодиэфирных связей (Hayes W. The Genetics of Bacteria and Their Viruses, Blackwell, Oxford, 229, 1964). Прямоугольники — основания; заштрихованные участки — водородные связи между парами оснований (А — аденин, Г — гуанин, Т — тимин, Ц — цитозин).

положении. Атом азота, присоединенный к пуриновому или пиримидиновому кольцу, обычно входит в состав *аминогруппы* (NH_2) и лишь крайне редко — в состав *иминогруппы* (NH). Атом кислорода, присоединенный к шестому углероду гуанина или тимина, находится в *кетоформе* (CO) и лишь изредка принимает *енольную* конфигурацию (COH). Как мы увидим позже, эти относительно стабильные конфигурации колец существенны для биологической функции ДНК. Если бы положение атомов водорода не было фиксировано, то аденин часто спаривался бы с цитозином, а гуанин — с тимином.

В отличие от отношений А/Т и Г/Ц, которые всегда равны единице (что следует из строгой специфичности спаривания), отношение $(А + Т)/(Г + Ц)$ в ДНК разных типов довольно сильно варьирует (табл. 9-1). В ДНК высших растений и животных имеется избыток А + Т по отношению к Г + Ц; у вирусов, бактерий и низших растений мы встречаем и типы, богатые А + Т, и такие, у которых преобладает Г + Ц. Эти различия не являются чисто случайными: у таксономически близких организмов отношение $(А + Т)/(Г + Ц)$ почти одинаково. Чем объясняются столь большие различия в составе оснований у ДНК из различных источников, этого мы пока не знаем. Они могут быть следствием бурной эво-

Таблица 9-1 Примеры вариаций в нуклеотидном составе ДНК $\left(\text{отношение } \frac{А+Т}{Г+Ц}\right)$ у таксономически различных организмов

Источник ДНК	$\frac{А+Т}{Г+Ц}$	Источник ДНК	$\frac{А+Т}{Г+Ц}$
Pseudomonas aeruginosa (бактерия)	0,51	*Rabdonema adriaticum* (диатомовая водоросль)	1,71
Escherichia coli	0,97	Пшеница	1,22
Bacillus megatherium (бактерия)	1,08	*Paracentrotus lividus* (морской еж)	1,86
Mycobacterium tuberculosis (бактерия)	0,60	*Locusta migratoria* (саранча)	1,41
Saccharomyces cerevisiae (дрожжи)	1,80	Форель	1,34
Aspergillus niger (плесневый гриб)	1,00	Курица	1,36
Scenedesmus quadricauda (водоросль)	0,57	Лошадь	1,33
		Человек	1,40
		Фаг T2	1,84
		Фаг λ	1,06

люции жизни на Земле (но явно не ее причиной). Несмотря на очень резкие различия между высшими растениями и животными, процентное соотношение оснований четырех главных типов в ДНК этих форм довольно близко. Этот факт говорит о том, что изменчивость в последовательности оснований уже сама по себе достаточна для обеспечения различий между генами растений и животных.

Молекулы ДНК с более высоким содержанием Г + Ц более устойчивы к нагреванию. Когда двухцепочечные молекулы ДНК нагревают до температур, превышающих физиологические (немного ниже 100°С), водородные связи между основаниями разрываются и комплементарные цепи отделяются друг от друга (денатурация ДНК). Поскольку пара Г···Ц стабилизируется тремя водородными связями, для разделения цепей, содержащих большее число таких пар, требуются более высокие температуры, чем для цепей, в которых преобладают пары А···Т. При промежуточных температурах или в присутствии дестабилизирующих агентов, таких, как щелочь или формамид, ДНК может быть денатурирована частично. В этом случае участки ДНК, богатые АТ-парами, плавятся независимо от соседних участков, а ГЦ-богатые участки сохраняют структуру двойной спирали (рис. 9-16).

Даже полная денатурация ДНК не всегда бывает необратимой. Если нагретый раствор ДНК подвергнуть медленному охлаждению, то разделенные комплементарные цепи часто «находят» друг друга и вновь образуют регулярную двойную спираль. Эта способность ДНК к ренатурации открывает возможность для получения искусственных гибридных молекул ДНК путем медленного охлаждения смеси денатурированных ДНК из двух различных организмов. Можно, например, получить гибридные молекулы ДНК, в которых одна цепь будет принадлежать ДНК человека, а другая — ДНК мыши. Однако лишь небольшая часть ДНК человека (25%) может гибридизоваться с ДНК мыши. Это и не удивительно, ибо данный факт означает, что последовательности нуклеотидов сходны только в некоторых генах человека и мыши, а все остальные гены этих организмов различаются очень сильно. Совершенно очевидно, что метод молекулярной гибридизации может оказаться весьма эффективным при изучении генетического сходства между представителями различных таксономических групп.

КОМПЛЕМЕНТАРНОСТЬ СТРУКТУРЫ УКАЗЫВАЕТ НА ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ САМОВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ

Ранее, при обсуждении возможного механизма действия матриц, мы отмечали, что, вообще говоря, две одинаковые поверхности не должны притягиваться друг к другу и что значительно более вероятным следует считать присоединение противоположно заряженных групп или двух поверхностей, комплементарных по форме (наподобие ключа и замка). Поэтому не имея никаких данных о структуре гена, естественно было полагать, что такая сложная молекула, как ген, не кодируется прямо. Можно было допустить, что репликация протекает с образованием какой-то промежуточной молекулы (комплементарной по форме) и уже эта последняя используется как матрица для получения реплик исходной структуры. Некоторые генетики еще не так давно (когда строение белка и нуклеиновых кислот не было достаточно хорошо изучено) высказывали предположение, что молекула ДНК играет роль матрицы в синтезе специфического белка, который в свою очередь служит матрицей для синтеза копий этой молекулы.

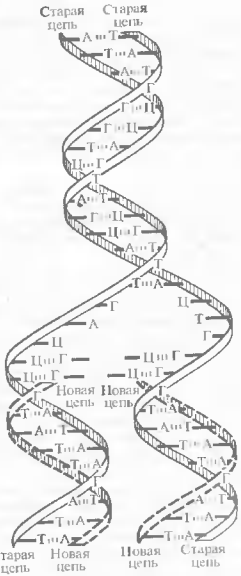


Рис. 9-7. Репликация ДНК.

Теперь, однако, мы знаем, что в молекуле ДНК специфические генетические поверхности двух полинуклеотидных цепей (т. е. пуриновые и пиримидиновые основания) комплементарны по форме и по зарядам. Это заставляет нас отказаться от мысли, что репликация ДНК связана с синтезом какого-то белкового посредника (тем более что и с химической стороны такой процесс представляется очень сложным и маловероятным). Гораздо проще предположить, что в процессе репликации ДНК цепи разъединяются и на каждой свободной цепи строится новая комплементарная цепь (рис. 9-7). Согласно такому представлению, одна из двух цепей каждой молекулы ДНК служит матрицей для образования другой комплементарной цепи.

Необходимость разрыва водородных связей между парами оснований не осложняет эту схему. Хотя водородные связи высокоспецифичны, однако они относительно слабы, так что для их разрыва (или, наоборот, образования) не требуется ферментов. Иными словами, они обеспечивают идеальный механизм для специфического взаимодействия матрицы и ее комплементарной реплики. Не составляет серьезной проблемы и раскручивание цепей ДНК. Молекула ДНК — это очень тонкая нить (диаметром всего 20 Å), и потому вращение вокруг оси спирали почти не связано с расходованием энергии.

СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СПАРИВАНИЕ ОСНОВАНИЙ ДОЛЖНО ОБЕСПЕЧИВАТЬ ВЫСОКУЮ ТОЧНОСТЬ ПРОЦЕССА РЕПЛИКАЦИИ

Выше мы говорили о том, что если бы аминокислоты выполняли функцию матриц, то в силу химической структуры своих боковых групп они не могли бы обеспечить надлежащую точность репликации. Пуриновые и пиримидиновые основания, способные к образованию нескольких водородных связей, обладают как раз такой структурой, которая обеспечивает эту точность.

Водородные связи идеально подходят для роли матричных связей. В отличие от ван-дер-ваальсовых взаимодействий, характеризующихся более слабыми силами притяжения и фактически не зависящих от природы реагирующих химических групп, водородные связи высокоспецифичны.

Средняя энергия водородной связи составляет около 4 ккал/моль, т. е. в 8 раз превышает среднюю энергию теплового движения молекул при комнатной температуре. Зная эту величину, можно вычислить отношение частоты эффективных взаимодействий соответствующих молекул (т. е. взаимодействий, ведущих к образованию водородных связей) к частоте неэффективных встреч. В нормальных для клетки условиях это отношение равно приблизительно 10^3, откуда следует, что если какие-либо две молекулы могут удерживаться вместе несколькими водородными связями, то они почти никогда не обнаруживаются в свободной форме.

Так, например, частота, с которой цитозин может присоединяться к аденину в процессе репликации ДНК, примерно в 10^8 раз ниже частоты присоединения аденина к тимину ($10^3 \cdot 10^3$, так как образуются две водородные связи). Пара Г····Ц стабилизируется тремя водородными связями, и, следовательно, ее воспроизведение в процессе репликации должно быть даже еще более точным.

Ценность этих соображений не снижается от того, что основания способны образовывать почти такие же прочные водородные связи с молекулами воды. Если поверхность, предназначающаяся, например, для тимина, временно занята несколькими молекулами воды, это не имеет значения. Молекулы воды не могут химически присоединиться к расту-

щей полинуклеотидной цепи, поэтому они через некоторое время удаляются (диффундируют в среду) и заменяются подходящим нуклеотидом.

Пока еще невозможно дать такую же количественную оценку тому факту, что два пурина или два пиримидина никогда не связываются друг с другом. Несомненно, что в обоих этих случаях потребовалось бы значительное изменение в расположении углеводно-фосфатного остова молекулы, что само по себе энергетически невыгодно. Большое число атомов, участвующих во взаимодействии, лишает нас возможности провести точные подсчеты энергетических различий. Отчасти эти затруднения связаны с тем, что пространственная локализация атомов в молекуле ДНК в настоящее время еще не может быть определена с точностью до 0,1 Å. Остается также неясным, как может повлиять нарушение конфигурации остова на связывание с ферментом, катализирующим образование межнуклеотидных ковалентных связей.

ВСЯ ИНФОРМАЦИЯ, НЕОБХОДИМАЯ ДЛЯ ПРОЦЕССА РЕПЛИКАЦИИ, ЗАКЛЮЧЕНА В ДНК

Доказательство этого положения получено при изучении синтеза ДНК в бесклеточной системе *E. coli*. Был обнаружен фермент ДНК-полимераза I, который соединяет дезоксинуклеотиды в процессе синтеза ДНК 3′, 5′-дифирными связями (рис. 9-8). Этот фермент функционирует только в присутствии ДНК-затравки, которая определяет порядок расположения нуклеотидов в продукте синтеза. Сама по себе ДНК-полимераза не может определить последовательность нуклеотидов, она способна обеспечить лишь построение регулярной (углеводно-фосфатной) части молекулы. Это отчетливо демонстрируют эксперименты, в которых затравкой служит ДНК из различных источников с разным содержанием пар А····Т и Г····Ц. Образовавшийся продукт всегда имеет такое соотношение оснований, какое имела ДНК-затравка (табл. 9-2).

Таблица 9-2 Сравнение нуклеотидного состава ДНК, синтезированной при помощи ДНК-полимеразы в присутствии соответствующей матричной ДНК

Источник матричной ДНК	Доля данного нуклеотида в продукте ферментативной реакции				А + Т / Г + Ц	
	А	Т	Г	Ц	в продукте	в матрице
Micrococcus lysodeikticus (бактерия)	0,15	0,15	0,35	0,35	0,41	0,39
Aerobacter aerogenes (бактерия)	0,22	0,22	0,28	0,28	0,80	0,82
Escherichia coli	0,25	0,25	0,25	0,25	1,00	0,97
Тимус теленка	0,28	0,28	0,24	0,22	1,32	1,35
Фаг T2	0,32	0,32	0,18	0,18	1,78	1,84

В процессе бесклеточного синтеза ДНК не происходит синтеза белка или молекул каких-либо других классов. Это убедительно доказывает, что не существует никаких промежуточных переносчиков генетической специфичности генов. Нет сомнения, что именно сама ДНК играет роль матрицы при своем воспроизведении. Можно было ожидать, что продукт данной ферментативной реакции будет иметь, подобно затравке, структуру двойной спирали, и эксперименты подтверждают это предположение.

О трехмерной структуре ДНК-полимеразы I имеется очень мало данных, поэтому точно не известно, как она работает на молекулярном

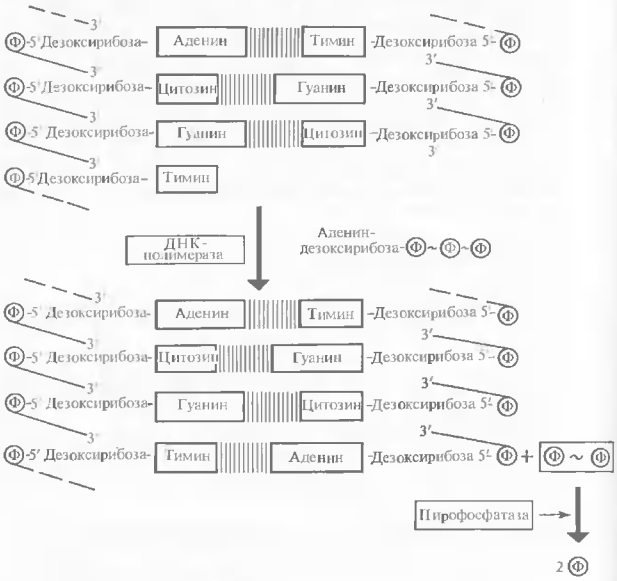


Рис. 9-8. Ферментативный синтез ДНК.

уровне. Очистка больших количеств фермента — очень трудная задача, поскольку он присутствует в клетках в весьма ограниченном количестве. Известно, однако, что его молекула состоит из одной полипептидной цепи, содержащей около 1000 аминокислот. Рано или поздно фермент удастся закристаллизовать, и тогда откроется возможность исследовать его трехмерную структуру с помощью дифракции рентгеновских лучей.

Способность ДНК-полимеразы I делать комплементарные копии цепей ДНК влечет за собой предположение, что она должна быть основным ферментом *E. coli*, участвующим в соединении нуклеотидов при репликации ДНК. Однако, как мы увидим далее, репликация ДНК в целом представляет собой сложный процесс, в котором участвует несколько различных полимеризующих ферментов. Открытие первой ДНК-полимеразы имело тем не менее огромное значение, так как благодаря ему было показано, что сборка комплементарных последовательностей нуклеотидов поддается изучению в пробирке сравнительно простыми методами.

УБЕДИТЕЛЬНЫЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВА РАЗДЕЛЕНИЯ ЦЕПЕЙ ДНК

Эти доказательства удалось получить после того, как были разработаны специальные методы разделения родительских и дочерних молекул ДНК. Сначала такое разделение было осуществлено при помощи тяжелых изотопов, например ^{15}N. Предварительно бактерии выращивали на среде, содержавшей ^{15}N. ДНК из таких бактерий имеет более высокую плотность, чем ДНК из клеток, выращенных в обычной среде. Тяжелую ДНК можно отделить от легкой путем равновесного центрифугирования в концентрированных растворах солей тяжелых металлов, например в растворе хлористого цезия. При центрифугировании молекулы распределяются в центрифужной пробирке в соответствии со своей плотностью (более тяжелые ближе ко дну). Если правильно подобрать исходную плотность раствора, то в равновесном состоянии молекулы ДНК каждого типа займут ту область в растворе соли, которая соответствует их собственной плотности. В описываемых экспериментах бактерии, содержавшие тяжелую ДНК, переносили в легкую среду (^{14}N) и давали им возможность в течение некоторого времени расти в этой среде. В данных условиях новосинтезированная ДНК содержала уже ^{14}N, и потому ее легко можно было отделить от ДНК, синтезированной до переноса в легкую среду.

Если репликация ДНК действительно идет с разделением цепей, то можно предсказать, какой должна быть плотность молекул ДНК через различные промежутки времени после переноса бактерий в легкую среду. После одной генерации в легкой среде все молекулы ДНК должны содержать одну тяжелую и одну легкую цепь, и, следовательно, они будут иметь промежуточную плотность. Именно этот результат и был обнаружен в эксперименте. После двух генераций половину должны составлять легкие молекулы и половину — гибридные (рис. 9.9); это предсказание также подтвердилось.

РЕПЛИКАЦИЯ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК ТАКЖЕ ПРОИСХОДИТ ПУТЕМ СПАРИВАНИЯ ОСНОВАНИЙ

Первоначально считали, что все молекулы ДНК содержат две цепи и что только при репликации небольшие участки цепей временно существуют в свободной форме (т. е. не образуют водородных связей с соответствующим участком комплементарной цепи). Поэтому для многих явилось неожиданностью обнаружение у некоторых мелких бактериофагов кольцевой одноцепочечной ДНК, для которой А $\neq$ Т и Г $\neq$ Ц. К фагам, имеющим одноцепочечную ДНК, относятся следующие: ϕX174, *s*13, *F*1 и M13.

Это открытие немедленно поставило перед исследователями вопрос о существовании еще одного копирующего механизма, в котором роль матрицы для получения тождественных копий должна играть одноцепочечная молекула ДНК. Такого типа репликация не может осуществляться путем образования двойной спирали, ибо при этом водородными связями соединялись бы одинаковые основания, а это по стехиометрическим соображениям невозможно. Чтобы все же объяснить самовоспроизведение одноцепочечных молекул, можно было допустить, что оно происходит благодаря участию молекул-«посредников» вроде тех, о которых говорилось выше (при обсуждении возможных механизмов копирования полипептидных цепей). В данном случае потребовалось бы четыре разных вида «посредников», каждый с двумя идентичными поверхностями, способных образовывать несколько водородных связей с определенным основанием. Благодаря «посредникам», связывающим основания, вдоль матрицы могла бы возникнуть новая последовательность нуклеотидов, тождественная исходной.

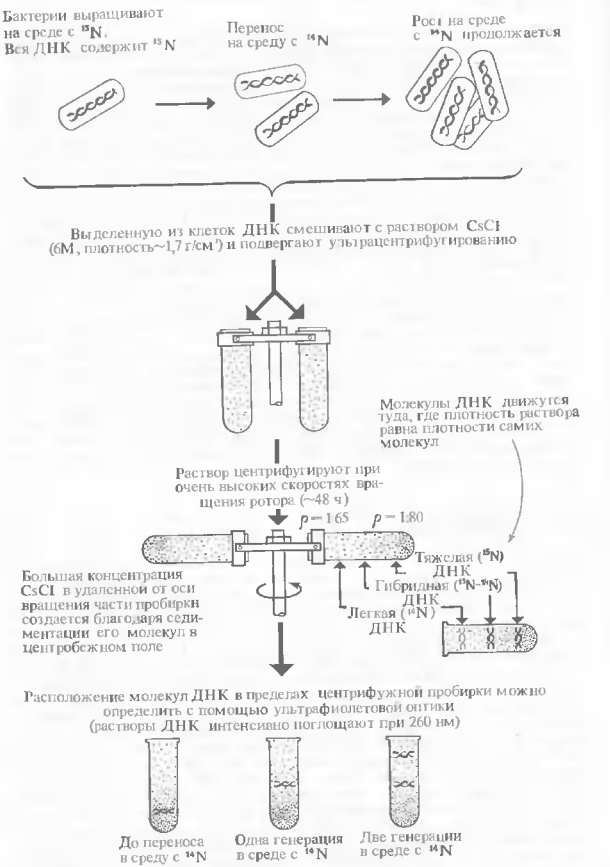


Рис. 9-9. Центрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия для демонстрации разделения комплементарных цепей в процессе репликации ДНК.

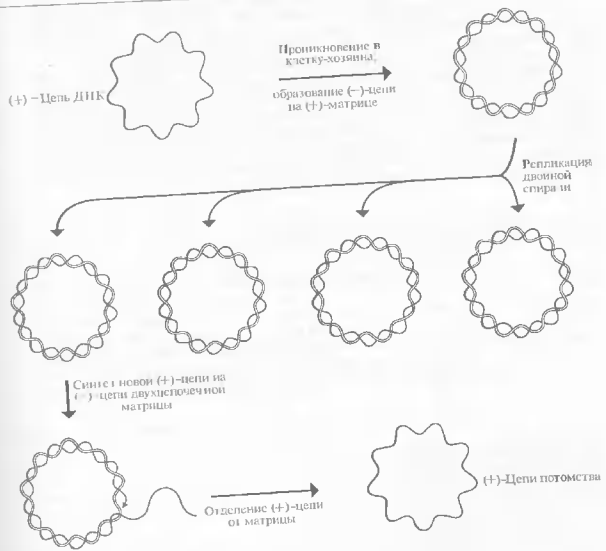


Рис. 9-40. Репликация одноцепочечной молекулы ДНК.
Каждая двойная спираль служит матрицей для образований множества новых (+)-цепей.

Однако у нас нет никаких экспериментальных данных в пользу существования подобных «посредников». В действительности вырисовывается совершенно иная картина. Тотчас же вслед за поступлением в клетку одноцепочечной ДНК (которую мы назовем (+)-цепью) на ней, как на матрице, синтезируется комплементарная (—)-цепь (рис. 9-40). *Образовавшаяся* двухцепочечная молекула в свою очередь служит матрицей для синтеза новых (+)-цепей, которые в *дальнейшем включаются* в новые вирусные частицы. Таким образом, главный механизм, при помощи которого происходит отбор нуклеотидов в процессе синтеза одноцепочечных полинуклеотидных цепей ДНК, в основных чертах совпадает с механизмом, действующим при репликации двухцепочечной ДНК. Отбор соответствующих нуклеотидов и в этом случае осуществляется по принципу спаривания комплементарных оснований. Однако имеется *и некоторое различие*, так как при этом только одна из двух цепей двойной спирали (а именно (—)-цепь) *функционирует как матрица при образовании* ДНК для дочерних частиц.

Итак, мы теперь знаем, что некоторые вирусы содержат одноцепочечную ДНК. Однако большая часть клеточной ДНК, несомненно, должна существовать в двухцепочечной форме. Это вытекает из следующих соображений: 1) комплементарные цепи содержат не одинаковые, а разные последовательности нуклеотидов и, следовательно, как мы увидим ниже, определяют разные последовательности аминокислот; 2) у бактерий (а, вероятно, также и у многих более высокоорганизованных форм) обычно имеется всего лишь одна копия данного гена. Поэтому если бы действительно большую часть времени существовала только одноцепочечная ДНК, а двухцепочечная образовывалась бы лишь на очень короткий срок в процессе репликации, то после митоза дочерние клетки несли бы совершенно различную генетическую информацию.

ХРОМОСОМЫ ВИРУСОВ И *E. coli* СОДЕРЖАТ ТОЛЬКО ОДНУ МОЛЕКУЛУ ДНК

В ранних опытах по определению молекулярного веса ДНК получали обычно величины $\sim 1 \cdot 10^6$, что, как мы увидим ниже, соответствует величине среднего гена. Поэтому в то время было вполне естественно сопоставлять одиночные молекулы ДНК с одиночными генами. Позднее, однако, выяснилось, что эти первые определения были ошибочными из-за того, что в процессе выделения целостность молекул ДНК нарушалась. В настоящее время установлено, что почти все интактные молекулы

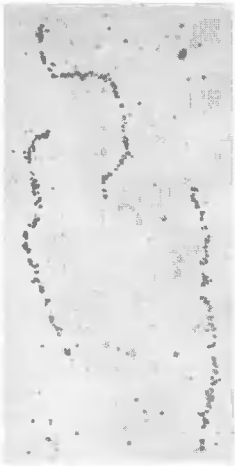


Рис. 9-11. Радиоавтограф нескольких хромосом фага T2. (С любезного разрешения д-ра Корнса.) Общая длина каждой хромосомы 52 мкм

ДНК содержат информацию, соответствующую нескольким генам. Наиболее точные и достоверные определения молекулярных весов ДНК получены для образцов, выделенных из вирусов.

В этом случае не имеет значения, относительно много или мало ДНК содержит вирусная частица; каждая содержит только одну молекулу ДНК. Например, вся ДНК небольшого вируса SV-40 представлена в виде единственной молекулы с мол. весом $3 \cdot 10^6$, тогда как молекула ДНК крупного бактериального вируса T2 имеет мол. вес $1{,}2 \cdot 10^8$ (рис. 9-14). В этих случаях мы должны отождествить вирусные хромосомы (но не гены) с единственной молекулой ДНК. То же самое справедливо в отношении единственной хромосомы клетки *E. coli*; ею является молекула ДНК с мол. весом $\sim 2 \cdot 10^9$. Длина этой молекулы ДНК в вытянутом виде составляет почти миллиметр. Сколько молекул ДНК содержится в отдельных хромосомах высших растений и животных, точно не известно, хотя и в этом случае имеются косвенные указания на то, что их число всегда равно единице. Как бы то ни было, некоторые молекулы ДНК на несколько порядков превосходят по размеру любую другую биологическую молекулу.

КОЛЬЦЕВЫЕ И ЛИНЕЙНЫЕ МОЛЕКУЛЫ ДНК

Ранние данные, полученные главным образом методами радиоавтографии и электронной микроскопии, свидетельствовали о том, что все молекулы ДНК линейны и имеют два конца. Однако, когда оказалось возможным увидеть недеградированные молекулы ДНК, было обнаружено, что многие из них имеют кольцевую форму. Например, хромосома вируса SV-40 находится в частице в виде двухцепочечного кольца, и, как уже упоминалось, некоторые одноцепочечные молекулы ДНК (из фага ϕX174) также имеют форму кольца. Кольцевую форму имеют не только маленькие молекулы ДНК, но и большинство (если не все) бактериальных хромосом.

Кольцевые молекулы ДНК часто закручены сами на себя и образуют супервитки (рис. 9-12). Такие супервитки — результат изменения среднего числа пар оснований, приходящихся на один виток двойной спирали; это изменение происходит в результате удаления белковых компонентов хромосом при выделении чистой ДНК. Абсолютное число витков не может измениться, так как нуклеотиды в перекрученных между собой цепях связаны вместе ковалентными связями. Любое изменение числа пар оснований на виток спирали должно быть скомпенсировано образованием супервитка в противоположном направлении. Тот факт, что практически все очищенные кольцевые ДНК содержат отрицательные супервитки, позволяет предположить, что в процессе репликации ДНК все они покрыты белком. Вместе с тем некоторые кольцевые ДНК не образуют суперспирализованных форм, однако это не противоречит высказанной гипотезе. Все такие простые кольца содержат в полинуклеотидной цепи один или несколько разрывов, которые автоматически позволяют формировать двойную спираль необходимого размера без суперспирализации.

ВЗАИМОПРЕВРАЩЕНИЯ ЛИНЕЙНЫХ И КОЛЬЦЕВЫХ ФОРМ

Иногда молекула ДНК, которая при выделении из вирусной частицы (например, фага λ) линейна, внутри клетки обнаруживается в кольцевой форме. Следовательно, линейные и кольцевые формы молекул ДНК могут переходить друг в друга. Молекулярный механизм превращения

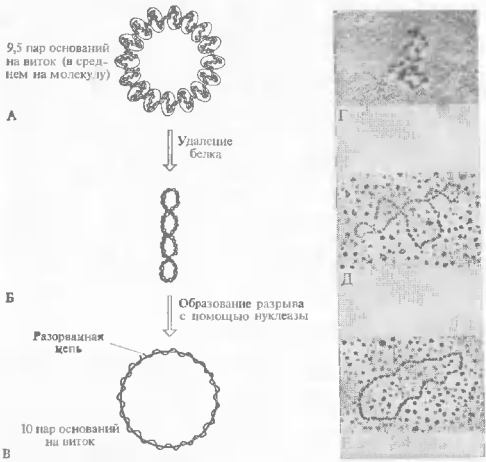


Рис. 9-12. Различные конформации ДНК вируса SV-40.
А. ДНК находится в комплексе с белком (минихромосома), состоящим из повторяющихся элементов упаковки. Каждый из элементов включает упакованную двухцепочечную ДНК и белок. *Б*. Очищенная ДНК принимает суперспирализованную конформацию. *В*. При внесении в одну из цепей одного разрыва ДНК релаксирует. *Г*. Вид минихромосомы в электронном микроскопе. Обратите внимание, что она не находится в суперспирализованной конформации (Germond et al., Proc. Nat. Acad. Sci, USA, 72, 1975). *Д*. Электронная микрофотография ковалентно замкнутой суперспирализованной ДНК. (С любезного разрешения д-ра Дэнциелла.) *Е*. Электронная микрофотография релаксированной формы ДНК, образовавшейся при мягкой обработке нуклеазой. (С любезного разрешения д-ра Дэнциелла.)

кольцевой ДНК в линейную и обратно показан на рис. 9-13. Специфический фермент (или ферменты) вносит в замкнутую кольцевую молекулу два разрыва: один — в (+)-, а другой — в (−)-цепи. Поскольку эти разрывы расположены очень близко друг к другу, водородные связи между ними разрушаются в результате теплового движения и кольцо раскрывается. Важно отметить, что образующаяся линейная молекула содержит одноцепочечные концы с комплементарной последовательностью оснований (липкие концы). Поэтому впоследствии линейная молекула может восстановить кольцевую конфигурацию путем спаривания оснований липких концов. Когда недостающие фосфодиэфирные связи восстанавливаются, снова образуется ковалентно замкнутое кольцо.

Имеются надежные данные в пользу этого механизма переходов ДНК фага λ из кольцевой в палочковидную форму и обратно. Дальше мы увидим, что при удвоении таких ДНК с липкими концами образуются кольцевые репликативные промежуточные продукты. По-видимому, пало-

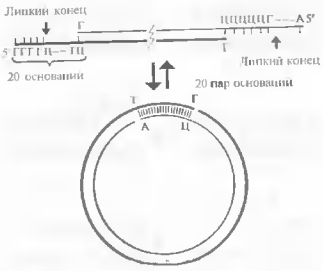


Рис. 9-13. Взаимопревращение линейной и кольцевой форм ДНК фага λ.

чковидная форма обеспечивает некоторые преимущества при введении фаговой хромосомы через тонкий отросток. Важно отметить, что многие другие линейные молекулы ДНК, например ДНК фага T7, также имеют потенциальные липкие концы, но никогда не переходят in vivo в кольцевую форму. Таким образом, кольцевая конфигурация, вероятно, не обязательна для репликации ДНК.

ОБРАЗОВАНИЕ СТРОГО ОПРЕДЕЛЕННЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК ПРИ ДЕЙСТВИИ ФЕРМЕНТОВ РЕСТРИКЦИИ

Ферменты, разрывающие фосфодиэфирные связи в полинуклеотидных цепях, называются нуклеазами. Нуклеазы, разрывающие предпочтительно внутренние связи, носят название эндонуклеаз, а те, что отщепляют концевые нуклеотиды, — экзонуклеаз (рис. 9-14).

В течение долгого времени считалось, что все эндонуклеазы относительно неспецифичны и расщепляют в полинуклеотидах связи внутри самых различных последовательностей нуклеотидов. Однако в течение последних нескольких лет был открыт новый класс эндонуклеаз микробного происхождения, действие которых ограничено весьма специфичными нуклеотидными последовательностями. Эти специфические нуклеазы, которые называют *ферментами рестрикции* (рестриктазами), разрывают цепь только в последовательностях, обладающих симметрией второго порядка относительно определенной оси, например:

ААГ ЦТТ
ТТЦ ГАА

Поскольку в обеих цепях обнаруживается одна и та же последовательность, расположенная в противоположных направлениях, такие ферменты всегда образуют разрывы в обеих цепях. Описано много рестриктаз с различной специфичностью (табл. 9-3), что дает возможность расщеплять данные молекулы ДНК на ряд определенных более мелких фрагментов. Например, рестриктаза Eco RI узнает последовательность, представленную в ДНК вируса SV-40 (мол. вес $3 \cdot 10^6$) один раз, а рестриктаза Hind II расщепляет ДНК SV-40 в 5 различных местах (рис. 20-41). Кроме того, последовательности, присутствующие в одной ДНК, часто отсут-

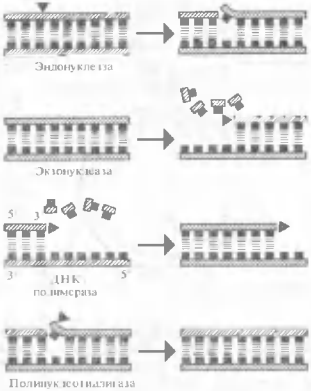


Рис. 9-14. Схема действия ферментов четырех различных типов, расщепляющих и синтезирующих связи остова ДНК.

ствуют в других ДНК. Например, ДНК фага f7 (мол. вес. $25 \cdot 10^6$) не содержит ни одной последовательности, узнаваемой ферментом Eco RI:

ГАА ТТЦ
ЦТТ ААГ

Рестриктазы в настоящее время стали важнейшим инструментом изучения ДНК. Они не только позволяют превращать кольцевые молекулы в линейные, имеющие определенные концевые последовательности, но дают также возможность выделить достаточно короткие фрагменты ДНК, в которых можно непосредственно определить последовательность нуклеотидов. Еще два года назад даже маленькие молекулы ДНК казались слишком большими, чтобы можно было всерьез заняться изучением их последовательностей нуклеотидов. Однако в настоящее время можно с помощью довольно простых методов определить последовательность 50—100 нуклеотидов (рис. 9-15).

ПАЛИНДРОМЫ

Неожиданным следствием расшифровки последовательностей нуклеотидов ДНК было обнаружение широко распространенных инвертированных повторяющихся последовательностей (палиндромов), в которых одна и та же (или почти одна и та же) последовательность располагается в двух цепях в противоположных направлениях симметрично относительно оси симметрии в середине палиндрома (например, ...ГТАТЦЦГТАТАЦ... / ...ЦАТАГГЦЦТАТГ...)

Некоторые палиндромы, например палиндромы, узнаваемые той или иной рестриктазой (табл. 9-3), относительно коротки (от 3 до 10 оснований

Таблица 9.3 Последовательности, узнаваемые некоторыми рестриктазами

Микроорганизм, из которого выделяют эндонуклеазу	Обозначение фермента	Участок узнавания: расщепляемая связь	Участок узнавания: ось симметрии	Число мест узнавания в геномах некоторых вирусов: SV-40 [1]	Число мест узнавания в геномах некоторых вирусов: λ [2]	Число мест узнавания в геномах некоторых вирусов: Аденовирус 2 [3]
Escherichia coli KY13	Eco RI	5′ ↓ ГАА / ЦТТ	ТТЦ / ААГ	1	5	5
Hemophilus influenzae Rd	Hind II	5′ ↘ ГТПир / ЦАПур	↑ ПурАЦ / ПирТГ	5	34	720
	Hind III	5′ ↓ ААГ / ТТЦ	↖ ЦТТ / ГАА	6	6	11
Hemophilus parainfluenzae	Hpa I	5′ ↘ ГТТ / ЦАА	↑ ААЦ / ТТГ	3	11	6
	Hpa II	5′ ↓ ЦЦ / ГГ	↖ ГГ / ЦЦ	1	750	750
Hemophilus aegyptius	Hae III	5′ ↘ ГГ / ЦЦ	↑ ЦЦ / ГГ ↖	17	750	750

1) Мол. вес $3 \cdot 10^6$.
2) Мол. вес $32 \cdot 10^6$.
3) Мол. вес $25 \cdot 10^6$.

в одном направлении). Другие гораздо длиннее и состоят из сотен пар оснований. Многие короткие палиндромы служат, по всей вероятности, участками узнавания в ДНК для олигомерных белков, состоящих из идентичных субъединиц. Однако роль более длинных палиндромов совершенно неясна. Возможно, они иногда претерпевают пространственную перестройку, при которой комплементарные последовательности одной цепи спариваются и образуют крестообразные (шпилечные) петли, выступающие из основной двойной спирали (рис. 9.15, *Б*). Такие петли могут иногда участвовать в узнавании ДНК связывающимися с ней белками.

Как бы то ни было, участки цепей РНК, транскрибированные с палиндромов, должны стремиться образовывать шпилечные петли, связанные водородными связями, а их стабильность должна непосредственно зависеть от степени совершенства симметрии палиндромных последовательностей. Таким образом, многие палиндромы, возможно, возникли для обеспечения структурной компактности считываемой с них РНК.

КАРТЫ ЧАСТИЧНОЙ ДЕНАТУРАЦИИ

Непродолжительное воздействие денатурирующих факторов (например, высокой температуры, высоких или низких значений pH, веществ, разрушающих водородные связи) на линейные молекулы ДНК вызывает прежде всего расплетание участков, богатых АТ-парами, а участки, которые удерживаются преимущественно значительно более прочными ГЦ-

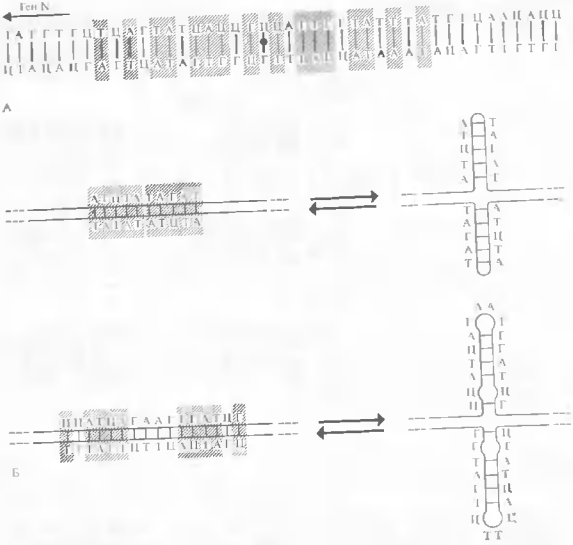


Рис. 9-15. *А*. Участок оператора ДНК фага λ (O_L) длиной в 45 пар оснований, участвующего в регуляции выражения гена. Заштрихованы фрагменты, образующие несовершенный палиндром (его середина обозначена черной точкой). *Б*. Показано, как инвертированные повторяющиеся последовательности (палиндромы) могут образовывать петли в форме шпилек. Обратите внимание, что несовершенный палиндром, изображенный внизу, образует несовершенные петли.

парами оснований, остаются интактными. Если частично денатурированные молекулы обработать формальдегидом, одноцепочечные участки стабилизируются, так как формальдегид взаимодействует со свободными аминогруппами аденина и препятствует восстановлению АТ-пар. При изучении молекул, обработанных таким образом, с помощью электронной микроскопии расплавленные участки выявляются в виде одноцепочечных «пузырей», располагающихся в одних и тех же местах молекул ДНК определенного типа (рис. 9-16). Получаемые при этом карты денатурации предоставляют возможность легко различать концы линейных молекул ДНК и таким образом точно определять, в каком месте (или местах) начинается репликация ДНК.

Рис. 9-16. *А*. Электронная микрофотография частично денатурированной молекулы ДНК фага Т7. *Б*. Карта денатурации молекулы, изображенной на фотографии *А*. *В*. Гистограмма, суммирующая расположение одноцепочечных участков у большого числа денатурированных молекул. На фотографии *А* стрелкой отмечена одноцепочечная выступающая петля, которая имелась в молекуле ДНК еще до частичной денатурации. Эта петля образуется из-за того, что была взята не обычная, а гетеродуплексная молекула ДНК фага Т7 (ср. 10). Такая молекула образуется при отжиге выделенных одиночных цепей ДНК фага Т7 дикого типа с цепями молекул ДНК фага Т7, содержащего делецию. С помощью генетического картирования было показано, что делеция расположена вблизи левого конца. Этот дополнительный физический маркер позволяет утверждать, что АТ-богатые участки частичной денатурации расположены на левом конце хромосомы бактериофага. (С любезного разрешения д-ра Вольфсона и д-ра Дрейслера.)

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕПЛИКАЦИИ ЛИНЕЙНОЙ МОЛЕКУЛЫ ДНК С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

В настоящее время легко выделить ДНК в процессе репликации и исследовать ее с помощью электронной микроскопии. Когда это было впервые сделано с линейной ДНК фага Т7, предполагалось, что репликация должна начинаться на одном или обоих концах молекулы, так как на первый взгляд легче представить себе разделение цепей на концах ДНК, чем

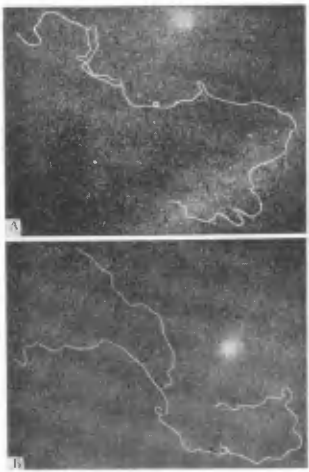


Рис. 9-17. *А.* Электронная микрофотография молекулы ДНК фага Т7, репликация которой только началась. Виден небольшой репликативный пузырь, середина которого находится примерно на расстоянии 17% общей длины ДНК от левого конца генетической карты фага Т7. *Б.* Молекула на более поздней стадии репликации. Ее *Y*-образная форма — результат того, что левая репликативная вилка достигла соответствующего конца. (С любезного разрешения д-ра Вольфсона и д-ра Дресслера.)

на внутреннем участке двойной спирали. Неожиданно оказалось, что репликация начинается на внутреннем участке, всегда в точке, отстоящей на 17% полной длины молекулы от ее левого конца. Как только начинается синтез ДНК, точки репликации начинают двигаться в обоих направлениях, образуя промежуточную структуру, по форме напоминающую глаз:

, которая превращается в молекулы, имеющие форму буквы

Y, когда левая репликативная вилка достигает соответствующего конца ДНК (рис. 9-17). Образование этих структур позволяет с полной определенностью отвергнуть гипотезу двухэтапной репликации, когда цепи родительской ДНК сначала полностью расплетаются и только затем служат матрицами для синтеза новых двойных спиралей. Во всех репликативных промежуточных структурах можно увидеть лишь очень короткие одноцепочечные расплетенные участки. Таким образом, дочерние полинуклеотидные цепи синтезируются почти сразу после расхождения родительских цепей.

ОБЩИЙ РОСТ ЦЕПИ В НАПРАВЛЕНИИ $5' \rightarrow 3'$ И $3' \rightarrow 5'$

Из противоположной направленности двух цепей двойной спирали ($5' \rightarrow 3'$ и $3' \rightarrow 5'$) следует, что две дочерние цепи, синтезирующиеся в каждой из репликативных вилок, также должны быть ориентированы в противо-

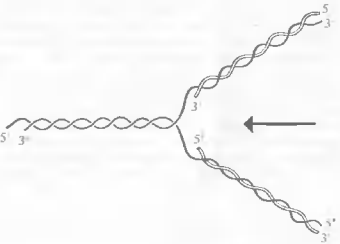


Рис. 9-18. Общее направление роста дочерней цепи в области репликативной вилки.

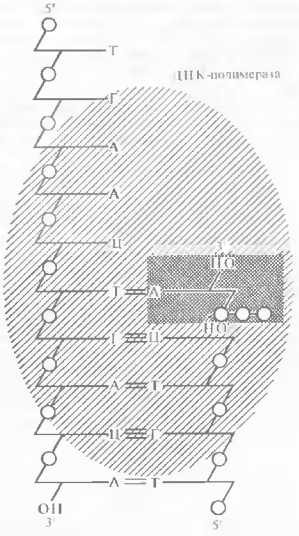


Рис. 9-19. Реакция нуклеозидтрифосфата с 3' ОН-группой растущей цепи ДНК.

положных направлениях. Таким образом, общее направление роста цепи должно быть 5′ → 3′ для одной из дочерних нитей и 3′ → 5′ — для другой (рис. 9-48). Однако, как это ни парадоксально, все известные формы ДНК-полимеразы — единственного фермента, способного присоединять предшественники нуклеотидов к ДНК, — наращивают цепи только в направлении 5′ → 3′. Химическая реакция, которую фермент катализирует, позволяет нуклеозидтрифосфатам взаимодействовать со свободным 3′-концом растущей полинуклеотидной цепи (рис. 9-49). Таким образом, возникает вопрос о существовании других ферментов репликации, в первую очередь ферментов, способных присоединять нуклеотиды к свободным 5′-концам. Несмотря на весьма интенсивные поиски, ни одного фермента с такой специфичностью пока не обнаружено.

КОРОТКИЕ ФРАГМЕНТЫ ДНК — ПРЕДШЕСТВЕННИКИ ДЛИННЫХ ЦЕПЕЙ

Решение казавшейся парадоксальной проблемы синтеза в направлении 3′ → 5′ было получено в результате открытия того, что дезоксинуклеотиды большей частью не присоединяются непосредственно к очень длинным дочерним полинуклеотидам; сначала они обнаруживаются в составе гораздо более коротких цепей ДНК (длиной примерно в 1000 оснований), которые затем присоединяются к основным дочерним цепям под действием соединяющего полинуклеотидные цепи фермента — ДНК-лигазы. Это открытие позволило сделать предположение, что цепь, направление роста которой в целом 3′ → 5′, может образовываться в результате соединения более коротких цепей, каждая из которых синтезируется обычным способом — в направлении 5′ → 3′. В этом случае одни и те же ферменты могли бы обеспечивать синтез всех цепей дочерних ДНК. Доказательство справедливости этого предположения было получено в прямых экспериментах по изучению концов растущих фрагментов, к которым только что были присоединены предшественники нуклеотидов. Все эти эксперименты доказали, что рост происходит исключительно на 3′-конце цепи.

Вначале считалось, что мелкие фрагменты являются предшественниками только цепей, растущих в направлении 3′ → 5′. Но к настоящему времени получены доказательства, что обе дочерние цепи вблизи репликативной вилки формируются соединением мелких фрагментов (рис. 9-20). Это означает, что расхождение цепей родительской ДНК в области репликативной вилки не является прямым следствием включения нуклеотидов, но что существует некая сила, под действием которой возникают протяженные одноцепочечные участки впереди точек роста. Такие участки возникают главным образом под действием так называемых *расплетающих белков*. Расплетающие белки связываются только с одноцепочечной ДНК и если их количество велико, дестабилизируют двойные спирали и способствуют их расхождению на отдельные цепи. С каждой репликативной вилкой связано около 200 молекул расплетающего белка, а каждая молекула белка связывается с 8—10 нуклеотидами. Таким образом, каждая ветвь репликативной вилки содержит примерно 2000 неспаренных оснований, и на этих участках может происходить инициация синтеза коротких фрагментов ДНК.

ТРИ ФОРМЫ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ

Когда была открыта и исследована первая ДНК-полимераза — ДНК-полимераза I, механизм образования полных цепей ДНК казался довольно простым. Однако к настоящему времени стало ясно, что этот механизм

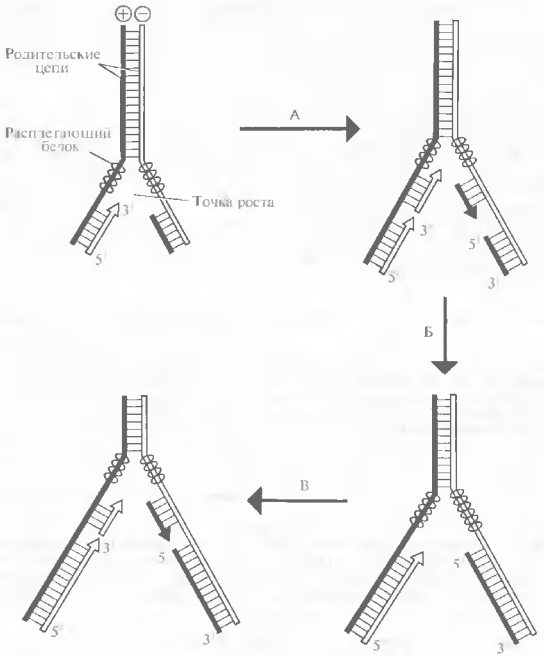


Рис. 9.20. Гипотетическая схема репликации, при которой обе дочерние цепи образуются путем соединения коротких фрагментов, синтезирующихся в направлении 5′ → 3′. *А.* Частичное расхождение родительской двойной спирали и последующий синтез коротких фрагментов на родительских (+)- и (−)-цепях в направлении 5′ → 3′. *Б.* Ферментативное присоединение коротких фрагментов к дочерним (+)- и (−)-цепям и расплетание очередного участка нереплицированной родительской двойной спирали. *В.* На только что открывшихся одноцепочечных матрицах синтезируются новые короткие фрагменты.

очень сложен. За прошедшее время в *E. coli* были идентифицированы по крайней мере три различные ДНК-полимеразы, и было бы удивительно, если бы их функции не различались между собой (табл. 9-4). Долгое время считалось, что ДНК-полимераза I — основной фермент, соединяющий дезоксинуклеотиды; теперь мы знаем, что основной полимеризующий фермент — ДНК-полимераза III, последняя по времени открытия. В отличие от нее ДНК-полимераза I используется главным образом для запол-

Таблица 9-4 Свойства ДНК-полимераз *E. coli* [1])

	Пол I	Пол II	Пол III
Функции			
Полимеризация 5′ → 3′	—	+	+
Экзонуклеазное расщепление 5′ → 3′	+	—	—
Экзонуклеазное расщепление 3′ → 5′	+	+	+
Активность			
Ингибирование при высокой концентрации соли	—	—	+
Сродство к предшественникам-трифосфатам	Низкое	Низкое	Высокое
Ингибирование реагентами, блокирующими SH-группы	—	+	+
Общие свойства	Одна полипептидная цепь	Одна полипептидная цепь	Две полипептидные цепи 140 000 + 40 000
Мол. вес	109 000	120 000	180 000
Число молекул на клетку	400	100	10
Число нуклеотидов, полимеризованных при 37 °С за 1 мин на молекулу	~ 1000	~ 50	~ 15 000

[1]) А. Корнберг, Синтез ДНК, «Мир», 1977.

нения пробелов между мелкими фрагментами-предшественниками (рис. 9-20). Какую функцию выполняет ДНК-полимераза II, неизвестно. Поскольку существуют мутантные клетки, содержащие очень мало молекул ДНК-полимеразы II, может оказаться, что она не является необходимой для клетки. Исследование ее роли, видимо, непростая задача.

ИСПРАВЛЕНИЕ ОШИБОК С ПОМОЩЬЮ 3′ → 5′-ЭКЗОНУКЛЕАЗЫ

После тщательной очистки всех трех форм ДНК-полимеразы было обнаружено, что каждый из трех ферментов, помимо полимеризующей активности, обладает экзонуклеазной активностью, действующей в направлении 3′ → 5′. Наличие экзонуклеазной активности с такой специфичностью означает, что каждая молекула полимеразы обладает способностью не только продолжать синтез цепи после присоединения очередных нуклеотидов, но и отщеплять только что присоединенные нуклеотиды.

Даже при небольших концентрациях предшественников-дезоксинуклеозидтрифосфатов синтез сильно преобладает над деградацией. Возникает вопрос, почему способность к расщеплению ДНК с такой специфичностью должна обязательно сочетаться с полимеризующей активностью. На первый взгляд наличие специфической нуклеазной активности бессмысленно. Однако, как только было показано, что она воздействует предпочтительно на неправильно спаренные основания, ее необходимость стала очевидной. Если к растущей цепи случайно присоединяется неправильный нуклеотид, весьма велика вероятность, что он будет удален

до того, как будет присоединен следующий. $3' \rightarrow 5'$-экзонуклеазная активность обеспечивает, таким образом, исправление ошибок в процессе синтеза. В результате репликация ДНК происходит с гораздо большей точностью, чем в отсутствие подобного отбора, когда присоединение необходимого нуклеотида зависело бы только от однократного спаривания оснований.

Возможно, необходимость постоянного исправления ошибок объясняет тот факт, что ни один фермент не присоединяет дезоксинуклеотиды в направлении $3' \rightarrow 5'$. Если бы рост цепи происходил таким образом, растущий конец содержал бы трифосфатную группу. Ее богатые энергией связи необходимы для присоединения очередного нуклеотида (рис. 9-21). При удалении дезоксинуклеотидов в процессе исправления ошибок с конца такой молекулы, несущего трифосфатную группу, образовывались бы цепи с 5'-OH на конце, неспособные из-за недостатка энергии к дальнейшему наращиванию, пока в синтез не будут вовлечены новые источники энергии. Такая задача могла бы выполняться в реакции, подобной лигазной, но этот этап настолько замедлял бы репликацию ДНК, что его участие в данном процессе было бы просто бессмысленным.

ИНИЦИАЦИЯ ЦЕПЕЙ ДНК РНК-ЗАТРАВКАМИ

Когда была точно установлена специфичность различных ДНК-полимераз, неожиданно оказалось, что каждый из этих ферментов способен лишь присоединять нуклеотиды к предшествующим полинуклеотидным цепям. Ни один из них не может инициировать синтез новых цепей ДНК. Таким образом, возник вопрос о существовании еще не открытых ДНК-полимераз, единственной функцией которых была бы инициация новых цепей ДНК. Теперь мы знаем, что таких полимераз нет: недавно было обнаружено, что к 5'-концам многих новосинтезированных цепей ДНК присоединены короткие участки РНК.

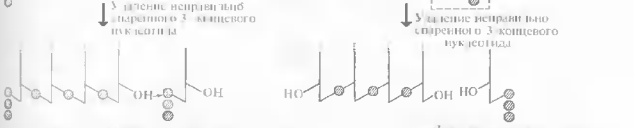


Рис. 9-21. Преимущество роста цепи в направлении $5' \rightarrow 3'$ для механизма репликации, требующего системы коррекции.

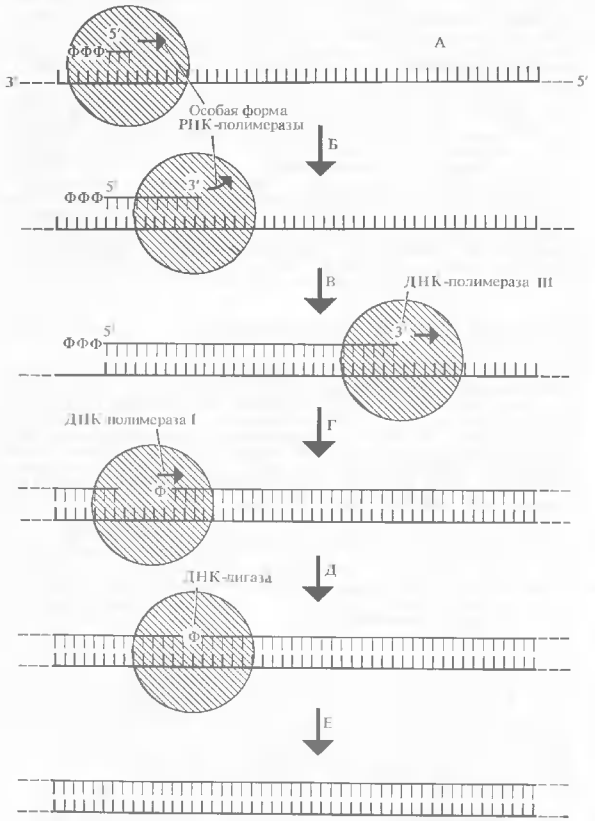


Рис. 9-22. Использование РНК-затравки при инициации синтеза ДНК.
А. Инициация роста РНК-затравки в точке начала синтеза ДНК; *Б*. Рост РНК-затравки в направлении 5′ → 3′ и последующая диссоциация РНК-полимеразы; *В*. Присоединение к РНК-затравке дезоксинуклеотидов, катализируемое ДНК-полимеразой III; *Г*. Одновременное расщепление РНК-затравки и наращивание основной цепи ДНК под действием ДНК-полимеразы I. *Д*. РНК-затравка полностью удаляется и основная цепь ДНК продолжает наращиваться. Связывание ДНК-лигазы в место разрыва. *Е*. Присоединение фрагмента к основной цепи под действием лигазы.

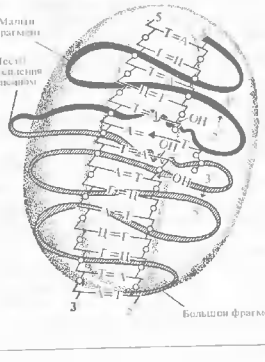


Рис. 9-23. Общая схема ДНК-полимеразы I, на которой показана ее единственная полипептидная цепь. (А. Корнберг, Синтез ДНК, Мир, М., 1977).
Трипсин расщепляет цепь на малый фрагмент, обладающий активностью 5'→3'-экзонуклеазы, и большой фрагмент, обладающий активностями полимеразы и 3'→5'-экзонуклеазы.

Следовательно, точки начала репликации ДНК могут узнаваться не ДНК-полимеразой, а одной из форм РНК-полимеразы — группы ферментов, роль которых состоит в синтезе комплементарных цепей РНК на матрице ДНК (гл. 11). После связывания РНК-полимеразы, инициирующей синтез цепи, несколько рибонуклеотидов последовательно соединяются до тех пор, пока не будет считан стоп-сигнал. Тогда фермент отделяется, оставляя короткую цепь РНК, связанную с ДНК-матрицей. Эта РНК служит затравкой, к которой ДНК-полимераза III присоединяет дезоксинуклеотиды (рис. 9-22).

Удаление РНК-затравки происходит позднее под действием другого фермента (или ферментов), который способен расщеплять РНК в составе гибридов РНК — ДНК. Один из ферментов, обладающих этой активностью — ДНК-полимераза I, основная функция которой, по-видимому, состоит в заполнении одноцепочечных пробелов между фрагментами ДНК, инициированными с помощью РНК. При этом она присоединяет дезоксинуклеотиды к 3'-концу фрагмента позади себя и одновременно вышепляет РНК-затравку, расположенную впереди. Вырезание рибонуклеотидов катализируется активным центром, совершенно отличным от активного центра, участвующего в исправлении ошибок в направлении 3'→5' (рис. 9-23). С помощью 5'→3'-экзонуклеазной активности могут удаляться и дезоксирибонуклеотиды, и рибонуклеотиды, так что ее функция не ограничивается лишь удалением затравки. Как мы увидим далее, ДНК-полимераза I используется также при удалении участков ДНК, поврежденных при облучении.

Не все РНК-затравки вышепляются ДНК-полимеразой I. Те затравки, которые соединяются с обеих сторон с ДНК, вырезаются специальными эндонуклеазами, подобными рибонуклеазе H, которая специфически вырезает рибонуклеиновый компонент в гибридных участках.

Природа нуклеотидной последовательности (или последовательностей), дающей сигнал начала репликации, до сих пор не исследована. Однако в ближайшем будущем, по-видимому, будет возможна расшифровка последовательностей фрагментов вирусной ДНК, содержащих «начало» репликации, и можно надеяться, что эти последовательности имеют

общие свойства. В настоящее время интенсивно исследуется форма (или формы) РНК-полимеразы, синтезирующая РНК-затравку. Имеются косвенные данные, указывающие на то, что некоторые затравки синтезируются модифицированными РНК-полимеразами, содержащими «фактор начала репликации», но только сейчас начинается изучение этого фактора на молекулярном уровне. Возможно, пройдет немало времени, прежде чем мы поймем, в чем состоит ключевая роль РНК-полимеразы в синтезе РНК и ДНК. В частности, следует обратить внимание на то, что РНК-затравки нужны не только для инициации множества мелких фрагментов, образующихся при перемещении репликативных вилок, но и при инициации синтеза ДНК в точке начала репликации.

Можно надеяться, что на каком-то этапе этих исследований мы поймем, почему РНК-затравки так широко распространены. В настоящее время единственная более или менее правдоподобная гипотеза состоит в том, что они предупреждают возникновение ошибок в точках, где начинается синтез цепей ДНК. Видимо, укладка первых нескольких нуклеотидов вдоль матрицы ДНК происходит менее точно, чем присоединение нуклеотидов к уже сформировавшемуся длинному участку двойной спирали. Таким образом, механизм инициации, позволяющий легко разлучать и впоследствии удалять начальную последовательность нуклеотидов, обеспечивает большое преимущество в процессе отбора.

ФОРМИРОВАНИЕ КОНЦОВ ЛИНЕЙНЫХ МОЛЕКУЛ ДНК

Из того факта, что РНК-затравки обычно удаляются, следует вопрос о формировании концов линейных молекул ДНК. Поскольку на 3′-конце матричной цепи необходим небольшой фрагмент РНК, должен существовать какой-то способ заделывания одноцепочечных пробелов, образующихся при удалении рибонуклеотидов (рис. 9-24). Однако в ДНК фага T7 нет подобных пробелов на концах и все дезоксинуклеотиды концевых участков нормально спарены. Решение вопроса о том, как все-таки образуются полные молекулы без пробелов, вытекает из сопоставления двух неожиданных свойств, характеризующих большинство линейных ДНК. Во-первых, линейные ДНК обычно имеют избыточные последовательности на концах — последовательность на левом конце в точности повторяется на правом. Во-вторых, при репликации линейных молекул сразу не образуются дочерние молекулы нормальной длины, а возникают очень длинные конкатемеры, содержащие многократно повторяющуюся последовательность генома.

Причина, по которой синтез линейной ДНК должен проходить через стадию конкатемеров, состоит в том, что при начальной репликации линейной двойной спирали образуются две неполные дочерние молекулы. Один конец каждой из них реплицирован полностью, а другой содержит одноцепочечный 3′-конец. Благодаря избыточным концевым последовательностям последовательности обоих 3′-концов комплементарны друг другу, они могут спариться и образовать конкатемер длиной в две единицы длины исходной ДНК (рис. 9-25). После заполнения оставшихся одноцепочечных пробелов и сшивания цепей лигазой этот димер снова может реплицироваться и образовать две неполные дочерние молекулы, которые будут сшиваться друг с другом, образуя тетрамер, и т. д. Молекулы единичной длины могут образоваться из таких конкатемеров под действием специфических эндонуклеаз, разрезающих две цепи ДНК, причем разрезы сдвинуты относительно друг друга. Продукты такого разрезания имеют небольшие одноцепочечные 5′-концы, и соответствующие пробелы могут быть легко заполнены ДНК-полимеразой. При этом получаются двухцепочечные молекулы, идентичные исходной родительской молекуле.

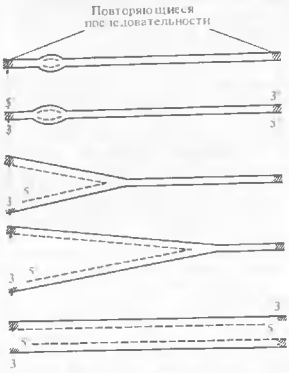


Рис. 9-24. Неполная репликация 3'-концов линейной молекулы ДНК фага Т7.

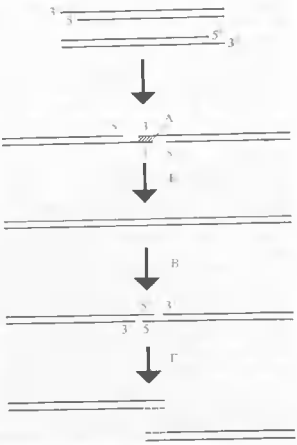


Рис. 9-25. Использование конкатемеров для полной репликации линейной ДНК фага Т7. *А.* Спаривание оснований комплементарных 3'-концов. *Б.* Заполнение пробелов с помощью ДНК-полимеразы I и лигазы. *В.* Расщепление специфической нуклеазой в строго определенных местах. *Г.* Полимеризация на 3'-концах.

В случае репликации кольцевой ДНК проблемы заполнения пробелов не возникает. Одноцепочечные пробелы на месте удаленных РНК-затравок немедленно заполняются при наращивании 3′-конца, перемещающегося по кольцу.

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СТРУКТУРЫ РЕПЛИКАЦИИ КОЛЬЦЕВОЙ ДНК, ИМЕЮЩИЕ КОНФИГУРАЦИЮ, НАПОМИНАЮЩУЮ ГРЕЧЕСКУЮ БУКВУ Θ

При удвоении кольцевой ДНК временное образование линейной ДНК не обязательно. Изучение репликативных промежуточных продуктов многих кольцевых хромосом с помощью электронной микроскопии показало, что цепи родительской ДНК на протяжении всей репликации сохраняют кольцевую конфигурацию (рис. 9-26). Они всегда имеют форму греческой буквы Θ, возникающую при инициации пузыря репликации в определенной точке (начало репликации) (рис. 9-27). Например, начало репликации в кольцевой ДНК фага λ расположено вблизи гена O и синтез происходит в обе стороны, по часовой стрелке и против нее (рис. 9-28). Начало репликации в хромосоме *E. coli* в норме расположено вблизи локуса ilv в районе 74 мин стандартной генетической карты. И в этом случае репликация идет в обоих направлениях.

С момента открытия кольцевой ДНК остается нерешенным вопрос о том, каким образом две ковалентно замкнутые переплетенные цепи могут расплетаться во время репликации. До тех пор пока они остаются интактными, даже небольшое раскручивание какого-либо участка кольцевой двухцепочечной молекулы требует образования супервитков противоположного направления. Следовательно, для полуконсервативной репликации такой ДНК обязательно нужно ввести временные разрывы в одну или в обе полинуклеотидные цепи. Сразу же возникает вопрос: как и на каком этапе репликации образуются эти разрывы? И являются ли они результатом случайного действия нуклеаз или существуют специфические разрезающие ферменты, основная функция которых — сделать возможным раскручивание цепей родительской ДНК?

Вначале рассматривалась возможность существования некоего постоянного молекулярного шарнира, вокруг которого вращаются родительские цепи. В настоящее время складывается впечатление, что такие разрывы обычно существуют в течение очень коротких промежутков времени и могут возникать только в одной из родительских цепей. Действительно, простой разрыв в одной из полинуклеотидных цепей приводит к появлению подобного шарнира, так как вокруг большинства ординарных связей, образующих остов полинуклеотида, возможно свободное вращение. Однако этот механизм, по крайней мере в такой простейшей форме, не способен обеспечить синтез ДНК, так как при прохождении репликативной вилки через одноцепочечный разрыв репликация на разорванной матричной цепи останавливается.

Значение этого затруднения оказалось в определенном смысле не столь уж важным, когда было обнаружено, что в течение большей части цикла репликации обе родительские цепи остаются интактными, причем нереплицировавшаяся часть θ-промежуточных структур периодически принимает суперспирализованную конформацию. Отсюда следует, что разрывы, обеспечивающие раскручивание, существуют весьма непродолжительное время. На самом деле репликация кольцевой ДНК может начинаться с роста очень маленького репликативного пузыря в составе полностью ковалентно замкнутой ДНК (рис. 9-29). Элонгация цепи внутри этого крошечного пузыря продолжается до того момента, когда увеличение суперспирализованности не начнет препятствовать дальнейшему росту, так как увеличивать число супервитков невозможно по стерическим при-

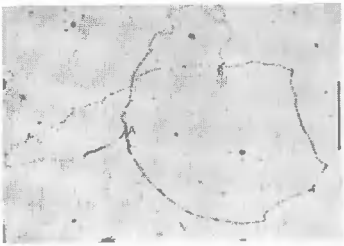


Рис. 9-26. Радиоавтограф, показывающий Y-образные точки роста A и B хромосомы *E. coli* (Cairns, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., XXVIII, 44, 1963). ДНК метили ^{3}H-тимидином на протяжении двух циклов репликации ДНК. Θ-подобная форма молекулы образовалась в результате репликации кольцевой хромосомы на $^2/_3$. Длина вертикальной черты справа — 100 мкм.

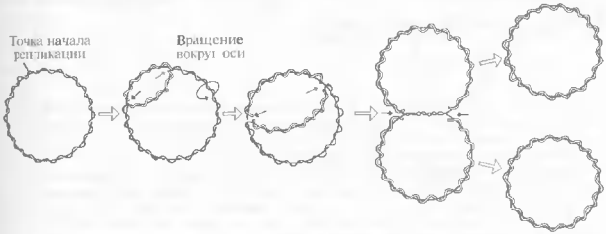


Рис. 9-27. Упрощенная схема репликации кольцевых молекул ДНК в двух направлениях. В электронном микроскопе удается наблюдать лишь некоторые из репликативных промежуточных структур, потому что молекулы, в которых родительские цепи интактны, находятся в суперспирализованной конформации.

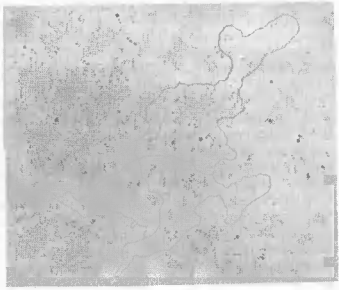


Рис. 9-28. Θ-образная реплицирующаяся молекула ДНК фага λ. (С любезного разрешения д-ра Дресслера, Гарвардский университет.)

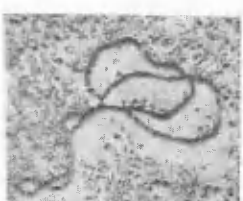


Рис. 9-29. Скрученные реплицирующиеся молекулы кольцевой ДНК вируса SV-40 (Salzman et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol., XXXVIII, 257, 1973).
А. Электронная микрофотография ранней стадии репликации. *Б*. Схема представленной микрофотографии: L1 и L2 — уже реплицировавшиеся участки, L3 — нереплицировавшийся участок в суперспирализованной конфигурации.

чинам. Такие остановившиеся в росте пузыри могут возобновить свой рост только после того, как специфический раскручивающий, или релаксирующий, фермент внесет одноцепочечный разрыв, позволяющий суперспирализованной молекуле релаксировать и превратиться в кольцевую молекулу, не содержащую супервитков. После заделывания разрыва происходит дальнейший рост цепи, снова возникают супервитки, которые опять релаксируют под действием релаксирующего фермента.

В настоящее время ДНК-релаксирующие ферменты выделены из бактериальных клеток и клеток высших животных. Один и тот же фермент вносит одноцепочечные разрывы и затем их заделывает. Как ни странно, для восстановления связей полинуклеотидной цепи дополнительная энергия, видимо, не требуется. Это может быть следствием каталитического механизма, при котором один из концов, образовавшихся в месте разрыва, прикрепляется ковалентной связью к ДНК-релаксирующему ферменту, благодаря чему энергия фосфодиэфирной связи остова сохраняется. После релаксации супервитков эта энергия используется для восстановления разорванной связи. Пока совершенно ясно, действует ли релаксирующий фермент на любые связи в полинуклеотидах или он работает только в специфических участках (например, в точке начала или окончания репликации).

Остается еще выяснить механизм, позволяющий двум родительским цепям разделиться по окончании репликации. Одна из двух цепей должна быть разорвана, но как это происходит и почему при этом не образуется неполная линейная дочерняя молекула, остается загадкой. Вероятнее всего родительские цепи расходятся под действием расплетающих белков далеко впереди того участка, где синтезируются дочерние цепи. Тогда внесение одноцепочечного разрыва релаксирующим ферментом по окончании репликации приводит к расхождению дочерних молекул до того, как они превратятся в ковалентно замкнутые двухцепочечные кольца. Однако эта схема не объясняет, каким образом воссоединяются свободные концы разорванной родительской цепи. По всей вероятности, разрез, позволяющий цепям разойтись, производится в таком участке, где разделенные цепи способны образовать петлю в форме шпильки, подо-

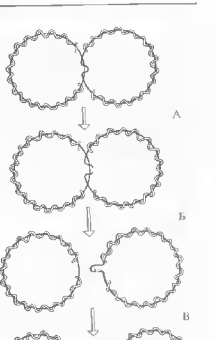


Рис. 9-30. Механизм разделения цепей дочерних кольцевых ДНК. Он включает образование петли в форме шпильки для соединения концов родительской матричной цепи.
А. Одиночный нуклеазный разрыв в репарированном участке. *Б*. Образование петли в форме шпильки и разделение дочерних спиралей. *В*. Замыкание петли лигазой и последующее завершение синтеза дочерних цепей.

бно тому как это происходит в одноцепочечной РНК. Если такая шпилька образуется, то разрезы в петлях могут быть ферментативно устранены под действием лигазы (рис. 9-30).

МОДЕЛЬ КАТЯЩЕГОСЯ КОЛЬЦА

Альтернативный способ репликации кольцевой ДНК описывается *моделью катящегося кольца* (rolling circle). Эта модель объясняет образование новых молекул многих вирусных ДНК, половой процесс у бактерий и амплификацию генов (стр. 513). В соответствии с ней репликация начинается со специфического разрыва в определенной цепи родительского двухцепочечного кольца, благодаря чему эта цепь превращается в полинуклеотид с двумя химически различающимися концами (рис. 9-31). Один из концевых нуклеотидов содержит свободную 3′-ОН-группу углеводного остатка, тогда как другой имеет 5′-фосфатную группу. Этот последний может быть участком связывания того фермента, который производит специфический разрез в последовательности «начала репликации». Синтез ДНК начинается с вытеснения 5′-конца, связанного с ферментом, в раствор, что позволяет ДНК-полимеразе присоединять дезоксинуклеотиды к 3′-ОН-концу. По мере прохождения репликации 5′-конец разорванной цепи вытесняется в виде свободного хвоста и его длина все увеличивается. Эту реплицирующуюся структуру называют катящимся кольцом, так как разматывание свободной одиночной цепи сопровождается вращением двухцепочечной матрицы вокруг своей оси. Такое разматывание не вызывает никаких топологических затруднений, так как кольцо сохраняет свою форму только за счет одной интактной полинуклеотидной цепи, которая свободно вращается вокруг множества ковалентных связей, составляющих ее остов.

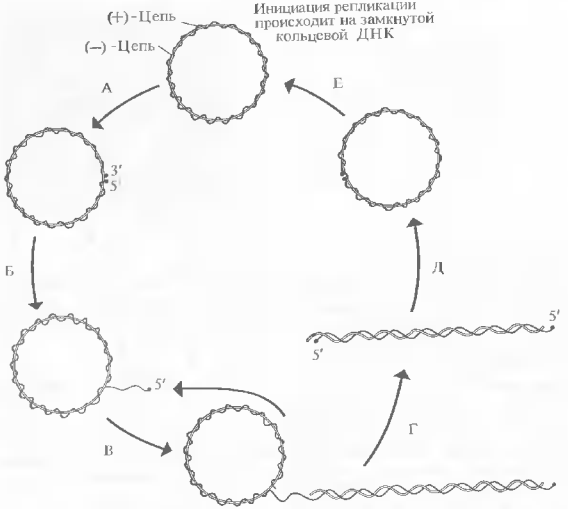


Рис. 9-31. Удвоение кольцевой ДНК по механизму катящегося кольца.
А. Специфичная к определенной последовательности эндонуклеаза вносит одноцепочечный разрыв в (+)-цепь. *Б*. ДНК-полимераза присоединяет нуклеотиды к 3′-концу разорванной цепи и вытесняет 5′-конец. Правильный выбор нуклеотидов обеспечивается водородными связями нуклеотидов с матричной (–)-цепью. По мере того как к (–)-цепи присоединяются новые нуклеотиды, она становится длиннее, чем исходная кольцевая ДНК. *В*. На удлиняющемся хвосте (с 5′-концом) начинается синтез комплементарных фрагментов с образованием двухцепочечной структуры. *Г*. Нуклеаза вырезает фрагменты с липкими концами, равные по длине исходной ДНК. *Д*. Благодаря спариванию липких 5′-концов ДНК переходит в кольцевую форму. *Е*. Лигаза заделывает оставшиеся разрывы.

Если этот механизм используется для репликации двухцепочечной ДНК, то 5′-концевые хвосты служат матрицами для синтеза небольших фрагментов ДНК, которые сразу же сшиваются вместе под действием ДНК-лигазы. Такие растущие хвосты вскоре после своего образования имеют двухцепочечную структуру (рис. 9-32). Элонгация хвостов приводит иногда к тому, что их длина многократно превышает общую длину исходной кольцевой молекулы. Пока не установлено, каким образом эти хвосты превращаются в молекулы ДНК потомства. Скорее всего они разрезаются специфическими ферментами типа тех эндонуклеаз, которые превращают кольцевые молекулы ДНК фага λ в линейные (стр. 206). Образующиеся линейные молекулы ДНК фагового потомства с длиной, равной исходной ДНК, упаковываются в зрелые вирусные частицы (гл. 15). Вместе с тем их одноцепочечные комплементарные концы могут

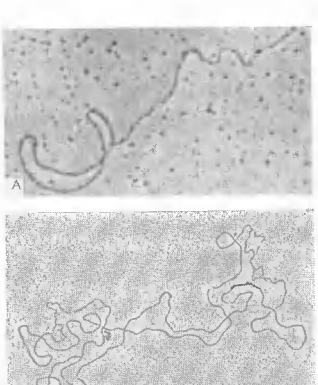


Рис. 9-32. Электронные микрофотографии промежуточных структур репликации, образующихся по механизму катящегося кольца.
А. Одноцепочечная ДНК фага ϕX174. (Слобевного разрешения д-ра Дресслера, Гарвардский университет.) *Б.* Репликация двухцепочечной ДНК фага P2. Условия нанесения препаратов, при которых происходит частичная денатурация, позволяют наблюдать гомологию последовательностей кольца и участков хвоста. (С любезного разрешения д-ра Ингмана, Висконсинский университет.)

использоваться для образования новых кольцевых молекул, способных стать новыми матрицами согласно модели катящегося кольца.

Катящиеся кольца могут быть также промежуточными структурами и при синтезе кольцевой одноцепочечной ДНК (рис. 9-33). Они образуются в том случае, когда новообразованные хвосты покрываются структурными белками вируса почти одновременно с их синтезом. Будучи покрыты белками, они уже не могут превратиться в двухцепочечные молекулы. Каким образом такие покрытые белком одноцепочечные хвосты превращаются в кольцевые молекулы нормальной длины, неизвестно, хотя и в этом случае, как и при образовании замкнутых кольцевых двойных спиралей, вероятнее всего, разрезание и замыкание происходят при участии петель в форме шпилек. Если это так, то можно представить себе, что существует специфический фермент, который разрезает хвосты где-то в шпильках с образованием молекулы, равной по длине исходной ДНК. Впоследствии свободные концы находят друг друга, при этом возникает внутримолекулярная шпилька, разрыв в которой может быть заделан лигазой.

СИНТЕЗ И ПЕРЕНОС ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК ПРИ ПОЛОВОМ ПРОЦЕССЕ У БАКТЕРИЙ

При половом процессе у бактерий та ДНК, которая переносится из мужской клетки в женскую, является одноцепочечной, а не двухцепочечной. Для ее синтеза используется катящееся кольцо, причем сначала в опре-

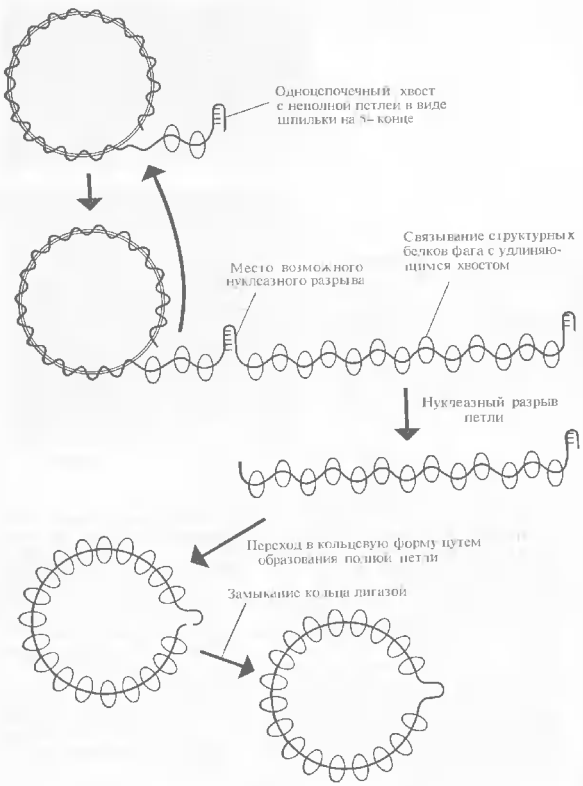


Рис. 9-33. Образование одноцепочечной ДНК по механизму катящегося кольца.
Показаны реакции, которые, как считается, участвуют в образовании одноцепочечных кольцевых ДНК, подобных ДНК фагов φX174 и Id.

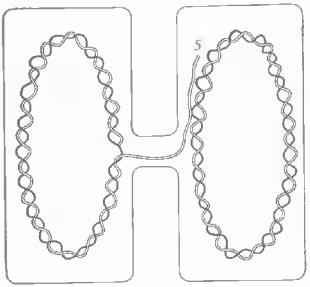
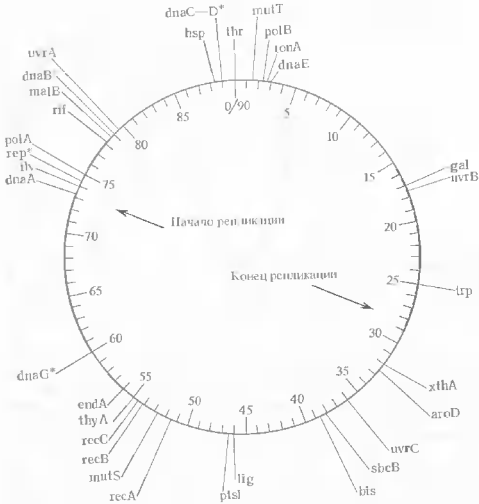


Рис. 9-34. Перенос одноцепочечной ДНК от донорной бактерии в реципиентную по механизму катящегося кольца.

деленной цепи хромосомы мужской клетки образуется одноцепочечный разрыв. Затем 3′-конец этой цепи удлиняется, что приводит к вытеснению 5′-конца и увеличению его длины. По всей вероятности, фермент, который производит специфическое разрезание, подобно ферменту, начинающему синтез на катящемся кольце, остается прикрепленным к 5′-концу и направляет его каким-то образом в реципиентную клетку (рис. 9-34). Как только ДНК донорной клетки оказывается в реципиентной клетке, она превращается в нормальную двухцепочечную ДНК. Затем она может путем генетической рекомбинации заменить часть хромосомы женской клетки. Благодаря этому механизму переноса, связывающему половой процесс с репликацией ДНК, исключается образование генетически дефектных мужских клеток.

МУТАЦИИ, БЛОКИРУЮЩИЕ СИНТЕЗ ДНК

Во многих местах хромосомы *E. coli* были обнаружены мутации, специфически блокирующие синтез ДНК (рис. 9-35). Некоторые из этих мутаций (dna A, dna C) специфически блокируют возникновение новых репликативных вилок, но не влияют на рост предсуществующих вилок. Другие мутации приводят к быстрому прекращению синтеза в предсуществующих репликативных вилках из-за утраты способности к инициации новых мелких фрагментов (например, dna G) или из-за отсутствия ферментов, непосредственно участвующих в полимеризации (dna E = = Пол III). Конечно, некоторые из генов, в которых выявлены эти мутации, направляют синтез белков, участвующих в образовании РНК-затравок. Были также обнаружены мутации, блокирующие способность к полимеризации ДНК-полимеразы I (Пол I) и II (Пол II), а также активность ДНК-лигазы, сшивающей концы цепей. Благодаря этим мутациям синтез не останавливается, во возникает огромное количество несшитых фрагментов ДНК. По-видимому, имеются и другие гены, кодирующие ферменты репликации, однако у нас нет пока прямых данных, свидетельствующих об их существовании. Например, реакция связывания ДНК-полимеразы III с ДНК нуждается в АТФ, и это предполагает наличие еще неизвестного этапа, предшествующего полимеризации, для которого требуется энергия.



Локус	Минуты генетической карты	Роль гена в репликации
mut T	1,5	Мутатор, вызывает трансверсии АТ → → ГЦ
dnc E	2,5	Пол III (Пол III *)
pol B	2,5	Пол II
uvr B	17,5	Вырезание тиминовых димеров
terminus	~ 25	Конец репликации
xth A	32	Экзонуклеаза III
uvr C	36	Вырезание тиминовых димеров
sbc B	38	Экзонуклеаза I
lig	46	Полинуклеотидлигаза
rec A	54,5	Рекомбинация
mut S	52,5	Мутатор
rec B	54,5	Нуклеаза rec BC
rec C	54,5	То же
end A	56	Эндонуклеаза I
dna C	60—65	Репликация ДНК
dna A	78	То же
trp	74	Репликация репликативной формы фагов M13 и φX174
oriC	~ 74	Начало репликации
pol A	75	Пол I
rif	78,5	β-Субъединица РНК-полимеразы (чувствительность к рифампицину)
dna B	~ 79	Репликация ДНК
uvr A	79,5	Вырезание тиминовых димеров
hsp	88,5	Рестрикция и модификация ДНК, эндонуклеаза и метилаза
dna C — D	89	Репликация ДНК

Отсутствуют локусы *thr*, *ton* A, *gal*, *trp*, *ore* D, *his*, *ctr*, *thy* A, *dv* и *mal* B.

Рис. 9-35. Расположение генов, участвующих в репликации, на хромосоме *E. coli* (более подробная карта приведена на рис. 7-13, А. Корнберг, Синтез ДНК, «Мир», М., 1977)

РЕПЛИКАЦИЯ ПОЛНЫХ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫХ МОЛЕКУЛ В ПРОБИРКЕ

Если вначале биохимики были счастливы, когда просто обнаруживали какое-то включение нуклеотидов в ДНК-подобные молекулы, то теперь их требования к экспериментам in vitro сильно возросли. Они не только ищут системы, в которых синтез ДНК идет быстро, но и стремятся найти условия, наиболее близко соответствующие условиям синтеза ДНК in vivo. Конечной целью является, очевидно, синтез полных молекул ДНК, а не просто присоединение нуклеотидов к растущим цепям с неизвестной структурой. Теперь, после ряда успехов, найдены условия, имитирующие условия в растущих клетках. Синтез ДНК в бесклеточных экстрактах не только идет с большой скоростью, но полученные продукты неотличимы от молекул ДНК, образованных внутри клеток. В экстрактах, приготовленных из клеток *E. coli*, исследователям удается синтезировать полные линейные молекулы, достигающие длины ДНК фага T7, а также проводить полную полуконсервативную репликацию кольцевой плазмидной ДНК. В последнем случае репликативные пузыри инициируются in vitro в тех же местах, которые in vivo используются как начало репликации, и Θ-структуры растут до завершения репликации и разделения кольцевых двухцепочечных молекул. Важно отметить, что дочерние кольца могут служить матрицами для последующих циклов полуконсервативной репликации. Можно надеяться, что экстракты, необходимые для репликации in vitro, удастся вскоре расфракционировать, для того чтобы выяснить природу каждого фермента, участвующего в процессе репликации, и механизм его действия. Только тогда пока еще спекулятивные идеи о репликации ДНК будут заменены точным описанием работы ферментов.

В настоящее время изучаются условия превращения одноцепочечной ДНК вирусов вроде ϕX174 и M13 в соответствующие двухцепочечные репликативные промежуточные структуры in vitro. Неожиданно оказалось, что ферменты, участвующие в превращении одноцепочечной ДНК ϕX174 в двухцепочечную репликативную форму, сильно отличаются от ферментов, участвующих в формировании двухцепочечных ДНК M13. В частности, несколько бактериальных «генов репликации ДНК» необходимы для репликации ϕX174, но не нужны для репликации M13 (табл. 9-5). Более того, для образования РНК-затравок фага M13 используется РНК-полимераза, но в синтезе затравок в фаге ϕX174 участвует какой-то другой фермент (или ферменты). Поскольку ингибитор РНК-полимеразы рифампицин подавляет репликацию плазмиды, но не основной бактериальной хромосомы, создается впечатление, что фаг M13 использует

Таблица 9.5 Белки, необходимые для синтеза двухцепочечных ДНК фагов ϕ X174 и M13 [1])

	M13	ϕX174		M13	ϕX174
Инициация			*Элонгация*		
РНК-полимераза	+	—	ДНК-полимераза III	+	+
Продукт гена dna A	—	+ (?)	Расплетающий белок	+	+
Продукт гена dna B	—	+	*Терминация*		
Продукт гена dna C	—	+	ДНК-полимераза I	+	+
Продукт гена dna G	—	+			
Расплетающий белок	+	+	ДНК-лигаза	+	+

1) Schekman et al., Science, 186, 987 (1974).

набор ферментов, который обычно участвует в репликации плазмидной ДНК, тогда как ДНК ϕX174 превращается в двухцепочечную форму при участии несколько отличного набора ферментов, тех, что используются при нормальной репликации основной хромосомы *E. coli*. Если дело обстоит именно так, то мы вынуждены будем признать, что существует не один, а несколько способов репликации весьма сходных на первый взгляд молекул ДНК.

РЕПАРАЦИОННЫЙ СИНТЕЗ

В течение многих лет биохимики считали, что включение предшественников нуклеотидов в ДНК обязательно связано с синтезом новых полинуклеотидных цепей. Сегодня мы знаем, однако, что нуклеотиды могут включаться и в готовые цепи ДНК в ходе ферментативных реакций, в которых происходит репарация повреждений в ДНК. Появление модифицированных оснований или разрывы в цепи в результате облучения не обязательно летальны, если осуществляются соответствующие репарационные процессы. В настоящее время известно несколько типов процессов репарации. В большинстве своем они были впервые обнаружены при изучении мутантов с повышенной чувствительностью к повреждениям при облучении. Последующие биохимические исследования позволили показать, что в этих мутантах отсутствуют определенные процессы репарации. Таким образом, в нормальных клетках многие повреждения, вызванные облучением, обычно репарируются до того, как проявится их действие.

Лучше всего изучено образование тиминовых димеров под действием УФ-облучения. Когда ультрафиолетовый свет поглощается соседними остатками тимина, они соединяются между собой и образуют структуру, показанную на рис. 9-36. Если это повреждение не репарируется, оно летально: сшитые остатки тимина не функционируют в составе матрицы при образовании цепей ДНК потомства. Нормальная репликация возможна только после вырезания димеров. Это происходит в несколько стадий, причем каждая из них катализируется особым ферментом. На первом этапе специфическая эндонуклеаза узнает поврежденный участок и разрезает соответствующую полинуклеотидную цепь с одной стороны от димера. На следующем этапе 5′ → 3′-экзонуклеаза ДНК-полимеразы I отщепляет нуклеотиды по соседству с разрывом. На третьем этапе какой-то фермент, возможно ДНК-полимераза I, заполняет образовавшийся в одной цепи пробел нуклеотидами, присоединяя их к 3′-концу цепи. Наконец, на последнем этапе полинуклеотидлигаза сшивает два конца, заделывая оставшийся разрыв (рис. 9-37).

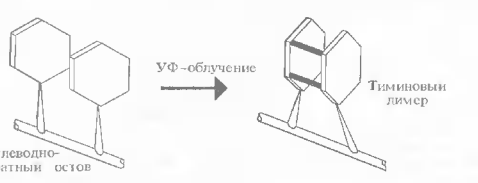


Рис. 9-36. Образование тиминовых димеров при облучении.

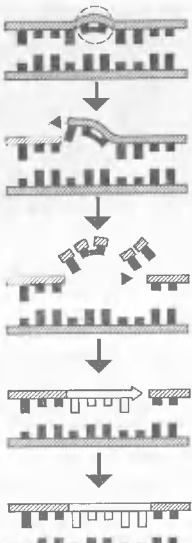


Рис. 9-37. Некоторые ферментативные реакции, протекающие при репарации молекул ДНК, содержащих тиминовые димеры.
А. Нарушение структуры молекулы ДНК, вызванное образованием тиминового димера при УФ-облучении. *Б.* Специфическая эндонуклеаза расщепляет одну из цепей вблизи димера. *В.* Вырезание небольшого участка, включающего тиминовый димер, экзонуклеазой. *Г.* Синтез новой цепи в направлении $5' \rightarrow 3'$. Правильные основания выбираются благодаря спариванию с основаниями интактной цепи. *Д.* Полинуклеотидлигаза соединяет концы разорванной цепи и репарация молекулы завершена.

Имеются доказательства существования процессов репарации практически во всех изученных клетках, от бактерий до высших растений и животных. Это не кажется неожиданным, так как все клетки постоянно подвергаются различным формам облучения. В процессе эволюции клетки, обладавшие ферментативными системами для репарации поврежденных молекул ДНК, должны были иметь огромное преимущество при отборе. К тому же эволюция систем репарации должна быть обязательной предпосылкой развития организмов со все большим количеством ДНК, поскольку чем больше ДНК содержит клетка, тем выше вероятность, что данная доза облучения окажется летальной.

УЧАСТИЕ МЕМБРАН В РЕПЛИКАЦИИ

Рост и деление бактериальной клетки должны включать не только точное удвоение кольцевой ДНК хромосомы с образованием двух идентичных дочерних хромосом, но и их правильное расхождение в две клетки потомства. Поэтому всегда казалось естественным предполагать связь

Рис. 9-38. Прикрепление хромосомы *Bacillus subtilis* к впячиванию бактериальной мембраны (мезосоме). (С любезного разрешения д-ра Райтера, Институт Пастера, Париж.) Я — ядерный хромосомный материал; М — мезосома.

между клеточной мембраной и определенной частью бактериальной хромосомы. Эту связь удалось обнаружить с помощью электронной микроскопии; на микрофотографиях можно заметить места прикрепления хромосомы к погнутым внутрь клетки участкам мембраны, называемым *мезосомами* (рис. 9-38). Кроме того, если при выделении интактных бактериальных хромосом применяют очень мягкую обработку, то часто удается обнаружить, что они связаны с фрагментами мембраны.

Видимо, с мембраной связываются только реплицирующиеся хромосомы. Интересные эксперименты по трансформации ДНК in vivo позволяют предположить, что в этом связывании участвуют преимущественно участки начала и конца репликации ДНК. Возможно, компоненты, ответственные за связывание (белок?), играют активную роль в инициации (терминации) репликации хромосомы. Вместе с тем между ферментами репликативной вилки и мембраной клетки прочные связи не обнаруживаются.

К сожалению, все эти предположения очень трудно доказать, потому что о белковых компонентах любой бактериальной мембраны почти ничего не известно. Возможно, более надежные данные будут получены при изучении репликации ДНК мелких плазмид *E. coli*. Они содержат прочно связанный белок, который может принимать участие не только в образовании одноцепочечных разрывов, но и в прикреплении 5′-конца в месте разрыва к определенному участку бактериальной мембраны. Интенсивные исследования функционирования плазмид могут породить новые концепции, касающиеся не только взаимодействия плазмиды с мембраной, но и поведения основной хромосомы.

ВЫВОДЫ

Главным генетическим материалом является ДНК. Ее молекула обычно состоит из двух полинуклеотидных цепей, закрученных одна вокруг другой в регулярную спираль. Каждая цепь содержит огромное число нуклеотидов. Имеется четыре главных типа нуклеотидов; последовательность нуклеотидов в каждой данной цепи крайне нерегулярна. Цепи удерживаются вместе водородными связями между парами оснований.

Аденин и гуанин (пурины) всегда спариваются соответственно с тимином и цитозином (пиримидины). Существование этих пар оснований означает, что последовательности нуклеотидов в двух цепях не тождественны, а комплементарны. Если известна последовательность в одной цепи, то последовательность в другой определяется автоматически.

При репликации ДНК в клетке цепи разделяются и одиночная цепь служит матрицей для образования новой (комплементарной) цепи. Синтез новых цепей начинается до того, как родительские цепи разделятся полностью. Процессы репликации и разделения цепей идут параллельно. Фермент ДНК-полимераза в присутствии одноцепочечной ДНК-матрицы соединяет между собой мономерные предшественники ДНК (нуклеозидтрифосфаты). Специфическое спаривание оснований с помощью водородных связей отличается большой точностью. Средняя вероятность ошибки при введении нового нуклеотида в оптимальных условиях, по-видимому, не превышает $10^{-8} — 10^{-9}$.

Молекулы ДНК могут иметь линейную или кольцевую форму, причем некоторые линейные молекулы способны превращаться в кольцевые. За исключением молекул ДНК, выделенных из мелких вирусов, большинство молекул ДНК очень велико. Например, хромосома *E. coli* представляет собой кольцевую молекулу ДНК с мол. весом $\sim 2 \cdot 10^9$. И у бактерий и у их вирусов репликация линейных и кольцевых хромосом обычно начинается в определенной точке (точка начала репликации), при этом образуется репликативный пузырь, содержащий две репликативные вилки. В каждой репликативной вилке рост цепи происходит путем присоединения нуклеотидов-предшественников к 3′-концам коротких фрагментов ДНК, которые в свою очередь присоединяются к основным дочерним цепям. Сначала предполагалось, что для репликации ДНК необходим один или лишь несколько ферментов, но теперь известно, что каждой клетке необходимо много таких ферментов. Инициация, элонгация и терминация, а также образование одноцепочечных разрывов, необходимых для расхождения родительских цепей кольцевой ДНК,— каждый из этих этапов требует особых ферментов. Существует несколько различных полимеризующих ферментов (ДНК-полимераз), причем один из них предназначен для элонгации цепи, а другой — для заполнения одноцепочечных проблем между мелкими фрагментами ДНК вблизи репликативных вилок. Ни одна из известных ДНК-полимераз не способна инициировать цепи ДНК; в настоящее время считается, что инициация происходит путем синтеза небольших РНК-затравок, катализируемого одной из форм РНК-полимеразы.

Все ДНК-полимеразы обладают способностью узнавать неправильно спаренные основания и удалять их ферментативным путем до присоединения очередного нуклеотида (исправление ошибок при считывании, или коррекция). Некоторые ферменты, участвующие в репликации ДНК, участвуют также в репарации поврежденных молекул ДНК. Кроме того, имеются косвенные данные, свидетельствующие о том, что один или несколько ферментов, участвующих в инициации (терминации) репликации ДНК, связаны с участками бактериальной мембраны. Правильное расхождение дочерних молекул ДНК в соответствующие дочерние клетки может зависеть от связей такого рода. Однако доказать подобное предположение довольно трудно, так как до сих пор данные о строении бактериальных мембран на молекулярном уровне весьма неполны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Stent G. S., Molecular Genetics, Freeman, San Francisco, 1971. (Г. Стент. Молекулярная генетика, изд-во «Мир», М., 1974.) Блестящий рассказ о возникновении молекулярной генетики.

Davidson J. N., The Biochemistry of Nucleic Acids, 7th ed., Academic Press, 1972. (Дж. Давидсон, Биохимия нуклеиновых кислот, изд-во «Мир», М., 1976.) Расширенное и чрезвычайно полезное переиздание одного из первых учебников по нуклеиновым кислотам.

DNA Synthesis in vitro, Wells R. D. and Inman R. B. (eds.), University Park Press, Baltimore, Md., 1973. Сборник статей, представленных на конференцию в июле 1972 г.

Kornberg A., DNA Synthesis, Freeman, San Francisco, 1974. (А. Корнберг, Синтез ДНК, изд-во «Мир», М., 1977.) Превосходный учебник повышенного типа, который обязательно должны прочесть все, кто интересуется репликацией ДНК.

Watson J. D., Crick F. H. C., Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid, Nature, **177**, 964 (1953).

Meselson M., Stahl F. W., The Replication of DNA in *Escherichia coli*, Proc. Nat. Acad. Sci., **44**, 671 (1958). Описание классического эксперимента молекулярной биологии, показавшего, что при репликации ДНК происходит разделение двух комплементарных полинуклеотидных цепей.

Cairns J., The Bacterial Chromosome, Scientific American, **214**, 36 (1966). Описание изящных опытов, в которых была установлена форма реплицирующейся хромосомы *E. coli*.

Schnos M., Inman R. D., Position of Branch Points in Replicating λ DNA, J. Mol. Biol., **51**, 61 (1970). Доказательство того, что репликация кольцевой ДНК идет в обоих направлениях.

Salzman N. P., Fareed G. C., Sebring E. D., Horen M. M., The Mechanism of SV40 Replication, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, **XXXVIII**, 57 (1973). Результаты экспериментов, продемонстрировавших интактность кольцевой ДНК в процессе репликации.

Gilbert W., Dressler D., DNA Replication: The Rolling Circle Model, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, **XXXIII**, 473 (1969). Описание модели катящегося кольца и ранних экспериментов, подтверждающих ее.

Wolfson J. D., Dressler D., Magazin M., Bacteriophage T7 DNA Replication: A Linear Replicating Intermediate, Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 998 (1972). Первое экспериментальное описание репликации линейной ДНК.

Watson J. D., The Origin of Concatemeric T7 DNA, Nature, New Biology, **239**, 197 (1972). Решение вопроса о том, как может быть завершена репликация концов линейной ДНК.

Gross J., DNA Replication in Bacteria, Current Topics in Microbiology and Immunology, **57**, 39, Springer-Verlag, 1972. Обширный обзор, уделяющий особое внимание мутациям, блокирующим синтез ДНК.

Scheckman R., Weiner A., Kornberg A., Multienzyme Systems of DNA Replication, Science, **186**, 987 (1974). Обзорная статья, подытоживающая данные о существовании в клетках *E. coli* нескольких различных систем репликации ДНК.

Maniatis T., Jeffrey A., Kleid D. G., Nucleotide Sequence of the Rightand Operator of Phage λ, Proc. Nat. Acad. Sci., **72** (1975). Изящная статья, демонстрирующая возможности новых методов расшифровки последовательности ДНК.

Papers in Biochemical Genetics, Mamur J. and Zubay G. (eds.), Holt, Rinehart and Winston, Inc., 1973. Превосходный сборник оригинальных статей по синтезу и регуляции ДНК, РНК и белка.

Getter M., DNA Replication, Ann. Rev. Biochem., **44**, 45 (1975); *Dressler D.*, The Recent Excitement in the DNA Growing Point Problem, Ann. Rev. Microbiology, 29, 525 (1975). Два современных обзора, посвященных главным образом энзимологии репликации ДНК.

ГЛАВА

10 Генетическая организация ДНК

Представление о том, что генетическая информация заключена в последовательностях нуклеотидов ДНК (самая простая из всех возможных гипотез о генетическом коде), существовало еще до открытия двойной спирали ДНК. Однако до тех пор, пока структура ДНК оставалась неизвестной, можно было предполагать, что одного знания порядка расположения нуклеотидов недостаточно для выяснения вопросов, связанных с расшифровкой генетического кода. Истинным ключом к пониманию всей проблемы в целом могла быть какая-нибудь причудливая трехмерная структура, которую нелегко, а может быть и совсем невозможно, было бы вывести из последовательности оснований. К счастью, ДНК представляет собой двойную спираль, сама структура которой указывает на геометрическую равноценность всех нуклеотидов, входящих в ее состав. Это однозначно свидетельствует о том, что генетический код заключен в последовательностях линейно расположенных нуклеотидов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИ МОЖЕТ СУЩЕСТВОВАТЬ ОЧЕНЬ БОЛЬШОЕ ЧИСЛО РАЗЛИЧНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ НУКЛЕОТИДОВ

Поскольку углеводно-фосфатный остов одинаков во всех молекулах ДНК, он не может нести никакой генетической информации. Следовательно, информация должна быть записана в последовательности оснований четырех типов (А, Г, Ц и Т). Это требование, однако, не налагает никаких реальных ограничений на количество информации, которое может быть заключено в ДНК. Молекулы ДНК имеют очень большую длину, и число возможных перестановок в последовательности оснований равно 4^n, где n — число нуклеотидов в данной молекуле. Практически с помощью четырехбуквенного алфавита нуклеиновых кислот можно закодировать бесконечное число генетических «сообщений». Возможное число различных генов с мол. весом 10^6 равно 4^{1600}, что значительно превышает число всех генов, которые могли бы входить в состав всех хромосом, существовавших с момента зарождения жизни.

МУТАЦИИ — ЭТО ИЗМЕНЕНИЯ В ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НУКЛЕОТИДНЫХ ПАР

При составлении генетической карты гена rIIA фага Т4 было обнаружено около 500 участков, в которых могут происходить мутации и между которыми возможны генетические рекомбинации (кроссинговер). Порядок этой величины наводит на мысль о том, что данные участки есть не что иное, как определенные пары оснований в пределах этого гена (рис. 10-1).

Многие мутации — это замены одних пар оснований другими (например, вместо АТ появляется ГЦ, ЦГ или ТА; рис. 10-2). Таким образом, тщательное изучение тонких деталей генетической карты может дать

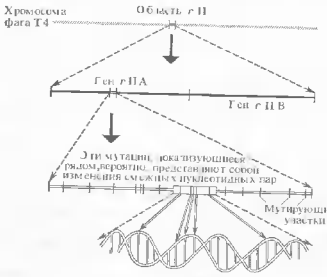


Рис. 10-1. Мутации в области rII хромосомы фага Т4 и структура ДНК. Область rII занимает приблизительно 2% всей генетической карты хромосомы фага Т4 ($4 \cdot 10^5$ пар нуклеотидов). Хромосома фага Т4 содержит $2 \cdot 10^5$ пар нуклеотидов. Область rII состоит из двух отдельных генов — гена rIIA (~2500 пар нуклеотидов) и гена rIIB (~1500 пар нуклеотидов); мутации в любом из этих генов дает фенотип r. В нижней части схемы показан в увеличенном виде небольшой участок гена rIIA (~100 пар нуклеотидов).

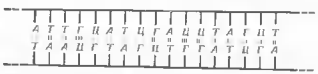
ценные сведения о последовательности пар оснований в молекуле ДНК. Однако необходимо сделать важную оговорку. А priori у нас нет причин думать, что все изменения в генетическом коде обязательно ведут к функциональным изменениям в соответствующих белках. Следовательно, оценивая число нуклеотидных пар по числу обнаруженных мутаций, мы можем получить довольно сильно завышенную оценку.

Большинство одиночных нуклеотидных замен обратимо, и нередко частота обратных мутаций, ведущих к восстановлению нормальной последовательности нуклеотидов, имеет тот же порядок величин, что и частота первичных (прямых) мутаций. Обратные мутации, по всей вероятности, отражают несовершенство процесса репликации: либо не образуются правильные водородные связи (рис. 10-3), либо аденин ошибочно спаривается с гуанином (или же цитозин с тимином). Существуют, однако, и такие (правда, редко встречающиеся) участки генов, в которых частота прямых мутаций резко превышает частоту обратных. Большая часть высокомутабильных нуклеотидных пар (их называют «горячими точками») возникла, вероятно, не в процессе нормальной репликации ДНК, а связана, как мы увидим ниже, с неправильным спариванием оснований при кроссинговере.

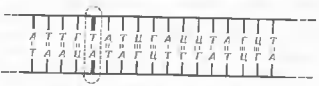
Другой класс спонтанных мутаций — это утраты (делеции) или, наоборот, добавления (вставки) нуклеотидов. Иногда при таких мутациях выпадают сотни и тысячи нуклеотидов; в редких случаях утрачиваются даже целые гены. При больших делециях (вставках) обратные мутации (т. е. восстановление нормальной последовательности нуклеотидов), разумеется, невозможны; обратные мутации происходят лишь при выпадении или добавлении одного нуклеотида, но и то с очень низкой частотой.

КОЛИЧЕСТВО ОШИБОК НА ОДИН ВКЛЮЧЕННЫЙ НУКЛЕОТИД КОЛЕБЛЕТСЯ ОТ 10^{-6} ДО 10^{-9}

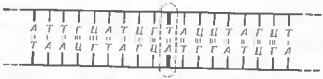
Данные, полученные при определении частоты мутаций для разных бактериальных генов, указывают на то, что на каждые 10^6 дупликаций гена спонтанно возникает в среднем около одной обнаруживаемой мутации. Эти расчеты можно перевести на нуклеотидный уровень только в том



Ген дикого типа



Замена одной пары оснований



Включение одной пары оснований

Выпадение (делеция) шести пар основания

Рис. 10-2. Три типа мутаций, возникающих в результате нарушения последовательности оснований (А, Т, Г и Ц), присоединенных к углеводно-фосфатному остову молекулы ДНК.
Первый тип — простая замена одной пары оснований другой. Второй тип — включение или выпадение одной пары оснований. Третий тип — выпадение (делеция) или включение целой группы нуклеотидов.

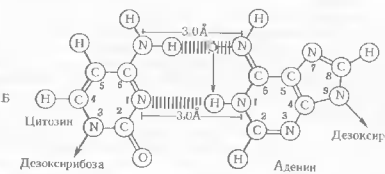


Рис. 10-3. Специфичность спаривания оснований определяется водородными связями (Hayes, The Genetics of Bacteria and Their Viruses, Blackwell, Oxford, 228, 1964)
Водородные связи обозначены вертикальной штриховкой. *А*. Показано, почему цитозин и аденин в нормальной конфигурации (при наиболее стабильном распределении водородных атомов) не спариваются. *Б*. Благодаря таутомерному превращению в аденине (переход Н из аминогруппы при С-6 к N-1) спаривание с цитозином оказывается возможным (нормальное расположение атома водорода показано маленьким пунктирным кружочком). Размеры приблизительные.

случае, если нам удастся определить, какую часть общего количества нуклеотидных пар составляют те пары, которые должны остаться неизменными для обеспечения нормальной функции гена. Если принять, что все пары оснований существенны (для обеспечения нормальной функции гена), то при репликации гена, содержащего 1000 нуклеотидов, ошибка составит приблизительно 10^{-9} на репликацию одного нуклеотида. Однако данные, полученные при изучении двух генов области rII, указывают на то, что во многих случаях замены пар оснований не приводят к выявляемым мутациям. 500 мутирующих участков, обнаруженных в этой области, составляют только одну четвертую часть общего числа пар оснований в этих двух генах. Дальнейшие исследования приведут, безусловно, к обнаружению еще большего числа мутирующих участков, но вряд ли можно ожидать, что для сохранения биологической активности необходимо присутствие более половины всех оснований в их неизменном виде.

Известно, что частота мутаций в области rII больше, чем во многих других участках. В области rII общая частота мутаций (даже если мы исключим «горячие точки») составляет 10^{-4} — 10^{-5}. Это очевидно, означает, что в других участках значительно меньшее число нуклеотидных замен ведет к выявляемым мутациям. Если это действительно так, то общая ошибка может составлять 10^{-7} на репликацию одного нуклеотида.

КОНТРОЛЬ НАД УРОВНЕМ МУТАЦИЙ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ БЛАГОДАРЯ ПРАВИЛЬНОМУ СООТНОШЕНИЮ АКТИВНОСТЕЙ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ: ПОЛИМЕРИЗУЮЩЕЙ И НУКЛЕАЗНОЙ

Вначале предполагали, что наблюдаемая при репликации частота ошибок является прямым отражением той точности, которая присуща самому процессу образования пар оснований А···Т и Г···Ц. Если бы это действительно было так, то тогда только в исключительно редких случаях то или иное основание могло бы принять «неправильную» таутомерную форму (енольную вместо кетоформы или форму имино вместо аминогруппы). Однако прямые химические измерения показали, что различные основания принимают «неправильные» формы со значительно более высокой частотой, чем та, которую можно было бы сопоставить с известными частотами мутаций. Чтобы объяснить это несоответствие, было выдвинуто предположение о том, что электронное окружение участка полимеризации в молекуле ДНК-полимеразы каким-то образом влияет на таутомерную форму связанного с этим участком нуклеотида. Это предположение было общепризнанным на протяжении многих лет, хотя оно всегда казалось спорным с химической точки зрения. К счастью, это затруднение исчезло, как только было обнаружено, что ДНК-полимеразы обладают корректирующей способностью, т. е. способностью исправлять допущенные «опечатки». Таким образом, первоначальная частота ошибок в процессе отбора пар оснований соответствует измеренным частотам образования таутомерных форм и, следовательно, ее величина значительно выше, чем предполагалось вначале. Однако почти все неправильно включенные основания удаляются затем с помощью 3′ → 5′-экзонуклеазы, являющейся компонентом соответствующей ДНК-полимеразы. Все известные в настоящее время ДНК-полимеразы обладают этой активностью. Вначале это обстоятельство казалось весьма загадочным. Однако теперь мы понимаем, что экзонуклеаза является необходимым компонентом механизма, обеспечивающего точную репликацию ДНК.

Действительно, опыты с мутантными ДНК-полимеразами показали, что уровень мутаций можно регулировать путем установления правильного соотношения между активностями прямой реакции, каковой является

$5' \rightarrow 3'$-полимеризация, и обратной, катализируемой $3' \rightarrow 5'$-экзонуклеазой. В случае инактивации $3' \rightarrow 5'$-экзонуклеазы наблюдается аномально высокая частота мутаций, и наоборот, повышенная активность $3' \rightarrow 5'$-экзонуклеазы приводит соответственно к очень низкой частоте мутаций.

Вероятно, уровень спонтанных мутаций для данного вида устанавливается в процессе эволюции. Слишком высокая частота мутаций настолько отягощает вид, что он перестает производить жизнеспособное потомство, между тем как слишком низкая частота мутаций предотвращает появление новых вариантных форм, необходимых для выживания в условиях изменяющейся окружающей среды.

НЕКОТОРЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ МУТАГЕНЫ ВЫЗЫВАЮТ ТОЧНО УСТАНОВЛЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГЕНЕТИЧЕСКОМ КОДЕ

В настоящее время можно уже высказать некоторые правдоподобные предположения относительно механизма воздействия определенных химических мутагенов на генетический код. Азотистая кислота HNO_2, например, очень мощный мутаген, так как она действует на нуклеиновые кислоты, вызывая замену аминогрупп кетогруппами. Она превращает одно основание в другое и тем самым непосредственно изменяет генетическую информацию (рис. 10-4). Некоторые вещества вызывают мутации потому, что они сами включаются в молекулу ДНК. К этой группе относятся аналоги оснований, т. е. вещества, структура которых близка к структуре нормальных компонентов ДНК. Они, видимо, могут включаться в ДНК, не нарушая ее способности к репликации. Однако в силу структурных отличий от нормальных оснований они чаще, чем эти последние, спариваются неправильно, что ведет к ошибкам в процессе репликации. Одним из наиболее мощных мутагенов этого типа является 5-бромурацил (аналог тимина). Как полагают, механизм его мутагенного действия определяется тем, что водородный атом в положении 1 фиксирован у него менее прочно, чем у тимина. Иногда этот водородный атом перемещается к атому кислорода при шестом углеродном атоме (рис. 10-5). В такой енольной форме 5-бромурацил может спариваться с гуанином.

ГЕНЫ РАЗДЕЛЕНЫ МЕЖДУ СОБОЙ ОТНОСИТЕЛЬНО КОРОТКИМИ ПРОМЕЖУТКАМИ

Кроссинговер между двумя мутациями, локализованными на смежных концах двух соседних генов, наблюдается обычно значительно реже, чем между двумя мутациями, локализованными на противоположных концах одного даже самого короткого гена. Это наводит на мысль о том, что во многих случаях соседние гены разделены между собой относительно небольшим числом нуклеотидных пар. Подтвердить это предположение можно будет лишь после того, как с помощью химических методов установят точную последовательность нуклеотидов в нескольких соседних генах. Вплоть до самого последнего времени эта задача казалась практически неосуществимой, однако изобретение новых методов позволило теперь начать работы по определению нуклеотидных последовательностей длинных участков в некоторых вирусных и бактериальных хромосомах. Как мы увидим в гл. 13, самые первые данные относительно межгенных нуклеотидных последовательностей показали, что два вирусных гена разделены между собой группой из 30 нуклеотидных пар. Позже при изучении двух соседних генов, участвующих в синтезе триптофана, были получены данные, свидетельствующие о том, что для разделения двух генов достаточно всего лишь нескольких нуклеотидов.

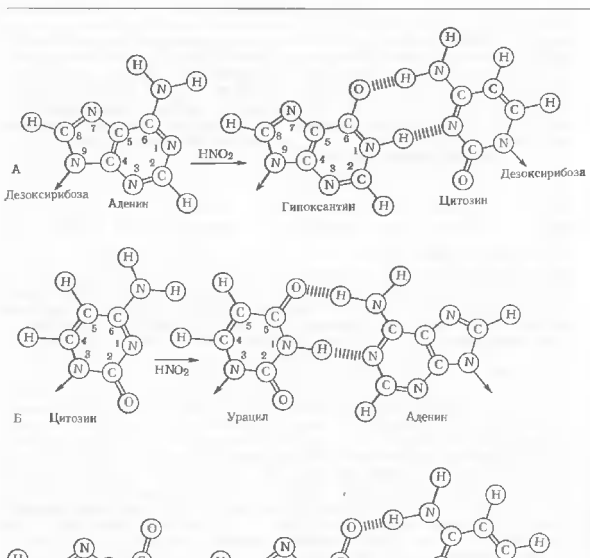


Рис. 10-4. Влияние окислительного дезаминирования оснований ДНК на спаривание оснований (Hayes, The Genetics of Bacteria and Their Viruses, Blackwell, Oxford, 280, 1964). *А*. Аденин дезаминируется до гипоксантина, который спаривается вместо тимина с цитозином. *Б*. Цитозин дезаминируется до урацила, который спаривается с аденином, а не с гуанином. *В*. Гуанин дезаминируется до ксантина, который все же спаривается с цитозином, но при этом всего лишь двумя водородными связями. Тимин (ДНК) и урацил (РНК) не содержат аминогруппы и поэтому не изменяются под воздействием азотистой кислоты.

КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КАРТОЙ И СООТВЕТСТВУЮЩИМ УЧАСТКОМ МОЛЕКУЛЫ ДНК

С тех пор как началось изучение кроссинговера, генетиков не переставал интересовать вопрос о том, насколько точно соответствуют их генетические карты действительно существующим физическим участкам в хро-

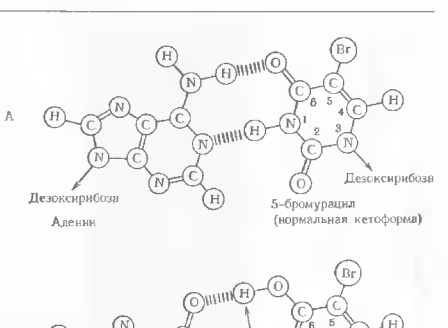


Рис. 10-5. Спаривание оснований с 5-бромурацилом (Hayes, The Genetics of Bacteria and Their Viruses, Blackwell, Oxford, 278, 1964). *А.* В нормальной кетоформе (водород у первого азота кольца) бромурацил спаривается с аденином. *Б.* Таутомерное превращение в енольную форму (происходит редко) приводит к специфическому спариванию с гуанином.

мосоме. В 30-х годах были проведены визуальные исследования очень крупных по своим размерам хромосом слюнных желез дрозофилы, что позволило точно картировать сайты мутаций. Было показано, что между физическими и генетическими расстояниями вдоль некоторых участков хромосом наблюдается хорошая корреляция. Однако такое изучение хромосом с помощью светового микроскопа не дает никаких сведений о структуре молекул ДНК, входящих в состав этих хромосом. Четкий ответ на этот вопрос на молекулярном уровне был получен только тогда, когда стала возможной локализация сайтов специфических мутаций на хорошо изученной вирусной хромосоме (молекуле ДНК).

В настоящее время наиболее изученной хромосомой является хромосома фага λ. Для определения физической локализации различных мутаций применяют несколько методов. В одном из этих методов используется возможность разрывать двухцепочечные молекулы ДНК при перемешивании их в гомогенизаторе на фрагменты различной длины. При определенной скорости перемешивания молекулы ДНК фага λ разрываются пополам, при более высокой скорости — на четыре части и т. д. Фрагменты, различающиеся по плотности, можно затем разделить с помощью равновесного центрифугирования в градиенте CsCl. Поскольку фрагменты, богатые ГЦ-парами, имеют более высокую плотность по сравнению с фрагментами, богатыми АТ-парами, разделение различных фрагментов можно легко осуществить, если они отличаются друг от друга разным

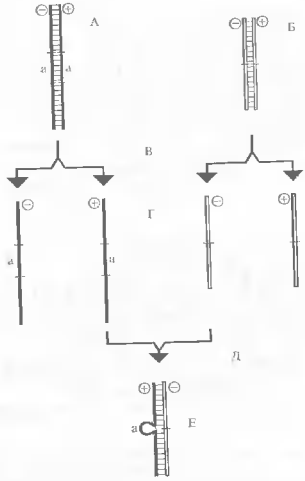


Рис. 10-6. Картирование делеций в ренатурированных молекулах ДНК с помощью электронного микроскопа.
А. Нормальная молекула ДНК фага λ дикого типа *Б*. Двухцепочечная молекула ДНК мутантного фага λ, содержащая делецию участка а. *В*. Нагревание почти до 100°С. *Г*. Цепи разделены с помощью градиентного центрифугирования в растворе CsCl благодаря тому, что они различаются по плотности. *Д*. Нормальная (+)-цепь и (—)-цепь с делецией нагреты почти до 100°С, а затем медленно охлаждены. *Е*. При ренатурации образуется смешанная двухцепочечная молекула с петлей из неспаренных оснований в области делеции.

отношением АТ/ГЦ. Именно это и имеет место в молекуле ДНК фага λ, у которой левая сторона значительно богаче ГЦ-парами, чем правая (рис. 15-9). Очищенные левые и правые половины молекул ДНК можно затем использовать в экспериментах по трансформации ДНК, чтобы выяснить, какие гены находятся в каждом из этих фрагментов. Полученные результаты показывают, что между правыми и левыми половинами молекул ДНК и соответствующими частями генетической карты наблюдается хорошая корреляция.

Значительно более точные данные были получены при картировании хорошо изученных делеций большого числа нуклеотидов. Такое картирование можно осуществить, используя метод гибридизации ДНК с ДНК. Две цепи ДНК фага λ отделяют друг от друга путем нагревания раствора ДНК почти до 100 °С. При этой температуре практически все водородные связи, удерживающие вместе обе цепи в молекуле ДНК, разрываются, а образовавшиеся свободные одиночные цепи раскручиваются и отходят друг от друга (денатурация ДНК). Цепи (+) и (—) можно затем разделить благодаря их различной плотности с помощью центрифугирования в растворе CsCl. Повторное образование двойных спиралей из разделенных одиночных цепей (ренатурация) происходит в том случае, если растворы, содержащие одиночные цепи и нагретые приблизительно до 100 °С, смешиваются, а затем медленно охлаждаются. В этих условиях первоначальные водородные связи между комплементарными цепями восстанавливаются, в результате чего образуются молекулы, которые при

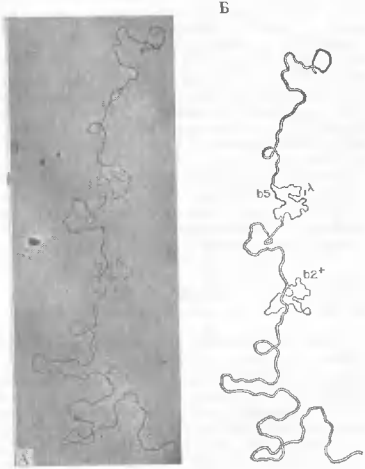


Рис. 10-7. *А*. Электронная микрофотография гетеродуплекса, образующегося между цепью 1 фага λ и цепью 2 фага λb2b5. *Б*. Рисунок, поясняющий электронную микрофотографию гетеродуплекса. Фаг λb2b5 содержит делецию b2 и гетерологичный участок b5, который не может спариваться с соответствующим ему участком фага λ (Westmoreland et al., Science, 163, 1343, 1969).

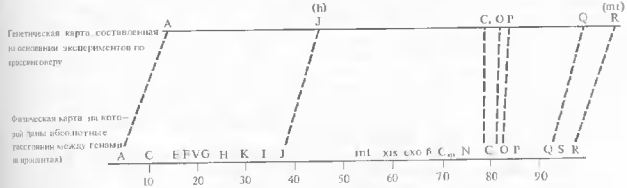


Рис. 10-8. Сравнение рекомбинационной карты фага λ с его истинной физической картой. Рекомбинационная карта составлена по основании данных, полученных Амати и Мезельсоном (Amati, Meselson, Genetics, 51, 369, 1965). Физическая карта составлена Шибальским (Висконсинский университет).

исследовании их с помощью электронного микроскопа ничем не отличаются от молекул, не подвергавшихся нагреванию.

Однако если ренатурация происходит между нормальной (+)-цепью и (—)-цепью, содержащей делецию, водородные связи не могут образоваться на участке (+)-цепи, комплементарном утраченному в результате делеции участку (—)-цепи. Этот участок (+)-цепи обра-

зует одноцепочечную петлю, выступающую из молекулы, которая в основном является двухцепочечной (рис. 10-6). Такие петли легко обнаруживают с помощью электронного микроскопа (рис. 10-7). Этот метод позволяет точно локализовать большое число различных делеций в молекуле ДНК фага λ. Если полученные таким образом данные расположить параллельно генетической карте хорошо изученного в этом отношении фага λ, то мы получим картину, изображенную на рис. 10-8. Из нее следует, что между генетической картой и действительной физической структурой ДНК наблюдается даже бо́льшее соответствие, чем можно было предвидеть заранее. Таким образом, данные, полученные при среднем разрешении, которое дает электронный микроскоп, свидетельствуют о том, что на всем протяжении молекулы ДНК кроссинговер может происходить приблизительно с равной вероятностью. Однако имеются и исключения из этого правила, что можно видеть на рис. 10-8. Поэтому необходимо с осторожностью оценивать результаты опытов по генетической рекомбинации.

ГЕН СРЕДНЕЙ ВЕЛИЧИНЫ СОДЕРЖИТ ОТ 900 ДО 1500 ПАР НУКЛЕОТИДОВ

К этому заключению можно прийти несколькими путями. Наиболее простой состоит в том, чтобы сопоставить число нуклеотидов в хромосоме с числом содержащихся в ней генов. У бактериофага T4 описано к настоящему времени свыше 100 генов; мол. вес хромосомы этого фага равен $120 \cdot 10^6$. Следовательно, мол. вес его гена равен в среднем $1{,}2 \cdot 10^6$. Это, очевидно, верхний предел, так как вполне возможно, что довольно значительное число генов фага T4 еще не обнаружено. В хромосоме фага λ картировано 40 генов. ДНК этого фага имеет мол. вес $32 \cdot 10^6$, поэтому у него верхним пределом для среднего размера гена будет величина $0{,}8 \cdot 10^6$.

Приблизительно такие же величины дают эксперименты по составлению генетических карт. Известно, например, что ген rIIA фага T4 занимает около 1% всей длины генетической карты (рис. 10-4). Если это средний размер, то хромосома данного фага содержит, очевидно, около 100 генов. Точность этого определения зависит от того, насколько справедливо принятое нами допущение, что вероятность кроссинговера одинакова на всем протяжении хромосомы. Если это допущение неверно, то области, в которых кроссинговер происходит чаще, окажутся на генетической карте как бы «растянутыми» по сравнению с областями, тождественными им по своим физическим размерам, но отличающимися от них более низкой частотой кроссинговера.

Более обоснованным является первый (приведенный выше) ход рассуждений с той, однако, оговоркой, что еще не все гены фага T4 и фага λ известны. Можно ли примерно оценить истинное их число по той скорости, с какой сейчас поступают сведения о вновь открытых генах? Скорость эта неуклонно снижается (особенно для фага λ), можно думать, что общее число всех генов обоих фагов примерно вдвое больше, чем то, которое нам известно. Если это так, то придется считать, что мол. вес среднего по размеру гена для различных организмов колеблется в пределах $0{,}5 \cdot 10^6 — 1 \cdot 10^6$. Поскольку мол. вес одной пары нуклеотидов слегка превышает 600, это означает, что ген состоит в среднем из 900—1500 пар нуклеотидов, расположенных в линейной последовательности.

КРОССИНГОВЕР ВКЛЮЧАЕТ РАЗРЫВ И ПОСЛЕДУЮЩЕЕ ВОССОЕДИНЕНИЕ МОЛЕКУЛ ДНК

До недавнего времени молекулярные основы процесса кроссинговера не удавалось понять даже в самых общих чертах. Классическое представление о кроссинговере, развитое на основе цитологических наблюдений в 30-х годах, сводилось к тому, что в процессе мейоза хроматиды скрученных и спаренных хромосом иногда разрываются под влиянием напряжения, вызванного сокращением. Возникшее напряжение устраняется благодаря тому, что разорванные хроматиды воссоединяются не в прежнем порядке, а крест-накрест. В результате вместо четырех родительских хроматид появляются две родительские и две рекомбинантные (рис. 10-9). Согласно этой модели, рекомбинация происходит после того, как удвоение хромосом завершится, т. е. на стадии четырех хроматид. В 1955 г., когда обнаружилось, что кроссинговер может происходить внутри гена (в то время уже знали, что ген представляет собой молекулу ДНК), эта гипотеза потеряла популярность. Дело в том, что принятие ее наталкивается на одну трудность. Приходится допустить, что разрывы в двух гомологичных хроматидах происходят на одном уровне. Если бы это было иначе, то рекомбинация приводила бы к образованию новых молекул ДНК, отличающихся от родительских по длине.

Чтобы избавиться от этой трудности, исследователи обратились к другой гипотезе, согласно которой рекомбинация связана с процессом репликации хромосомы. Предполагается, что в процессе репликации спаренных хромосом новая цепь ДНК сначала строится вдоль одной хромосомы, т. е. копирует, например, отцовскую хромосому, а затем синтез переключается на материнскую хромосому, и в дальнейшем копируется уже эта последняя. Если в той же точке происходит и переключение синтеза второй цепи (на этот раз с материнской хромосомы на отцовскую), то в результате должны образоваться две реципрокные рекомбинантные цепи. Этот гипотетический процесс получил название *копирования с переменой матриц*. Фундаментальное различие между двумя гипотезами проявляется, когда мы пытаемся решить вопрос о физическом происхождении материала рекомбинантных хромосом. Согласно гипотезе разрыва и воссоединения, рекомбинантные хромосомы состоят из мате-

Рис. 10-9. Схематическое изображение двух возможных механизмов кроссинговера.

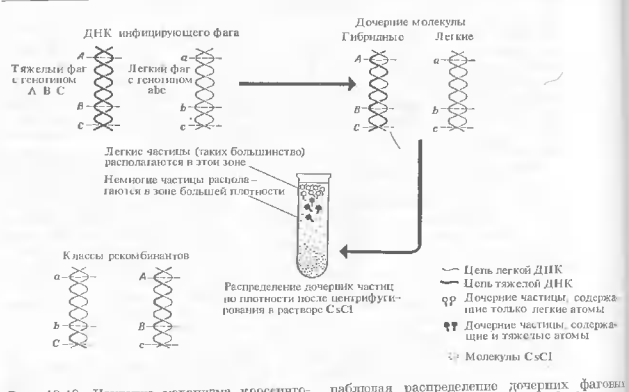


Рис. 10-10. Изучение механизма кроссинговера с помощью тяжелых изотопов.
Бактерии, растущие в легкой среде, инфицируются тяжелым фагом с генотипом ABC и легким фагом с генотипом abc. Фаговая ДНК, проникнув в клетки, реплицируется, в результате чего почти все родительские цепи оказываются в составе гибридных или легких молекул. Однако многие родительские цепи не остаются интактными, так как они вовлекаются в кроссинговер. В этом можно убедиться, наблюдая распределение дочерних фаговых частиц в градиенте плотности CsCl. Основная масса частиц не содержит тяжелых изотопов. Эти частицы занимают верхнюю часть пробирки. Некоторые частицы образуют полосу в зоне большей плотности, потому что они содержат тяжелые атомы, полученные от родителя ABC. Рекомбинанты с генотипом ABc располагаются ниже, чем рекомбинанты с генотипом abC.

рила двух родительских хромосом; в случае копирования с переменой матриц они синтезируются только из нового материала.

Эти две гипотезы были проверены экспериментально с помощью фага λ, меченного тяжелыми изотопами (^{13}C, ^{15}N) (рис. 10-10, 10-11). В этих опытах тяжелые изотопы служили для различения родительских и дочерних цепей ДНК при центрифугировании в градиенте плотности CsCl. Генетические скрещивания между тяжелыми (или между тяжелыми и легкими) частицами фага осуществлялись в клетках *E. coli*, растущих на легкой среде (^{12}C и ^{14}N). В этих условиях вся новосинтезированная фаговая ДНК должна была содержать легкие изотопы; следовательно, если копирование действительно происходит с переменой матриц, то все рекомбинантные частицы могли быть только легкими. Если же рекомбинанты образуются путем разрыва и воссоединения, то некоторые рекомбинантные фаговые частицы должны были содержать тяжелые атомы, полученные от родительских хромосом. Потомство фага, полученное от этих скрещиваний, помещали в концентрированные растворы хлористого цезия и подвергали равновесному центрифугированию для разделения частиц по плотности. После этого фаговые частицы различной плотности исследовали генетически, чтобы выявить, какие из них являются рекомбинантными. Эксперименты дали отчетливые результаты (рис. 10-10) и ко всеобщему удивлению показали, что некоторые рекомбинантные частицы содержат тяжелые атомы.

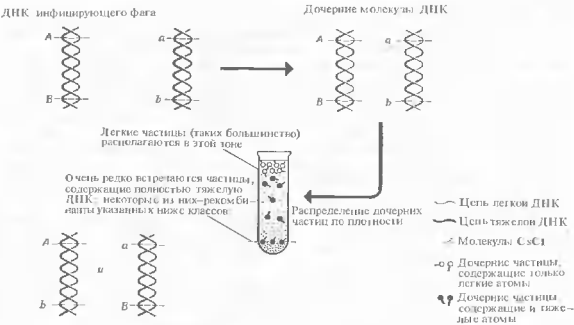


Рис. 10-11. Экспериментальное доказательство того факта, что кроссинговер и репликация ДНК представляют собой два независимых процесса.
Легкие бактерии, растущие в легкой среде, инфицируются несколькими частицами тяжелого фага с генотипом AB и несколькими частицами тяжелого фага с генотипом ab. После проникновения в клетку почти все тяжелые цепи оказываются в составе гибридных молекул. Однако в некоторых (редких) случаях репликация по какой-то причине не происходит и при созревании в белковую оболочку включается сама инфицирующая молекула. Этот феномен не позволяет нам решить, являются ли редкие тяжелые молекулы ДНК истинными рекомбинантами. Потомство фагов исследуют затем в градиенте плотности CsCl. Большинство дочерних частиц не содержит тяжелой метки и располагается в зоне наименьшей плотности. В самой нижней зоне располагаются очень редкие частицы, содержащие полностью тяжелые молекулы ДНК. Некоторые из этих частиц являются реком, бинантами классов Ab и aB. Из этого следует что кроссинговер может происходить между интактными двухцепочечными молекулами ДНК и что интенсивный синтез ДНК для него вовсе не обязателен.

Более того, в ходе дальнейших экспериментов (рис. 10-11) было обнаружено, что рекомбинация может происходить между реплицирующимися молекулами ДНК. Таким образом, главный механизм кроссинговера у бактериофагов заключается в разрыве и воссоединении интактных двойных спиралей ДНК. Весьма вероятно, что такой же механизм лежит в основе процесса кроссинговера у бактерий и у высших организмов.

В ПРОЦЕССЕ КРОССИНГОВЕРА ПРОИСХОДИТ СПАРИВАНИЕ ОСНОВАНИЙ

В основе большей части экспериментов, которые проводятся в настоящее время с целью более точного определения способа (или способов) рекомбинации цепей ДНК, лежат два допущения. Первое допущение состоит в том, что две гомологичные двухцепочечные молекулы ДНК не могут связываться друг с другом в каких-то специфических точках, поскольку невозможно представить себе, с помощью каких известных физических взаимодействий могло бы осуществляться такое спаривание. Второе допущение заключается в том, что узнавание происходит в результате образования

водородных связей между комплементарными участками одноцепочечных ДНК.

Один из возможных путей возникновения в молекуле ДНК одноцепочечных участков обусловлен образованием одноцепочечных разрывов под действием эндонуклеазы. В результате в полинуклеотидной цепи появляются свободные концы, к которым ДНК-полимеразы могут присоединять новые нуклеотиды, вытесняя при этом предсуществующие цепи, благодаря чему в молекуле ДНК образуется большое число одноцепочечных «хвостов» (рис. 10-12). Случайные столкновения между хвостами, имеющими комплементарные последовательности, должны приводить к образованию двухцепочечных соединительных участков между различными молекулами ДНК. Если затем под действием эндонуклеазы происходят разрывы в противолежащих цепях, а также последующее заполнение образовавшихся пробелов, как показано на рис. 10-12, то в результате появляются одна рекомбинантная молекула ДНК и два фрагмента, оставшихся от родительских молекул. Под действием экзонуклеазы в этих фрагментах возникают комплементарные одноцепочечные участки, необходимые для того, чтобы эти фрагменты могли соединиться (рис. 10-12). Образовавшиеся в индивидуальных цепях пробелы могут затем заполниться с помощью ДНК-полимеразы. В конечном счете образуется вторая рекомбинантная молекула, генетическая структура которой является в основном реципрокной по отношению к первой рекомбинантной молекуле.

ВЫСТУПАЮЩИЕ ИЗ МОЛЕКУЛЫ ДНК ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ ХВОСТЫ СТАБИЛИЗИРУЮТСЯ С ПОМОЩЬЮ БЕЛКА, СТИМУЛИРУЮЩЕГО РЕКОМБИНАЦИЮ

Описанный выше механизм рекомбинации противоречит, казалось бы, тому факту, что одиночные цепи всех известных ДНК обнаруживают сильную выраженную тенденцию к образованию с помощью водородных связей шпилькообразных петель, подобных тем, которые образуются в одноцепочечных РНК (гл. 2). In vitro большая часть оснований одноцепочечных ДНК при температуре 37 °С входит в состав образованных водородными связями петель (рис. 11-11), которые разрываются обычно только при температуре выше 50 °С. Поэтому очень трудно было представить себе, что присутствие свободно выступающих из молекулы ДНК одноцепочечных участков является особенностью, общей для всех молекул ДНК, находящихся внутри клетки. Однако это противоречие в настоящее время устранено, так как недавно был открыт так называемый распластающий белок, молекулы которого раскрывают шпилькообразные петли благодаря прочному связыванию с одноцепочечной ДНК. В результате этого появляются выступающие из молекулы ДНК полинуклеотидные цепи, которые легко образуют двойные спирали при столкновении с другими таким же образом выступающими участками ДНК, имеющими комплементарную последовательность.

В ПРОЦЕССЕ КРОССИНГОВЕРА ПРИНИМАЮТ УЧАСТИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

Надежные данные, свидетельствующие об участии нуклеаз в процессе кроссинговера, впервые были получены при изучении фагов T4 и λ. При их размножении кроссинговер наблюдается значительно чаще, чем в соответствующих по длине участках ДНК *E. coli*. Одновременно появляется несколько вирус-специфических нуклеаз. Каждая из них кодируется определенным геном, находящимся в хромосоме вируса (гл. 15). Пока

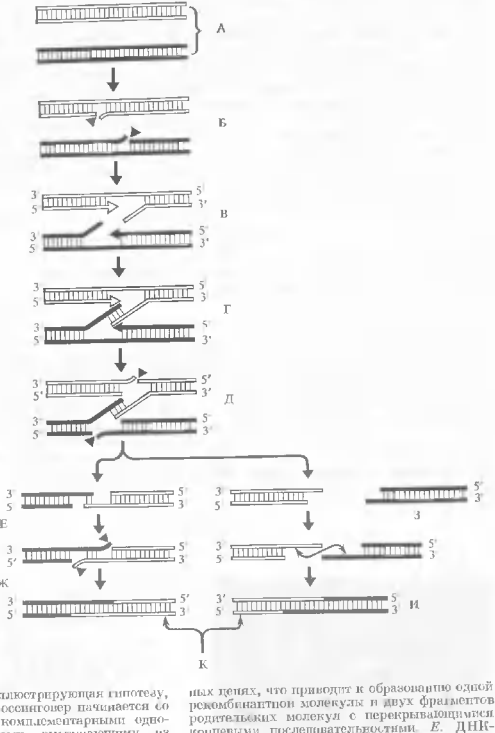


Рис. 10-12. Схема, иллюстрирующая гипотезу, согласно которой кроссинговер начинается со спаривания между комплементарными одноцепочечными хвостами, выступающими из двухцепочечных молекул ДНК.

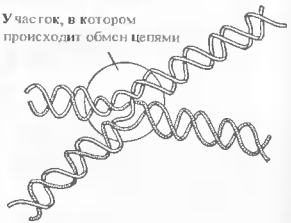
А. Две гомологичные молекулы ДНК. *Б.* Эндонуклеаза производит один разрыв в одной из цепей каждой молекулы. *В.* ДНК-полимераза катализирует синтез ДНК только с одной стороны каждой из разорванных цепей, в результате чего образуются два свободно выступающих одноцепочечных хвоста. *Г.* Если два таких одноцепочечных участка являются гомологичными, они могут спариться, что приведет к образованию короткого двухцепочечного мостика. *Д.* Эндонуклеаза производит одиночные разрывы в противоположных цепях, что приводит к образованию одной рекомбинантной молекулы и двух фрагментов родительских молекул с перекрывающимися концевыми последовательностями. *Е.* ДНК-полимераза синтезирует недостающие части молекулы. *Ж.* Полинуклеотидлигаза сшивает разрывы в двух цепях, что приводит к образованию двухцепочечной рекомбинантной молекулы. *З.* Экзонуклеаза «объедает» одну цепь каждой половины молекулы, открывая при этом гомологичные участки. *И.* Спаривание оснований приводит к образованию двухцепочечной рекомбинантной молекулы после того, как пробелы в цепях заполнятся с помощью ДНК-полимеразы и лигазы. *К.* Две двухцепочечные рекомбинантные молекулы ДНК.

обнаружено два фермента, образующихся при заражении клеток фагом T4: вирус-специфическая эндонуклеаза и новый фермент, сходный по своей специфичности с ДНК-полимеразой. Для инфекции фагом λ характерно появление новых экзо- и эндонуклеазных активностей. Очень важным фактом является то, что мутации, блокирующие синтез экзонуклеазы фага λ, приводят к значительному снижению уровня рекомбинаций между инфицирующими молекулами ДНК фага λ.

Мы располагаем теперь убедительными данными, свидетельствующими о том, что и в клетках *E. coli* также существует связь между нуклеазами и процессом рекомбинации. В геноме *E. coli* находятся два тесно связанных между собой гена (гены rec B и rec C), которые кодируют синтез двух полипептидных субъединиц высокоактивной нуклеазы, атакующей как одно-, так и двухцепочечную ДНК. Мутации в этих генах приводят к значительному снижению частоты кроссинговера.

ДВОЙНЫЕ СПИРАЛИ ДНК, РАСПОЛОЖЕННЫЕ НА БЛИЗКОМ РАССТОЯНИИ И ПАРАЛЛЕЛЬНО ОДНА ДРУГОЙ, МОГУТ ОБМЕНИВАТЬСЯ МЕЖДУ СОБОЙ ЦЕПЯМИ

Второй потенциально возможный способ рекомбинации включает прямой обмен цепей между параллельно расположенными двойными спиралями ДНК. Этот обмен происходит вслед за образованием разрывов в двух одинаково ориентированных цепях. Благодаря свободному вращению вокруг связей, образующих углеводно-фосфатный остов молекулы ДНК, такие цепи могут перемещаться из одной двойной спирали в другую. Это перемещение не сопровождается ни потерями каких-либо пар оснований, ни возникновением напряженных химических связей (рис. 10-13). Образованию таких перекрещивающихся двойных спиралей может предшествовать появление в молекуле ДНК в результате действия нуклеаз одноцепочечных участков (хвостов).



Б

Рис. 10-13.
А. Фотография молекулярной модели фрагментов двух двойных спиралей ДНК, показывающая, что связь между двумя перекрещенными цепями может осуществляться без разрыва индивидуальных молекул ДНК (Sigel, Alberts, J. Mol. Biol., **71**, 789, 1972).
Б. Взаимный обмен цепями между двойными спиралями ДНК (миграция ветви), являющийся результатом правого вращения молекул вокруг своих осей (Broker, J. Mol. Biol., 81, 1, 1973).

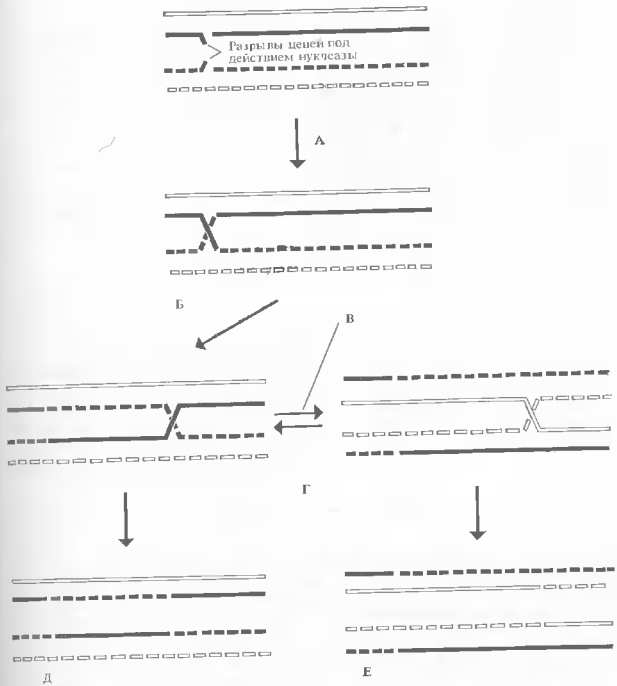


Рис. 10-14. Схема, иллюстрирующая гипотезу, согласно которой кроссинговер происходит в результате обмена параллельными цепями между двумя двойными спиралями ДНК. Последующая изомеризация связывающих цепей приводит к образованию равного числа одноцепочечных и двухцепочечных замен. *А.* Обмен цепями, приводящий к образованию перекрестного мостика. *Б.* Распространение перекрестного мостика (*«миграция ветви»*). *В.* Изомеризация связывающих цепей. *Г.* Удаление перекрестного мостика с помощью дополнительных разрывов цепей под действием нуклеазы и последующее заполнение пробелов в цепях в результате действия полимеразы и лигазы. *Д.* Двойные замены в двух дочерних цепях. *Е.* Одиночные замены во всех четырех дочерних цепях.

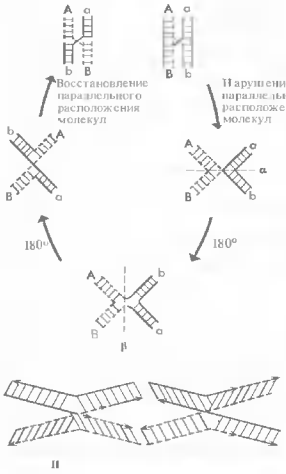


Рис. 10-15.
I. Этапы изомеризации цепей, связывающих между собой две перекрестно соединенные двойные спирали (Meselson, Radding, Proc. Nat. Acad. Sci., 1975). *II.* Трехмерное изображение двух перекрестно соединенных между собой двойных спиралей. Показана эквивалентность изомерных форм этих спиралей (Wood et al., The Molecular Biology of Eucaryotic Cells, W. A. Benjamin, 1975).

После того как обе спирали соединятся между собой описанным способом, образовавшаяся между ними крестообразная перемычка может легко передвигаться вдоль обеих молекул наподобие застежки-молнии; в результате такого передвижения обе исходные молекулы обменяются основаниями. Именно таким способом может происходить переход из одной спирали в другую протяженных отрезков данной цепи (рис. 10-14). Это приводит часто к образованию длинных участков гибридных (гетеродуплексных) молекул ДНК, в которых нуклеотидная последовательность одной цепи может быть не вполне комплементарна соответствующей последовательности в другой цепи. Может происходить и дальнейшая перестройка родительских цепей, если перекрещенные спирали претерпевают простое стерическое превращение, в результате которого цепи, образующие перекрещенные мостики, и противолежащие цепи меняются между собой местами (рис. 10-15). Такая «изомеризация» наблюдается очень часто, поэтому последующие разрывы под действием нуклеаз, завершающие процесс кроссинговера, происходят не обязательно в тех цепях, с которых начался кроссинговер (например, в (+)-цепях). Наоборот, разрывы могут произойти с равной вероятностью в еще интактных (—)-цепях. Таким образом, кроссинговер между двумя двойными спиралями ДНК приводит к образованию рекомбинантных молекул, в которых либо две из четырех цепей, либо все четыре цепи содержат по одному замещенному участку (рис. 10-14).

НЕПОСРЕДСТВЕННОЕ ВИЗУАЛЬНОЕ НАБЛЮДЕНИЕ ЗА ПРОЦЕССОМ КРОССИНГОВЕРА

Прямое доказательство того, что двойные спирали ДНК действительно могут обмениваться цепями, было получено при наблюдении за процессом кроссинговера с помощью электронного микроскопа. Поскольку кроссинговер происходит очень часто в процессе репликации ДНК фагов, электронно-микроскопическое изучение систем фагов λ и Т4 предоставляет наилучшие возможности для прямой проверки предполагаемого молекулярного механизма кроссинговера. Использование системы фага λ для денатурационного картирования дало наиболее четкие из всех полученных до настоящего времени результатов, которые показывают, что гомологичные участки двух спаривающихся молекул ДНК всегда связаны между собой перекрещивающимися мостиками (рис. 10-16). В равной степени важно и то, что на микрофотографиях удается различить индивидуальные цепи в тех участках молекул ДНК, которые связаны между собой мостиками, что однозначно свидетельствует о возможности перехода этих цепей из одной двойной спирали в другую.

ГЕТЕРОДУПЛЕКСЫ

Образование гетеродуплексных участков ДНК, нередко наблюдающееся во время кроссинговера, представляет собой еще одно экспериментальное подтверждение гипотезы, согласно которой главным событием рекомбина-

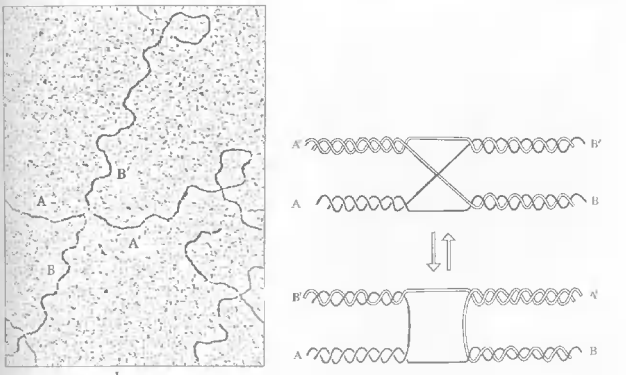


Рис. 10-16. Визуальное наблюдение за процессом кроссинговера между двумя гомологичными участками ДНК фага λ с помощью электронного микроскопа.
I Электронная микрофотография. *II* Схема, показывающая, каким образом обычная крестообразная диаграмма кроссинговера при повороте на 180° превращается в прямоугольную диаграмму. (С любезного разрешения д-ра Ишана, Висконсинский университет.)

ции является спаривание одноцепочечных участков ДНК. Гетеродуплексы — это такие участки рекомбинантных молекул ДНК, в которых обе цепи не полностью комплементарны друг другу. Они возникают в том случае, если основной спаривающийся участок вместе с соседним участком, образовавшимся в результате миграции ветви, включает сайт (или сайты), по которому все родительские хромосомы различаются между собой генетически. Гетеродуплексные участки были обнаружены у всех вирусов, для которых был проведен детальный генетический анализ. На одну молекулу ДНК фага Т4 приходится в среднем один гетеродуплексный участок длиной в несколько тысяч нуклеотидных пар. У фага λ гетеродуплексы также были хорошо охарактеризованы, и было показано, что и в этом случае их длина значительно больше, чем можно было бы ожидать, если бы они возникали только в результате обычного спаривания оснований. Таким образом, можно думать, что гетеродуплексы в основном образовались благодаря миграции ветви — процесса, при котором происходит перемещение цепей из одной двойной спирали в другую.

Гетеродуплексы могут существовать только в течение очень короткого промежутка времени, так как при дупликации рекомбинантных молекул ДНК происходит расщепление альтернативных аллелей (рис. 10-17). Это впервые было показано на фаговых системах, использование которых дает возможность с помощью простого визуального обследования стерильных пятен выявить смесь двух генетически различных типов рекомбинантов. Когда ДНК родительского фага Т4 содержит гетеродуплекс по участку rII, образуются неоднородные по своему внешнему виду (мозаичные) стерильные пятна: одни участки этих пятен характерны для фенотипа штамма rII, в то время как другие — для фенотипа дикого штамма r^+ (рис. 10-18).

НА УЧАСТКЕ КРОССИНГОВЕРА РЕКОМБИНАЦИЯ НЕ ВСЕГДА БЫВАЕТ РЕЦИПРОКНОЙ

В ранних исследованиях было установлено, что при кроссинговере между различными генами происходит, казалось бы, обязательное образование реципрокных рекомбинантов (рис. 10-19). Однако при изучении рекомбинантов, образовавшихся между близкими сайтами одного и того же гена, были выявлены исключения из этого правила. После этого обнаружение нереципрокного поведения генетического материала при кроссинговере стало обычным явлением. Этот феномен, названный *генной конверсией*, лучше всего изучен у таких организмов, как дрожжи или *Neurospora*, у которых можно визуально различить все продукты, образовавшиеся в результате одного цикла мейоза. Здесь были найдены расщепления с соотношением 3 : 1 вместо обычно наблюдающегося расщепления с равным соотношением составляющих аллелей 2 : 2.

Такие исключения из общего правила не противоречат изложенной выше гипотезе механизма кроссинговера. Объяснение этому дано на рис. 10-17, из которого следует, что на окончательный результат расщепления генов, локализованных вокруг участка кроссинговера, может оказывать влияние процесс репарации, так как при этом процессе происходит узнавание нарушений двойной спирали в гетеродуплексе и удаление какой-либо одной неправильно спаренной пары оснований. В зависимости от того, происходит ли удаление оснований или рекомбинация осуществляется без репарации, возникает соотношение аллелей либо 2 : 2, либо 3 : 1. Нам до сих пор не известно, какая часть нереципрокных рекомбинантов, образовавшихся вследствие генной конверсии, действительно обусловлена репарационным синтезом, так как сложная серия разрывов под действием эндо- и экзонуклеаз во время рекомбинации также должна

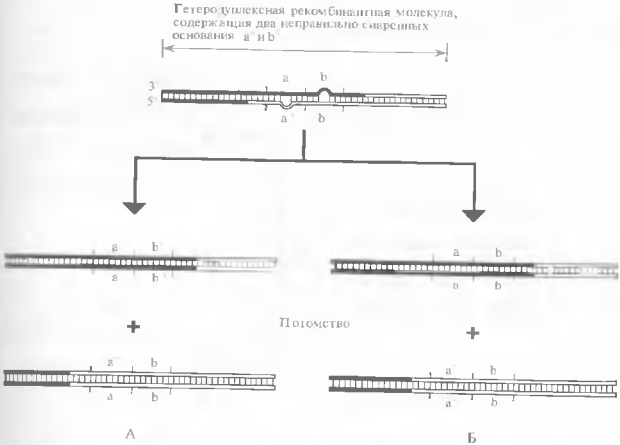


Рис. 10-17. Расщепление гетеродуплекса. *А.* Расщепление, следующее за репликацией, без исправления дефектов. *Б.* Расщепление, следующее за репликацией, с исправлением одного неправильно спаренного основания b′→ b.

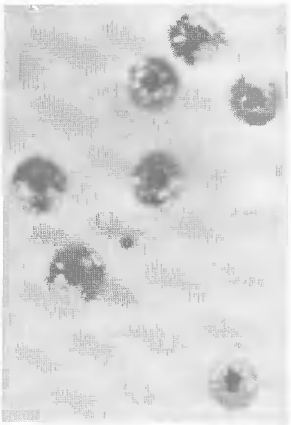


Рис. 10-18. Фотография мозаичных стерильных пятен, образовавшихся в результате расщепления гетеродуплексной молекулы ДНК, в которой одна цепь содержала маркер rII+, а противоположная цепь — маркер rII. (С любезного разрешения д-ра Херши.)

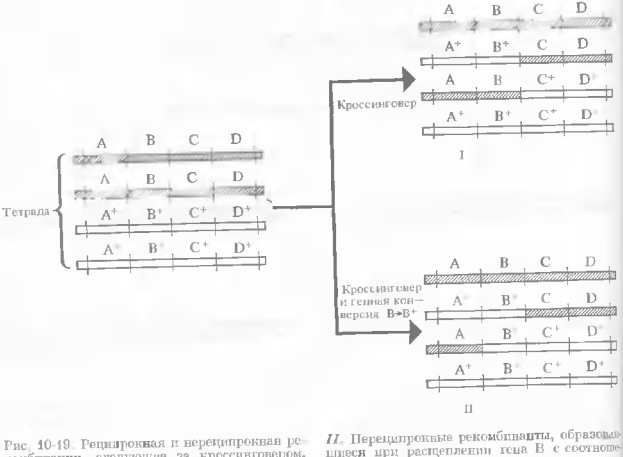


Рис. 10-19. Реципрокная и нереципрокная рекомбинации, следующие за кроссинговером. *I*. Реципрокные рекомбинанты, образовавшиеся при расщеплении всех генов с соотношением 2 : 2. *II*. Нереципрокные рекомбинанты, образовавшиеся при расщеплении гена B с соотношением 3 : 1.

приводить к расщеплению с неравным соотношением аллелей. И тем не менее если бросить общий взгляд на весь процесс рекомбинации в целом, то окажется, что реципрокные рекомбинанты занимают доминирующее положение. Это явление даже при рассмотрении его на молекулярном уровне представляет собой самую удивительную особенность рекомбинации.

ОШИБКИ ПРИ КРОССИНГОВЕРЕ ПРИВОДЯТ К ПОЯВЛЕНИЮ ВСТАВОК (ИЛИ ДЕЛЕЦИЙ) В ПОЛИНУКЛЕОТИДНЫХ ЦЕПЯХ

Исключительно большая точность, наблюдающаяся почти во всех случаях при кроссинговере, зависит от правильного относительного расположения комплементарных одноцепочечных участков в процессе образования новых водородных связей между ними. Такое правильное расположение обусловлено тем, что почти все длинные полинуклеотидные цепи уникальны во своей нуклеотидной последовательности. Две произвольно выбранные полинуклеотидные цепи одинаковой длины, содержащие более 12 нуклеотидов, практически никогда не имеют одинаковой нуклеотидной последовательности. Таким образом, поскольку в кроссинговере участвуют относительно длинные одноцепочечные отрезки цепей, существует чрезвы-

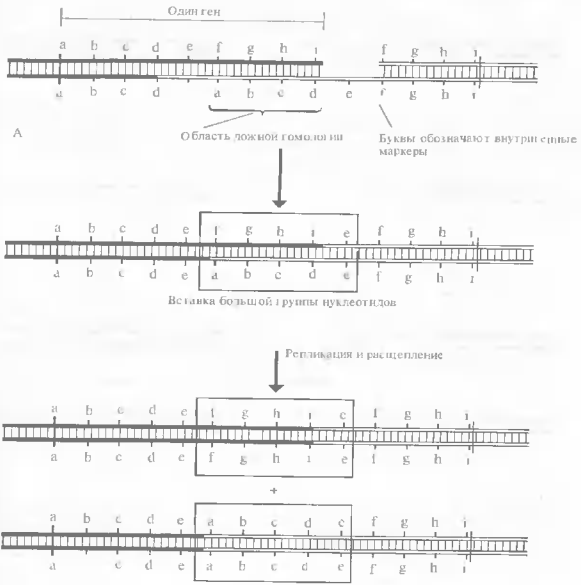


Рис. 10-20. Образование вставки, состоящей из большого числа нуклеотидов, в результате спаривания почти гомологичных последовательностей в пределах одного гена.
А Гетеродуплекс, образовавшийся в результате спаривания почти гомологичных участков, расположенных в разных частях одного и того же гена.
Б. Две дочерние молекулы содержат разные вставки большой группы нуклеотидов.

чайно малая вероятность того, что фрагмент одного гена соединится по ошибке с не соответствующей ему частью того же или какого-либо другого гена. Однако в тех редких случаях, когда два разных участка в значительной степени гомологичны друг другу, следует ожидать, что они могут случайно соединиться между собой неправильным образом, и это приведет к появлению вставки (или делеции), состоящей из большого блока нуклеотидов (рис. 10-20).

Выпадение отдельных пар оснований происходит в результате неправильного спаривания двух участков, подобного тому, которое изображено справа на рис. 10-21. Образующаяся при этом двойная спираль содержит два не соответствующих друг другу основания. Если эта ошибка не будет исправлена с помощью какого-либо репарационного процесса, то образо-

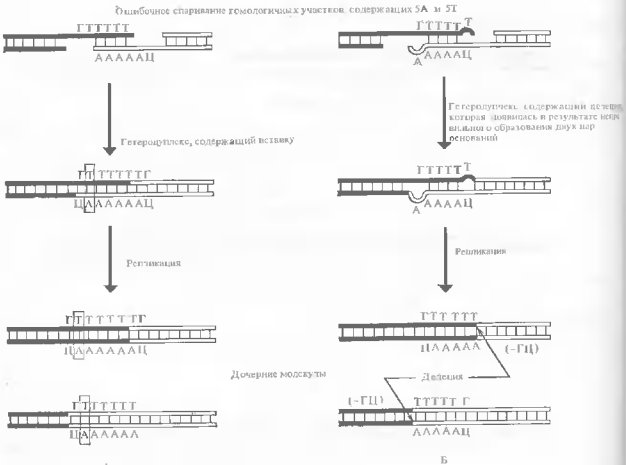


Рис. 10-21. Образование делеций и вставок в процессе кроссинговера в результате ошибочного спаривания участков, содержащих последовательности одинаковых оснований.

А. При расщеплении рекомбинанта образуются две молекулы, содержащие одинаковую вставку АТ. *Б*. При расщеплении рекомбинанта образуются две молекулы, различающиеся по местоположению делеции ГЦ.

вавшаяся спираль даст начало двум дочерним спиралям, в каждой из которых будет содержаться отличающаяся по своей локализации делеция одной нуклеотидной пары. Наоборот, если спаривание происходит таким образом, как изображено слева на рис. 10-21, то конечным результатом будет образование двух дочерних спиралей, каждая из которых будет содержать одинаковую вставку одной пары оснований.

Весьма вероятно, что у фага Т4 бо́льшая часть вставок (или делеций) возникает во время кроссинговера. В отличие от фага Т4 у *E. coli* при нормальной репликации кроссинговер происходит значительно реже, поэтому и частота мутаций, связанных с возникновением вставок (делеций), у *E. coli* также значительно ниже, чем у фага Т4.

«ГОРЯЧИЕ ТОЧКИ» НЕРЕДКО ПРЕДСТАВЛЯЮТ СОБОЙ УЧАСТКИ, В КОТОРЫХ ПРОИСХОДИТ НЕПРАВИЛЬНОЕ СПАРИВАНИЕ ОСНОВАНИЙ

Описанная выше модель образования вставок (делеций) предполагает, что вероятность их возникновения зависит от последовательности соседних оснований. Чем длиннее последовательность повторяющихся оснований, тем выше частота мутаций. Данные, подтверждающие эту гипотезу, были

получены при изучении фагоспецифического фермента лизоцима, который кодируется ДНК фага Т4. При исследовании вставок и делеций в экспериментах, подобных описанным в следующем разделе, были получены некоторые данные о нуклеотидной последовательности ДНК фага Т4. В ней, согласно этим данным, имеется один высокомутабильный участок («горячая точка»), в котором происходит мутация, приводящая к выпадению одного остатка аденина из последовательности, состоящей из шести остатков аденина (6А). Обратная мутация, которая приводит к добавлению одного остатка А к участку, состоящему из 5 остатков А, происходит в 100 раз реже, чем прямая мутация. Таким образом, весьма вероятно, что частота мутации, приводящей к вставке (делеции), является функцией числа идентичных повторяющихся оснований (например, дуплетов, триплетов оснований и т. д.).

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

До недавнего времени мы считали, что нуклеазы, участвующие в рекомбинации, инициируют этот процесс, разрывая только одну цепь двойной спирали ДНК. Трудно было представить себе, каким образом могла бы воссоединиться полностью разорванная спираль. Однако теперь мы предполагаем, что инициация определенных типов сайт-специфической рекомбинации происходит в результате образования двух (смещенных относительно друг друга) разрывов под действием нуклеаз, которые разрывают двойную спираль ДНК только после связывания со строго специфическими нуклеотидными последовательностями. Образующиеся в результате этих разрывов фрагменты могут затем спариваться с новыми партнерами, что приводит к перестройке исходного генетического материала. Например, при образовании смещенных относительно друг друга разрывов в двух

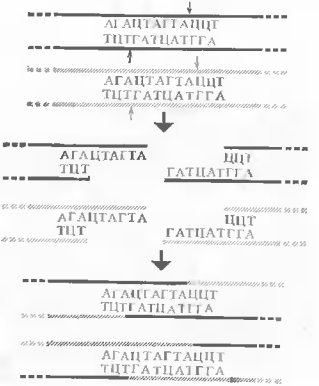


Рис. 10-22. Кроссинговер между фрагментами ДНК с липкими концами, образовавшимися под действием сайт-специфической нуклеазы.

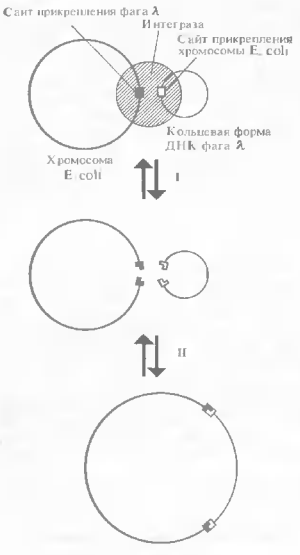


Рис. 10-23. Механизм сайт-специфической рекомбинации между ДНК фага λ и хромосомой *E. coli*.
I. Образование липких концов и результате смещенных относительно друг друга разрывов комплементарных цепей ДНК под действием сайт-специфической нуклеазы (интегразы).
II. Интеграция ДНК фага λ с хромосомой *E. coli*, завершающаяся заделыванием пробелов и устранением разрывов с помощью лигазы.

двойных спиралях, каждая из которых содержит один и тот же сайт узнавания, возникает возможность кроссинговера между этими двумя спиралями (рис. 10-22).

В рекомбинации могут участвовать, вероятно, только такие ферменты, которые узнают достаточно длинные нуклеотидные последовательности; если бы в молекуле ДНК присутствовало несколько участков узнавания, это могло бы привести к полному нарушению первоначального порядка расположения генов. Допустим, в узнавании принимает участие около десяти пар оснований; в этом случае в молекуле ДНК, равной по длине хромосоме *E. coli*, может случайно оказаться только один такой участок. Возможно, именно благодаря действию фермента, узнающего длинные нуклеотидные последовательности, кольцевая молекула ДНК фага λ может включаться в рецепторный участок хромосомы *E. coli* (рис. 10-23). В отличие от сайт-специфической рекомбинации общая рекомбинация у бактерий вряд ли могла бы осуществляться с участием ферментов, производящих смещенные относительно друг друга разрывы в двойной спирали ДНК, поскольку, как уже отмечалось выше, действие любой нуклеазы, узнающей многие участки, привело бы к быстрому нарушению исходного расположения генов.

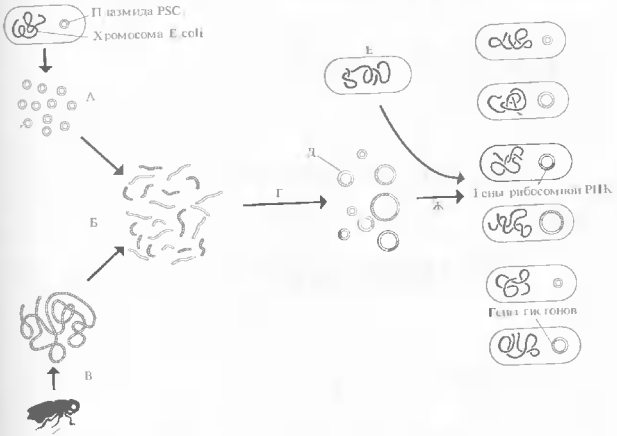


Рис. 10-24. Использование специфических смещенных относительно друг друга разрывов цепей ДНК под действием нуклеазы Eco R_1 для включения фрагментов ДНК дрозофилы в ДНК плазмиды *E. coli*.
А. Очистка плазмидной ДНК. *Б.* Очищенная ДНК подвергается действию фермента рестрикции R_1, который расщепляет плазмидную ДНК в одном месте, а ДНК дрозофилы во многих местах с образованием большого количества фрагментов разной величины. *В.* Очистка ДНК дрозофилы. *Г.* Случайное соединение фрагментов и устранение разрывов с помощью лигазы. *Д.* Набор плазмид, содержащих различные фрагменты ДНК дрозофилы. *Е.* Клетка *E. coli*, не содержащая плазмиды. *Ж.* Перемешивание рекомбинантных плазмид с клетками *E. coli* в среде с высоким содержанием Ca^{2+}.

Понимание того факта, что нуклеазы, производящие специфические смещенные относительно друг друга разрывы в двойной спирали ДНК, могут стимулировать сайт-специфическую рекомбинацию, лежит в основе нового раздела молекулярной биологии — генетической инженерии. С помощью методов генетической инженерии специфические фрагменты хромосом можно переносить из одного организма в другой. Например, в системе in vitro можно теперь легко осуществить включение фрагментов эукариотической ДНК с липкими концами в кольцевые молекулы вирусной (или плазмидной) ДНК (рис. 10-24). В связи с тем что модифицированные молекулы могут во многих случаях размножаться внутри бактериальной клетки-хозяина, теперь появилась возможность изучать особенности функционирования эукариотических генов в условиях бактериальной клетки. Исследования, в которых выясняется вопрос о том, функционируют ли такие «чужеродные» гены нормально в несвойственной для них окружающей среде, находятся в самом начале своего развития. Тем не менее можно надеяться, что скоро будут получены важные данные о регуляции генной активности.

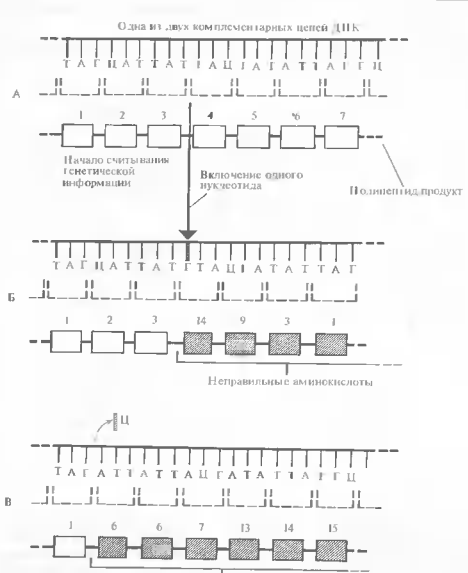


Рис. 10-25. Мутации, связанные с включением или выпадением одного основания, изменяют порядок считывания генетической информации. Каждая аминокислота определяется группой из трех нуклеотидов (числа обозначают аминокислоты). Считывание генетической информации (т. е. правильный выбор аминокислот) начинается всегда с одного определенного конца матрицы. *А*. Нормальная генетическая информация, в которой закодирована последовательность аминокислот функционального белка. *Б*. Мутантная генетическая информация, содержащая один лишний нуклеотид. Полипептидный продукт не обладает биологической активностью. *В*. Мутантная генетическая информация: выпадение одного нуклеотида. Полипептидный продукт не обладает биологической активностью. *Г*. Рекомбинантная генетическая информация: включение и выпадение нуклеотида, т. е. (+)- и (−)-мутации. В полипептидном продукте содержатся только две неправильные аминокислоты, и он может обладать биологической активностью.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД СЧИТЫВАЕТСЯ ГРУППАМИ ИЗ ТРЕХ ОСНОВАНИЙ

Выше мы уже отмечали, что между основаниями ДНК и аминокислотами не может быть соотношения 1 : 1. Это с очевидностью вытекает из того факта, что аминокислот существует двадцать, а оснований — всего четыре. Следовательно, каждая аминокислота должна кодироваться не одним нуклеотидом, а группой нуклеотидов. Генетические данные свидетельствуют о том, что число нуклеотидов, кодирующих одну аминокислоту, равно трем и что код считывается линейно с одного конца последовательности. К этому заключению приводят эксперименты по скрещиванию между мутантами, у которых были утрачены (или, наоборот, добавлены) один или несколько нуклеотидов. При мутациях этого типа функция генов обычно полностью нарушается. В противоположность этому простые замены нуклеотидов часто приводят к мутациям, дающим течь (т. е. к мутациям с неполным нарушением функции, leaky-мутациям). Белки, синтезируемые под контролем мутантных генов этого второго типа, в какой-то мере сохраняют ферментативную активность, так как в их молекуле заменена только одна аминокислота. Практически полное отсутствие ферментативной активности при делециях (или вставках) говорит о том, что в этих случаях мутантные гены обусловливают синтез полностью измененных белков.

Эти поразительные качественные различия между мутантами двух классов связаны с тем, что считывание генетического кода при синтезе белка начинается с одного конца матрицы и происходит последовательно группами по три нуклеотида. В результате делеции (или вставки) система считывания полностью нарушается (мутации со сдвигом рамки) (рис. 10-25). Если, например, последовательность АТТАГАЦАЦ и т. д. нормально читается как (АТТ) (АГА) (ЦАЦ) и т. д., то вставка одного нуклеотида (АТТЦАГАЦАЦ) дает новый «текст»: (АТТ) (ЦАГ) (АЦА) (Ц...) и т. д. Аналогичный результат получается и после делеции. При скрещивании двух мутантов с делециями (или вставками) получаются двойные мутанты, у которых порядок считывания остается нарушенным.

Однако при скрещивании мутанта со вставкой и мутанта с какой-нибудь близко расположенной делецией могут получаться частично активные гены. Кроссинговер на участке между делецией и вставкой восстанавливает правильный порядок считывания в остальной части гена, и только на этом участке считывание оказывается нарушенным (рис. 10-25). Белки, синтезированные под контролем таких генов, содержат нормальную последовательность аминокислот, если не считать нескольких замен, и потому они могут обладать некоторой ферментативной активностью. Иногда удается получить функционально активный ген у рекомбинантов, которые несут три близко расположенные вставки (или делеции). Однако рекомбинанты, содержащие четыре вставки (или делеции), всегда образуют белки, полностью лишенные активности. Именно опыты этих двух последних типов говорят в пользу того, что считывание происходит группами по три нуклеотида; только при таком порядке считывания соединение трех делеций (или вставок) должно приводить к восстановлению порядка считывания за пределами области делеции (или вставки) (рис. 10-26).

Таким образом, ген среднего размера, содержащий 900 нуклеотидных пар, подразделяется на 300 единиц считывания, каждая из которых кодирует одну аминокислоту. Это хорошо согласуется со средними размерами известных белков, мол. веса которых лежат в пределах 30 000 (300 аминокислот). Поскольку оба определения (размер гена и размер белка) сделаны приблизительно (с точностью 50—100 %), такое согласие величин даже лучше, чем то, которого можно было бы ожидать в эксперименте.

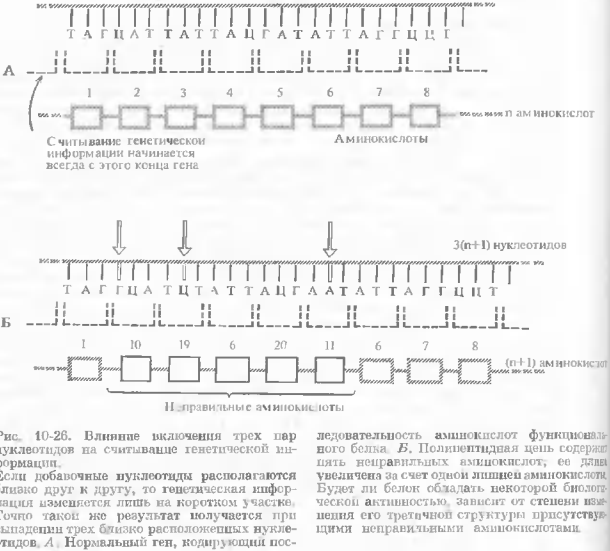


Рис. 10-26. Влияние включения трех пар нуклеотидов на считывание генетической информации.

Если добавочные нуклеотиды располагаются близко друг к другу, то генетическая информация изменяется лишь на коротком участке. Точно такой же результат получается при выпадении трех близко расположенных нуклеотидов. *А.* **Нормальный ген, кодирующий последовательность аминокислот функционального белка.** *Б.* **Полипептидная цепь содержит пять неправильных аминокислот, ее длина увеличена за счет одной лишней аминокислоты. Будет ли белок обладать некоторой биологической активностью, зависит от степени изменения его третичной структуры присутствующими неправильными аминокислотами.**

ВЫВОДЫ

Генетическая информация заключена в линейной последовательности четырех оснований, входящих в состав молекулы ДНК. Теоретически может существовать очень много различных последовательностей оснований, поскольку число перестановок оснований равно 4^n, где n — число нуклеотидов, входящих в состав цепи ДНК. Все мутации представляют собой изменения последовательности пар оснований. В основе многих мутаций лежит замена одной, расположенной в определенном месте, пары оснований, в то время как другие мутации представляют собой вставки или выпадения одной или нескольких нуклеотидных пар. Часто одна пара оснований замещается другой в результате ошибок, возникающих в процессе образования нормальных водородных связей во время репликации ДНК. Появление вставок или делеций связано нередко с ошибками, происходящими в процессе кроссинговера.

Бо́льшая часть нуклеотидов в молекуле ДНК входит в состав генов, кодирующих специфические полипептидные цепи. Расстояние между концом одного гена и началом соседнего может быть очень небольшим и составляет иногда всего лишь несколько нуклеотидов. Почти все молекулы ДНК содержат большое число генов, в каждый из которых входит

обычно от 600 до 1800 пар оснований. Поскольку группа из трех последовательных нуклеотидов кодирует одну индивидуальную аминокислоту, большая часть полипептидов состоит из 200—600 аминокислот.

Кроссинговер возникает в результате разрыва и воссоединения двухцепочечных молекул ДНК. Он не связан непосредственным образом с репликацией ДНК, а происходит, по всей вероятности, при участии специфических расщепляющих ферментов, под действием которых образуются выступающие из молекулы длинные участки одноцепочечной ДНК. Образование водородных связей между этими участками может приводить к возникновению рекомбинантных молекул ДНК. Бо́льшая часть событий, происходящих на молекулярном уровне в процессе кроссинговера, остается до сих пор неизвестной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Benzer S., The Fine Structure of the Gene. In: The Molecular Basis of Life, R. H. Haynes and P. C. Hanawalt (eds.), Freeman, San Francisco (1968), p. 130. Ясно написанная статья, которая была опубликована в 1962 г. в журнале «Scientific American», а затем перепечатана в книге «The Molecular Basis of Life».

Stahl F., The Mechanics of Inheritance, 2nd ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1969. Мутации и рекомбинации с точки зрения одного из наиболее проницательных исследователей, занимающихся фагами. Особую ценность представляют вопросы, которые помещены в конце каждой главы.

Drake J. W., The Molecular Basis of Mutation, Holden-Day, San Francisco, 1970. Новая и обширная сводка данных о механизме мутаций.

Swanson C. P., Merz T., Young W. J., Cytogenetics, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1967. Короткое введение к изучению многочисленных цитологических фактов, знание которых необходимо для понимания экспериментов по рекомбинации на высших организмах.

Muzyczka N., Poland R. L., Bessman M. J., Studies on the Biochemical Basis of Spontaneous Mutation, J. Biol. Chem., **247**, 7116 (1972). Изящное доказательство существования механизма коррекции в процессе репликации ДНК.

Whitehouse H. K. L., Toward an Understanding of the Mechanism of Heredity, 2nd ed., Edward Arnold, London, 1969. Самое полное обсуждение механизма кроссинговера, какое только можно найти в учебниках.

Meselson M., Weigle J. J., Chromosome Breakage Accompanying Genetic Reconstruction in Bacteriophage, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **47**, 857—868 (1961). Классическая работа, в которой методами молекулярной биологии было показано, что во время кроссинговера происходит разрыв хромосом.

Emerson S., Linkage and Recombination at the Chromosomal Level. In: Genetic Organization, E. W. Caspari and A. W. Ravin (eds.), Academic, New York, 1969. Первый основательный обзор, в котором явление генной конверсии анализируется в связи с процессами, происходящими при репарации ДНК.

Hutchkiss R. D., Models of Genetic Recombination, Ann. Rev. Microbiol., **28**, 445 (1974). В обзоре дано очень полезное сравнение современных молекулярных моделей кроссинговера.

Sobell H. M., Symmetry in Protein-Nucleic Acid Interaction and Its Genetic Implications, Adv. in Genetics, **17**, 411 (1973). Попытка связать кроссинговер с наличием симметричных нуклеотидных последовательностей.

Sigal N., Alberts B., Genetic Recombination: The Nature of a Crossed Stranded Exchange between Two Homologous DNA Molecules, J. Mol. Biol., **71**, 789 (1972). В этой работе получен очень важный результат, который показывает, что между двойными спиралями ДНК может происходить обмен одиночными цепями без утраты каких-либо пар оснований.

Broker T. R., Lehman I. R., Branched DNA Molecules: Intermediates in T4 Recombination, J. Mol. Biol., **60**, 131 (1971). Визуальное исследование ДНК в процессе рекомбинации с помощью электронного микроскопа.

Crick F. H. C., The Genetic Code, Sci. Am., October 1962, pp. 66—74. In: The Molecular Basis of Life, R. H. Haynes and P. C. Hanawalt (eds.), Freeman, San Francisco, 1968, p. 198 (1968). Описание экспериментов, с помощью которых Крик и Бреннер, используя мутанты фага T4, исследовали механизм мутаций со сдвигом рамки и показали, что генетический код считывается группами из трех нуклеотидов.

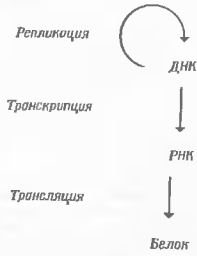
Streisinger G., Okada Y., Emrich J., Newton J., Tsugita A., Terzaghi E., Inoye M., Frameshift Mutations and the Genetic Code. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., XXXI, 77 (1966). Очень изящное подтверждение гипотезы о механизме мутаций со сдвигом рамки, полученное благодаря анализу аминокислотной последовательности белков.

ГЛАВА
11 Синтез РНК на ДНК-матрицах (транскрипция)

Теперь мы достаточно подготовлены, чтобы обсудить вопрос о том, каким образом ДНК контролирует последовательность аминокислот в белках. Поскольку боковые группы многих аминокислот не способны к образованию специфических водородных связей с нуклеотидами (или с группами нуклеотидов) и не имеют поверхностей, комплементарных по форме этим последним, мы должны ожидать, что механизм выбора аминокислот при синтезе полипептида окажется в химическом отношении более сложным, чем выбор нуклеотидов при репликации ДНК. В то же время известно, что ошибки при синтезе полипептида возникают не чаще чем 1 на 1000 аминокислот. Поэтому не удивительно, что изучение этой проблемы (известной как проблема кодирования) потребовало большей теоретической изощренности, а также изобретательности в поисках экспериментальных подходов и в то же время принесло больше неожиданных результатов, чем изучение репликации ДНК.

ОСНОВНЫЕ ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Сначала мы рассмотрим данные, показывающие, что сама ДНК не может служить матрицей в белковом синтезе. Генетическая информация, закодированная в ДНК, передается другому классу молекул, которые в дальнейшем и выполняют функцию матриц уже непосредственно при синтезе белка. Такими промежуточными матрицами служат молекулы рибонуклеиновой кислоты (РНК). Это полимерные макромолекулы, химически весьма близкие к ДНК. Их отношение к ДНК и к соответствующим белкам обычно выражают в следующем виде (так называемый *основной постулат*).



Стрелки указывают направление переноса генетической информации. Кривая стрелка при ДНК означает, что ДНК играет роль матрицы в про-

цессе самовоспроизведения. Стрелка, идущая от ДНК к РНК, показывает, что все типы клеточной РНК образуются на ДНК-матрицах[1]. Наконец, последняя стрелка (от РНК к белку) выражает тот факт, что последовательность аминокислот во всех белках определяется РНК-матрицами. Особенно важно подчеркнуть, что перенос информации происходит только в указанном направлении; белок никогда не может служить матрицей для синтеза РНК, а РНК — матрицей для синтеза ДНК[2].

СИНТЕЗ БЕЛКА В ОТСУТСТВИЕ ДНК

Многие наблюдения показывают, что синтез белка может происходить в отсутствие ДНК. Наиболее наглядно этот факт демонстрируется на клетках, содержащих ядра. В таких клетках почти вся ДНК сосредоточена в хромосомах (которые находятся в клеточном ядре), а синтез белка происходит главным образом в цитоплазме. Уже это пространственное разделение говорит о существовании некой промежуточной матрицы, переносящей генетическую информацию к местам синтеза белка в цитоплазме. Для бактериальных клеток такого простого доказательства не существует, так как они не имеют ядра. Однако опыты с бесклеточными бактериальными системами убеждают нас в том, что синтез белка без прямого участия ДНК представляет собой общее явление.

Промежуточной матрицей, несомненно, служит РНК. Об этом свидетельствует ряд фактов. На многих клетках, имеющих ядро, удалось показать, что вся клеточная РНК синтезируется именно в ядре, которое содержит ДНК (рис. 11-1)[3]. В цитоплазме, не содержащей ДНК, РНК не синтезируется[4]. РНК, следовательно, образуется там, где она и должна образовываться, если она синтезируется на ДНК. Большая часть синтезированной РНК в дальнейшем переходит в цитоплазму, в которой в основном и протекает синтез белка.

Количество синтезированного белка находится в прямой зависимости от содержания РНК в клетке. Клетки, богатые РНК, синтезируют больше белка, чем клетки, в которых количество РНК понижено. Наглядным примером этого могут служить клетки поджелудочной железы — ткани, которая синтезирует большие количества протеолитических ферментов, секретируемых в пищеварительный тракт. Клетки поджелудочной железы отличаются высоким содержанием РНК (рис. 11-2). Мышечные клетки, напротив, бедны РНК и в соответствии с этим синтезируют мало белка. Значение этой корреляции было подтверждено в опытах с изотопами, предпринятых с целью определить местоположение белкового синтеза в цитоплазме. Сначала клетки на очень короткие промежутки времени помещали в растворы аминокислот, меченных радиоактивными изотопами. За эти короткие промежутки времени некоторая часть метки включалась в белки. Затем клетки быстро разрушали и определяли ту фракцию гомогената, которая содержала новообразованный белок (его идентифицировали по радиоактивной метке). Для всех исследованных клеток были получены одинаковые результаты: новообразованные полипептидные цепи оказались ассоциированными со сферическими РНК-содержащими частицами — рибосомами (рис. 11-3).

---

[1] Это утверждение справедливо лишь для нормальных клеток, но не для клеток, зараженных некоторыми РНК-содержащими вирусами (гл. 13).

[2] В гл. 20 мы увидим, что РНК некоторых вирусов служит матрицей в синтезе ДНК.

[3] Исключение составляют некоторые клетки, инфицированные вирусом (гл. 15).

[4] В это утверждение необходимо внести поправку, поскольку в митохондриях и хлоропластах также обнаружены небольшие количества ДНК. Эта ДНК может, очевидно, играть роль матрицы при образовании РНК, обеспечивающей синтез специфических белков митохондрий и хлоропластов.

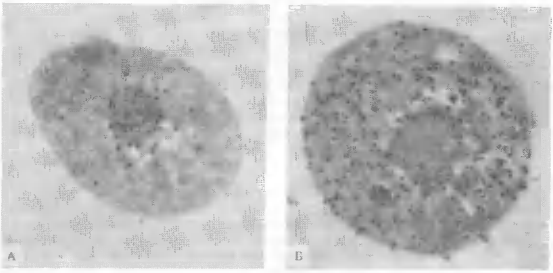


Рис. 11-1.
А. Радиоавтограф клетки (*Tetrahymena*), помещенной на 15 мин в среду с радиоактивным цитидином. Рентгеновская пленка совмещена с фотографией тонкого среза клетки. Каждая черная точка — это след электрона, испускаемого при распаде ^3H (тритий), включенного в РНК. Почти вся новообразованная РНК обнаруживается в ядре. *Б*. Радиоавтограф такой же клетки, помещенной на 12 мин в среду с радиоактивным цитидином и перенесенной затем на 88 мин в среду с немеченым цитидином. Практически вся метка, включенная за первые 12 мин, покинула ядро и перешла в цитоплазму. (С любезного разрешения д-ра Прескота; Prescott, Progr. Nucleic Acid Res., III, 35, 1964.)

Рис. 11-2. Электронная микрофотография части клетки поджелудочной железы летучей мыши; × 105 000. (С любезного разрешения д-ра Портера.)

Видны митохондрии и большое количество рибосом. Некоторые рибосомы лежат свободно, другие (особенно в верхней части фотографии) прикреплены к мембранам эндоплазматической сети.

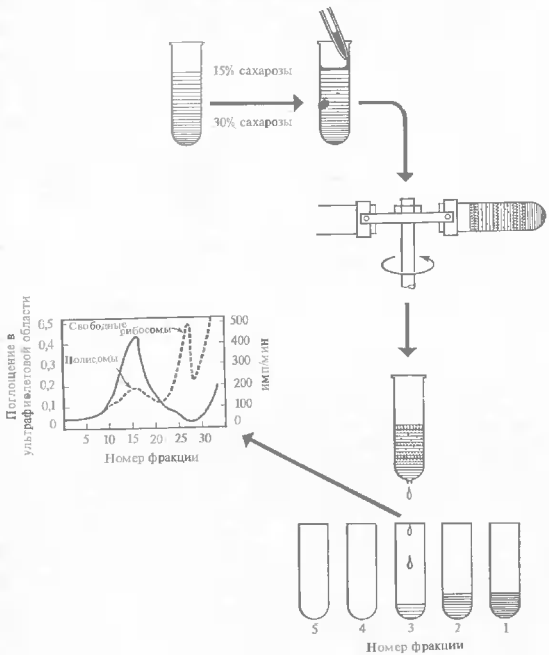


Рис. 11-3. Опыт с градиентом плотности сахарозы, доказывающий, что синтез белка происходит на рибосомах (Rich, Sci. Am., 209, 44—47, 1963).

Для получения градиента сахарозу растворяют в воде и помещают в пробирку. В типичном эксперименте ретикулоциты кролика инкубируют 45 с с аминокислотами, меченными ^{14}C. Рибосомы наслаивают на градиент сахарозы и подвергают центрифугированию, а затем полученные отдельные фракции анализируют. Рибосомы обнаруживают по сильному поглощению в ультрафиолетовой области (260 нм). Новосинтезированные полипептидные цепи, содержащие ^{14}C, выявляют по радиоактивности. Оказывается, что они находятся в наиболее тяжелой рибосомной фракции (полирибосомах).

В опытах с тщательно приготовленными клеточными экстрактами также удается наблюдать синтез небольшого количества белка. И в этом случае радиоактивная метка позволяет установить, что бо́льшая часть новообразованного белка прикреплена к рибосомам.

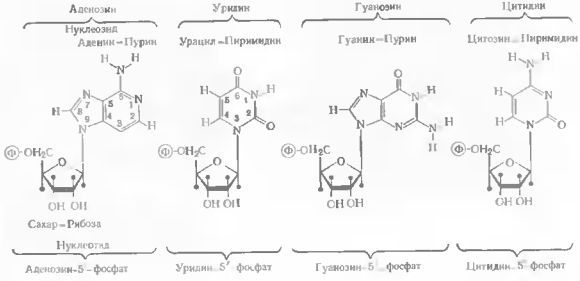


Рис. 11-4. Нуклеотиды, входящие в состав РНК.

ХИМИЧЕСКИ РНК ОЧЕНЬ БЛИЗКА К ДНК

Уже простое рассмотрение структуры РНК наводит на мысль о том, каким может быть механизм синтеза РНК на ДНК-матрице. Химически РНК очень близка к ДНК; это тоже длинная неразветвленная цепь, построенная из нуклеотидов четырех типов (рис. 11-4), которые связаны между собой 3′,5′-фосфодиэфирными связями (рис. 11-5). От ДНК она отличается только в двух отношениях (рис. 11-6): во-первых, вместо дезоксирибозы, входящей в состав ДНК, РНК содержит рибозу, в которой имеется дополнительная группа ОН, и, во-вторых, вместо тимина в состав РНК входит другой, очень близкий к тимину пиримидин — урацил. Однако, несмотря на эти отличия, полирибонуклеотиды обладают потенциальной способностью к образованию спиралей из двух комплементарных цепей, напоминающих двойную спираль ДНК. Ни присутствие добавочной гидроксильной группы в углеводной части молекулы, ни отсутствие метильной группы в остатке урацила не нарушают способности РНК к образованию двойных спиралей, стабилизируемых водородными связями между парами оснований.

ОБЫЧНО МОЛЕКУЛЫ РНК СОСТОЯТ ИЗ ОДНОЙ ЦЕПИ

Соотношение оснований в молекуле РНК по большей части указывает на отсутствие комплементарности: $А \neq У$ и $Г \neq Ц$ (табл. 11-1). Это говорит о том, что РНК, как правило, не обладает регулярной структурой, стабилизированной водородными связями. В отличие от ДНК бо́льшая часть РНК существует в одноцепочечной форме. Из-за отсутствия регулярного спаривания оснований одноцепочечные молекулы РНК не имеют простой регулярной структуры, такой, какую имеют молекулы ДНК; поэтому их трехмерная конфигурация остается пока невыясненной и, возможно, ее еще очень нескоро удастся определить. Первоначально это обстоятельство порождало самые пессимистические настроения, ибо всем

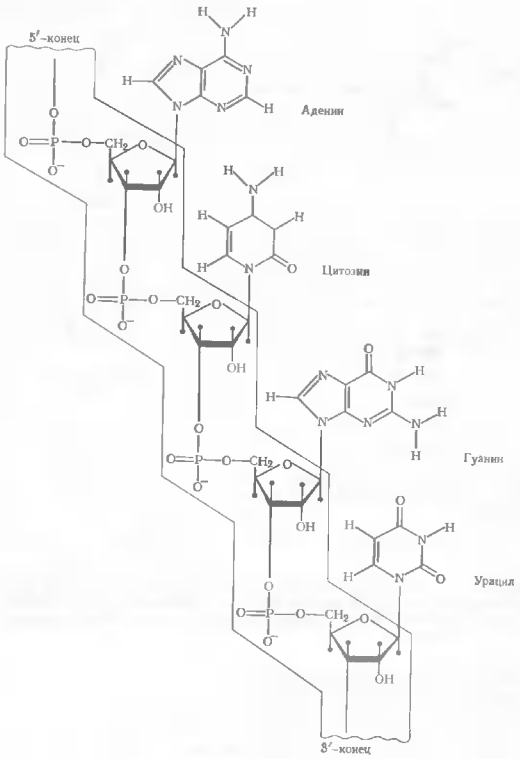


Рис. 11-5. Химическая формула полирибонуклеотида.

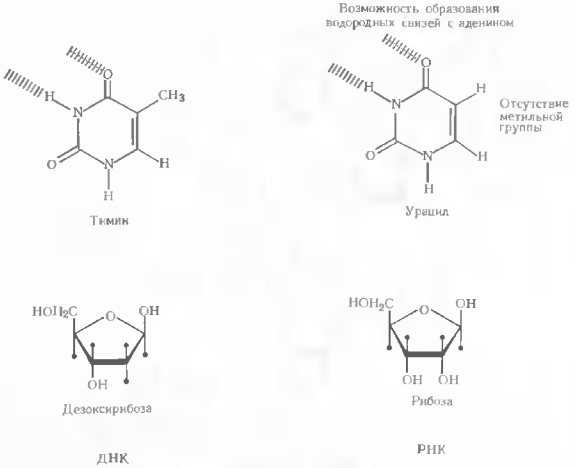


Рис. 11.6 Строение урацила и рибозы в сравнении с тимином и дезоксирибозой соответственно

казалось ясным, что сначала нужно «увидеть» матрицу, а затем уже приступать к вопросу о том, как эта матрица осуществляет выбор аминокислот в процессе синтеза белка. К счастью, как мы увидим ниже, опасения оказались напрасными.

Таблица 11-1 Нуклеотидный состав РНК, полученной из различных источников

Источник РНК	Содержание данного нуклеотида в РНК, %			
	А	У	Г	Ц
Escherichia coli	24	22	32	22
Proteus vulgaris (бактерии)	26	19	31	24
Euglena (водоросль)	22	24	30	27
Вирус желтой мозаики турнепса	23	22	17	38
Вирус полиомиелита	30	25	25	20
Почка крысы	19	20	30	31

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ РНК НА ДНК-МАТРИЦАХ

Сходство в строении между ДНК и РНК (выше мы уже убедились в том, что молекула РНК — это длинная неразветвленная цепь, построенная из нуклеотидов четырех типов) немедленно наводит на мысль, что генетическая информация, заключенная в цепях ДНК, должна передаваться комплементарным цепям РНК. Согласно этой гипотезе, на какой-либо одной или на нескольких стадиях клеточного цикла цепи ДНК расходятся и в течение некоторого времени функционируют как матрицы, присоединяя (по принципу специфического спаривания: А — У и Г — Ц) комплементарные рибонуклеотиды. Предполагается также, что существуют и какие-то контролирующие механизмы, от которых зависит, какие комплементарные цепи будут синтезироваться на разделившихся цепях ДНК — новые цепи ДНК или цепи РНК.

Прямые данные в пользу этой гипотезы были получены благодаря открытию соответствующего фермента — РНК-полимеразы. Этот фермент, имеющийся практически в каждой клетке, соединяет между собой рибонуклеотиды, из которых построен остов молекулы РНК, катализируя образование межнуклеотидных 3′,5′-фосфодиэфирных связей (рис. 11-7). Однако данный процесс протекает только в присутствии ДНК. Эта зависимость вновь указывает на то, что порядок нуклеотидов в РНК определяется последовательностью нуклеотидов в цепи ДНК. Доказательство правильности такого представления было получено при исследовании

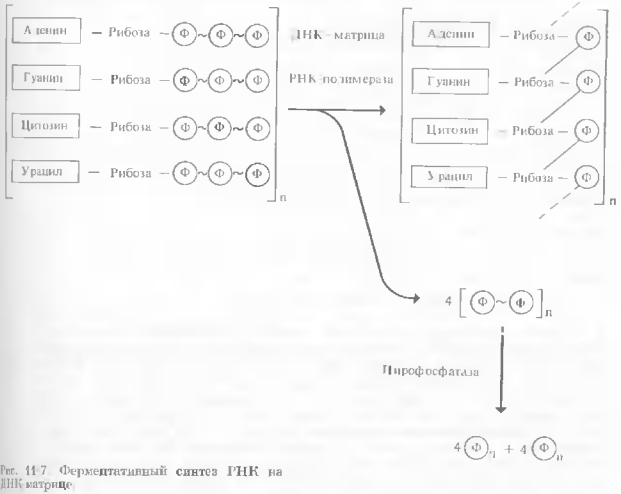


Рис. 11-7. Ферментативный синтез РНК на ДНК-матрице.

нуклеотидного состава РНК, синтезированной на ДНК различных типов. Опыты показали, что нуклеотидный состав РНК [(А + У)/(Г + Ц)] всегда сходен с составом матричной ДНК [(А + Т)/(Г + Ц)] (табл. 11-2).

Таблица 11-2 Сравнение нуклеотидного состава РНК (синтезированной при помощи РНК полимеразы) и соответствующей двухцепочечной матричной ДНК

Источник матричной ДНК	Доля данного нуклеотида в продукте ферментативной реакции				Отношение	
	А	У	Г	Ц	$\frac{А + У}{Г + Ц}$ в РНК	$\frac{А + Т}{Г + Ц}$ в ДНК
Фаг Т2	0,31	0,34	0,18	0,17	1,86	1,84
Тимус теленка	0,31	0,29	0,19	0,21	1,50	1,35
E. coli	0,24	0,24	0,26	0,26	0,92	0,97
Micrococcus lysodeikticus (бактерия)	0,17	0,16	0,33	0,34	0,49	0,39

Дальнейшие эксперименты непосредственно продемонстрировали, что в роли матрицы выступает только одна цепь ДНК. Наиболее убедительными были эксперименты с использованием ДНК фага ϕX174. Этот фаг относится к особому классу вирусов, содержащих одноцепочечную ДНК (вместо обычной двухцепочечной). При использовании такой ДНК в качестве матрицы для РНК-полимеразы продукт реакции оказался по составу комплементарным матрице (табл. 11-3). Более того, продукт реакции

Таблица 11-3 Нуклеотидный состав РНК, синтезированной на матрице одноцепочечной ДНК фага ϕX174

Нуклеотид	Содержание, %		
	в ДНК фага ϕX174	в РНК	
		найденное	рассчитанное
Аденин	0,25	0,32	0,33
Урацил	0,33 (тимин)	0,25	0,25
Гуанин	0,24	0,20	0,18
Цитозин	0,18	0,23	0,24
Всего	1,00	1,00	1,00

и матрица оставались прочно связанными и образовывали гибридную двойную спираль ДНК — РДК. В этом отношении результат указанных опытов не совпадает с результатами опытов, в которых используют двухцепочечную ДНК. Когда матрицей служит двухцепочечная ДНК, образующаяся РНК тотчас же отделяется от матрицы, а разделившиеся цепи ДНК вновь спариваются, принимая исходную форму. По-видимому, двойная спираль, образованная двумя комплементарными цепями ДНК, в энергетическом отношении более выгодна (и поэтому более стабильна), чем гибридная структура ДНК — РНК, так что свободная цепь ДНК немедленно вытесняет новосинтезированную цепь РНК, как только РНК-полимераза освободит соответствующий участок матрицы (рис. 11-8).

Рис. 11-8. Синтез молекулы РНК на одной из цепей ДНК-матрицы (транскрипция). В результате присоединения фермента РНК-полимеразы к молекуле ДНК открывается небольшой участок двойной спирали, после чего свободные основания ДНК могут спариваться с предшественниками РНК (рибонуклеозидтрифосфатами). По мере продвижения фермента вдоль матрицы растущая цепь РНК отходит от матрицы и двойная спираль восстанавливается. Таким образом, почти немедленно после начала синтеза РНК передний конец ее цепи уже может связываться с рибосомой (ср. 12).

Мы видим, таким образом, что механизмы синтеза РНК и ДНК в своих основных чертах очень сходны. В обоих случаях непосредственными предшественниками являются нуклеозидтрифосфаты и энергия одной из пирофосфатных связей используется для того, чтобы направить реакцию в сторону синтеза. В обеих реакциях участвует только один фермент, катализирующий присоединение нуклеотидов всех четырех типов; последовательность присоединения определяется матрицей по принципу специфического спаривания оснований. Следовательно, процесс транскрипции (синтез РНК на ДНК-матрице) отличается довольно большой точностью. Однако нет никаких данных о существовании какого-либо механизма коррекции, участвующего в синтезе РНК. Поэтому весь процесс транскрипции в целом не обладает той почти совершенной точностью копирования, которая характерна для процесса самовоспроизведения ДНК. Но поскольку клеточная РНК не способна к самовоспроизведению, возникающие ошибки (крайне редкие) не воспроизводятся в последующих генерациях.

ТОЛЬКО ОДНА ЦЕПЬ ДНК ИГРАЕТ РОЛЬ МАТРИЦЫ В ПРОЦЕССЕ СИНТЕЗА РНК

Если бы обе цепи ДНК служили матрицами при синтезе РНК, то каждый ген синтезировал бы две комплементарные молекулы РНК, несущие информацию для двух разных белков. Однако генетические данные свидетельствуют о том, что под контролем каждого гена синтезируется только один белок. Для объяснения этого можно, очевидно, выдвинуть два предположения: либо в процессе транскрипции образуется только одна цепь, либо если их образуется две, то по каким-то причинам функционирует только одна. Справедливо, по-видимому, первое предположение: in vivo образуется только одна из двух возможных реплик цепей ДНК. Это было отчетливо показано путем анализа РНК, синтезируемой in vivo под контролем вируса SP8, размножающегося в клетках *Bacillus subtilis*. У ДНК этого вируса в отличие от ДНК большинства других вирусов комплементарные цепи резко отличаются одна от другой по составу оснований и могут быть относительно легко разделены. Это открывает путь для решения

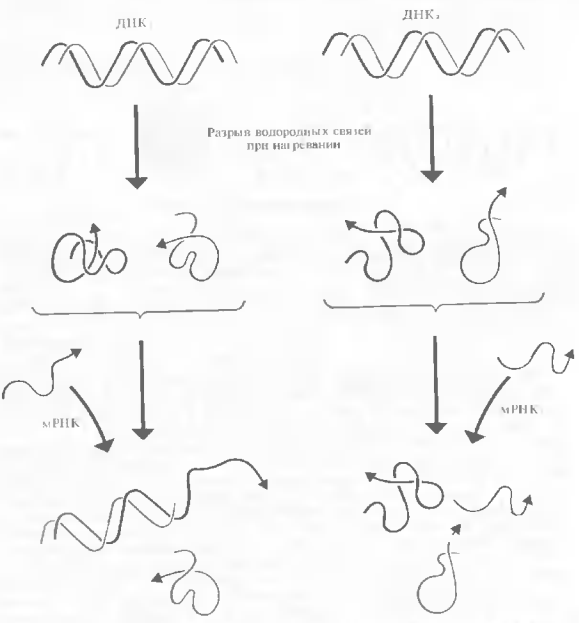


Рис. 11-9. Возможность гибридизации ДНК с РНК доказывает комплементарность нуклеотидных последовательностей РНК и одной из двух цепей ее ДНК-матрицы.
В левой части рисунка изображено образование гибридной молекулы с участием молекулы РНК и одной из двух цепей ДНК-матрицы. Правая часть рисунка демонстрирует специфичность метода. В эксперименте та же самая РНК была смешана с чужеродной ДНК. При этом гибридные молекулы не образовывались.

вопроса о том, комплементарна ли синтезированная под контролем вируса РНК одной или двум цепям ДНК.

Для выяснения этого вопроса была использована методика получения искусственных гибридов ДНК — РНК путем смешения РНК с денатурированной одноцепочечной ДНК. При нагревании ДНК до температур несколько ниже 100°С водородные связи, удерживающие комплементарные цепи друг возле друга, разрываются и цепи быстро расходятся (денатурация ДНК). Если затем медленно понижать температуру, то комплементарные цепи вновь соединяются благодаря образованию правильных водородных связей и двойная спираль восстанавливается (ренатурация ДНК). Однако если осторожное охлаждение проводить в присутствии одно-

цепочечной РНК, синтезированной на гомологичной ДНК, то наряду с репатурированной ДНК образуются также и гибриды ДНК — РНК (рис. 11-9). Эти гибриды высокоспецифичны и образуются лишь тогда, когда некоторые участки цепей ДНК и РНК комплементарны друг другу. Поэтому данная методика позволяет выяснить природу РНК, синтезируемой in vivo при заражении клеток фагом SP8. Для этого нужно лишь установить, образует ли она гибриды с обеими цепями ДНК или только с одной. Результат оказался совершенно однозначным: копируется только одна цепь ДНК.

Это избирательное копирование объясняет нам, почему РНК, синтезируемая на ДНК-матрице, по составу оснований обычно не комплементарна матричной ДНК. Нет никаких причин для того, чтобы в какой-либо одной цепи ДНК количество А было равно количеству Т или количество Г — количеству Ц. Соотношение 1 : 1 обеспечивается лишь в двухцепочечной молекуле, содержащей две комплементарные цепи. В одиночных же цепях ДНК соотношение оснований лишь очень редко приближается к тому, которое характерно для комплементарных структур. И соответственно очень редко встречаются одноцепочечные молекулы РНК, в которых А=У и Г=Ц.

Эффект избирательного копирования цепей ДНК можно также наблюдать in vitro. Результат в этом случае зависит от сохранения нативности матричной ДНК. Если, например, матричную ДНК фага Т7 денатурируют, вызывая разделение цепей, или если ее разрушают так, что возникают области, имеющие одноцепочечную структуру, то в таких случаях копируются обе цепи. Если же используются интактные молекулы ДНК фага Т7 (мол. вес $2{,}6 \cdot 10^7$), то в системе in vitro копируется та же самая цепь ДНК, которая копируется in vivo в процессе размножения вируса (рис. 11-10).

Часто транскрипция носит более сложный характер по сравнению с тем, который наблюдается у фагов Т7 или SP8. В хромосомах фагов Т4 и λ транскрибируются обе цепи, при этом для некоторых генов (обычно они расположены вместе) матрицей служит одна цепь, в то время как остальные гены транскрибируются на другой цепи (рис. 15-24). Такая же картина наблюдается и у *E. coli*, и в этом случае хромосома может транскрибироваться в двух направлениях — как по часовой так и против часовой стрелки. Значительно большее число генов (например, группы генов, ответственных за синтез лактозы, триптофана и галактозы) считывается против часовой стрелки. Имеет ли этот факт какое-либо реальное значение, остается пока невыясненным. Поскольку реплицирующаяся бактериальная хромосома непрерывно вращается в определенном направлении, казалось, можно было бы думать, что раскручивание образующихся цепей РНК связано с вращением их матриц. Однако это, по-видимому, не соответствует действительности. Известен один случай, когда в результате изменения ориентации лактозных генов в хромосоме *E. coli* они должны считываться по часовой стрелке, а не наоборот, как обычно. Насколько можно судить по имеющимся данным, скорость транскрипции этих генов не изменяется при этом и, следовательно, не зависит от их ориентации.

ЦЕПИ РНК НЕ БЫВАЮТ ЗАМКНУТЫМИ В КОЛЬЦО

Все цепи клеточной РНК, исследованные до сих пор, имеют линейную форму. Несмотря на усиленные поиски, пока не обнаружено никаких кольцевых РНК[1]. Размеры линейных молекул РНК отличаются значи-

[1] Агол, Дрыгин, Романова и Богданов сообщили (FEBS Letters, 8, 13, 1970) об обнаружении ими кольцевой репликативной формы РНК вируса, вызывающего энцефаломиокардит у мышей. Все другие известные формы вирусной РНК являются линейными.

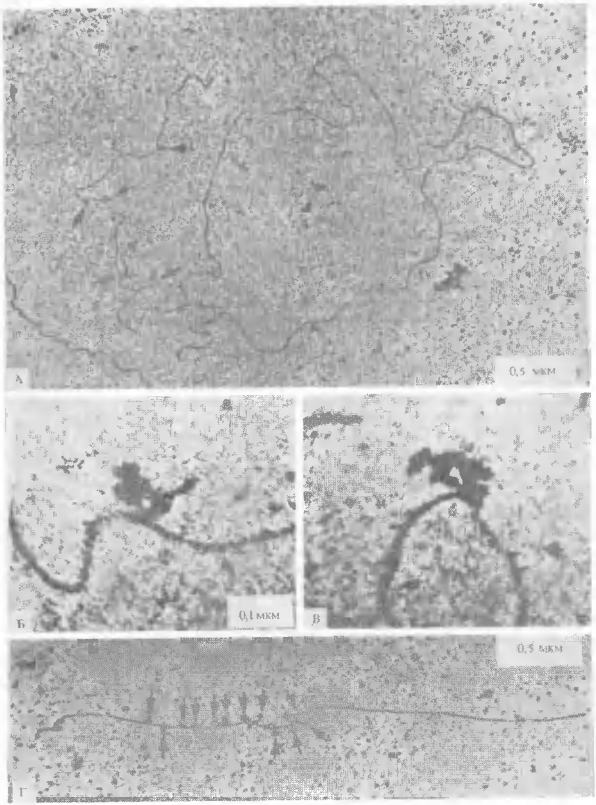


Рис. 11-40. Электронные микрофотографии ДНК фага T7, на которой происходит транскрипция РНК in vitro. (С любезного разрешения д-ра Дэвиса, Калифорнийский Технологический институт.)

А. Несколько растущих цепей РНК присоединены к ДНК-матрице. Все цепи РНК транскрибируются с одной и той же цепи ДНК фага T7, рост начинается в одной точке, находящейся недалеко от видимого слева конца цепи ДНК. Общее время синтеза — 5 мин при 37 °С. *Б* и *В.* Две прикрепленные к ДНК цепи РНК при большем увеличении. *Г.* Синтез, проходивший при 37 °С, был прерван через 2,5 мин. Можно видеть, что на одном конце ДНК находятся 12 растущих цепей РНК.

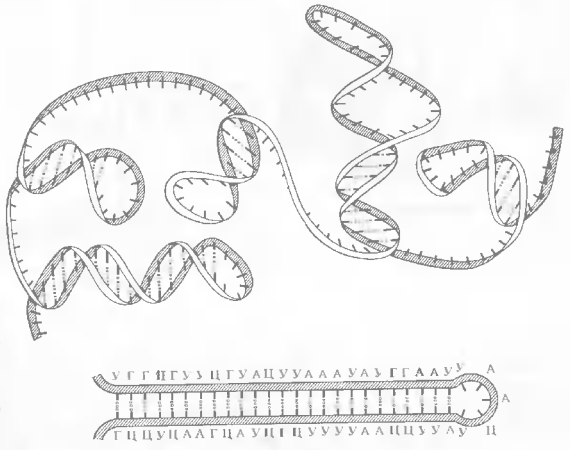


Рис. 11-11.
А. Схематическое изображение укладки цепи РНК. Показано несколько двухцепочечных участков, образовавшихся с помощью водородных связей. *Б.* Изображение действительно существующей петли в РНК вируса R17.

тельно бо́льшим разнообразием по сравнению с размерами цепей ДНК. Некоторые из молекул РНК построены всего из 75 нуклеотидов, в то время как другие содержат свыше 10 000 нуклеотидов. Независимо от длины молекулы РНК обладают, как правило, частично упорядоченной конформацией. Бо́льшая часть оснований в РНК связана между собой водородными связями и образует пары, подобные парам оснований в ДНК (А связывается с У, а Г с Ц). Такое спаривание оснований осуществляется в результате того, что при складывании цепи РНК образуются шпилькообразные петли, причем основания, входящие в состав данной петли, сближаются между собой и образуют ДНК-подобную двухцепочечную структуру (рис. 11-11). Возникновение такой конфигурации цепи возможно только в том случае, если в данном участке цепи число остатков аденина приблизительно равно числу остатков урацила или если число остатков гуанина приблизительно равно числу остатков цитозина.

ПРИ СИНТЕЗЕ РНК ПОЛИНУКЛЕОТИДНЫЕ ЦЕПИ РАСТУТ ВСЕГДА В ОПРЕДЕЛЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ

В каждой цепи РНК, как и в цепи ДНК, углеводно-фосфатный остов определенным образом ориентирован. Конец цепи, содержащий 5′-углеродный атом рибозы, условно называют 5′-концом, а конец, содержащий

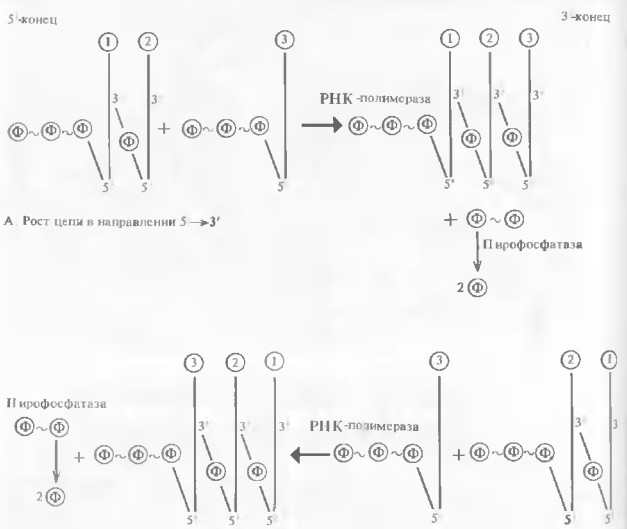


Рис. 11-12. Два возможных направления роста цепи при синтезе РНК. Результаты многочисленных экспериментов свидетельствуют о том, что цепи всегда растут в направлении 5′ → 3′.

3′-углеродный атом, соответственно 3′-концом (рис. 11-5). До недавнего времени у нас не было сколько-нибудь определенных данных о направлении роста полинуклеотидных цепей РНК. Если рост происходит в направлении 5′ → 3′, то группу Ⓟ ~ Ⓟ ~ Ⓟ должен содержать нуклеотид, с которого начинается цепь (рис. 11-12), а если цепь растет в направлении 3′ → 5,′ то эту группу будет содержать растущий конец цепи. В настоящее время убедительно показано, что цепь растет в направлении 5′ → 3′. При исследовании растущих незаконченных цепей присоединяемые нуклеотиды обнаруживались лишь на 3′-конце, а группы Ⓟ ~ Ⓟ ~ Ⓟ — у начального нуклеотида.

Эксперименты с антиметаболитом 3′-дезоксиаденозином также подтверждают, что рост цепи идет в направлении 5′ → 3′. Этот антиметаболит, попадая в клетку, сначала фосфорилируется до соответствующего трифосфата, а затем присоединяется к растущему 3′-концу. Поскольку он не содержит группы 3′-OH, следующий нуклеозидтрифосфат уже не может присоединиться, и синтез РНК останавливается.

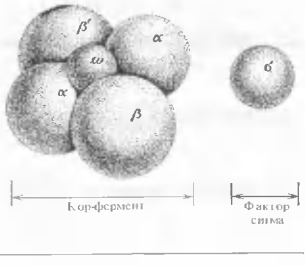


Рис. 11-13. Схематическое изображение РНК-полимеразы. Показана субъединичная структура фермента.

МОЛЕКУЛА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ПОСТРОЕНА ИЗ СУБЪЕДИНИЦ

В отличие от ДНК-полимеразы I, которая состоит только из одной полипептидной цепи, РНК-полимераза имеет очень сложную субъединичную структуру. Фермент в активной форме (*холофермент*) имеет константу седиментации приблизительно 15 S и содержит 5 различных полипептидных цепей: β′, β, σ, α и ω, мол. веса которых равны соответственно 160 000, 150 000, 90 000, 40 000 и 10 000. Между этими цепями не существует никаких ковалентных связей; их агрегация осуществляется в результате образования слабых связей. В состав активной молекулы фермента входит по одной цепи каждого типа, за исключением α, которая представлена двумя цепями. Совокупность всех этих цепей представляет собой полный холофермент ($\beta' \beta \alpha_2 \omega \sigma$), мол. вес которого немного превышает $0{,}5 \cdot 10^6$ (рис. 11-13). Цепь σ связана с другими цепями не очень прочно, поэтому относительно легко можно выделить агрегат, состоящий из $\beta' \beta \alpha_2 \omega$. Эта особая структура получила название *кор-фермента* (core — сердцевина) благодаря тому, что она катализирует образование межнуклеотидных фосфодиэфирных связей так же хорошо, как и полный холофермент.

УЗНАВАНИЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ СИГНАЛОВ НАЧАЛА СИНТЕЗА РНК

Субъединица σ сама по себе не обладает каталитической функцией; ее роль заключается в том, что она участвует в узнавании сигналов начала синтеза РНК, находящихся в молекуле ДНК. Эксперименты, проведенные в системе in vitro, показывают, что кор-фермент иногда инициирует синтез РНК и в отсутствие σ, но в этом случае происходят ошибки в выборе стартовых сигналов. Образование цепей РНК с помощью кор-фермента начинается в случайно выбранных местах вдоль обеих цепей данного гена. В присутствии же σ происходит правильный выбор цепи, и это указывает на то, что холофермент обладает способностью специфически связываться со стартовой последовательностью в ДНК. Еще предстоит выяснить вопрос о том, узнаются ли стартовые сигналы непосредственно самой σ или же она действует косвенным путем, модифицируя конфигурацию кор-фермента. В любом случае в присутствии σ происходит очень прочное связывание холофермента с теми участками ДНК (*промоторами*), в

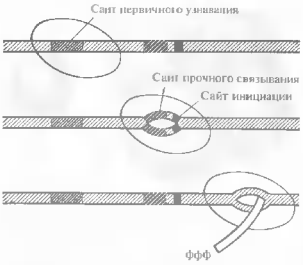


Рис. 11-14. Схематическое изображение инициации синтеза РНК после связывания холофермента РНК-полимеразы с сигналом начала синтеза РНК (промотором).

которых находятся стартовые сигналы. Весьма вероятно, что холофермент узнает вначале спаренные последовательности в интактных двойных спиралях ДНК. Однако вскоре после связывания фермента с ДНК, происходит локальное расплетание цепей в очень ограниченном участке ДНК, что дает возможность ферменту начать синтез новой цепи РНК на соответствующем одноцепочечном участке.

Еще два года назад ничего не было известно о последовательностях оснований в промоторных участках. Однако теперь уже установлены последовательности многих промоторов, а в скором времени будет выяснено еще большее число таких последовательностей. Уже сейчас ясно, что основания, которые узнают РНК-полимеразу, сами не транскрибируются в РНК (рис. 11-14). Вскоре после первичного связывания с *РНК-полимеразным участком узнавания* РНК-полимераза перемещается ближе к старту транскрипции, связываясь более прочно со вторым участком, который

Последовательность участков, связывающих РНК-полимеразу

Фаг fd	ТГЦТТЦТГАЦ **ТАТААТА** ГАЦАГГГТААААГАЦЦТГАТТТТТГА
Фаг TTA3	ААГТАААЦАЦГГ **ТАЦГАТГ** ТАЦЦАЦАТГААААЦГАЦАГТГАГТЦА
Фаг T7A2	АГТАААЦАТГЦАГ **ТААГАТА** ЦАААТЦГЦТАГГТААЦАЦТАГЦАГ
Lac-оперон E.coli UV-5	ГЦТТЦЦГЦТЦГ **ТАТААТГ** ТГТГГАА ТГГТГАГЦГГАТААЦАА
Правый промотор (P_R) фага λ	АЦЦТЦТГГЦГГТ **ГАТААТГ** ГТГГЦАТ ГТАЦТААГГАГГТГГ
Вирус SV40	ТТТАТТГЦАГЦТ **ТАТААТГ** ГТТАЦАА АТАААГЦААТАГЦАТЦ
Левый промотор (P_L) фага λ	АЦЦАЦТГГЦГГТ **ГАТАЦТГ** АГЦАЦАТ ЦАГЦАГГАШГЦАЦТГАЦ
тРНК^{Tyr} E.coli	ЦТГЦАТТТГА **ТАТГАТГ** ШГЦЦЦ ЦГ ЦТГЦЦГАТААГГГАГЦАГ
Lac оперон E.coli дикого типа	ГЦТТЦЦГГЦТЦГ **ТАТГТТГ** ТГТГГАА ТГГТГАГЦГГАТААЦАА

Рис. 11-15. Последовательности участков связывания с РНК-полимеразой в различных вирусных и бактериальных ДНК. Первое транскрибируемое основание подчеркнуто.

так же, как и первый, богат АТ-парами (*участок связывания РНК-полимеразы*). Первичные участки узнавания сильно различаются между собой как по длине, так и по последовательности оснований. В противоположность им участки, в которых происходит более прочное связывание РНК-полимеразы, содержат обычно последовательности, состоящие из семи пар оснований и являющиеся производными последовательности

5′ ТАТПурАТГ
3′ АТАПирТАЦ

Можно предположить, что индивидуальные различия в этих последовательностях (рис. 11-15) отражают различия в эффективности промоторов, обусловливающие разную степень транскрибирования тех или иных функциональных единиц ДНК. Большое количество АТ-пар, содержащихся в обоих связывающих участках, объясняется, вероятно, тем, что такие последовательности денатурируются значительно легче, чем участки, богатые ГЦ-парами. Поэтому они являются хорошими мишенями для такого фермента, как РНК-полимераза, в функционировании которого важную роль играет локальная денатурация ДНК.

СИНТЕЗ ЦЕПЕЙ РНК НАЧИНАЕТСЯ С ПРИСОЕДИНЕНИЯ ффф*А* ИЛИ ффф*Г*

Действительная инициация синтеза цепей РНК начинается не на участке более прочного связывания с РНК-полимеразой, а на расстоянии приблизительно 6 — 7 оснований от него. Таким образом, активный центр, осуществляющий действительную полимеризацию цепи РНК, может быть расположен на расстоянии около 20 Å от участка, в котором происходит более прочное связывание РНК-полимеразы. Весьма вероятно, что это расстояние не является постоянным, так как имеются косвенные данные, указывающие на то, что наблюдается некоторая неоднозначность (по крайней мере в опытах in vitro) в отношении основания, с которого начинается транскрипция. Однако во всех случаях первым основанием в цепи РНК должен быть пурин. У *E coli* большинство цепей РНК начинается с ффф*Г*, тогда как при использовании в качестве матрицы ДНК фагов ϕX174 или T7 бо́льшая часть синтезированных цепей начинается с ффф*А*.

Некоторые кажущиеся исключения из этого правила, предусматривающего обязательное начало цепей с А или Г, находят простое объяснение. После завершения синтеза большое число цепей РНК расщепляется эндонуклеазами с образованием более мелких фрагментов, многие из которых начинаются с пиримидина. Так, например, некоторые цепи тРНК начинаются с У (гл. 12), но они никогда не содержат концевых трифосфатных групп, и это является убедительным свидетельством в пользу того, что они образовались в результате расщепления более длинных цепей in vivo. Поскольку практически все клетки содержат большое число различных нуклеаз, однозначные данные о начальных нуклеотидных последовательностях могут быть получены, по всей вероятности, в экспериментах in vitro, в которых исключают влияние действия нуклеаз, используя высокоочищенные ферменты.

ОТДЕЛЕНИЕ СУБЪЕДИНИЦЫ σ ПРОИСХОДИТ ВСЛЕД ЗА ОБРАЗОВАНИЕМ ПЕРВЫХ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫХ СВЯЗЕЙ

После того как начнется элонгация цепи РНК, σ освобождается из комплекса, в состав которого входят РНК-полимераза, ДНК и синтезирующаяся цепь РНК. Освободившись, σ может снова присоединиться к дру-

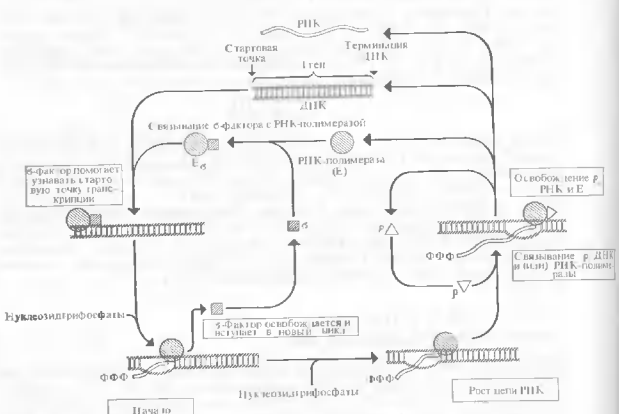


Рис. 11-16. Общая схема синтеза РНК. Схема иллюстрирует случаи, когда для терминации цепи требуется ρ-фактор. Во многих других ситуациях РНК-полимераза может самостоятельно считывать сигнал терминации.

той молекуле кор-фермента (рис. 11-16). Предполагают, что σ освобождается просто потому, что она уже сыграла свою роль. Согласно другой точке зрения, ее дальнейшее присутствие могло бы привести к такому прочному связыванию РНК-полимеразы с ДНК, что последующее перемещение фермента вдоль матрицы было бы практически невозможным. Элонгация цепи лучше всего, по-видимому, происходит в том случае, когда комплекс образующейся цепи РНК с ферментом удерживается на ДНК-матрице с помощью довольно слабых и неспецифичных к последовательностям оснований взаимодействий, которые существуют между кор-ферментом и ДНК.

СТОП-СИГНАЛЫ ОБЕСПЕЧИВАЮТ ОБРАЗОВАНИЕ ЦЕПЕЙ РНК ОПРЕДЕЛЕННОЙ ДЛИНЫ

Кроме сигналов, обозначающих начало синтеза цепей РНК, существуют также и стоп-сигналы, функция которых заключается в том, что они обеспечивают терминацию синтеза РНК в определенных точках ДНК-матрицы. Имеется, по-видимому, два типа таких сигналов. Одни сигналы,

которые считываются, очевидно, самой РНК-полимеразой, обусловливают образование транскриптов с концевой последовательностью УУУУУУ (А). Отсюда можно, по-видимому, заключить, что длинная последовательность поли(А) является частью таких терминирующих последовательностей. Стоп-сигналы другого типа действуют только в присутствии фактора ρ, представляющего собой белок с мол. весом 50 000. Он функционирует только в виде олигомера, и это указывает на то, что он узнает в ДНК симметричные последовательности, подобные тем, которые узнают рестриктазы. Однако этот белок не является нуклеазой, и, следовательно, он может каким-то образом прямо блокировать процесс элонгации. К сожалению, эксперименты, в которых была сделана попытка проверить, связывается ли ρ непосредственно с ДНК или с РНК-полимеразой или одновременно с той и с другой, дали неоднозначные результаты. Для получения более четкого ответа на этот вопрос потребуются, вероятно, прямые данные о нуклеотидной последовательности тех участков, которые служат терминирующими сигналами в присутствии фактора ρ.

ВЫВОДЫ

Молекулы ДНК не служат матрицами в самом процессе синтеза белка. Сначала генетическая информация переносится от ДНК к РНК, и лишь затем эта последняя (сама выступая в роли матрицы) определяет точную последовательность соединения аминокислот в полипептидную цепь ((ДНК→РНК→Белок)). По своему химическому строению РНК очень близка к ДНК, и генетическая информация в ее молекуле также записывается последовательностью нуклеотидов четырех типов. Однако в отличие от ДНК большинство молекул РНК известных типов имеют одноцепочечную и линейную структуру. Синтез РНК на ДНК-матрице во многих отношениях напоминает процесс репликации ДНК. Особенно важно, что выбор нуклеотидов для синтеза также осуществляется путем специфического спаривания оснований. Фермент РНК-полимераза связывает между собой мономерные предшественники РНК — нуклеозидтрифосфаты (АТФ, ГТФ, ЦТФ и УТФ). В любом данном гене копируется лишь одна из двух цепей ДНК.

РНК-полимераза построена из полипептидных цепей пяти типов. Одна из этих цепей, σ, легко отделяется от четырех других, которые в совокупности составляют кор-фермент. Кор-фермент катализирует образование фосфодиэфирных связей, а субъединица σ участвует в узнавании сигналов начала синтеза РНК, присутствующих в молекуле ДНК. После инициации синтеза РНК σ освобождается из комплекса, состоящего из ДНК, РНК и кор-фермента; освободившись, σ может вновь присоединяться к другим молекулам кор-фермента.

Синтез всех цепей РНК начинается с присоединения к матрице либо ффффА, либо ффф**Г** — в зависимости от того, какой специфический сигнал старта находится в ДНК-матрице. Процесс элонгации происходит в направлении 5′ → 3′, вследствие чего 5′-концевые нуклеотиды всегда содержат трифосфатную группу ((Ф) ~ (Ф) ~ (Ф)). Синтез цепи РНК прекращается, как только цепь доходит до стоп-сигналов, которые так же, как и сигналы старта, представляют собой специфические нуклеотидные последовательности. Терминация синтеза зависит иногда от присутствия специфического белка, ρ-фактора. Молекулярный механизм действия ρ-фактора еще не известен.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Prescott D. M., Cellular Sites of RNA Synthesis. In: J. N. Davidson and W. E. Cohn (eds.), Progr. Nucleic Acid Res., III, 35—37 (1964). Очень ясное обсуждение цитологических методов, с помощью которых было установлено, что ядро является местом синтеза большей части РНК.

Spiegelman S. S., Hybrid Nucleic Acids, Sci. Am., **210**, 48—56 (1964). В этой статье четко описаны многие экспериментальные методы, которые были столь изящно использованы для демонстрации гомологии между нуклеотидными последовательностями в ДНК и РНК.

Marmur J., Greenspan C., Palacek F., Kahan F. M., Levine J., Mandel M., Specificity of the Complementary RNA Formed by *B. subtilis* Infected with Bacteriophage SP8, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., XXVIII, 191—199 (1963). Описание эксперимента, показавшего, что только одна из двух цепей ДНК бактериофага SP8 служит матрицей для синтеза РНК in vivo.

Taylor K., Hradecna Z., Szybalski W., Asymmetric Distribution of the Transcribing Regions on the Complementary Strands of Coliphage λ DNA, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **57**, 1618 (1967). Использование метода гибридизации ДНК с РНК для установления механизма транскрипции у фага λ.

Burgess R., Travers A. A., Dunn J. J., Bautz E. K. F., Factor Stimulating Transcription by RNA Polymerase, Nature, **222**, 537 (1969). В этом сообщении изложены результаты классической работы, в которой РНК-полимераза была разделена на два компонента: кор-фермент и фактор σ.

Transcription of Genetic Material, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **XXXV** (1970). В этом томе собрано более 90 статей, в которых излагается состояние проблемы транскрипции к июню 1970 г. Это самое обширное собрание известных в настоящее время фактов, касающихся синтеза РНК.

Control of Transcription, B. B. Biswas, R. K. Mandal, A. Stevens and W. E. Cohn (eds.), Plenum, 1974. Обзорные статьи по отдельным вопросам, которые обсуждались на конференции, посвященной синтезу РНК, в 1973 г.

Chamberlin M. J., The Selective of Transcription, Ann. Rev. Biochem., **43**, 721 (1974). Превосходный обзор, в котором особое внимание уделено механизму действия РНК-полимеразы.

Pribnow D., Nucleotide sequence of a RNA Polymerase Binding Site at an Early T7 Promoter, Proc. Nat. Acad. Sci., **72** (1975). Очень ясное описание работы по определению нуклеотидной последовательности промотора.

ГЛАВА

12 Участие РНК в синтезе белка

Рассмотрим теперь ту роль, которую играют РНК в белковом синтезе. Когда к середине 50-х годов был сформулирован основной постулат молекулярной биологии (ДНК → РНК → Белок), многие допускали, что все РНК выполняют функцию матриц. Высказывались также надежды, что выяснение общей структуры РНК само по себе окажется достаточным, чтобы понять, как работает матрица. Теперь мы знаем, что все эти представления были весьма наивными и что синтез белка — процесс значительно более сложный, чем синтез нуклеиновых кислот. Более того, установлено, что не все типы РНК играют роль матриц: помимо РНК-матриц, существуют еще два других класса РНК, выполняющих другие важнейшие функции в синтезе белка.

МЕЖДУ АМИНОКИСЛОТАМИ И РНК НЕ СУЩЕСТВУЕТ СПЕЦИФИЧЕСКОГО СРОДСТВА

Выше уже упоминалось о главных причинах, определяющих сложность процесса синтеза белка. Как известно, между боковыми группами аминокислот, с одной стороны, и пуриновыми и пиримидиновыми основаниями РНК — с другой, не существует специфического сродства. Например, углеводородные боковые группы аминокислот аланина, валина, лейцина и изолейцина не только не образуют водородных связей с амино- и кетогруппами оснований, но должны активно отталкиваться этими последними. Трудно также представить себе на молекуле РНК специфические поверхности, имеющие уникальное сродство к ароматическим аминокислотам — фенилаланину, тирозину и триптофану. Таким образом, свободные аминокислоты, по-видимому, не могут сами расположиться в правильном порядке на поверхности матричной РНК.

АМИНОКИСЛОТЫ ПРИСОЕДИНЯЮТСЯ К РНК-МАТРИЦЕ С ПОМОЩЬЮ АДАПТОРОВ

Прежде чем какая-либо аминокислота займет свое место на матричной РНК, эта аминокислота должна претерпеть химическую модификацию, в результате которой она приобретет специфическую поверхность, способную соединяться с матрицей путем образования определенного числа водородных связей. Сущность этой химической модификации заключается в том, что аминокислота присоединяет к себе (одной ковалентной связью) специфическую молекулу-адаптор. Именно адаптор специфически взаимодействует с матрицей, а боковая группа аминокислоты никогда сама в этом процессе не участвует. Соединение аминокислот с соответствующими адапторами значительно легче осуществимо, чем химическая модификация их боковых групп. Такая модификация могла бы потребовать участия нескольких ферментов для каждой из аминокислот; более того, после

включения аминокислоты в полипептидную цепь примерно столько же ферментов потребовалось бы на то, чтобы вновь придать модифицированной боковой группе исходную конфигурацию. Между тем для специфического соединения аминокислоты с ее адаптором и для последующего отделения от него достаточно одного фермента.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ «УЗНАЮТ» ОПРЕДЕЛЕННЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ

Между поверхностью боковой группы аминокислоты и поверхностью адаптора особого соответствия не требуется. Решающую роль в выборе аминокислоты играет специфический фермент. Этот фермент, катализирующий присоединение аминокислоты к ее адаптору, должен обладать сродством и к боковой группе аминокислоты, и к адаптору. Как известно, белки прекрасно приспособлены для таких функций, поскольку их активные участки могут нести значительное число как гидрофобных, так и гидрофильных групп. Полипептидная цепь с надлежащей последовательностью аминокислот легко складывается так, что образуется «полость», в которую может войти боковая группа какой-либо определенной аминокислоты. Если, например, активный центр фермента содержит атом, который способен образовать водородную связь с ОН-группой тирозина, то такой фермент может отличить тирозин от фенилаланина. Образование одной специфичной водородной связи даст в этом случае около 4—5 ккал/моль энергии. Этот выигрыш в энергии был бы потерян, если бы фермент взаимодействовал не с тирозином, а с фенилаланином. Таким образом, физико-химические соображения позволяют нам предсказать, что вероятность эффективного взаимодействия данного фермента с тирозином в 1000 раз больше, чем вероятность его взаимодействия с фенилаланином.

Значительно труднее понять, каким образом достигается такая же точность в выборе аминокислот, отличающихся друг от друга одной метильной группой, так как метильная группа не может образовать ни солевых, ни водородных связей. Рассмотрим, например, фермент, который должен обладать способностью отличать глицин от аланина и валин от изолейцина. Легко понять, почему большая боковая группа аланина не может уместиться в маленькой полости, предназначенной для глицина; естественно также, что изолейцин не умещается в полости для валина. Трудность возникает, когда мы задаем себе вопрос, почему, собственно, не происходит обратного, т. е. почему глицин не проникает иногда в аланиновую полость, а валин — в полость, предназначенную для изолейцина. Дело в том, что если бы это произошло, то вандерваальсово взаимодействие, обеспечиваемое точным соответствием между полостью активного центра и метильной группой, не могло бы возникнуть.

Вандерваальсовым силам приписывается энергия примерно 2—3 ккал/моль. Сами по себе они слишком малы, чтобы обеспечить необходимую точность выбора аминокислот в процессе белкового синтеза. В настоящее время предполагают, что частота ошибок при включении аминокислот в полипептидную цепь лежит в пределах 1 : 1000—1 : 10 000. Это означает, что выигрыш в энергии при выборе правильной аминокислоты должен составлять не менее 4—6 ккал/моль, что приблизительно в 2 раза выше, чем указанная величина для вандерваальсова взаимодействия. По-видимому, механизм распознавания, с помощью которого происходит выбор правильных аминокислот в процессе синтеза белков, является более сложным, чем предполагалось вначале.

Несоответствие между двумя указанными величинами в течение долгого времени казавшееся совершенно непонятным, можно объяснить, по всей вероятности, если воспользоваться недавно высказанным пред-

положением о том, что все подобные процессы отбора являются многостадийными. Благодаря этому существует несколько возможностей для отбраковки неправильно включенных аминокислот. Если энергия связывания каждой из двух стадий этого процесса составляет 2—3 ккал/моль, то вместе они дадут 4—6 ккал/моль, т. е. именно ту величину, которая может объяснить, почему ошибочное включение аминокислот в белки происходит с частотой 10^{-3}. Когда мы будем рассматривать дальше химические стадии, из которых состоит процесс присоединения аминокислот к их адапторам, мы увидим, что многие процессы распознавания аминокислот, казавшиеся ранее одностадийными, на самом деле состоят из нескольких последовательных стадий.

МОЛЕКУЛЫ-АДАПТОРЫ — ЭТО ОСОБЫЙ КЛАСС МОЛЕКУЛ РНК

Молекулы, к которым присоединяются аминокислоты,— это относительно небольшие молекулы РНК, образующие особый класс, так называемую транспортную РНК (тРНК). В сущности, нет ничего удивительного в том, что адапторами служат именно молекулы РНК, ибо главное требование к адаптору состоит в том, чтобы он обладал способностью специфически взаимодействовать со свободными кето- и аминогруппами на одноцепочечной матричной РНК. Если сам адаптор тоже представляет собой молекулу одноцепочечной РНК, то условия для такого взаимодействия будут, очевидно, идеальными, так как это открывает возможность для временного связывания матрицы и адаптора путем образования высокоспецифических водородных связей (вероятно, по типу спаривания оснований). Для каждой из двадцати различных аминокислот имеется свой адаптор, структура его уникальным образом приспособлена для специфического взаимодействия с определенной последовательностью нуклеотидов на матрице. Следовательно, число различных типов тРНК весьма велико.

Каждая молекула тРНК содержит около 80 нуклеотидов (мол. вес ~ 25 000), соединенных обычным образом в одну цепь (рис. 12-1). Один конец этой цепи (3′-конец) всегда оканчивается последовательностью ЦЦА, а на другом конце (5′-конец) обычно стоит Г. Хотя цепь только одна, большинство оснований связано друг с другом водородными связями по типу специфического спаривания, как в молекуле ДНК (А···У и Г···Ц). Это достигается вследствие того, что отдельные участки цепи, складываясь, образуют шпилькообразные структуры. Подобная конфигурация оказывается возможной благодаря тому, что число остатков аденина на данном участке приблизительно равно числу остатков урацила, а число остатков гуанина приблизительно равно числу остатков цитозина. Однако некоторые нуклеотиды все же не находят себе партнера, и именно эти свободные нуклеотиды могут взаимодействовать с матрицей.

Вначале предполагали, что различные тРНК могут коренным образом отличаться друг от друга своими трехмерными структурами. Однако обнаружение того факта, что в смеси, содержащей тРНК всех типов, могут формироваться вполне регулярные кристаллы, указывает на то, что все молекулы тРНК имеют в основном сходные трехмерные структуры.

АЛАНИНОВАЯ тРНК ДРОЖЖЕЙ СОДЕРЖИТ 77 НУКЛЕОТИДОВ

В декабре 1964 г. была завершена работа по установлению последовательности нуклеотидов одной из тРНК, источником которой служили дрожжи. Эта тРНК специфически соединяется с аланином, и поэтому она получила

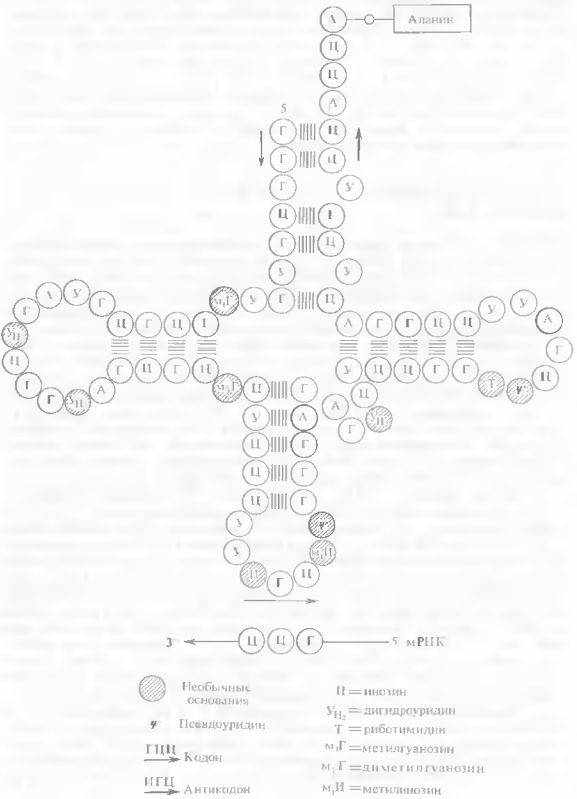


Рис. 12-1. Полная нуклеотидная последовательность аланиновой тРНК.
Необычные основания обозначены заштрихованными кружками. Отмечено положение антикодона по отношению к кодону.

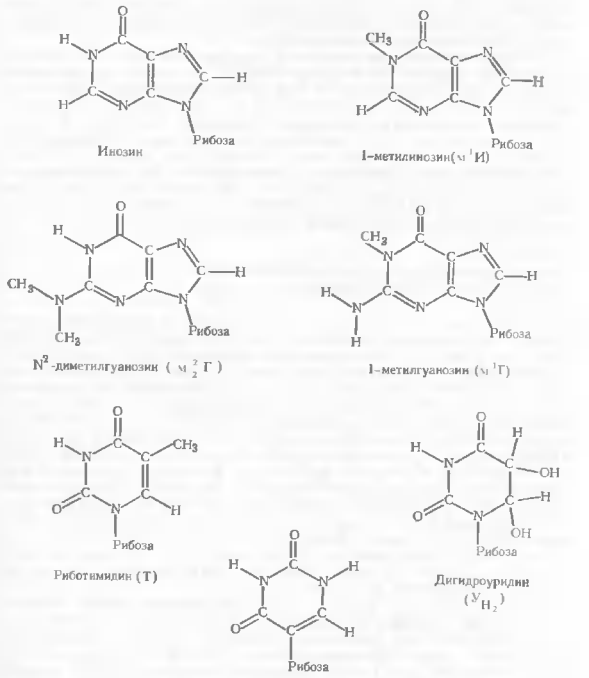


Рис. 12-2. Строение необычных (минорных) нуклеотидов, обнаруженных в дрожжевой $тРНК^{Ала}$.

название аланиновой тРНК ($тРНК^{Ала}$). Она содержит 77 нуклеотидов, расположенных в определенной последовательности (рис. 12-1). Наиболее интересная особенность этой последовательности — высокое содержание необычных оснований (10 оснований из 77; рис. 12-2). Необычными, или минорными, называют пуриновые или пиримидиновые основания, отличные от А, Г, Ц или У. Многие из них отличаются от обычных присутствием одной или нескольких метильных групп. Большинство метильных групп

(а возможно, и все) присоединяется к основаниям ферментативно уже после завершения синтеза полинуклеотидной цепи. Вполне вероятно, что и другие необычные основания образуются путем ферментативной модификации предобразованного полинуклеотида.

Функциональная роль необычных оснований не ясна. Их наличие не является особенностью аланиновой тРНК, так как в том или ином количестве они присутствуют во всех тРНК. Единственным указанием на их возможную роль может служить тот факт, что некоторые необычные основания не способны к нормальному спариванию. Быть может, вследствие этого они нарушают двухцепочечную структуру шпилькообразных областей тРНК и тем самым дают возможность свободным амино- и кетогруппам образовывать водородные связи. В зависимости от специфичности оснований указанные свободные группы могут образовывать водородные связи либо с матричной РНК, либо с рибосомной, либо с ферментом, катализирующим связывание определенной аминокислоты с ее тРНК.

ПОЛИНУКЛЕОТИДНЫЕ ЦЕПИ МОЛЕКУЛ тРНК СКЛАДЫВАЮТСЯ В ВИДЕ КЛЕВЕРНОГО ЛИСТА

Знание точной нуклеотидной последовательности аланиновой тРНК еще не дает достаточной информации для однозначного решения вопроса о том, между какими основаниями в этой молекуле образуются водородные связи. Зная первичную структуру только одной тРНК, можно представить себе очень большое число возможных шпилькообразных конфигураций молекулы. Однако после определения первичной структуры еще нескольких тРНК, также выделенных из дрожжей, стало ясно, что некоторые нуклеотидные последовательности являются общими для всех тРНК. Существует только один способ двумерной укладки цепей тРНК, обеспечивающий образование максимально возможного количества пар оснований. При этом образуется общая для всех тРНК структура, напоминающая по своей форме клеверный лист (рис. 12-1). В каждой молекуле тРНК, имеющей форму клеверного листа, находятся следующие, не содержащие водородных связей участки:

1. 3′-конец, состоящий из АЦЦ и четвертого нуклеотида, который может быть различным у разных тРНК. Аминокислота всегда присоединяется к 3′-концевому А.
2. Если мы будем мысленно передвигаться вдоль остова молекул тРНК, начиная с 3′-конца, то вскоре дойдем до ее первой петли, состоящей из 7 неспаренных оснований и всегда содержащей в своем составе последовательность 5′-ТψЦГ-3′. Возможно, что именно на этом участке происходит связывание тРНК с поверхностью рибосомы.
3. Далее следует петля, размеры которой сильно варьируют у разных тРНК; часто эту петлю называют «бугорком» («hump») или добавочной петлей.
4. Третья петля, состоящая из семи неспаренных оснований, содержит антикодон — три смежных основания, которые связываются (по принципу образования комплементарных пар оснований) с последовательно расположенными основаниями мРНК, образующими кодон. Антикодон ограничен с 3′-конца пурином, который часто имеет алкилированную форму, а с 5′-конца — уридином.
5. Четвертая петля содержит от 8 до 12 неспаренных оснований, относительно большую долю которых составляет дигидроуридин ($У_{Н_2}$ петля). Предполагают, что именно на этом участке происходит связывание тРНК со специфическим активирующим ферментом (аминоацил-тРНК — синтетазой).

За последние несколько лет были определены нуклеотидные последовательности тРНК, выделенных не только из дрожжей, но и из целого ряда других организмов. Все они обнаруживают в своем строении общие черты, которые способствуют образованию структуры «клеверного листа». Поэтому не вызывает удивления тот факт, что некоторые молекулы тРНК, выделенные, например, из дрожжей, могут активироваться ферментами из совершенно неродственных дрожжам организмов (см. ниже).

КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ тРНК

Тот факт, что молекулы тРНК имеют конфигурацию «клеверного листа», сам по себе ничего не говорит нам о том, каким образом расположены в пространстве различные петли этой структуры. Сведения об этом можно получить только на основании рентгеноструктурного анализа тРНК. Однако первые попытки получить кристаллы тРНК были неудачными. К счастью, мрачные предположения о том, что тРНК вообще не способна кристаллизоваться, не оправдались. Фактически в настоящее время можно получать очень хорошие кристаллы нескольких тРНК, используя для этого четко отработанные методы (рис. 12-3). Наиболее детально к настоящему времени изучена пространственная структура фенилаланиновой тРНК (тРНК^{Фен}), выделенной из дрожжей. Недавно (в 1974 г.) была расшифрована трехмерная структура этой молекулы при разрешении 3 Å, что позволило определить местоположение практически всех основных химических групп. Особенно приятно то, что все двухцепочечные участки, предсказанные на основании модели «клеверного листа», действительно существуют в молекуле тРНК^{Фен} (рис. 12-4). Кроме того, в молекуле имеется целый ряд дополнительных водородных связей, с помощью которых «клеверный лист» складывается таким образом, что образуется стабильная третичная структура, несколько напоминающая по своей форме латинскую букву L (рис. 12-5 и 12-6А, 12-6Б). При рассмотрении этой структуры можно обнаружить следующие характерные для нее особенности.

1. Акцепторная группа ЦЦА, к которой присоединяется аминокислота, находится на одном конце буквы L на расстоянии 70 Å от антикодона, расположенного на противоположном конце молекулы.

2. Богатая дигидроуридином петля ($У_{Н_2}$-петля) и петля, содержащая ТψЦ, образуют угол буквы L.

3. Во многих взаимодействиях, благодаря которым образуются водородные связи и формируется третичная структура, участвуют основания, которые являются общими для всех известных тРНК (рис. 12-4,*А*). Это убедительно подтверждает предположение о том, что все молекулы тРНК имеют в основном одинаковую третичную структуру.

4. Большая часть водородных связей, принимающих участие в формировании третичной структуры, образуется между парами (или триплетами) оснований, которые отличаются от обычных А—Т- и Г—Ц-пар, присутствующих в двухцепочечных молекулах ДНК (рис. 12-7).

5. Почти все основания в молекуле тРНК^{Фен} ориентированы таким образом, что они могут располагаться друг над другом в виде стопки монет. Это приводит к максимальному усилению взаимодействий между плоскими гидрофобными поверхностями оснований (рис. 12-6А и рис. 12-6Б). Даже кажущийся нестабилизированным участок антикодона на самом деле имеет относительно жесткую структуру, обусловленную стэкинг-взаимодействиями между образующими его основаниями. По всей вероятности, стэкинг-взаимодействия — это такой же важный фактор, обеспечивающий стабильность конфигурации молекулы тРНК, как и водородные связи, участвующие в формировании ее третичной структуры.

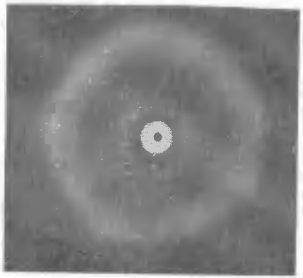


Рис. 12-3. Рентгенограмма кристалла суммарной тРНК. (С любезного разрешения д-ра Лэнгриджа, Принстонский университет; Blake, Fresco, Langridge, Nature, 225, 32, 1970.) Этот кристалл был получен при кристаллизации нефракционированного препарата тРНК, выделенной из дрожжей. Способность нефракционированного материала кристаллизоваться с образованием таких регулярно построенных кристаллов (дифракционное поле на этой фотографии соответствует максимальному разрешению ~ 10 Å; были получены также и другие фотографии, на которых оно соответствовало максимальному разрешению ~ 3 Å) указывает на то, что молекулы тРНК всех типов обладают очень сходной конфигурацией.

Рис. 12-4. Схема, иллюстрирующая образование третичной структуры молекулы тРНК^{Фен} дрожжей (Kim et al., Science, 185, 435, 1974). Штриховыми линиями обозначены взаимодействия, благодаря которым формируется третичная структура. В них участвуют основания, связанные водородными связями. *А* — общепринятое изображение конфигурации молекулы тРНК в виде «клеверного листа». *Б* — изображение конфигурации молекулы тРНК, иллюстрирующее тесное взаимодействие между петлей, содержащей ТΨЦ, и дигидроуридиловой петлей.

6. Антикодоновая ветвь соединяется с остальной частью молекулы тРНК^{Фен} лишь несколькими водородными связями. Это делает возможным изменение относительной ориентации участка антикодона в процессе синтеза белков.

Рис. 12-5. Фотография модели молекулы $тРНК^{Фен}$ дрожжей (Kim et al., Science, **185**, 435, 1974).
Акцепторный конец ЦЦА находится в верхней части фотографии справа, а петля, содержащая антикодон,— в нижней части фотографии.

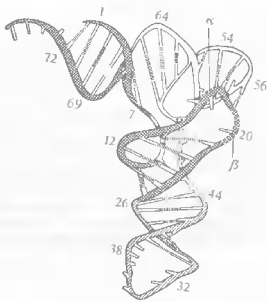


Рис. 12-6А. Схематическое изображение пространственной структуры молекулы $тРНК^{Фен}$ дрожжей (Kim et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 4970, 1974).
Рибозо-фосфатный остов представлен в виде непрерывного тяжа, внутримолекулярные водородные связи изображены в виде поперечных перемычек. Укороченные отростки, отходящие от основного тяжа, соответствуют положениям неспаренных оснований. Вариабельные участки, содержащие неодинаковое число нуклеотидов в различных молекулах тРНК, указаны штриховой линией. Два таких участка, находящихся в $У\Psi_2$-петле, обозначены как α и β. Антикодон находится в самой нижней части этого рисунка, а акцепторный конец — в верхней левой части. Нумерация нуклеотидов такая же, как и на рис. 12-4. Антикодоновая ветвь заштрихована, акцепторная и дигидроуридиловая ветви заштрихованы в клеточку, ТΨС-ветвь не заштрихована.

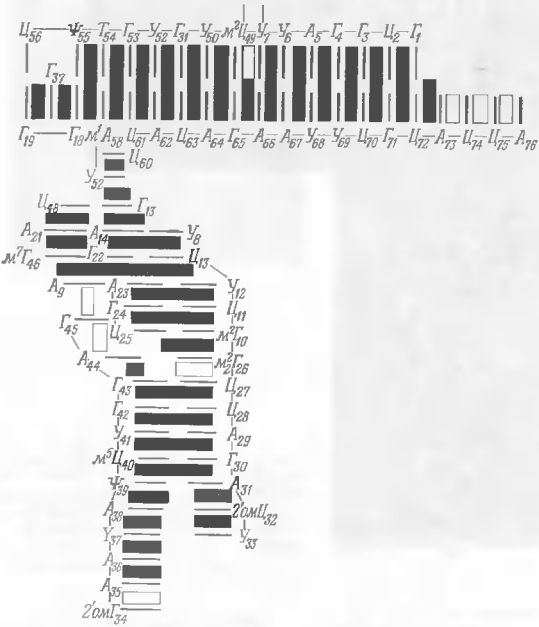


Рис. 12-6Б. Схематическое изображение гидрофобных стекинг-взаимодействий между нуклеотидами в молекуле дрожжевой тРНК^{Фен} (Kim et al., Proc. Nat. Acad. Sci., **71**, 4970, 1974).

Представлены как полные (обозначены черными прямоугольниками), так и частичные (обозначены светлыми прямоугольниками) стекинг-взаимодействия. При такой ориентации молекулы антикодон находится внизу, акцепторный конец ЦЦА — вверху справа, а петля, содержащая ТψЦ,— в верхнем левом углу рисунка. Там, где соседние нуклеотиды, участвующие в стекинг-взаимодействии, связаны между собой рибозо-фосфатной цепью, эта связь обозначена тонкими линиями. Сплошные изгибные линии, отходящие от символов нуклеотидов, представляют в схематическом виде пуриновые или пиримидиновые основания, а прямоугольники между основаниями обозначают гидрофобные взаимодействия между ними. Последовательность нуклеотидов в непрерывной цепи тРНК обозначена только порядковыми номерами нуклеотидов. Именно этим объясняется то, что многие нуклеотиды кажутся не связанными с другими нуклеотидами. На схеме не представлены основания, не участвующие в стекинг-взаимодействиях (основания 16, 17, 20, 47).

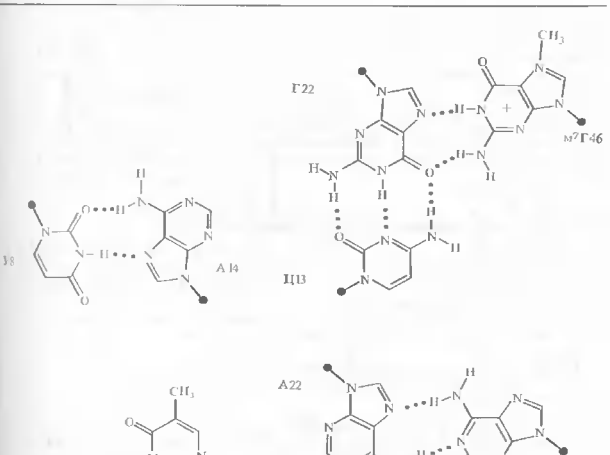


Рис. 12-7. **Различные типы водородных связей, встречающихся в дрожжевой тРНК^{Фен}.** Предполагается, что такие же связи имеются и в других тРНК. Сплошные черные кружки изображают 1′-углеродный атом остатков рибозы.

СОЕДИНЯЯСЬ С АДАПТОРОМ, АМИНОКИСЛОТА АКТИВИРУЕТСЯ

Аминокислоты всегда связываются с концевым остатком адениловой кислоты в молекуле тРНК (на ЦЦА-конце). При этом образуется ковалентная связь между карбоксильной группой аминокислоты и остатком концевой рибозы тРНК (рис. 12-8). Из данного факта (связывание адаптора через карбоксил) вытекает ряд интересных следствий. Во-первых, адаптор (тРНК) должен отщепиться, прежде чем карбоксил сможет образовать пептидную связь, и, следовательно, эти два процесса — отщепление адаптора и образование пептидной связи — происходят согласованно. Во-вторых, связь между аминокислотой и тРНК (аминоацильная связь) относится к типу высокоэнергетических связей. Такие комплексы можно

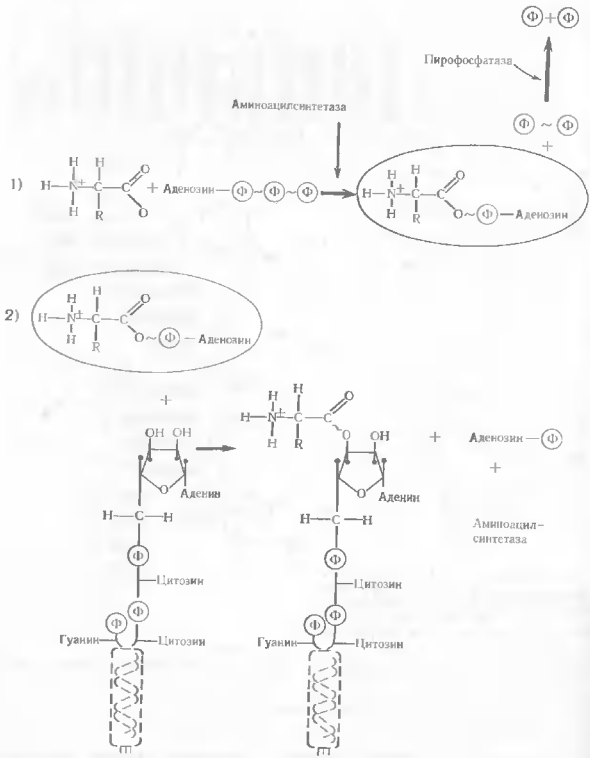


Рис. 12-8. Активация аминокислоты с помощью АТФ и перенос активированной аминокислоты на ЦЦА-конец соответствующей адапторной тРНК.

рассматривать как активированные предшественники. Энергия аминоацильной связи может использоваться для образования пептидной связи (бедной энергией).

Что касается энергии, необходимой для образования самой аминоацильной связи, то она поставляется высокоэнергетической пирофосфатной связью ((Ф) ~ (Ф)) АТФ.

Прежде чем произойдет соединение аминокислоты с тРНК (АА ~ тРНК), аминокислота активируется ферментом (аминоацилсинтетазой) путем образования аденилата (АА ~ АМФ), в котором карбоксил аминокислоты присоединен высокоэнергетической связью к остатку адениловой кислоты (рис. 12-8):

$$\text{АК} + \text{АТФ} \xrightleftharpoons{\text{Аминоацилсинтетаза}} \text{АА} \sim \text{АМФ} + (\text{Ф}) \sim (\text{Ф}). \qquad (12\text{-}1)$$

Продукт этой реакции (АА ~ АМФ) обычно остается прочно связанным с активирующим ферментом до тех пор, пока не произойдет встреча с соответствующей тРНК. При взаимодействии с тРНК тот же активирующий фермент переносит активированную аминокислоту на концевой остаток адениловой кислоты в молекуле тРНК:

$$\text{АА} \sim \text{АМФ} + \text{тРНК} \xrightleftharpoons{\text{Аминоацилсинтетаза}} \text{АА} \sim \text{тРНК} + \text{АМФ}. \qquad (12\text{-}2)$$

Таким образом, активирующие ферменты способны специфически «узнавать» как аминокислоту, так и соответствующую тРНК (адаптор). Для этой цели ферменты должны иметь два различных центра связывания: один — для взаимодействия с боковой группой аминокислоты и другой — для взаимодействия со специфической тРНК. Каждая тРНК в свою очередь также должна иметь два опознавательных участка: один — для активирующего фермента и другой — для взаимодействия со специфической последовательностью нуклеотидов матрицы. Следовательно, боковая группа аминокислоты сама никогда не контактирует с матрицей. Все, что необходимо, — это ее специфическое взаимодействие с соответствующим активирующим ферментом.

Каждой клетке требуется по крайней мере 20 различных типов активирующих ферментов и не менее 20 разных типов тРНК. Для каждой аминокислоты должен существовать по меньшей мере один адаптор, поэтому раньше предполагалось, что существует именно 20 различных тРНК. Однако теперь установлено, что в ряде случаев для одной и той же аминокислоты имеется две тРНК или более. Это находится в прямой связи с тем фактом, что для кодирования данной аминокислоты часто используется не один, а несколько разных кодонов (вырожденность кода, см. гл. 13). Часто для каждого функционального кодона существует своя, уникальная молекула тРНК. Однако отдельных активирующих ферментов для всех тРНК, соответствующих данной аминокислоте, возможно, и не требуется. Поскольку в молекулах тРНК имеются два разных участка для взаимодействия с матрицей и с активирующим ферментом, можно допустить, что молекулы, соответствующие одной и той же аминокислоте, отличаются друг от друга только первым из этих участков, а в области, контактирующей с ферментом, имеют одинаковые последовательности нуклеотидов. Если это так, то молекулы тРНК, взаимодействующие с разными кодонами, могут, очевидно, связываться с одним и тем же ферментом.

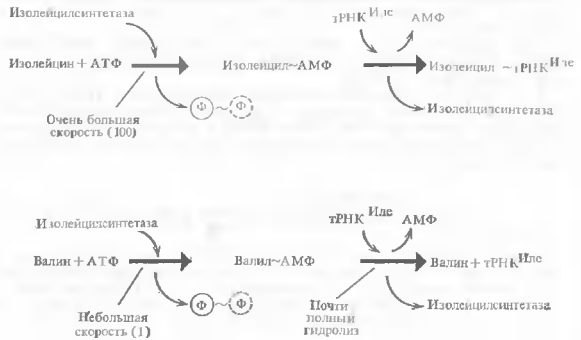


Рис. 12-9. Установление различия между изолейцином и валином в процессе образования изолейцил-тРНК.

ОБРАЗОВАНИЕ АА ~ тРНК — ЭТО ОЧЕНЬ ТОЧНЫЙ ПРОЦЕСС

Механизм, с помощью которого та или иная аминоацилсинтетаза выбирает правильную аминокислоту из двух очень сходных между собой аминокислот, казался вначале весьма загадочным. Поэтому особенно приятным было то, что удалось понять, каким образом изолейцилсинтетаза отличает изолейцин от валина. Эти аминокислоты различаются между собой только тем, что одна из метильных групп валина замещена в изолейцине этильной группой и поэтому разность между величинами их энергии связывания с изолейцилсинтетазой составляет всего 2—3 ккал. На первый взгляд кажется, что эта величина недостаточна, чтобы предотвратить возникновение слишком частых ошибок при выборе между этими двумя аминокислотами. Так, например, если изолейцилсинтетаза присутствует в смеси с эквимолярными количествами изолейцина и валина, то на каждые 100 правильно активированных комплексов изолейцил-АМФ образуется примерно один неправильный комплекс валил-АМФ. Если бы все эти молекулы активированного валина были затем перенесены на молекулы $тРНК^{Иле}$, то это привело бы к неприемлемо высокому уровню ошибок. Однако такой перенос происходит очень редко, так как при связывании $тРНК^{Иле}$ с комплексом валил ~ АМФ — изолейцилсинтетаза почти все молекулы валил ~ АМФ распадаются на их составные компоненты — валин и АМФ (рис. 12-9). При таком способе «коррекции» ошибок аминокислота должна быть связана с активным центром соответствующей синтетазы на обеих ферментативных стадиях, катализируемых синтетазой. Таким образом, распознавание аминоацилсинтетазой правильной аминокислоты может осуществляться дважды — как на одной, так и на другой ферментативной стадии, что в конечном итоге приводит к приемлемому уровню ошибок: $10^{-2} \cdot 10^{-2} = 10^{-4}$. В настоящее время у нас есть основания предполагать, что выбор между очень сходными аминокислотами — глицином и аланином — происходит таким же образом, как в случае изолейцина и валина.

СИНТЕЗ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ ПРОИСХОДИТ НА РИБОСОМАХ

После присоединения адапторов аминокислоты диффундируют к рибосомам — сферическим частицам, осуществляющим синтез белка. Белок никогда не синтезируется в растворе, а всегда только на поверхности рибосом, которые поэтому можно рассматривать как миниатюрные фабрики для производства белка. Главная функция рибосом заключается в том, чтобы правильно ориентировать поступающие АА ~ тРНК относительно матричной РНК и таким образом обеспечивать точное считывание генетического кода. На поверхности рибосом имеются особые участки, связывающие надлежащим образом матричную РНК, АА ~ тРНК и растущую полипептидную цепь.

В быстро растущей клетке *E coli* содержится приблизительно 15 000 рибосом. Мол. вес каждой рибосомы несколько меньше $3 \cdot 10^6$. Общая масса

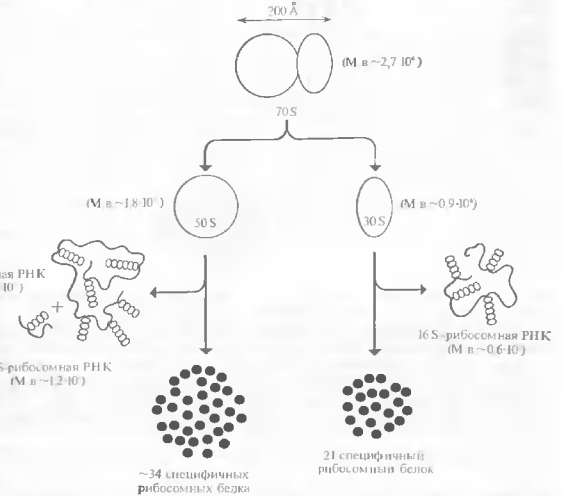


Рис. 12-10. Строение рибосомы *E. coli*.
Эту частицу обычно называют 70S-рибосомой, так как ее константа седиментации равна 70S. Субчастицы, на которые она распадается, называют соответственно 30S- и 50S-субчастицами. Константы седиментации молекул рРНК двух типов — более мелких и более крупных — равны соответственно 16S и 23S. Все бактериальные рибосомы близки по своим размерам к рибосомам *E. coli* и состоят из 30S и 50S-субчастиц. У высших организмов (в том числе у дрожжей) рибосомы имеют несколько бо́льшие размеры (80S) и состоят из 40S- и 60S-субчастиц. Для удобства мы будем обозначать все малые частицы как 30S-субчастицы, а все большие частицы — как 50S-субчастицы.

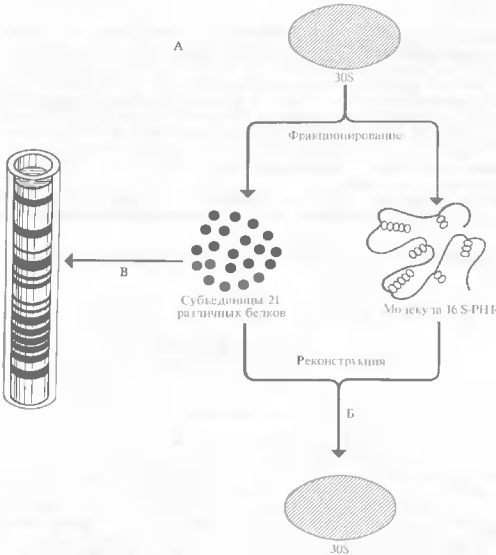


Рис. 12-11. Реконструкция 30S-субчастицы рибосомы из смеси, содержащей 21 рибосомный белок и 16S-рРНК.
А. 30S-субчастица рибосомы *E. coli*, обработанная раствором мочевины и соли, диссоциирует на белковые субъединицы 21 типа. Обработка 30S-субчастицы фенолом дает возможность выделить молекулу 16S-РНК. *Б*. При смешивании всех полученных белков и 16S-РНК в растворе с высокой концентрацией KCl при 37°C образуется рибосомная 30S-субчастица, проявляющая полную функциональную активность при синтезе белков. *В*. Различные белки, входящие в состав 30S-субчастицы, можно сделать видимыми, окрасив их после разделения с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Этим способом было показано, что интактные и реконструированные 30S-субчастицы содержат одинаковые белки. Каждая полоса в столбике геля представляет собой один или несколько различных белков.

рибосом составляет примерно $^1/_4$ всей массы клетки, и, следовательно, удельный вес синтеза белков в общем клеточном синтезе весьма велик. Каждая рибосома в любой данный момент времени может синтезировать только одну полипептидную цепь. В оптимальных условиях синтез полипептида с мол. весом 40 000 занимает примерно 10 с. Готовая полипептидная цепь отделяется от рибосомы, после чего свободная рибосома может приступить к синтезу другого белка.

Все рибосомы построены из двух неодинаковых субчастиц, бо́льшая из них в 2 раза превышает меньшую (рис. 12-10). Каждая субчастица содержит РНК и белок. Отношение РНК/белок для рибосом *E. coli* состав-

ляет 2 : 1, а для рибосом многих других организмов приблизительно 1 : 1. Большая часть белка выполняет структурную, а не ферментативную функцию. И большие и малые субчастицы содержат определенное число различных белков, главная функция которых сводится к облегчению правильного взаимодействия матричной РНК с АА ~ тРНК. До сих пор наиболее интенсивная работа проводилась с рибосомными белками, выделенными из клеток *E. coli*. В настоящее время охарактеризованы все белки 21 типа, содержащиеся в малой 30S-субчастице (рис. 12-11). При этом было показано, что они различаются по своим размерам и большинство из них представлено в рибосоме только одной копией. 34 белка, содержащиеся в большой 50S-субчастице, охарактеризованы менее полно. Однако имеются данные, указывающие на то, что большинство из них, так же как и белки из 30S-субчастицы, представлены в каждой рибосоме только одной молекулой. Таким образом, рибосомы — это исключительно сложные структуры, для полного химического изучения которых может потребоваться несколько десятилетий.

РЕКОНСТРУКЦИЯ РИБОСОМ

Полная реконструкция малой субчастицы *E. coli* из составных компонентов — РНК и белков — была впервые осуществлена в 1968 г. Такие реконструированные частицы являются функционально активными в процессе синтеза белков и обнаруживают полное сходство в своем поведении с интактными 30S-субчастицами. Намного труднее было осуществить реконструкцию функционально активной 50S-субчастицы *E. coli*. Значительные успехи в этом отношении были достигнуты совсем недавно. К числу очень важных достижений относится то, что найдены условия для успешного проведения опытов по реконструкции рибосом. Это открывает возможность получать частицы, у которых отсутствует один или несколько специфических белков, что в свою очередь позволяет изучать, какое влияние оказывает отсутствие этих белков на специфические функции рибосом (например, на связывание с тРНК, образование пептидных связей и т. д.).

РИБОСОМНАЯ РНК ОБЫЧНО НЕ НЕСЕТ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

Когда в 1953 г. выяснилось, что рибосомы играют важную роль в синтезе белка, естественно было допустить, что прочно связанная рибосомная РНК служит матрицей, т. е. определяет последовательность аминокислот в синтезируемом белке. Более того, вначале предполагали, что вся клеточная РНК локализована в рибосомах и что более легкая (медленно седиментирующая) растворимая фракция (~20% всей РНК) представляет собой продукт деградации матричной рибосомной РНК. В 1956 г. было установлено, что растворимая РНК играет роль адаптора; однако и после этого всю остальную клеточную РНК (80%) продолжали считать матричной. Только в 1960 г. было однозначно показано, что выделенная из очищенных рибосом РНК (рибосомная РНК, или рРНК) не обладает матричными свойствами.

МАТРИЧНАЯ РНК ОБРАТИМО СОЕДИНЯЕТСЯ С РИБОСОМАМИ

Матричную функцию выполняет особая фракция РНК. На долю этой фракции приходится не более одного или нескольких процентов всей клеточной РНК. Эта РНК обратимо связывается с поверхностью малых

субчастиц рибосом и в среде с низкой концентрацией Mg^{2+} может затем вновь отделяться от рибосом без нарушения их целостности. Поскольку она передает генетическую информацию от гена синтезируемому в рибосомах белку, ее назвали матричной РНК (мРНК). Она передвигается вдоль участков рибосом, на которых происходит синтез белка, при этом ее кодоны занимают положение, в котором они могут взаимодействовать с соответствующими АА ~ тРНК.

Существование мРНК было впервые отчетливо продемонстрировано в опытах с клетками *E. coli*, зараженными фагом Т2. Попав в клетку, фаговая ДНК должна образовать РНК-матрицы для большого числа фагоспецифических белков, без которых невозможна репродукция фага (подробнее об этом см. в гл. 15). Поэтому для многих биохимиков явилось неожиданностью, что в клетках, зараженных фагом Т2, не удалось обнаружить синтеза новой рРНК. Такого рода результаты могли означать только одно — что рРНК не служит матрицей для синтеза фагоспецифических белков, а это в свою очередь позволяло предположить, что и в нормальных клетках молекулы рРНК не являются матрицами белкового синтеза. Когда эти опыты с фагом Т2 получили широкую известность, они стимулировали новые поиски, которые привели к идентификации мРНК сначала в клетках, зараженных вирусами, а потом и в незараженных клетках.

СУЩЕСТВУЕТ ДВА КЛАССА РРНК, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ВЕЛИЧИНЕ МОЛЕКУЛ

Во всех рибосомах найдены молекулы рРНК двух классов. Они составляют неотъемлемую часть рибосом и в отличие от мРНК не могут быть удалены из рибосом без одновременного и полного разрушения этих последних. Меньшая молекула 16S-рРНК обнаружена в малой субчастице и имеет мол. вес около $0{,}5 \cdot 10^6$, а большая 23S-рРНК входит в состав большой субчастицы и ее мол. вес достигает $1 \cdot 10^6$.

Кроме того, каждая большая субчастица содержит одну очень короткую молекулу рРНК, имеющую константу седиментации 5S. Все молекулы рРНК представляют собой одиночные цепи с неодинаковым содержанием оснований, способных спариваться друг с другом (т. е. Г и Ц или А и У). Однако приблизительная эквивалентность все же имеется, и многие основания рРНК в пределах данной цепи спариваются между собой, что ведет к образованию двухцепочечных шпилек, напоминающих те, которые обнаружены в тРНК.

Наличие как одноцепочечных, так и двухцепочечных участков делает трехмерную структуру индивидуальных молекул рРНК нерегулярной, вследствие чего до сих пор не удается получить препараты рРНК, в которых молекулы были бы правильно организованы в пространстве. Рентгенограммы рРНК по этой причине размыты сильнее, чем соответствующие рентгенограммы тРНК, так что извлечь из них какие-либо точные сведения о структуре рРНК не представляется возможным. С подобной же трудностью мы встречаемся при попытках установить методом рентгеноструктурного анализа строение мРНК.

Таким образом, анализ нуклеотидной последовательности — это единственный доступный в настоящее время способ исследования детальной структуры рРНК. Однако в связи с тем, что молекулы рРНК представляют собой очень длинные полинуклеотидные цепи (16S-РНК содержит 1520 нуклеотидов, а 23S-РНК — около 3000 нуклеотидов), такой анализ является значительно более сложной задачей, чем выяснение нуклеотидной последовательности тРНК. Тем не менее в настоящее время установлена, хотя еще и не очень точно, нуклеотидная последовательность

почти всей цепи 16S-рРНК из *E. coli*, в течение же следующих нескольких лет должна быть выяснена в общих чертах нуклеотидная последовательность 23S-рРНК. При рассмотрении таких последовательностей обнаруживается большое число потенциальных шпилькообразных участков, однако пока у нас нет никаких подходов к выяснению вопроса о том, каким образом молекула рРНК складывается в пространстве.

ФУНКЦИЯ БОЛЬШИНСТВА МОЛЕКУЛ рРНК ЕЩЕ НЕ ИЗВЕСТНА

До недавнего времени не существовало никакой хоть сколько-нибудь удовлетворительной гипотезы, о том, почему рибосомы содержат как РНК, так и белок. Но теперь мы считаем, что многие неспаренные основания в РНК принимают участие в связывании тРНК и мРНК с рибосомами. Как мы увидим ниже, несколько неспаренных оснований, расположенных недалеко от 3′-конца молекулы 16S-рРНК, образуют, возможно, временные пары с основаниями участка инициации (участка связывания с рибосомами) молекулы мРНК. Поэтому теперь мы можем предположить, что дальнейшие исследования приведут к обнаружению также и других последовательностей в рРНК, которые будут комплементарны определенным неизменяемым последовательностям, встречающимся у всех тРНК. Но все же трудно понять, почему обе основные молекулы рРНК содержат сотни нуклеотидов, доступных для специфического связывания. Может быть, большая часть таких взаимодействий происходит фактически между рРНК и различными белками, содержащимися в той же рибосоме. Это помогает белкам сохранять совершенно определенную трехмерную структуру. Но даже если это предположение соответствует действительности, остается все-таки непонятным, почему в качестве структурной основы используется РНК, а не белок сам по себе.

КЛЕТОЧНАЯ РНК ВСЕХ ТРЕХ ТИПОВ СИНТЕЗИРУЕТСЯ НА ДНК-МАТРИЦАХ

Поскольку тРНК и рРНК выполняют в синтезе белка совершенно особую роль, несколько лет назад было высказано предположение, что молекулы РНК этих классов не синтезируются на матричной ДНК, а (подобно одноцепочечным вирусным РНК) обладают способностью к самовоспроизведению (гл. 15). Опыты по искусственной гибридизации ДНК с РНК показали, однако, что это предположение неверно. В этих опытах рРНК (или тРНК) смешивали с гомологичной ДНК при температуре около 100 °С, при которой структура двухцепочечных участков рРНК (или тРНК) нарушается. Водородные связи в молекулах ДНК при этих условиях также разрываются, и комплементарные цепи расходятся. Если затем медленно охлаждать препарат, то произойдет ренатурация ДНК, т. е. вновь образуются стабильные двойные спирали. Однако некоторые одиночные цепи ДНК соединяются с цепями рРНК (или тРНК) и образуют гибридные молекулы (ДНК — РНК). Гибридизация — очень специфичный процесс, при использовании гетерологичной ДНК гибридные молекулы не образуются. Опыты по гибридизации подтверждают, следовательно, что рРНК и тРНК, подобно мРНК, синтезируются на ДНК-матрице. Особый интерес вызывает тот факт, что, хотя рРНК и тРНК составляют в сумме около 98% всей РНК клетки, для синтеза их используется (в качестве матриц) менее 1% всей клеточной ДНК.

ПРЕДШЕСТВЕННИКИ тРНК И рРНК

Молекулы 16S-РНК и 23S-РНК не транскрибируются с ДНК как таковые. Они ведут свое начало от более крупной молекулы-предшественника, которую нуклеазы расщепляют затем на зрелые молекулы рРНК. Молекулы 16S- и 23S-РНК образуются из одного транскрипта — 30S-предшественника рРНК (пре-рРНК с мол. весом $\sim 2{,}1 \cdot 10^6$). Транскрипция начинается с участка, соответствующего молекуле 16S-РНК, участок же, соответствующий 23S-РНК, транскрибируется последним. Расщепление 30S-пре-рРНК приводит сначала к образованию промежуточных продуктов с константами седиментации 17S и 25S, которые затем под действием нуклеаз превращаются соответственно в 16S- и 23S-молекулы. По всей вероятности, каждая молекула пре-рРНК содержит также последовательности, соответствующие 5S-рРНК, однако их точное местоположение пока не известно.

Все тРНК транскрибируются сначала также в виде более крупных предшественников (рис. 12-12). Первые точные данные о предшественниках тРНК относятся к $тРНК^{Trp}$ из *E. coli*, образующейся в результате отщепления 39 нуклеотидных остатков от 5′-конца и 3 остатков от 3′-конца пре-$тРНК^{Trp}$ (рис. 12-13). Другие молекулы пре-тРНК содержат последовательности, входящие в состав нескольких различных тРНК, и обеспечивают тем самым образование равных количеств соответствующих тРНК внутри клетки.

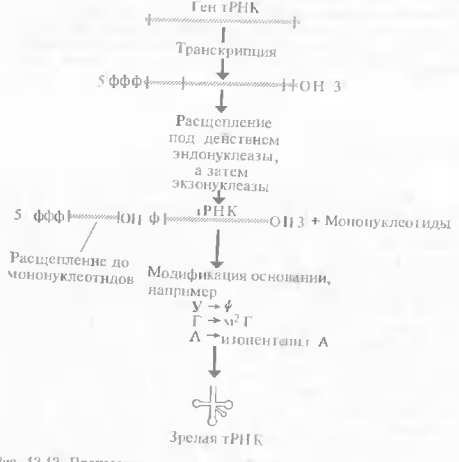


Рис. 12-12. Процессинг моноцистронной молекулы пре-тРНК, приводящий к образованию зрелой молекулы тРНК.

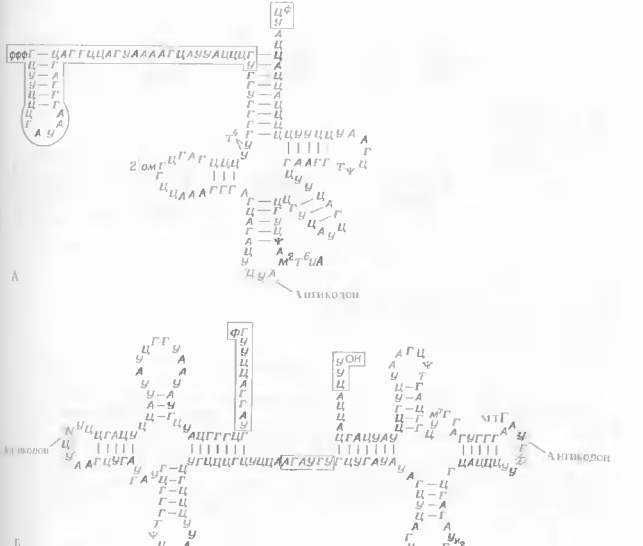


Рис. 12-43. *А.* Структура пре-тРНК^{Tyr} из *E. coli*. В рамке нуклеотидные остатки, отщепляющиеся в процессе превращения этой молекулы в тРНК^{Tyr}. *Б.* Структура предшественника тРНК$^{Sup}_{SUA36}$ и тРНК$^{Ile}_{ЦУЦ}$ из *E. coli*. В рамке участки, которые удаляются в процессе расщепления этой молекулы, приводящего к образованию зрелых молекул тРНК. Тот факт, что на 5′-конце этой молекулы не обнаружено трифосфатной группировки, говорит о том, что сам предшественник не является прямым продуктом транскрипции, а образовался в результате деградации еще более крупной молекулы. Антикодоны заштрихованы; $m^2r^6иА$ — 2-метилтио-N_6-изопентениладенозин; мГ — метилгуанозин.

Каждая из 30 или 40 различных молекул пре-тРНК *E. coli* кодируется, вероятно, только одной специфической нуклеотидной последовательностью в ДНК, т. е. одним геном. В противоположность этому цепи пре-рРНК кодируются, по-видимому, несколькими генами *E. coli*, расположенными в совершенно разных участках хромосомы. Все эти отдельные гены пре-рРНК несколько различаются между собой по своей нуклеотидной последовательности, что является результатом случайных мутационных событий, происходивших в этих генах. Безусловно, различия между генами не могут быть слишком резкими, поскольку молекулы рРНК, являющиеся их продуктами должны обладать сходной трехмерной структурой, обеспечивающей их правильную укладку в рибосомах.

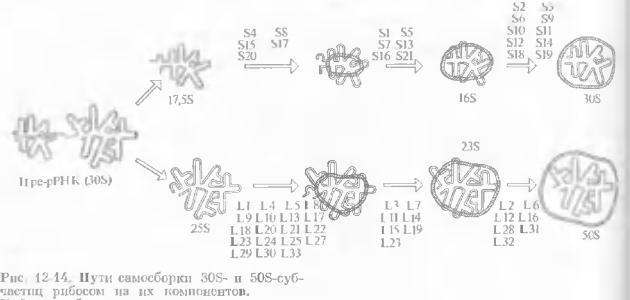


Рис. 12-14. Пути самосборки 30S- и 50S-субчастиц рибосом из их компонентов.
Цифры и буквы, расположенные рядом со стрелками,— принятые в настоящее время обозначения белковых компонентов малой и большой субчастиц.

Использование ДНК в качестве матрицы для кодирования тРНК и рРНК означает, что не все гены кодируют специфические аминокислотные последовательности. Поэтому мы вправе задать вопрос о том, не существует ли каких-то других, еще не обнаруженных форм РНК, которые могут играть важную роль в метаболизме клетки. Несомненно только одно: мы не можем теперь признавать как само собой разумеющееся представление о том, что в клетке для каждого гена существует соответствующий ему белок.

ПРОЦЕСС ОБРАЗОВАНИЯ РИБОСОМ СОСТОИТ ИЗ НЕСКОЛЬКИХ СТАДИЙ

Рибосомные белки начинают связываться с пре-рРНК вскоре после начала транскрипции. Однако присоединение основной части рибосомных белков происходит, вероятно, уже после отделения цепи РНК от матрицы и частичного расщепления этой цепи в процессе ее превращения в меньшие по размерам молекулы рРНК. Вначале белки взаимодействуют непосредственно со свободной молекулой рРНК, но по мере присоединения новых белков, помимо взаимодействий между РНК и белком, возникают, вероятно, также и вторичные взаимодействия типа белок — белок. Все эти процессы агрегации протекают во времени далеко не случайным образом. Напротив, формирование зрелых 30S- и 50S-частиц — это точные процессы сборки, характеризующиеся тем, что на каждой их стадии образуется совершенно определенный предшественник частиц, у которого отсутствуют те или иные рибосомные белки и который содержит фрагменты рРНК, еще не превратившиеся полностью в зрелые молекулы 16S и 23S РНК (рис. 12-14). Интересно, что способность связывать тРНК или мРНК возникает у таких частиц только на поздних стадиях сборки, поэтому не происходит бесполезного связывания тРНК или мРНК с незрелыми частицами, которые не способны принимать участие в синтезе белков.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВЕС мРНК КОЛЕБЛЕТСЯ В ШИРОКИХ ПРЕДЕЛАХ

В отличие от тРНК (мол. вес $\sim 2{,}5 \cdot 10^4$) и рРНК (мол. вес $5 \cdot 10^6$ или $1 \cdot 10^6$) молекулы мРНК очень разнообразны по своей длине, а следовательно, и по молекулярному весу. Эта гетерогенность в какой-то мере отражает разброс в длине синтезируемых полипептидных цепей. Лишь очень немногие полипептидные цепи содержат менее 100 аминокислот, поэтому почти все молекулы мРНК должны содержать по крайней мере 100·3 нуклеотидов (так как кодон содержит три нуклеотида). Еще одной причиной гетерогенности молекул мРНК является неодинаковая длина последовательностей нуклеотидов, расположенных на 5′-концах этих молекул. Это так называемые лидер-последовательности (или просто лидеры), которые не кодируют никаких аминокислот, а осуществляют, по крайней мере в некоторых случаях, функцию контроля над синтезом определенных белков (гл. 14). Совсем недавно было установлено, что лидер галактозной мРНК из *E. coli* состоит из 26 нуклеотидных остатков (рис. 12-15), а лидер триптофановой мРНК из *E. coli* содержит, по-видимому, по менее 150 оснований. Пока мы не располагаем убедительными данными, которые указывали бы на то, что и на 3′-концах молекул мРНК также существуют относительно длинные нетранслируемые последовательности нуклеотидов. Однако такие данные должны быть скоро получены. Во всяком случае, обнаружение 5′-концевых лидеров у многих мРНК означает, что большинство молекул мРНК имеет несколько более крупные размеры, чем предполагали вначале, исходя лишь из требований, которым должна удовлетворять мРНК как матрица, кодирующая аминокислоты. Так, например, у *E. coli* молекулы мРНК, кодирующие полипептиды, средний размер которых соответствует 300—500 аминокислотным остаткам, содержат обычно 1000—2000 нуклеотидов.

Есть и еще одна причина гетерогенности мРНК. Некоторые молекулы мРНК кодирует более чем одну полипептидную цепь. Кроме последовательностей, входящих в состав лидеров, полигенные матричные РНК содержат также межгенные участки, которые могут быть такими же длинными, как и лидеры. В большинстве случаев (а может быть, и всегда) эти полигенные матрицы кодируют синтез белков, функции которых взаимосвязаны. Например, существует мРНК, кодирующая синтез всех десяти ферментов, участвующих в образовании гистидина. В ее молекуле содержится приблизительно 12 000 нуклеотидов (мол. вес $\sim 4\,000\,000$), т. е. в среднем по 1200 нуклеотидов на каждый кодируемый белок и его лидер.

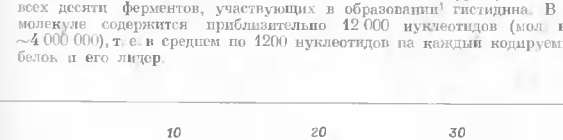


Рис. 12-15. 5′-конец галактозной мРНК *E. coli*. Изображены нуклеотидные остатки, входящие в состав лидера (в рамке) расположенного в начале цепи, а также нуклеотидные последовательности, кодирующие N-концевые аминокислоты в молекуле УДФ-галактоза—4-эпимеразы.

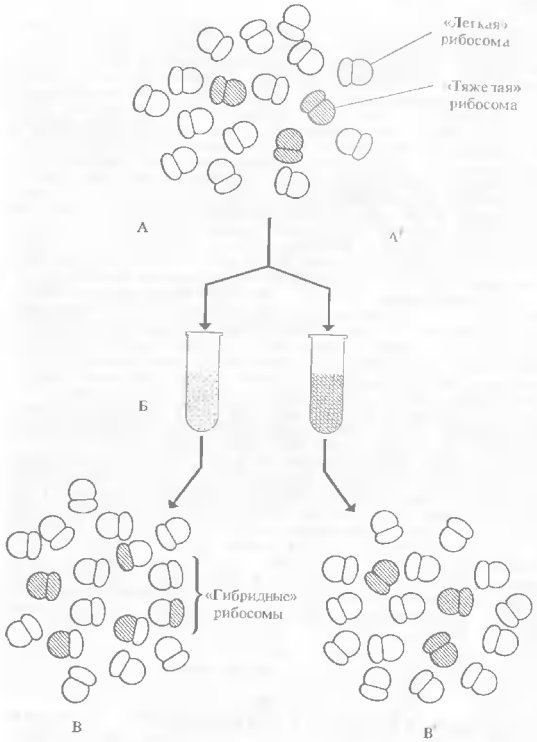


Рис. 12-46. Схематическое изображение опытов, в которых было показано, что обмен субчастицами между рибосомами осуществляется только в процессе синтеза белков.
А. Некоторое количество «тяжелых» рибосом вместе с избытком «легких» рибосом добавляют в пробирку, содержащую все компоненты, необходимые для синтеза белков. *Б*. После кратковременной инкубации из смеси выделяют рибосомы. *В*. В процессе синтеза белков образуются многочисленные «гибридные» рибосомы («тяжелая» 30S субчастица — «легкая» 50S-субчастица или «легкая» 30S-субчастица — «тяжелая» 50S-субчастица). Это означает, что между рибосомами произошел обмен субчастицами. *А'*. Ставят точно такой же опыт, как и описанный слева на схеме, но в этом случае в пробирку добавляют, кроме того, еще и спарсомицин, блокирующий синтез белков. *В'*. Если синтез белков заблокирован, то обмена субчастицами не происходит и «гибридные» рибосомы не образуются.

В ПРОЦЕССЕ СИНТЕЗА БЕЛКОВ РИБОСОМЫ РАСПАДАЮТСЯ НА СУБЧАСТИЦЫ

Сама структура рибосом, состоящих из легко диссоциирующих субчастиц, указывала, на то, что существует некий цикл, вступая в который, рибосомы на определенной стадии белкового синтеза распадаются на большие и малые субчастицы. Это предположение было подтверждено результатами экспериментов, в которых было показано, что большинство рибосом, находящихся в клетках *E. coli* и дрожжей, постоянно диссоциирует на субчастицы, которые затем снова объединяются с образованием рибосом. Чтобы установить этот факт, клетки, выращенные в среде, содержащей тяжелые изотопы, переносили затем в среду, содержащую легкие изотопы. Вскоре после переноса в клетках начинали появляться гибридные рибосомы («тяжелая» 50S-субчастица — «легкая» 30S-субчастица, «легкая» 50S-субчастица — «тяжелая» 30S-субчастица). Скорость появления этих «гибридных» рибосом позволяла предположить, что рибосомы обмениваются субчастицами один раз в течение каждого цикла синтеза полипептида. Данные, подтверждающие это предположение, были получены при изучении синтеза белков в опытах in vitro (см. след. гл.). В этих опытах судьбу «тяжелых» рибосом прослеживали в присутствии большого избытка «легких» рибосом. Почти все «тяжелые» рибосомы исчезали приблизительно в течение 1 мин после начала синтеза белков (именно столько времени требуется для синтеза завершенной полипептидной цепи), одновременно появлялись «гибридные» рибосомы (рис. 12-16). Опыты в системе in vitro с применением антибиотика спарсомицина подтвердили предположение о том, что обмен субчастицами между рибосомами находится в прямой зависимости от синтеза белков. В присутствии этого

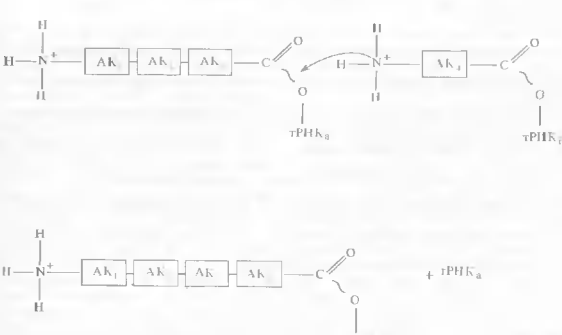


Рис. 12-17. Постепенный рост полипептидной цепи
Рост начинается с NH_3^+-конца цепи, растущий (карбоксильный) конец соединен с молекулой тРНК. Жирными линиями показаны связи между аминокислотами.

антибиотика, который блокирует элонгацию полипептидных цепей, не происходит также и обмена субчастицами между рибосомами.

Пока еще окончательно не выяснено, происходит ли разъединение субчастиц одновременно с завершением синтеза нового полипептида или же сначала от молекулы мРНК отделяется 70S-рибосома, которая затем уже диссоциирует на субчастицы.

РОСТ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ НАЧИНАЕТСЯ С NH_2-КОНЦА

Каждая законченная полипептидная цепь имеет два конца; на одном располагается аминокислота, несущая свободную аминогруппу (NH_2-конец), на другом — аминокислота со свободной карбоксильной группой (COOH-конец). Цепи всегда растут начиная с NH_2-конца, путем постепенного добавления аминокислот; рост завершается присоединением концевой аминокислоты со свободной COOH-группой (рис. 12-17). Это было четко показано в опытах с ретикулоцитами, для которых характерен интенсивный синтез гемоглобина. Ретикулоциты инкубировали в течение короткого времени с мечеными аминокислотами, а затем сразу же выделяли из них новосинтезированные цепи гемоглобина. В аминокислотах, расположенных на NH_2-конце цепей, была обнаружена очень небольшая радиоактивность, основная ее часть была сосредоточена в аминокислотах на COOH-конце (рис. 12-18). Более того, при прослеживании радиоактивности вдоль цепи отчетливо наблюдалось ее постепенное увеличение от NH_2-конца к COOH-концу.

ВСЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПОЛИПЕПТИДНЫЕ ЦЕПИ НАЧИНАЮТСЯ С N-ФОРМИЛМЕТИОНИНА

Синтез всех полипептидов в клетках бактерий начинается с N-формилметионина. Эта аминокислота представляет собой модифицированный метионин, у которого к концевой аминогруппе присоединена формильная группа (рис. 12-19). Такая блокированная аминокислота может быть использована только в самом начале синтеза белков. Из-за отсутствия свободной аминогруппы эта аминокислота не может включиться в полипептидную цепь в процессе элонгации. Формильная группа присоединяется к метионину ферментативно уже после того, как метионин свяжется со своим адаптором — соответствующей молекулой тРНК.

Не все молекулы $тРНК^{Met}$ способны формилироваться. Существуют $тРНК^{Met}$ двух типов, но формилированию подвергается лишь тРНК одного из них. Анализ нуклеотидных последовательностей $тРНК^{Met}$ обоих типов, показал, что они имеют одинаковые антикодоны (рис. 12-20). Тогда возникает вопрос: каким образом один и тот же кодон (АУГ) может кодировать две различные аминокислоты?

Обнаружение того факта, что синтез бактериальных белков начинается с блокированной аминокислоты, было весьма неожиданным, так как при анализе очищенных белков, выделенных из растущих бактерий, в них не находили практически никаких формилированных концевых групп. Это означает, что в бактериальных клетках существует фермент, который удаляет формильную группу из растущей полипептидной цепи вскоре после того, как начнется ее синтез (рис. 12-21). Кроме того, существует еще и другой фермент (аминопептидаза), который может удалять концевой метионин из многих белков. Этот фермент не действует на все белки, поэтому значительная доля бактериальных белков начинается с метионина.

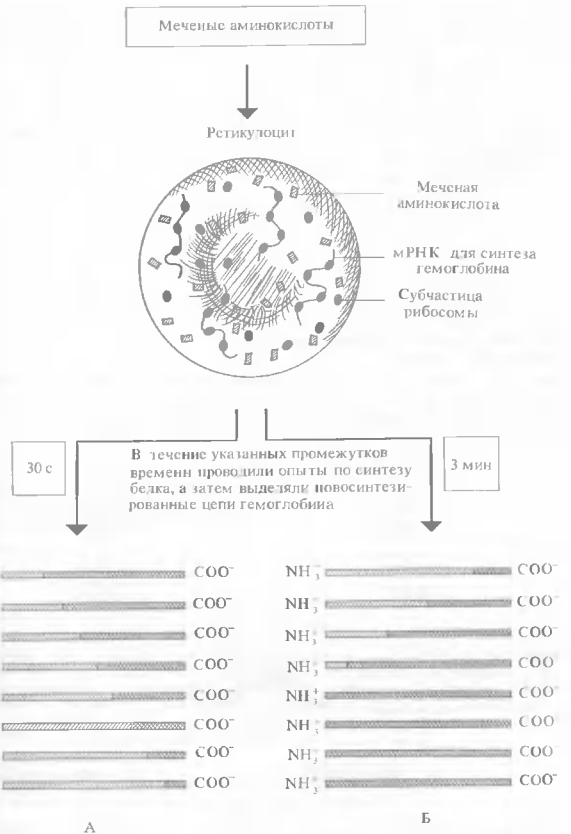


Рис. 12-18. Схематическое изображение опыта, в котором было продемонстрировано, что цепи гемоглобина растут в направлении $NH_3^+ \rightarrow COO^-$.

А. В этом опыте успевали полностью синтезироваться только те цепи, которые уже были частично синтезированы до начала опыта. Было показано, что радиоактивность в цепях постепенно нарастала к COO^--концу. На NH_3^+-концах полностью синтезировавшихся цепей не было обнаружено никакой радиоактивности. *Б.* В этом опыте новые цепи успевали полностью синтезироваться в присутствии меченых аминокислот. Поэтому в некоторых цепях обнаруживается метка на NH_3^+-конце.

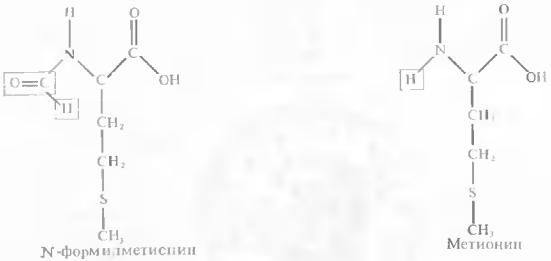
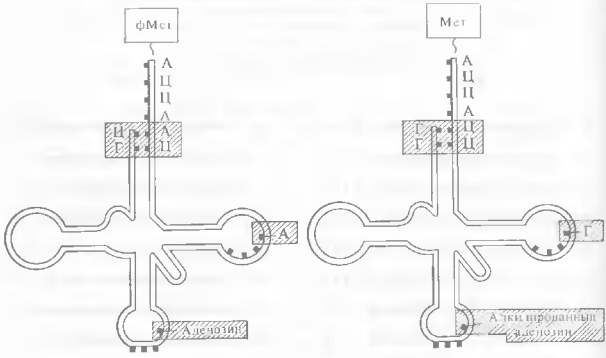


Рис. 12-19. Структура N-формилметионина в сравнении с метионином.



N-фМет-тРНК^{фМет} Мет-тРНК^{Мет}

Рис. 12-20. Схематическое изображение молекул N-фМет-тРНК и Мет-тРНК. Штриховкой показаны три основных участка, по которым эти молекулы различаются между собой.

Рис. 12-21. Ферментативные реакции, происходящие при инициации синтеза белков с участием N-формилметионина.

Менее отчетливы наши представления о том, каким образом происходит инициация синтеза белков в тех организмах, у которых в клетках имеется дискретное ядро и 80S-рибосомы. Такие организмы называются эукариотическими в отличие от прокариотических. Хотя синтез белков у них также начинается с метионина, однако эта аминокислота, по-видимому, не блокирована формильной группой. Несмотря на это, в клетках эукариотов также существуют метиониновые тРНК двух типов. Одна из них принимает участие только в инициации синтеза белка, а другая — только в элонгации полипептидной цепи.

МАЛАЯ СУБЧАСТИЦА РИБОСОМЫ СВЯЗЫВАЕТСЯ С МОЛЕКУЛОЙ мРНК В ОПРЕДЕЛЕННЫХ ТОЧКАХ

Стадия инициации синтеза белков у бактерий начинается с образования комплекса между малой 30S-субчастицей рибосомы, фМет-тРНК и молекулой мРНК. Затем к этому комплексу присоединяется 50S-субчастица рибосомы и в результате образуется функционально активная 70S-рибосома. Каждая специфическая молекула мРНК содержит один или несколько определенных участков, к которым могут прикрепляться свободные 30S-субчастицы рибосом. В пределах каждого такого участка имеются нуклеотидные последовательности, единственная функция которых заключается в том, что они обеспечивают правильное расположение

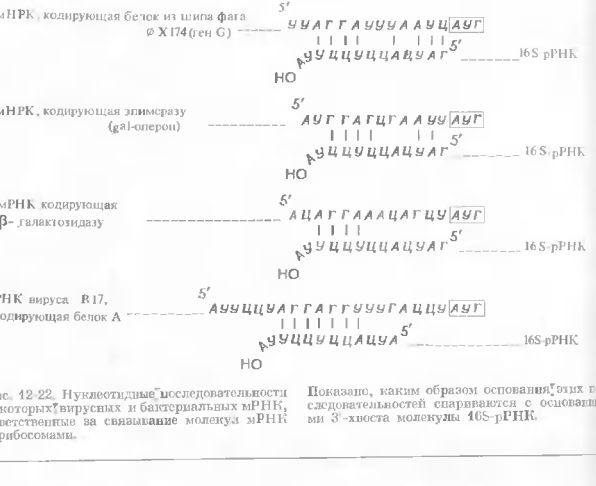


Рис. 12-22. Нуклеотидные последовательности некоторых вирусных и бактериальных мРНК, ответственные за связывание молекул мРНК с рибосомами. Показано, каким образом основания этих последовательностей спариваются с основаниями 3′-хвоста молекулы 16S-рРНК.

молекул мРНК на поверхности рибосом перед началом синтеза белков. В каждой молекуле мРНК содержится по одному *участку связывания с рибосомами* на каждый полипептидный продукт, синтезирующийся на ней независимо от другого. Например, в молекуле РНК фага R17, кодирующей три различных белка, имеется три таких участка.

Впервые нуклеотидные последовательности, принимающие участие в связывании молекулы мРНК с рибосомой, были обнаружены при проведении опытов, в которых рибосомы связывались со специфическими мРНК. Добавленный затем фермент рибонуклеаза расщеплял в мРНК все нуклеотидные последовательности, кроме тех, которые были защищены связанными с ними рибосомами. При анализе нуклеотидных последовательностей в этих защищенных фрагментах мРНК было обнаружено, что на 3′-концах этих последовательностей находятся нуклеотиды, которые кодируют первые 5 или 6 аминокислот в соответствующих полипептидных продуктах. Однако эти нуклеотиды не могут быть «связывающими нуклеотидами», так как они варьируют в зависимости от того, какой белок кодирует та или иная мРНК. Эту роль, по-видимому, играет в основном группа из 3 или 4 пуриновых нуклеотидов, расположенная недалеко от 5′-конца защищенного фрагмента. Практически во всех связывающих участках (рис. 12-22) имеется последовательность АГГА (или близкая к ней последовательность). Между серединой этой последовательности и первым кодирующим нуклеотидом находится приблизительно 8—13 нуклеотидов. Как было показано совсем недавно, они образуют комплементарные пары с нуклеотидами богатого пиримидинами участка, расположенного на 3′-конце (хвосте) молекулы 16S-РНК (... ГАУЦАЦЦУЦЦУУА$_{ОН}$3′). Это спаривание каким-то образом способ-

ствует тому, что инициирующий кодон АУГ оказывается в таком положении, в котором он может связаться с антикодоном инициаторной тРНК, находящейся в комплексе с 30S-субчастицей рибосомы.

Впоследствии, когда начинается элонгация полипептидной цепи, комплекс, состоящий из связывающего участка мРНК и хвоста 16S-рРНК, должен тем или иным способом диссоциировать, чтобы дать возможность освободившейся мРНК перемещаться по поверхности рибосомы. При таком перемещении рибосома неизбежно вступает в контакт с теми участками мРНК, с которыми она не способна была связываться до начала синтеза белка. В результате такого связывания должно происходить, в частности, временное нарушение двухцепочечной структуры шпилькообразных участков, составляющих значительную часть свободной молекулы мРНК. Это приводит к образованию одноцепочечных участков, способных правильно выбирать молекулы АА ~ тРНК с соответствующими антикодонами.

Факторы инициации белкового синтеза

Смесь N-фМет-тРНК, мРНК, 30S- и 50S-субчастиц рибосом сама по себе еще недостаточна для осуществления инициации белкового синтеза. Необходимо, чтобы в этой смеси присутствовали также еще по крайней мере три особых белка (IF1, IF2 и IF3), которые обычно не являются составной частью рибосом (рис. 12-23). По всей вероятности, процесс инициации белкового синтеза начинается с присоединения IF3 к свободной 30S-субчастице. На втором этапе этого процесса фМет-тРНК, связанная с комплексом IF2 — ГТФ, присоединяется к агрегату IF3 — 30S-субчастица. Образовавшийся комплекс IF3 — 30S-субчастица — IF2 — ГТФ связывается затем с мРНК. Возможно, что на этом этапе необходимо также присутствие фактора IF1. Наконец, присоединение ко всему этому комплексу 50S-субчастицы, происходящее на последних этапах инициации, вызывает гидролиз ГТФ, а также приводит к освобождению всех трех факторов инициации.

мРНК считывается в направлении 5′ → 3′

Прикрепившись к рибосоме, мРНК движется во время синтеза в совершенно определенном направлении. Она не может свободно выбирать направление, и это отражает тот факт, что сами молекулы мРНК определенным образом ориентированы. Считывание начинается с 5′-конца полинуклеотидной цепи, т. е. с того же самого конца, с которого начинается ее синтез. Благодаря этому рибосома может присоединяться к еще не завершенной цепи мРНК, синтезируемой на ДНК-матрице. Если бы синтез белка происходил в направлении 3′ → 5′, то он мог бы начинаться лишь после того, как синтезируется цепь мРНК, соответствующая полной полипептидной цепи. Направление 5′ → 3′, по всей вероятности, означает, что быстро растущие клетки, как правило, не содержат длинных свободных (т. е. не присоединенных к рибосомам) цепей мРНК.

В каждой рибосоме имеется два тРНК-связывающих участка

На поверхности всех 70S-рибосом находятся две полости, в которых могут поместиться молекулы тРНК (рис. 12-24). Эти полости называются П (пептидил)- и А (аминоацил)-участками. Каждое такое углубление

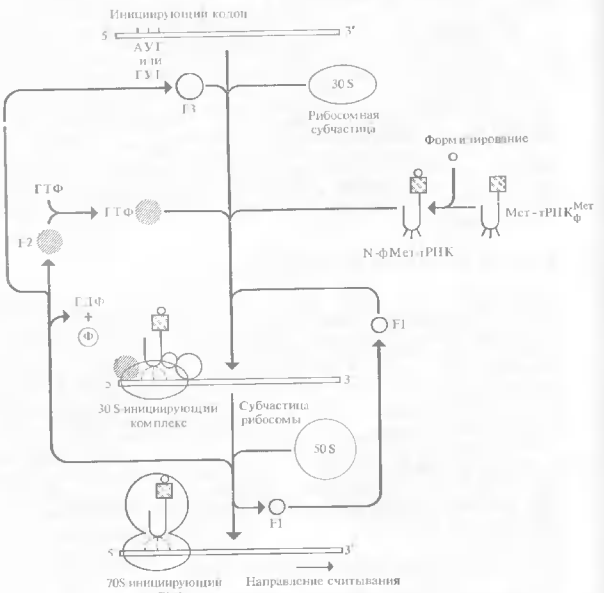


Рис. 12-23. Схематическое изображение процесса инициации синтеза белков.
На рибосоме показан только один из двух тРНК-связывающих участков. Не известно, с каким из этих участков (А или П) связывается вначале фМет-тРНК.

ограничено частично участками поверхности 30S- и 50S-субчастиц, а частично кодоном специфической мРНК. Та часть полости, которая ограничена поверхностью рибосомы, связывается с неспецифическим участком молекулы тРНК, и поэтому к ней способна присоединяться любая молекула АА ~ тРНК. Однако поверхность полости, ограниченная кодоном мРНК, специфична только для одной определенной молекулы тРНК.

Пока мы еще не знаем, входит ли инициирующая фМет-тРНК сразу в П-участок или же она сначала попадает в А-участок, а затем уже перемещается в П-участок. Однако совершенно ясно, что она должна так или иначе войти в П-участок, чтобы дать возможность второй молекуле АА ~ тРНК специфически связаться с рибосомой в А-участке. Для всех молекул АА ~ тРНК, кроме фМет-тРНК, твердо установлено, что они проникают в рибосому через А-участок. После того как вторая молекула АА ~ тРНК

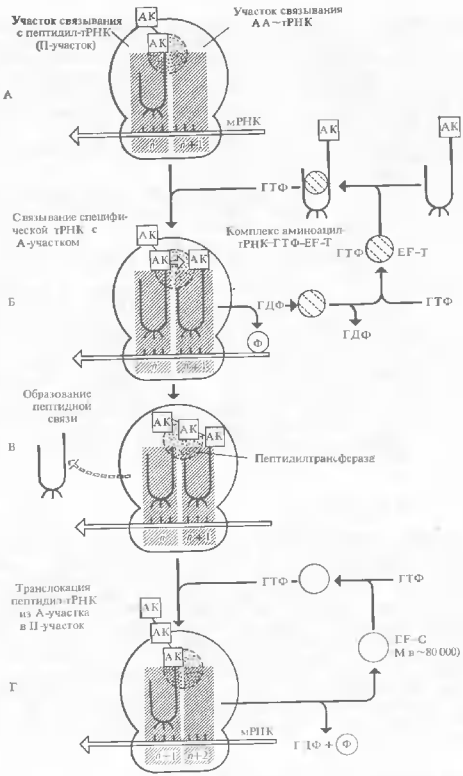


Рис. 12-24. Схематическое изображение процесса образования пептидной связи.
На схеме показано, какую роль в этом процессе играют факторы элонгации. *А*. Растущая полипептидная цепь, прикрепленная с помощью концевой тРНК к участку, связывающему белок. *Б*. Присоединение с помощью водородных связей молекулы специфической аминоацил-тРНК к $(n+1)$-кодону молекулы мРНК. Этот процесс требует участия фактора элонгации T и ГТФ. *В*. Образование пептидной связи между $АК_2$ и $АК_3$ с помощью пептидилтрансферазы, являющейся неотъемлемой частью 50S-субчастицы рибосомы. Вытеснение тРНК из П-участка. *Г*. Перемещение растущей полипептидной цепи из А-участка в П-участок. Для этого процесса необходимы фактор G и ГТФ. Одновременное передвижение цепи мРНК, приводящее к тому, что $(n+2)$-кодон оказывается в А-участке.

надлежащим образом расположится в А-участке, происходит ферментативное образование пептидной связи. В результате получается дипептид (т. е. две аминокислоты, соединенные между собой пептидной связью), у которого на конце находится молекула тРНК, являющаяся адаптором второй аминокислоты. Процесс постепенного присоединения аминокислот к растущей полипептидной цепи (причем каждый раз по одной аминокислоте) повторяется снова и снова до тех пор, пока не образуется законченная полипептидная цепь (рис. 12-24). В этом процессе необходимо выделить следующие особенности.

1. Растущий карбоксильный конец цепи всегда связан с молекулой тРНК. Основной силой, удерживающей растущую полипептидную цепь на рибосоме, является взаимодействие, возникающее при связывании этой концевой тРНК с П- или с А-участками.
2. Образование пептидной связи приводит к тому, что точка прикрепления растущей цепи к рибосоме перемещается из П-участка в А-участок.
3. Сразу же после образования пептидной связи (или одновременно с ним) освободившаяся молекула тРНК вытесняется из П-участка.
4. Новая концевая молекула тРНК перемещается затем из участка А в участок П (это перемещение называется транслокацией). В то же самое время при продвижении по рибосоме молекулы мРНК, связанной с малой субчастицей, кодон $(n+1)$ перемещается в положение, занимаемое ранее кодоном n.
5. Освободившийся А-участок может теперь принять новую молекулу АА ~ тРНК, специфичность которой определяется путем правильного спаривания ее антикодона с соответствующим ему кодоном мРНК.

ФАКТОРЫ ЭЛОНГАЦИИ

Вначале предполагали, что для образования пептидной связи требуется только один специфический фермент, так как активация карбоксильных групп аминокислот происходит в процессе их присоединения к адапторным молекулам тРНК. Кроме того, не было никаких оснований думать, что для реакции полимеризации потребуется еще дополнительная энергия. Однако эти предположения оказались неверными. Прежде всего выяснилось, что для синтеза всех пептидных связей в белках требуется богатая энергией молекула ГТФ (аналогичная молекуле АТФ, но содержащая гуанин вместо аденина). Кроме того, были выделены два белка (факторы элонгации), которые также необходимы для синтеза пептидных связей, хотя они обычно не входят в состав рибосомы. Более того, ни один из них сам по себе не участвует непосредственно в процессе образования пептидных связей.

ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ АА ~ тРНК С А-УЧАСТКОМ ТРЕБУЕТСЯ ФАКТОР ЭЛОНГАЦИИ Т

Первоначально предполагали, что присоединение АА ~ тРНК к рибосоме не является ферментативным процессом, а происходит в результате того, что правильная АА ~ тРНК случайно сталкивается с А-участком к специфическим кодоном связанной с рибосомой мРНК. Недавно проведенные эксперименты показали, однако, что эта реакция совсем не такая простая. Она начинается в тот момент, когда один из факторов элонгации (EF-T) взаимодействует с ГТФ и АА ~ тРНК с образованием комплекса АА ~ тРНК — ГТФ — EF-T. С помощью этого ком-

плекса АА ~ тРНК переносится затем в А-участок, что приводит к высвобождению комплекса EF-T — ГДФ и неорганического фосфата.

Таким образом, время, в течение которого молекула АА ~ тРНК находится внутри А-участка, можно разделить на два периода: в первом АА ~ тРНК связана с EF-T и ГТФ, а во втором она существует в свободном состоянии. Как в первом, так и во втором периоде антикодон тРНК связан с кодоном мРНК. Благодаря этому существуют две возможности вытеснить «неправильную» молекулу АА ~ тРНК в том случае, если она связалась с А-участком. Предположительно фактор EF-T играет в основном корректирующую роль: его главная функция заключается в том, что он предоставляет рибосомам еще одну возможность вытеснить неправильно связавшуюся молекулу АА ~ тРНК.

ФЕРМЕНТ, С ПОМОЩЬЮ КОТОРОГО ОБРАЗУЮТСЯ ПЕПТИДНЫЕ СВЯЗИ, ЯВЛЯЕТСЯ НЕОТЪЕМЛЕМОЙ ЧАСТЬЮ 50 S-СУБЧАСТИЦЫ РИБОСОМЫ

Собственно ферментативный катализ в процессе образования пептидной связи осуществляется с помощью одного из белков, входящих в состав большой субчастицы рибосомы. Он называется пептидилтрансферазой; предполагают, что на каждую 50S-субчастицу приходится по одной копии этого белка. Все попытки, предпринятые до сих пор с целью добиться отделения этого фермента при диссоциации 50S-субчастиц, оказались неудачными. Теперь, после того как удалось осуществить полную реконструкцию 50S-субчастиц, можно будет наконец точно определить, какой из специфических белков, входящих в состав 50S-субчастицы, играет роль активного катализатора реакции образования пептидной связи.

ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ТРАНСЛОКАЦИИ ПЕПТИДИЛ-тРНК НЕОБХОДИМО ПРИСУТСТВИЕ ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ G

Перемещение пептидил-тРНК из А-участка в П-участок осуществляется с помощью фактора элонгации G(EF-G), который часто называют транслоказой. Процесс транслокации начинается с образования комплекса EF-G — ГТФ — рибосома. На следующем этапе совершается сам акт транслокации, сопряженный с гидролизом ГТФ до ГДФ + $Ф_н$ и сопровождающийся освобождением фактора EF-G, который может использоваться повторно. Расщепление высокоэнергетической связи является обязательным условием, без которого не может произойти перемещение пептидил-тРНК. Точные измерения показали, что при каждом акте транслокации расщепляется одна молекула ГТФ.

МОЛЕКУЛА мРНК ПЕРЕДВИГАЕТСЯ ПО ПОВЕРХНОСТИ РИБОСОМЫ

При каждом акте транслокации молекула мРНК должна передвигаться, как правило, точно на три нуклеотида. Следовательно, можно представить себе, что в рибосоме существует какой-то механизм, который выпуждает цепь мРНК продвигаться каждый раз на три нуклеотида вперед. Вместе с тем можно предположить, что в передвижении молекулы мРНК рибосома как таковая не принимает никакого участия; возможно, что цепь мРНК просто тянется вслед за молекулой пептидил-тРНК, которая в процессе транслокации перемещается из А-участка в П-участок. Согласно этой гипотезе перемещение кодона обусловлено его связью с анти-

кодоном тРНК. В пользу последнего предположения убедительно свидетельствует существование недавно обнаруженной супрессорной тРНК, подавляющей мутацию со сдвигом рамки (гл. 13). Антикодон этой тРНК состоит из четырех нуклеотидов, и поэтому он связывается с группой из четырех соседних нуклеотидов в мРНК. Когда происходит транслокация такой необычной тРНК, соответствующая молекула мРНК передвигается на четыре нуклеотида. Таким образом, этот факт указывает на то, что движение мРНК вдоль рибосомы является прямым следствием перемещения тРНК.

СИНТЕЗ БЕЛКОВ НА ОПРЕДЕЛЕННЫХ СТАДИЯХ МОЖНО ЗАТОРМОЗИТЬ С ПОМОЩЬЮ АНТИБИОТИКОВ

Многие антибиотики оказались очень полезными при изучении различных стадий, из которых складывается процесс синтеза белков. Например, пуромицин, являющийся очень мощным ингибитором, в присутствии которого прекращается рост всех клеток, прерывает синтез белков на стадии элонгации полипептидной цепи. По своей структуре (рис. 12-25) он напоминает 3′-конец нагруженной аминокислотой молекулы тРНК. Благодаря этому пуромицин способен очень эффективно связываться с А-участком рибосомы и конкурентно ингибировать нормальное связывание с этим участком молекул АА ~ тРНК. Еще более важно то, что пептидилтрансфераза может использовать его как акцептор вместо обычной молекулы АА ~ тРНК и перепосить на него растущую полипептидную цепь. Поскольку остаток пуромицина связывается с А-участком непрочно, растущие полипептидные цепи с концевым пуро-

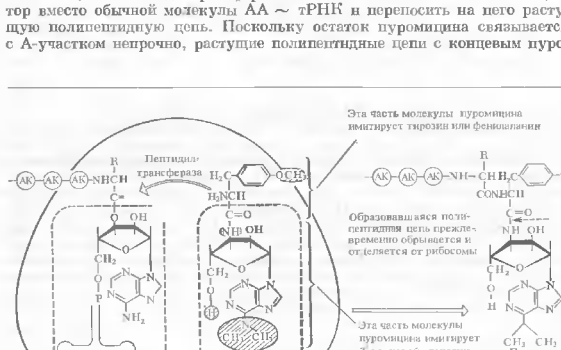


Рис. 12-25. Преждевременный обрыв полипептидной цепи под действием пуромицина. Пептидная связь (на которую указывает штриховая стрелка) в молекуле пептидилпуромицина, относительно стабильна, и поэтому последующее присоединение аминокислоты невозможно.

мицином отваливаются от рибосом, что приводит к образованию незаконченных полипептидных цепей разной длины.

Еще одним полезным антибиотиком является фузидиевая кислота, которая специфически ингибирует реакцию транслокации, осуществляемую с помощью фактора элонгации G. Реакция, катализируемая пептидилтрансферазой, ингибируется антибиотиками спарсомицином и липкомицином, которые специфически связываются с 50S-субчастицей рибосомы. В отличие от них стрептомицин, являющийся мощным ингибитором инициации белкового синтеза, связывается с 30S-субчастицей.

ОДНОВРЕМЕННО С СИНТЕЗОМ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ ПРОИСХОДИТ И ИХ УКЛАДКА

В оптимальных условиях время, необходимое для синтеза полипептидной цепи, состоящей из 300—400 аминокислот, составляет у *E. coli* от 10 до 20 с. В течение этого времени растущая цепь не остается в виде беспорядочного клубка, а приобретает вскоре после начала синтеза в значительной мере законченную трехмерную конфигурацию благодаря большому числу уже образовавшихся слабых связей. Таким образом, многие белки обладают почти законченной конфигурацией еще до того, как несколько последних аминокислот присоединятся к полипептидной цепи. Поэтому на рибосомах, от которых еще не отделились их полипептидные продукты, уже можно обнаружить незначительный уровень активности многих ферментов.

ОТДЕЛЕНИЕ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ ОТ РИБОСОМЫ ЗАВИСИТ ОТ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ОСВОБОЖДЕНИЯ, КОТОРЫЕ СЧИТЫВАЮТ ТЕРМИНИРУЮЩИЕ КОДОНЫ

Чтобы произошла терминация цепи, необходимо соблюдение двух условий. Во-первых, в молекуле мРНК должен присутствовать специфический кодон, который означает, что элонгация полипептидной цепи должна прекратиться. Во-вторых, необходимо присутствие связанного с ГТФ фактора освобождения, который считывает терминирующий кодон. Причина всех этих сложностей кроется в том, что после того, как полипептидная цепь достигнет своей полной длины, ее карбоксильный конец все еще остается связанным со своей адапторной молекулой тРНК. Поэтому процесс терминации должен включать стадию, на которой происходит отщепление концевой тРНК. В результате отщепления новообразованная полипептидная цепь сразу же высвобождается, поскольку ее связь с рибосомой осуществляется в основном через тРНК.

Расшифровка генетического кода (гл. 13) привела к обнаружению трех кодонов, которые являются специфическими «стоп-сигналами». Открытие этих кодонов послужило вначале поводом для предположения о том, что существуют особые терминирующие молекулы тРНК, т. е. такие тРНК, которые специфически связываются с терминирующими кодонами, но не несут никаких аминокислот, присоединенных к их 3′-концевому адепозину. Эти тРНК должны каким-то образом способствовать отделению от рибосомы концевой тРНК. Однако результаты недавно проведенных экспериментов полностью исключили возможность существования таких молекул. Оказалось, что терминирующие кодоны считываются специфическими белками (факторами освобождения), для действия которых требуется опять-таки присутствие ГТФ. Предстоит выяснить, не являются ли эти факторы освобождения (release factors, RF) ферментами, непосредственно катализирующими отщепление концевого остатка тРНК.

ВОЗМОЖНО, ЧТО ГТФ ВЫЗЫВАЕТ КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЛЕКУЛАХ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ ТРАНСЛЯЦИИ

Столь частое использование ГТФ на многих этапах трансляции (инициации, элонгации и терминации) требует какого-то объяснения, которое сделало бы более понятной роль ГТФ во всех этих процессах. Не существует никаких данных, указывающих на то, что ГТФ используется при образовании какой-либо ковалентной связи; следовательно, это соединение не служит, подобно АТФ, донором энергии. ГТФ в отличие от АТФ играет ключевую роль в процессе нековалентного связывания различных факторов трансляции (IF2, EF-T, EF-G, RF) с поверхностью рибосомы. Для осуществления такого связывания требуется именно присутствие ГТФ, тогда как реакция расщепления ГТФ до ГДФ служит сигналом для освобождения связанного фактора. Таким образом, возможно, что присутствие (или отсутствие) ГТФ определяет конформационное состояние различных факторов трансляции. Согласно этой гипотезе, присоединение ГТФ к тому или иному фактору индуцирует в нем такие конформационные изменения, без которых он не мог бы связаться с рибосомой. Соответственно гидролиз ГТФ до ГДФ приводит к тому, что молекула фактора возвращается к своей первоначальной конфигурации, в результате чего происходит ее вытеснение с поверхности рибосомы.

В ПРИСУТСТВИИ тРНК, НЕ НАГРУЖЕННОЙ АМИНОКИСЛОТОЙ, НА РИБОСОМАХ ПРОИСХОДИТ ХОЛОСТАЯ РЕАКЦИЯ, ПРИВОДЯЩАЯ К ОБРАЗОВАНИЮ ффГфф

Если молекула тРНК, не нагруженная аминокислотой, занимает случайно А-участок на рибосоме, то это приводит не только к временному прекращению роста полипептидной цепи, но и к тому, что под воздействием этой тРНК на рибосоме происходит холостая реакция, в которой АТФ используется в качестве донора пирофосфатной группы $Ф \sim Ф$ для превращения $фф^5Т^3он$ (ГДФ) в необычный нуклеотид $фф^5Г^3Ффф$. В бактериях, растущих в нормальных условиях, можно обнаружить лишь незначительный уровень содержания ффГфф, однако при аминокислотном голодании в клетках накапливаются большие количества этого соединения. Молекулы ффГфф как таковые играют не пассивную роль, а служат специфическими сигналами, благодаря которым прерывается инициация синтеза молекул рРНК и тРНК. Таким образом, они выполняют функцию контролирующих молекул, в присутствии которых клетки производят только такое количество рибосом, которое они действительно способны использовать. Такую специфическую блокировку синтеза рРНК и тРНК в условиях аминокислотного голодания можно назвать «строгой ответной реакцией» (stringent response). Хотя эта реакция и полезна для клетки, тем не менее она не является обязательной, поскольку существуют релаксированные мутанты, которые продолжают синтезировать рРНК и тРНК и во время аминокислотного голодания. В таких релаксированных клетках отсутствует фермент, названный его «строгим» фактором (stringent factor; мол. вес 75 000), который связывается с рибосомами и осуществляет превращение ффГ в ффГфф.

ПОСЛЕ ЗАВЕРШЕНИЯ СИНТЕЗА ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ В НИХ МОГУТ ОБРАЗОВЫВАТЬСЯ РАЗРЫВЫ

Известно много случаев, когда модификация специфических ферментов происходит уже после завершения их синтеза. Выше мы упоминали об удалении формильной группы и метионина из многих бактериальных

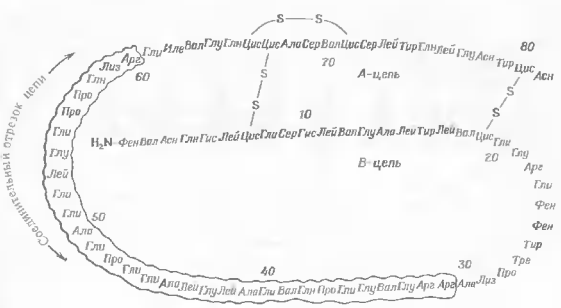


Рис. 12-26. Структура бычьего проинсулина. Аминокислоты, которые удаляются в процессе превращения проинсулина в инсулин обведены волнистой линией.

белков. По всей вероятности, вскоре будут обнаружены случаи удаления из белков не только одной, но и нескольких аминокислот либо с NH_2-, либо с COOH-конца полипептидной цепи в результате действия экзопептидаз (ферментов, которые последовательно одну за другой удаляют концевые аминокислоты). Столь же важную роль играют и эндопептидазы, которые производят разрывы пептидных связей, расположенных внутри полипептидной цепи. В качестве примера можно привести инсулин. В течение многих лет считалось, что молекула инсулина образуется в результате агрегации A- и B-цепей, синтезируемых независимо друг от друга. Теперь же выяснилось, что инсулин синтезируется вначале в виде одной цепи, состоящей из 82 аминокислотных остатков (проинсулин). Эта цепь приобретает трехмерную конфигурацию после образования в ней нескольких дисульфидных (S—S) связей. В результате последующих разрывов двух внутренних связей от цепи отделяется отрезок, состоящий из 31 аминокислоты. Оставшиеся два фрагмента, которые ранее находились в одной непрерывной полипептидной цепи, соединяются теперь между собой только S—S-связями (рис. 12-26). Таким образом, совершенно ясно, что знание аминокислотной последовательности очищенного фермента не обязательно влечет за собой обнаружение истинных инициирующих и терминирующих аминокислот.

ОДНА МОЛЕКУЛА мРНК «РАБОТАЕТ» ОДНОВРЕМЕННО НА НЕСКОЛЬКИХ РИБОСОМАХ

Участок молекулы мРНК, контактирующий с одной рибосомой, относительно невелик. Это позволяет одной молекуле мРНК «работать» одновременно на нескольких рибосомах. Она может скользить по поверхности нескольких рибосом и, таким образом, служить матрицей сразу для нескольких полипептидных цепей (набор рибосом, связанных с одной молекулой мРНК, получил название *полирибосомы* или *полисомы*). В каж-

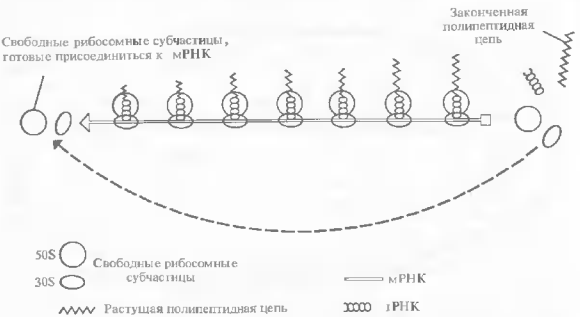


Рис. 12-27. Схематическое изображение полисомы в момент синтеза белка. Направление движения молекулы мРНК указано стрелкой.

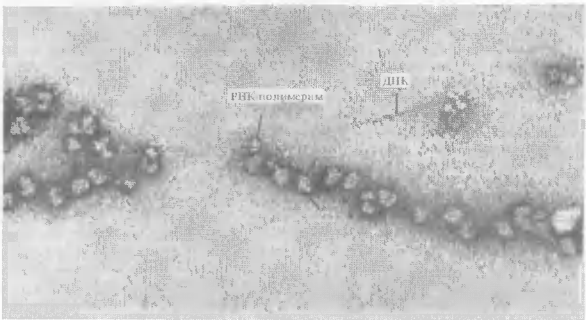


Рис. 12-28. Группы рибосом (полисом), движущиеся вдоль цепей мРНК, которые синтезируются на молекуле ДНК *E. coli*. (С любезного разрешения д-ра Барбары Хэмкало, Оксфордская национальная лаборатория.)

дый данный момент длина полипептидной цепи, связанной с работающими в составе полисомы рибосомами, зависит от длины «прочитанной» части мРНК (рис. 12-27). Это значит, что полипептидная цепь постепенно растет по мере того, как рибосома движется вдоль мРНК. Размеры полирибосом сильно варьируют в зависимости от длины цепей мРНК. При максимальном использовании мРНК на каждые 80 нуклеотидов приходится одна рибосома. Полирибосомы, синтезирующие полипептидные цепи молекулы гемоглобина, содержат обычно 4—6 рибосом (рис. 12-28); при синтезе более крупных белков (мол. вес 30 000—50 000; 300—500 аминокислот) полирибосомы содержат примерно 12—20 рибосом, связанных с соответствующей мРНК.

Способность одной молекулы мРНК работать одновременно на нескольких рибосомах объясняет нам, почему клетка нуждается в сравнительно небольшом количестве мРНК. До открытия полирибосом низкое содержание мРНК в клетке (1—2% общего количества РНК) представлялось необъяснимым, так как расчет показывал, что при среднем мол. весе мРНК $5 \cdot 10^6$ не более 10% рибосом могут активно синтезировать белок.

РИБОСОМЫ ТРЕБУЮТ БОЛЕЕ УГЛУБЛЕННОГО ИЗУЧЕНИЯ

Вполне вероятно, что важнейшие общие черты процесса синтеза белков в настоящее время уже выяснены. Самыми разнообразными экспериментами подтверждены все основные особенности этого процесса, которые иллюстрирует рис. 12-29. Однако, несомненно, потребуется еще очень много усилий, прежде чем мы окажемся в состоянии полностью понять белковый синтез на молекулярном уровне. Главный пробел в наших знаниях касается роли рибосом.

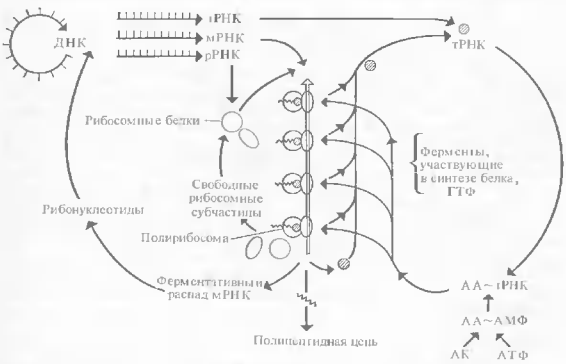


Рис. 12-29. Схема, поясняющая роль РНК в синтезе белка.

Рис. 12-30. Электронная микрофотография тонкого среза клетки куриного эмбриона. (С любезного разрешения д-ра Байера, Биологическая лаборатории Гарвардского университета; Byers, J. Mol. Biol., 26, 155, 1967.) Видны кристаллы рибосом, образовавшиеся в результате выдерживания эмбриона в течение 6 ч при 5°С.

Хотя с помощью электронного микроскопа большой разрешающей силы, может быть, и удастся вскоре определить относительную локализацию различных рибосомных белков, а также положение тРНК-связывающих участков П и А, но этим методом невозможно выяснить детали строения рибосом на уровне отдельных атомов. Такое исследование можно будет провести только с помощью рентгеноструктурного анализа. В течение многих лет этот подход к изучению структуры рибосом казался почти безнадежным, так как в связи с тем, что никому еще не удалось получить кристаллы рибосом, возникли сомнения в принципиальной возможности их получения.

Однако теперь обнаружены многочисленные случаи образования кристаллов рибосом в живых клетках. Они образуются в тех клетках, в которых синтез белков временно приостановился. Например, прекрасные кристаллы (рис. 12-30) получаются в клетках куриного эмбриона, которые после инкубации при повышенной температуре подвергаются медленному охлаждению. В этих условиях полипептидные цепи, уже начавшие синтезироваться, достраиваются до конца, но инициации синтеза новых цепей не происходит и поэтому мРНК отделяется от рибосом. Освободившиеся рибосомы могут затем спонтанно агрегировать друг с другом. Благодаря осуществлению такой кристаллизации рибосом in vivo можно надеяться, что в не очень далеком будущем кристаллы рибосом будут выращены и в пробирке. Однако это будет всего лишь первым шагом на пути к решению невероятно трудной задачи, поскольку рентгеноструктурный анализ никогда еще не применялся для изучения структур, хоть в какой-то мере приближающихся по своей сложности к структуре рибосомы.

Много терпения и труда придется потратить для того, чтобы наконец понять, почему для синтеза белка необходима такая сложная структура, как рибосома.

ВЫВОДЫ

Аминокислоты сами непосредственно не реагируют с матричной РНК. На первом этапе они соединяются со специфичными молекулами-адапторами, которые обладают выраженным химическим сродством к нуклеоти-

дам РНК. Все такие адапторы принадлежат к классу низкомолекулярной РНК (тРНК; мол. вес ~25 000). Каждая данная молекула тРНК специфична по отношению к одной определенной аминокислоте.

Полинуклеотидные цепи всех тРНК складываются с образованием относительно жестких молекул, напоминающих по своей конфигурации букву L. Около половины всех оснований в молекулах тРНК входит в состав двухцепочечных участков, а остальные основания образуют петли, стабилизированные водородными связями между основаниями в двухцепочечных участках, а также стэкинг-взаимодействиями. Одна из таких петель содержит антикодон, т. е. группу из трех оснований, которые спариваются с тремя последовательно расположенными основаниями матрицы (кодоном). Карбоксильная группа аминокислоты ковалентно связывается с 3′-концевым аденозином тРНК. Эта ковалентная связь принадлежит к числу высокоэнергетических связей, так что аминокислота в этом соединении активирована. Реакция аминокислоты с адапатором катализируется активирующим ферментом (аминоацилсинтетазой), специфичным для каждой аминокислоты. Именно эти ферменты обладают способностью «узнавать» соответствующие аминокислоты. Общая точность синтеза белка не может поэтому превышать ту точность, с которой активирующие ферменты «узнают» соответствующие аминокислоты.

После активации молекулы АА ~ тРНК диффундируют к рибосомам — сферическим частицам, на которых происходит образование пептидной связи. Рибосомы имеют мол. вес ~$3 \cdot 10^6$ и состоят примерно наполовину из рРНК и наполовину из белка. Рибосома построена из большой (мол. вес ~$2 \cdot 10^6$) и малой (мол. вес ~10^6) субчастиц. В каждой рибосоме находится около 60 различных белков и две основные молекулы рРНК (16S- и 23S- РНК). Молекулы рРНК не содержат генетической информации, и их функция все еще остается загадкой, решение которой имело бы важное значение.

Роль матрицы выполняет РНК третьего типа — информационная, или матричная РНК (мРНК). Молекулы мРНК присоединяются к рибосомам и движутся вдоль рибосом таким образом, что кодоны последовательно занимают положения, необходимые для правильного выбора АА ~ тРНК.

Рост белковых цепей всегда происходит постепенно и начинается с NH_2-конца. Это означает, что растущий конец полипептидной цепи всегда связан с молекулой тРНК. Присоединение образующейся полипептидной цепи к рибосоме осуществляется в результате того, что концевая молекула тРНК связывается с рибосомой в некоем углублении, находящемся на ее поверхности. В каждой рибосоме имеется два таких углубления, которые называются П (пептидил-) и А (аминоацил)-участками. В нормальных условиях молекула АА ~ тРНК входит сначала в А-участок, что делает возможным последующее образование пептидной связи между нею и растущей цепью, находящейся в П-участке. При этом новообразующаяся полипептидная цепь переносится в А-участок. Под действием фермента транслоказы эта же цепь перемещается затем обратно в П-участок, и весь описанный цикл повторяется. Для присоединения АА ~ тРНК к А-участку, а также для осуществления процесса транслокации необходимо расщепление ГТФ до ГДФ и фосфата. Возможно, что передвижение последовательных кодонов в молекуле мРНК вдоль поверхности рибосомы происходит одновременно с актом транслокации, однако по существу ничего не известно о том, каким образом осуществляется такое передвижение. Для инициации белкового синтеза требуются особые ферменты, отличающиеся от тех, которые участвуют в процессе элонгации цепей. В инициации синтеза белков на бактериальных рибосомах всегда участвует $тРНК^{фмет}$. Терминация цепи происходит в результате считывания специфических стоп-сигналов специфическими белками (факторами освобождения).

Завершение синтеза полипептидной цепи сопровождается диссоциацией рибосом на большие и малые субчастицы. Воссоединение субчастиц происходит только после того, как инициирующая аминоацил-тРНК свяжется с комплексом, состоящим из молекулы мРНК и малой субчастицы рибосомы. Как правило, молекула мРНК работает одновременно на нескольких рибосомах (полисомы). Таким образом, в каждый данный момент времени многие кодоны одной и той же молекулы мРНК находятся «в работе».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ingram V. M., Biosynthesis of Macromolecules, W. A. Benjamin, Menlo Park, 1972. (В. Ингрэм, Биосинтез макромолекул, изд-во «Мир», М., 1975.) Вводный курс, содержащий подробное описание первых экспериментов, сыгравших важную роль в дальнейшем изучении макромолекул.

The Mechanism of Protein Synthesis and its Regulation, L. Bosch (ed.), North Holland, Elsevier, 1972. Несколько отличных обзоров по отдельным аспектам белкового синтеза.

Ribosomes, M. Nomura, A. Tissiers and P. Lengyel (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, 1974. В этом сборнике углубленных обзорных статей дано очень полное описание современных представлений о возможных механизмах функционирования рибосом.

Crick F. H. C., On Protein Synthesis, Symp. Soc. Exptl. Biol., **12**, 138—163 (1958). Рассуждения, которые привели к выдвижению автором адаптерной гипотезы.

Watson J. D., The Involvement of RNA in the Synthesis of Proteins, Science, **140**, 17—26 (1963). История исследований, проводившихся в период между 1953 и 1962 гг., в которых было установлено, каким образом РНК участвует в процессе синтеза белка.

Holley R. W., The Nucleotide Sequence of a Nucleic Acid. In: The Molecular Basis of Life, R. H. Haynes and P. C. Hanawalt (eds.), Freeman, San Francisco, 1968. Автор подробно описывает, каким образом была установлена первичная структура аланиновой тРНК.

Robertus J. D., Ladner J. E., Finch J. T., Rhodes D., Brown R. S., Clark B. F. C., Klug A., Structure of Yeast Phenylalanine tRNA at 3 Å Resolution, Nature, **250**, 546 (1974).

Kim S. H., Suddath F. L., Quigley F. L., McPherson A., Sussman J. L., Wang A. H. J., Seeman N. C., Rich A., Three-Dimensional Tertiary Structure of Yeast Phenylalanine Transfer RNA, Science, **185**, 435 (1974). В этих двух статьях содержатся сообщения о трехмерной структуре молекулы тРНК, установленной впервые и независимо друг от друга двумя группами исследователей.

Hopfield J. J., Kinetic Proofreading: A New Mechanism for Reducing Errors in Biosynthetic Processes Requiring High Specificity, Proc. Nat. Acad. Sci., **71**, 4135 (1974). Важная умозрительная работа, подчеркивающая те преимущества, которые получает процесс коррекции, если он состоит из нескольких последовательных этапов.

Baldwin A. N., Berg P., Transfer Ribonucleic Acid-Induced Hydrolysis of Valyladenylate Bound to Isoleucyl Ribonucleic Acid Synthetase, J. Biol. Chem., **241**, 839 (1967). Классическая работа, в которой описано, каким образом аминоацилсинтетаза точно различает очень сходные по своей структуре аминокислоты в процессе образования молекул АА ~ тРНК.

Nomura M., Ribosomes, Scientific American, December 1969. Очень хороший вводный обзор, посвященный проблеме разделения рибосом на субчастицы и их воссоединения.

Steitz J. A., Polypeptide Chain Initiation: Nucleotide Sequences of the Three Ribosomal Binding Sites in Bacteriophage R17 RNA, Nature, **224**, 957 (1969). Первые данные о нуклеотидных последовательностях, расположенных в самом начале генов.

Shine J., Dalgarno L., The 3′-Terminal Sequence of *E. coli* 16S rRNA: Complementarity to Nonsense Triplets and Ribosome Binding Sites. В работе обсуждается вопрос о том, каким образом происходит первоначальное связывание мРНК с рибосомной 30S-субчастицей.

ГЛАВА

13 Генетический код

Даже после того, как роль РНК в белковом синтезе в основном выяснилась (1960 г.), ученые не склонны были особенно оптимистически расценивать перспективы расшифровки генетического кода. Предполагали, что идентификация кодонов (для каждой отдельной аминокислоты) потребует точного выяснения как последовательности оснований в гене, так и последовательности аминокислот в белковом продукте гена. Выше мы отмечали, что определение последовательности аминокислот в белках было уже в то время задачей хотя и трудоемкой, но вполне разрешимой. Иначе обстояло дело с определением последовательностей оснований в ДНК, так как применявшиеся для этой цели методы были весьма примитивными. Только сейчас такого рода работы начинают интенсивно развиваться. К счастью, однако, оказалось, что трудности, связанные с расшифровкой кода, переоценивались: уже через год после открытия мРНК (т. е. в 1961 г.) благодаря использованию синтетической мРНК началось «взламывание» кода. Первым был однозначно определен кодон для аминокислоты фенилаланина. Для того чтобы объяснить, как это было сделано, мы должны прежде всего описать некоторые детали исследований по синтезу белка в бесклеточных системах.

ДОБАВЛЕНИЕ мРНК СТИМУЛИРУЕТ СИНТЕЗ БЕЛКА in vitro

На экстрактах из клеток, активно синтезирующих белки, была доказана необходимость участия в этом процессе трех классов РНК: тРНК, рРНК и мРНК. В этих опытах клетки тщательно разрушали и полученные бесклеточные препараты фракционировали, чтобы определить, какие именно клеточные компоненты необходимы для включения аминокислот в белки. Поскольку в бесклеточных системах синтез белка протекает очень слабо (и обнаружить реальный прирост белка обычно не удается), во всех этих опытах использовали аминокислоты, меченные радиоактивными изотопами (^{3}H, ^{14}C или ^{35}S). Только использование метки позволяет убедительно продемонстрировать включение аминокислот в белки (рис. 13-1).

Типичный ход такого процесса представлен на рис. 13-2. Мы видим, что в экстрактах из клеток *E. coli* синтез белка в течение нескольких минут идет линейно, а затем постепенно замедляется и наконец прекращается вообще. Одновременно исчезает соответствующая мРНК, которую быстро разрушают ферменты, присутствующие в экстракте. Это позволило предположить, что главная причина малой эффективности синтеза белка в бесклеточных экстрактах заключается в потере матриц. Правильность такого заключения была доказана путем добавления к системе, в которой синтез приостановился, новой порции мРНК. Это добавление немедленно восстановило синтез белка. Экстракты, бедные мРНК, весьма удобны

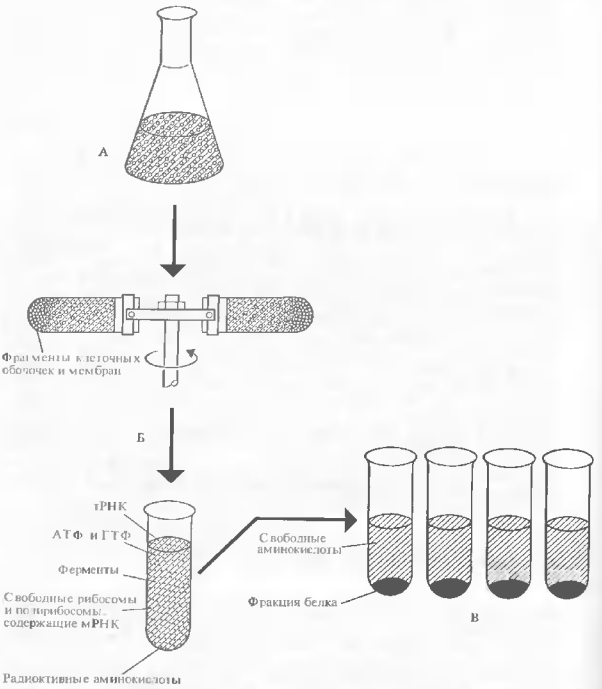


Рис. 13-1. Изучение синтеза белка in vitro. *А*. Быстро растущие клетки *E. coli* собирают путем центрифугирования на холоду (0°С) и разрушают для получения клеточного сока. Добавляют дезоксирибонуклеазу (фермент, разрушающий ДНК). *Б*. Клеточный сок центрифугируют (0°С), чтобы удалить фрагменты клеточных оболочек и мембран. Затем собирают более медленно седиментирующие компоненты (полирибосомы, свободные рибосомы, свободную мРНК, тРНК и ферменты) и помещают в пробирки. Вносят в каждую пробирку АТФ, ГТФ и радиоактивные аминокислоты; инкубируют при 37°С в течение различных промежутков времени. *В*. Добавляют кислоту для осаждения белков (свободные аминокислоты остаются при этом в растворе). Осадки собирают, промывают и помещают в счетчик для измерения радиоактивности. Величина радиоактивности осадка служит мерой количества включенных аминокислот (т. е. интенсивности белкового синтеза).

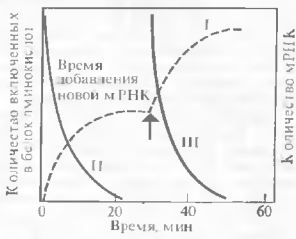


Рис. 13-2. Влияние добавления мРНК на включение аминокислот в белок в бесклеточных экстрактах *E. coli* (при 37°С).
I — включение аминокислот, *II* — распад исходной мРНК, *III* — распад добавленной мРНК.

для тестирования мРНК. Поскольку они содержат очень мало функционирующей мРНК, они могут быть использованы для обнаружения даже слабой матричной активности в добавляемых извне препаратах мРНК.

ВИРУСНАЯ РНК ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ мРНК!

В гл. 15 мы увидим, что генетический компонент многих вирусов представлен одноцепочечной РНК. Когда такие вирусы инфицируют клетку, их РНК должна сначала сыграть роль матрицы при синтезе специфических белков, без которых не может начаться жизненный цикл вируса. К числу этих необходимых белков относится и фермент РНК-синтетаза, катализирующий репликацию РНК. Поэтому инфицирующая одноцепочечная молекула РНК не может служить матрицей для синтеза комплементарной цепи до тех пор, пока она не выполнит роль матрицы в белковом синтезе. Это означает, что инфекционная вирусная РНК сама должна быть способна связываться с клеточными рибосомами и направлять синтез вирус-специфических белков (т. е. она должна действовать как мРНК). Опыты с бесклеточными системами доказывают это весьма наглядно. Так, например, добавление РНК ВТМ к экстракту *E. coli*, в котором запасы мРНК исчерпаны, немедленно стимулирует включение аминокислот в белки.

В БЕСКЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ МОЖНО СИНТЕЗИРОВАТЬ ОПРЕДЕЛЕННЫЕ БЕЛКИ

В наших бесклеточных системах даже при добавлении избытка мРНК лишь небольшое количество аминокислот включается в полипептидные цепи. Очевидно, мы еще не умеем надлежащим образом воспроизводить те условия, в которых протекает нормальный синтез белка in vivo. Вначале высказывались даже сомнения, действительно ли белки, синтезированные in vitro, имеют такую же структуру, как и природные белки. К счастью, благодаря использованию специфических вирусных РНК эти сомнения были рассеяны; удалось показать, что и в бесклеточных системах код считывается правильно. В первых удачных опытах, проведенных в 1962 г., к предварительно инкубированному экстракту *E. coli* добавляли РНК, выделенную из бактериофага f2. Она действовала как матрица и стиму-

лировала включение аминокислот в белок. Некоторые полипептидные цепи оказались в конечном счете достроенными и отделились от рибосом. Эти новообразованные белки сравнили с белком оболочки F2, имеющим мол. вес 14 000. Сравнение показало, что некоторая часть белков имела ту же последовательность аминокислот, что и белок F2, синтезированный in vivo. Отсюда следует, что в условиях бесклеточной системы молекулы мРНК способны правильно выбирать предшественники (АА ~ тРНК) для построения полипептидной цепи.

Множество других вирусных и клеточных белков удалось синтезировать в бесклеточных системах в течение следующего десятилетия. Одним из первых успешных синтезов был синтез лизоцима фага Т4, фермента (мол. вес 20 000), который способствует разрушению клеточных стенок бактерий. Осуществление синтеза этого фермента в активной форме еще раз показало, что трансляция в системах in vitro происходит с большой точностью. После непродолжительного периода, в течение которого исследователи сталкивались с трудностями при синтезе очень длинных полипептидных цепей, уже в 1969 г. было убедительно продемонстрировано, что в бесклеточной системе можно синтезировать ферментативно активную β-галактозидазу, состоящую из 1300 аминокислот. Более того, за последнее время в бесклеточных системах был синтезирован целый ряд важных белков млекопитающих (например, гемоглобин, легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов, актин, коллаген и миозин); все это показывает, что условия синтеза in vitro для белков высших организмов изучены в настоящее время так же хорошо, как и условия синтеза бактериальных белков.

СТИМУЛЯЦИЯ ВКЛЮЧЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ СИНТЕТИЧЕСКИМИ мРНК

Хотя описанные выше опыты с вирусной РНК и доказали, что в бесклеточных системах сохраняется правильное считывание генетического кода, все же сами по себе эти опыты еще ничего не дали для выяснения точной природы кода. Иными словами, они не дали возможности установить, какие тройки нуклеотидов кодируют те или иные аминокислоты (напом-

Таблица 13-1 64 возможных трехбуквенных кодона

Первое положение (5′-конец)	Второе положение				Третье положение (3′-конец)
	У	Ц	А	Г	
У	УУУ	УЦУ	УАУ	УГУ	У
	УУЦ	УЦЦ	УАЦ	УГЦ	Ц
	УУА	УЦА	УАА	УГА	А
	УУГ	УЦГ	УАГ	УТГ	Г
Ц	ЦУУ	ЦЦУ	ЦАУ	ЦГУ	У
	ЦУЦ	ЦЦЦ	ЦАЦ	ЦГЦ	Ц
	ЦУА	ЦЦА	ЦАА	ЦГА	А
	ЦУГ	ЦЦГ	ЦАГ	ЦГГ	Г
А	АУУ	АЦУ	ААУ	АГУ	У
	АУЦ	АЦЦ	ААЦ	АГЦ	Ц
	АУА	АЦА	ААА	АГА	А
	АУГ	АЦГ	ААГ	АГГ	Г
Г	ГУУ	ГЦУ	ГАУ	ГГУ	У
	ГУЦ	ГЦЦ	ГАЦ	ГГЦ	Ц
	ГУА	ГЦА	ГАА	ГГА	А
	ГУГ	ГЦГ	ГАГ	ГГГ	Г

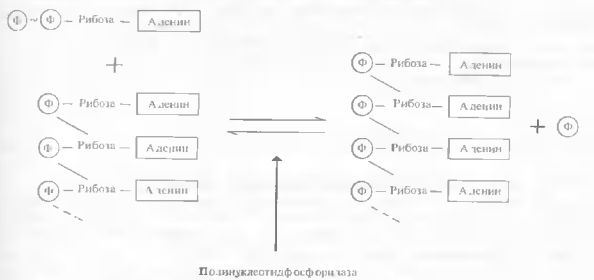


Рис. 13-3. Синтез (и распад) РНК под действием фермента полинуклеотидфосфорилазы.

ним, что таких троек, или триплетов, может быть 64, поскольку имеется 4 типа нуклеотидов; табл. 13-1).

Для получения необходимых данных были использованы синтетические полирибонуклеотиды. Их приготовляют с помощью фермента полинуклеотидфосфорилазы. Этот фермент, найденный у всех бактерий, катализирует следующую реакцию:

$$(\text{РНК}) + \text{Ⓟ} \rightleftarrows \text{Рибонуклеозид}—\text{Ⓟ} \sim \text{Ⓟ} \qquad (13\text{-}1)$$

В нормальных для клетки условиях равновесие реакции сдвинуто в сторону распада РНК до нуклеозиддифосфатов, так что главная функция полинуклеотидфосфорилазы, возможно, заключается в том, чтобы контролировать время жизни мРНК (гл. 14). Однако, используя высокие начальные концентрации нуклеозиддифосфатов, можно сдвинуть равновесие в сторону образования 3',5'-фосфодиэфирной связи (рис. 13-3), что приведет к образованию синтетических РНК. Так как полинуклеотидфосфорилаза не является биосинтетическим ферментом, для синтеза не требуется матричной РНК, и состав продуктов реакции полностью определяется концентрациями различных дифосфатов в реакционной смеси. Если, например, в смеси присутствует только АДФ, то в составе продукта реакции обнаруживается только адениловая кислота; такой продукт называется полиадениловой кислотой или сокращенно поли(А). Тем же способом можно синтезировать поли(У), поли(Ц) и поли(Г). Если в реакционной смеси присутствует два разных дифосфата или более, то образуются сополимеры, например поли(АУ), поли(АЦ), поли(ЦУ) или поли(АЦУ). Во всех этих смешанных полимерах последовательность оснований имеет случайный характер и частота различных динуклеотидов (частота ближайших соседей) определяется только относительными концентрациями исходных реагентов. Так, если концентрация А в 2 раза больше концентрации У, то последовательность оснований в поли(АУ) может иметь следующий вид: УААУАУААУАЛУААААУАУУ и т. д.

Почти все такие синтетические полимеры способны соединяться с рибосомами и функционировать в качестве матриц. Некоторые полимеры обнаруживают низкую матричную активность. Это, однако, не обязательно означает, что в них отсутствуют функциональные последовательности нуклеотидов (кодоны). Их слабая активность может объясняться тем, что почти все основания в них спарены и это лишает их возможности связываться с рибосомами.

ПОЛИ(У) КОДИРУЕТ ПОЛИФЕНИЛАЛАНИН

Поли(У) был первым синтетическим полирибонуклеотидом, у которого удалось обнаружить матричную активность. Основания в этом полимере в водных растворах не спарены, и потому поли(У) легко соединяется со свободными рибосомами. Он избирательно связывается с молекулами $тРНК^{Фен}$ и определяет синтез полипептидных цепей, состоящих только из остатков фенилаланина, т. е. представляющих собой полифенилаланин. Этим доказывается, что кодон для фенилаланина построен из трех остатков уридиловой кислоты (УУУ) (кодовое число 3 было получено в генетических экспериментах, описанных в гл. 10). Подобным же образом на основе опытов с поли(Ц) и поли(А) было установлено, что кодоном для пролина служит триплет ЦЦЦ, а для лизина — ААА. К сожалению, остатки гуанина в поли(Г) прочно связываются между собой водородными связями, образуя трехцепочечные спирали, не способные соединяться с рибосомами. Поэтому эксперимент такого типа не позволяет выявить функциональный характер кодона ГГГ.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОПОЛИМЕРОВ ПОЗВОЛЯЕТ ВЫЯВИТЬ СОСТАВ КОДОНОВ

В молекулу поли(АЦ) может входить восемь разных кодонов: ЦЦЦ, ЦЦА, ЦАЦ, АЦЦ, ЦАА, АЦА, ААЦ и ААА. Их количественное соотношение зависит от отношения А/Ц. В бесклеточной системе, присоединяясь к рибосомам, сополимер АЦ, кроме пролина (ЦЦЦ) и лизина (ААА), стимулирует также включение аспарагина, глутамина, гистидина и треонина. Величина включения этих аминокислот тоже зависит от отношения А/Ц в полимере. Поскольку сополимер АЦ, содержащий больше А, чем Ц, стимулирует включение аспарагина в значительно большей степени, чем включение гистидина, мы приходим к выводу, что кодон аспарагина состоит из двух А и одного Ц, а кодон гистидина — из двух Ц и одного А (табл. 13-2). Такие же эксперименты с другими сополимерами позволили определить еще ряд кодонов. Однако эксперименты этого рода не дают возможности выявить порядок оснований в триплете. Мы знаем, например, что кодон для гистидина содержит 2Ц и 1А, но мы не можем определить, какое из трех возможных сочетаний этого типа — ЦЦА, ЦАЦ или АЦЦ — является истинным кодоном, так как последовательность нуклеотидов в сополимере имеет случайный характер. Более того, делать выводы на основе слабого включения очень трудно, а потому некоторые кодоны были вообще определены неверно. Опыты с поли(АУ) (1 : 5) показали, например, что лизин кодируется не только кодоном ААА, но и кодоном, содержащим 2А и 1У. Между тем новейшие эксперименты (см. ниже) явно свидетельствуют против присутствия У в каком бы то ни было из кодонов лизина.

Таблица 13-2 Включение аминокислот в белки [1])

Аминокислота	Наблюдаемое включение	Предположительные кодоны	Рассчитанная частота триплетов				Сумма рассчитанных частот триплетов
			3А	2А1Ц	1А2Ц	3Ц	
Поли(АЦ) (5 : 1)							
Аспарагин	24	2А1Ц		20			20
Глутамин	24	2А1Ц		20			20
Гистидин	6	1А2Ц			4,0		4
Лизин	100	3А	100				100
Пролин	7	1А2Ц					
		3Ц			4,0	0,8	4,8
Треонин	26	2А1Ц,					
		1А2Ц		20	4,0		24
Поли(АЦ) (1 : 5)							
Аспарагин	5	2А1Ц		3,3			3,3
Глутамин	5	2А1Ц		3,3			3,3
Гистидин	23	1А2Ц			16,7		16,7
Лизин	1	3А	0,7				0,7
Пролин	100	1А2Ц,					
		3Ц			16,7	83,3	100
Треонин	21	2А1Ц					
		1А2Ц		3,3	16,7		20

[1]) Включение аминокислот в белки наблюдали после добавления статистических сополимеров АЦ в бесклеточному экстракту (см. подпись под рис. 12-1). Включение каждой аминокислоты выражено в процентах от максимального. Отношение А/Ц в сополимере было использовано для вычисления частоты распределения данного кодона в полинуклеотиде. Относительные частоты этих кодонов являются функцией вероятности того, что какой-либо определенный нуклеотид занимает данное положение в кодоне. Если, например, А:Ц = 5 : 1, то ААА/ААЦ = (5×5×5) : (5×5×1) = 125 : 25. Поэтому, приняв частоту для кодона 3А за 100, мы получаем для кодона 2А1Ц величину, равную 20. Предположительные кодоны можно определить, исходя из относительных величин включения аминокислот и рассчитанных частот кодонов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НУКЛЕОТИДОВ В КОДОНАХ ПО СПЕЦИФИЧЕСКОМУ СВЯЗЫВАНИЮ СООТВЕТСТВУЮЩИХ тРНК

В 1964 г. был разработан прямой метод для определения последовательности нуклеотидов в некоторых кодонах. Этот метод основывается на том, что комплексы мРНК—рибосома могут связывать молекулы тРНК в отсутствие белкового синтеза. Например, при смешении поли(У) с рибосомами образовавшийся комплекс будет присоединять только фенилаланиновую тРНК. Соответственно связывание поли(Ц) с рибосомой стимулирует присоединение пролиновой тРНК. Наиболее важно в этом феномене то, что для такого специфического связывания тРНК не требуется присутствия длинных цепей мРНК; достаточно взаимодействия рибосомы с соответствующим *триплетом*. Добавление к рибосоме тринуклеотида УУУ обеспечивает специфическое связывание фенилаланиновой тРНК, а добавление тринуклеотида ААА — связывание лизиновой тРНК. Обнаружение этого эффекта открыло путь для относительно легкого определения последовательности нуклеотидов во многих кодонах. До этого открытия казалось очевидным, что такое определение не удастся провести до тех пор, пока химики-органики не научатся синтезировать длинные полинуклеотиды с регулярно повторяющимися последовательностями. Но теперь стало ясно, что использование триплетов с известной последовательностью оснований дает возможность установить последовательность нуклеотидов во многих кодонах. Выяснилось, например, что тринуклеотиды $^{5'}$ГУУ$^{3'}$, $^{5'}$УГУ$^{3'}$ и $^{5'}$УУГ$^{3'}$ стимулируют присоединение соответственно валиновой, цистеиновой и лейциновой тРНК. В результате интенсивной работы были синтезированы все возможные 64 триплета в надежде на то, что с их помощью удастся расшифровать последовательность в большин-

Таблица 13-3 Связывание специфической тРНК комплексом триплет—рибосома

Триплет	Связываемая тРНК
5'УУУ3' УУЦ	Фенилаланиновая
УУА УУГ ЦУУ ЦУЦ ЦУА ЦУГ	Лейциновая
ААУ АУЦ АУА	Изолейциновая
АУГ	Метиониновая
ГУУ ГУЦ ГУА ГУГ УЦУ	Валиновая
УЦУ УЦЦ УЦА УЦГ	Серииовая
ЦЦУ ЦЦЦ ЦЦА ЦЦГ	Пролиновая
ААА ААГ	Лизиновая
УГУ УГЦ	Цистеиновая
ГАА ГАГ	тРНК глутаминовой кислоты

стве кодонов. В табл. 13-3 приведены некоторые кодоны, установленные таким путем. Следует, однако, отметить, что этим методом, видимо, невозможно определить все правильные комбинации, так как некоторые триплетоиды связываются с тРНК значительно менее эффективно, чем УУУ или ГУУ, и это не позволяет решить, кодируют они какую-либо аминокислоту или нет.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НУКЛЕОТИДОВ В КОДОНАХ С ПОМОЩЬЮ РЕГУЛЯРНЫХ СОПОЛИМЕРОВ

Одновременно с описанным выше методом был предложен и еще один метод расшифровки кодонов. Он основан на использовании синтетических полирибонуклеотидов с известными повторяющимися последовательностями, которые удалось приготовить благодаря комбинированию методов органического и ферментативного синтеза. Эти регулярные сополимеры обеспечивают специфическое включение аминокислот в полипептиды. Выяснилось, например, что повторяющаяся последовательность ЦУЦУЦУЦУ... действует, как мРНК для синтеза регулярного полипептида, в котором чередуются аминокислоты лейцин и серин, последовательность УГУГУГ... стимулирует синтез полипептида, содержащего аминокислоты цистеин и валин, а полимер АЦАЦАЦ... направляет синтез полипептида из чередующихся аминокислот треонина и гистидина (табл. 13-4). Использование в качестве матрицы сополимера, построен-

Таблица 13-4 Определение последовательности нуклеотидов в кодонах с помощью регулярных сополимеров, построенных из двух разных оснований

Сополимер	Включение аминокислот	Кодон
ЦУЦ | УЦУ | ЦУЦ . . .	Лейцин	5'ЦУЦ3'
	Серин	УЦУ
УГУ | ГУГ | УГУ . . .	Цистеин	УГУ
	Валин	ГУГ
АЦА | ЦАЦ | АЦА . . .	Треонин	АЦА
	Гистидин	ЦАЦ
АГА | ГАГ | АГА . . .	Аргинин	АГА
	Глутамин	ГАГ

Таблица 13-5 Определение последовательности нуклеотидов в кодонах с помощью полимеров, состоящих из повторяющихся тринуклеотидов

Сополимер	Считываемый кодон	Образующийся полипептид	Кодон
$(ААГ)_n$	ААГ | ААГ | ААГ . . .	Полилизин	5'ААГ3'
	АГА | АГА | АГА . . .	Полиаргинин	АГА
	ГАА | ГАА | ГАА . . .	Полиглутаминовая кислота	ГАА
$(УУЦ)_n$	УУЦ | УУЦ | УУЦ . . .	Полифенилаланин	УУЦ
	УЦУ | УЦУ | УЦУ . . .	Полисерин	УЦУ
	ЦУУ | ЦУУ | ЦУУ . . .	Полилейцин	ЦУУ
$(УУГ)_n$	УУГ | УУГ | УУГ . . .	Полилейцин	УУГ
	УГУ | УГУ | УГУ . . .	Полицистеин	УГУ
	ГУУ | ГУУ | ГУУ . . .	Поливалин	ГУУ

Таблица 13-6 Определение последовательности нуклеотидов в кодонах с помощью полимеров, состоящих из повторяющихся тетрануклеотидов

Сополимер	Включение аминокислот	Кодон
УАУ ЦУА УЦУ АУЦ УАУ...	Тирозин	5'УАУ3'
	Лейцин	ЦУА
	Серин	УЦУ
	Изолейцин	АУЦ
УУА ЦУУ АЦУ УАЦ УУА...	Лейцин	УУА
	Лейцин	ЦУУ
	Треонин	АЦУ
	Тирозин	УАЦ

Таблица 13-7 Генетический код

Первое положение (5'-конец)	Второе положение				Третье положение (3'-конец)
	У	Ц	А	Г	
У	Фен	Сер	Тир	Цис	У
	Фен	Сер	Тир	Цис	**Ц**
	Лей	Сер	Терм [1])	Терм [1])	А
	Лей	Сер	Терм [1])	Три	**Г**
Ц	Лей	Про	Гис	Арг	У
	Лей	Про	Гис	Арг	**Ц**
	Лей	Про	Глн	Арг	А
	Лей	Про	Глн	Арг	Г
А	Иле	Тре	Асп	Сер	У
	Иле	Тре	Асп	Сер	Ц
	Иле	Тре	Лиз	Арг	А
	Мет	Тре	Лиз	Арг	Г
Г	Вал	Ала	Асп	Гли	У
	Вал	Ала	Асп	Гли	**Ц**
	Вал	Ала	Глу	Гли	А
	Вал	Ала	Глу	Гли	Г

[1]) Терминация цепи (раньше этот кодон называли нонсенс-кодоном).

ного из повторяющейся тринуклеотидной последовательности ААГ (ААГААГААГ), приводит к синтезу трех типов полипептидов: полилизина, полиаргинина и полиглутаминовой кислоты. Образование в этом опыте цепей трех типов показывает, что рибосомы прикрепляются к матрице случайным образом и одинаково эффективно начинают считывание с кодонов ААГ, АГА и ГАА. Так же ведет себя поли(АУЦ)$_n$, служащий матрицей для синтеза полиизолейцина, полисерина и политистидина. В настоящее время исследовано множество таких сополимеров; полученные результаты приведены в табл. 13-5. Лишь несколько полимеров, построенных из повторяющихся тетрануклеотидных последовательностей, было использовано в опытах по определению кодонов. Данные, полученные для двух таких полимеров, приведены в табл. 13-6. Совокупность всех этих наблюдений позволяет окончательно установить, какие аминокислоты кодирует 61 из 64 возможных кодонов. Остальные три кодона кодируют терминацию цепи (табл. 13-7).

ВЫРОЖДЕННОСТЬ КОДА

Для многих аминокислот имеется более одного кодона (вырожденность кода). Так, например, фенилаланин кодируется триплетами УУУ и УУЦ, а серин — триплетами УЦУ, УЦЦ, УЦА, УЦГ, АГУ и АГЦ. Имеющиеся данные говорят о том, что когда первые два нуклеотида в таких кодонах совпадают, то третьим может быть либо цитозин, либо урацил —«смысл»

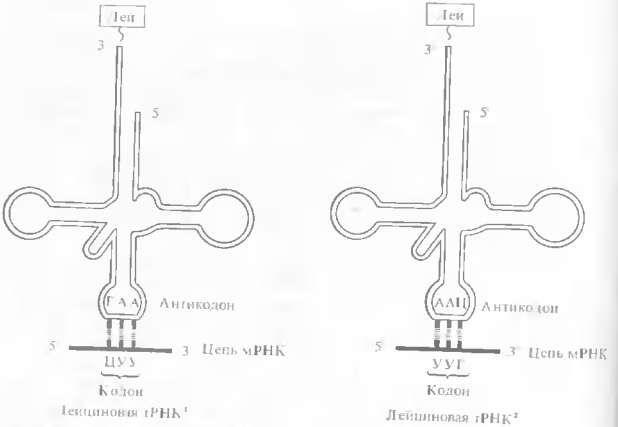


Рис. 13-4. Молекулы двух разных тРНК, акцептирующих остатки лейцина.
Каждая из них узнает свое кодовое слово.

кодона в обоих случаях будет одинаков. Аденин и гуанин часто оказываются также взаимозаменяемыми. Однако, по-видимому, не все виды вырожденности основаны на эквивалентности первых двух нуклеотидов. Например, лейцину, по всей вероятности, соответствуют не только триплеты УУА и УУГ, но также и ЦУУ, ЦУЦ, ЦУА и ЦУГ (рис. 13-4).

Вырожденность кодонов, особенно вырожденность, которая обусловлена часто встречающейся эквивалентностью цитозина и урацила или гуанина и аденина, стоящих в третьем положении, является причиной того, что соотношение А + Г/Г + Ц сильно варьирует в разных организмах (см. гл. 9). Это, однако, не вызывает соответствующих изменений в соотношении различных аминокислот в этих организмах. Первоначально этому сходству в аминокислотном составе не придавали большого значения, так как считали, что оно отражает сходство последовательностей только тех генов, которые кодируют белки, присутствующие в организмах в больших количествах. Однако анализ ряда индивидуальных белков показал, что между аминокислотным составом и эволюционным положением того или иного организма нет никакой корреляции, откуда следует, что приведенное выше объяснение несоответствия между нуклеотидным и аминокислотным составом организмов является несостоятельным.

Вначале предполагалось также, что для каждого кодона существует свой антикодон. Если бы это действительно было так, то должна была бы существовать 61 различная тРНК и, возможно, еще 3 тРНК для терминирующих кодонов. Однако вскоре стали появляться данные, свидетельствующие о том, что высокоочищенные тРНК с известной последовательностью (например, аланин-тРНК) могут узнавать несколько различных кодонов. Было обнаружено также несколько случаев, когда в состав антикодона входило основание, являющееся не одним из обычных четырех оснований, а пятым основанием — гипоксантином. Подобно всем другим минорным основаниям тРНК, гипоксантин возникает в результате ферментативной модификации одного из оснований в уже готовой молекуле тРНК. Таким предшественником является аденин, который превращается в гипоксантин при дезаминировании 6-го углеродного атома и образовании 6-кетогруппы.

«КАЧАНИЯ» В АНТИКОДОНЕ

Для объяснения всех этих наблюдений была предложена *гипотеза «качаний»* (wobble). Она основывается на том, что 5′-концевое основание антикодона не так жестко фиксировано в пространстве, как два других, и благодаря этому может образовывать водородные связи с одним из нескольких оснований, расположенных на 3′-конце кодона. Существуют определенные ограничения при образовании таких пар оснований, возможные варианты спаривания приведены в табл. 13-8. Например, У в третьем (качающемся)

Таблица 13-8 Возможные комбинации пар оснований, образующиеся согласно гипотезе качаний

Основание антикодона	Основание кодона
Г	У или Ц
Ц	Г
А	У
У	А или Г
И	А, У или Ц

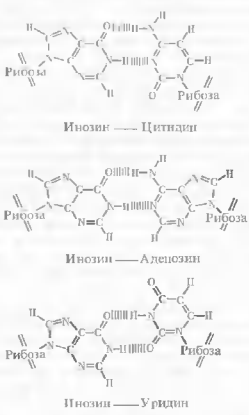
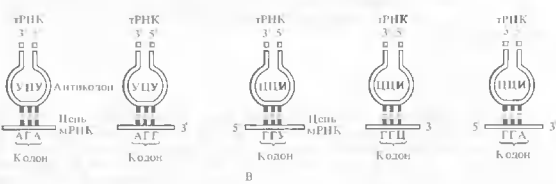


Рис. 13-5. Спаривание оснований, обусловленное «качаниями» при взаимодействии кодона и антикодона.
А. Благодаря «качанию» основания, занимающего третье положение в антикодоне, водородные связи могут образоваться между такими основаниями, которые обычно не спариваются друг с другом. *Б.* У, стоящее в третьем положении в антикодоне, может спариваться с А или Г. *В.* И в третьем положении может спариваться с У, Ц или А.



положении может спариваться с аденином и гуанином, а И может спариваться с У, Ц и А (рис. 13-5). Эти правила не позволяют ни одной молекуле тРНК узнавать 4 различных кодона, а три кодона могут быть узнаны только в том случае, если третье положение в антикодоне занимает инозин.

Практически все имеющиеся данные подтверждают гипотезу качаний. Например, она правильно предсказала, что для шести кодонов серина (УЦУ, УЦЦ, УЦА, УЦГ, АГУ и АГЦ) должно существовать по меньшей мере 3 различные тРНК. Две другие аминокислоты, вырожденные кодоны которых различаются по первому или второму положению (лейцин и аргинин), также должны иметь различные тРНК для каждого набора кодонов.

В молекуле дрожжевой фенилаланиновой тРНК, трехмерная структура которой была недавно установлена, все основания антикодона направлены в пространстве примерно одинаково, причем их точная конформация определяется в основном стэкинг-взаимодействиями между их плоскими поверхностями. Можно предположить, что третье основание антикодона закреплено менее жестко, чем два других основания,— следовательно, основание в третьем положении качается! Это утверждение, однако, еще далеко не доказано; строгое доказательство будет получено только после того, как станут известны пространственные структуры еще нескольких тРНК (и к тому же с бо́льшим разрешением, чем то, которое было достигнуто для дрожжевой фенилаланиновой тРНК).

Хотя качания позволяют данному основанию узнавать несколько оснований, эффективность их связывания между собой сильно варьирует. Таким образом, можно предположить, что если для данного кодонового слова не существует тРНК, которая хорошо связывалась бы с ним, то соответствующая аминокислота включается в белок с низкой скоростью. Если это предположение подтвердится, то это будет означать, что скорость синтеза данного белка регулируется в какой-то мере тем, какими кодонами зашифрована его аминокислотная последовательность (гл. 14).

МИНОРНЫЕ тРНК

Иногда несколько химически различающихся форм тРНК обладают одним и тем же антикодоном. Часто единственное различие между двумя формами — это присутствие или отсутствие 3′-концевой адениловой кислоты. Внутри клетки это различие является временным, так как имеется фермент, присоединяющий концевые остатки адениловой кислоты к тем молекулам, которые их не содержат. Почему некоторые молекулы тРНК не имеют 3′-концевых остатков, остается пока совершенно загадочным. Возможно, что их отсутствие — это результат случайного действия экзонуклеазы, в таком случае «присоединяющий» фермент выполняет функцию исправления повреждений. В то же время можно предположить, что отсутствие концевых остатков связано каким-то образом с регуляцией общей скорости синтеза белка, поскольку неполные молекулы не могут акцептировать соответствующие аминокислоты.

Гораздо более загадочны случаи, когда у двух тРНК, содержащих один и тот же антикодон, имеются различия во внутренней части их нуклеотидных последовательностей, причем одна из разновидностей присутствует в огромном количестве по сравнению с другой. Например, существуют основная и минорная (т. е. присутствующая в малых количествах) тирозиновые тРНК, обе они несут антикодон $^{3'}$АУГ$^{5'}$. Возможность образования минорного компонента путем ферментативной модификации основного компонента после завершения транскрипции исключается из-за характера различий в последовательностях. Такие модификации не могут возникнуть в результате каких-либо известных ферментативных превращений. Роль, которую играют в норме эти минорные разновидности тРНК, остается неизвестной, но, как мы увидим дальше, они нередко участвуют в супрессии генов.

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ КОДОНОВ В ПРИРОДНЫХ мРНК

В связи с тем что большинство аминокислот кодируется более чем одним кодоном, возникает вопрос о том, используются ли альтернативные кодоны с равной частотой или же некоторые из них встречаются в мРНК чаще, чем другие. Если в молекуле мРНК содержатся неодинаковые количества

Таблица 13-9 Установленные кодоны РНК фага MS2. Более половины представленных здесь кодонов кодируют аминокислоты в полностью расшифрованной последовательности белка оболочки. Остальные кодоны используются для кодирования некоторых последовательностей белка «А» и рецепказы

	У	Ц	А	Г	
У	Фен 10	Сер 13	Тир 8	Цис 7	У
	Фен 13	Сер 10	Тир 13	Цис 4	Ц
	Лей 11	Сер 10	Терм 1	Терм	А
	Лей 4	Сер 13	Терм 1	Трп 14	Г
Ц	Лей 10	Про 7	Гис 4	Арг 13	У
	Лей 14	Про 3	Гис 4	Арг 11	Ц
	Лей 13	Про 6	Глн 10	Арг 6	А
	Лей 6	Про 5	Глн 16	Арг 4	Г
А	Иле 8	Тре 14	Асн 11	Сер 4	У
	Иле 16	Тре 10	Асн 23	Сер 8	Ц
	Иле 7	Тре 8	Лиз 12	Арг 8	А
	Мет 15	Тре 5	Лиз 17	Арг 6	Г
Г	Вал 13	Ала 19	Асп 18	Гли 17	У
	Вал 12	Ала 12	Асп 11	Гли 11	Ц
	Вал 11	Ала 14	Глу 9	Гли 4	А
	Вал 10	Ала 8	Глу 14	Гли 4	Г

Таблица 13-10 Кодоны, установленные в ходе предварительной работы по расшифровке лактозной, галактозной и триптофановой мРНК *E. coli*, мРНК фагов ϕX, F1 и T4 и гемоглобиновой мРНК

	У	Ц	А	Г	
У	Фен 2	Сер 1	Тир	Цис	У
	Фен	Сер	Тир 2	Цис	Ц
	Лей	Сер 2	Терм 1	Терм 1	А
	Лей	Сер	Терм	Трп	Г
Ц	Лей 1	Про	Гис 1	Арг	У
	Лей	Про	Гис 1	Арг 1	Ц
	Лей	Про 1	Глн 2	Арг	А
	Лей 3	Про 1	Глн 2	Арг	Г
А	Иле 4	Тре 1	Асн 1	Сер 2	У
	Иле	Тре 2	Асн	Сер 2	Ц
	Иле	Тре 1	Лиз 2	Арг 1	А
	Мет 5	Тре 2	Лиз	Арг	Г
Г	Вал 3	Ала	Асп 1	Гли 3	У
	Вал	Ала	Асп	Гли	Ц
	Вал	Ала	Глу 3	Гли 1	А
	Вал	Ала	Глу	Гли 1	Г

четырех оснований, то ясно, что в этом случае может наблюдаться некоторое отклонение от равномерного распределения равнозначных кодонов. Например, мы можем ожидать, что в организмах с АТ-богатой ДНК в мРНК чаще всего будут встречаться кодоны с У или А в третьем положении. В настоящее время наиболее полно изучена встречаемость кодонов в РНК фага MS2, которая содержит примерно одинаковое количество четырех оснований. Для этой РНК удалось точно идентифицировать

420 кодонов. Рассмотрение этих данных (табл. 13-9) не позволяет сделать вывод о предпочтительном использовании каких-либо определенных кодонов. Хотя некоторые кодоны встречаются несколько чаще, чем другие, альтернативные кодоны, в большинстве случаев нет оснований считать, что наблюдаемое предпочтение выходит за рамки случайного. Когда станет известна полная последовательность РНК фага MS2 (3000 оснований), ответ на заданный выше вопрос будет в меньшей степени зависеть от обычных статистических флуктуаций.

Гораздо меньше данных имеется о ДНК-содержащих хромосомах по сравнению с РНК-содержащими. В табл. 13-10 перечислены кодоны, встречающиеся в различных мРНК бактерий и ДНК-содержащих вирусов. Хотя на первый взгляд кажется, что для этих кодонов наблюдается заметное отклонение от случайного распределения, для окончательного выяснения этого вопроса необходимо получить значительно большее количество данных, чем то, которым мы располагаем в настоящее время.

АУГ И ГУГ ИГРАЮТ РОЛЬ ИНИЦИИРУЮЩИХ КОДОНОВ

Открытие тРНК, специфичной для *N*-формилметионина ($тРНК^{Ф\text{-}Мет}$), дало основание предположить вначале, что она узнает кодон, отличный от кодона метионина АУГ. Однако это предположение с самого начала казалось сомнительным, так как все кодоны были уже установлены и среди них не было ни одного, который мог бы специфически связываться с $тРНК^{Ф\text{-}Мет}$. При расшифровке последовательности $тРНК^{Ф\text{-}Мет}$ было показано, что ее антикодон $^{3'}$УАЦ$^{5'}$ идентичен антикодону $тРНК^{Мет}$ (рис. 12-20). Следовательно, АУГ должен кодировать как формилметионин, так и метионин. Распознавание этих аминокислот осуществляется благодаря их различному связыванию с фактором инициации и фактором элонгации. Только $тРНК^{Ф\text{-}Мет}$ может связываться с факторами инициации и рибосомной 30S-субчастицей, что приводит к образованию инициирующего комплекса. Соответственно только $тРНК^{Мет}$ способна связываться с фактором элонгации EF-T на стадии наращивания полипептидной цепи.

Ситуация еще более осложнилась, когда на основании результатов, полученных в опытах in vitro при исследовании регулярных сополимеров в качестве матриц, было сделано предположение, что $тРНК^{Ф\text{-}Мет}$ инициирует синтез белка, связываясь не только с кодоном АУГ, но и с кодоном ГУГ. ГУГ служит обычно кодоном валина. То, что его узнает $тРНК^{Ф\text{-}Мет}$, заставляет предположить, что в антикодоне $тРНК^{Ф\text{-}Мет}$ существует особый вид «качания», при котором некоторая пара оснований образуется в первом положении, а не в третьем, как обычно. Возможно, причина этого кроется в одной особенности, которая характерна для последовательности $тРНК^{Ф\text{-}Мет}$. Дело в том, что рядом с 3′-концевым нуклеотидом антикодона в этой тРНК стоит немодифицированный аденин вместо объемистого алкилированного производного, которое находится почти во всех других тРНК.

Хотя вначале предполагалось, что ГУГ может быть инициирующим кодоном только в искусственных условиях опытов in vitro, данные, полученные в последнее время при расшифровке нуклеотидных последовательностей, показывают, что ГУГ является, например, начальным кодоном для синтеза А-белка на молекуле РНК фага MS2. Более того, оказалось, что ГУГ инициирует синтез белка и в том случае, если нормальный начальный кодон АУГ был утрачен в результате генетической делеции. Поскольку в опытах in vitro ГУГ в качестве стартового сигнала действует гораздо менее эффективно, чем АУГ, можно предположить, что благодаря его

более низкому сродству к $тРНК^{Ф\text{-}Мет}$ он участвует в регуляции уровня функционирования данного гена. Конечно, необходимо изучить значительно большее число генов, чтобы роль ГУГ как инициирующего кодона стала более понятной.

КОДОНЫ ТЕРМИНАЦИИ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ

Три кодона — УАА, УАГ и УГА — не соответствуют никакой аминокислоте. Они обозначают конец цепи. Как показано в главе 12, эти кодоны считываются не особыми терминирующими тРНК, а специальными белками, которые называются факторами освобождения. К настоящему времени идентифицированы два таких фактора, каждый из которых узнает два кодона. Один фактор специфичен для УАА и УАГ, другой — для УАА и УГА. Чтобы понять, каким образом каждый из факторов освобождения узнает два различных кодона, необходимо получить детальную информацию об их трехмерной структуре. В связи с тем что для считывания стоп-сигналов используются белки, следует подчеркнуть один факт, который игнорируют многие биохимики. Специфические группы в полинуклеотидной цепи, образующие водородные связи, могут быть узнаны теми аминокислотами, которые также способны к образованию водородных связей.

МАТРИЦЫ ДЛЯ СИНТЕЗА ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ МОГУТ ЗАКАНЧИВАТЬСЯ ОДНИМ ИЛИ ДВУМЯ ТЕРМИНИРУЮЩИМИ КОДОНАМИ

Пока совершенно неясно, для чего существует три различных терминирующих кодона. Возникло множество предположений по поводу того, какие из них используются преимущественно. Поэтому все с нетерпением ожидали результатов расшифровки нуклеотидных последовательностей концов настоящих генов. Однако картина не прояснилась и после того, как были получены (весной 1975 г.) предварительные данные примерно о десяти таких стоп-сигналах. Существуют гены, в которых используется один терминирующий кодон; в то же время в некоторых случаях гены оканчиваются двумя последовательными стоп-сигналами (рис. 13-6). Использование второго терминирующего кодона может служить своего рода предохранителем в тех редких случаях, когда по какой-либо причине первый кодон перестает действовать. По неясно, почему этот механизм используется только в некоторых случаях. Например, в РНК-содержащих фагах гомологичные гены белка оболочки оканчиваются либо одним (фаг Qβ), либо двумя (фаги R17 и MS2) терминирующими кодонами.

МУТАЦИИ, ИЗМЕНЯЮЩИЕ СМЫСЛ КОДОНА ИЛИ ДЕЛАЮЩИЕ ЕГО БЕССМЫСЛЕННЫМ

Изменение кодона, кодирующего данную аминокислоту, на кодон, кодирующий другую аминокислоту, называется *мутацией, изменяющей смысл* (*миссенс-мутацией*). Вместе с тем существуют мутации, приводящие к превращению кодона в терминирующий кодон. Их называют *бессмысленными мутациями* (*нонсенс-мутациями*). Поскольку существует только три терминирующих кодона, большинство мутаций, происходящих путем замены одного основания, являются, очевидно, мутациями, меняющими смысл, а не бессмысленными мутациями. Мутации, изменяющие смысл, вызывают замену аминокислоты только в каком-нибудь одном положении

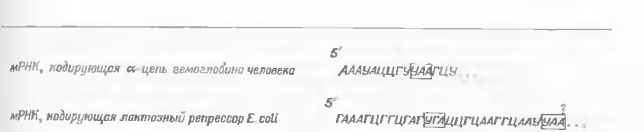


Рис. 13-6. 3′-концевые нуклеотидные последовательности некоторых мРНК, содержащие один или два терминирующих кодона (обведены рамкой), которые служат сигналами для остановки трансляции соответствующих белков.

полипептидной цепи. Образующиеся при этом измененные белки часто в какой-то мере сохраняют биологическую активность, присущую исходным белкам. Примером таких измененных белков могут служить аномальные гемоглобины (гл. 4).

Замены аминокислот в мутантных гемоглобинах (табл. 13-11) подтверждают мысль о том, что такие мутации возникают в результате заме-

Таблица 13-11 Примеры возможных изменений в кодонах, которые могут обусловливать замены аминокислот в мутантных гемоглобинах

Аминокислота в нормальном гемоглобине	Аминокислота в мутантном гемоглобине	
Лизин (ААА)	→ Глутаминовая кислота (ГАА)	А → Г
Глутаминовая кислота (ГАА)	→ Глутамин (ЦАА)	Г → Ц
Глицин (ГГУ)	→ Аспарагиновая кислота (ГАУ)	Г → А
Гистидин (ЦАУ)	→ Тирозин (УАУ)	Ц → У
Аспарагин (ААУ)	→ Лизин (ААА)	У → А
Глутаминовая кислота (ГАА)	→ Валин (ГУА)	А → У
Глутаминовая кислота (ГАА)	→ Лизин (ААА)	Г → А
Глутаминовая кислота (ГАА)	→ Глицин (ГГА)	А → Г

Таблица 13-12 Замены аминокислот, индуцированные в белке BTM азотистой кислотой [1])

Пролин (ЦЦЦ)	→ Серин (УЦЦ)	Ц → У
Пролин (ЦЦЦ)	→ Лейцин (ЦУЦ)	Ц → У
Изолейцин (АУУ)	→ Валин (ГУУ)	А → Г
Изолейцин (АУА)	→ Метионин (АУГ)	А → Г
Лейцин (ЦУУ)	→ Фенилаланин (УУУ)	Ц → У
Глутаминовая кислота (ГАА)	→ Глицин (ГГА)	А → Г
Треонин (АЦА)	→ Изолейцин (АУА)	Ц → У
Треонин (АЦГ)	→ Метионин (АУГ)	Ц → У
Серин (УЦУ)	→ Фенилаланин (УУУ)	Ц → У
Серин (УЦГ)	→ Лейцин (УУГ)	Ц → У
Аспарагиновая кислота (ГАЦ)	→ Глицин (ГГЦ)	А → Г

1) Все обнаруженные замены согласуются с возможными последовательностями нуклеотидов в кодонах и с теми изменениями, которые, как предполагают, вызывает обработка азотистой кислотой (Ц → У; А → Г).

щения одного нуклеотида. Тот же вывод напрашивается и при рассмотрении многочисленных замен в мутантных белках ВГМ (табл. 13-12). Более того, об этом же свидетельствует и тот факт, что в белках встречаются лишь определенные замены аминокислот (например, замена глицина аспарагиновой кислотой); если бы большинство наблюдаемых мутаций затрагивало несколько соседних нуклеотидов, то, несомненно, наблюдалось бы большее разнообразие в заменах аминокислот.

БЕССМЫСЛЕННЫЕ МУТАЦИИ ВЫЗЫВАЮТ ОБРАЗОВАНИЕ НЕПОЛНЫХ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ

Когда бессмысленная мутация возникает в середине генетической матрицы, от рибосомы отделяется неполный полипептид, образующийся в результате преждевременной терминации цепи. Чаще всего эти неполные цепи не обладают биологической активностью (например, ферментативной активностью), что позволяет легко обнаружить большинство бессмысленных мутаций, затронувших жизненно важные гены. Наоборот, мутации, изменяющие смысл, обычно не обнаруживаются при отборе, так как они приводят в большинстве случаев к образованию белков, которые сохраняют некоторую биологическую активность. Таким образом, значительная часть *обнаруживаемых* мутаций, вызванных обработкой каким-либо мутагеном, относится к категории бессмысленных мутаций.

Размер образующейся неполной полипептидной цепи зависит от расположения бессмысленной мутации в гене. Мутации, возникшие вблизи начала гена, приводят к образованию очень коротких фрагментов. Если же мутация расположена недалеко от конца гена, то образуется фрагмент почти нормальной длины, который может обладать некоторой биологической активностью. Это позволяет точно установить положение мутации внутри данного гена. Выделение ряда неполных фрагментов и измерение их длины дают возможность однозначно определить те участки в гене, где произошли соответствующие мутации.

В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ СИНТЕЗА БЕЛКА ПРИ СЧИТЫВАНИИ МАТРИЦЫ МОГУТ ПРОИСХОДИТЬ ОШИБКИ

Наблюдения действительно показывают, что в определенных условиях в бесклеточной системе очень часто происходят ошибки при считывании кода. Вскоре после того, как выяснилось, что поли(У) кодирует синтез полифенилаланина, было отмечено парадоксальное явление: в отсутствие фенилаланина под действием поли(У) синтезировался полилейцин. Это означало, что кодон УУУ отбирает молекулы лейциновой тРНК. Чтобы объяснить это, первоначально допускали возможность неоднозначности кодона УУУ. Однако теперь доказано, что аномальное включение лейцина обусловливается высокой концентрацией ионов Mg^{2+} в инкубационной среде. Когда концентрацию ионов Mg^{2+} снижают, включение лейцина под действием поли(У) оказывается значительно менее выраженным. Этот результат очень важен, так как он подчеркивает необходимость создания нормальных физиологических условий в экспериментах с бесклеточными системами. Только это дает возможность на основе полученных данных судить о событиях, происходящих в нормальной клетке.

ГЕНЫ-СУПРЕССОРЫ НАРУШАЮТ СЧИТЫВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА

Ошибки при считывании генетического кода происходят также и в живых клетках. Именно этими ошибками объясняется явление супрессии. В течение многих лет существование генов-супрессоров казалось совершенной загадкой. Генетики знают много примеров «обращения» различных неблагоприятных мутаций под действием второй мутации. В некоторых случаях природа этого явления проста: это именно *обратная мутация* (*реверсия*), т. е. возврат к исходной структуре гена. Значительно более трудными для понимания оказались другие мутации, тоже подавляющие эффект первичной мутации, но при этом локализующиеся в другом участке хромосомы (т. е. случаи, при которых мутация в участке А подавляется мутацией в участке В). Такие *супрессорные мутации* распадаются на два главных типа: к первому относятся мутации в том же самом гене, но в другом его участке (*внутригенная супрессия*), ко второму — мутации в каком-нибудь другом гене (*межгенная супрессия*). Гены, подавляющие мутации других генов, получили название *генов-супрессоров*.

В настоящее время мы знаем, что проявление обоих типов супрессии в конечном счете одинаково: и в том и в другом случае эффект первичной мутации, обусловившей синтез неактивных белков, снимается потому, что под влиянием второй мутации начинают синтезироваться активные (или частично активные) белки. Если, например, первичная мутация вызывает инактивацию одного из ферментов, участвующих в биосинтезе аргинина, то вторая (супрессорная) восстанавливает этот биосинтез, обеспечивая образование активного фермента. Однако механизмы, с помощью которых внутригенные и межгенные супрессорные мутации восстанавливают синтез активных белков, совершенно различны.

Мутации, которые могут быть обращены под действием супрессоров первого типа, — это по большей части делеции или вставки отдельных

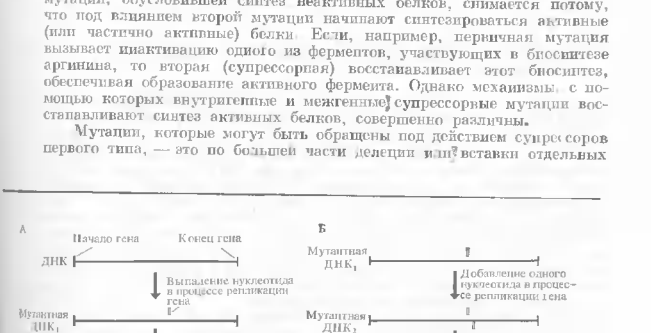


Рис. 13-7. *А*. Влияние выпадения (или добавления) одного нуклеотида на считывание генетической информации. *Б*. Механизм, с помощью которого вторая делеция (или вставка) может подавить эффект первой.

нуклеотидов. В результате делеции или вставки порядок считывания кода нарушается (гл. 10), и все кодоны, следующие за делецией (или вставкой), считываются неправильно, что приводит к появлению новых аминокислотных последовательностей. Реже при сдвиге порядка считывания кода возникают новые, расположенные ближе к началу гена бессмысленные кодоны, и в результате образуются более короткие мутантные полипептиды (рис. 13-7).

Внутригенная супрессия может возникнуть, когда вторая мутация удаляет (или добавляет) новый нуклеотид вблизи первого изменения и таким путем восстанавливает (за пределами вторичного изменения) правильный порядок считывания (рис. 13-7). На участке между двумя мутациями кодоны, конечно, остаются измененными, но поскольку код вырожден, то вполне может случиться так, что все эти измененные кодоны кодируют какие-нибудь аминокислоты. В таком случае не исключено, что будут синтезироваться белки нормального размера, обладающие функциональной активностью.

Внутригенную супрессию могут вызывать также и мутации, изменяющие смысл. В этих случаях благодаря еще одной, новой замене аминокислоты восстанавливается исходная трехмерная конфигурация фермента, нарушенная первой мутацией. Пример такого типа супрессии в системе триптофан-синтазы описан в гл. 8 (рис. 8-13).

ОПРЕДЕЛЕННЫЕ ГЕНЫ-СУПРЕССОРЫ НАРУШАЮТ СЧИТЫВАНИЕ ОПРЕДЕЛЕННЫХ КОДОНОВ

Гены-супрессоры не изменяют нуклеотидную последовательность мутантной ДНК; их действие проявляется в изменении порядка считывания мРНК. У *E. coli* выявлен ряд различных генов-супрессоров. Поскольку каждый из них обусловливает видоизмененное считывание совершенно определенных кодонов, эти гены-супрессоры могут подавлять эффекты лишь незначительной части одиночных нуклеотидных замен в пределах данного гена. Из большого числа мутаций, блокирующих у *E. coli* синтез фермента β-галактозидазы (гл. 14), только несколько процентов будет подавляться данным геном-супрессором (назовем его геном a). Подавляться будут только мутации, затронувшие кодоны, считывание которых специфически нарушается геном a. Ген-супрессор b в свою очередь будет подавлять лишь часть мутаций в β-галактозидазной системе, но теперь это будет уже совершенно иной набор мутаций.

Не раз наблюдалось, что тот или иной супрессор может подавлять мутации в нескольких разных генах. Этот факт легко объяснить, если связать действие супрессора с нарушением считывания. Известно, например, что у некоторых двойных мутантов, неспособных синтезировать аргинин и триптофан, способность к синтезу обеих аминокислот может восстанавливаться в результате одиночной мутации гена-супрессора. В данном случае мы просто должны заключить, что оба первичных нарушения были обусловлены одним и тем же изменением, которое привело к появлению бессмысленного кодона или кодона с измененным смыслом.

В СУПРЕССИИ БЕССМЫСЛЕННЫХ КОДОНОВ УЧАСТВУЮТ МУТАНТНЫЕ тРНК

Для каждого из трех терминирующих кодонов существуют гены-супрессоры. Их действие проявляется в том, что стоп-сигналы, т. е. сигналы, означающие конец полипептидной цепи, начинают считываться так, как если бы это были кодоны каких-либо определенных аминокислот. Имест-

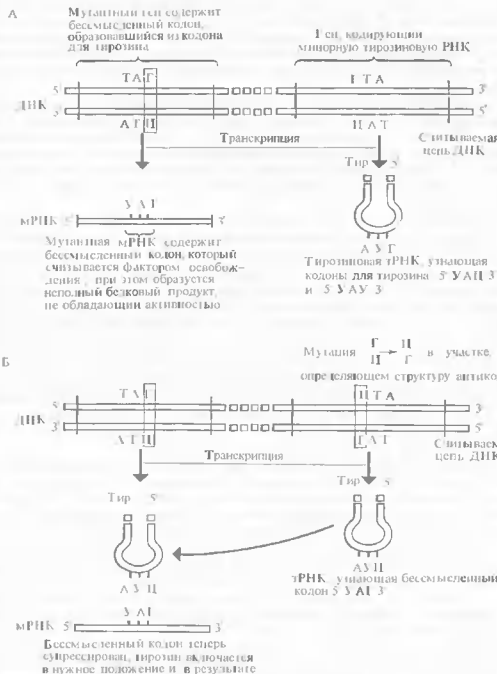


Рис. 13-8. Схема функционирования минорной тирозиновой тРНК в качестве супрессора бессмысленной мутации.

ся, например, три хорошо охарактеризованных гена, супрессирующих кодон УАГ. Под действием одного из этих генов-супрессоров происходит включение серина в то место полипептидной цепи, которое соответствует бессмысленному кодону. Точно так же под действием второго гена-супрессора включается глутамин, а под действием третьего — тирозин. Все три супрессора кодона УАГ действуют благодаря тому, что они вызывают изменения в антикодонах тРНК, специфичных для этих аминокислот.

Например, тирозиновый супрессор возникает в результате мутации в гене $тРНК^{Тир}$, приводящей к изменению нуклеотидной последовательности антикодона: $^{3'}АУГ^{5'}$ изменяется на $^{3'}АУЦ^{5'}$, что дает возможность антикодону узнавать кодон УАГ (рис. 13-8). Супрессия кодона УАА происходит также, по-видимому, при участии мутантных тРНК. Однако вследствие ее малой эффективности мы пока гораздо меньше знаем о ее механизме.

Супрессия УАГ при участии тРНК была впервые продемонстрирована в опытах по изучению бессмысленной мутации, блокирующей синтез белка оболочки РНК-содержащего фага R17. Если РНК мутантного фага, содержащая такой бессмысленный кодон, использовалась в системе трансляции in vitro, то белок оболочки не образовывался до тех пор, пока в систему не добавляли очищенную тРНК из соответствующего супрессорного штамма.

В супрессии кодона УГА также участвуют мутантные молекулы тРНК, в этом случае супрессия осуществляется триптофановой тРНК ($тРНК^{Три}$), которая вставляет триптофан в те места в полинуклеотидной цепи, которые соответствуют бессмысленным кодонам. В норме $тРНК^{Три}$ считывает только кодон УГГ, но в результате супрессорной мутации она приобретает способность считывать также и кодон УГА. К общему удивлению оказалось, что в основе этого изменения лежит не замена основания в антикодоне, а замена Г → А в положении 24. Непонятно, каким образом эта замена приводит к неоднозначности взаимодействия между кодоном и антикодоном, так как рентгеноструктурный анализ $тРНК^{Фен}$ указывает на то, что основание тРНК в положении 24 находится на расстоянии примерно 15 Å от антикодона. Тем не менее мы должны предположить, что антикодон этой супрессорной тРНК часто располагается неправильно в соответствующем ему рибосомном участке связывания.

В связи с открытием супрессии при участии тРНК возникает вопрос о том, каким образом обеспечивается считывание соответствующих нормальных кодонов. В случае тирозинового супрессора кодона УАГ ответом на этот вопрос является обнаружение двух генов, кодирующих в норме тирозиновую тРНК. Один из них кодирует основную тРНК, а другой — тРНК, присутствующую в клетках в гораздо меньшем количестве. Именно в этом гене и происходит супрессорная мутация. Кроме того, было обнаружено, что супрессорные мутации чаще всего происходят в тех штаммах, в которых ген минорной тРНК присутствует в двух копиях. Отбор этих штаммов, в которых произошла дупликация генов, основан на том, что утрата минорной тРНК хотя и не летальна для клетки-хозяина, но замедляет ее рост. Истинная функция минорных тРНК остается пока совершенно загадочной. Можно предположить, что они играют какую-то регуляторную роль и поэтому необходимы лишь в небольшом количестве. В случае супрессии кодона УГА подобной дилеммы не существует, так как супрессорная $тРНК^{Три}$ сохраняет свою способность считывать триптофановые кодоны УГГ.

СУПРЕССОРЫ БЕССМЫСЛЕННЫХ МУТАЦИЙ ДОЛЖНЫ СЧИТЫВАТЬ И НОРМАЛЬНЫЕ ТЕРМИНИРУЮЩИЕ СИГНАЛЫ

Супрессия кодонов УАГ и УГА осуществляется весьма эффективно. В присутствии супрессорных тРНК более половины терминирующих сигналов считываются как кодоны определенных аминокислот. В то же время супрессия кодона УАА составляет обычно всего 1—5%. Вначале предполагали, что эффективная супрессия кодонов УАГ и УГА обусловлена тем, что они редко встречаются в качестве нормальных терминирующих сигна-

лов, а может быть, и вообще не встречаются как таковые. Если бы они использовались часто, их специфические супрессоры препятствовали бы нормальной терминации цепей, что приводило бы к образованию аномально длинных полипептидов и прекращению роста клеток. Однако в настоящее время, когда обнаружены двойные терминирующие кодоны, стало понятнее, почему супрессия кодонов УАГ и УГА не влияет на рост бактерий. Мы просто должны сделать вывод, что эти терминирующие кодоны почти никогда не встречаются поодиночке. В случае супрессора УАА ситуация менее ясна, так как его присутствие всегда приводит к замедлению роста клеток. Отсюда следует, что многие гены оканчиваются, возможно, только одним терминирующим кодоном УАА. Для выяснения всех этих нерешенных вопросов необходимо получить значительно больше данных о нуклеотидных последовательностях генов.

МУТАЦИИ В НОРМАЛЬНЫХ СТОП-СИГНАЛАХ

Из того факта, что гены, оканчивающиеся единственным стоп-сигналом УАА, широко распространены, следует, что иногда можно выявить мутации, превращающие терминирующие кодоны в кодоны, соответствующие определенным аминокислотам. Если 3'-концы нормальных мРНК содержат нетранслируемые нуклеотидные последовательности, то трансляция таких мутантных мРНК приведет к образованию аномально длинных белков. В настоящее время нам уже известна одна такая мутация в гене человека, кодирующем α-цепь молекулы гемоглобина. Длина α-цепи в норме составляет 141 аминокислоту, при этом трансляция соответствующей мРНК прекращается при прочитывании одиночного терминирующего кодона

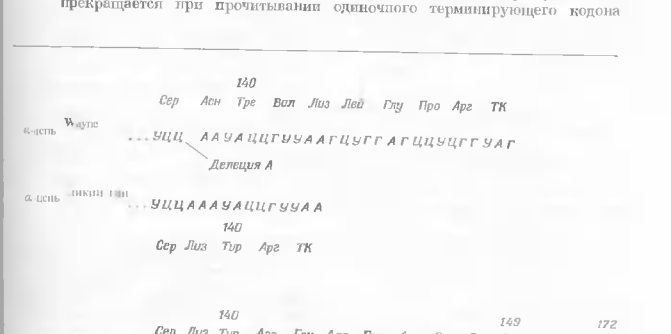


Рис. 13.9. Образование очень длинной α-цепи гемоглобина человека при замене У→Ц в терминирующем кодоне УАА (такой гемоглобин получил название «Constant Spring»). Аномально длинной α-цепью обладает также гемоглобин «Wayne», у которого имеется делеция одного нуклеотида А в кодоне лизина 139. Делеция сдвигает порядок считывания, и при этом нормальный терминирующий кодон УАА исчезает. Новый терминирующий кодон УАГ возникает в положении 149, что приводит к синтезу α-цепи, состоящей из 149 остатков. ТК — терминирующий кодон.

УАА. Но если этот терминирующий кодон изменяется в результате замены У→Ц, то в положение 142 включается глутамин, и трансляция продолжается до тех пор, пока не образуется цепь, состоящая из 172 аминокислот (рис. 13-9). Таким образом, на 3′-конце молекулы мРНК, кодирующей α-цепь, должно быть по меньшей мере 93 нуклеотида, которые обычно никогда не транслируются.

В СУПРЕССИИ МУТАЦИЙ, ИЗМЕНЯЮЩИХ СМЫСЛ КОДОНА, ТАКЖЕ УЧАСТВУЮТ тРНК

Супрессия мутаций, изменяющих смысл кодона (миссенс-мутаций), также может осуществляться с помощью мутантных тРНК. Недавно это было продемонстрировано на примере мутации гена А триптофан-синтазы в *E. coli*. Если в этом гене происходит мутация, при которой глицин заменяется на аргинин, то это приводит к образованию неактивного фермента (см. гл. 8). Однако существуют супрессорные мутации, которые вызывают включение глицина в его исходное положение, соответствующее образовавшемуся при мутации кодону аргинина. При этом активность фермента восстанавливается. Эффективность такой супрессии низка, поэтому в присутствии гена супрессора образуются как активная, так и неактивная формы фермента. Механизм этой супрессии был изучен в системе синтеза in vitro, при этом роль мРНК выполнял сополимер с повторяющейся динуклеотидной последовательностью АГ (АГАГ...). В норме он кодирует только глутаминовую кислоту и аргинин, но в присутствии тРНК, выделенной из супрессорного штамма, в полипептиды включались также следовые количества глицина. К тому же частота включения глицина хорошо коррелировала с частотой супрессии in vivo.

Супрессорные тРНК при хроматографии элюируются вместе с фракциями глициновой тРНК, что позволяет предположить, что соответствующие мутации изменяют антикодоны $тРНК^{Gly}$. Доказательство справедливости этого предположения было получено при дальнейшем изучении глициновых тРНК *E. coli*. В хромосоме этой бактерии имеется три различных гена, которые кодируют $тРНК^{Gly}$, содержащие разные антикодоны. Таким образом, каждая из этих тРНК узнает собственную подгруппу кодонов, входящую в группу из четырех кодонов глицина (табл. 13-13). Одна из них, а именно $тРНК^{Gly\ I}_{ГГГ}$, специфически связывается только с кодоном ГГГ; другая — $тРНК^{Gly\ II}_{ГГА/Г}$ — узнает два кодона ГГГ и ГГА,

Таблица 13-13 Глициновые тРНК *E. coli* и возникновение супрессорных тРНК, изменяющих смысл кодона (вставляющих глицин в места, соответствующие кодонам аргинина)

Ген	тРНК (продукт гена)	Антикодон	Узнаваемые кодоны глицина	Супрессорные гены, образовавшиеся в результате мутации соответствующих генов тРНК	Антикодон тРНК (продукта супрессорного гена)	Узнаваемые кодоны аргинина
Гли U	$тРНК^{Gly\ I}_{ГГГ}$	3′ЦЦЦ5′	ГГГ	gly Sus	УЦЦ	АГГ
Гли T	$тРНК^{Gly\ II}_{ГГА/Г}$	3′ЦЦУ5′	ГГА ГГГ	gly Tsu[1])	УЦУ	АГА АГГ
Гли V	$тРНК^{Gly\ III}_{ГГУ/Ц}$	3′ЦЦА5′	ГГУ ГГЦ			

1) Штаммы с этой мутацией растут очень плохо (полулетальные мутации). Неясно, почему они сохраняют лишь остаточную способность считывать кодоны ГГА.

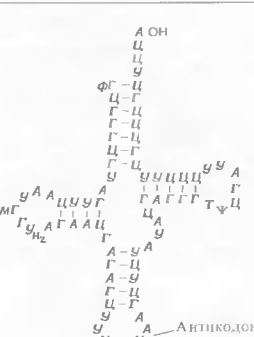


Рис. 13-10. Нуклеотидная последовательность $тРНК^{Глн}_{Sup\,D}$ (супрессора мутаций со сдвигом рамки), изображенная в конфигурации клеверного листа.

так как благодаря «качаниям» ее антикодон может связываться либо с одним, либо с другим кодоном. Отсюда можно сделать вывод, что $тРНК^{Глн\ I}_{ГГГ}$ не играет существенной роли в синтезе белка, поэтому при изменении ее антикодона $^{3'}$ЦЦЦ$^{5'}$ на $^{3'}$УЦЦ$^{5'}$ (что позволяет ей связываться с кодоном аргинина АГГ) клетка не утрачивает способности считывать кодон глицина ГГГ.

СУПРЕССИЯ МУТАЦИЙ, ПРИВОДЯЩИХ К ИЗМЕНЕНИЮ ПОРЯДКА СЧИТЫВАНИЯ КОДА

Существуют также и такие супрессорные гены, которые маскируют действие некоторых мутаций с изменением порядка считывания кода, вызванного вставкой нуклеотидов. По меньшей мере четыре из шести известных генов-супрессоров мутаций такого типа кодируют мутантные тРНК. Два из них кодируют пролиновые тРНК, а другие два — глициновые тРНК. Полная расшифровка последовательности одной из таких глициновых тРНК — супрессора мутации со изменением порядка считывания кода ($тРНК^{Глн}_{sup\,D}$ = $тРНК^{Глн}_{ГГг}$) — показала, что в ее антикодоне имеется одно лишнее основание: последовательность ЦЦЦ заменена в ней на ЦЦЦЦ (рис. 13-10). В остальном ее последовательность идентична последовательности $тРНК^{Глн\ I}_{ГГГ}$. Это указывает на то, что в гене glyU, кодирующем эту тРНК (табл. 13-13), в результате мутации произошла вставка одного нуклеотида. Наличие дополнительного основания не только позволяет такой тРНК считывать одновременно четыре основания, но и приводит к последующему перемещению участка мРНК длиной в 4 нуклеотида вдоль поверхности рибосомы. Благодаря этому восстанавливается правильный порядок считывания кода. Все известные тРНК, супрессирующие мутации со сдвигом порядка считывания кода, действуют только в том случае, если в гене произошла вставка; они никогда не супрессируют делеции. Это говорит о том, что не существует никакого способа для считывания одновременно только двух оснований.

МУТАЦИИ, ИЗМЕНЯЮЩИЕ СТРУКТУРУ РИБОСОМ, ТАКЖЕ ВЛИЯЮТ НА ТОЧНОСТЬ СЧИТЫВАНИЯ КОДА

Эффективность супрессии бессмысленных мутаций и мутаций, изменяющих смысл кодона, зависит также от структуры рибосомы. Определенные мутации некоторых белков 30S-субчастицы влияют на точность считывания кода. Аминокислотные замены в этих белках могут нарушить структуру рибосомы, а измененный комплекс матрицы с рибосомой не всегда может оказаться способным выбрать правильную молекулу тРНК (рис. 13-11). Одна из таких мутаций, которая называется ram (от англ. ribosomal ambiguity — неоднозначность узнавания в рибосоме), слабо супрессирует все три бессмысленных кодона в отсутствие каких бы то ни было супрессорных тРНК. Кроме того, имеются косвенные данные о том, что некоторые мутации со сдвигом порядка считывания кода также могут супрессироваться мутантами ram; отсюда следует, что определенные рибосомные белки способствуют правильному постепенному перемещению мРНК по поверхности рибосомы.

СТРЕПТОМИЦИН ТАКЖЕ МОЖЕТ НАРУШАТЬ СЧИТЫВАНИЕ КОДА

Гипотеза о том, что структурные изменения в рибосомах могут нарушать считывание генетического кода, нашла значительную поддержку в экспериментах, которые показали, что антибиотик стрептомицин вызывает ошибки в процессе перевода генетического кода как in vitro, так и в живой клетке. В основе этого явления лежит связывание стрептомицина с рибосомой, вследствие которого нарушается нормальное взаимодействие в комплексе мРНК — тРНК — рибосома. Степень нарушения зависит от того, к какому штамму добавляют стрептомицин: чувствительному или

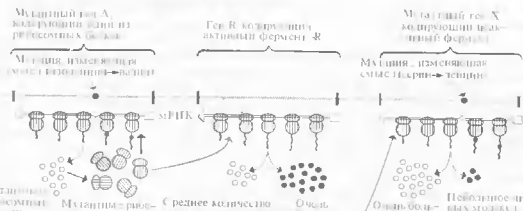


Рис. 13-11. Схема, поясняющая, каким образом мутация, приводящая к изменению смысла кодона и возникающая в гене, который кодирует один из рибосомных белков, может быть супрессором другой мутации.

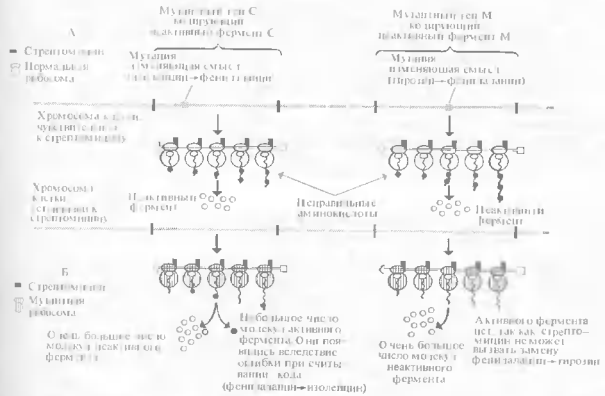


Рис. 13-12. Схема, поясняющая действие стрептомицина на чувствительные и устойчивые клетки *E. coli*.
А. Рост чувствительных клеток в присутствии стрептомицина. Код считывается почти сплошь неправильно из-за присоединения стрептомицина к нормальным рибосомам. *Б*. Рост устойчивых клеток в присутствии стрептомицина. Рибосомы устойчивых мутантов присоединяют стрептомицин, но ошибки при считывании происходят редко.

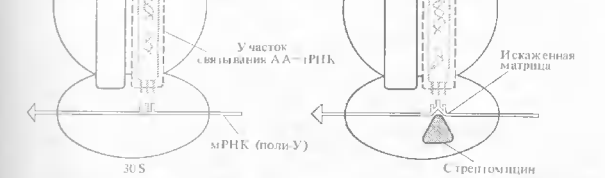


Рис. 13-13. Присоединение молекулы изолейцин~тРНК к комплексу рибосома — поли(У) — стрептомицин.
В данном случае стрептомицин нарушает считывание кода так, что присоединяется молекула изолейцин~тРНК, которая в норме присоединяется к кодону АУУ.

устойчивому. В клетках, чувствительных к этому антибиотику, стрептомицин вызывает очень сильное нарушение считывания. Мутация, вызывающая устойчивость к стрептомицину, так изменяет рибосомы, что число ошибок резко снижается. Однако их оказывается все же достаточно, чтобы подавить ряд мутаций; так, благодаря им синтезируется некоторое количество активного фермента (рис. 13-12).

Есть основания предполагать, что стрептомицин вызывает только определенные ошибки. Если в качестве матрицы используют поли(У), а рибосомы берут от чувствительного штамма, то чаще всего встречающаяся ошибка заключается в замене фенилаланина (УУУ) изолейцином (АУУ). Этот результат позволяет думать, что стрептомицин обычно вызывает замену только одного из трех нуклеотидов в кодоне УУУ (рис. 13-13).

ГЕНЫ-СУПРЕССОРЫ НАРУШАЮТ ТАКЖЕ СЧИТЫВАНИЕ «ПРАВИЛЬНЫХ» ГЕНОВ

Мы видим, таким образом, что гены-супрессоры нарушают считывание не только мутантных мРНК-матриц. В сущности говоря, они могут влиять на синтез всех клеточных белков, а это значит, что большинство «супрессорных ошибок» должно возникать при считывании нормальных типов мРНК, т. е. препятствовать синтезу полноценных белков. Такие изменения по большей части не очень вредны для растущих клеток, так как нормального белка образуется намного больше, чем видоизмененного. Однако и пользы клетке от неактивного белка (как бы мало его ни было), разумеется, тоже нет. Поэтому в процессе эволюции гены-супрессоры обычно элиминируются, если только они не служат защитой от какой-нибудь неблагоприятной мутации.

В настоящее время можно сделать одно общее предположение относительно функции супрессорных генов в норме. Ген становится супрессором в результате мутации. До того как эта мутация произойдет, ген нормален и активен; он кодирует определенную тРНК, один из рибосомных белков или один из ферментов, участвующих в синтезе белка. В процессе эволюции продукт такого гена приобретает оптимальную конфигурацию для правильного считывания генетического кода. Если этот ген изменяется в результате мутации таким образом, что продукт мутировавшего гена увеличивает частоту неправильного считывания, то этот ген становится супрессорным геном. И только в том случае, если повышенная частота ошибок необходима для существования клетки, продукты мутантного гена будут иметь преимущество по сравнению с продуктами нормального гена.

КОД, ПО ВСЕЙ ВЕРОЯТНОСТИ, УНИВЕРСАЛЕН

Поли(У) стимулирует включение фенилаланина в бесклеточных экстрактах из самых различных организмов, от бактерий до высших млекопитающих. Точно так же во всех испытанных бесклеточных экстрактах (независимо от природы клеток) поли(Ц) стимулирует включение пролина, а поли-(А) — включение лизина. Подобные указания на универсальность кода у современных организмов говорят о том, что генетический код остался неизменным в течение длительного периода эволюции. Однако до тех пор, пока не будут однозначно установлены все кодоны для нескольких организмов, это утверждение нельзя считать ни строго доказанным, ни опровергнутым. Мы вправе ожидать постоянства большей части кода. Рассмотрим, к чему могла бы привести мутация, изменившая генетический код. Допустим, например, что подобная мутация изменила последо-

вательность в сериновой тРНК и молекулы этой тРНК взаимодействуют теперь уже не с кодоном УЦУ, а с кодоном УУГ. Эта мутация будет безусловно летальной для гаплоидной клетки, содержащей только по одному гену для каждого типа тРНК, потому что в мутантной клетке нормальная сериновая тРНК синтезироваться не будет и серин перестанет включаться в надлежащие участки полипептидных цепей. Даже если бы клетка содержала более одного гена для каждого типа тРНК (т. е. если бы это была диплоидная клетка), то и тогда мутация такого типа оказалась бы для нее летальной, так как она привела бы к одновременной замене многих остатков фенилаланина серином в большей части клеточных белков.

ВЫВОДЫ

Наиболее прямой путь для изучения генетического кода — это наблюдения над синтезом белка в бесклеточной системе. Особенно удобна для этих опытов та система, в которой запасы собственной мРНК истощены. Добавленно к экстрактам новой мРНК вызывает образование новых белков. Последовательность аминокислот в молекулах этих белков определяется исключительно новой, добавленной извне мРНК. Например, при введении в систему РНК фага F2 синтезируются белки, практически тождественные белку оболочки этого фага. Таким образом, РНК, составляющая генетический материал вируса, действует и как мРНК.

Первым (и, вероятно, самым важным) этапом в расшифровке генетического кода было обнаружение того факта, что поли(У) специфически кодирует синтез полифенилаланина, т. е. что кодоном для фенилаланина служит последовательность УУУ. Использование других синтетических полирибонуклеотидов, как гомогенных (например, поли(Ц)), так и смешанных (например, поли(АУ)), позволило получить предварительные данные о целом ряде кодонов для различных аминокислот.

Однозначная расшифровка кода была осуществлена при изучении специфических взаимодействий между тринуклеотидами, РНК и рибосомами, а также благодаря использованию сополимеров с регулярной последовательностью в качестве матриц. Было твердо установлено значение всех 64 кодонов. 61 из них кодирует определенные аминокислоты, остальные три являются стоп-сигналами. Код сильно вырожден, так как обычно несколько кодонов соответствует одной аминокислоте. Данная тРНК может иногда специфически узнавать несколько кодонов. Эта неоднозначность обусловлена качанием (подвижностью) основания на 5'-конце антикодона.

Кодоном начальной аминокислоты, N-формилметионина, обычно является АУГ, тот же кодон, что и для метионина; ГУГ, который обычно кодирует валин, также может кодировать N-формилметионин. Терминирующие кодоны УАА, УАГ и УГА считываются особыми белками, а не молекулами тРНК. Неизвестно, для чего существуют три различных терминирующих кодона, хотя результаты анализов нуклеотидных последовательностей, выполненных в последнее время, показывают, что некоторые гены оканчиваются двумя последовательными терминирующими кодонами.

Некоторые мутации (мягкие супрессорные мутации) увеличивают частоту ошибок при считывании генетического кода. В результате этого увеличения частоты ошибок мутантные гены могут в некоторых случаях синтезировать нормальные продукты. Существуют супрессорные гены как для мутаций кодонов с изменением смысла, так и для бессмысленных мутаций (с образованием терминирующих кодонов), а также для мутаций со сдвигом порядка считывания, вызванных вставкой одного основания. Основой действия многих супрессорных генов является образование молекул тРНК с измененными антикодонами.

Код, по-видимому, в основных чертах одинаков у всех организмов. Это и не удивительно: вариации в коде могли бы возникнуть в результате мутаций, однако почти невозможно представить себе нелетальную мутацию, изменяющую буквы в кодоне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Nirenberg M. W., Mattaei J. H., The Dependence of Cell-Free Protein Synthesis in *E. coli* upon Naturally Occurring or Synthetic Polyribonucleotides, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **47**, 1588 (1961). Классическая работа, в которой показано, что поли(У) кодирует полифенилаланин.

Crick F. H. C., The Recent Excitement in the Coding Problem, Proc. Nucleic Acid Res., **1**, 164 (1963). Превосходный анализ состояния проблемы кодирования в конце 1962 г.

Leder P., Nirenberg M. W., RNA Code Words and Protein Synthesis II. Nucleotide Sequence of a Valine RNA Code Word, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 52, 420 (1964). Изящно сделанная работа, в которой был установлен порядок расположения нуклеотидов в кодоне валина.

Nishimura S., Jones D. S., Khorana H. G., The in vitro Synthesis of a Copolypeptide Containing Two Amino Acids in Alternating Sequence Dependent upon a DNA-like Polymer Containing Two Nucleotides in Alternating Sequence, J. Mol. Biol., **13**, 302 (1965). Еще одна классическая работа, посвященная изучению генетического кода. В ней дается окончательное доказательство того, что каждый кодон содержит три нуклеотида.

Gorini L., Antibiotics and the Genetic Code, In: The Molecular Basis of Life, R. H. Haynes and P. C. Hanawalt (eds.), Freeman, San Francisco, 1968.

The Genetic Code, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **XXXI** (1966). Весьма впечатляющий сборник докладов, представленных в июне 1966 г., сразу после того, как стали известны общие свойства кода.

Fiers W., Chemical Structure and Biological Activity of Bacteriophage MS2 RNA. In: RNA Phages, N. Zinder (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, 1975. Итоги проведенного автором анализа длинных нуклеотидных последовательностей РНК фага MS2 с целью установить полную последовательность вирусной хромосомы.

Crick F. H. C., Codon-Anticodon Pairing: The Wobble Hypothesis, J. Mol. Biol., **19**, 548 (1966). Важное предположение, которое позволило понять, каким образом одна разновидность тРНК связывается более чем с одним кодоном.

Woese C. R., The Genetic Code, Harper and Row, New York, 1967. Недавно написанный обзор, в котором современные данные рассматриваются с исторической точки зрения.

Jacas M., The Biological Code, Wiley (Interscience), New York, 1969. (М. Ичас, Биологический код, пер. с англ. «Мир», М., 1971.) Наиболее полная монография, посвященная коду, написанная одним из пионеров в этой области.

Nichols J. L., Nucleotide Sequence from the Polypeptide Chain Termination Region of the Coat Protein Cistron in Bacteriophage R17, Nature, **225**, 147 (1970). Первое исследование терминирующих кодонов in vivo.

Garen A., Sense and Nonsense in the Genetic Code, Science, **160**, 149 (1968). Доступно написанный обзор данных по механизмам действия супрессорных генов.

Smith J. D., Genetics of Transfer RNA, Ann. Rev. Genetics, **6**, 235 (1972). Очень полезный обзор, содержащий много данных по супрессорным тРНК.

Riddle D. L., Carbon J., Frameshift Suppression: A Nucleotide Addition in the Anticodon of a Glycine Transfer RNA, Nature, New Biology, **242**, 230 (1973).

Roth J. R., Frameshift Mutations, Ann. Rev. Genetics, **8**, 317 (1974).

ГЛАВА 14

Регуляция синтеза и функционирования белков

Теперь, когда мы уже в общих чертах знаем, какую роль играют нуклеиновые кислоты в синтезе белка, мы можем заняться вопросом о том, как регулируется скорость синтеза различных белков. Количества отдельных клеточных белков колеблются весьма сильно, поэтому должны существовать механизмы, обеспечивающие избирательный синтез тех белков, в которых клетка испытывает особенно большую потребность. До недавнего времени мы почти ничего не знали об этих механизмах и вынуждены были ограничиваться одними предположениями. Однако теперь уже ясно, что скорость синтеза белка определяется отчасти внутренним генетическим контролем и отчасти химическим составом среды. Чтобы показать, как взаимодействуют эти факторы, мы обратимся к микробным системам, так как именно на основании исследования этих систем возникли важнейшие современные теории регуляции синтеза и функционирования белков.

РАЗЛИЧНЫЕ БЕЛКИ СИНТЕЗИРУЮТСЯ В РАЗНЫХ КОЛИЧЕСТВАХ

Выше мы привели подсчеты, согласно которым хромосома клетки *E. coli* может кодировать от 2000 до 4000 различных полипептидных цепей. Пока еще в точности не известно, какое число различных белков одновременно присутствует в данной клетке. Основываясь на вероятном числе ферментов, необходимых для синтеза разнообразных метаболитов, можно принять, что в клетке, растущей на глюкозе в качестве единственного источника углерода, имеется по меньшей мере 600—800 различных ферментов. Некоторые из этих ферментов присутствуют в клетке в относительно больших количествах. Таковы, например, ферменты, катализирующие начальные этапы распада глюкозы и реакции, ведущие к синтезу обычных аминокислот и нуклеотидов, а также ферменты, необходимые для синтеза высокоэнергетических связей АТФ. В противоположность этому ряд других ферментов присутствует в клетке в следовых количествах (очень мало, например, требуется ферментов, участвующих в синтезе коферментов, так как необходимое количество этих последних тоже очень невелико). Вместе с тем клетка нуждается в относительно больших количествах различных структурных белков, используемых для построения клеточной стенки, клеточной мембраны и рибосом.

РАЗЛИЧИЯ В КОЛИЧЕСТВЕ ОТДЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ У *E. coli*

Только для некоторых белков имеются в настоящее время надежные данные об их содержании в нормальной бактериальной клетке. Наиболее точно определено количество молекул фермента β-галактозидазы (мол.

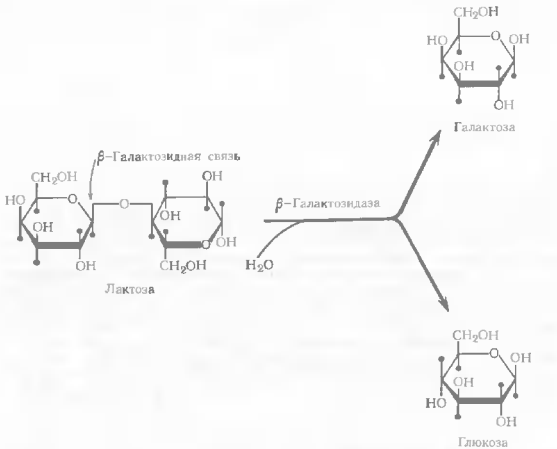


Рис. 14-1. Фермент β-галактозидаза гидролитически расщепляет сахар лактозу на галактозу и глюкозу.

Мутанты, не способные синтезировать этот белок, не могут использовать лактозу в качестве источника углерода.

вес $5{,}4 \cdot 10^5$) у *E. coli*. Этот фермент расщепляет сахар лактозу на глюкозу и галактозу (рис. 14-1). Важное его значение обусловлено тем, что клетка не может использовать лактозу в качестве источника углерода и энергии до тех пор, пока этот дисахарид не будет расщеплен на более простые сахара — глюкозу и галактозу. Клетки *E. coli*, растущие на среде, в которой единственным источником углерода служит лактоза, содержат около $3 \cdot 10^3$ молекул β-галактозидазы, что составляет около 3% общего количества клеточного белка. Это максимальное количество, которое может синтезировать клетка, если ее хромосома содержит только один β-галактозидазный ген. Если этот ген присутствует в двух копиях, то количество синтезированной β-галактозидазы может составить 6% общего белка. Существуют даже «сверхпродуктивные» мутантные штаммы (вероятно, несущие много копий этого гена), эти штаммы могут синтезировать еще больше β-галактозидазы, почти до 15% общего клеточного белка. Однако такой усиленный синтез достигается лишь за счет одновременного снижения до возможного минимума синтеза других необходимых белков. Клетки, синтезирующие чрезмерно большие количества β-галактозидазы, растут плохо и быстро вытесняются мутантами, у которых белковый синтез более сбалансирован.

Имеются также достоверные данные о количестве структурного белка рибосом. Каждая рибосома содержит приблизительно 55 различных белков (средний мол. вес ~20 000), составляющих в сумме около 10% общего

белка быстро растущей клетки. Таким образом, на каждый отдельный рибосомный белок может приходиться в среднем 0,2% общего количества белка *E. coli*. До сих пор мы не располагаем подобными количественными данными в отношении ферментов, необходимых для биосинтеза коферментов. В некоторых случаях в клетке, вероятно, присутствует не более нескольких молекул того или иного фермента. Однако доказать это будет, очевидно, трудно, так как для выделения хотя бы одного из этих ферментов в количествах, необходимых для определения молекулярного веса, нужно переработать огромную массу материала.

СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ КОЛИЧЕСТВОМ ОТДЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ И ПОТРЕБНОСТЬЮ В ЭТИХ БЕЛКАХ

В зависимости от условий окружающей среды количество данного белка в клетке может резко меняться. В каждой нормальной клетке *E. coli*, растущей в присутствии какого-нибудь β-галактозида, например лактозы, имеется приблизительно 3000 молекул β-галактозидазы, но если среда содержит другой источник углерода, то это число снижается в 1000 раз.

Субстраты, подобные лактозе в том отношении, что их введение в питательную среду специфически усиливает синтез фермента, называют *индукторами*, а соответствующие ферменты — *индуцируемыми ферментами*. Совершенно иные соотношения характерны для многих ферментов, участвующих в процессах биосинтеза. В клетках *E. coli*, растущих в среде, не содержащей ни одной аминокислоты, имеются все ферменты, необходимые для осуществления синтеза всех 20 аминокислот. Если же питательная среда содержит аминокислоты, то соответствующие биосинтетические ферменты в клетках почти совсем отсутствуют. Биосинтетические ферменты, количество которых уменьшается в присутствии *конечного продукта* соответствующей цепи реакций (например, для ферментов, участвующих в биосинтезе гистидина, конечным продуктом является гистидин), получили название *репрессируемых ферментов*. Конечные продукты, добавление которых в питательную среду специфически снижает количество какого-либо определенного фермента, называют *корепрессорами*. Индукция и репрессия в равной мере полезны для бактериальной клетки: если какие-либо ферменты необходимы для расщепления питательных веществ или для образования определенных строительных белков, то клетка их синтезирует, а если потребность в них отпадает, то клетка быстро прекращает синтез.

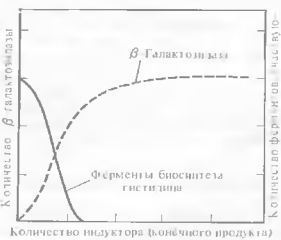


Рис. 14-2. Содержание фермента в клетке как функция содержания индуктора (или конечного продукта) в питательной среде.

Однако адаптация не следует закону «все или ничего». В определенных условиях, когда клетке не требуется максимального количества фермента, она может поддерживать его концентрацию на каком-то промежуточном уровне (рис. 14-2). Подобным же образом может регулироваться и синтез структурных белков. Особенно ясно это видно на примере рибосом. Когда бактерии растут с максимальной скоростью, на долю рибосом приходится до 25—30% всей массы клетки. Если же скорость роста снижается (под влиянием неблагоприятных условий), а значит, замедляется и синтез белка, то клетка уже больше не нуждается в таком количестве рибосом, и число их резко падает (иногда оно может уменьшиться в 5 раз по сравнению с максимальной величиной).

РАЗЛИЧИЯ В СОДЕРЖАНИИ ОТДЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ МОГУТ ЗАВИСЕТЬ ОТ ЧИСЛА МОЛЕКУЛ СПЕЦИФИЧНЫХ мРНК

В быстро делящихся бактериальных клетках белковые молекулы, однажды образовавшись, по большей части сохраняются. Поэтому различия в содержании этих белков определяются, вероятно, разной скоростью синтеза, а не разной устойчивостью. Скорость же синтеза в свою очередь отчасти зависит от числа имеющихся в клетке молекул мРНК. В клетках, активно синтезирующих β-галактозидазу, число β-галактозидазных матриц намного выше, чем в клетках, не занятых синтезом этого фермента. Согласно наиболее надежным подсчетам, при очень интенсивном синтезе β-галактозидазы в каждой клетке имеется 35—50 молекул соответствующей мРНК. Если же синтез β-галактозидазы не происходит, то далеко не каждая клетка популяции содержит даже по одной молекуле β-галактозидазной мРНК.

РЕПРЕССОРЫ КОНТРОЛИРУЮТ СКОРОСТЬ СИНТЕЗА мРНК

Специальная группа молекул, получивших название *репрессоров*, контролирует синтез мРНК, кодирующей индуцируемые и репрессируемые ферменты. Каждый репрессор блокирует синтез какого-либо одного или нескольких определенных белков.

Подобно вообще всем белкам структура репрессоров кодируется хромосомной ДНК; гены, определяющие структуру репрессоров, называются *генами-регуляторами*. Были выделены мутанты, у которых гены-регуляторы не способны кодировать функционально активные репрессоры. Клетки, содержащие неактивные гены-регуляторы, синтезируют соответствующие белки независимо от потребности в них (рис. 14-3). Эти мутанты были названы *конститутивными*, потому что конститутивными называются белки, синтезируемые всегда в одинаковом количестве, независимо от того, есть ли в них потребность или нет.

Некоторые мутации генов-регуляторов могут подавляться мутациями других генов. Следовательно, благодаря наличию гена-супрессора может восстанавливаться синтез активных репрессоров. Это указывает на то, что структура репрессоров изменяется вследствие ошибок при считывании, поэтому мы вправе предположить, что некоторые (а может быть, и все) репрессоры имеют белковую природу.

РЕПРЕССОРЫ ЯВЛЯЮТСЯ БЕЛКАМИ

Белковая природа репрессоров была подтверждена в последние годы, когда удалось выделить пять различных репрессоров: один из них регулирует синтез в клетках *E. coli* β-галактозидазы, второй регулирует синтез

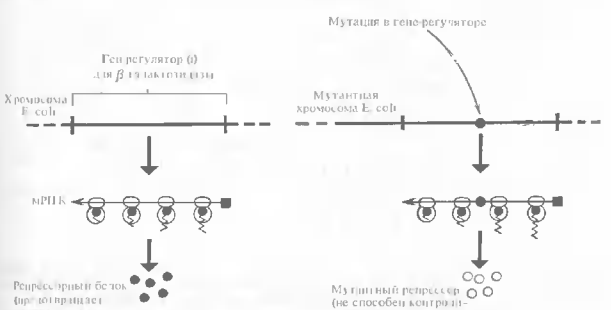


Рис. 14.3. Биосинтез репрессора под контролем нормального и мутантного генов.

ферментов *E. coli*, участвующих в метаболизме галактозы, третий регулирует синтез ферментов, участвующих в биосинтезе триптофана у *E. coli*; четвертый регулирует синтез ферментов, участвующих в расщеплении гистидина у *Salmonella typhimurium*, пятый блокирует синтез большинства фагоспецифических белков фага λ, когда он встроен в хромосому *E. coli* в виде профага (гл. 15). К настоящему времени лучше всего охарактеризован репрессор β-галактозидазы (лактозный репрессор). Его полипептидные цепи с мол. весом 37 000 легко агрегируют с образованием тетрамеров (мол. вес 148 000). Тетрамер, по-видимому, является активной формой репрессора; на каждую хромосому приходится всего от 10 до 20 таких тетрамеров. Из-за столь малого числа молекул репрессора первые работы по его обнаружению и выделению были настоящим подвигом. К счастью, теперь имеются мутации (см. ниже), приводящие к синтезу гораздо больших количеств репрессора (> 1% всего клеточного белка), что позволяет выделить его в достаточных количествах для определения последовательности аминокислот. Работа по расшифровке последовательности 347 аминокислот лактозного репрессора была завершена в 1973 г.

РЕПРЕССОР ДЕЙСТВУЕТ, СВЯЗЫВАЯСЬ С ДНК

Все известные репрессоры связываются с определенными участками молекул ДНК и блокируют инициацию транскрипции соответствующих мРНК. Специфические нуклеотидные последовательности, с которыми связываются репрессоры, называются *операторами*. Вообще говоря, для специфического взаимодействия оператора с репрессором путем образования водородных связей необходимо, чтобы длина оператора была не менее 10—12 пар оснований. Этой длины достаточно, чтобы такая же последовательность оснований не встретилась где-нибудь еще в хромосоме в соответствии со случайным распределением. Если оператор будет короче, то репрессор будет связываться во многих неправильных местах. Использо-

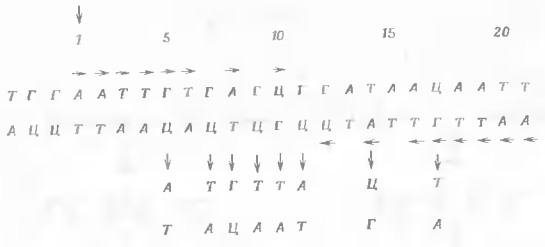


Рис. 14.4. Последовательность лактозного оператора.
Стрелкой сверху отмечена точка, где начинается транскрипция лактозной мРНК. Под парами оснований оператора дикого типа показаны замены, приводящие к ослаблению связывания лактозного репрессора.

вание же достаточно большого числа специфических взаимодействий дает явное преимущество; связывание может быть очень прочным. После связывания с ДНК лактозный репрессор останется в этом состоянии до тех пор, пока не вступит во взаимодействие с индуктором.

Нуклеотидная последовательность лактозного оператора была определена при изучении фрагмента, защищаемого от нуклеазного расщепления при специфическом связывании лактозного репрессора с ДНК *E. coli*. Длина этого участка составляет 21 пару оснований, примерно 16 из них расположены симметрично относительно оси второго порядка, проходящей через пару оснований в одиннадцатом положении (рис. 14.4). Эта симметрия позволяет одновременно связаться с оператором двум субъединицам тетрамерного лактозного репрессора. Поскольку симметрия не полная, сначала эти данные интерпретировали таким образом, что не все пары оснований оператора связываются с репрессором. Эта идея привела к выводу, что в соответствующем взаимодействии белка с нуклеиновой кислотой участвуют только симметрично расположенные пары оснований. Однако исследования операторов мутантов показали, что связывание репрессора с оператором ослабляется при замене пар оснований как в симметричных, так и в несимметричных участках.

Для более глубокого понимания данной проблемы необходимы работы по изучению трехмерной структуры с помощью дифракции рентгеновских лучей. К сожалению, они могут занять много лет, так как полученные к настоящему времени кристаллы лактозного репрессора слишком малы для детального трехмерного анализа. До тех пор пока выращивание крупных кристаллов белков остается в основном делом удачи, у нас нет никакой уверенности в том, что кристаллы лактозного репрессора нужного размера будут получены в близком будущем.

КОРЕПРЕССОРЫ И ИНДУКТОРЫ ОПРЕДЕЛЯЮТ ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ РЕПРЕССОРОВ

Репрессоры, однако, не всегда способны блокировать синтез специфической мРНК. Если бы это было так, то они постоянно ингибировали бы синтез соответствующих белков. Все репрессоры могут существовать

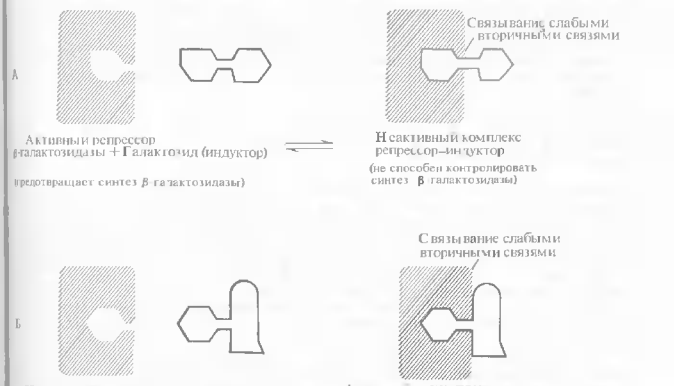


Рис. 14-5. Схема, иллюстрирующая противоположное действие репрессоров и индукторов на активность репрессоров.

Видно, что активность свободного репрессора зависит от того, является ли ферментная система индуцируемой (*А*) или репрессируемой (*Б*).

в двух формах — активной и неактивной. В какой форме находится репрессор, зависит от того, с чем он взаимодействует — с индуктором или корепрессором. Присоединение индуктора инактивирует репрессор. Например, в результате взаимодействия с β-галактозидом [1] (индуктором) репрессор β-галактозидазы утрачивает способность связываться со слоем оператором. Добавление β-галактозидов к растущим клеткам побуждает их синтезировать β-галактозидазу, так как в присутствии β-галактозидов снижается концентрация активного репрессора. И наоборот, взаимодействие с корепрессором превращает неактивный репрессор в активный. Добавление аминокислот к клеткам, растущим в минимальной среде, резко увеличивает концентрацию активных репрессоров, контролирующих синтез ферментов, участвующих в образовании аминокислот. Следствием этого оказывается немедленное выключение синтеза соответствующих молекул мРНК (рис. 14-5).

Между репрессором и соответствующими индукторами и корепрессорами не образуется никаких ковалентных связей. Форма части молекулы каждого репрессора комплементарна определенной части своего

[1] В настоящее время предполагают, что истинный индуктор β-галактозидазной системы, способный соединяться с репрессором, — это не сама лактоза, а какое-то ее производное. По-видимому, лактоза сначала превращается в какое-то сходное с ней соединение, которое уже затем присоединяется к репрессору.

индуктора (или корепрессора), и они соединяются за счет слабых вторичных связей (водородные связи, солевые мостики, вандерваальсовы силы). Поскольку эти связи слабы, они быстро образуются и разрушаются, что позволяет репрессору быстро переходить из активного состояния в неактивное и обратно в соответствии с физиологическими нуждами клетки. Например, сразу после удаления лактозы синтез мРНК β-галактозидазы прекращается.

РЕПРЕССОР МОЖЕТ КОНТРОЛИРОВАТЬ СИНТЕЗ БОЛЕЕ ЧЕМ ОДНОГО БЕЛКА

В некоторых случаях репрессор может контролировать синтез только одного белка, однако гораздо чаще один и тот же репрессор воздействует на синтез нескольких ферментов. Так, например, репрессор β-галактозидазы *E. coli* контролирует по крайней мере три фермента: β-галактозидазу, β-галактозидпермеазу, от которой зависит скорость поступления β-галактозидов в бактериальную клетку, и β-галактозидацетилазу, функция которой еще неизвестна. При отсутствии β-галактозидпермеазы клетки *E. coli* не способны накапливать β-галактозидазу. Поскольку все три фермента необходимы для утилизации β-галактозидов, их биосинтез, очевидно, должен быть координирован.

Координация синтеза осуществляется благодаря тому, что три гена расположены рядом (рис. 14-6), вследствие чего структурная информация для трех ферментов выдается в виде одной молекулы мРНК (рис. 14-7). Репрессор может подавлять одновременно и большее число генов (до десяти). Пример этого мы находим в системе биосинтеза гистидина. И в данном случае координация оказывается возможной благодаря тому, что информация, заключенная во всех этих генах, передается одной молекуле мРНК.

Последовательность нуклеотидов, кодирующая одну молекулу мРНК и контролируемая одним промотором (см. ниже), получила название *оперона*. Опероны могут состоять из одного, двух или нескольких генов. Сначала предполагали, что каждый репрессор воздействует специфично только на один оперон. Несколько лет назад были обнаружены экспериментальные факты, которые легче всего интерпретировать следующим образом: специфический репрессор может действовать на три различных оперона, так как гены, ответственные за биосинтез аргинина у *E. coli*, как оказалось, сгруппированы в три несцепленных оперона. Тем не менее имеются данные, что один регуляторный ген контролирует уровень синтеза ферментов всех трех оперонов. Подобно этому репрессор фага λ может действовать более чем в одном месте. Он специфически связывается с двумя группами операторов, одна из которых расположена слева, а другая — справа от соответствующего регуляторного гена (гл. 15).

ОТСУТСТВИЕ ОПЕРАТОРА ПРИВОДИТ К КОНСТИТУТИВНОМУ СИНТЕЗУ БЕЛКА

Все операторы (участки связывания репрессора) расположены очень близко к месту, где начинается транскрипция мРНК. Они сцеплены так тесно, что вначале предполагали, что операторный участок может включать нуклеотиды, кодирующие первые несколько аминокислот β-галактозидазы. Сейчас получены твердые доказательства, что такого перекрывания нет.

Присутствие связанного репрессора препятствует только инициации мРНК и не влияет на элонгацию цепи, если синтез уже начался. Таким

Рис. 14-6. Лактозный оперон со своим регуляторным геном, изображенные в масштабе в соответствии с данными о размерах продуктов генов.
Числами обозначена длина некоторых генов в парах оснований.

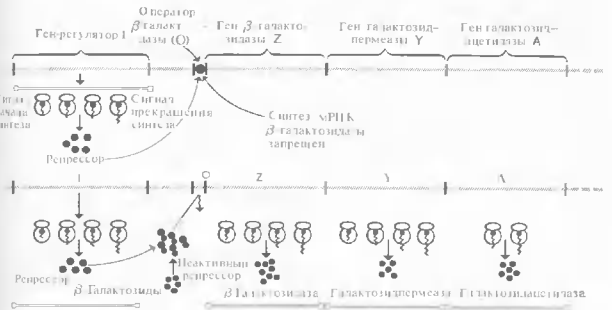


Рис. 14-7. Гипотеза, объясняющая взаимодействие репрессора, индуктора и оператора в процессе контроля над системой синтеза β-галактозидазы, β-галактозидпермеазы и галактозидацетилазы *E. coli*.

образом, операторы действуют главным образом негативно: если нет активно действующего оператора, соответствующий репрессор не может ингибировать синтез специфической мРНК и в результате происходит конститутивный синтез белкового продукта (или продуктов) данной мРНК.

Существование операторов было впервые открыто с помощью генетического анализа. В результате мутации оператор может перейти в неактивную форму, и тогда действие репрессоров блокируется. Когда это происходит, начинается конститутивный синтез фермента. Поэтому соот-

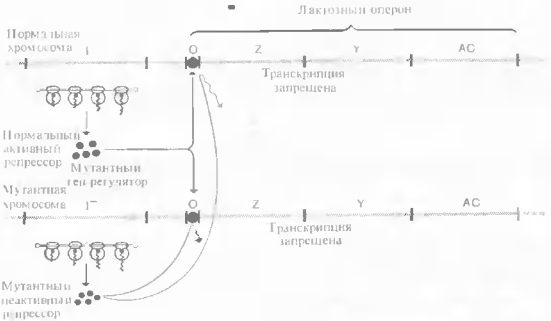


Рис. 14-8. **Использование частично диплоидных клеток для доказательства того, что функционирующие репрессоры доминируют над неактивными.**
При отсутствии во внешней среде β-галактозидов эти клетки не синтезируют заметных количеств β-галактозидазы.

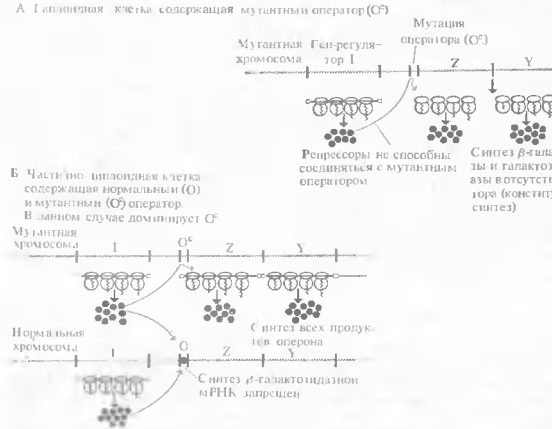


Рис. 14-9. **Контроль над синтезом специфической мРНК, осуществляемый нормальным и мутантным операторами.**

ветствующие мутанты обозначаются O^c (от слова constitutive — конститутивный). Мутации O^c легко отличить от мутаций генов репрессора, измеряя уровень синтеза фермента в особых, частично диплоидных клетках, содержащих две копии изучаемого участка хромосомы. Клетки, которые содержат один активный и один неактивный ген репрессора, остаются репрессибельными, так как полноценные молекулы репрессора могут действовать на оба оператора (рис. 14-8). Клетки, содержащие только один неполноценный оператор, всегда будут конститутивными, независимо от того, в каком состоянии находится ген репрессора (рис. 14-9).

ПОЗИТИВНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ЛАКТОЗНОГО ОПЕРОНА

Действие репрессоров, препятствующих синтезу мРНК,— пример негативной регуляции, когда в отсутствие фактора, посредством которого осуществляется регуляция, синтез идет быстрее, чем в его присутствии. Сначала предполагали, что лактозный оперон находится только под контролем негативной системы регуляции; однако теперь ясно, что даже в присутствии индуктора, нейтрализующего репрессор, для нормального функционирования оперона необходим сигнал позитивной регуляции, передача которого также осуществляется белком. Белок, обеспечивающий позитивную регуляцию, был открыт при изучении механизма блокирования глюкозой работы ряда оперонов (так называемых *чувствительных к глюкозе оперонов*); каждый из этих оперонов отвечает за расщепление (катаболизм) определенного сахара (например, лактозы, галактозы, арабинозы и мальтозы). Если выращивать *E. coli* в присутствии как глюкозы, так и лактозы, то используется только глюкоза и ни один из белков лактозного оперона не синтезируется. Подобно этому, если в среде присутствуют глюкоза и галактоза, галактозный оперон не проявляет активности. В настоящее время можно лишь гадать о том, почему глюкоза в качестве сырья для метаболизма предпочитается всем остальным сахарам. Возможно, на протяжении длительной эволюции бактерии чаще всего оказывались в среде, богатой глюкозой, а не в среде, богатой каким-нибудь другим сахаром.

Как бы то ни было, ингибирование активности оперонов в присутствии глюкозы обусловлено не замедлением проникновения различных сахаров внутрь клеток, а какими-то реакциями на уровне транскрипции. Данные в пользу такого механизма впервые получили в опытах, где были обнаружены мутации промотора (см. ниже), которые делали лактозный оперон нечувствительным к действию глюкозы. У соответствующих мутантов максимальная индукция лактозного оперона может быть достигнута даже в присутствии больших количеств глюкозы.

КАТАБОЛИЗМ ГЛЮКОЗЫ ВЛИЯЕТ НА УРОВЕНЬ ЦИКЛИЧЕСКОГО АМФ

Сама по себе глюкоза не действует на транскрипцию. Один из продуктов ее расщепления (катаболит) снижает внутриклеточный уровень *циклического АМФ (цАМФ)*. Этот ключевой метаболит необходим для транскрипции оперонов, ингибируемых при катаболизме глюкозы. Механизм влияния катаболитов глюкозы на концентрацию цАМФ в клетке еще неизвестен. Непосредственным предшественником цАМФ является АТФ, и вполне вероятно, что определенным катаболитом прямо ингибируется фермент, ответственный за превращение АТФ в цАМФ — аденилатциклаза (рис. 14-10). Другая возможность состоит в том, что существует фер

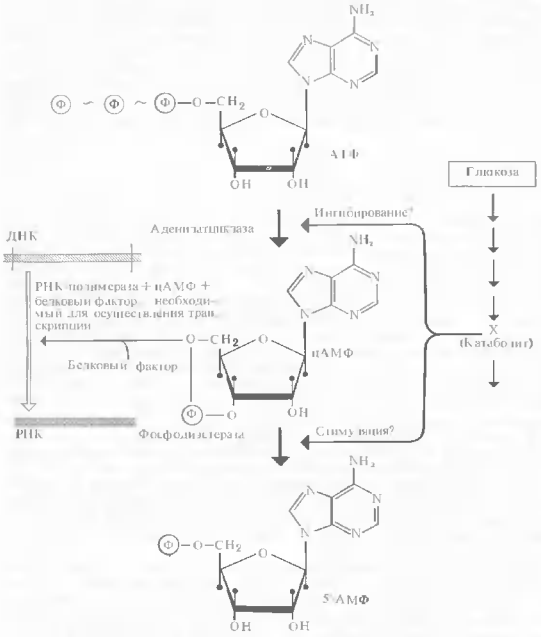


Рис. 14.40. Регуляция чувствительной к катаболитам транскрипции при помощи цАМФ.

мент, специфически превращающий цАМФ в АМФ, тогда ингибирование оперонов легко регулировалось бы скоростью расщепления цАМФ. Можно надеяться, что вскоре правильное решение этого вопроса будет найдено.

БЕЛОК, АКТИВИРУЮЩИЙ КАТАБОЛИТНЫЙ ГЕН, СНАЧАЛА СВЯЗЫВАЕТСЯ С цАМФ

цАМФ стимулирует синтез мРНК лактозного оперона не прямо, а путем связывания с белком, активирующим катаболитный ген (БАК, catabolite gene activator protein, или CAP). Молекула БАК представляет собой димер с мол. весом около 44 000. Этот белок не влияет на транскрипцию

до тех пор, пока с ним не свяжется цАМФ. После того как это случится, он приобретает способность связываться со специфическими участками ДНК, благодаря чему увеличивается скорость транскрипции прилегающих оперонов. БАК — позитивный регуляторный элемент для всех оперонов, чувствительных к глюкозе. Поэтому мутанты, в которых функционирование БАК блокировано, не способны использовать различные сахара.

БАК И СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕПРЕССОРЫ РЕГУЛИРУЮТ РАБОТУ ПРОМОТОРА

На скорость роста цепей данной мРНК не влияет ни связывание БАК, ни связывание специфического репрессора. БАК положительно, а специфический репрессор отрицательно регулируют скорость, с которой молекулы РНК-полимеразы прикрепляются к *промоторам* — участкам ДНК, играющим особую роль в инициации транскрипции. Экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу существования промоторов, впервые были получены при изучении нескольких мутаций, которые карти-

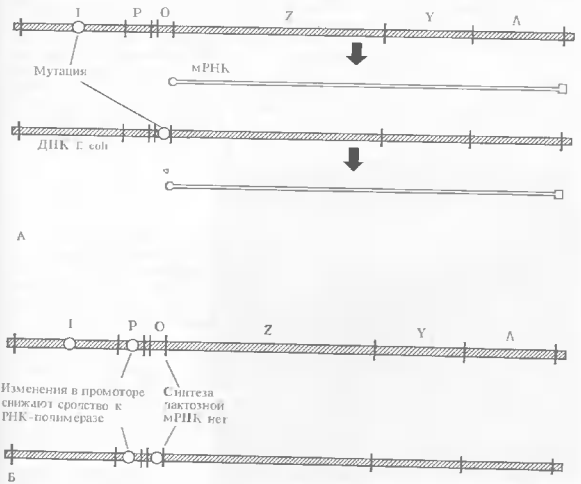


Рис. 14-11. Генетическое доказательство существования промотора лактозного оперона. *А.* В отсутствие активного репрессора или при наличии мутации оператора промотор дикого типа обеспечивает высокий уровень синтеза лактозной мРНК. *Б.* Мутация промотора, полностью блокирующая синтез лактозной мРНК даже в отсутствие активного репрессора или неактивного оператора.

руются вблизи гена β-галактозидазы. У выделенных мутантов эффективность транскрипции была сильно снижена даже при полном отсутствии лактозного репрессора (рис. 14-11). Теперь мы знаем, что не все мутации промотора приводят к снижению эффективности транскрипции. На самом деле у некоторых мутантов условия, ограничивающие синтез определенных мРНК, менее строгие, чем у дикого штамма (например, нет необходимости в связывании БАК). Сначала думали, что промоторы построены относительно просто. Однако в настоящее время очевидно, что они довольно сложны, так как должны взаимодействовать со многими различными позитивными и негативными регуляторными элементами.

СВЯЗЫВАНИЕ РЕПРЕССОРА ПРЕПЯТСТВУЕТ СВЯЗЫВАНИЮ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ

Проведенная в последнее время расшифровка последовательностей лактозного оператора и промотора сразу позволила понять, почему связывание лактозного репрессора с соответствующим оператором препятствует инициации синтеза лактозной мРНК (рис. 14-12). Участок ДНК длиной в 21 пару оснований, образующий оператор, включает точку начала синтеза лактозной мРНК (рис. 14-4). Таким образом, лактозный промотор слегка перекрывается с оператором, и поэтому связанный лактозный репрессор стерически препятствует связыванию РНК-полимеразы с лактозным промотором. Такое перекрывание не означает, что репрессор узнает ту же последовательность оснований, что и РНК-полимераза. Действительно, если бы лактозный репрессор обладал способностью связываться с теми же участками, на которых РНК-полимераза начинает синтез, возникла бы пастоящая неразбериха. Однако многие основания в промоторах не относятся к участкам, узнаваемым РНК-полимеразой (см. ниже), поэтому, вообще говоря, оператор и промотор могут и перекрываться. Действительно, как мы увидим в гл. 15, операторы и промоторы в ДНК фага λ сильно перекрываются.

ЛАКТОЗНЫЙ ПРОМОТОР СОСТОИТ ПРИМЕРНО ИЗ 80 ПАР ОСНОВАНИЙ

В лактозном промоторе было идентифицировано два функционально различных участка. Один из них — участок взаимодействия с РНК — непосредственно участвует в первоначальном связывании с полимеразой, тогда как другой — БАК-участок, расположенный более дистально по отношению к оператору,— отвечает за связывание комплекса цАМФ — БАК (рис. 14-13). Пока неизвестно точно, какие из 40 пар оснований БАК-участка непосредственно связываются с БАК, но всей вероятности, это набор из 16 симметрично расположенных пар оснований в положениях от —52 до —67, поскольку БАК — димерная молекула. Неизвестно также, к каким именно основаниям первоначально прикрепляется РНК-полимераза. Все промоторы с известной последовательностью содержат почти те же пары оснований, что и участок лактозного промотора вблизи места начала транскрипции, состоящий из семи пар оснований в положениях от —6 до —12 (рис. 14-15). Однако фрагменты ДНК, содержащие такую последовательность, не связывают полимеразу, если они не содержат также основания, лежащие на расстоянии 25 пар (в положениях от —25 до —35) от первой транскрибируемой пары оснований (которая соответствует положению 1). Особенно важной для функционирования лактозного промотора может оказаться АТ-богатая последовательность оснований (в положениях от —25 до —35), находящаяся между двумя

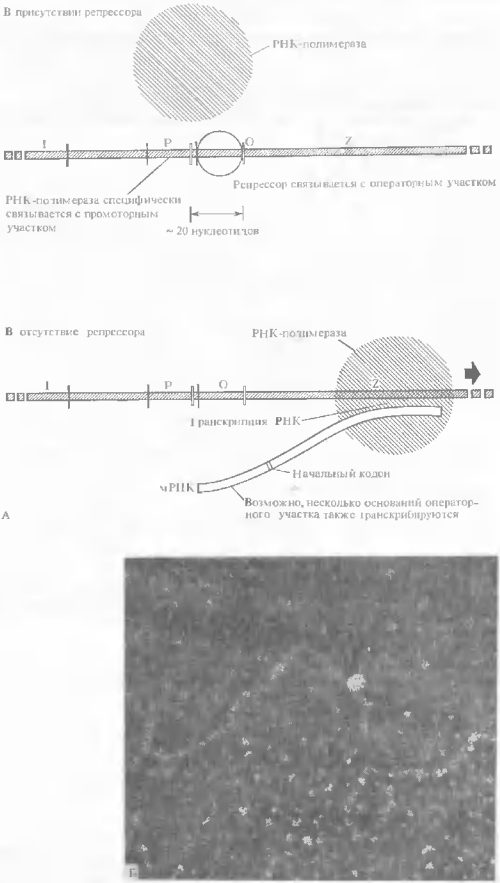


Рис. 14-12. *А*. Влияние репрессора на связывание РНК-полимеразы с промотором лактозного оперона. *Б*. Электронная микрофотография β-галактозидазного (лактозного) репрессора, специфически связанного с оператором лактозного оперона. (С любезного разрешения д-ра Гриффитса, физический факультет Корнельского университета.)

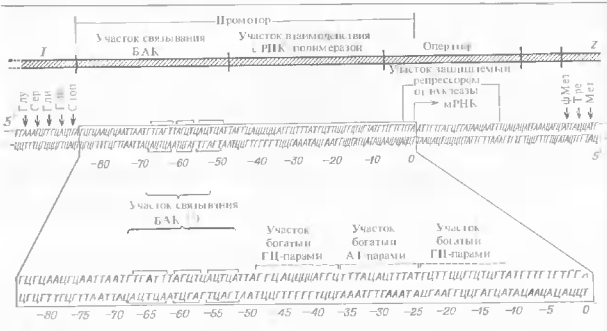


Рис. 14-13. Последовательность промотора *E. coli*.
Показаны также операторные последовательности, с которыми он перекрывается

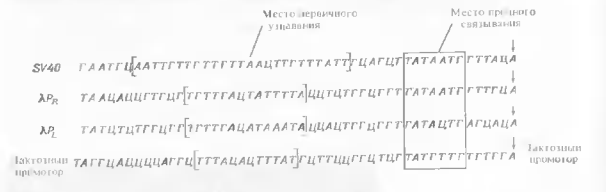


Рис. 14-14. Участки взаимодействия РНК-полимеразы с промоторами лактозного оперона, фага λ (промоторы P_R и P_L) и вирус SV-40. Стрелками указаны точки начала транскрипции; гомологичные участки заключены в скобки

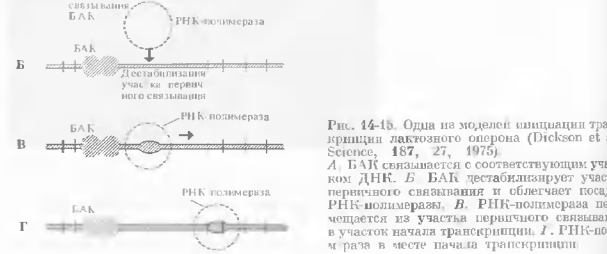


Рис. 14-15. Одна из моделей инициации транскрипции лактозного оперона (Dickson et al., Science, **187**, 27, 1975).
А. БАК связывается с соответствующим участком ДНК. *Б*. БАК дестабилизирует участок первичного связывания и облегчает посадку РНК-полимеразы. *В*. РНК-полимераза перемещается из участка первичного связывания в участок начала транскрипции. *Г*. РНК-полимераза в месте начала транскрипции

ГЦ-богатыми последовательностями. Поскольку спонтанное расхождение цепей АТ-богатых участков происходит чаще, чем ГЦ-богатых участков, можно предположить, что первоначально РНК-полимераза связывается с АТ-богатым участком и что частота, с которой происходит такое связывание, зависит от длины прилегающих ГЦ-богатых последовательностей. Расположение АТ-богатых участков в четырех полностью расшифрованных промоторных последовательностях (рис. 14-14) варьирует. Не исключено, что РНК-полимераза после первоначального связывания смещается до тех пор, пока не «сядет» на стартовый участок (рис. 14-15), включающий основания от —12 до —6. Есть ли необходимость в таком смещении, неясно. Не следует забывать, что РНК-полимераза достаточно велика и участок ее связывания вполне может на 30—40 пар оснований отстоять от места расположения активного центра, где происходит синтез фосфодиэфирной связи.

Необходимо выяснить, каким образом связывание комплекса цАМФ—БАК способствует прикреплению РНК-полимеразы. Этот далеко не очевидный вопрос осложняется тем, что наиболее вероятный участок связывания БАК удален от середины АТ-богатого участка на 30 пар оснований. Скорее всего нам придется отложить его решение до тех пор, пока не станет известна трехмерная структура БАК. Только тогда можно будет серьезно думать о механизме его действия на молекулярном уровне.

ИЗУЧЕНИЕ РАБОТЫ ПРОМОТОРА in vitro

Важнейшую роль в формировании наших представлений о работе промоторов и операторов сыграли эксперименты по транскрипции in vitro. Если в качестве матрицы in vitro использовали ДНК лактозного (галактозного) оперона, то для связывания РНК-полимеразы и инициации синтеза лактозной (галактозной) мРНК требовалось одновременное присутствие цАМФ и БАК. Если же ДНК-матрица была выделена из мутантных клеток, лактозный оперон которых транскрибировался даже в присутствии глюкозы, то для транскрипции in vitro не требовалось присутствия БАК. Эти эксперименты представляют собой наиболее убедительное доказательство того, что цАМФ и БАК действуют на уровне транскрипции, а не на уровне изменения проницаемости мембраны.

ПОЗИТИВНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ HUT-ОПЕРОНА ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ ФЕРМЕНТОМ ГЛУТАМИНСИНТЕТАЗОЙ

Все белковые факторы, влияющие на выражение лактозного, галактозного, триптофанового оперонов и оперонов фага λ, выполняют только регуляторные функции (регуляторные белки) и не обладают никакими ферментативными активностями. Впрочем, такое разделение функций вряд ли можно теоретически обосновать. В последнее время было обнаружено, что важный клеточный фермент непосредственно влияет на транскрипцию двух оперонов в бактерии *Salmonella typhimurium*. Регулируемые этим белком опероны содержат Hut-гены (гены, ответственные за утилизацию гистидина), которые кодируют четыре фермента, участвующие в расщеплении гистидина. При этом образуется достаточное количество катаболитов для роста в условиях углеродного и (или) азотного голодания (глутамат, формиат и аммоний) (рис. 14-16). Наиболее существенно то, что эти опероны продуцируют соответствующие белки в присутствии гистидина при недостатке углерода или азота. Чтобы понять механизм регуляции этих оперонов, мы должны выяснить, как действует гистидин и каким образом поступает сигнал о недостатке углерода (азота). В настоящее

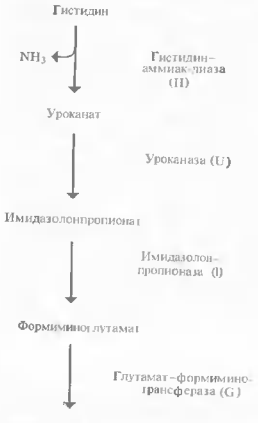


Рис. 14-16. Последовательность реакций ферментативного расщепления гистидина.

время считается, что гистидин действует как условный индуктор, подавляющий негативную регуляцию, осуществляемую Hut-репрессором. Таким образом, сигнал о нехватке углерода или азота может быть воспринят только в том случае, если Hut-репрессор не связан с соответствующим оператором (рис. 14-17). Это имеет глубокий смысл, так как синтез ферментов, кодируемых Hut-опероиами в отсутствие достаточного количества гистидина, был бы весьма расточительным с биологической точки зрения.

Сигнал о недостатке углерода передается таким же образом, как и в случае лактозного оперона: путем повышения концентрации цАМФ и последующей активации Hut-промоторов при связывании комплексов цАМФ — БАК. Если же концентрация цАМФ низка, как, например, в том случае, когда в среде имеется избыток глюкозы, то сигнал о недостатке азота должен быть передан каким-то другим позитивным регуляторным белком, отличным от БАК.

Недавние исследования транскрипции in vitro показали, что активирующим белком для синтеза мРНК Hut-оперонов является активная глутаминсинтетаза. Этот фермент в активной неаденилированной форме присутствует в клетке в большом количестве в условиях недостатка азота, а в условиях избытка азота обнаруживается в неактивной аденилированной форме. Таким образом, Hut-опероны получают сигнал о недостатке азота при связывании глутаминсинтетазы с соответствующим промотором.

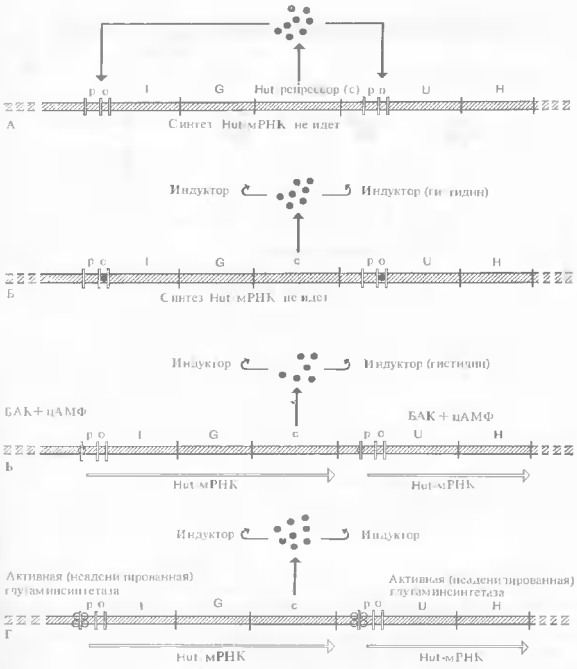


Рис. 14-17. Схема организации двух оперонов Hut *Salmonella typhimurium* и их регуляции при участии взаимодействующих позитивных и негативных белковых факторов.

БЕЛОК, КОТОРЫЙ МОЖЕТ ОСУЩЕСТВЛЯТЬ КАК ПОЗИТИВНУЮ, ТАК И НЕГАТИВНУЮ РЕГУЛЯЦИЮ

Более загадочна регуляция ферментов арабинозного оперона (ara) В клетках *E. coli*, растущих в отсутствие арабинозы, три фермента, участвующих в ее расщеплении, присутствуют в ничтожных количествах. Но при добавлении арабинозы количество всех этих ферментов одновременно возрастает. Этот процесс индукции контролируется четвертым геном «С», который

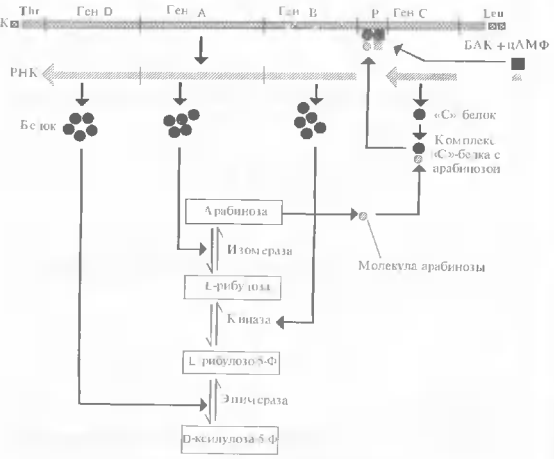


Рис. 14-18. Схема арабинозного оперона *E. coli* как пример позитивной регуляции.

находится вблизи трех других генов и отделен от них только промотором арабинозного оперона (рис. 14-18). Поскольку генетический анализ показал, что в «C»-гене возможны нонсенс-мутации, предполагается, что его продуктом должен быть какой-то белок, связывающийся с арабинозой. Однако этот белок является не обычным репрессором, поскольку известно, что если в результате делеции гена «C» он не синтезируется, то индукция арабинозного оперона невозможна. Поэтому предполагают, что после соединения с арабинозой продукт гена «C» позитивно влияет на арабинозный промотор подобно БАК. К тому же арабинозный оперон относится к чувствительным к глюкозе оперонам, и, следовательно, синтез мРНК на нем зависит от связывания БАК с арабинозным промотором. Таким образом, для интенсивного функционирования арабинозного оперона требуются одновременно два позитивных регуляторных сигнала, один из которых сообщает о присутствии арабинозы, а другой — об отсутствии глюкозы.

Сначала казалось, что открытие мутантов по «C»-белкам (C^c), способных к конститутивному синтезу благодаря активированию «C»-белков при связывании их с каким-то нормальным внутриклеточным метаболитом, не противоречит изложенной выше гипотезе. Предполагалось, что диплоидные клетки, содержащие один ген C^+ и один ген C^c, будут синтезировать белки арабинозного оперона в отсутствие арабинозы. Однако на самом деле C^+-ген препятствовал действию его C^c-аллеля. Кажется

вероятным, что «С»-белок в отсутствие арабинозы сохраняет способность связываться с арабинозным промотором, но в этом случае он действует негативно, как если бы он был репрессором. Итак, «С»-белок обладает способностью действовать позитивно или негативно в зависимости от того, связан он с индуктором или нет.

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ТРИПТОФАНОВОГО ОПЕРОПА ДВУМЯ РАЗЛИЧНЫМИ РЕГУЛЯТОРНЫМИ УЧАСТКАМИ

Первоначально предполагали, что синтез пяти ферментов триптофанового оперона (*trp*; см. рис. 8-9) также контролируется прежде всего регуляторными белками, взаимодействующими с промоторно-операторными участками. В данном случае важно отметить, что транскрипция пяти последовательных триптофановых генов (рис. 14-19) необходима только тогда, когда не хватает триптофана. Таким образом, триптофан действует не как индуктор, а как корепрессор, активирующий специфический репрессор, который приобретает способность связываться с триптофановым оператором и предупреждать транскрипцию соответствующего оперона. Следовательно, в отсутствие триптофана триптофановый оператор свободен и на прилегающем промоторе может начаться синтез триптофановой мРНК. Однако неожиданно оказалось, что молекула мРНК триптофанового оперона, синтез которой начинается таким образом, не обязательно достигает своей полной длины. Наоборот, рост большинства молекул триптофановой мРНК останавливается даже до того, как начнется транскрипция первого триптофанового гена (*trp E*).

Ключ к пониманию столь странного результата дали исследования последовательности оснований 5'-конца триптофановой мРНК. Обнаружилось, что промотор и оператор отделены от *trp E* участком длиной в 161 пару оснований. Этот участок (лидер) содержит ослабляющую последовательность, или аттенуатор (в положениях 123—150), на которой примерно 90% молекул РНК-полимеразы прекращают элонгацию, в результате чего образуется большое число фрагментов длиной в 140 пар нуклеотидов

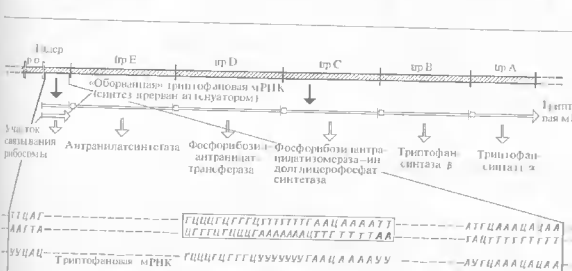


Рис. 14-19. Положение нетранслируемого участка, считываемого в начале мРНК (лидера), относительно структурных генов в триптофановом опероне *E. coli*.

В прямоугольной рамке участки, симметрия второго порядка в последовательности, где РНК-полимераза прекращает синтез РНК (в аттенуаторе).

(рис. 14.19). Хотя некоторая часть молекул РНК-полимеразы проходит через аттенуатор, это событие становится частым только при действии на него особого регулятора. Детальный механизм этого молекулярного сигнала пока неизвестен, хотя выяснено, что вероятность прохождения РНК-полимеразы через аттенуатор обратно пропорциональна содержанию триптофана. Количество триптофана влияет каким-то образом (непосредственно или косвенно) на регулятор, осуществляемую триптофановым репрессором, и регуляторный механизм, действующий в области аттенуатора. Очевидно, сосуществование двух различных регуляторных участков позволяет более тонко регулировать внутриклеточный уровень триптофана путем двухэтапного ответа на постепенно увеличивающуюся нехватку триптофана: первоначальная реакция заключается в том, что репрессор перестает связываться с оператором; более тяжелое триптофановое голодание приводит к ослаблению действия аттенуатора.

До сих пор неясно, как считывается аттенуатор в норме. Из-за того что он очень богат АТ-парами (рис. 14.19), он, возможно, не требует участия ρ-фактора (см. стр. 287), хотя в последнее время получены косвенные генетические данные, свидетельствующие о том, что ρ-фактор может участвовать в терминации в области аттенуатора. Как бы то ни было, в блокировании действия аттенуатора может участвовать какой-то антитерминирующий белок (анти-ρ?), специфичный к данному аттенуатору. Видимо, уместно вспомнить, что имеются надежные данные о существовании белка-антитерминатора, играющего ключевую роль в транскрипции фага λ (стр. 415). Вполне возможно, что по мере изучения новых оперонов обнаружится много других примеров регуляции по тому же механизму, что и в триптофановом опероне. Уже имеются данные о существовании ослабляющих участков — аттенуаторов, расположенных перед первыми структурными генами в гистидиновом и изолейцин-валиновом оперонах.

До сих пор не установлено, играет ли РНК, синтез которой прекращается в области аттенуатора, какую-нибудь функциональную роль. Имеются косвенные данные, указывающие на то, что эта РНК может кодировать полипептид длиной около 40 аминокислот в начале этой РНК расположен участок сильного связывания рибосомы, содержащий инициирующий кодон АУГ. Таким образом, большое количество этой короткой РНК может синтезироваться в ответ на существующую потребность в больших количествах кодируемого ею короткого пептида по сравнению с полипептидами, непосредственно участвующими в биосинтезе триптофана. По всей вероятности, короткий полипептид может действовать подобно «*N*»-белку фага λ (стр. 415), который кодируется сходной последовательностью ДНК, предшествующей собственно гену, и действует как специфический антитерминатор.

БЕЛКИ, КОДИРУЕМЫЕ ПОЛИЦИСТРОННОЙ МОЛЕКУЛОЙ мРНК, МОГУТ СИНТЕЗИРОВАТЬСЯ В РАЗНЫХ КОЛИЧЕСТВАХ

Белки, кодируемые одной и той же полицистронной молекулой мРНК, нередко требуются клетке в неодинаковых количествах, и этим, по-видимому, также объясняются колебания в содержании различных клеточных белков. Проиллюстрируем это положение на примере белков лактозного оперона. Дело в том, что в клетке синтезируется гораздо больше молекул β-галактозидазы, чем галактозидпермеазы и галактозидацетилазы. Они образуются в соотношении 1 : $^1/_2$: $^1/_5$. Это может означать, что рибосомы прикрепляются к разным начальным точкам трансляции данной молекулы мРНК с различной скоростью в зависимости от начальной последовательности оснований. Другая возможность состоит в том, что они прикрепляются только к участку начала трансляции гена β-галактозидазы,

а трансляция двух последующих генов зависит от частоты, с которой рибосома отделяется от матрицы после прочтения сигнала терминации полипептидной цепи. Последняя гипотеза прекрасно согласуется с наблюдением, что ген β-галактозидазы транслируется чаще всего, а ген ацетилазы — реже всего. Еще один фактор, который, очевидно, должен влиять на трансляцию,— существование кодонов, для которых соответствующие тРНК имеются в ограниченных количествах. По всей вероятности, в местах расположения таких кодонов рибосомы останавливаются в ожидании столкновения с необходимой тРНК. Однако следует отметить, что до сих пор нет доказательств существования таких тРНК. Как бы то ни было, разумно предположить, что существуют какие-то механизмы, обеспечивающие различную скорость считывания на разных участках одной и той же молекулы мРНК. Согласованное образование метаболически близких ферментов, безусловно, дает клетке большие преимущества; вместе с тем нет никаких оснований утверждать, что при этом образуются одинаковые количества молекул этих ферментов. Образование одних и тех же количеств разных ферментов было бы полезно только в том случае, если бы удельные каталитические активности (число оборотов) близких ферментов были одинаковы. Однако значения числа оборотов различных ферментов сильно варьируют.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ мРНК ЧАСТО МЕТАБОЛИЧЕСКИ НЕУСТОЙЧИВЫ

Когда к растущим клеткам добавляют корепрессор (или индуктор), скорость синтеза соответствующих белков быстро изменяется. Столь же быстро она изменяется и при удалении соответствующих веществ из среды. Такая быстрая адаптация к изменениям окружающей среды возможна не только потому, что рост требует постоянного синтеза новых молекул мРНК, но главным образом потому, что многие типы бактериальной мРНК метаболически нестойки. Среднее время жизни большей части

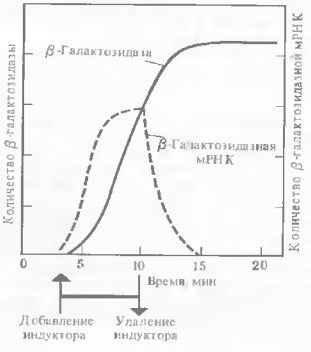


Рис. 14-20. Быстрое увеличение (или уменьшение) количества β-галактозидазной мРНК при добавлении индуктора в среду (или удалении его из среды).
В этом эксперименте клетки *E. coli* выращивали при 37°С и время генерации составляло 40 мин.

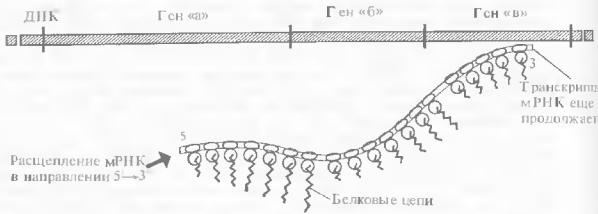


Рис. 14-21. Расщепление мРНК в направлении 5′ → 3′.
Расщепление длинных молекул мРНК с 5′-конца часто начинается еще до того, как закончится синтез 3′-конца.

молекул мРНК *E. coli* составляет около 2 мин при 37° С, по истечении этого срока они подвергаются ферментативному разрушению. Образующиеся при этом нуклеотиды затем вновь фосфорилируются до высокоэнергетических трифосфатов и используются для синтеза новой мРНК.

Таким образом, каждые несколько минут происходит почти полная замена матриц для многих клеточных белков. Например, после добавления к клеткам *E. coli* подходящих β-галактозидов уже через несколько минут достигается максимальная (при данном уровне индуктора) скорость синтеза β-галактозидазы. Если бы все молекулы мРНК были устойчивыми, то скорость синтеза возрастала бы до максимума только после надлежащего разбавления предобразованной мРНК в процессе клеточного роста. Метаболической неустойчивостью лактозной мРНК объясняется и то, что при удалении β-галактозидов синтез β-галактозидазы быстро прекращается и не возобновляется до тех пор, пока в этом не возникнет необходимость (рис. 14-20).

Судя по имеющимся данным, среднее время жизни мРНК отдельных типов может значительно различаться. Если это верно, то это означает, что время жизни мРНК само должно быть детерминировано генетически, т. е. что какая-то последовательность нуклеотидов (возможно, на одном из концов молекулы мРНК) определяет вероятность ферментативного разрушения данной молекулы.

Ферментативный механизм разрушения отдельных молекул мРНК до сих пор неизвестен, хотя ясно, что расщепление идет в направлении 5′ → 3′ (рис. 14-21). Тот конец, который первым синтезируется, первым же и расщепляется. Такое расщепление не будет приводить к синтезу неполных белковых цепей. Если бы расщепление происходило в противоположном направлении 3′ → 5′, то концы многих мРНК разрушались бы до того, как рибосомы транслировали их последовательности. Предполагают, что пока молекулы мРНК связаны с рибосомами, они стабильны. После того как 5′-концы молекул мРНК закончат свое продвижение вдоль рибосомы, возможны два варианта их дальнейшей судьбы: либо к ним прикрепятся новые рибосомы, либо они разрушатся под действием ферментов деградации.

БЕЛКИ, КОТОРЫЕ НЕ НАХОДЯТСЯ ПОД НЕПОСРЕДСТВЕННЫМ КОНТРОЛЕМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

В клетке имеется множество белков, количество которых не зависит от окружающей среды. Например, количество ферментов, расщепляющих глюкозу в клетке *E. coli*, существенно не изменяется, если к среде добавляют глюкозу или удаляют ее из среды. Таким образом, эти ферменты являются конститутивными ферментами, скорость синтеза которых не регулируется ни индукторами, ни корепрессорами. Мы не знаем, почему это так; казалось бы, клетки, способные изменять количество этих ферментов, должны были бы иметь преимущество при отборе. Следует, конечно, учитывать, что индуктор или корепрессор могут быть обнаружены в будущем. Вместе с тем в данном случае вполне разумно было бы задать следующий вопрос: должны ли все гены контролироваться репрессором и оператором или же количественное соотношение белков может регулироваться каким-нибудь иным способом?

Ответ на этот вопрос довольно очевиден. Легко представить себе конститутивный синтез любого фермента и в больших, и в малых количествах. Интенсивный конститутивный синтез наблюдается при мутациях, вызывающих утрату репрессора или оператора. В результате не подлежащийся регуляции синтез соответствующих белков происходит с такой же скоростью, как и в оптимальных условиях индукции или дерепрессии. Следовательно, репрессоры и операторы сами по себе не нужны для синтеза молекул мРНК.

В целом уровень конститутивного синтеза зависит от: 1) скорости, с которой данная молекула мРНК может синтезироваться в отсутствие репрессоров или оператора (или операторов); в настоящее время известно, что эта скорость зависит от последовательности промотора; 2) скорости прикрепления рибосом к стартовой точке в мРНК; 3) скорости, с которой считывается сама матрица; 4) времени жизни данной матрицы.

К сожалению, из-за того что мы еще очень мало знаем о факторах, влияющих на все эти скорости, трудно оценить абсолютное или хотя бы относительное значение каждой из них. Тем не менее представление о влиянии множества факторов на скорость конститутивного синтеза позволяет предположить, что синтез многих белков, требующихся в небольших количествах, может регулироваться без участия репрессоров и операторов.

СИНТЕЗ РЕПРЕССОРА НАХОДИТСЯ ОБЫЧНО ПОД КОНТРОЛЕМ ПРОМОТОРА, А НЕ ОПЕРАТОРА

В каждый данный момент времени в одной клетке *E. coli* имеется всего около 1000 молекул мРНК. Минимальное число оперонов, регулируемых при участии корепрессоров или индукторов, оценивается в 100—200. Так что трудно себе представить, что для каждого репрессора существует более 1—2 специфических молекул мРНК. Большее число молекул мРНК, кодирующих репрессор (регуляторных мРНК), сильно ограничило бы количество мРНК, кодирующей необходимые структурные белки и ферменты. Отсюда ясно, что синтез регуляторной мРНК, по-видимому, тщательно регулируется. Такая регуляция не может, однако, осуществляться с помощью новых репрессоров, так как для репрессии синтеза каждого репрессора понадобилось бы бесконечно много различных репрессоров. Скорее всего либо сами репрессоры способны подавлять собственный синтез, либо они синтезируются конститутивно. В случае β-галактозидазной системы справедливо второе объяснение, и ряд мутаций промотора уже был картирован. В результате некоторых из этих мутаций число

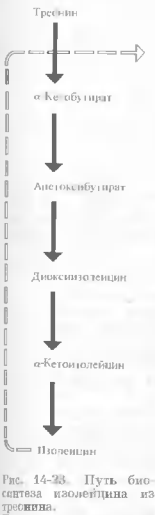


Рис. 14-23. Путь биосинтеза изолейцина из треонина.
Пунктирная линия показывает, что изолейцин подавляет фермент (треониндезаминазу), который катализирует превращение треонина в α-кетобутират.

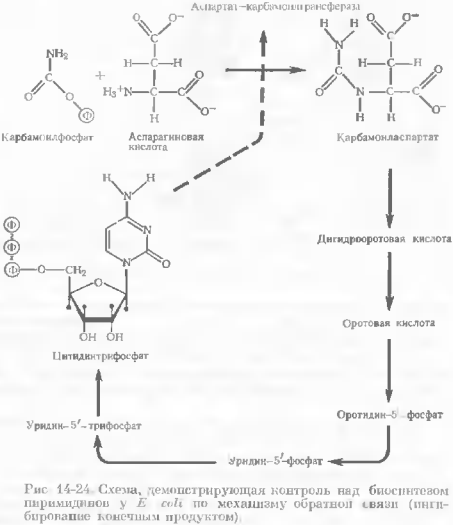


Рис. 14-24. Схема, демонстрирующая контроль над биосинтезом пиримидинов у *E. coli* по механизму обратной связи (ингибирование конечным продуктом).

E. coli, растущим на минимальной среде с глюкозой, добавить изолейцин. В них немедленно прекратится синтез (или будет подавлена функция?) молекул мРНК, кодирующих те ферменты, которые участвуют в биосинтезе изолейцина. Однако при отсутствии дополнительного контрольного механизма предобразованные ферменты все еще будут синтезировать изолейцин, хотя это уже и не нужно, поскольку изолейцин поступает извне. В действительности такой бесполезный синтез почти никогда не наблюдается, так как высокая концентрация изолейцина блокирует активность фермента, катализирующего первую стадию его биосинтеза, т. е. превращение треонина в α-кетобутират (рис. 14-23). Торможение происходит благодаря связыванию изолейцина с треониндезаминазой, так как связанный фермент оказывается неспособным катализировать упомянутое превращение. Для полного подавления активности фермента необходимы относительно высокие концентрации изолейцина, потому что фермент связывается непрочно и обратимо. Такое весьма специфичное подавление

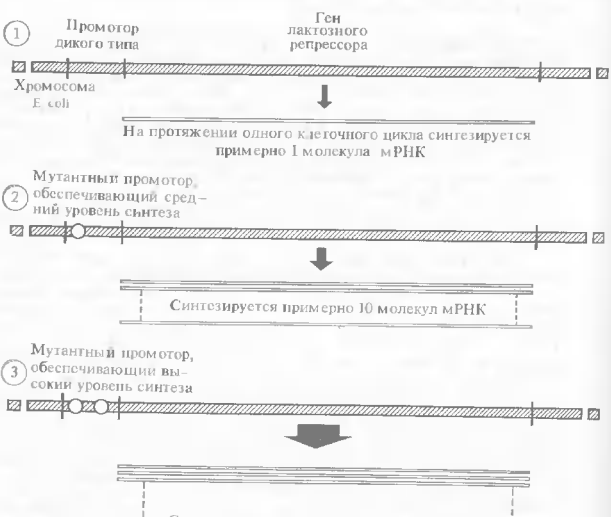


Рис. 14-22. Увеличение числа молекул мРНК лактозного репрессора при мутациях промотора.

Предполагается, что промотор, обеспечивающий высокий уровень синтеза, возникает в результате аддитивного действия нескольких мутаций.

молекул лактозного репрессора увеличивается более чем в 50 раз по по сравнению с числом молекул в клетках дикого типа (рис. 14-22).

Однако в случае Hut-оперона репрессор кодируется одним из двух оперонов, работу которых он регулирует (рис. 14-17). Таким образом, Hut-репрессор специфически подавляет собственный синтез.

РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКА ПО ТИПУ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

Каталитическая активность многих белков изменяется после присоединения определенных низкомолекулярных веществ. Таким путем может быть блокирована активность ферментов, которые в данный момент не требуются. Посмотрим, например, что произойдет, если к клеткам

Рис. 14-25. Схема, поясняющая, каким образом присоединение ретроингибитора может вызвать аллостерическую трансформацию фермента и тем самым ингибировать фермент.

получило название *подавления по типу обратной связи* (конечным продуктом), в этом случае само накопление определенного продукта предотвращает его дальнейшее образование. Блокируется только первое звено в той или иной метаболической цепи, благодаря этому не происходит накопления ненужных промежуточных продуктов, а следовательно, не возникает и необходимости в подавлении всех остальных ферментов цепи.

Последний ферментативный этап синтеза того конечного продукта, который выполняет роль ингибитора всей цепи, часто отделен целым рядом реакций от субстрата (или продукта) первой стадии биосинтеза (рис. 14-24). Поэтому структура ингибитора может иметь мало общего со структурой субстрата угнетаемого фермента, и, естественно, не приходится ожидать, что такой ингибитор будет реагировать с активным центром фермента. Можно полагать, что он обратимо взаимодействует с другим центром фермента и, по-видимому, изменяет конформацию фермента (аллостерическая трансформация), так что в результате фермент инактивируется, утрачивая способность соединяться с собственным субстратом (рис. 14-25). Подобные белки, в которых форма молекулы может меняться в результате присоединения определенных низкомолекулярных веществ не к области активного центра, а к какому-нибудь другому участку, получили название *аллостерических белков*. Соответствующие соединения, осуществляющие аллостерическую трансформацию, называют *аллостерическими эффекторами*. Мы пока располагаем лишь весьма скудными сведениями о природе химических сил, специфично связывающих ингибитор и соответствующий белок. Как и для взаимодействия репрессор — корепрессор, здесь также допускается участие только слабых вторичных связей (водородных, ионных или обусловленных вандерваальсовым притяжением), полагают, что ковалентные связи не образуются. Поэтому торможение такого типа быстро снимается, если концентрация конечного продукта падает до низкого уровня.

ВЫВОДЫ

Клетки обладают специальными механизмами, которые регулируют скорость синтеза белков в соответствии с потребностью. Лишь совсем недавно мы начали кое-что понимать в молекулярных основах этих процессов. Большинство имеющихся сведений относится к бактериальным клеткам,

главным образом к *E. coli*. Бактерии содержат много ферментов, синтезируемых с разной скоростью в зависимости от состава питательной среды. Вещества, содержащиеся в среде (корепрессоры или индукторы), определяют скорость синтеза различных белков, контролируя синтез соответствующих молекул мРНК. Корепрессоры (или индукторы) действуют, связываясь с определенными молекулами — репрессорами. Репрессоры находятся в активной форме, когда они связаны с корепрессором, и в неактивной, когда они связаны с индуктором. Активные репрессоры действуют, связываясь с определенными участками ДНК (операторами). Это связывание в свою очередь препятствует специфическому связыванию РНК-полимеразы с ее участками связывания на ДНК (с промоторами) и таким образом останавливает инициацию синтеза мРНК. Участок ДНК, контролируемый отдельным промотором,— оперон — часто включает несколько генов с близкими метаболическими функциями (т. е. продуцирует ряд ферментов, последовательно принимающих участие в синтезе определенной аминокислоты или нуклеотида). Неизвестный механизм обеспечивает различный уровень синтеза разных белков, кодируемых одной и той же полицистронной молекулой мРНК; некоторые белки образуются в гораздо большем количестве, чем другие.

Существует также множество позитивных регуляторных белков, которые, взаимодействуя со специфическими промоторами, стимулируют одновременно связывание РНК-полимеразы и инициацию синтеза специфической мРНК. Регуляция оперона не обязательно должна быть только позитивной или только негативной; многие опероны отвечают и на те, и на другие сигналы. Один из важнейших позитивных регуляторных белков — БАК — связывается с ДНК только в комплексе с цАМФ. Такое связывание представляет собой сигнал, означающий, что концентрация цАМФ высока и, следовательно, глюкозы расщепляется очень мало. Таким образом, сигнал, передаваемый посредством БАК, обеспечивает использование в метаболических процессах сахаров, подобных лактозе, только в условиях полного израсходования глюкозы.

В течение долгого времени считалось, что различные позитивные и негативные регуляторные белки по своей природе являются исключительно регуляторами и не обладают ферментативной активностью. Однако в последнее время было обнаружено, что глутаминсинтетаза — важный фермент, участвующий в ассимиляции азота органическими молекулами,— действует также как позитивный регуляторный белок. При связывании со специфическими промоторами он передает сигнал об истощении запасов азота и тем самым стимулирует синтез ферментов, расщепляющих аминокислоты до удобных для биосинтеза азотсодержащих молекул.

Клетки, обладающие метаболически нестабильными молекулами мРНК, могут быстро изменять набор белков, которые они синтезируют, в ответ на радикальные изменения окружающей среды (например, изменения в содержании питательных веществ). Это особенно справедливо в отношении бактерий, у которых среднее время жизни большинства молекул мРНК, видимо, не превышает 3 мин.

Скорость синтеза ряда белков не регулируется репрессорами и индукторами (конститутивный синтез). Некоторые белки синтезируются постоянно с высокой скоростью, другие — с очень низкой. Такая регуляция осуществляется благодаря особым последовательностям нуклеотидов, образующих их промоторы. Некоторые промоторные последовательности обладают высоким сродством к РНК-полимеразе, другие — низким. Поскольку промоторы репрессоров обладают низким сродством, репрессоры обычно синтезируются в ничтожных количествах.

Регуляция метаболизма клетки быстро достигается также путем торможения ферментов конечным продуктом. Конечный продукт того или иного метаболического пути может обратимо взаимодействовать с фер-

ментом, катализирующим первый этап этого пути. В результате такого взаимодействия фермент переходит в неактивную форму. Предполагают, что ингибитор, действующий по механизму обратной связи, связывается не с активным центром фермента, а с каким-то другим его участком, в результате чего конформация молекулы фермента меняется. Белки, конформация и активность которых меняются при взаимодействии с другими молекулами, получили название аллостерических белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Wainwright S., Control Mechanisms and Protein Synthesis, Columbia University Press, 1972. Учебник повышенной сложности, в котором рассмотрены генетические регуляторные процессы в клетках низших и высших организмов.

The Lactose Operon, Beckwith J. and Zipser D. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, 1970. Несколько устаревший, но все еще очень полезный вводный курс по плазмиде изученному оперону.

Miller J., Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972. (Дж. Миллер, Эксперименты в молекулярной генетике, изд-во «Мир», М., 1976.) Превосходное сочетание теории и лабораторных исследований в первую очередь на примере лактозного оперона.

Jacob F., Monod J., Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins, J. Mol. Biol., 3, 318 (1961). Прекрасный обзор, объединяющий концепцию мРНК с проблемой регуляции белкового синтеза.

Gilbert W., Muller-Hill B., Isolation of the Lac Repressor, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 56, 1891 (1966). Описание выделения первого репрессора.

Ptashne M., Specific Binding of the λ Phage Repressor to λ DNA, Nature, 214, 232 (1967). Первое доказательство того, что репрессоры действуют, связываясь с ДНК.

Gilbert W., Maizels N., Maxam A., Sequences of Controlling Regions of the Lactose Operon, Cold Spring Harbor Symposium, XXXVIII, 845 (1974). Расшифровка первой операторной последовательности.

Dickson R. C., Abelson J., Barnes W. M., Reznikoff W. S., Genetic Regulation: The Lac Control Region, Science, 187, 27 (1975). Последовательность лактозного промотора и предполагаемый механизм его функционирования.

Maniatis T., Ptashne M., Backman K., Kleit D., Flashman S., Jeffrey A., Mauer R., Sequences of Repressor Binding Sites in the Operators of Bacteriophage λ, Cell, 5, 109 (1975). Детали поразительно сложных и интересных многочисленных регуляторных участков фага λ.

Nakanishi S., Adhya S., Gottesman M., Pastan I., Studies on the Mechanism of Action of the Gal Repressor, J. Biol. Chem., 248, 5937 (1973). Эксперименты in vitro по взаимодействию цАМФ, БАК и галактозного репрессора в процессе регуляции функционирования галактозного промотора.

Rose J. K., Squires C. G., Yanofsky L., Yang H., Zubay G., Regulation of in vitro Transcription of the Tryptophan by Purified RNA Polymerase in the Presence of Partially Purified Repressor and Tryptophan, Nature New Biology, 245, 133 (1973). Описание экспериментов in vitro, подтверждающих, что триптофановый оперон регулируется негативно.

Smith G. R., Magasanik B., Nature and Self-Regulated Synthesis of the Repressor of the Hut Operons in *Salmonella Typhimurium*, Proc. Natl. Acad. Sci., 68, 1493 (1971). Доказательство существования репрессора, регулирующего скорость собственного синтеза.

Tyler B., DeLeo A. B., Magasanik B., Activation of Transcription of Hut DNA by Glutamine Synthetase, Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 225 (1974). Очень важная работа, в которой показано, что клеточный фермент непосредственно регулирует работу соответствующих опероном путем связывания с их промоторами.

Magasanik B., Prival M. J., Brenchley J. E., Tyler B. M., DeLeo A. B., Streicher S. L., Bender R. A., Paris C. G., Glutamine Synthetase as a Regulator of Enzyme Synthesis, Current Topics in Cellular Regulation, Horecker B. L. and Stadtman E. (eds.), 8, 119 (1974), Academic Press. Обзор, демонстрирующий ключевую роль глутаминсинтетазы во внутриклеточном метаболизме.

Greenblatt J., Schlsif R., Arabinose «C» Protein: Regulation of the Arabinose Operon in vitro, Nature New Biology, 223, 166 (1974). Прямое доказательство позитивного действия основного регуляторного белка арабинозного оперона.

Morse D. E., Mostellor R. D., Yanofsky C., Dynamics of Synthesis, Translation and Degradation of trp Operon Messenger RNA in *E. coli*, Cold Spring Harbor Symposium of Quant. Biol., XXXIV, 729 (1969). Наиболее полное среди выполненных к настоящему времени работ исследование кинетики синтеза и расщепления мРНК.

Bertrand K., Korn L., Lee F., Platt T., Squires C. L., Squires C., Yanofsky C., New Features of the Regulation of the Tryptophan Operon, Science, 189, 22 (1975). Обсуждается новый тип регуляторного участка в триптофановом опероне *E. coli*.

Monod J., Changeux J. P., Jacob F., Allosteric Proteins and Cellular Control Systems, J. Mol. Biol., 6, 306—329 (1963). Важный ранний обзор, посвященный проблеме аллостерии.

Gerhart J. C., Pardee A. B., The Effect of the Feedback Inhibitor, CTP, on Subunit Interactions in Aspartate Transcarbamylase. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., XXVIII, 491 (1963). Первые итоги изучения ферментной системы, сыгравшей важную роль в создании концепции аллостерии.

Gerhart J. C., A Discussion of the Regulatory Properties of Aspartate Transcarbamylase from *E. coli*, Current Topics in Cellular Regulation, Horecker B. and Stadtman E. (eds.), 2, 275 (1970), Academic Press. Описание наиболее интенсивно изучавшегося аллостерического фермента.

ГЛАВА

15 Репликация вирусов

Вирусы привлекали пристальное внимание генетиков, потому что казались необычайно простыми объектами для изучения. Сначала думали, что вирусы представляют собой «обнажепные» гены; со временем становилось все более очевидным, что правильнее всего «равнивать их с «обнаженными» хромосомами. В процессе изучения выяснилось, что многие вирусы, казавшиеся когда-то столь несложными организмами, содержат несколько сотен генов. По мере того как становились ясными механизмы, при помощи которых бактерии препятствуют синтезу нежелательных веществ, складывалось впечатление, что для вирусов характерно отсутствие каких бы то ни было регуляторных приспособлений подобного рода. Если это верно, то вирусы должны обладать способностью быстро размножаться, пользуясь «услугами» метаболического аппарата клетки хозяина. Но и эти предположения, рожденные интуицией, оказались неверными. Репликация даже наиболее мелкого из всех вирусов представляет собой чрезвычайно сложную цепь событий, реализуемых лишь с помощью высокоорганизованных систем регуляции, которые обеспечивают в строго определенные моменты жизненного цикла вируса синтез молекул определенного типа. Однако, прежде чем рассмотреть эту проблему детально, остановимся на некоторых более общих принципах строения и размножения вирусов.

СЕРДЦЕВИНА И ОБОЛОЧКА ВИРУСОВ

Размеры и структурная сложность вирусов варьируют в широких пределах. Некоторые вирусы относительно невелики (молекулярный вес порядка нескольких миллионов), тогда как другие приближаются по своим размерам к очень мелким бактериям. В отличие от клеток, в которых содержится как РНК, так и ДНК, все вирусы содержат нуклеиновую кислоту одного типа: либо ДНК, либо РНК. Генетический материал вируса (его нуклеиновая кислота) всегда располагается в центре вирусной частицы. Снаружи его покрывает защитная оболочка (чехол). У некоторых вирусов оболочка устроена довольно сложно: она состоит из нескольких слоев и в состав ее входят различные белки, а также липиды и углеводы (рис. 15-1—15-3). У других вирусов, например у вируса табачной мозаики (ВТМ) или у мелких РНК-содержащих бактериофагов F2, R17 и Qβ, оболочка построена из белка одного типа и не содержит липидов и углеводов.

Все оболочки состоят из большого числа молекул белкового компонента (или компонентов). Эти молекулы определенным образом упакованы, вследствие чего возникает структура либо со спиральной, либо с кубической (или квазикубической) симметрией. У ВТМ приблизительно 2150 одинаковых белковых субъединиц (мол. вес 17 000) располагаются по спирали вокруг длинной молекулы РНК, содержащей около 6000 нуклеотидов (рис. 15-4). Оболочка бактериофагов F2 и R17 построена из 180 белковых

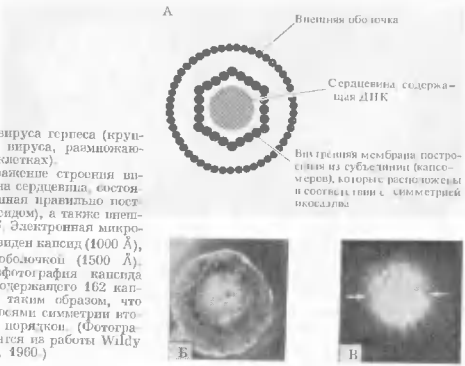


Рис. 15-1. Морфология вируса герпеса (крупного ДНК-содержащего вируса, размножающегося в животных клетках).
А. Схематическое изображение строения вирусной частицы. Показана сердцевина, состоящая из ДНК и окружающая правильно построенной мембраной (капсидом), а также внешняя оболочка частицы. *Б.* Электронная микрофотография, на которой виден капсид (1000 Å), окруженный внешней оболочкой (1500 Å). *В.* Электронная микрофотография капсида (высокое разрешение), содержащего 162 капсомера, расположенных таким образом, что вся структура обладает осями симметрии второго, третьего и пятого порядков. (Фотографии *Б* и *В* воспроизводятся из работы Wildy et al., Virology, **12**, 204, 1960.)

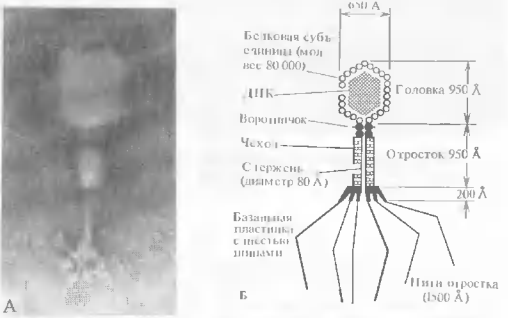


Рис. 15-2. Строение частицы Т-четного фага (Т2, Т4 и Т6).
А. Электронная микрофотография фага Т2 (Home et al., J. Mol. Biol., **1**, 281, 1959).
Б. Схематическое изображение отдельных деталей структуры, выявленных при помощи электронного микроскопа.

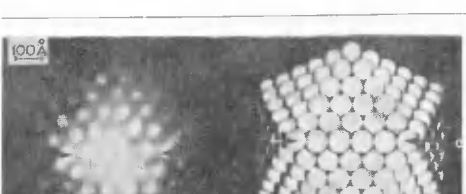


Рис. 15-3. Строение аденовируса (Horne et al., J. Mol. Biol., 1, 86, 1959).
Эти ДНК-содержащие вирусы, размножающиеся в животных клетках, имеют очень правильное строение. *А*. Частица при большом увеличении. Внешняя оболочка построена из 252 капсомеров. *Б*. Модель икосаэдра, снятая в том же ракурсе.

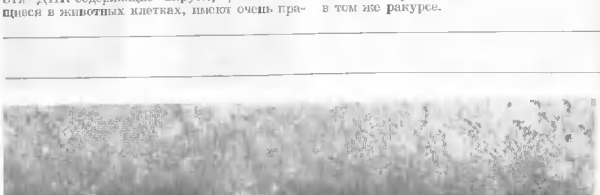


Рис. 15-4. Электронная микрофотография (высокое разрешение) одного из концов частицы ВТМ (Finch, J. Mol. Biol., 8, 872, 1964).
Диаметр частицы равен приблизительно 180 Å, а длина всей частицы 3000 Å. Частица оттенена темным красителем, который проник в центральный канал.

субъединиц (мол. вес $\sim$ 14 000), которые образуют куб, внутри куба находится молекула РНК, содержащая 3000 нуклеотидов.

Использование большого числа одинаковых белковых молекул для построения защитной оболочки — характерная черта всех вирусов. Это объясняется тем, что вирусная частица содержит очень небольшое количество нуклеиновой кислоты. Небольшие размеры хромосомы вируса накладывают ограничение на число аминокислот в кодируемых белках. Так, например, РНК из ВТМ ($\sim$6000 нуклеотидов) может кодировать около 2000 аминокислот, что соответствует белку с мол. весом примерно $2{,}5 \cdot 10^5$; это намного меньше мол. веса белка оболочки ВТМ ($3{,}5 \cdot 10^7$). Следовательно, если бы даже вся РНК ВТМ кодировала белок оболочки (что, разумеется, невозможно), то и тогда для построения оболочки потребова-

лось бы приблизительно 150 одинаковых субъединиц. Именно использование большого числа одинаковых белковых субъединиц является причиной того, что более просто устроенные вирусы, в оболочке которых имеется белок одного типа, обладают либо спиральной, либо кубической (или квазикубической) симметрией. Только эти два типа симметрии допускают регулярную (или квазирегулярную) упаковку идентичных белковых субъединиц, обеспечивающую им фактически одинаковое химическое окружение (если не считать контакта с нуклеиновой кислотой, образующей сердцевину вирусной частицы).

НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА — ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОМПОНЕНТ ВСЕХ ВИРУСОВ

Вирусы дают убедительное свидетельство того, что носителями генетической специфичности являются нуклеиновые кислоты. Нуклеиновые кислоты многих вирусов легко отделяются от белковой оболочки и могут быть получены в высокоочищенной форме. При добавлении таких препаратов к клеткам-хозяевам данного вируса образуются новые инфекционные вирусные частицы, идентичные тем, из которых была получена нуклеиновая кислота (рис. 15-5). Важнейшие эксперименты подобного рода отчетливо показывают, что нуклеиновая кислота вируса является носителем генетической специфичности и контролирует как процесс самовоспроизведения, так и синтез специфических белков оболочки.

Это верно не только для вирусов, содержащих ДНК, но также и для РНК-содержащих вирусов. Первые доказательства инфекционности нуклеиновой кислоты были получены как раз на РНК из ВТМ. До этих опытов многие сомневались в том, что роль генетического материала у ВТМ играет РНК. Дело в том, что подавляющее большинство частиц ВТМ обычно не проявляет инфекционности, как правило, в клетки табачного листа проникает одна частица из миллиона и только она одна дает потомство. Естественно было предположить, что размножаются лишь те

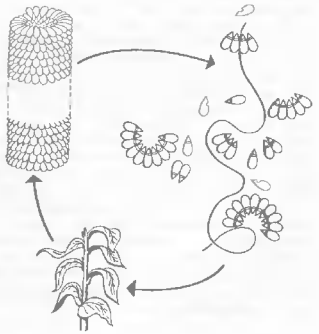


Рис. 15-5. Доказательство генетической роли РНК ВТМ.
Палочковидную частицу ВТМ легко разделить на два компонента — РНК и белок, которые можно испытать по отдельности на способность вызывать инфекцию. Показано, что такой способностью обладают только молекулы РНК. Вирусные частицы, образующиеся при заражении растения чистой РНК, идентичны частицам, образующимся при заражении интактным вирусом.

редкие частицы, которые содержат ДНК. Однако выделение из ВТМ инфекционной РНК устранило все сомнения и однозначно доказало, что последовательность оснований в РНК, подобно последовательности оснований в ДНК, также несет генетическую информацию.

ВИРУСНЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ МОГУТ СУЩЕСТВОВАТЬ КАК В ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ, ТАК И В ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ФОРМЕ

У большинства вирусов молекулы нуклеиновых кислот имеют ту же форму, что и соответствующие нуклеиновые кислоты клетки-хозяина. Известно, например, что все хорошо изученные ДНК-содержащие вирусы (вирус оспы и близкий к нему, но безопасный вирус осповакцины, вирус SV-40 и Т-четные бактериофаги) содержат двухцепочечную ДНК. В отличие от этого в ВТМ, вирусах гриппа, полиомиелита и в бактериофагах F2 и R17 нуклеиновая кислота (РНК) представлена одноцепочечной формой. В то же время известно и несколько групп бактериофагов, у которых ДНК имеет одноцепочечную форму, а также по крайней мере две группы вирусов (реовирусы), содержащих двухцепочечную РНК.

По существу различия между формами не столь глубоки, так как после проникновения в клетку-хозяина одноцепочечная молекула может быстро образовать комплементарную реплику. Главное — это то, что генетическая информация заключена в последовательности нуклеотидов.

СИНТЕЗ ВИРУСНОЙ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И СИНТЕЗ БЕЛКА ПРОИСХОДЯТ НЕЗАВИСИМО ДРУГ ОТ ДРУГА

Истинный ход событий, разыгрывающихся в чувствительной клетке после проникновения в нее вирусной нуклеиновой кислоты, зависит от природы вируса. Особенно важно, какую нуклеиновую кислоту несет данный вирус — ДНК или РНК. Если генетический компонент представлен ДНК, то в процессе размножения вируса ДНК служит матрицей для собственной репликации и для синтеза вирусной РНК, которая необходима, чтобы осуществить синтез специфических вирусных белков. Если же вирус содержит РНК, то молекулы РНК выполняют двоякую матричную функцию, обеспечивая, во-первых, синтез новых копий вирусной РНК и, во-вторых, синтез новых вирусных белков. Однако в обоих случаях результат инфекции оказывается одним и тем же: в клетке образуется большое число новых копий вирусной нуклеиновой кислоты и вирусных белков. Эти новообразованные молекулы в дальнейшем спонтанно агрегируют и образуют зрелые вирусные частицы. Для созревания у большинства вирусов (а может быть, и у всех) не требуется особых ферментов, так как между нуклеиновой кислотой и белком обычно не возникает ковалентных связей. Образуются только слабые нековалентные связи (солевые, водородные, а также связи, обусловленные ванцервааальсовым взаимодействием). Это можно наглядно продемонстрировать на ВТМ. Палочковидные частицы этого вируса легко разделяются на РНК и белок. Если затем в определенных условиях смешать полученные таким путем компоненты вируса, то быстро образуются новые инфекционные частицы, неотличимые от исходных (рис. 15-6). Ясно, таким образом, что механизм размножения вируса в основных своих чертах должен стать понятным, как только мы узнаем, как происходит синтез вирусной нуклеиновой кислоты и вирусного белка.

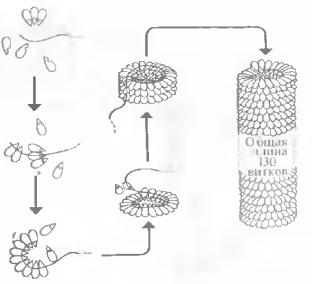


Рис. 15-6. Образование частицы ВТМ из белковых субъединиц и молекулы вирусной РНК (Fraenkel-Conrat, Design and Function at the Threshold of Life: The Viruses, рис. 18, Academic, New York, 1962).

ВИРУСНЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ СОДЕРЖАТ ИНФОРМАЦИЮ ДЛЯ СИНТЕЗА СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И БЕЛКОВ ОБОЛОЧКИ

Вирусная нуклеиновая кислота должна кодировать последовательность аминокислот в белке, образующем защитную оболочку вируса. Такие белки оболочки никогда не обнаруживаются в неинфицированной клетке и полностью специфичны для данного вируса. Кроме того, в процессе инфекции образуется один или несколько ферментов, необходимых для успешного размножения вируса.

В настоящее время известно много случаев, когда ДНК-содержащие вирусы несут информацию для аминокислотных последовательностей ферментов, участвующих в синтезе предшественников нуклеотидов. Одним из наиболее ярких примеров является размножение бактериофага Т4 (рис. 15-7). В ДНК этого вируса отсутствует цитозин, что вначале дало основание предполагать, будто ДНК фага Т4 может существенно отличаться от нормальной ДНК. Однако в дальнейшем выяснилось, что в ДНК фага Т4 всегда есть близкородственное основание — 5-ОН-метилцитозин, который, как и цитозин, легко образует пару с гуанином (рис. 15-8). Таким образом, трехмерная структура ДНК фага Т4 по существу ничем не отличается от трехмерной структуры нормальной двухспиночной ДНК.

В незараженных клетках *E. coli* нет 5-ОН-метилцитозина; следовательно, те ферменты, которые нужны для его синтеза, должны кодироваться фаговой ДНК. Кроме того, скорость синтеза ДНК в клетках, зараженных фагом Т4, во много раз превосходит скорость синтеза ДНК в незараженных клетках. Эта повышенная скорость достигается за счет того, что в молекуле ДНК фага Т4 есть гены, содержащие информацию для большей части ферментов, участвующих в метаболизме обычных нуклеотидов, а также для фермента ДНК-полимеразного типа (рис. 15-9).

Для того чтобы новообразовавшиеся вирусные частицы могли выйти из клетки-хозяина, часто бывает нужен еще один вирус-специфический фермент. Такой фермент жизненно необходим для тех вирусов, которые размножаются в бактериях с плотными клеточными стенками. Поскольку клеточные стенки таких бактерий самопроизвольно не разрушаются, они

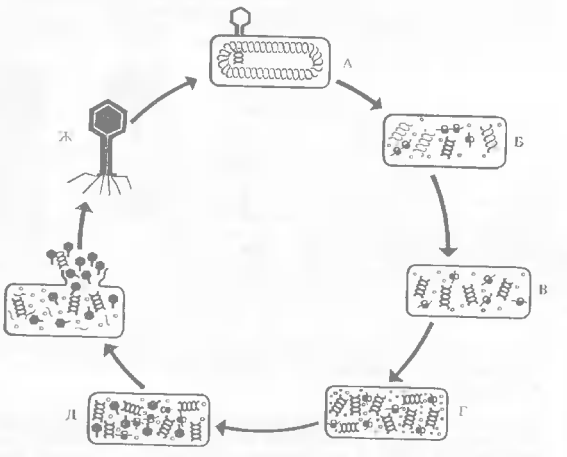


Рис. 15-7. Жизненный цикл фага Т2, содержащего двухцепочечную ДНК.
А. Прикрепление отростка фаговой частицы к клетке *E. coli*; инъекция в клетку фаговой ДНК. *Б.* Образование фагоспецифической мРНК. Она служит матрицей для синтеза фагоспецифических ферментов, один из которых разрушает хромосому клетки-хозяина. *В.* Репликация хромосомы фага, сопровождающаяся разделением цепей ДНК. *Г.* Репликация фаговой ДНК продолжается. Начинают появляться белки, из которых будут строиться оболочки фаговых частиц. *Д.* Агрегация белковых субъединиц вокруг молекул фаговой ДНК. Начинает синтезироваться лизоцим фага. *Е.* Клетка лизируется под действием накопившегося лизоцима, и из нее выходят 200–1000 новых фаговых частиц. *Ж.* Инфекционная частица (мол. вес $\sim 2{,}5 \cdot 10^8$) содержит одну молекулу двухцепочечной ДНК (мол. вес $\sim 1{,}2 \cdot 10^8$) в защитной оболочке, построенной из различных белков нескольких типов.

могут эффективно препятствовать высвобождению вирусных частиц и их внедрению в другие клетки. Чтобы обойти это затруднение, многие фаги содержат ген, несущий информацию для лизоцима — фермента, разрушающего клеточные стенки бактерий. Он начинает синтезироваться в тот момент, когда в клетке появляются белки оболочки вируса, и вызывает распад клеточной стенки, когда созревание вируса почти полностью закончено.

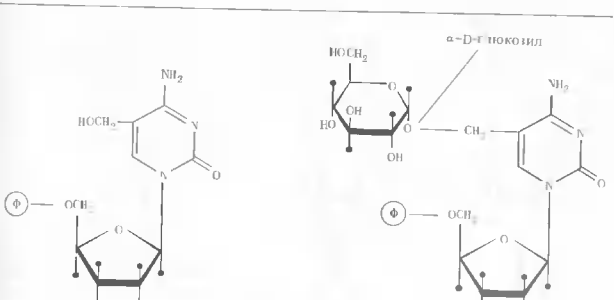


Рис. 15-8. ДНК Т-четных фагов содержит вместо цитозина 5-оксиметилцитозин (*А*), который спаривается точно так же, как цитозин. К некоторым группам $5\text{-}CH_2OH$ присоединяется одна (*Б*) или несколько молекул глюкозы. Биологическое значение этого необычного основания пока еще не раскрыто. Согласно одной из гипотез, оно защищает фаговую ДНК от действия ферментов, которые синтезируются под контролем фага и разрушают только клеточную (немодифицированную) ДНК.

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПУТИ

Сборка вирусов с таким замысловатым строением, как у фагов λ и Т4, представляет собой гораздо более сложный процесс, чем обыкновенная агрегация, наблюдаемая при созревании простых вирусов, например ВТМ. Чтобы образовалась зрелая вирусная частица, во взаимодействие должны вступить около 40 разных генных продуктов, каждый из которых кодируется специфическим геном фага Т4. Многочисленные гены содержат информацию для различных структурных белков, и по крайней мере один ген кодирует фермент, превращающий белок-предшественник в ту форму, которая обнаруживается в зрелых частицах фага Т4. В процессе сборки отдельные компоненты соединяются друг с другом отнюдь не в любой момент времени. Напротив, для сборки характерна строго определенная последовательность событий (морфогенетическая сборка), и существуют некие специальные устройства (сущность которых пока не выяснена), препятствующие наступлению любого из этапов сборки до завершения предыдущего. Три цепи событий (первая ответственна за сборку головки, вторая — за сборку отростка и третья — за нити отростка) в определенный момент соединяются, как показано на рис. 15-10, что приводит к образованию зрелых вирусных частиц.

ВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ ЧАСТО РАДИКАЛЬНО ИЗМЕНЯЕТ МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТКИ

Иногда синтез компонентов вируса идет параллельно с нормальным клеточным синтезом. Хромосомы клетки-хозяина часто продолжают функционировать в течение довольно значительной части жизненного цикла вируса.

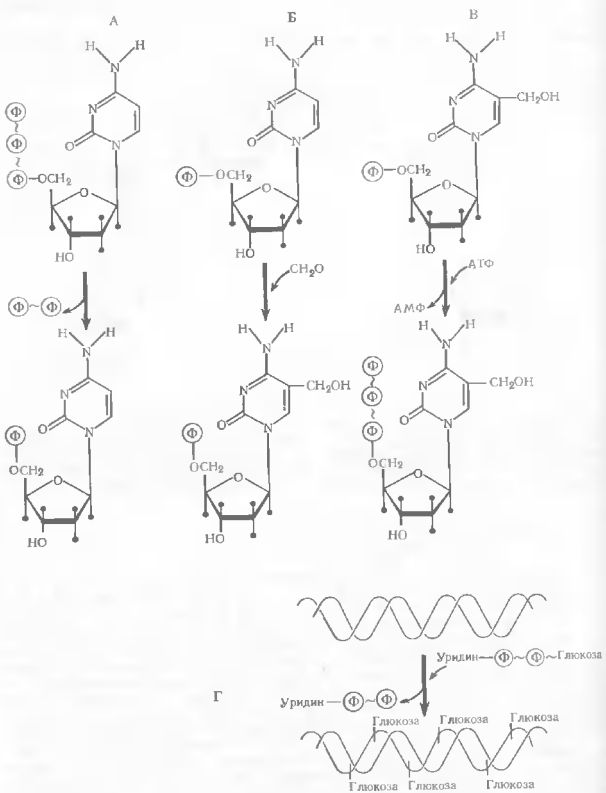


Рис. 15-9. Биохимический механизм, обеспечивающий синтез фаговой ДНК, содержащей 5-оксиметилцитозин и его глюкозопроизводные. Тотчас же после заражения клетки фагом в ней синтезируется ряд ферментов. Их структура кодируется фаговой ДНК, и каждый из ферментов выполняет свою особую роль в процессе размножения фага. Один из ферментов (*А*) разрушает предшественник клеточной ДНК цитидинтрифосфат (это объясняет, почему ДНК, синтезированная после заражения, не содержит цитозина), второй (*Б*) катализирует превращение цитидин-5′-Ф в 5-оксиметилцитидин-5′-Ф, третий (*В*) присоединяет группу Ф ~ Ф к продукту предыдущей реакции. В результате образуется субстрат ДНК-полимеразы, которая включается в растущую цепь ДНК. Еще один фермент присоединяет глюкозу к новосинтезированным молекулам фаговой ДНК (*Г*).

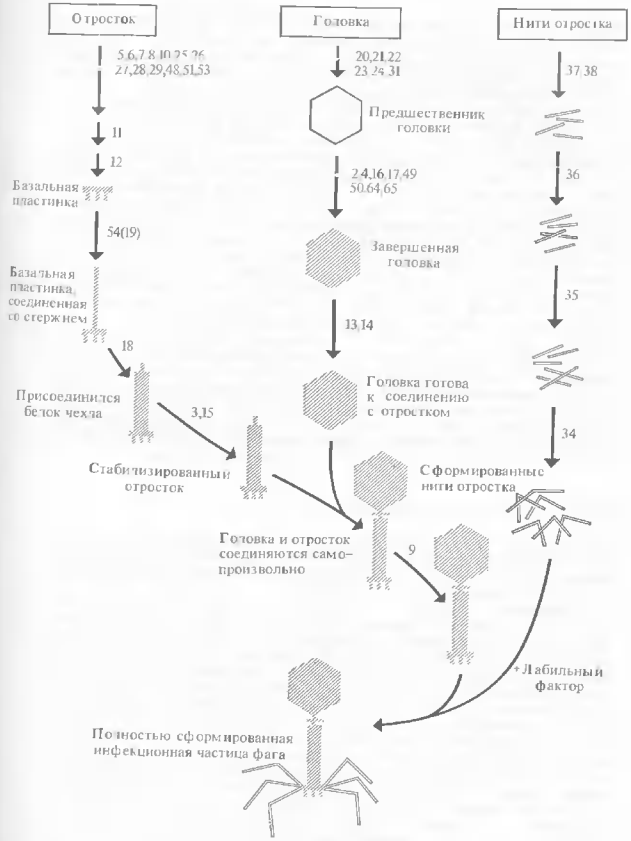


Рис. 15-40. Морфогенетический механизм, обеспечивающий образование частиц фага Т4 (Wood, Edgar, Scientific American, июль 1967). Цифры обозначают номера генов, ответственных за данную стадию.

Однако нередки и другие случаи, когда вскоре после заражения почти весь клеточный метаболизм переключается на синтез новых молекул, связанных исключительно с появлением новых вирусных частиц. В самых крайних случаях всякий синтез ДНК и РНК на хромосомах клетки прекращается, предсуществовавшие клеточные РНК распадаются, и весь последующий синтез белка протекает уже на новых РНК-матрицах, образовавшихся под контролем вирусной нуклеиновой кислоты.

Степень, до которой вирус способен контролировать синтетические процессы клетки, зависит как от природы вируса, так и от типа клетки-хозяина. Вообще говоря, чем больше информации содержит геном какого-нибудь вируса, тем большее число вирусных генов занято подавлением тех клеточных функций, которые не требуются для образования новых вирусных частиц. В настоящее время мы еще только начинаем понимать, как эти вирусные гены осуществляют переключение клеточного метаболизма на синтез чуждых для клетки веществ. Так, например, в процессе размножения фага T4 хромосома *E. coli* разрушается ферментом, синтез которого, по всей вероятности, кодируется нуклеиновой кислотой фага. Хромосома самого фага не атакуется этим ферментом, по-видимому вследствие того, что в ней содержится необычное основание 5-ОН-метилцитозин. Такое избирательное разрушение клеточной хромосомы не является, однако, единственной причиной, обусловливающей метаболическое доминирование хромосомы вируса. Задолго до того, как обнаружатся первые признаки распада клеточной хромосомы, эта последняя уже перестает синтезировать специфичную для клетки мРНК. Относительно недавние эксперименты (см. ниже) свидетельствуют о том, что это происходит благодаря изменению клеточного σ-фактора, в результате чего он теряет способность связываться с кор-ферментом РНК-полимеразы.

СИНТЕЗ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ВИРУСНЫХ БЕЛКОВ

Эти белки синтезируются точно так же, как нормальные белки клетки. Специфическая вирусная мРНК присоединяется к клеточным рибосомам, образуя полисомы, которые взаимодействуют обычным путем с аминоацил-тРНК (АА-тРНК).

Инициирующим агентом при синтезе всех фаговых белков также является фМет-тРНК, а сигналами терминации служат те же кодоны, что и при синтезе белков клетки-хозяина. Однако определенным изменениям может подвергаться структура клеточных рибосом. После заражения фагом T4 рибосомы *E. coli* модифицируются таким образом, что начинают функционировать эффективнее на матрице фага T4, чем на мРНК клетки-хозяина. Точная природа изменений, вызываемых вирусом, требует дальнейшего выяснения. Известно несколько случаев, когда после заражения вирусом в клетке выявляются новые виды тРНК, образующиеся в результате ферментативной модификации предсуществовавших молекул тРНК. В некоторых зараженных клетках появляются и абсолютно новые виды тРНК. Таким образом, вирусные гены, как и гены клетки-хозяина, содержат информацию, необходимую для синтеза тРНК.

Значение новых видов тРНК до сих пор остается неясным. В некоторых случаях они могут отражать приспособительную реакцию на изменение структуры рибосом, вызванное вирусом. В других случаях они могут быть связаны с различиями в составе оснований вирусной и клеточной хромосом. Например, для ДНК фага T4 характерно вдвое большее содержание АТ-пар по сравнению с ГЦ парами, в то время как ДНК *E. coli* содержит приблизительно равные количества пар двух типов. Разные пары оснований, способные образовываться согласно гипотезе качания (wobble hypothesis), обладают различной прочностью; поэтому

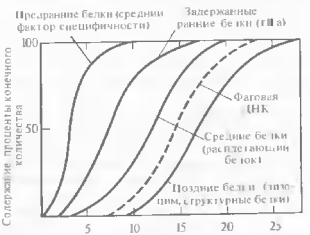


Рис. 15-11. Время синтеза различных вирус-специфических белков и ДНК фага T4 при 37°C.

при развитии вируса, ДНК которого богата АТ-парами, привлечение тРНК, приспособленных к хромосоме с равным содержанием оснований четырех типов, может привести к замедлению трансляции многих вирус-специфических белков. Это соображение служит ключом к пониманию того, какие избирательные преимущества имеют новые виды тРНК с измененными антикодонами.

РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ РАННИМИ И ПОЗДНИМИ БЕЛКАМИ

После того как вирусная хромосома проникнет в клетку, ее гены начинают функционировать, как правило, вовсе не одновременно. Напротив, существует определенное «расписание» их работы. Некоторые вирусные белки появляются в клетке немедленно после заражения, а синтез других может откладываться до тех пор, пока не пройдет больше половины жизненного цикла вируса. Некоторые гены начинают функционировать очень рано и продолжают работать на протяжении всего жизненного цикла, в то время как другие функционируют лишь в течение нескольких минут, а затем «выходят из игры» (рис. 15-11). У такого последовательного появления белков есть очевидные преимущества. Часть генных продуктов, например ферментов, необходимых для переключения клеточного синтеза с клеточных генов на вирусные, естественно, должна появиться в первую очередь, в то время как другие генные продукты — такие, как белки вирусной оболочки или лизоцим, необходимый для лизиса клетки,— должны появляться на поздних стадиях цикла. Если бы лизоцим принадлежал к числу ранних ферментов, лизис клетки наступал бы преждевременно и сборка дочерних вирусных частиц прерывалась бы. Таким образом, даже весьма поверхностное знание жизненного цикла вируса дает основания предполагать, что должны существовать довольно замысловатые системы регуляции, обеспечивающие появление нужных белков в нужный момент цикла. Насколько нам известно, эти регуляторные системы обычно действуют на уровне транскрипции. Так, некоторые специфические молекулы мРНК появляются рано, а другие обнаруживаются лишь на поздних этапах жизненного цикла вируса. Вначале было принято разделять различные мРНК на две категории — ранние и поздние — и аналогичным образом определять тот или иной белок как ранний или поздний. Однако

зачастую ситуация бывает более сложной, что привело к появлению нескончаемого потока терминов: «предранние», «задержанные ранние», «средние», «квазипоздние» и т. п.

РЕГУЛЯЦИЯ ВРЕМЕНИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЕНОВ ЗА СЧЕТ ПОРЯДКА РАСПОЛОЖЕНИЯ ГЕНОВ В ХРОМОСОМЕ

В оптимальных условиях роста время, необходимое для синтеза молекулы мРНК с мол. весом около $2 \cdot 10^6$, равно приблизительно 3—4 мин. Молекулы такого размера (6000 нуклеотидов) содержат информацию для 4—5 белков средней величины. Однако синтез этих белков начинается не в одно и то же время — белки, кодируемые участком мРНК 5′-конца, могут быть полностью транслированы еще до того момента, когда начнется транскрипция гена на 3′-конце. Следовательно, гены, которые должны функционировать в первую очередь, имеют тенденцию располагаться в начале оперонов. Аналогичным образом, когда оптимальное время для начала функционирования гена соответствует третьей или четвертой минутам после заражения, иногда имеет смысл искать этот ген вблизи 3′-конца сравнительно крупного оперона (рис. 15-12).

Задержку появления поздних белков, однако, нельзя полностью объяснить существованием чрезвычайно крупных оперонов. Например, у фага T4 бо́льшая часть оперонов имеет относительно малую длину и лишь некоторые содержат больше нескольких тысяч пар оснований. Вероятно, одна треть из 200 генов (или около того) не начинает функционировать до истечения 10 мин с того момента, когда произошло проникновение хромосомы T4 в клетку-хозяина.

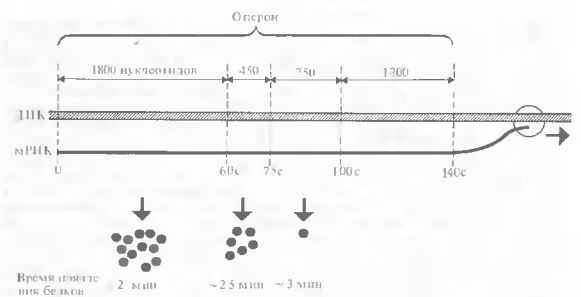


Рис. 15-12. Последовательное функционирование соседних генов одного оперона.
При 37°C in vivo цепи мРНК *E. coli* растут со скоростью около 30 нуклеотидов в секунду. Полное считывание участка ДНК длиной 4200 пар оснований происходит примерно за 2 мин 20 с. Присоединение первых рибосом осуществляется за считанные секунды после начала транскрипции. Поскольку движение рибосом в ходе трансляции идет приблизительно с той же скоростью, что и транскрипция, функциональные активные продукты генов начинают появляться в клетке менее чем через минуту после завершения транскрипции соответствующего гена.

ПОИСКИ ОТСУТСТВУЮЩИХ РЕПРЕССОРОВ Т4

Для объяснения того, почему так называемые «поздние» опероны не транскрибируются, была выдвинута гипотеза, согласно которой промоторы для поздних оперонов блокируются высокоспецифическими репрессорами — эти последние кодируются геномом вируса и синтезируются сразу же после проникновения вирусных хромосом в клетку-хозяина. Связываясь с оператором поздних оперонов, репрессоры должны были бы специфически препятствовать синтезу ощутимых количеств поздней мРНК до тех пор, пока индуктор, также являющийся продуктом вирус-специфического раннего фермента, не нейтрализовал бы данный репрессор. Доказательством такой схемы могло бы служить выявление мутантов, у которых нарушено нормальное «расписание» работы генов вследствие блокирования синтеза репрессора — в этом случае должна была бы наблюдаться ранняя продукция всех поздних белков. Однако, хотя бессмысленных мутаций фага Т4 было получено очень много, не удалось обнаружить и малейшего следа репрессора Т4. Приходится признать, что все полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что в основе развития фага Т4 лежит не негативная, а позитивная регуляция.

ФАКТОРЫ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВИРУС-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ

Сущностью позитивной регуляции у фага Т4 является наличие кодируемых им факторов специфичности, которые изменяют набор промоторов (ранние → средние → поздние), считываемых РНК-полимеразой в ходе жизненного цикла фага. Сразу же после заражения специфичность транскрипции определяется клеточными σ-факторами (стр. 283), которые обеспечивают узнавание примерно 25 различных ранних промоторов фага Т4 (рис. 15-13). Все образуемые в результате транскрипции мРНК копируются с одной и той же цепи матрицы — *l*-цепи в направлении против часовой стрелки, если рассматривать стандартную генетическую карту фага Т4 (рис. 15-14). В большинстве ранних оперонов быстрое выражение свойственно лишь тем генам, которые расположены близко к промотору (так называемые «предранние»). Гены, расположенные более дистально, выражаются медленнее («задержанные ранние» гены), частично из-за более позднего связывания их с движущимися молекулами РНК-полимеразы, но также и потому, что рост многих ранних цепей РНК прерывается еще до того момента, когда более дистальные гены могут быть считаны. Наиболее вероятное, как нам кажется, объяснение состоит в том, что клеточный фактор терминации ρ часто узнает стоп-сигналы на концах предранних генов. Если это так, то более дистально расположенные задержанные ранние гены могут транскрибироваться с высокой эффективностью только тогда, когда действие фактора ρ тормозится вирус-специфическим антитерминационным белком, аналогичным белку, который, как предполагают, кодируется геном *N* фага λ (см. рис. 15-23).

Инициация всех ранних промоторов прекращается примерно через 5 мин (при 37° С) после заражения, когда продукт раннего гена блокирует в клеточной РНК-полимеразе связывание фактора σ с кор ферментом. Как только это связывание нарушится, освободившийся кор фермент активируется за счет связывания новых факторов специфичности и приобретает способность транскрибировать сначала средние, а затем и поздние промоторы фага Т4. Одно время предполагали, что эти факторы специфичности должны быть приблизительно той же величины, что и фактор σ (мол. вес ~70 000), однако теперь стало ясно, что белки с относительно небольшим молекулярным весом также могут определять специфичность транскрипции.

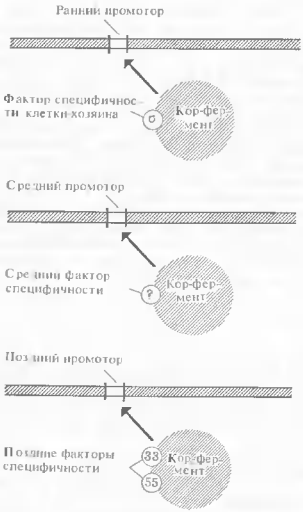


Рис. 15-13. Смена факторов специфичности, используемых РНК-полимеразой *E. coli* для считывания промоторов фага Т4 разных классов в ходе его жизненного цикла.

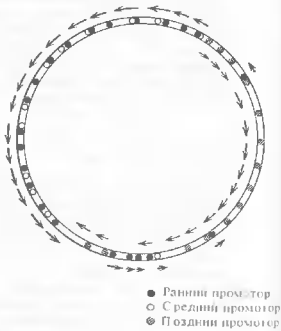


Рис. 15-14. Схематическое изображение процесса транскрипции у фага Т4. Гены, находящиеся под контролем ранних и средних промоторов, транскрибируются в направлении против часовой стрелки, а гены, контролируемые поздними промоторами, считываются в обратном направлении.

Средние промоторы (исходно называвшиеся «квазипоздними») начинают функционировать еще до того, как инициируется репликация фаговой ДНК, и транскрипция их идет на протяжении всей остальной части жизненного цикла вируса. Многие средние промоторы контролируют считывание генов, которые находятся также под контролем ранних промоторов. Такие промоторы регулируют продолжающийся синтез многих (но не всех) ранних ферментов после того, как перестает функционировать клеточный фактор σ (рис. 15-15). Другие средние промоторы управляют синтезом белков (ферментов), образующихся на средних и поздних стадиях развития фага Т4. Например, ген 32, который кодирует расплетающий белок ДНК, полностью контролируется средним промотором. До сих пор неизвестна природа среднего фактора специфичности, однако в ближайшее время ее, вероятно, удастся выяснить, поскольку выявлена мутация одного из генов Т4, в результате которой специфически блокируется образование мРНК, полностью контролируемой средними промоторами.

Рис. 15-15. Взаимоотношения между генами, находящимися под контролем ранних и средних промоторов фага Т4.
А. Лишь немногие из оперонов Т4 полностью контролируются ранними промоторами. Выражение генов может быть предранним или задержанным ранним в зависимости от их близости к промотору. *Б.* Существенно большее число оперонов находится под одновременным контролем ранних и средних промоторов. *В.* У других оперонов средний промотор контролирует только те гены, которые расположены по отношению к нему более дистально. *Г.* Существуют и такие опероны, которые контролируются исключительно средними промоторами.

Поздние промоторы в основном контролируют гены, содержащие информацию для структурных белков фага Т4, а также морфогенетических факторов. Их считывание, которое происходит исключительно на г-цепи, зависит от функционирования двух ранних генов фага Т4 — генов 33 и 55. Последние кодируют два специфических полипептида с мол. весами 12 000 и 22 000 соответственно. Оба полипептида прочно связываются с кор-ферментом и скорее всего обеспечивают связывание РНК-полимеразы с поздними промоторами.

ДНК ФАГА Т7 СОДЕРЖИТ ИНФОРМАЦИЮ ДЛЯ НОВОЙ РНК ПОЛИМЕРАЗЫ

В последнее время внимание исследователей было обращено на выяснение механизмов транскрипции у фагов группы Т7 (рис. 15-16). Поскольку длина молекулы ДНК у таких фагов (мол.вес $25 \cdot 10^6$) в 5 раз меньше, чем у Т-четных фагов (мол.вес $120 \cdot 10^6$), изучение генетической карты этих фагов существенно облегчается. Уже идентифицировано около 25 фагоспецифических полипептидов, образующихся после заражения клеток фагом Т7; для 24 из них найдено соответствие со специфическими генами на линейной генетической карте фага Т7. В сумме размер этих фагоспецифических полипептидов соответствует приблизительно 90% кодирующей способности ДНК фага Т7; следовательно, есть основания ожидать, что в течение ближайших нескольких лет фаг Т7 будет полностью генети-

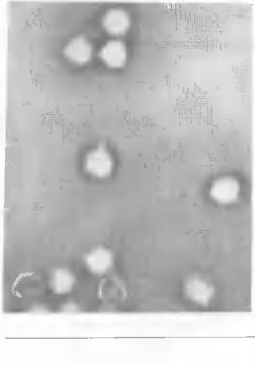


Рис. 15-16. Электронная микрофотография бактериофага Т7. (С любезного разрешения Лаборатории по изучению вирусов Калифорнийского университета, Беркли.)

чески охарактеризован. Гены фага Т7 сгруппированы на карте согласно их функции, причем в левой части находится отрезок, соответствующий примерно 15% длины ДНК, где расположены ранние гены, в первую очередь вовлекаемые в регуляцию транскрипции. Поздние гены сгруппированы в два отличающихся друг от друга набора: один из них содержит информацию для ферментов, участвующих в репликации фаговой ДНК, а второй — информацию для структурных белков, необходимых для морфогенеза (рис. 15-17).

Переключение с синтеза ранних мРНК на синтез поздних мРНК происходит у фага Т7 не за счет появления новых факторов специфичности, которые взаимодействуют с клеточным кор-ферментом. Дело обстоит совершенно иначе: поздние промоторы считываются РНК-полимеразой нового типа, которая является продуктом фагового гена 1. Этот ген в совокупности со всеми остальными ранними генами фага Т7 образует отдельный оперон на левом конце генетической карты фага Т7 и находится под контролем сложного промотора, имеющего три участка инициации. Этот промотор считывается исключительно РНК-полимеразой клетки-хозяина, причем образующиеся транскрипты составляют отдельный класс ранних молекул РНК с мол. весом $\sim 2{,}5 \cdot 10^6$. В дальнейшем эти первичные транскрипты расщепляются специальным ферментом — рибонуклеазой III,— в результате чего образуется набор молекул с более короткими цепями (рис. 15-18). Самый крупный из продуктов расщепления (мол. вес $\sim 10^6$) содержит информацию для фагоспецифической РНК-полимеразы, состоящей из одной полипептидной цепи с мол. весом $\sim 110\,000$. Два других ранних гена, по-видимому, содержат информацию для белков, блокирующих функционирование клеточной РНК-полимеразы по мере накопления фагоспецифического фермента. Таким образом, на поздних стадиях инфекции транскрибируются только поздние гены фага Т7.

Существует несколько поздних промоторов фага Т7, однако способ их считывания и их нуклеотидные последовательности неизвестны. Нельзя также пока ответить на вопрос, почему Т7-специфическая РНК-полимераза содержит всего одну полипептидную цепь и обладает значительно более простой структурой, чем фермент *E. coli* ($\beta'\beta\alpha_2\omega\sigma$). Можно лишь предполагать, что относительная простота ее устройства связана с мень-

Рис. 15-17. Генетическая карта фага T7. Обычное расположение слева направо соответствует здесь направлению сверху вниз. Указаны номера, вычисленные опытным путем размеры и функции генов (размеры генов 2 и 18 остаются приближенными). Расположение двоякого промоторов условно.

шим числом регуляторных механизмов, необходимых для функционирования фермента. Однако до сих пор ни фагоспецифическую, ни бактериальную РНК-полимеразу не удалось получить в кристаллическом состоянии, и, по-видимому, пройдет еще немало лет, прежде чем мы будем точно знать механизмы их действия.

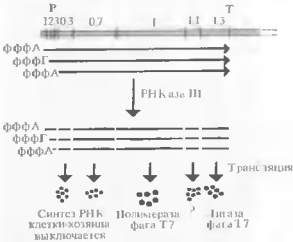


Рис. 15-18. Расщепление первичных ранних транскриптов ДНК фага **Т7** под действием **РНКазы III.**
В области раннего промотора находится 3 различных участка инициации, которые отделены друг от друга расстоянием от 200 до 300 о... нований.

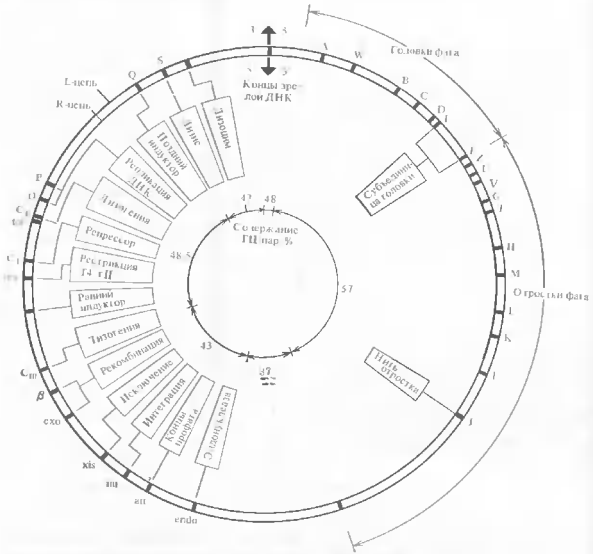


Рис. 15-19. Генетическая карта фага λ.
Указаны функции многих генов.

λ-РЕПРЕССОР ПОДДЕРЖИВАЕТ ПРОФАГОВОЕ СОСТОЯНИЕ

Еще более сложен контроль транскрипции ДНК фага λ (мол. вес $32 \cdot 10^6$) (рис. 15-19). Это связано не только с тем, что литический жизненный цикл фага λ характеризуется наличием ранних и поздних видов мРНК, но и тем, что, будучи по природе фагом лизогенизирующим, он обладает геномом, способным внедряться в бактериальные хромосомы, а затем покидать их. Когда он в качестве профага включается в хромосому клетки-хозяина, транскрипция подавляющего большинства его генов должна быть блокирована. В таком блокировании ключевую роль играет λ-репрессор — белок, обычно обнаруживаемый в виде димера с мол. весом ~52 000. В его присутствии специфическая мРНК практически не образуется; исключение составляет мРНК, кодируемая геном C_1, несущим информацию для самого λ-репрессора. В бактериях, геном которых содержит профаг λ, λ-репрессор присутствует в количестве всего лишь 10—20 копий, причем большая часть их связана с двумя специфическими операторами, каждый из которых контролирует синтез специфической ранней мРНК (рис. 15-20). Такое связывание происходит только с двухцепочечной ДНК, следовательно, присутствие связанного λ-репрессора не вызывает расплетания соответствующего оператора, а, напротив, еще более стабилизирует этот двухцепочечный участок ДНК.

Оба оператора, левый и правый, содержат приблизительно по 75 пар оснований, причем в каждом из них находятся три сходных, но не одинаковых, симметричных участка связывания для димеров репрессора (рис. 15-21 и 15-22). Каждый участок связывания состоит приблизительно из 17 пар оснований, причем эти участки отделены друг от друга областями с повышенным содержанием АТ-пар. В значительной степени перекрывающиеся последовательности λ-операторов представляют собой соответ-

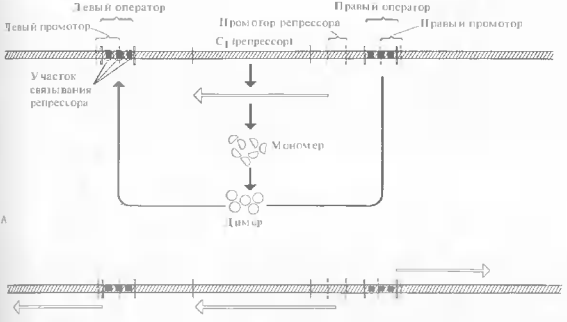


Рис. 15-20. При лизогении (*А*) образуется только мРНК для репрессора фага λ. Когда репрессор инактивируется (*Б*), начинается транскрипция ранних фаговых мРНК (слева и справа).

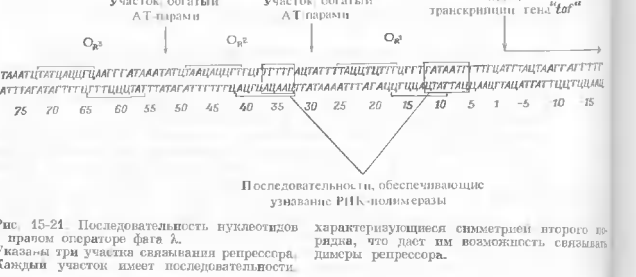
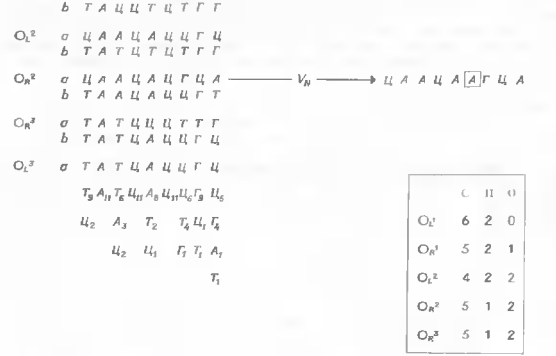


Рис. 15-21. Последовательность нуклеотидов в правом операторе фага λ. Указаны три участка связывания репрессора. Каждый участок имеет последовательности, характеризующиеся симметрией второго порядка, что дает им возможность связывать димеры репрессора.



	C	П	О
O_L^1	6	2	0
O_R^1	5	2	1
O_L^2	4	2	2
O_R^2	5	1	2
O_R^3	5	1	2

Рис. 15-22. Сравнение половин известных участков связывания репрессора у фага λ (Maniatis et al., 1975).
Последовательности записаны в направлении 5′ → 3′, *a* — транскрибируемая цепь, *b* — комплементарная цепь. Показаны также замены оснований в результате трех мутаций (V_2, V_{101}, V_N), приводящие к снижению эффективности связывания репрессора. Эти замены затрагивают пары оснований, неизменно встречающиеся во всех известных участках. В рамке внизу справа схема, показывающая наличие симметрии вращения второго порядка в участках связывания репрессора. Ось симметрии проведена через 9-е основание каждого участка (все они состоят из 17 пар оснований). Типы симметрии для 16 оснований, расположенных по обе стороны от 9-го обозначены следующим образом: С — совершенная симметрия, П — симметрия в отношении расположения пуриновых и пиримидиновых оснований, О — отсутствие симметрии. При случайном расположении основании симметрия должна была бы быть $C_2П_4О_2$.

ствующие промоторы, участвующие в первичном узнавании РНК-полимеразы и последующей инициации синтеза РНК. Весьма важно, что участки с наибольшим сродством к λ-репрессору непосредственно примыкают к стартовым точкам синтеза РНК, в то время как более дистально расположенные участки связывают репрессор менее эффективно. В чем смысл наличия нескольких участков связывания репрессора в каждом λ-операторе, до сих пор неясно, хотя само собой напрашивается предположение, что последовательное связывание репрессора делает еще более невероятным расплетание промоторного участка, а это условие необходимо для связывания РНК-полимеразы.

Инактивация λ-репрессора зачастую происходит в условиях, когда синтез ДНК ингибирован (например, после УФ-облучения). Это дает возможность начаться транскрипции мРНК из двух ранних оперонов (рис. 15-20). Один из этих оперонов составляют в основном гены, содержащие информацию для белков, участвующих в рекомбинационных процессах, в результате которых фаговая хромосома (гл. 7) исключается из хромосомы *E. coli*. Второй оперон содержит, помимо прочих, гены, продукты которых обеспечивают репликацию фаговой ДНК.

Один из генов, считываемых в первую очередь, каким-то образом прекращает дальнейший синтез C_1 (репрессорной)-мРНК. Ген, непосредственно вовлеченный в этот процесс («tof»), расположен справа от гена C_1. Выключение синтеза репрессорной мРНК имеет прямой смысл, так как новые репрессоры более не нужны и даже нежелательны для оставшейся части жизненного цикла фага.

ПОЛОЖИТЕЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ, НАПРАВЛЯЕМАЯ АНТИТЕРМИНАТОРОМ — ПРОДУКТОМ ГЕНА N

Остановка репрессии сама по себе, однако, не влечет за собой полного считывания ранних оперонов. Чтобы это стало возможным, должен начать функционировать ключевой ген фага λ, так называемый ген N. В отсутствие продукта гена N синтез мРНК начинается на двух соответствующих промоторах, но продолжается лишь на сравнительно небольших участках ДНК, поскольку расположенные поблизости стоп-сигналы считываются ρ-фактором (или фактором терминации) *E. coli*. Белок N каким-то образом специфически противодействует фактору терминации, что приводит к считыванию гораздо бо́льших областей обоих оперонов (рис. 15-23). Сигнал, останавливающий синтез более протяженных цепей, до сих пор неизвестен, хотя и в настоящее время можно предположить, что он не зависит от ρ-фактора.

ОБЩИЙ ПРОМОТОР ДЛЯ ВСЕХ ПОЗДНИХ ГЕНОВ ФАГА λ

Почти половина генетического материала фага λ (около 20 генов) содержит информацию для поздних белков, причем бо́льшая его часть кодирует синтез головки и компонентов отростка. Все поздние гены принадлежат к одному опорону, начало которого лежит перед геном S, а конец располагается за геном J (рис. 15-24). Рассматриваемый оперон функционирует только в присутствии белка, являющегося продуктом раннего гена Q. Этот белок, по-видимому, представляет собой σ-подобный фактор, необходимый для считывания позднего промотора. Согласно другому предположению, он может действовать по аналогии с белком, кодируемым геном N (т. е. способствовать продлению синтеза коротких цепей РНК), промотор которого расположен непосредственно перед геном S — как полагают, терминация этого синтеза осуществляется фактором ρ.

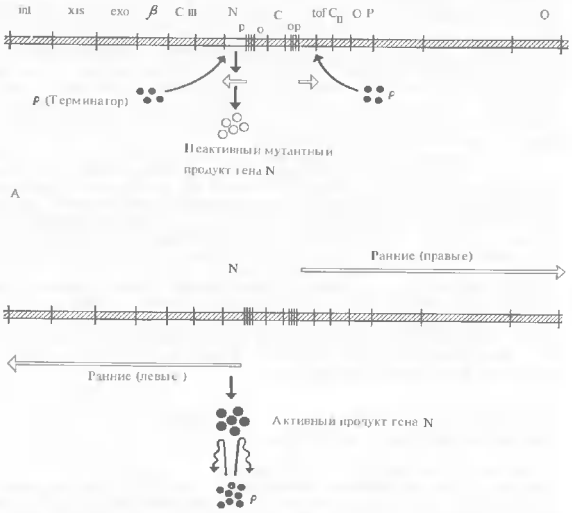


Рис. 15.23. Схема функционирования продукта гена N фага λ в качестве антитерминатора. *А*. Мутантный ген. В отсутствие продукта гена N считывание ранних (левых) генов, следующих за N, прекращается, а считывание ранних (правых) генов доходит только до ге на «tof» включительно. *Б*. Нормальный ген В присутствии продукта гена N действие фак тора ρ тормозится и считываются оба ранни оперона.

Ген Q удален от своего промотора приблизительно на 4 мин (если считать по времени транскрипции). Так, первый белковый продукт этого гена начинает появляться через 5 мин после начала инфекции; только спустя 10 мин после начала инфекции он накапливается в количестве, достаточном для того, чтобы обеспечить сколько-нибудь ощутимое считывание поздних мРНК. Дальнейший контроль жизненного цикла фага λ осуществляется благодаря тому, что все поздние гены сгруппированы в один оперон. К примеру, около 10 000 пар оснований отделяют гены, несущие информацию для основного белка головки, от генов, кодирующих нити отростка. Это означает, что конечная сборка отростка может начаться только через 5 мин после сборки головки.

Существование такого мощного механизма регуляции последовательных процессов, возможного благодаря наличию весьма протяженных опероиов, поднимает вопрос о том, какова причина возникновения общего отдельного оперона для поздних белков. Ответ нужно искать в том, что при размножении фага требуются существенно большие количества поздних мРНК, чем ранних. Почти все (если не все) продукты ранних генов

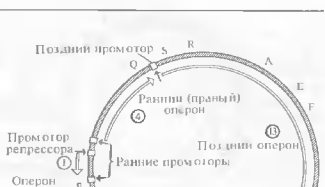


Рис. 15-24. Четыре оперона фага λ. Цифрами обозначено примерное время (в минутах), необходимое для полного считывания соответствующих оперонов при 37°С

представляют собой ферменты, в то время как большинство поздних белков относится к структурным белкам, которые должны накапливаться в весьма значительных количествах. Таким образом, для запуска крупномасштабного синтеза поздних мРНК по прошествии 8—10 мин после начала функционирования ранних оперонов требуется специальное приспособление. Образование генного продукта, дающего возможность функционировать новому промотору, выполняет эту задачу просто и эффективно.

В ГЕНОМЕ ОЧЕНЬ МЕЛКИХ ДНК-СОДЕРЖАЩИХ ФАГОВ ИМЕЕТСЯ НЕСКОЛЬКО ПРОМОТОРОВ

Намного более простая картина транскрипции наблюдается у очень мелких ДНК-содержащих фагов — полиэдрических с одноцепочечной ДНК (ϕX174, S13) и нитевидных (F1, fd, M13). У фагов обоих типов хромосомы кольцевые; у первой группы геном содержит около 5500 нуклеотидов, у второй — 6000. А этого можно считать, что они содержат информацию для 6—10 белков со средней длиной цепи от 200 до 300 аминокислот. Действительно, для фага ϕX174 уже охарактеризовано 9 генов, весьма возможно — и это очень отрадно,— что обнаружены почти все гены этого фага (рис. 15-25).

Четыре гена ϕX174 содержат информацию для структурных белков. Вначале, имея в виду очень малые размеры белка оболочки, думали, что он образуется путем упорядоченной агрегации белка одного вида. Однако в настоящее время идентифицировано 4 разных белка с мол. весами 50 000, 36 000, 19 000 и 9000 (рис. 15-26). Для их кодирования необходимо 3000 нуклеотидов, т. е. около 50% всей длины хромосомы. Известно, что один из остающихся пяти генов вовлечен в репликацию двухцепочечного промежуточного продукта ДНК (рис. 9-10), два других связаны с продукцией одноцепочечных кольцевых молекул дочернего вируса, еще один ответствен за лизис клетки. Можно надеяться, что в ближайшее десятилетие станет точно известно предназначение каждого гена этого фага.

Синтез вирус-специфической мРНК начинается, как только образуются двухцепочечные промежуточные продукты. Вся эта мРНК комплементарна (—)-цепи вируса, причем часть ее транскрибируется как отдельная линейная единица, образуемая вследствие однократного пол-

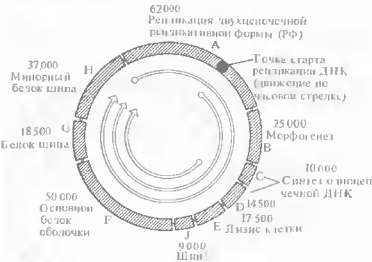


Рис. 15-25. Генетическая карта фага ϕX174. Указаны размеры и функции девяти генов, содержащихся в геноме этого фага, а также области, которые могут соответствовать трем из транскриптов генома.

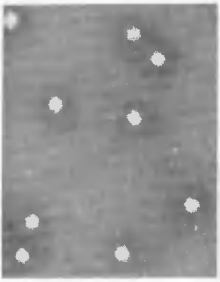
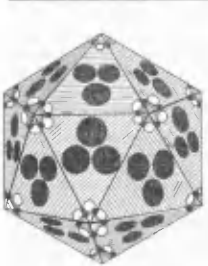


Рис. 15-26. Электронная микрофотография фага ϕX174. (С любезного разрешения Лаборатории по изучению вирусов Калифорнийского университета, Беркли.)
Внизу — схематическое изображение полиэдрической формы фага, показано возможное взаиморасположение молекул белка оболочки и белка шипов.



●	F – Основной капсидный белок	60 копий на частицу
○	G – Белок шипа	60 копий на частицу
◎	H – Белок шипа	12 копий на частицу
•	J – Белок шипа?	60 копий на частицу

ного считывания генома, начиная с промотора вблизи переднего конца гена A (рис. 15-25). Два других промотора контролируют синтез мРНК-продуктов несколько меньшей величины, один из которых, вероятно, содержит информацию для всех структурных белков вируса. Взаиморасположение разных генов вряд ли представляет собой важный фактор, определяющий точное время синтеза разных белков, кодируемых фагом,— транскрипция всего генома целиком занимает лишь 2 мин при 37 °С, а жизненный цикл вируса протекает примерно за 20 мин. Дальнейшее углубленное исследование мелких фагов стоит на повестке дня, поскольку выяснение важнейших особенностей их репликации представляется вполне достижимой целью.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ИНИЦИАЦИИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ПРОЦЕССЕ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСНОЙ РНК

Синтез молекул вирусной ДНК на вирусной хромосоме всегда начинается в фиксированной точке. Каким образом узнаются эти точки, до сих пор неизвестно, хотя и предполагается наличие последовательностей, несущих сигнал «начинай синтез!», а также компонентов аппарата, ведущего репликацию ДНК, которые специфически узнают эти сигналы. В настоящее время мы склонны думать, что и стартовые последовательности, и фактор(ы) узнавания специфичны для каждого вируса, так как во всех изучавшихся до сих пор ДНК-содержащих вирусах имеются гены, несущие информацию для белков, необходимых для запуска синтеза соответствующей ДНК. Весьма вероятно, что многие из этих белков вовлечены в синтез коротких цепей РНК, которые, как сейчас считают, являются затравкой при синтезе большинства (или всех?) цепей ДНК. Например, репликация в двух направлениях ДНК фага λ, по всей видимости, запускается двумя короткими цепями РНК, находящимися под контролем генов O и P этого фага. Таким образом, узнавание стартовых сигналов для репликации ДНК должно осуществляться либо за счет образования совершенно новых молекул РНК-полимеразы, либо за счет появления молекул клеточного фермента, измененных вследствие присоединения факторов специфичности, кодируемых вирусом.

ПОВТОРНАЯ ИНИЦИАЦИЯ РЕПЛИКАЦИИ ДНК В ХОДЕ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА

Во время репликации клеточной ДНК данный стартовый сигнал прочитывается однократно в каждом клеточном цикле. Повторения инициации произойти не может, так как это привело бы к бесконечному увеличению числа хромосом. Поэтому необходимо постулировать наличие некоего саморазрушающего механизма, который осуществляет инактивацию белков инициации синтеза клеточной ДНК после однократного выполнения ими соответствующей функции. Но в ходе репликации вирусной ДНК число считываний данного стартового сигнала не ограничено. К примеру, при репликации хромосом фага T7 часто наблюдаются множественные вилки (рис. 15-27). Таким образом, либо белки инициации синтеза вирусной ДНК могут функционировать не один раз, а несколько, либо во время ранних стадий синтеза вирусной ДНК такие белки продуцируются в значительных количествах.

Рис. 15.27. Молекула ДНК фага Т7. (С любезного разрешения д-ра Дрекслера, Гарвардский университет.)
Виды репликативные вилки

САМОВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ ВИРУСНОЙ РНК ТРЕБУЕТ УЧАСТИЯ НОВОГО ВИРУС-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА

В клетке молекулы РНК никогда не служат матрицами для синтеза новых молекул РНК. Репликация большинства РНК-содержащих вирусов требует участия абсолютно нового фермента, способного синтезировать новые цепи РНК на матричной родительской РНК. Этот фермент, называемый РНК-репликазой (синтетазой), образуется обычно сразу после проникновения вирусной РНК в клетку и прикрепления ее к клеточным рибосомам. Подобно ДНК-полимеразе и РНК-полимеразе, РНК-репликаза катализирует образование комплементарной цепи на одноцепочечной матрице. Таким образом, основной механизм копирования последовательности оснований всех нуклеиновых кислот одинаков. Во всех случаях получение точных реплик достигается путем спаривания комплементарных оснований.

Новообразованные комплементарные цепи РНК служат матрицами для синтеза новых молекул РНК, из которых одни становятся хромосомами дочерних частиц, а другие используются в качестве матриц для образования специфичных белков. Как именно это происходит, зависит от того, содержит ли инфицирующий вирус одноцепочечную или двухцепочечную РНК. Однако и в том и в другом случае только одна цепь из каждой пары комплементарных цепей используется как матрица в белковом синтезе (т. е. как мРНК). Таким образом, между механизмами образования мРНК в вирусных системах обоих типов, как у ДНК-, так и у РНК-содержащих вирусов, существует тесный параллелизм.

При репродукции большинства одноцепочечных вирусных РНК (например, у вируса полиомиелита или у различных РНК-содержащих фагов) функцию матрицы выполняет цепь, содержащаяся в зрелых частицах, т. е. (+)-цепь. Эта цепь кодирует молекулы РНК-репликазы, необходимые для запуска репликации вирусной РНК. Однако совершенно иная картина наблюдается в случае вируса везикулярного стоматита, также содержащего одноцепочечную РНК, который размножается в клетках животных. Для его вирус-специфических белков матрицей служит (—)-цепь. Этот факт заставил задуматься о происхождении молекул РНК-репликазы, необходимых для продукции (—)-цепей на инфекционных (+)-цепях как на матрицах. Совсем недавно их происхождение было установлено: выяснилось, что они содержатся в самих вирусных частицах.

В каждую частицу вируса везикулярного стоматита «встроена» молекула рециказы, синтезированная во время предыдущего цикла вирусной инфекции.

РНК-СОДЕРЖАЩИЕ ФАГИ УСТРОЕНЫ КРАЙНЕ ПРОСТО

Все РНК-содержащие фаги (R17, F2, MS2, Qβ и т. д.), изучавшиеся до сих пор, отличаются чрезвычайно малыми размерами (~250 Å в диаметре). Они самые простые из всех вирусов (рис. 15-28) и содержат всего три гена в РНК-хромосоме длиной около 3500 нуклеотидов; в ходе жизненного цикла продуцируется от 5000 до 10 000 частиц дочернего вируса за 30—60 мин при 37° С (рис. 15-29). Два гена из трех используются для кодирования структурных полипептидных цепей двух типов. Один из этих белков — белок оболочки (БО) — имеет мол. вес 14 700 и содержится в каждой вирусной частице в количестве 180 молекул. В настоящее время полностью установлена последовательность 129 аминокислот, входящих в его состав. Второй структурный белок, так называемый белок А, необходим для адсорбции этих фагов на стенке бактерии-хозяина, а также для последующего прохождения вирусной РНК через стенку и мембрану бактериальной клетки. В каждой вирусной частице присутствует одна копия такого белка; его мол. вес составляет ~38 000, а число аминокислот в молекуле равно приблизительно 330. Таким образом, примерно половина генетического материала используется на кодирование структурных белков. Последний, третий вирус-специфический белок представляет собой компонент РНК-репликазы, участвующей в самовоспроизведении цепи РНК этого вируса. Этот полипептид состоит примерно из 580 аминокислот; следовательно, остается еще около 300 нуклеотидов, которые не несут кодирующей функции.

Наличие трех продуктов генов находит прямое подтверждение в данных генетического анализа. С использованием мутагенов удалось получить мутации, приводящие к бессмысленным кодонам; они образуют три группы комплементации, причем удалось установить их соответствие генам белка оболочки (ген CP), белка А (ген А) и репликазы (ген REP). Однако с помощью чисто генетических приемов определить точный порядок генов в хромосоме нельзя, поскольку при репликации РНК-содержащего фага не происходит генетической рекомбинации. Недавно порядок генов фага R17 ($5'$A — CP — REP$3'$) был установлен в результате изучения нуклеотидной последовательности его РНК (рис. 15-30).

РИБОСОМЫ ИСХОДНО СВЯЗЫВАЮТСЯ С ОДНИМ УЧАСТКОМ НА ФАГОВОЙ РНК

После вхождения молекулы фаговой РНК в клетку-хозяина рибосомы присоединяются к ней только в участке связывания, расположенном в начале гена CP (рис. 15-31). В стартовых точках генов А и REP связывания рибосом не происходит, поскольку эти участки блокированы вследствие особенностей вторичной структуры вирусной РНК. Первым из них становится доступным участок гена REP, который раскрывается, когда при считывании гена CP временно разрушаются блокирующие связывание петли шпилек, стабилизированные водородными связями. Таким образом, функционирование репликазного гена всегда зависит от присоединения рибосом к участку связывания гена CP. Предположение об ограничении такого рода было впервые основано на существовании полярных мутаций, приводящих к бессмысленным кодонам в гене CP. Было обнаружено, что они препятствуют функционированию репликазного гена, тогда как бес-

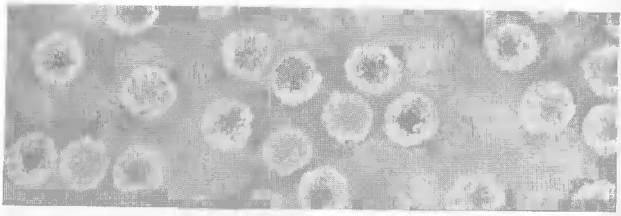


Рис. 15-28. Электронная микрофотография частиц фага F2. (С любезного разрешения д-ра Зиндера, Рокфеллеровский университет.)

Негативное окрашивание позволяет видеть частицы как светлые объекты на темном фоне.

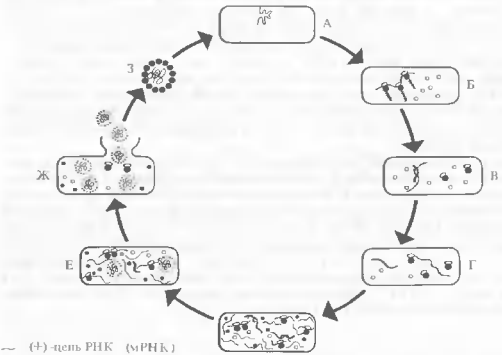


Рис. 15-29. Жизненный цикл вируса семейства F2 (R17, MI2 и т. д.), содержащего одноцепочечную РНК.

А. Адсорбция фага на клетке *E. coli* и инъекция в клетку фаговой РНК [(+)-цепи]. *Б*. Связывание (+)-цепи с рибосомами клетки-хозяина и синтез РНК-репликазы. *В*. Рост (−)-цепи РНК с образованием промежуточных продуктов. *Г*. Завершение синтеза (−)-цепи и последующая диссоциация репликативного комплекса на свободные (+)- и (−)-цепи. *Д*. Преимущественное образование (+)-цепей на (−)-матрицах. Связывание рибосом некоторыми (+)-цепями и синтез большого числа копий белка оболочки. *Е*. Агрегация молекул белка оболочки вокруг (+)-цепей. *Ж*. Клетка подвергается лизису и высвобождает от 1000 до 10 000 дочерних фаговых частиц. *З*. Инфекционная частица (мол. вес $3{,}6 \cdot 10^6$) содержит а) одноцепочечную (+)-молекулу РНК, состоящую из 3500 нуклеотидов, б) 180 молекул белка (мол. вес ~ 14 700), определенным образом расположенных вокруг сердцевины (РНК), в) одну молекулу белка А (мол. вес ~ ~ 38 000).

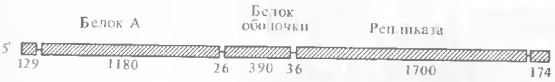


Рис. 15-30. Гены фага R17 (MS2).
Размеры и относительное расположение генов определены на основании данных нуклеотидного анализа, проведенного в последнее время.

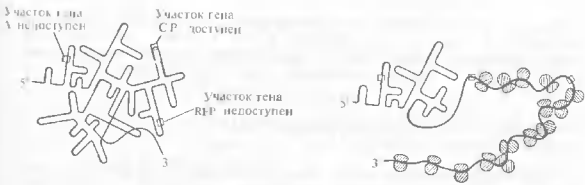


Рис. 15-31. Схематическое изображение влияния вторичной структуры РНК фага R17 на доступность участков связывания рибосом. *А*. В отсутствие белкового синтеза участки связывания рибосом генов А и REP блокированы. *Б*. Прохождение рибосом по гену CP приводит к разрушению вторичной структуры, благодаря чему экранированный ранее участок связывания рибосом гена REP открывается и ген REP способен транслироваться.

смысленные мутации в гене репликазы никогда не влияли на считывание гена CP. Последующие исследования показали, что бессмысленные мутации в гене А никоим образом не влияют на считывание генов CP или REP. Сначала это попытались истолковать как указание на то, что ген А лежит на дистальном (3') конце. Но сейчас мы считаем, что при наличии более чем одного участка связывания рибосом данные о полярности не могут дать точных сведений о взаимном расположении генов.

ГРАДИЕНТЫ ПОЛЯРНОСТИ

Не все мутации, приводящие к бессмысленным кодонам, являются полярными. В целом можно сказать, что они полярны лишь на 5'-конце данного гена, в то время как по направлению к 3'-концу наблюдается определенный градиент полярности. Когда рибосома доходит до терминирующего бессмыслешюго кодона, что сопровождается освобождением незавершенной полипептидной цепи, происходит отделение рибосомы от мРНК-матрицы. Эта самая или какая-либо другая рибосома с большой степенью вероятности не сможет функционировать на дистальном гене до тех пор, пока не раскроется участок связывания этого гена; вероятность того, что этот участок откроется, зависит от протяженности транскрибированной области соседнего, ближайшего к 5'-концу гена. Таким образом, поссеис-

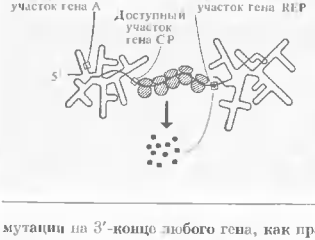


Рис. 15-32. Присоединение молекулы белка оболочки к участку инициации гена REP

мутации на 3'-конце любого гена, как правило, не должны влиять на считывание дистальных генов, поскольку к тому времени, когда рибосома начнет считывать бессмысленные кодоны, петли шпилек, заключающие в себе следующий участок связывания, становятся доступными.

БЕЛОК ОБОЛОЧКИ МОЖЕТ РЕПРЕССИРОВАТЬ ТРАНСЛЯЦИЮ ГЕНА РЕПЛИКАЗЫ

Полипептидные цепи белка оболочки РНК-содержащего фага продуцируются в существенно больших количествах, чем полипептидные цепи репликазы. Насколько известно, в области гена REP продолжает двигаться по матрице не более 10% рибосом, завершивших считывание гена CP. In vivo контроль осуществляется следующим образом: новосинтезированные субъединицы белка оболочки специфически прикрепляются к участкам связывания гена REP и препятствуют считыванию последнего (рис. 15-32). За 10 мин после начала инфекции накапливается такое количество белка оболочки, которое достаточно для блокирования дальнейшего синтеза репликазы. Это позволяет рассматривать цепи белка оболочки как специфические репрессоры на уровне трансляции.

Специфическая остановка синтеза репликазы ранее чем на полпути жизненного цикла имеет очевидный смысл. К этому времени накапливается достаточное для репликации вирусной РНК количество фермента, и главным процессом последних стадий жизненного цикла становится образование структурных белков вируса.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ, ОБРАЗУЕМЫЕ ЦЕПЯМИ ВИРУС-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕПЛИКАЗЫ И БЕЛКАМИ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА

Продукт гена репликазы — полипептид с мол. весом 65 000 — не может функционировать сам по себе: он становится активным только после соединения с тремя полипептидными цепями, синтезируемыми клеткой-хозяином (рис. 15-33). Две из них (мол. вес 35 000 и 45 000) представляют собой компоненты Tu и Ts так называемого фактора T; этот последний является белковым комплексом, ответственным за перенос вновь поступающих молекул АА-тРНК в А-участок рибосомы. Третий полипептид — это фактор S1, белок с мол. весом 70 000; функция его до сих пор неясна, известно только, что он всегда прочно связывается с 30S-субчастицей рибосомы. В настоящее время с определенностью можно говорить лишь о роли вирус-специфического компонента. Он содержит каталитический

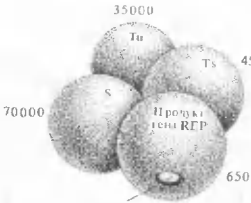


Рис. 15-33. Схематическое изображение молекулы репликазы фага Qβ. Молекула состоит из одной вирус-специфической полипептидной цепи и трех компонентов, синтезируемых клеткой-хозяином.

участок, ответственный за образование межнуклеотидных 3′—5′-фосфодиэфирных связей.

Функция фактора Т скорее всего заключается в инициации цепи, точнее в узнавании 3′-концов РНК-матриц. В поддержку этого предположения говорит наличие тРНК-подобных последовательностей (в частности, ...ЦЦА$_{(ОН)}$) на 3′-концах вирусных (+)- и (—)-цепей. Поскольку оба Т-фактора приспособлены для узнавания молекул тРНК, их присутствие в полном репликазном комплексе, возможно, объясняется тем, что в процессе эволюции возник механизм, с помощью которого молекулы репликазы предпочитают присоединяться к 3′-концам вирусной, а не бактериальной РНК. Еще менее понятна функция компонента S1, хотя он необходим опять-таки скорее для стадии инициации, чем элонгации.

У РНК-СОДЕРЖАЩИХ ФАГОВ САМОВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ РНК ПРОИСХОДИТ БЕЗ УЧАСТИЯ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫХ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Репликация вирусной РНК начинается с присоединения репликазы к 3′-концу материнской (+)-цепи и последующего синтеза комплементарной (—)-цепи в направлении 5′ → 3′ (предшественниками служат рибонуклеозидтрифосфаты). Хотя последовательность в (—)-цепи определяется спариванием оснований, никакого двухцепочечного репликативного промежуточного комплекса не образуется и продуктом первого этапа синтеза является свободная (—)-цепь (рис. 15-34). Короткий двухцепочечный участок обнаруживается в репликативном промежуточном комплексе только в месте связывания репликазы с материнской цепью. Но если удалить репликазу обработкой веществами, денатурирующими белок, то все растущие цепи комплементарно спарятся с материнскими цепями с образованием двухцепочечных участков (рис. 15-35). Следовательно, сама репликаза каким-то образом обеспечивает расхождение дочерних (—)-цепей и материнских (+)-цепей матриц. В дальнейшем и завершенная дочерняя (—)-цепь, и исходная (+)-цепь в свою очередь служат матрицами для синтеза все больших количеств (+)- и (—)-цепей. В этом процессе (—)-цепей образуется существенно больше, чем дочерних (+)-цепей; это говорит о том, что молекулы репликазы предпочтительно связываются с 3′-концом (—)-, а не (+)-цепей.

Синтезированные in vitro (+)-цепи осаждаются при центрифугировании с той же скоростью, что и (+)-цепи, сформировавшиеся in vivo;

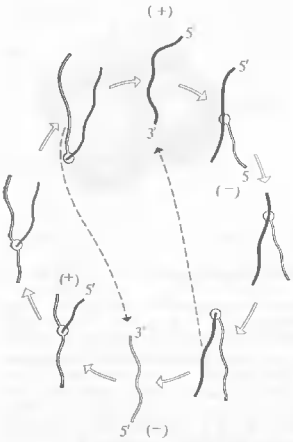
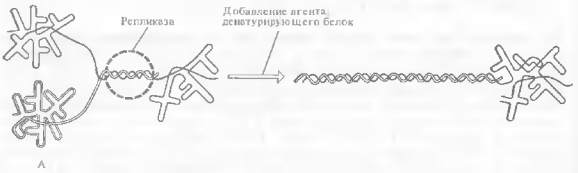


Рис. 15-34. Схема репликации фага Qβ (или фагов MS2, R17 и т. д.), осуществляемой фаговой репликазой.
Для наглядности одноцепочечные области изображены растянутыми, а не свернутыми.



А

Б

Рис. 15-35. *А*. Схема, показывающая, как после отделения репликазы компактный промежуточный продукт репликации РНК-содержащего фага приобретает вытянутую линейную форму, состоящую в основном из двухцепочечной области. *Б*. Электронная микрофотография вытянутой линейной формы. Светлый объект на конце двухцепочечной области представляет собой скрученный в клубок участок одноцепочечной РНК фага R17. (С любезного разрешения д-ра З. Тача и д-ра Р. Тача, медицинский факультет Вашингтонского университета.)

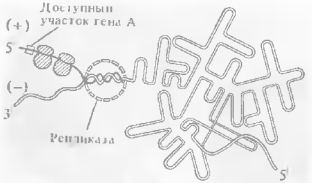


Рис 15-36. Образование белка А на растущих (−)-цепях.

при добавлении к растущим бактериям они обнаруживают одинаковую инфекционность. Кроме того, частоты возникновения мутаций in vitro и in vivo также одинаковы. Это означает, что копирование, осуществляемое in vitro, происходит столь же точно, как и в клетках.

ТОЛЬКО РАСТУЩИЕ ОТРЕЗКИ (+)-ЦЕПИ СЛУЖАТ МАТРИЦАМИ ДЛЯ СИНТЕЗА А-БЕЛКА

Считывание гена А ограничено во времени периодами репликации вирусной РНК, которые характеризуются наличием незавершенных отрезков растущей РНК. Как только начинает расти вирусная (−)-цепь, новообразованный участок связывания гена А становится доступным для рибосом (рис. 15-36). Однако довольно быстро он закрывается, так как в ходе дальнейшей элонгации цепи образуются достаточно протяженные отрезки РНК с выраженной вторичной структурой. Открытые участки гена А связывают рибосомы далее эффективнее, чем открытые участки гена CP. Следовательно, мы видим, что их внутреннее сродство к рибосомам само по себе не определяет частоту их считывания. Гораздо существеннее оказывается степень их блокировки за счет образования вторичной структуры.

САМОСБОРКА ДОЧЕРНИХ ЧАСТИЦ И ОБРАЗОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ВИРУСНЫХ КРИСТАЛЛОВ

Сборка дочерних фагов начинается самопроизвольно, как только накопятся А-белок, белок оболочки и дочерние (+)-цепи РНК. В частицу фага входят всегда только дочерние (+)-цепи, а новообразованные (−)-цепи остаются свободными и на них синтезируются все большие количества дочерних (+)-цепей. Полагают, что в процессе агрегации белок А довольно рано связывается с фаговой РНК и образует прочный комплекс, который сохраняется и в дальнейшем, когда белок А проникнет в бактерии вместе с молекулой РНК. Можно себе представить, что при связывании А-белка дочерние (+) цепи превращаются в формы, вокруг которых агрегация белка оболочки ускоряется.

В ходе инфекции белок дочерних частиц зачастую составляет столь существенную долю внутриклеточного содержимого, что он начинает образовывать мельчайшие кристаллы, которые легко увидеть в электронный микроскоп (рис. 15-37). До сих пор такие кристаллы обнаружены лишь in vivo. Несмотря на то что чистый РНК-содержащий фаг можно

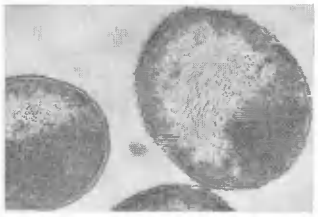


Рис. 15-37. Электронная микрофотография тонкого среза клетки *E. coli*, зараженной РНК-содержащим фагом F2. (С любезного разрешения д-ра Зиндера, Рокфеллеровский университет.)
Большая часть дочерних частиц лежит вплотную друг к другу, образуя кристаллоподобные включения.

легко получить в больших количествах, никому еще не удалось получить такие кристаллы in vitro; по этой причине пока нельзя рассчитывать на рентгеноструктурный анализ РНК-содержащего фага.

ПОЛНАЯ НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РНК ФАГА MS2 УСТАНОВЛЕНА

В течение многих лет исследователи не смели и мечтать о том, что когда-нибудь удастся выяснить полную нуклеотидную последовательность вирусной нуклеиновой кислоты. Число нуклеотидов в цепи РНК или ДНК даже у самого мелкого из вирусов казалось слишком огромным, чтобы подступиться к этой задаче. Но за последнее десятилетие были разработаны новые методы для определения нуклеотидной последовательности, благодаря которым точка зрения исследователей изменилась. Особенно важную роль сыграли новые ферменты, которые расщепляют молекулу нуклеиновой кислоты в месте строго определенного сочетания нуклеотидов. Существенным оказалось также осознание того факта, что отсутствие какой бы то ни было свернутой вторичной структуры делает определенные последовательности гораздо более восприимчивыми к расщеплению нуклеазами по сравнению с теми же участками, входящими в состав закрученных шпилек. Например, если РНК фага R17 на короткое время подвергнуть действию РНКазы IV, то при первом расщеплении образуется 2 фрагмента: один, соответствующий 40% длины всей РНК, содержит 5′-конец РНК, а второй, длина которого равна 60% длины РНК, содержит 3′-конец. Еще один прием состоит в том, что РНК-репликаза дают возможность функционировать в течение различных отрезков времени и благодаря этому получают цепи различной длины. С помощью упомянутых подходов легко установить последовательность многих нуклеотидных фрагментов, образующихся при ограниченном ферментативном гидролизе. Еще больше информации, особенно в случае очень длинных последовательностей, извлекают из сравнения полученных таким образом последовательностей с аминокислотными последовательностями белков, кодируемых исследуемыми РНК.

Первыми из фаговых РНК были расшифрованы (хотя бы частично) последовательности для фагов R17 и Qβ: для них были установлены протяженные участки на 5′- и 3′-концах, а также значительные части гена CP. В последнем случае данные можно было легко проверить сопоставлением с уже установленной аминокислотной последовательностью

белка оболочки. В настоящее время наиболее полные сведения получены для фага MS2, родственного фагу R17; выяснилось, что он обладает последовательностями, почти идентичными обнаруженным в фаге R17. Недавно (весной 1975 г.) была полностью расшифрована последовательность нуклеотидов в РНК этого фага и были разработаны модели вторичной структуры примерно для половины молекулы. На рис. 15-38 показана такая модель для гена CP, а также для межцистронных последовательностей, отделяющих его от генов A и REP. Модель для всего генома в целом, по всей видимости, должна быть построена в ближайшем будущем.

Весьма важно, что данные о нуклеотидной последовательности прямо говорят о том, что трансляция начинается не непосредственно на 5′-конце, а на расстоянии примерно 129 нуклеотидов от него: здесь расположен кодон ГУГ, играющий роль сигнала для инициирующего формилметионина. На 3′-конце РНК отсутствует кодон терминации; за стоп-сигналом УАГ для гена REP следует нетранслируемая последовательность из 174 нуклеотидов (рис. 15-38). В настоящее время складывается впечатление, что функция многих из нетранслируемых нуклеотидов (или нуклеотидов, комплементарных им) состоит в специфическом узнавании вирус-специфической репликазы. Поскольку репликацию обеих цепей — и (—)-, и (+)-цепи — катализирует один и тот же фермент, 3′-концы этих цепей должны выглядеть в основных чертах одинаково. Следовательно, 5′-конец (+)-цепи, на котором синтезируется 3′-конец (—)-цепи, должен содержать некоторые последовательности, комплементарные участкам, расположенным на 3′-конце.

САТЕЛЛИТНАЯ РНК СОДЕРЖИТ ИНФОРМАЦИЮ ТОЛЬКО ДЛЯ МОЛЕКУЛ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ

Еще меньшими размерами характеризуются частицы РНК-содержащего вируса, которые обнаруживаются в клетках листьев табака, зараженного вирусом некроза табака. Одноцепочечная РНК этого вируса состоит всего лишь из 1000 нуклеотидов — эта величина как раз достаточна для кодирования белкового компонента, образующего структурную оболочку вируса. Эти мельчайшие частицы (часто называемые сателлитами) никогда не обнаруживаются в одиночестве; они образуются только тогда, когда восприимчивые клетки одновременно заражены другим РНК-содержащим вирусом большего размера (РНК этого вируса состоит из 6000 нуклеотидов). Это обстоятельство дает вполне очевидные основания думать, что очень мелкий вирус реплицируется с использованием вирус-специфических ферментов (в частности, РНК-синтетазы), информация для которых содержится в РНК вируса большего размера. Таким образом, вопрос о том, следует ли считать вирус некроза табака наиболее мелким из всех известных вирусов, представляется нам спорным и, вообще говоря, не таким уж важным. О чем стоит сказать, так это о том, что нуклеиновая кислота этого вируса является удобным объектом для изучения нуклеотидной последовательности.

НАИМЕНЬШИЕ ИЗ ИЗВЕСТНЫХ ВИРУСОВ ПРАКТИЧЕСКИ СООТВЕТСТВУЮТ НИЖНИМ ПРЕДЕЛАМ РАЗМЕРА ВИРУСА

Требование, согласно которому геном вируса должен содержать информацию для вирус-специфической РНК-репликазы, а также для белков оболочки, естественным образом определяет нижний предел размера РНК-содержащего вируса. Во-первых, было бы удивительно, если бы молекула синтетазы с мол. весом меньше 30 000 могла выполнять все задачи,

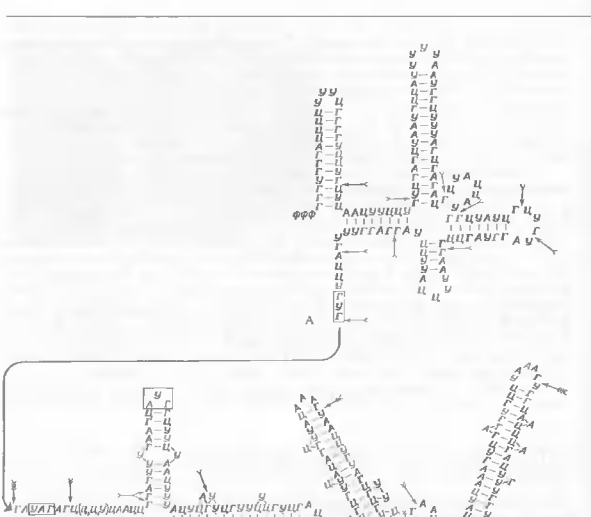
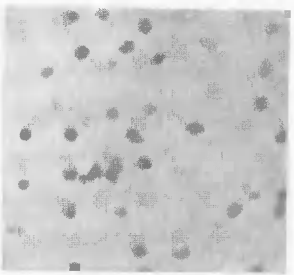
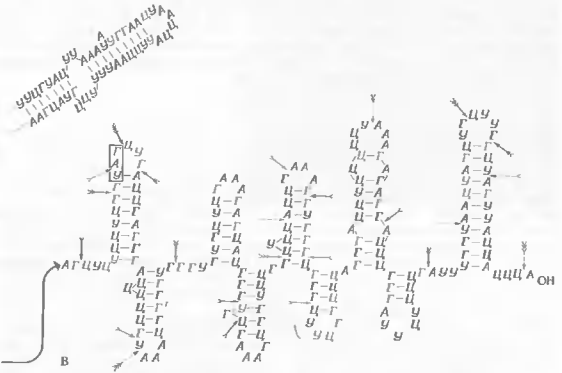


Рис. 15-38. Генетическая карта фага MS2 на уровне нуклеотидов.
А. Последовательность участка от 5′-конца до инициирующего кодона ГУГ для белка А. *Б.* Полная последовательность гена белка оболочки и примыкающих к нему межцистронных участков. *В.* Нетранслируемая последовательность, находящаяся на 3′-конце. В ряде кодон УАГ, функционирующий как «стоп-сигнал» при считывании гена репликазы (ге

возникающие при самовоспроизведении РНК. Во-вторых, трудно себе представить стабильные субъединицы белка оболочки, которые состояли бы менее чем из 50—75 аминокислот. Таким образом, наименьший РНК-содержащий вирус, который был бы способен обеспечивать себя сам, вероятнее всего, должен обладать РНК с числом нуклеотидов не менее 1500 (т. е





последовательности были расшифрованы д-ром Фиерсом и его сотрудниками в Гентском университете). На электронной микрофотографии вверху справа показана цепь РНК фага MS2, имеющая компактную трехмерную структуру. (Фотография воспроизводится с любезного разрешения д-ра З. Тача и д-ра Р. Тача, медицинский факультет Вашингтонского университета.)

около половины нуклеотидов, которые содержит РНК фага R17). Обнаружить гораздо более мелкий вирус в высшей степени нереально.

Аналогичные рассуждения о наименьшем размере для ДНК-содержащего вируса привести в настоящее время нельзя, поскольку не исключено, что кольцевая молекула вирусной ДНК может реплицироваться

с использованием одних только бактериальных ферментов. Если это действительно так, то в один прекрасный день мы сможем обнаружить ДНК-содержащий вирус, единственный ген которого будет содержать информацию для белка оболочки. Легко прикинуть, что цепь ДНК такого вируса будет содержать всего лишь 300—500 пар оснований.

Верхний предел размера вируса оценить довольно трудно. Самые крупные из известных вирусов содержат 200, а то и 300 генов, и при этом вряд ли можно чисто теоретически объяснить, почему нуклеиновая кислота не могла бы состоять из еще большего числа генов. Вероятно, за пределами определенного размера нет существенной необходимости в появлении новых генов для более эффективного управления клеткой-хозяином и переключения ее на предпочтительный синтез вирус-специфических продуктов.

Неизменно четкой остается существенная разница между вирусом и клеткой. Хотя, впрочем, еще десять лет назад и в данном вопросе существовала известная путаница. В то время основным критерием для вируса оставалась по-прежнему его способность проходить через мембранные фильтры, задерживающие бактерии. При таком определении очень мелкие болезнетворные тельца, известные под названием риккетсий, обычно рассматривались как вирусы. Но теперь обнаружено, что риккетсии содержат не только ДНК и РНК, но и белоксинтезирующую систему; следовательно, их нужно считать бактериями очень малых размеров. Отличительная особенность вирусов состоит в том, что у них отсутствует собственная белоксинтезирующая система. Это означает, что размножение вирусов должно всегда сопровождаться разрушением их защитной оболочки, благодаря чему у вирусных хромосом появляется возможность контактировать с клеточными ферментами.

РЕПЛИЦИРУЮЩИЕСЯ МОЛЕКУЛЫ РНК, ЛИШЕННЫЕ БЕЛКОВОЙ ОБОЛОЧКИ

В последние годы были получены свидетельства существования болезнетворных агентов с размерами, намного меньшими, чем у всех известных вирусов, которые, по-видимому, состоят из одной РНК. Названные вироидами, эти инфекционные агенты совершенно нового типа были выявлены при изучении веретеновидности клубней картофеля. Вироид седиментирует крайне медленно; его инфекционность не зависит от присутствия какого-либо белка или липида, причем она быстро исчезает при обработке рибонуклеазами, гидролизующими одноцепочечные цепи РНК.

Недавно удалось получить инфекционный материал, который в высокоочищенном виде седиментирует с константой седиментации 5,5S. При прямом определении его мол. веса была получена величина $8 \cdot 10^5$ (около 225 нуклеотидов). Она была подтверждена данными электронной микроскопии (рис. 15-39); на электронных микрофотографиях видны короткие линейные молекулы (не исключается конфигурация шпилек) длиной от 400 до 500 Å. Каким образом вироиды реплицируются, до сих пор остается загадкой, так как в лучшем случае они могут содержать информацию для 70—80 аминокислот, т. е. скорее всего не способны кодировать вирус-специфическую репликазу. В их репликации должен участвовать некий клеточный фермент, который способен синтезировать комплементарные цепи. Хотя до сих пор в нормальных клетках не удалось обнаружить такого фермента, открытие кодируемого вирусом фермента, именуемого обратной транскриптазой (стр. 656) и синтезирующего ДНК на матрице РНК, представляет широкое поле для раздумий о том, каким образом происходит репликация вироида.

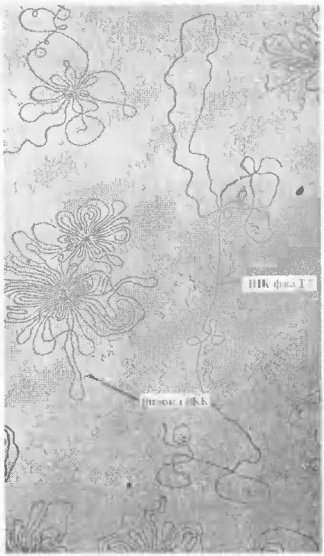


Рис. 15-39. Электронная микрофотография вирионов веретеновидности клубней картофеля в смеси с двухцепочечной ДНК фага Т7. (С любезного разрешения д-ра Котлера и д-ра Соко, Швейцарский федеральный технологический институт, Цюрих.)

СУЩЕСТВУЕТ НИЖНИЙ ПРЕДЕЛ РАЗМЕРА ДЕЛЯЩИХСЯ КЛЕТОК

Существует некий нижний предел размера клетки, даже если эта клетка растет в среде, содержащей все необходимые питательные вещества. Клетка должна быть достаточно большой, чтобы содержать функционирующую полупроницаемую мембрану, аппарат для синтеза белка и генетический материал, в котором была бы закодирована информация для всех ферментов, обеспечивающих синтез клеточных нуклеиновых кислот и белков. Кроме того, в хромосомах должна быть также заключена информация для ферментов, катализирующих образование тех низкомолекулярных веществ, которые необходимы клетке, но не способны проходить через полупроницаемую мембрану. Так, например, хотя все аминокислоты и пуриновые или пиримидиновые основания могут поступать в клетку из питательной среды, получать таким путем фосфорилированные соединения типа АТФ клетка обычно не может. Такого рода соединения должны поэтому синтезироваться в самой клетке, и, следовательно, в ее геноме должна храниться информация для образования ферментов, с помощью которых эти молекулы синтезируются из предшественников.

Точно определить нижний предел размера клетки пока еще невозможно. По осторожной оценке количество ДНК в хромосоме риккетсий не превышает 15—20% количества ДНК в хромосоме *E. coli*. Это, очевидно, означает, что в хромосоме риккетсий содержится 750—4000 генов. Имеются сообщения о существовании еще более мелких клеток, однако такие сообщения требуют тщательный проверки, ибо из них вытекает, что уже 100 различных белков достаточно для поддержания жизни клетки.

ВЫВОДЫ

Все известные вирусы содержат сердцевину, состоящую из ДНК или РНК. Сердцевина окружена защитной оболочкой, построенной из белка (иногда с добавлением липидов и (или) углеводов). Вирусная ДНК может быть как двухцепочечной, так и одноцепочечной. В этих же двух формах встречается и вирусная РНК. Присутствие в вирусных частицах нуклеиновых кислот не вызывает удивления, поскольку эти частицы должны содержать какой-то генетический компонент. Удивительным на первый взгляд представляется то, что роль генетического компонента у многих вирусов (например, у ВТМ или вируса гриппа) играет РНК. Это означает, что вирусная РНК служит матрицей для самовоспроизведения.

После проникновения вирусной нуклеиновой кислоты в клетку начинается синтез различных компонентов вируса. Затем эти компоненты специфическим образом объединяются (агрегируют), и образуются новые инфекционные частицы, тождественные родительским. Избирательному синтезу вирусных компонентов в клетке часто предшествует синтез ряда специфичных ферментов, участвующих в метаболизме нуклеиновых кислот. Например, для репликации одноцепочечной РНК требуется РНК-репликаза. Этот фермент использует в качестве матрицы материнскую (+)-цепь РНК и синтезирует на ней (−)-цепи. Затем он использует в качестве матриц (−)-цепи и синтезирует на них (+)-цепи. Таким образом, основной механизм репликации РНК и ДНК одинаков. Во всех случаях новые полинуклеотидные цепи строятся как комплементарные копии по принципу специфического спаривания оснований.

Не существует данных, которые бы свидетельствовали о наличии систем типа репрессор-оператор во время литического цикла развития вируса. Регуляция, обеспечивающая появление вирус-специфических белков в строго определенные моменты времени, скорее всего имеет позитивный характер. Напротив, поддержание лизогенного состояния непосредственно контролируется специфическими репрессорами, которые связываются с операторами и препятствуют транскрипции большей части вирусного генома.

Циклы литического развития обычно подразделяют на несколько отдельных фаз (раннюю, среднюю и позднюю), каждая из которых характеризуется функционированием специфических наборов генов. Ранние гены, большинство которых содержит информацию для ферментов, необходимых для синтеза вирус-специфических РНК и ДНК, контролируются промоторами, последние считываются немодифицированными молекулами РНК-полимеразы клетки-хозяина. Что касается средних и поздних генов, то они часто (например, у фага Т4) контролируются промоторами, считывание которых зависит от существования кодируемых вирусом факторов специфичности. Факторы специфичности направляют синтез новых форм РНК за счет присоединения к кор-ферменту РНК-полимеразы клетки-хозяина. У некоторых вирусов (например, у фага Т7) поздние гены считываются совершенно новой РНК полимеразой, кодируемой одним из ранних генов.

Внутри данного оперона точное время выражения генов определяется порядком их расположения, причем гены, наиболее удаленные от промоторов, выражаются последними. Выражение этих более дистальных генов зачастую тормозится действием фактора терминации ρ, который считывает стоп-сигналы, расположенные между проксимальными и дистальными по отношению к промотору генами. Выражение дистальных генов зависит от накопления антитерминаторов, которые кодируются вирусными генами (к примеру, геном N у фага λ).

Простейшими из известных в настоящее время вирусов являются РНК-содержащие фаги. В их хромосомах, состоящих из 3500 нуклеотидов, расположены три основных гена — два из них содержат информацию для структурных белков, третий — для РНК-репликазы. Скорости, с которыми функционируют эти гены, в какой-то степени определяются доступностью их участков связывания для рибосом (участков инициации). Важным механизмом регуляции является также специфическое присоединение новосинтезированных молекул белка оболочки к участку инициации гена репликазы, в результате чего функционирование гена репликазы во второй половине жизненного цикла вируса становится невозможным. В настоящее время новые методы анализа нуклеотидной последовательности позволяют установить полную последовательность оснований в хромосомах РНК-содержащих фагов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Crick F. H. C., Watson J. D., Virus Structure General Principles, CIBA Found. Symp. Nature Viruses, 5—13, 1957. Ранняя работа с объяснением структурных последствий ограниченного содержания нуклеиновых кислот в вирусах.

Klug A., Caspar D. L. D., The Structure of Small Viruses, Advan. Res., **7**, 225 (1960). Наилучшее объяснение принципов построения вирусов; особенно подробно рассмотрен ВТМ.

Stent G. S., Molecular Biology of Bacterial Viruses, Freeman, San Francisco, 1963. (Г. Стент, Молекулярная биология вирусов бактерий, изд-во «Мир», М., 1965.) Книга, к настоящему времени сильно устаревшая. Однако она может быть весьма полезной для уяснения, каким образом бактериофаги заняли ключевое положение в развитии молекулярной биологии.

Luria S. E., Darnell J. E., General Virology, 2nd ed., Wiley, New York, 1968. (С. Лурия, Дж. Дарнелл, Общая вирусология, изд-во «Мир», М., 1970.) Осмысление всех аспектов размножения вирусов.

Cohen S. S., Virus-Induced Enzymes, Columbia University Press, New York, 1968. Несколько субъективный обзор, посвященный использованию вирусами определенных ферментов для переключения клеточного синтеза на синтез вирус-специфических продуктов.

Wood W. B., Edgar R. S., Building a Bacteria Virus. Прекрасно иллюстрированная статья из журнала «Scientific American», перепечатанная в сборнике The Chemical Basis of Life, P. C. Hanawalt and R. H. Haynes (eds.), Freeman, San Francisco, 1973.

Milanesi G., Brody E. N., Grau O., Geiduschek E. P., Transcription of the Bacteriophage T4 Template in vitro: Separation of «Delayed Early» from «Immediate Early» Transcription, Proc. Nat. Acad. Sci., **66**, 181 (1970). Свидетельства контроля ранними промоторами предранних и задержанных ранних генов.

Travers A. A., Positive Control of Transcription by a Bacteriophage, Nature, **225**, 1009 (1970). Первые эксперименты, показавшие, что в синтезе мРНК фага Т4 участвует фактор специфичности данного фага.

Schmidt D. A., Maaniss A. J., Kozal R., Bautz E. K. F., Involvement of a Phage T4 σ Factor and an Antiterminator Protein in the Transcription of Early T4 Genes in vivo, Nature, **225**, 1012 (1970). Жизненный цикл фага Т4, анализируемый с точки зрения участия σ, ρ и антитерминатора.

Transcription of Genetic Material, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., XXXV (1971). В этом внушительном сборнике статей содержится фактически полная информация о результатах, полученных к июню 1970 г., касающихся транскрипции вирусных генов.

O'Farrel P. Z., Gold L. M., Bacteriophage T4 Gene Expression: Evidence for Two Classes of Prereplicative Cistrons, J. Biol. Chem., **248**, 5502 (1973). Эксперименты, помогающие подтвердить различия между ранними и средними (квазипоздними) промоторами.

Mattson T., Richardson J., Goodin D., Mutant of Bacteriophage T4D Affecting Expression of Many Early Genes, Nature, 250, 48 (1974). Доказательство существования мутации, при которой блокируется выражение средних промоторов.

Stevens A., New Small Polypeptides Associted with DNA-Dependent RNA Polymerase of *E. coli* after Infection with Bacteriophage T4, Proc. Natl. Acad. Sci., 69, 603 (1972). Данные, свидетельствующие о том, что гены 33 и 55 фага T4 контролируют синтез мелких полипептидов специфичности, необходимых для считывания поздних генов.

Horvitz H. R., Polypeptide Bound to Host RNA Polymerase is Specified by T4 Control Gene 33, Nature New Biology, 244, 137 (1973). Прямое доказательство кодирования геном 33 фактора специфичности фага T4 с мол. весом 12 000.

Chamberlin M., McGrath J., Waskell L., New RNA Polymerase from *E. coli* Infected with Bacteriophage T7, Nature, 228, 227 (1970). Неожиданное открытие абсолютно новой вирус-специфической РНК-полимеразы, синтезирующей позднюю РНК фага T7.

Golomb M., Chamberlin M., A Preliminary Map of the Major Transcription Units Read by T7 RNA Polymerase on the T7 and T3 Bacteriophage Chromosomes, Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 760 (1974).

The Bacteriophage Lambda, A. D. Hershey (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, 1971. Собрание общих обзоров и специальных статей, в которых подводится итог двадцатилетним исследованиям природы лизогенизирующих фагов.

Roberts J. W., Termination Factor for RNA Synthesis, Nature, 224, 1168 (1969). Статья о том, как открытие фактора терминации ρ привело к постулированию антитерминаторов.

Walz A., Pirrotta V., Sequence of the P_R Promoter of Phage λ, Nature, 254, 118 (1975).

Maniatis T., Ptashne M., Backman K., Kleid D., Flashman S., Jeffrey A., Maurer R., Recognition Sequences of Repressor and Polymerase in The Operators of Bacteriophage λ, Cell, 5, 109 (1975). В этой статье, так же как и в предыдущей, наглядно показаны взаимоотношения между операторными и промоторными последовательностями в ДНК фага λ.

Spiegelman S., Haruna I., Holland I. B., Beaudreau G., Mills D., The Synthesis of a Self-Propagating and Infectious Nucleic Acid with a Purified Enzyme, Proc. Natl. Acad. Sci., 54, 919 (1965). Первое сообщение о репликации инфекционной вирусной РНК (фага Qβ) in vitro.

RNA Phages, N. Zinder (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, 1975. Сборник современных обзоров, в котором суммированы многочисленные сравнительно недавно полученные факты о вирусах этой необычайно важной группы (РНК-содержащие фаги).

Diener T. O., Viroids: The Smallest Known Agents of Infectious Disease, Ann. Rev. Microbiol., 28, 23 (1974). Обзор данных, полученных в основном самим автором, свидетельствующих о способности безбелковых частиц, состоящих из очень мелких молекул РНК, вызывать некоторые болезни растений.

ГЛАВА
16

Отличительные черты эукариотических клеток

Объем наших знаний о генетической организации бактерий и их вирусов на молекулярном уровне вселяет в нас энтузиазм и позволяет надеяться, что в самое ближайшее время наука сможет столь же однозначно ответить на многие вопросы и в отношении высших организмов, в частности позвоночных. Само собой разумеется, что новые сведения о позвоночных могут иметь прямое отношение к человеку. Однако, прежде чем замахиваться так далеко, мы должны понять, что главная граница раздела в биологии проходит не между микроорганизмами, с одной стороны, и высшими растениями и животными — с другой, а между организмами, обладающими ядром, и теми, которые ядра не содержат. Бактерии и близкородственные им сине-зеленые водоросли не имеют ядра и вместе именуются *прокариотами*. В отличие от них организмы, клетки которых характеризуются выраженным ядром, называются *эукариотами*. К последним принадлежат как некоторые группы микроорганизмов — зеленые водоросли, грибы, простейшие, так и более крупные и более знакомые высшие растения и животные. Насколько можно судить с современной точки зрения, все эукариоты происходят от одного и того же общего предка, поэтому, пытаясь выявить их отличительные свойства, нужно прежде всего понять, какие факторы эволюции привели к их появлению.

СКАЧОК В РАЗМЕРЕ ОРГАНИЗМА — РЕАКЦИЯ НА ПРЕИМУЩЕСТВА ГЕТЕРОТРОФНОГО ОБРАЗА ЖИЗНИ

В настоящее время общепринято мнение, что первые живые формы появились в водной океанической среде, в которой содержались огромные количества готовых блоков для построения живых клеток, таких, как аминокислоты, нуклеотиды, жирные кислоты. Все эти органические соединения («первичный бульон»), как полагают, образовались в ходе пребиотического эволюционного процесса, во время которого под действием солнечной энергии относительно простые молекулы типа метана и аммиака превращались в огромный набор сложных органических соединений. Жизнь как таковая зародилась тогда, когда молекулы примитивной нуклеиновой кислоты и примитивного белка оказались заключенными в мембранные липидсодержащие пузырьки, обеспечивающие среду, в которой мог протекать упорядоченный рост. Каким образом это произошло, остается до сих пор непонятным и совершенно загадочным. Особенно головоломным является вопрос о происхождении генетического кода и соответственно аппарата белкового синтеза. Чрезвычайная сложность воспроизведения и использования генетической информации делает любую попытку представить себе механизм возникновения всей системы в целом практически неразрешимой задачей. О природе первых «генетических» молекул, и в частности о том, что появилось вначале — РНК или ДНК, высказывались самые разные суждения. В основе всех ныне существующих живых форм

лежат одни и те же молекулярные механизмы, и этот факт свидетельствует о том, что не сохранилось никаких ископаемых молекул, которые могли бы дать ключ к разгадке природы первых живых организмов.

Что касается исходного пребиотического бульона, то мы предполагаем, что он был чрезвычайно богатым, так как многие ключевые химические превращения, от которых зависела первобытная жизнь, должны были протекать в отсутствие каких бы то ни было белковых катализаторов. Но благодаря присутствию в бульоне мелких молекул с каталитическими свойствами даже в таких условиях большинство исходных биологических реакций могло идти со скоростями, совместимыми с состоянием живого. Такой неферментативный катализ был бы, однако, в лучшем случае на 2—3 порядка менее эффективным, чем катализ, осуществляемый в настоящее время достигшими высокой степени сложности белками-ферментами. Поэтому надо думать, что первая живая форма, по всей видимости, росла гораздо медленнее, чем современная клетка.

Но когда ДНК приняла на себя обязанности кодирования специфических последовательностей аминокислот в ферментах, клетки получили возможность расти существенно быстрее, и тогда достаточно большая часть содержимого исходного органического бульона превратилась в клеточный материал. Вероятно, вскоре после возникновения столь продуктивных живых форм уровень содержания в бульоне пребиотических пищевых молекул снизился до тех низких концентраций, которые и сегодня наблюдаются в океанической среде. Таким образом были созданы условия, способствовавшие не только развитию фотосинтетических систем, но также и эволюционным процессам, приводящим к появлению организмов, которые могли бы активно находить пищу, перейдя к гетеротрофному способу питания. Чтобы это могло случиться, вначале должен был возникнуть организм такого размера, который позволил бы ему поглощать более мелкие организмы путем фагоцитоза — способом, похожим на питание существующих и в настоящее время амебоидных организмов.

КРУПНЫЕ КЛЕТКИ ДОЛЖНЫ ОБЛАДАТЬ ОБШИРНЫМИ ВНУТРЕННИМИ МЕМБРАНАМИ

Наиболее яркой особенностью строения, отличающей эукариотов от прокариотов, помимо наличия ядра, является сильное развитие внутри клеток липидсодержащих мембран, вакуолей и других органелл. Если почти во всех прокариотах и встречается какое-то подобие внутренних мембран (например, мезосомы), то только в крупных, высокоспециализированных фотосинтезирующих бактериях и сине-зеленых водорослях эти структуры становятся основной особенностью строения клетки. У эукариотов для формирования внутренних мембран используется гораздо больше липидов, чем для построения наружной поверхностной мембраны (плазматической мембраны). Такое необычайно выраженное развитие внутренних мембран вовсе не является делом случая, а скорее представляет собой следствие относительного увеличения размера эукариотической клетки. Даже самая мелкая из всех эукариотических клеток в 5—10 раз крупнее мелкой неспециализированной бактерии типа *E. coli*. Это означает, что эукариотические клетки характеризуются существенно меньшими величинами отношения массы к площади наружной поверхности, чем клетки прокариотов. Поэтому если считать, что жизненно важные процессы должны протекать на мембранах, то возникновение клеток все большего размера должно было зависеть от их способности ко все более интенсивному формированию внутренних мембранных пузырьков.

Например, и фотосинтез, и окислительное фосфорилирование требуют пространственного разделения многих ключевых промежуточных

соединений, что осуществляется при помощи полупроницаемых мембран. Это приводит не только к окружению хлоропластов и митохондрий мембранами, но и к появлению на поверхности органелл обоих типов обширных впячиваний, существенно увеличивающих площадь мембранной поверхности. Точно так же развитие ядерной мембраны может иметь отношение к еще не до конца понятной связи между молекулами ДНК и клеточными мембранами. По мере увеличения объема клетки прикрепление ДНК к клеточным мембранам могло быть заменено связыванием ДНК с более близко расположенными ядерными мембранами.

УКЛАДКА ЛИПИДОВ В ДВОЙНЫЕ СЛОИ

Большинство молекул липидов, обнаруживаемых в составе биологических мембран, содержат «голову» в виде фосфатных групп, соединенную с длинным углеводородным «хвостом» (фосфолипиды). Известно четыре основных вида фосфолипидов, участвующих в построении мембран у эукариотов: фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин и сфингомиелин (рис. 16-4). Они всегда упакованы в двойной слой толщиной 70 Å, причем заряженные фосфатные группы голов располагаются снаружи. Вследствие такой упорядоченной укладки все гидрофобные углеводород-

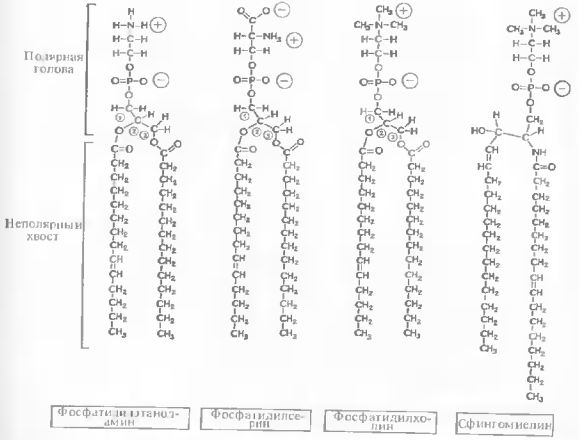


Рис. 16-4. Строение четырех основных фосфолипидов, обнаруживаемых в мембранах эукариотических клеток.
Длина неполярного хвоста жирной кислоты может варьировать. Цифры в кружочках стоят при трех атомах углерода в глицерине, который является компонентом трех фосфолипидов.

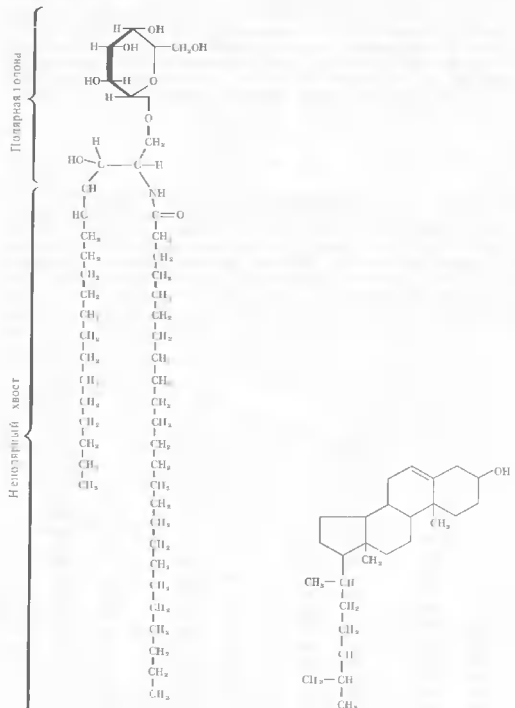


Рис. 16-2. Строение гликолипида (одного из цереброзидов) и холестерина.

ные хвосты контактируют друг с другом, что дает возможность сильно заряженным фосфатным группам свободно взаимодействовать с полярным водным окружением. Вполне возможно, что с момента возникновения жизни мембраны характеризовались точно такой же двуслойной структурой, как и та, которую мы видим сегодня.

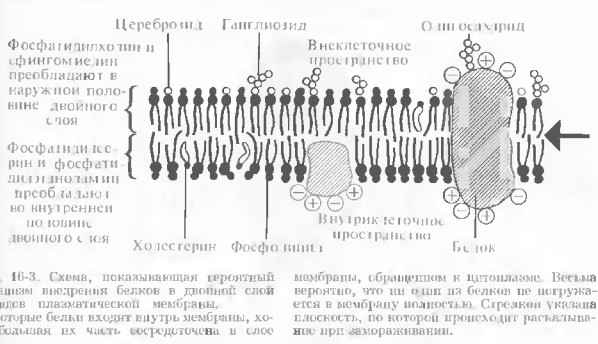


Рис. 16-3. Схема, показывающая вероятный механизм внедрения белков в двойной слой липидов плазматической мембраны. Некоторые белки входят внутрь мембраны, хотя большая их часть сосредоточена в слое мембраны, обращенном к цитоплазме. Весьма вероятно, что ни один из белков не погружается в мембрану полностью. Стрелкой указана плоскость, по которой происходит раскалывание при замораживании.

В состав большинства мембран эукариотических клеток входят также гликолипиды нескольких типов, в которых одна или несколько групп водорастворимого углевода связаны с гидрофобным хвостом, состоящим из жирной кислоты и аминоспирта сфингозина (рис. 16-2). В больших части двуслойных структур обнаруживаются также стероиды — в частности, практически во всех мембранах клеток полноценных неизменно присутствует в больших количествах холестерин. Не только фосфолипиды, но и все остальные соединения встраиваются в мембрану таким образом, что гидрофобные группы попадают в середину двойного слоя, а заряженные группы (способные к образованию водородных связей) располагаются снаружи (рис. 16-3).

ВНЕДРЕНИЕ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ В ДВОЙНЫЕ СЛОИ ЛИПИДОВ

Большинство мембран содержит разнообразные белковые молекулы, которые внедрены непосредственно в двойной слой липидов. Некоторые из них проходят через весь слой, так что их группы «высовываются» наружу с обеих сторон. Те боковые цепи аминокислот, которые расположены внутри двойного слоя, являются в целом гидрофобными. Наоборот, в областях, обращенных к внутренней (или внешней) поверхности, преобладают гидрофильные аминокислоты (рис. 16-4). В зависимости от функции мембраны в ее состав входят белковые компоненты различной специфичности. Некоторые из наиболее высокоспециализированных мембран содержат только один основной белковый компонент (например, белок мембраны сетчатки представлен почти исключительно зрительным пигментом *родопсином*).

Большинство электронных микрофотографий свидетельствует о симметричном строении мембран. Однако в последнее время представлены убедительные доказательства того, что две стороны данной мембраны характеризуются существенно отличающимся друг от друга химическим составом. Фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин обращены к внутрен-

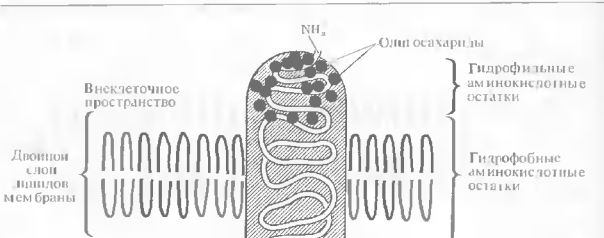


Рис. 16-4. Схема, показывающая вероятный механизм включения гликофорина (крупного гликопротеида) в мембрану эритроцитов.

ней (цитоплазматической) стороне, в то время как фосфатидилхолин и сфингомиелин обнаруживаются в основном на наружной поверхности. Те белки, которые внедряются в мембраны, имеют специфические области, которые, как правило, располагаются только снаружи или только внутри. Связанные углеводные группы имеют лишь те области, которые обращены кнаружи. Это позволяет предполагать, что гликозилирующие ферменты, которые катализируют перенос сахаров к мембранам, располагаются исключительно на внешних поверхностях мембраны.

При изучении с помощью электронной микроскопии мембран, расщепленных на внешнюю и внутреннюю половины, можно видеть большое

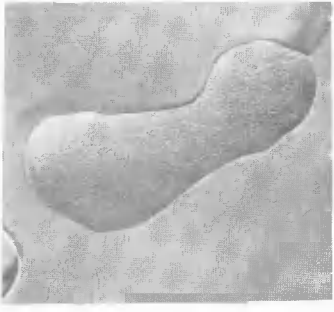


Рис. 16-5. Электронная микрофотография мембраны эритроцита, полученная методом замораживания — скалывания; × 60 000. (С любезного разрешения д-ра Брантона, Гарвардский университет.) При использовании этого метода мембрана часто разделяется на внутреннюю и наружную половины. Сферы с диаметром 85 Å, обнаруживаемые в этом случае только во внутренней части, in vivo могут располагаться во всех слоях мембраны.

количество глобулярных белков с диаметром молекулы 70 Å, расположенных внутри двойного слоя липидов (рис. 16-5). Является ли такое расположение истинным или оно связано с условиями обработки, остается выяснить в ходе дальнейших исследований — вероятно, разобраться в этом не удастся до тех пор, пока не будет определена функция этих глобулярных белков.

ПОЛУЖИДКОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

В настоящее время мы располагаем достоверными данными, согласно которым отдельные молекулы фосфолипидов и белков не сохраняют фиксированной ориентации, но находятся в постоянном движении внутри остова данной мембраны. Молекулы, соприкасающиеся друг с другом в какой-то определенный момент, могут достигать противоположной стороны клетки диаметром 10 мкм в течение одного часа или около того. Поэтому мембраны можно рассматривать как двумерные жидкости, все компоненты которых постоянно находятся в диффузионном движении. По основным свойствам они сходны с самозаклеивающейся резиновой покрышкой автомобильного колеса: образующиеся в них отверстия быстро исчезают вследствие диффузии рядом расположенных углеводородных молекул в направлении к энергетически нестабильным пустотам.

Столь же важным свойством является потенциальная способность соседних мембранных пузырьков сливаться при соприкосновении. Мембранные пузырьки могут также делиться, когда вроде бы случайное движение приводит к образованию нестабильных выпячиваний. Вероятно, большая часть таких делений или слияний представляет собой не случайные события, а реакцию на точно определенные раздражители. Можно думать, что они опосредованы силами, прилагаемыми к двойным слоям липидов, которые на какое-то мгновение создают в них мельчайшие разрывы. Если это так, то слияние или деление может быть следствием перестройки поверхности, имеющей разрывы, в результате чего внутренние и наружные поверхности рассматриваемой мембраны приходят в контакт соответственно с внутренними и наружными поверхностями других мембран (рис. 16-6).

ФАГОЦИТОЗ (ПИНОЦИТОЗ) ЯВЛЯЕТСЯ ОБРАТИМЫМ ПРОЦЕССОМ

В настоящее время мы можем в лучшем случае чисто теоретически рассуждать о молекулярных механизмах *фагоцитоза*, с помощью которого наружные плазматические мембраны крупных фагоцитирующих клеток плотно обволакивают пищевые объекты размером с бактерию и втягивают внутрь окруженные мембраной пузырьки (вакуоли), содержащие захваченную пищу. Этот способ питания используется не только для захвата клеток — основные черты этого процесса сохраняются и тогда, когда пищевые объекты имеют размер макромолекулы. Хотя последнее явление имеет особое название (*пиноцитоз*), основные черты его на молекулярном уровне не отличаются от механизма фагоцитоза. В ходе обоих процессов всегда происходит одно и то же: значительная часть наружной плазматической мембраны по необходимости втягивается во внутреннее пространство клетки (рис. 16-6). Такое движение может быть сбалансировано постоянным слиянием внутренних мембран с наружной мембраной — этот процесс часто называют обратным пиноцитозом или экзоцитозом. Аналогичные акты слияния мембран происходят (по крайней мере в клетках высших организмов) при росте клеток, когда осуществляется общее увели-

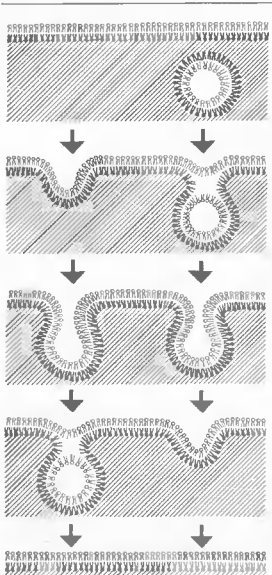


Рис. 16-6. Схема, показывающая наличие симметрии при пиноцитозе (слева) и экзоцитозе (справа).
Изображен вероятный механизм слияния мембраны. Наружная часть двойного слоя липидов в мембране изображена светлыми кружками с двумя отростками, а внутренняя, цитоплазматическая часть, черными кружками с двумя отростками.

чение площади внешней поверхности. Можно высказать предположение, что в ходе эволюции сначала появился пиноцитоз и лишь гораздо позже, когда пребиотнческий бульон стал сильно разбавленным, приобрел определенное биологическое значение и процесс фагоцитоза.

ДВИЖЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН В РЕЗУЛЬТАТЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АКТИНА И МИОЗИНА

Возникновение способности к фагоцитозу должно было одновременно придать соответствующим клеткам способность к некой форме направленного движения. Наблюдения за амебоидными клетками позволяют пред-

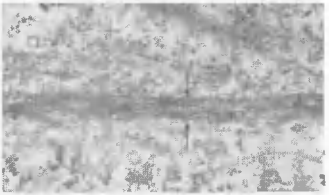


Рис. 16-7. Электронная микрофотография тонкого среза уплощенной клетки из почек обезьяны. (С любезного разрешения д-ра Голдмана, Карнеги-Меллоновский университет.) Видны многочисленные микрофиламенты диаметром 60 Å (актин), расположенные в виде пучка, идущего параллельно нижней поверхности клетки; × 45 000.

полагать, что движения мембраны, которые приводят к эффективному захвату пищи, являются также и основой передвижения таких клеток по твердым поверхностям. До самого последнего времени все теории амебоидного движения были чрезвычайно расплывчатыми. Однако теперь есть надежда, что в ближайшие одно-два десятилетия удастся понять детали этого процесса. Такая оптимистическая точка зрения основана на том, что все клетки, способные к амебоидному движению, содержат очень много структурных белков (если не все), участвующих в сокращении мышечных волокон. Мышечные белки (миозин, актин, тропомиозин и α-актинин) являются основными компонентами клеток не только у амеб, но также и во многих клеточных линиях, способных расти в культуре. К примеру, в клетках куриных фибробластов первое место по массе занимает среди белков актин. Кроме того, по структуре он, вероятно, идентичен актину, входящему в состав миофибрилл поперечнополосатой мускулатуры цыплят. Тропомиозин, α-актинин и миозин также принадлежат к числу основных компонентов всех фибробластов.

В культуре клеток большая часть актина находится в виде чрезвычайно длинных полимеризованных волокон диаметром 60 Å (микрофиламентов), которые зачастую уложены параллельно друг другу в пучки (вначале цитологи называли их волокнами напряжения) и расположены непосредственно под клеточной мембраной (рис. 16-7). Эти пучки содержат также миозин, тропомиозин и α-актинин (рис. 16-8). Поэтому напрашивается предположение, что они располагаются тем же способом, что и в поперечнополосатых мышцах, и имеют одну-единственную функцию: обеспечение скольжения при движении волокон, подобном тому, на котором основано сокращение миофибрилл поперечнополосатой мускулатуры (рис. 16-9). Однако микроскопическое исследование пучков микрофиламентов с применением флуоресцирующих антител показывает, что они скорее напоминают менее высоко организованные и гораздо менее изученные гладкие мышцы того типа, который характерен для мускульного желудка и сердца. Поскольку миозин, тропомиозин и α-актинин уложены во внутриклеточные пучки с определенной периодичностью, структура повторяется с частотой примерно 1,6 мкм, что составляет всего лишь $^2/_3$ частоты (2,5 мкм), наблюдаемой в волокнах обычных поперечнополосатых мышц. Кроме того, в «немышечных» клетках соотношение количества миозина и актина в 10 раз меньше по сравнению с поперечнополосатой мускулатурой.

Наиболее удивительно то, что при укладке актина не выявляется никакой периодичности — это позволяет думать, что отдельные нити актина непрерывны по всей длине пучка, и, следовательно, их длина

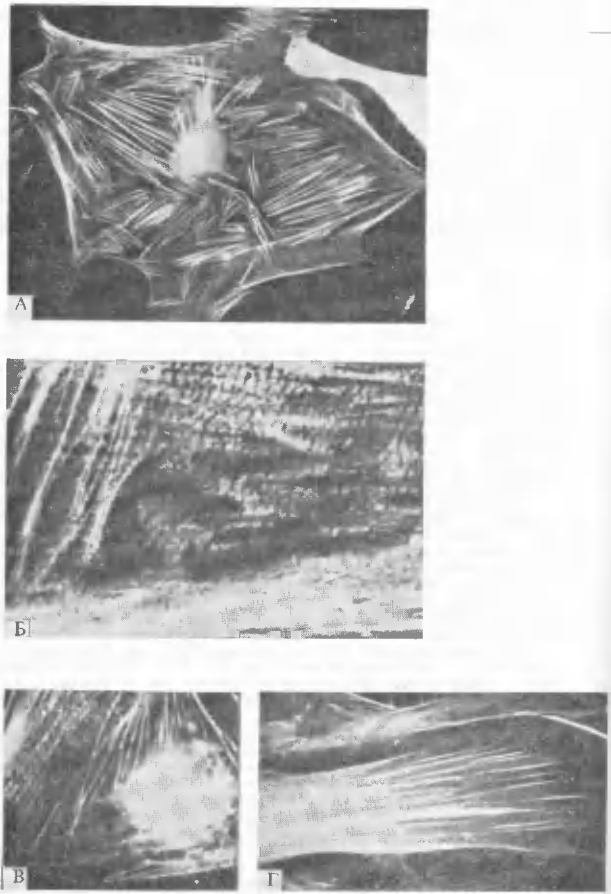


Рис. 16-8. Микрофотография клеток крысиных эмбрионов, полученная с использованием флуоресцирующих антител к актину (*А*), тропомиозину (*Б*), миозину (*В*) и α-актинину (*Г*). (С любезного разрешения д-ра Лазаридеса и д-ра Веберя, Лаборатория в Колд Спринг Харборе.)

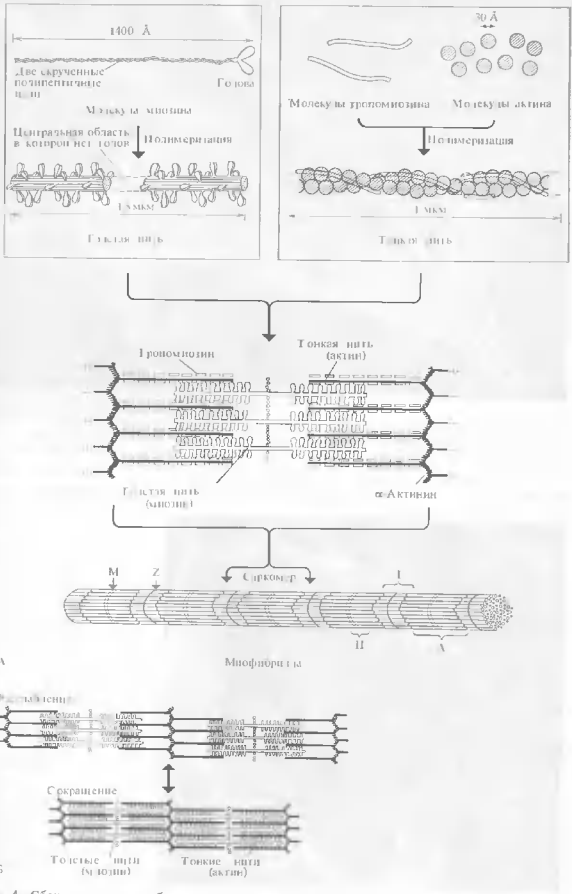


Рис. 16-9. *А*. Сборка мышечных белков в мышечное волокно. *Б*. Схема, показывающая механизм сокращения волокна скелетной мышцы вследствие скольжения одного пучка нитей (актин) относительно другого (миозин).

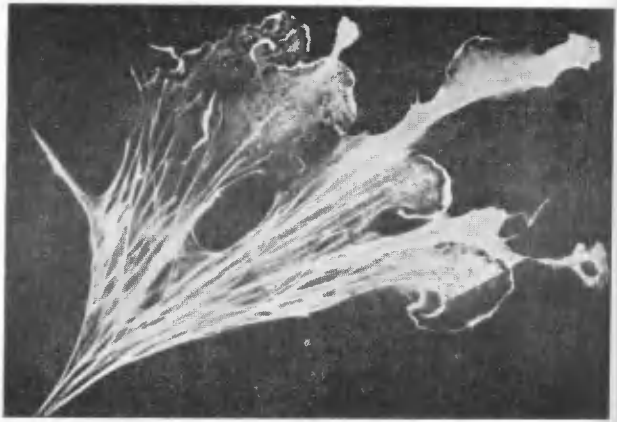


Рис. 16-10. Отдельная клетка из организма мыши, обработанная антителами к актину и помещенная на стеклянную пластинку. (С любезного разрешения д-ра Поллака, Лаборатория в Колд Спринг Харборе.) Клетка движется, основное направление движения — слева направо.

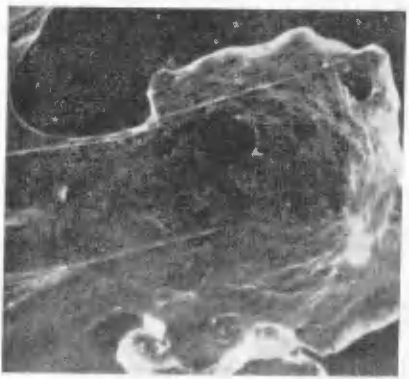


Рис. 16-11. Микрофотография движущегося выроста (псевдоподии) фибробласта куриного эмбриона, полученная при большом увеличении с использованием антител к актину. (С любезного разрешения д-ра Поллака, Лаборатория в Колд Спринг Харборе.) Внутри псевдоподии наиболее тонкие нити актина расположены, по-видимому, неупорядоченно если сравнить их организацию с более толстыми агрегатами, напоминающими кабель, которые обнаруживаются в покоящихся областях клетки.

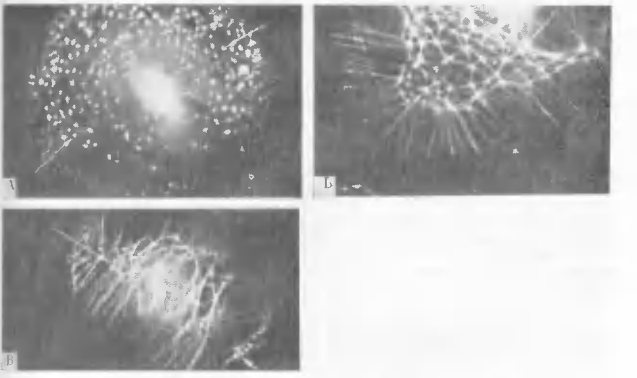


Рис. 16-12. Полигональная укладка мышечных белков, соединенных с сеймбраной фибробласта крысы, в процессе прикрепления клетки к плоской поверхности. (С любезного разрешения д-ра Лазаридеса, Лаборатория в Колд Спринг Харборе.)

А. Антитела к α-актинину позволяют выявить отдельные островки этого белка, которые соединяются с актином (*Б*) и тропомозином (*В*). Следует обратить внимание на то, что актин и α-актинин расположены в центральных участках, а тропомозин присутствует только в соединительных волокнах.

равна нескольким микрометрам. Вместе с тем пучки микрофиламентов (волокна напряжения), возможно, характерны для состояния полного сокращения, при котором противоположно направленные нити актина находятся в тесном контакте (рис. 16-9). Во всяком случае, наиболее упорядоченные волокна, напоминающие мышцы, лежат в относительно неокоящихся областях клетки, а не в участках активного движения мембраны (рис. 16-10). И наоборот, активно движущиеся выпячивания типа псевдоподий, по-видимому, содержат только неупорядоченные мышечные компоненты (рис. 16-11). Эта относительная неупорядоченность может отражать тот факт, что цитоплазматические выпячивания являются весьма кратковременными и существуют в течение нескольких секунд или нескольких минут, поэтому их мышечные элементы должны постоянно строиться и вновь разрушаться.

При любой схеме сокращения волокна, напоминающие мышцы, должны каким-то образом непосредственно контактировать с наружной клеточной мембраной, ключевую роль в этом процессе играет, по всей видимости, α-актинин — мышечный белок, который в поперечнополосатых мышцах располагается внутри пластинок «Z» — там он образует участки прикрепления актиновых нитей (рис. 16-9). В «немышечных» клетках α-актинин не только располагается между пучками микрофиламентов (рис. 16-8), но и участвует в их прикреплении к клеточной мембране. При изучении этого явления большую пользу принесло использование флуоресцирующих антител — с их помощью удалось увидеть, что микро-

филаменты прикрепляются к различным поверхностям клеточной мембраны в точках, располагающихся в виде многоугольника (рис. 16-12). Такой способ прикрепления придает определенную стабильность и самой плазматической мембране, благодаря чему при мгновенном замораживании в каждый данный момент можно фиксировать строго определенное взаиморасположение многих белков мембраны. Но когда выпячивания типа псевдоподий попеременно образуются, а затем исчезают, большая часть белков плазматической мембраны должна менять свое положение. Отсюда следует, что наружная клеточная мембрана является по своей природе «полужидкой».

Мышечные белки, перечисленные выше, были обнаружены практически во всех формах эукариотических организмов — даже в жестких растительных клетках, окруженных толстыми целлюлозными стенками, в значительном количестве присутствует актин, который, как полагают, принимает участие в движении потоков цитоплазмы. В то же самое время ни в одном из прокариотов не выявлено даже следов подобных белков. Следовательно, присутствие белков, аналогичных актину и миозину, является одним из главных биохимических показателей эукариотического состояния.

МИКРОВОРСИНКИ (МИКРОШИПЫ) МОГУТ ПРЕДСТАВЛЯТЬ СОБОЙ ОРГАНЫ ЧУВСТВ ДВИЖУЩЕЙСЯ КЛЕТКИ.

Уже первые шаги в осмыслении принципов организации мышечных белков клетки, способной к движению, позволяют всерьез подойти к ответу на вопрос о том, каким образом клетка «принимает решение» двигаться или расти в определенном направлении. Если ограниченные области мембраны способны реагировать на специфические раздражения (в частности, на присоединение частиц пищи), проще всего представить себе, что на поверхности плазматической мембраны существуют «чувствительные тельца». Вероятными кандидатами на эту роль являются микроворсинки (микрошипы) — они представляют собой длинные тонкие (диаметром ~0,2 мкм) выступы, которые постоянно выпячиваются и втягиваются на поверхности клетки (рис. 16-13). Процессы такого выпячивания и втягивания (удлинения и укорочения) протекают за несколько секунд или минут, и было бы заманчиво допустить, что основная их функция состоит в чувствовании (восприятии) окружающего мира. В поддержку такой

Рис. 16-13. Микрофотография переднего края движущейся клетки из организма мыши, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. (С любезного разрешения д-ра Ревела, Калифорнийский технологический институт; Revel, Symp. Soc. Exp. Biol. 39, 447, 1974.)
Видны волнистые края (1) и многочисленные микроворсинки (2) на верхней поверхности (стрелками указаны места прикрепления волнистых краев к поверхности стекла)

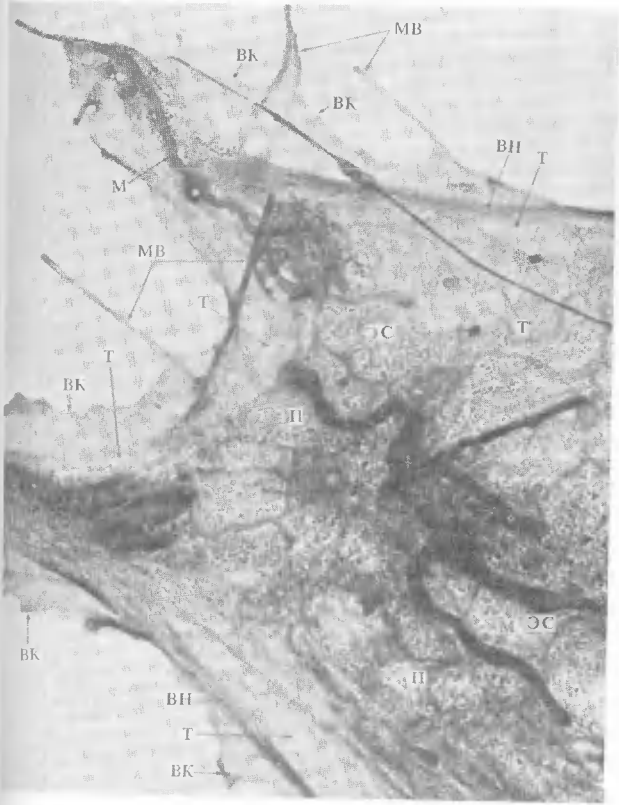


Рис. 16-14. Микрофотография края фибробласта, растущего в культуре, полученная с помощью высоковольтного электронного микроскопа. (Buckley, Tissue and Cell, **7**, 51, 1975.) Митохондрии (М) окружены эндоплазматической сетью (ЭС), полирибосомами (Р), заключенными в оболочку пузырьками (П) и микротрубочками (Т). Последние расположены в самых различных направлениях. Некоторые микротрубочки локализованы радиально вдоль периферических пучков нитей, образующих волокна напряжения (ВН), называемые также мышечными пучками. Другие микротрубочки располагаются в клетке вдоль и поперек и могут изменять направление движения. В периферических областях за краевыми ВН богатая нитями цитоплазма, расположенная под плазмалеммой, заходит в микроворсинки (МВ) и подвижные волнистые края (ВК).

догадки говорят данные микроскопического исследования живых клеток, свидетельствующие о том, что прилипание кончика микроворсинки к соответствующей твердой поверхности служит сигналом для клетки, заставляющим ее образовывать более крупные замедленные вдавливания — *волнистые края*, или *ламеллоподии* — определяющие очертания переднего края движущейся клетки.

Содержимое микроворсинок состоит в основном из мышечных белков; с помощью флуоресцирующих антител в нем обнаружены актин, тропомиозин и α-актинин, присутствующие в высоких концентрациях. При электронно-микроскопическом исследовании видны длинные тонкие нити актина, проходящие через микроворсинки по всей длине. Они соединены друг с другом, а также с окружающими их клеточными мембранами при помощи шпилькообразных выступов, которые, вероятно, состоят из α-актинина (рис. 16-14). Весьма важно, что пучки нитей актина не прерываются на клеточной поверхности, а распространяются в глубь цитоплазмы, где они, по всей видимости, взаимодействуют с другими мышечными пучками. Следовательно, вдавливание и втягивание микроворсинок (так же как и ламеллоподий) может возникнуть в результате взаимодействия мышечных белков друг с другом, а также с прилегающими участками плазматической мембраны.

ОСВОБОЖДЕНИЕ ИОНОВ Ca^{2+} СЛУЖИТ ПУСКОВЫМ МЕХАНИЗМОМ ЦИКЛОВ СОКРАЩЕНИЯ И РАССЛАБЛЕНИЯ

Универсальным пусковым механизмом процесса сокращения мышечных белков является резкое увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в окружающей цитоплазме. Это дает основание предполагать, что функционирование микроворсинок и ламеллоподий в значительной степени зависит от концентрации в них ионов Ca^{2+}. Сокращение происходит обычно при миллимолярных концентрациях этого иона, тогда как уровень содержания свободного Ca^{2+} в большей части цитоплазмы поддерживается, как правило, в диапазоне нескольких микромолей. Возможно, источником необходимого для сокращения кальция служит внеклеточная жидкость, где Ca^{2+} неизменно присутствует в миллимолярных концентрациях. Тогда внешние сигналы, приводящие к локальному мышечному сокращению, могут непосредственно вызывать временный приток Ca^{2+} внутрь клетки через плазматическую мембрану в расположенным в непосредственной близости от нее мышечным волокнам. К тому же локальные изменения мембранного потенциала могут приводить к освобождению ионов кальция из внутренних пузырьков, богатых Ca^{2+}. В любом случае мы видим, что, задаваясь вопросом о способе движения клетки, мы неизбежно приходим к следующему выводу: отдельная клетка функционирует подобно нервной системе — она способна интегрировать постоянный поток внеклеточной информации и использовать последнюю для упорядоченного движения большого числа полуавтономных мышечных волокон.

МИКРОТРУБОЧКИ ВСТРЕЧАЮТСЯ ТОЛЬКО У ЭУКАРИОТОВ

Характерные только для эукариотов и широко распространенные среди них микротрубочки представляют собой полые цилиндрические структуры диаметром ~240 Å и длиной обычно в несколько десятков микрометров (рис. 16-15). Они бывают уложены по-разному и могут выполнять весьма различные функции. Все микротрубочки характеризуются наличием полой сердцевины диаметром 140 Å, которая окружена оболочкой толщиной 50 Å, образованной упорядоченно уложенными субъединицами

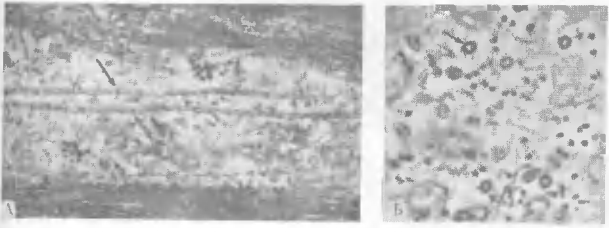


Рис. 16-15. Электронная микрофотография тонкого среза уплощенного мышиного фибробласта. (С любезного разрешения д-ра Голдмана, Карнеги Меллонский университет.) Видны микротрубочки, располагающиеся в продольном направлении (*А*) и в виде поперечных срезов (*Б*).

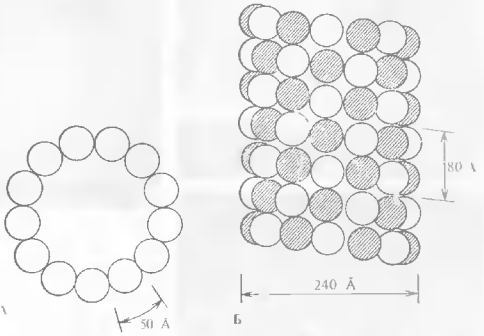


Рис. 16-16. Схема, показывающая вероятное строение микротрубочки.
А Вышний вид поперечного среза, показаны 13 профиламентов, из которых образуется стенка трубочки. *Б* Вид сбоку, спиральное расположение глобулярных молекул тубулина. Показана гипотетическая укладка тубулина двух типов внутри микротрубочки.

глобулярного белка, называемого *тубулином*. Вначале полагали, что функциональная единица тубулина характеризуется мол. весом 60 000, но в настоящее время стало ясно, что она примерно в два раза больше по размеру и состоит из двух неидентичных полипептидных цепей с мол. весом 55 000 и 57 000. Каким образом эти строительные блоки точно подгоняются друг к другу, неизвестно, но на поперечных срезах микротрубочек на любом уровне часто выявляется 13 молекул тубулина. Скорее

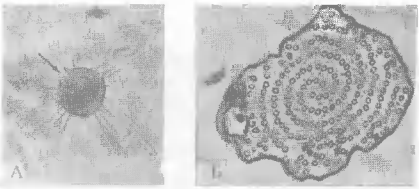


Рис. 16-17. Аксоподии представителя простейших *Echinosphaerium*. (С любезного разрешения д-ра Тилни, Пенсильванский университет.)
А. Внешний вид организма в целом; стрелкой указаны радиально расходящиеся аксоподии. *Б*. На поперечном срезе аксоподия предстает как структура со сложной 12-кратной симметрией, которая, по-видимому, определяется поперечными мостиками между разными слоями соединенных друг с другом микротрубочек.

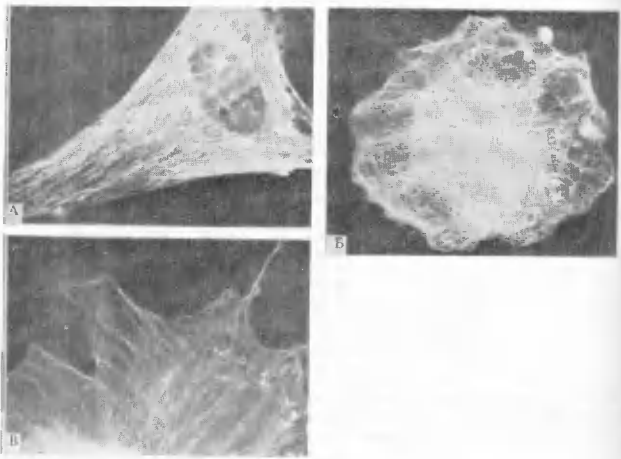


Рис. 16-18. Микрофотографии микротрубочек, полученные с применением флуоресцирующих антител. (С любезного разрешения д-ра Вебера и д-ра Поллака, Лаборатория в Колд Спринг Харборе.)
А. Уплощенный фибробласт куриного эмбриона. *Б*. Лишенная ядра клетка из организма обезьяны в процессе «распластывания» на твердой поверхности. *В*. Часть клетки мыши (3Т3) под микроскопом высокой разрешающей способности. Видно, что большинство микротрубочек имеет неправильную форму, это позволяет предполагать, что микротрубочки не скреплены между собой упорядоченно расположенными поперечными мостиками.

всего, основной тип укладки — спиральный (как у вируса табачной мозаики), причем 13 молекул тубулина соответствуют одному витку спирали (рис. 16-16).

Многие микротрубочки помогают контролировать форму клетки. Это легко показать опытным путем, если обработать клетки алкалоидным ядом колхицином, который специфически связывается с микротрубочками в соотношении один моль на моль тубулина. После связывания колхицина микротрубочки распадаются, что приводит к сокращению тех органелл, опорный остов которых поддерживается в основном микротрубочками. В частности, жесткие аксоподии у представителя простейших *Echinosphaerium* (рис. 16-17) вскоре после добавления колхицина втягиваются — это говорит о том, что их устойчивая структура хотя бы частично обусловлена микротрубочками. Микротрубочки существенны также для роста и поддержания в стабильном состоянии протяженных отростков (аксонов) нервных клеток.

В клетке микротрубочки находятся в равновесии со свободным тубулином, однако до сих пор есть лишь смутные догадки о том, каким образом контролируются в ней их образование и распад. Субъединицы тубулина, фосфорилированные под действием цАМФ-зависимой киназы, агрегируют, по-видимому, легче, чем нефосфорилированные. Этим можно объяснить тот факт, что цАМФ стимулирует образование микротрубочек в эпителиальных клетках, растущих в культуре. Морфология таких клеток в значительной степени обусловлена составом питательной среды. Если выращивать эти клетки в присутствии ощутимых количеств цАМФ, то они часто принимают удлиненную форму и становятся похожими на фибробласты (для собственно эпителиальных клеток характерна более округлая форма). Такие изменения внешнего вида клеток находятся в строгом соответствии с наличием большого числа микротрубочек в фибробластах, где они располагаются вдоль главных проекционных осей (рис. 16-18).

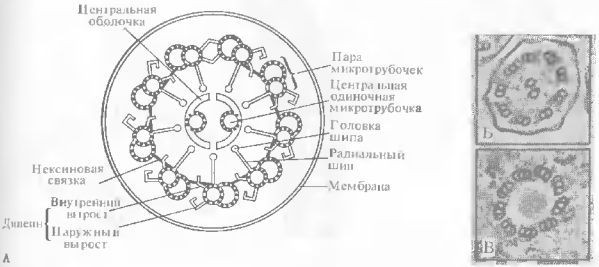


Рис. 16-19. *А.* Строение реснички (жгутика). На поперечном разрезе показано взаимное расположение девяти пар микротрубочек, образующих окружность вокруг двух одиночных микротрубочек. Каждая одиночная микротрубочка и микротрубочка А из каждой пары всегда состоят из 13 продольно расположенных протофиламентов. В-трубочка каждой пары содержит 10 протофиламентов. Показаны также разного рода выступы и мостики, ответственные за подвижность органеллы. *Б.* Электронная микрофотография поперечного среза реснички *Tetrahymena*. Видна организация микротрубочек по типу 9 + 2. *В.* Поперечный срез базального тельца реснички (*Tetrahymena*), состоящего из девяти триплетов микротрубочек и полой сердцевины.

РЕСНИЧКИ ТАКЖЕ СОДЕРЖАТ МИКРОТРУБОЧКИ

Еще одной функцией микротрубочек является поддержание основного каркаса ресничек (или жгутиков) — двигательных органелл, каждая из которых характеризуется точно определенным расположением девяти пар микротрубочек вокруг двух одиночных микротрубочек (образуемая структура носит название аксонемы; рис. 16.19). Каждая аксонема окру-

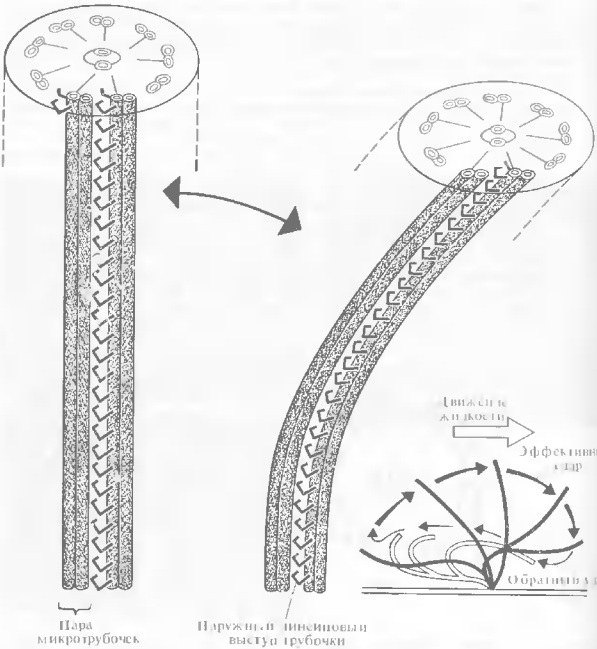


Рис. 16-20. Схема, показывающая, каким образом активное скольжение соседних микротрубочек относительно друг друга может приводить к движению ресничек. Динеиновые выступы важны для возникновения скользящей силы между соседними парами микротрубочек, которая вызывает сгибание ресничек в результате взаимодействия радиальных шипов с микротрубочками, расположенными в центре, и их оболочкой. Для наглядности показаны лишь две пары трубочек. В правом нижнем углу дана схема сгибания трубочек, приводящего к мерцанию ресничек.

дения выпячиванием плазматической мембраны, вследствие чего микротрубочки находится в непосредственном контакте с АТФ, продуцируемом митохондриями,— последние обнаружены в большом количестве у основания ресничек. Движение ресничек полностью зависит от непрерывного производства АТФ; в последнее время проведено немало опытов, целью которых было выяснить, каким образом расщепление АТФ приводит к волнообразному движению ресничек.

Накапливается все больше данных, которые говорят о том, что это движение представляет собой результат периодического скольжения пар микротрубочек относительно друг друга (рис. 16-20) и что ключевым процессом при таких скользящих движениях является образование и разрушение поперечных мостиков между соседними парами микротрубочек. Поперечные мостики образуются за счет замыкания боковых так называемых «динеиновых» выступов. Два динеиновых мостика, связывающих данную пару микротрубочек с соседней, образуются самопроизвольно в отсутствие АТФ. После добавления АТФ мостики размыкаются, что сопровождается расщеплением связанного АТФ на АДФ и фосфат (Ф). Каким-то пока еще непонятным образом формирование (а может быть и разрушение) поперечного мостика приводит к скольжению соответствующей пары микротрубочек по поверхности пары, расположенной рядом. При наличии устойчивости к сдвигу у остальных замкнутых друг на друга пар, каждая из которых прикреплена к двум центральным микротрубочкам радиальными шипами, возникающее сгибательное движение приводит к характерному волнообразному движению ресничек. Это дает основание полагать, что система тубулин — динеин произошла в процессе эволюции от системы актин — миозин (либо наоборот). Однако в строении их полипептидных цепей не удалось обнаружить абсолютно никакой гомологии. Поэтому приходится признать, что если у них и был общий молекулярный предшественник, то он исчез «из употребления» уже на очень ранних этапах эволюции эукариотической клетки.

В основании каждой реснички расположено *базальное тельце* — органелла, содержащая девять триплетов микротрубочек, уложенных в цилиндр с полой сердцевиной (рис. 16-19). Полагают, что базальные тельца участвуют в построении (росте) аксонемы реснички, каким-то образом стимулируя агрегацию свободного внутриклеточного тубулина. Огромные количества этого белка обнаруживаются во многих клетках. К примеру, после удаления ресничек с поверхности клеток *Chlamydomonas* (при помощи встряхивания суспензии) в присутствии ингибитора белкового синтеза циклогексимида частичная регенерация ресничек все равно происходит.

МИТОЗ И ДВА ПУТИ ОБРАЗОВАНИЯ ТРУБОЧЕК ВЕРЕТЕНА

Процессы митоза и мейоза, в ходе которых хромосомы делятся на волокнах веретена, также являются отличительными чертами эукариотической клетки. Хотя в течение многих лет было известно, что колхицин препятствует образованию веретена, причина его специфического действия стала понятна только после того, как удалось выяснить, что главными компонентами веретена (рис. 16-21) являются микротрубочки и что колхицин специфически связывается тубулином. Микротрубочки веретена возникают в двух разных областях: около центриоли снаружи от ядерной мембраны (*полюсные микротрубочки*) и у кинетохоров (рис. 16-22) — мест присоединения микротрубочек, которые фиксированы на центромерных участках каждой хромосомы (*хромосомные микротрубочки*). Полюсные трубочки образуются первыми и начинают расти во время профазы. Позже, когда

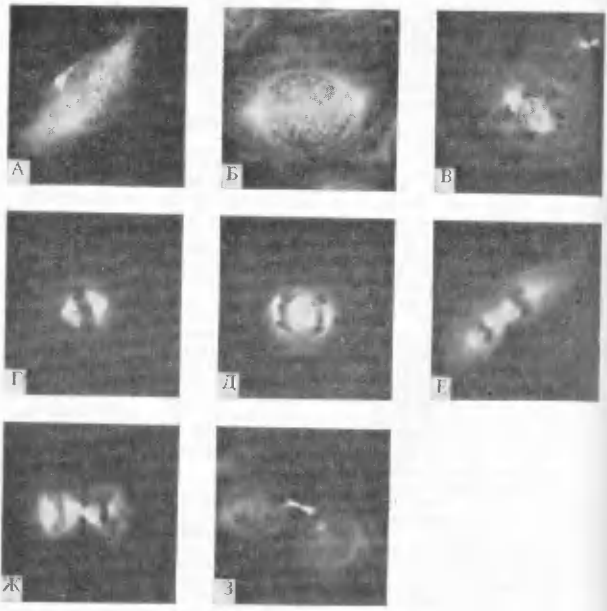


Рис. 16-21. Микрофотографии микротрубочек веретена на последовательных этапах митоза клеток человека линии HeLa, полученные с использованием флуоресцирующих антител (Weber et al., Exp. Cell Research, в печати, 1975).
А и *Б*. Два этапа профазы: сборка микротрубочек вокруг центриоли. *В*. В прометафазе темные хроматиды движутся к экваториальной пластинке. *Г*. В метафазе все хромосомы обнаруживаются на полностью сформированном веретене. *Д*. Расхождение хромосом в анафазе. *Е* и *Ж*. В телофазе межхромосомные волокна начинают растворяться. *З*. Две дочерние клетки сохраняют связь благодаря микротрубочкам внутри межклеточного мостика.

разрушается ядерная мембрана, кинетохоры могут взаимодействовать с содержащимся в цитоплазме свободным тубулином, что обеспечивает сборку хромосомных трубочек.

В ходе метафазы полюсные и хромосомные трубочки проникают в глубь веретена и образуют многочисленные поперечные мостики, что приводит в конечном счете к выстраиванию гомологичных хромосом по одной линии в центре веретена (*экваториальная пластинка*) (рис. 16-23). Анафаза начинается тогда, когда наборы полюсных и хромосомных трубочек

Рис. 16-22. Электронная микрофотография поперечного среза центромеры хромосомы сумчатой крысы в метафазе. (Brinkley, Stubblefield, Advances in Cell Biology, v. 1, Appleton-Century-Crofts, 1970.)
Видно прикрепление микротрубочек к кинетохорам (К). Кинетохор содержит две нити (к1 и к2), каждая из которых служит местом прикрепления для микротрубочек.

начинают двигаться в противоположных направлениях, что приводит к расхождению гомологичных хромосом к двум разным полюсам. В этом процессе происходит попеременное разрушение поперечных мостиков и образование новых; собственно, именно эти повторные акты и являются первичной причиной скольжения. Основным доказательством справедливости такой точки зрения является выделение in vitro функционально активного веретена, сохраняющего способность вызывать расхождение анафазных хромосом. При его исследовании выяснилось, что во время расхождения хромосом, когда полюса веретена движутся в разные стороны, увеличения длины отдельных нитей веретена не происходит. Движение, вызывающее растягивание, во время анафазы обусловлено скольжением относительно друг друга полюсных и хромосомных трубочек. Поэтому возникает вопрос, используются ли в данном случае, как и при движении ресничек, динеиноподобные поперечные мостики для превращения химической энергии в механическое движение. В настоящее время ответ на этот вопрос кажется нам утвердительным, однако, как показали недавние эксперименты, в веретене обнаружен также актин, и, следовательно, нельзя исключить возможности, что ключевую роль играет взаимодействие актина и миозина.

ГИСТОНЫ И ВОЗМОЖНОСТЬ ХРОМОСОМНОГО СОКРАЩЕНИЯ

Чрезвычайно важным для эволюции упорядоченного митоза было возникновение механизма, ответственного за правильную цикличность растягивания и уплотнения хромосом, характерных для митотического цикла. Насколько можно себе представить, определяющим этапом было появление *гистонов* — небольших основных белков, которые прочно ассоциированы с ДНК эукариотов. У прокариотов ДНК обычно окружена слабо связанным с ней основным белком; связь между ними разрушается крайне легко, и поэтому вплоть до самого последнего времени думали, что ДНК

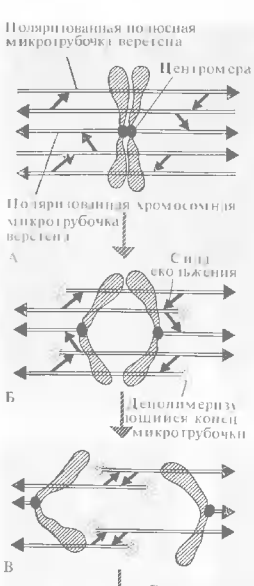
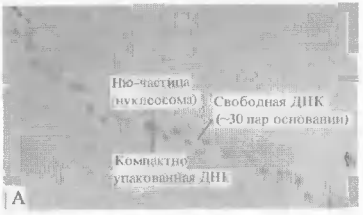


Рис. 16-23. Упрощенная схема вероятного механизма движения хромосомы во время митоза в результате возникновения силы скольжения между полюсными и хромосомными микротрубочками веретена. (McIntosh et al., Nature, **224**, 569, 1969.)
Показана одна пара гомологичных хромосом. *А*. Метафаза. *Б*. Ранняя анафаза. *В*. Поздняя анафаза. *Г*. Телофаза. Сплошными линиями стрелками показаны результирующие силы, возникающие при образовании и разрушении поперечных мостиков между двумя соседними микротрубочками, направленными в противоположные стороны.

находится в клетке в основном в свободном состоянии. Наоборот, у эукариотов большая часть ДНК находится в прочном комплексе с белками и образует нуклеопротеидные волокна, называемые обычно *хроматином*. За исключением некоторых типов спермы, где основным белковым компонентом хроматина являются *протамины* (короткие, содержащие около 45 аминокислотных остатков, богатые аргинином полипептиды), в подавляющем большинстве клеток белки хроматина представлены пятью гистонами: H1, H2a, H2b, H3 и H4. На электронных микрофотографиях



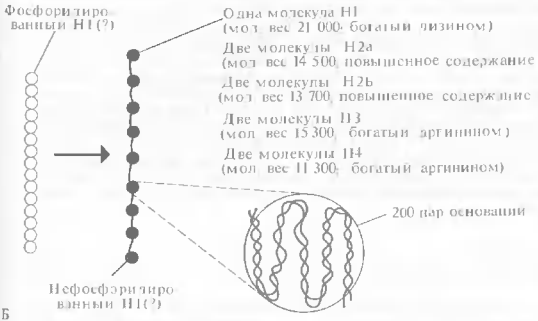


Рис. 16-24. *А.* Электронная микрофотография частично «обнаженного» хроматина дрозофилы с отчетливо видимыми нуклеосомами. (С любезного разрешения д-ра Лэрда, Вашингтонский университет, Сиэтл.) *Б.* Схема организации хроматина на двух разных стадиях сокращения.

часто видно, что хроматин имеет форму бус, состоящих из сферических частиц диаметром 100 Å, которые «нанизаны» на тонкие нити (рис. 16-24). Каждая из этих частиц (их часто называют *ν-частицами* или *нуклеосомами*) включает около 200 пар оснований, уложенных благодаря связыванию с определенными группами гистонов в неизвестную до сих пор конфигурацию. В настоящее время можно думать, что каждая нуклеосома содержит по две молекулы гистонов H2a, H2b, H3 и H4 и одну молекулу H1. Весьма важно, что последовательности аминокислот у некоторых из гистонов, в частности H3 и H4, не претерпели в ходе эволюции практически никаких изменений. Но-видимому, данный факт говорит о том, что именно эти гистоны играют ключевую роль в образовании нуклеосом, размеры и форма которых у эукариотов сохраняются без изменений у всех видов хроматина.

С комплексом ДНК — гистоны столь же прочно и примерно в таком же количестве, как гистоны с ДНК, связаны кислые негистоновые белки.

Этих негистоновых белков, в число которых входят разного рода ДНК- и РНК-полимеразы, насчитывается в хромосомах не менее сотни. Насколько можно судить, ни один из них не участвует в формировании структуры основного хроматина. Они выполняют другую функцию: участвуют в репликации или транскрипции ДНК, а также в регуляторных процессах, управляющих синтезом ДНК и РНК. Как раз эти белки весьма различаются в дифференцированных клетках разных типов одного и того же организма.

Структурная организация основного хроматина сохраняется неизменной в течение всего клеточного цикла — сильно конденсированный хроматин, обнаруживаемый в клетке во время митоза, имеет тот же состав гистонов, который характерен для гораздо более растянутых интерфазных волокон. Не исключено, что конденсация хромосом связана с обратимой химической модификацией гистонов, которые могут подвергаться фосфорилированию, ацетилированию и метилированию. Накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что модификация гистонов является функцией фазы клеточного цикла. Наиболее однозначно показано фосфорилирование гистона H1, чрезвычайно богатого лизином. Фосфорилирование достигает максимального уровня в расчете на клетку во время поздней интерфазы — как раз перед тем моментом, когда при помощи светового микроскопа удается увидеть конденсацию хромосом. После завершения митоза уровень фосфорилирования падает до 20% максимального значения. Небезынтересно, что гистон H1 сам по себе не участвует в построении основного хроматина, поскольку волокна хроматина, реконструированные in vitro в его отсутствие, дают ту же самую картину дифракции рентгеновских лучей, которая характерна для нативного хроматина. Напротив, хроматин, реконструированный in vitro в отсутствие любого из четырех остальных гистонов, не дает картины, характерной для нативного хроматина.

В КЛЕТКАХ ЭУКАРИОТОВ СОДЕРЖАТСЯ ТРИ РАЗЛИЧНЫЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ

Еще одной отличительной чертой эукариотов является наличие в их клетках трех разных, легко отделяемых друг от друга основных форм РНК-полимеразы — одна из них осуществляет синтез рРНК, другая — синтез мРНК и третья — синтез тРНК. Различие между РНК-полимеразами может быть связано с присутствием в клетках эукариотов ядрышек — небольших округлых ядерных телец, содержащих копии гена рРНК, которые соединены по принципу тандема (стр. 508). Фермент, который находится в ядрышках, называют эукариотической РНК-полимеразой 1, а основные ферменты нуклеоплазмы именуют эукариотическими РНК-полимеразами 2 и 3. Действие полимеразы 2 специфически тормозится сильно токсическим ядом грибов α-аманитином уже в низких концентрациях, в то время как подавление активности РНК-полимеразы 3 наблюдается лишь при высоких концентрациях яда. В противоположность обеим нуклеоплазматическим ферментам РНК-полимераза 1 устойчива к действию α-аманитина. Следовательно, с помощью этого ингибитора довольно просто определить, какая из эукариотических полимераз ответственна за синтез данного вида РНК.

Изучение молекулярных свойств трех разных форм фермента показало, что каждая из них характеризуется абсолютно специфическим набором полипептидных цепей. Подобно их единственному прокариотическому аналогу, все три вида эукариотических РНК-полимераз характеризуются мол. весом ~5,6 10^5 и состоят из двух длинных (мол. вес ~1,6 10^5 и 1,4 10^5) и 4—6 коротких полипептидов. Значение такого разно-

образия полипептидов остается неясным, особенно если принять во внимание высказываемые подозрения, что некоторые из более мелких цепей образуются в ходе очистки фермента в результате протеолитического расщепления исходно более протяженных цепей. Поэтому до тех пор, пока не будет проведен детальный химический анализ белков, довольно трудно разобраться в том, какие факторы в действительности контролируют специфичность транскрипции эукариотической ДНК.

МНОГИЕ мРНК ЭУКАРИОТОВ СОДЕРЖАТ НА 5′-КОНЦАХ НЕОБЫЧНЫЕ ГРУППЫ

При исследовании 5′-концевых последовательностей различных эукариотических мРНК обнаружили удивительный факт: лишь немногие из цепей мРНК имеют на конце ожидаемую группу ффф**N**ф (где N — А или Г). Выяснилось, что бо́льшая часть 5′-концевых последовательностей после транскрипции модифицируется путем присоединения гуанина. Это само по себе не было бы слишком странным, если бы этот гуанин присоединялся посредством обычной 5′—3′-фосфодиэфирной связи. Однако было обнаружено, что ГТФ реагирует с 5′-концом цепи мРНК путем 5′—5′-конденсации с образованием концевой последовательности, имеющей общую формулу ^{7}**T**$^{5'}$ффф$^{5'}$**N**$^{2'}$ф... В последующем к новому концевому гуаниновому остатку, а также к 2′-ОН группе соседнего нуклеотида присоединяются метильные группы (рис. 16-25). Для чего 5′-конец эукариотической мРНК должен быть блокирован таким образом, остается до сих пор абсолютной тайной. Хотя накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что многие эукариотические мРНК не способны транслироваться, будучи неблокированными, известно несколько эукариотических

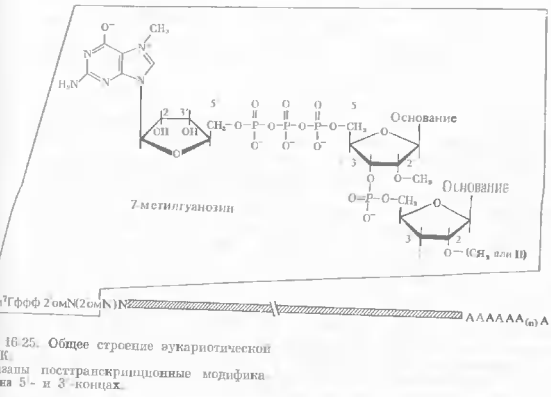


Рис. 16-25. Общее строение эукариотической мРНК.
Показаны посттранскрипционные модификации на 5′- и 3′-концах.

мРНК, которые, несмотря на отсутствие таких концевых последовательностей, способны функционировать абсолютно нормально в качестве матриц для белкового синтеза

НА 3′-КОНЦЕ мРНК НАХОДИТСЯ ПОЛИ (А)

Не менее загадочным является тот факт, что у большинства эукариотических молекул мРНК на 3′-конце находятся довольно протяженные отрезки поли(А) (длиной до 200 остатков). Эти отрезки поли(А)не кодируются ядерной ДНК, они добавляются после завершения транскрипции и выхода новообразованных молекул мРНК в нуклеоплазму. Фермент, ответственный за эту модификацию, поли(А)-полимераза, специфически узнает мРНК, поскольку на концах рРНК не удается обнаружить и следов поли(А). Так как поли(А) является концевой последовательностью прокариотических мРНК достаточно редко, возникло предположение, согласно которому функция поли(А) каким-то образом связана с транспортом мРНК через поры ядерной мембраны. Однако мРНК гистонов, по всей видимости, не содержит поли(А), поэтому, какой бы ни была функция поли(А), она может оказаться не столь уж необходимой. Во всяком случае, поли(А) остается связанной с 3′-концами и после присоединения к мРНК рибосом, но есть указания на то, что по мере повторения актов трансляции на одной и той же мРНК длина отрезков поли(А) уменьшается.

Эукариотические полисомы отличаются от прокариотических тем, что в первых молекулы мРНК взаимодействуют с двумя специфическими белками. Один из белков (мол. вес 22 000) связывается с 5′-концом, а другой (мол. вес 52 000) — с 3′-концом, вероятно, с остатками поли(А). Неизвестно, присоединяются ли эти белки к соответствующим мРНК в цитоплазме или еще раньше входят в комплекс, в виде которого мРНК проходит через поры ядерной мембраны. В пользу последнего предположения говорит тот факт, что в ядре практически не обнаруживается свободная мРНК. Вскоре после освобождения от ДНК, а может быть и одновременно с этим процессом, мРНК вступает в комплекс с белком, часть которого, видимо, остается связанной с ней и после выхода в цитоплазму.

СРАВНЕНИЕ 80S- И 70S-РИБОСОМ

Рибосомы всех эукариотов всегда крупнее 70S-рибосом прокариотов; они имеют константу седиментации примерно 80S. Соответственно и субчастицы их имеют больший размер (константы седиментации 60S и 40S). Каждая 60S-частица содержит цепь 28S-рРНК, а 40S-субчастица — цепь 18S-рРНК. В чем причина этих отличий и почему они закрепились в ходе эволюции, не известно. Важно отметить, что на структурном уровне между прокариотическими и эукариотическими микроорганизмами (дрожжи, нейроспора, гриб *Aspergillus*) существует гораздо более резкое отличие, чем между сильно дивергировавшими в ходе эволюции эукариотическими клетками.

Молекулярные механизмы синтеза белков у прокариотов и эукариотов практически одинаковы. По-видимому, единственное постоянное различие заключается в том, что метионин, представляющий собой начальную аминокислоту в синтезе полипептидов во всех клетках, у эукариотов не формилируется. В эукариотических клетках обнаружены две различные метиониновые тРНК, и только одна из них служит специфическим инициатором в синтезе белка. Интересно, что инициаторную тРНК эукариотов

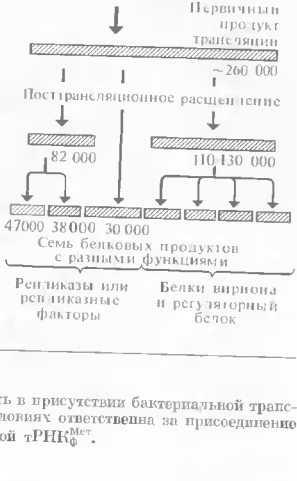


Рис. 16-26. Моноцистронный ген полиовируса типа 1.
Первичный продукт трансляции расщепляется под действием протеаз и в конечном итоге распадается на 7 белков с различными функциями. Цифры обозначают примерные молекулярные веса белковых продуктов.

можно специфически формилировать в присутствии бактериальной трансформилазы, которая в обычных условиях ответственна за присоединение формильных групп к бактериальной $тРНК_{ф}^{Мет}$.

МОНОЦИСТРОННЫЕ МОЛЕКУЛЫ мРНК

Все молекулы мРНК, которые удалось до сих пор выделить из клеток эукариотов или из вирусов, паразитирующих в эукариотических клетках, содержат информацию только для единственного первичного полипептидного продукта. Такие отличные друг от друга матрицы, как мРНК миозина, коллагена, индивидуальных цепей гемоглобина и некоторых гистонов, связывают рибосомы лишь в одном участке. Ни одна из них не похожа на lac-мРНК *E. coli* или РНК фага R17, каждая из которых содержит множество стартовых и терминальных сигналов трансляции. Даже очень длинные матричные РНК вирусов, размножающихся в клетках животных, в частности, содержащие информацию для белков вируса полиомиелита и ЭМК, исходно транслируются с образованием одного протяженного полипептида, который в дальнейшем расщепляется под действием клеточных протеаз на определенное число белков с разными функциями. Первичный продукт трансляции РНК вируса полиомиелита длиной около 2000 аминокислотных остатков разрезается на 7 белков с различными функциями (рис. 16-26). На первый взгляд такой процесс кажется весьма неэффективным, поскольку некоторые из этих продуктов представляют собой структурные белки, которые требуются для размножения вируса в огромных количествах, а другие являются ферментами, которых нужно значительно меньше. По-видимому, условие единственного стартового сигнала диктуется каким-то уникальным свойством эукариотических полисом.

РИБОСОМЫ, СВЯЗАННЫЕ С МЕМБРАНАМИ

У прокариотов большинство рибосом либо существует в свободной форме, либо входит в состав полисом, и белковые продукты, образуемые в ходе трансляции, освобождаются непосредственно в окружающую цитоплазму. Однако некоторые прокариотические рибосомы прикрепляются к внутренней поверхности наружной плазматической мембраны. При таком способе прикрепления (обычно в виде скоплений полисом) соответствующие полипептидные цепи растут внутрь пограничных мембран, причем некоторые проходят мембраны насквозь и освобождаются (секретируются) в полость, отделяющую наружную мембрану от клеточной стенки. Прикрепление рибосом к мембране можно, следовательно, рассматривать как приспособление для обеспечения секреции белкового продукта. Можно думать, что должен существовать некий механизм, посредством которого определенные виды мРНК избирательно вступают в контакт с рибосомами, связанными с мембранами, а не со свободными рибосомами.

У эукариотов секреция осуществляется также с участием рибосом, прикрепленных к мембранам. Однако в этом случае бо́льшая часть таких рибосом связывается не с внешними мембранами, а с внутренними мембранными пузырьками, называемыми эндоплазматической сетью (ЭС). Лишь часть ЭС покрыта рибосомами. Участки, богатые рибосомами, называют шероховатой ЭС, а области, в которых рибосом нет,— гладкой ЭС (рис. 16-27). Площадь шероховатой эндоплазматической сети меняется в зависимости от потребности в секреции белка. Такие клетки, как ретикулоциты, синтезирующие в основном белки, необходимые для «внутренних» нужд (в данном случае гемоглобин), характеризуются слабо развитой шероховатой ЭС, а в клетках, главной функцией которых является секреция (к примеру, клетки печени), почти половина внутреннего пространства занята шероховатой ЭС. Интенсивное развитие ЭС — по-видимому,

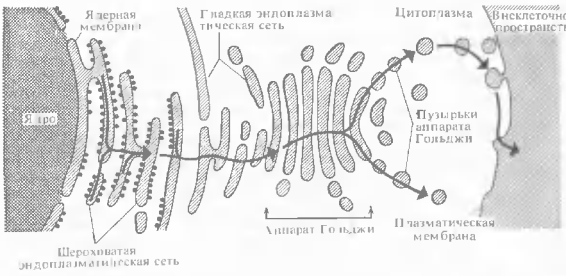


Рис. 16-27. Схема, показывающая расположение в клетке различных полостей, примыкающих к мембране, и их возможную роль в синтезе и экскреции.
Шероховатая ЭС имеет на своей поверхности рибосомы. На одной поверхности аппарата Гольджи секретируются пузырьки, другая образована элементами гладкой ЭС. Стрелками указаны как общее направление движения мембран в клетке, так и возможный путь белков, предназначенных для секреции. Области, отграниченные от цитоплазмы мембранами, заштрихованы.

необходимое следствие увеличения размера клеток у эукариотов. По мере увеличения размера клетки отношение ее поверхности к объему уменьшается, и площадь плазматической мембраны более крупных эукариотических клеток может стать недостаточной для размещения всех рибосом, необходимых для требуемой скорости секреции.

Почему через большинство мембран способны проходить только продукты рибосом, прикрепленных к мембранам, понять до сих пор не удалось. Не исключено, что рибосомы прикрепляются таким способом для того, чтобы растущие полипептиды, прежде чем свернуться и принять окончательную трехмерную конфигурацию, могли внедряться в прилегающие клеточные мембраны. Прямое отношение к этой дилемме имеет и вопрос о месте синтеза белковых продуктов, которые должны функционировать в качестве компонентов мембраны. Обязательно ли эти белки должны синтезироваться только на рибосомах, прикрепленных к мембране, или некоторые специфические белки имеют способность самопроизвольно внедряться в уже образовавшийся двойной слой липидов — это еще предстоит выяснить.

ПРОХОЖДЕНИЕ НОВОСИНТЕЗИРОВАННОГО БЕЛКА ЧЕРЕЗ ГЛАДКУЮ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ СЕТЬ И АППАРАТ ГОЛЬДЖИ

Белки, предназначенные в конечном счете для секреции или связывания с другими компонентами мембраны, достигают цели только после выхода из шероховатой ЭС и прохождения через соединенные с ней мембранные пузырьки гладкой ЭС и аппарат Гольджи (рис. 16-27). Включения двух

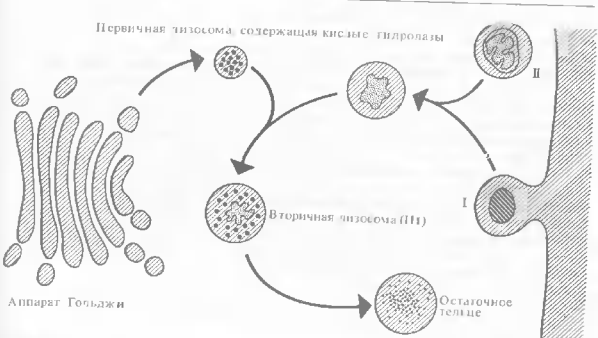


Рис. 16-28. Основные стадии возможного пути образования и способа функционирования лизосом.
Вакуоли с захваченной пищей (*I*) и окруженные мембранами клеточные органеллы, ответственные за их расщепление (*II*), соединяются с первичными лизосомами. Последние представляют собой органеллы, содержащие кислую гидролазу и образующиеся при посредстве аппарата Гольджи. Вторичные лизосомы (*III*), образующиеся при этом слиянии, в конечном счете превращаются в остаточные тельца, содержащие полностью гидролизованный материал и самоокисленные липиды.

последних типов, очевидно, являются главными местами присоединения углеводных остатков к растущим белкам, в результате чего образуются гликопротеиды. В этих же органеллах происходит и полимеризация других углеводных групп (что приводит к образованию сложных полисахаридов типа гликогена), а также синтез жирных кислот, которые в дальнейшем служат компонентами мембраны.

Внутри аппарата Гольджи специфические белки (или запасные углеводные продукты) ассоциируют друг с другом в специальных вакуолях. Вакуоли эти в конце концов отпочковываются и превращаются в гранулы, которые в последующем секретируются наружу или выполняют специализированную функцию внутри клетки. К числу таких внутренних гранул относятся лизосомы, содержащие в основном гидролитические ферменты, и пероксисомы, в состав которых входят каталаза, а также некоторые другие ферменты, участвующие в метаболизме H_2O_2 (рис. 16-28).

Хранению некоторых соединений внутри вакуолей позволяет клеткам пространственно отграничить потенциально опасные гидролитические ферменты или промежуточные соединения метаболизма от основной части клеточной цитоплазмы. К примеру, клетка сразу же потеряла бы способность нормально функционировать, если бы протеолитические ферменты, заключенные в лизосомах, пришли в контакт с большей частью клеточных белков. Точно так же перекись водорода, действуя как сильный окислитель, мгновенно разрушила бы многие компоненты клетки, имей она к ним доступ. Благодаря тому что образование перекиси ограничено внутренней частью пероксисом, где каталаза практически мгновенно разрушает ее, концентрация H_2O_2 в клетке никогда не достигает опасного уровня.

ПЕРЕВАРИВАНИЕ ЗАХВАЧЕННОЙ ПИЩИ ПУТЕМ СЛИЯНИЯ ПИЩЕВЫХ ВАКУОЛЕЙ С ЛИЗОСОМАМИ

Каждая лизосома содержит большой набор разнообразных гидролитических ферментов, в число которых входят протеазы, нуклеазы, фосфатазы, липазы и гликозилазы. В первичной лизосоме эти ферменты по существу инертны. Катализ начинается только тогда, когда первичная лизосома сливается с вакуолью, содержащей пищу, и превращается во вторичную лизосому (рис. 16-28). Бо́льшая часть молекул, содержащихся в пище, подвергается быстрому распаду; образующиеся при этом растворимые продукты гидролиза свободно проходят через мембрану лизосомы и попадают в цитоплазму. Такие вторичные лизосомы могут в дальнейшем сливаться с новыми пищевыми вакуолями, только что захватившими пищу. Почему мембраны лизосомы обладают избирательной способностью сливаться только с фагоцитирующими гранулами, а не с другими клеточными компонентами, в частности с митохондриальными мембранами, остается неясным. Полностью понять сущность такого слияния удастся только тогда, когда будет проведен более детальный структурный анализ различных компонентов лизосомной мембраны.

ЯДЕРНАЯ МЕМБРАНА КАК ОТПОЧКОВАВШАЯСЯ ЧАСТЬ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ СЕТИ

Во всех эукариотических клетках высших растений и животных двуслойная ядерная мембрана (рис. 16-29) разрушается при образовании веретена и образуется снова после расхождения хромосом в анафазе. Наиболее вероятно, что разрушение включает процесс слияния уплощенных пузырьков ядерной мембраны с предсуществующими вакуолями цитоплазматической мембраны, в частности с вакуолями ЭС. Еще до начала разрушения

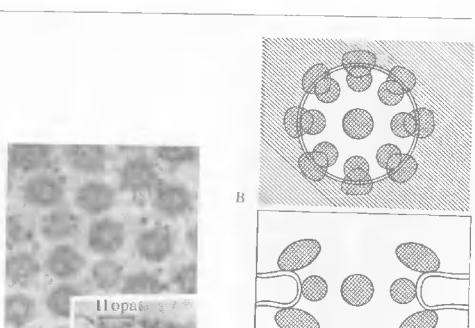


Рис. 16-29. Схематическое изображение строения ядерной мембраны (*В* и *Г*) и электронная микрофотография ее поперечного среза, на котором видна пора (*А* и *Б*). (С любезного разрешения д-ра Робертса. Институт Джонса Инниса, Норидж, Англия.)

ядерную мембрану можно рассматривать как часть ЭС, поскольку ее наружная поверхность усеяна рибосомами, секретирующими белки в полость между двумя отдельными мембранами клетки. Кроме того, на электронных микрофотографиях часто бывает видно, что эта полость соединяется с главными канальцами ЭС. Это наводит на мысль, что ядерные мембраны образуются в результате слияния уплощенных выпячиваний ЭС. Однако этот процесс, вероятно, не завершается, и в ядерной мембране остается большое число ядерных пор строго определенного размера (350 Å). Эти поры часто имеют восьмигранную форму, и было бы заманчиво связать правильность их очертаний с формой «затычек», заполняющих большинство пор. Можно думать, что эти затычки представляют собой места конденсации, вокруг которых происходит сращение вакуолей ЭС в ходе формирования ядерной мембраны.

Продукты генов попадают в места белкового синтеза в цитоплазме из ядра, проходя через поры ядерной мембраны (рис. 16-29). Это означает, что либо поры иногда бывают не закрыты «затычками», либо внутри самих «затычек» существуют канальцы. Во всяком случае, транспорт веществ идет в двух направлениях — и в цитоплазму и в ядро. Опыты с пересадкой ядер, в которых меченые ядра вводили в радиоактивно меченную цитоплазму, показывают, что часть новосинтезированного белка быстро проникает из цитоплазмы в ядро.

ПРЕВРАЩЕНИЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ В МИТОХОНДРИИ И ХЛОРОПЛАСТЫ В ХОДЕ ЭВОЛЮЦИИ

До самого последнего времени происхождение митохондрий и хлоропластов оставалось невыясненным. Хотя данные микроскопии (рис. 16-30) свидетельствовали о том, что эти органеллы способны вытягиваться

Рис. 16-30. Микрофотография края уплощенной клетки мыши, полученная с помощью высоковольтного электронного микроскопа (1000 кВ); × 7000. (С любезного разрешения д-ра Волосеника, Колорадский университет.) Большинство митохондрий имеет удлиненную трубчатую форму. Вначале думали, что митохондриям присуща правильная эллипсоидная форма, однако при использовании высоковольтных электронных микроскопов, позволяющих наблюдать интактные митохондрии, выявилась в высшей степени неправильная форма этих органелл.

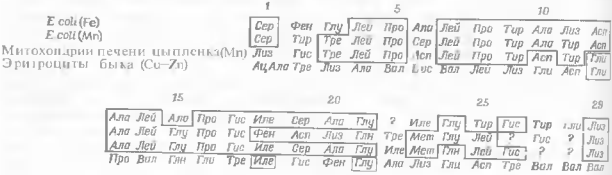


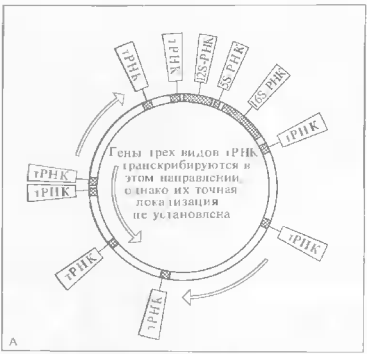
Рис. 16-31. N-концевые аминокислотные последовательности супероксиддисмутаз из четырех различных источников. (Steinman et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 3725, 1973.)
Жирными линиями обведены идентичные остатки аминокислот в двух бактериальных (*E. coli*) и митохондриальной дисмутазах. Идентичные аминокислотные остатки в любом из трех вышеуказанных ферментов и в супероксиддисмутазе из бычьих эритроцитов обведены тонкими линиями.

и делиться, подобно бактериям, значение этой аналогии оставалось неясным до тех пор, пока во всех митохондриях и хлоропластах не были обнаружены молекулы ДНК, а также рибосомы, тРНК и различные ферменты, необходимые для белкового синтеза. Еще более важными для наших представлений о биогенезе органелл стали данные о константе седиментации рибосом хлоропластов (70S), типичной для клеток прокариотов. Это сразу же натолкнуло на мысль о том, что на ранних стадиях эволюции эукариотов хлоропласты, как и митохондрии, произошли от симбиотических бактерий, росших в гораздо более крупных примитивных эукариотических клетках. По-видимому, они настолько эффективно обеспечивали своего хозяина АТФ, что их обязательное присутствие в клетке в качестве органелл было предопределено. Сильным аргументом в пользу гипотезы об эндосимбиотической природе этих органелл являются данные анализа аминокислотной последовательности митохондриального фермента из клеток цыпленка — супероксиддисмутазы. N-концевая последовательность аминокислот этого фермента весьма сходна с наблюдаемой у дисмутаз *E. coli* (рис. 16-34), что может свидетельствовать об одинаковом эволюционном происхождении. Напротив, между митохондриальным ферментом цыпленка и дисмутазой из эритроцитов быка, несмотря на большую таксономическую близость источников, выявить существенного сходства не удалось.

Существующие ныне хлоропласты и митохондрии содержат, по-видимому, гораздо меньше ДНК, чем в момент начала их эволюции. Молекулы ДНК большинства хлоропластов характеризуются мол. весом $\sim 10^8$, что в 10 раз меньше, чем у ДНК любой из известных бактерий. ДНК митохондрий имеют еще меньший молекулярный вес. Особенно это касается митохондрий из клеток высших животных — каждая органелла содержит одну молекулу ДНК с мол. весом $\sim 10^7$. Многие функции, исходно выполнявшиеся ДНК органелл, были, по-видимому, переданы ядерным генам клетки-хозяина, что привело к уменьшению размера соответствующих ДНК в органеллах.

ЯДЕРНЫЕ ГЕНЫ СОДЕРЖАТ ИНФОРМАЦИЮ ДЛЯ БЕЛКОВ ОРГАНЕЛЛ

Митохондрии клеток высших организмов представляют собой крайний случай замены кодирующей емкости органелл аналогично функционирующей ДНК клетки. Величина молекулы митохондриальной ДНК с мол. весом 10^7 вряд ли достаточна для того, чтобы кодировать все белки, обнаруживаемые в митохондриальных рибосомах; такая молекула никак не способна обеспечить хранение информации, необходимой для весьма разнообразных белков, участвующих в окислительном фосфорилировании. Поэтому большинство ферментов, вовлеченных в репликацию и транскрипцию митохондриальной ДНК, а также в последующую трансляцию митохондриальной мРНК, кодируется ядерной ДНК. Уменьшение размера митохондриальной ДНК в ходе отбора привело, кроме того, к возникновению в этих органеллах 60S-рибосом, которые существенно мельче своих 70S-прокариотических прародителей. Каждая митохондриальная рибосома состоит из 45S- и 35S-субчастиц, содержащих соответственно 16S- (мол. вес $7 \cdot 10^5$) и 12S-(мол. вес $4{,}5 \cdot 10^5$) рРНК. Митохондриальная ДНК содержит информацию для этих рРНК, а также для 9 различных видов тРНК; в настоящее время установлено взаиморасположение генов этих РНК в геноме рДНК (рис. 16-32). Тот факт, что таким способом кодируется только 9 тРНК, означает, что по крайней мере половина видов тРНК, участвующих в синтезе митохондриальных белков, имеет ядерное


Гены трех видов тРНК транскрибируются в этом направлении, однако их точная локализация не установлена
тРНК
тРНК
тРНК

вследствие чего клетки увеличились в размерах и приобрели способность передвигаться и захватывать другие организмы при помощи фагоцитоза. Определяющей стадией этого эволюционного процесса было, по-видимому, развитие мышечных белков, сходных с актином и миозином, и возникновение микротрубочек для обеспечения опорного остова, а также для поддержания определенных типов движения клетки (например, движения ресничек).

Столь же важным было развитие разнообразных внутренних пузырьков, прикрепленных к мембране — эндоплазматической сети, телец Гольджи, лизосом. Эти пузырьки позволяют отграничить от основной массы цитоплазматических белков те белки, которые предназначены либо для секреции, либо для переваривания пищевых гранул. Большинство таких пузырьков наделено способностью сливаться с другими пузырьками или с наружной клеточной (плазматической) мембраной. Вместе с тем наружная клеточная мембрана может образовывать впячивания, которые отшнуровываются внутрь клетки и дают начало новым внутренним пузырькам, прикрепленным к мембране (пиноцитоз).

Сама по себе ядерная мембрана представляет собой участок эндоплазматической сети, окружающей хромосомы после деления клетки. Для чего существуют ядерные мембраны, до сих пор неясно, но высказываются предположения, что на какой-то стадии жизненного цикла клетки хромосомы обязательно должны прикрепляться к мембранам. Если это так, то при увеличении размеров клеток хромосомам стало удобнее прикрепляться к внутренней мембране, а не к расположенной гораздо дальше наружной плазматической мембране.

В эукариотических клетках вся ДНК существует в виде хроматина — комплекса, состоящего из ДНК ($^1/_3$), гистонов (основных белков небольшого размера; $^1/_3$) и неосновных (кислых) хромосомных белков ($^1/_3$). Имеется пять основных гистонов, четыре из которых (H2a, H2b, H3 и H4) закрывают участки двухцепочечной ДНК длиной 200 пар оснований, образуя отчетливые сферические частицы (нуклеосомы) диаметром 125 Å. Пятый гистон (H1), вероятно, контролирует растягивание и уплотнение хромосом в ходе митотического цикла. Расхождение гомологичных хромосом во время митоза происходит на веретене, которое представляет собой совокупность микротрубочек разной природы (межполюсных и хромосомных). Каким образом осуществляется движение хромосом на веретене, неизвестно. Наиболее вероятным механизмом кажется скольжение межполюсных и хромосомных микротрубочек относительно друг друга.

В отличие от прокариотов, которые характеризуются наличием только одной основной формы РНК-полимеразы, все эукариотические клетки содержат РНК-полимеразу трех видов. Фермент одного вида ответствен за синтез рРНК, другого — за синтез тРНК и третьего — за образование мРНК. После транскрипции бо́льшая часть молекул мРНК модифицируется по 5′-концу путем присоединения гуанинового нуклеотида с образованием 5′—5′-связи и по 3′-концу путем присоединения 100—200 адениновых нуклеотидов [поли(А)]. Функция этих блокирующих групп остается непонятной, известно лишь, что некоторые эукариотические мРНК их не содержат, но в то же время функционируют нормально. В отличие от мРНК прокариотов эукариотические мРНК характеризуются единственным местом связывания рибосом, т. е. они всегда несут информацию для одной-единственной полипептидной цепи. Многие крупные продукты трансляции в дальнейшем расщепляются на более мелкие цепи, каждая из которых функционирует как отдельный белок (фермент).

Для всех эукариотов типично наличие митохондрий, которые представляют собой цитоплазматические АТФ-генерирующие органеллы, образовавшиеся в ходе эволюции из эндосимбиотических бактерий. У растений, кроме того, имеются хлоропласты, которые предположительно

имеют то же эволюционное происхождение. Органеллы обоих типов содержат ДНК (своего рода «мини-хромосомы») и обнаруживают большое сходство с клетками прокариотов (в частности, их рибосомы имеют константу седиментации 70S). «Мини-хромосомы» содержат информацию для цепей рРНК и нескольких цепей тРНК и в силу небольшого размера способны кодировать только небольшую часть специфических белков органелл. Поэтому бо́льшая часть белков митохондрий и хлоропластов кодируется ядерной ДНК и при помощи механизмов, которые еще предстоит выяснить, проникает в соответствующие органеллы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Novikoff A., Holtzman E., Cells and Organelles, Holt, Rinehart and Winston, New York, 1970. Хорошо написанное, богато иллюстрированное издание вводного типа, посвященное строению эукариотических клеток.

Wolfe S. L., Biology of the Cell, Wadsworth, Belmont, California, 1972. Основное внимание в книге уделено структуре хромосом и их поведению во время митоза и мейоза.

Organization and Control in Procaryotic and Eucaryotic Cells, Twentieth Symp. Soc. Gen. Microbiol., Cambridge University Press, 1970. Сборник статей, в которых анализируются отличительные свойства эукариотов.

Margulis L., Origin of Eucaryotic Cells, Yale University Press, 1970. Книга, написанная с творческим воображением и дающая представление о систематике и строении клеток у низших организмов, весьма полезна биохимикам, почти ничего об этом не знающим.

Miller S. L., Orgel L. E., The Origins of Life on the Earth, Prentice-Hall, 1974. Отличительной особенностью книги является то, что небольшое число точно установленных фактов отграничено в ней от множества спекуляций, в которых желаемое принимается за действительное.

Singer S. J., Nicholson G. L., The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes, Science, **175**, 720 (1972). Первые достоверные свидетельства полужидкой природы клеточных мембран.

Membrane Molecular Biology, C. F. Fox and A. D. Keith (eds.), Sinauer Associates, Stamford, Connecticut, 1972. Статьи обзорного типа, представляющие интерес для специалистов.

Aspects of Cell Motility, Symp. Soc. Exp. Biol., XXII, Academic Press, 1968. Сборник статей обзорного характера о различных механизмах клеточного движения.

Trinkhaus J. P., Cells into Organs: The Forces that Shape the Embryo, Prentice-Hall, 1969. Попытка объяснить роль клеточных движений в эмбриональном развитии.

Wessels N. K., How Living Cells Change Shape, Scientific American, October, 1971. Эксперименты, направленные на выяснение роли микрофиламентов и микротрубочек в клеточном движении.

Locomotion of Tissue Cells, CIBA Foundation Symposium XLV (new series), Elsevier, North Holland, Amsterdam, New York, 1973. В работе отражен современный уровень знаний о движениях клеточной мембраны, обусловливающих подвижность клетки.

Pollard T. D., Weihing R. R., Actin and Myosin and Cell Movement, CRC Critical Reviews in Biochemistry, G. D. Fasman (ed.), 2, 1, Chemical Rubber Company, Cleveland, 1973. Весьма полный обзор, в котором особое внимание уделено свойствам мышечных белков, выделенных из немышечных клеток.

Allison A. C., Davies P., Mechanism of Endocytosis and Exocytosis: Transport at the Cellular Level, Symp. Soc. Exp. Biol., XXVIII, 419, Cambridge University Press, 1974. Блестящий обзор, творческое осмысление известных фактов.

Lazarides E., Weber K., Actin Antibody: The Specific Visualization of Actin Filaments in Nonmuscle Cells, Proc. Nat. Acad. Sci., **71**, 2268 (1974). Эта и последующие три статьи показывают целесообразность использования флуоресцирующих антител для изучения организации мышечных белков в клетках, растущих в культуре.

Goldman R. D., Lazarides E., Pollack R., Weber K., The Distribution of Actin in Nonmuscle Cells: The Use of Actin Antibody in the Localization of Actin within the Microfilament Bundles of Mouse 3T3 Cells, Exp. Cell Res., **90**, 333 (1975).

Lazarides E., Tropomyosin Antibody: The Specific Localization of Tropomyosin in Nonmuscle Cells, J. Cell Biol., **65**, 549 (1975).

Lazarides E., Actin, α-Actinin and Tropomyosin Interaction in the Structural Organization of Actin Filaments in Nonmuscle Cells, J. Cell Biol. (1975).

Buckley I. K., Three-Dimensional Fine Structure of Cultured Cells: Possible Implication for Subcellular Motility, Tissue and Cell, **1**, 51 (1975). Важная статья, в которой показаны возможности миллионовольтного электронного микроскопа при изучении строения интактных клеток.

Porter K. R., Cytoplasmic Microtubules and Their Functions, Principles of Biomolecular Structure, Ciba Symposium, Little, Brown and Company, Boston, 1966. Великолепно иллюстрированный обзор по микротрубочкам на электронно-микроскопическом уровне.

Roberts K., Cytoplasmic Microtubules and Their Functions, Progress in Biophysics and Molecular Biology, **28**, 371 (1974). Обзор, отражающий современный уровень знаний в области строения и функции микротрубочек.

Satir P., How Cilia Move, Scientific American, October 1974. В статье описывается, каким образом микротрубочки вызывают движение ресничек.

Warner F. D., Macromolecular Organization of Eucaryotic Cilia and Flagella, Adv. Cell and Mol. Biol., E. J. DuPraw (ed.), **2**, 193 (1972), Academic Press. Великолепно иллюстрированный обзор, в котором подвижность ресничек связывается с движением микротрубочек.

Brinkley B. R., *Stubblefield E.*, Ultrastructure and Interaction of the Kinetochore and Centriole in Mitosis and Meiosis, Advances in Cell Biology, D. M. Prescott et al. (eds.), **1** (1970), Appleton-Century-Crofts. Подробный обзор данных на современном уровне.

McIntosh J. R., *Hepler P. K.*, *Van Wie D. G.*, Model for Mitosis, Nature, **224**, 659 (1969). Заслуживающая внимания попытка описать митоз с использованием свойств микротрубочек.

Cande W. Z., *Snyder J.*, *Smith D.*, *Summers K.*, *McIntosh J. R.*, A Functional Mitotic Spindle Prepared from Mammalian Cells in Culture, Proc. Nat. Acad. Sci., **71**, 1559 (1974). Первое успешное исследование митоза in vitro.

Olins A. L., *Olins D. E.*, Spheroid Chromatin Units (nu bodies), Science, **183**, 330 (1974). Первое четкое доказательство того, что хроматин по форме напоминает бусы.

Kornberg R., Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA, Science, **184**, 868 (1974). Гипотеза, касающаяся взаимодействия ДНК и гистонов.

Oudet P., *Gross-Bellard M.*, *Chambon P.*, Electron Microscopic and Biochemical Evidence that Chromatin is a Repeating Unit, Cell, **4**, 281 (1975). Электронно-микроскопический анализ превращения нуклеосом в хроматин с более компактной структурой после добавления гистона H1.

Adams J. M., *Cory S.*, Modified Nucleosides and Bizarre 5′ Termini in Mouse Myeloma Messenger RNA, Nature, **255**, 28 (1975).

Furuichi Y., *Morgan M.*, *Muthukrishman S.*, *Shatkin A. J.*, Reovirus Messenger RNA Contains a Methylated, Blocked 5′-Terminal Structure: $m^7G(5')ppp(5')-G^{m}pCp$, Proc. Nat. Acad. Sci., **72**, 362 (1972). Эта и предыдущая статьи были одними из первых, в которых сообщалось о необычных 5′-блокирующих группах эукариотических мРНК.

Control of Organelle Development, Symposium of the Society for Experimental Biology, XXIV, Academic Press, 1970. Фундаментальная книга, в которой рассмотрены строение, функции и генетика различных цитоплазматических органелл, в особенности тех, которые содержат генетическую информацию.

Sager R., Cytoplasmic Genes and Organelles, Academic Press, 1972. Работа, в которой обобщены современные взгляды на генетическую природу хлоропластов и митохондрий.

Schatz G., *Mason T. L.*, The Biosynthesis of Mitochondrial Proteins, Ann. Rev. Biochem., **43**, 51 (1974).

ГЛАВА

17

Эмбриология на молекулярном уровне

Внимательный читатель мог заметить, что многие утверждения, сделанные в предыдущей главе, носили условный характер. О регуляции синтеза различных белков в бактериальной клетке мы знаем гораздо меньше, чем о самом механизме белкового синтеза, и, несомненно, намного меньше, чем, например, о структуре ДНК. Мы можем, например, с полной определенностью утверждать, что генетическая информация, содержащаяся в хромосомах клетки, закодирована в нуклеотидной последовательности ДНК или что все молекулы тРНК имеют двумерную структуру «клеверного листа». Но мы совсем не уверены в том, что большинство оперонов построено так же, как лактозный оперон, и что все они контролируются репрессорами или что позитивный контроль — общее явление для различных систем. Все эти пробелы в наших знаниях не слишком нас беспокоят; несомненно, в ближайшие годы на смену спекулятивным теориям, касающимся механизма регуляции бактериальных систем, придут твердо установленные факты.

Однако воодушевление от уже достигнутых успехов может побудить нас автоматически распространить данные, полученные на бактериях, на клетки высших растений и животных. Делать этого не следует. Мы обязаны помнить, что выбор бактерий и вирусов в качестве объекта исследования был обусловлен лишь их относительной простотой. Высшие растения и животные — исключительно сложные объекты, и нужно проявить много осмотрительности при решении вопроса о том, какие генетические процессы могут быть успешно исследованы на молекулярном уровне в ближайшие десять-двенадцать лет. В частности, следовало бы попытаться выяснить, достаточно ли мы уже подготовлены к тому, чтобы заняться изучением на молекулярном уровне таких проблем, как проблемы эмбриологии.

КОЛИЧЕСТВО ДНК В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИМЕРНО В 800 РАЗ БОЛЬШЕ, ЧЕМ В КЛЕТКЕ *E. coli*

Прежде чем начать подъем на какую-нибудь высокую гору, альпинисты обычно тщательно измеряют ее высоту и пытаются оценить, насколько труден будет подъем. Переходя от бактериальных клеток к клеткам млекопитающих, также следовало бы сначала попытаться сопоставить сложность тех и других с генетической точки зрения. Самый простой подход заключается, очевидно, в том, чтобы сравнить количество ДНК в клетках обоих типов. Сравнение показало, что в клетке млекопитающего содержится приблизительно в 800 раз больше ДНК, чем в клетке *E. coli* (рис. 17-1). Эта величина дает нам верхний предел числа различных генов, ибо у нас нет оснований считать, что размеры белковых молекул (а следовательно, и размеры генов) увеличиваются при переходе от низших форм жизни к высшим. Итак, если считать, что в гаплоидном геноме каждый ген представлен только одной копией, то клетка млекопитающего

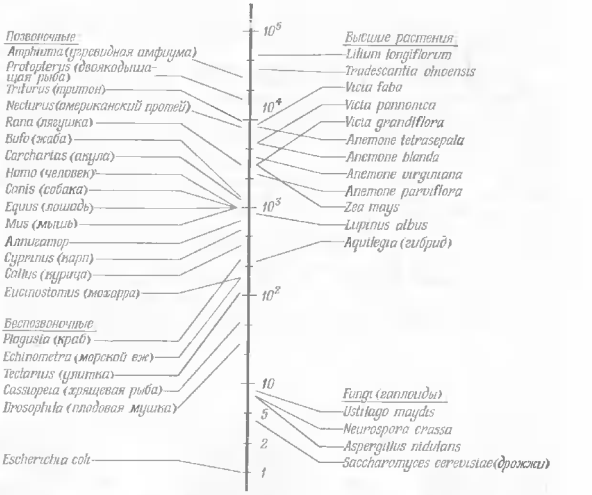


Рис. 17-1. Количество ДНК в гаплоидных геномах клеток различных организмов. (Holiday, Symp. Soc. Gen. Microbiol., 20, 362, 1970.) За единицу принято содержание ДНК в клетке *E. coli* ($4{\cdot}10^{-15}$ мг, мол. вес $2{,}4{\cdot}10^9$). Многие величины надо рассматривать как приближенные.

способна синтезировать около двух миллионов различных белков. Если это действительно так, то это, конечно, означает, что у млекопитающих установить связь между мутантным признаком и соответствующим мутантным белком намного труднее, чем у бактерий.

Правда, такой критерий, как количество ДНК, может в некоторых случаях ввести в заблуждение. Клетки некоторых амфибий содержат, например, в 25 раз больше ДНК, чем клетки млекопитающих. Разумеется, в этом случае нет никаких оснований думать, что первые в биологическом отношении более сложны, чем вторые.

Таким образом, необходимо соблюдать осторожность, если мы хотим по количеству ДНК судить о числе белков, которые может синтезировать данная клетка. Однако уже простое морфологическое наблюдение (при помощи электронного микроскопа) показывает, что в клетках млекопитающих имеется гораздо больше различных субклеточных структур, чем в клетке *E. coli*. Соответственно следует ожидать и большего числа различных структурных белков, а также ферментов. Во всяком случае, мы вправе, очевидно, считать, что с генетической точки зрения клетка позвоночного по меньшей мере в 20—50 раз сложнее, чем клетка *E. coli*.

ВНИМАНИЕ ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ СОСРЕДОТОЧЕНО НА ТЕХ ОРГАНИЗМАХ, У КОТОРЫХ ЛЕГКО НАБЛЮДАТЬ ЗА ДРОБЛЕНИЯМИ

Почти на протяжении ста лет механизмы, при помощи которых оплодотворенная яйцеклетка превращается в ходе развития в многоклеточный организм, оставались для биологов тайной. На первых этапах исследований основными экспериментальными объектами были иглокожие (особенно популярными были морские ежи) и земноводные, в частности разные виды лягушек, саламандр и жаб. Такая устойчивая приверженность объяснялась тем, что у этих животных необычайно легко получать и оплодотворять яйцеклетки, а также следить за ходом эмбрионального развития. В отличие от иглокожих и земноводных у птиц и млекопитающих эмбриогенез протекает под толстой скорлупой или внутри материнского организма, что для эмбриологов существенно осложняет работу с ними. Лишь совсем недавно были разработаны приемы, позволяющие экспериментально изучать ранние стадии эмбриогенеза у мышей.

Одной из наиболее важных особенностей эмбрионального развития у морских ежей и лягушек является то, что все питательные вещества (в основном запасаемые в виде желтка), необходимые для прохождения стадий бластулы и гаструлы (рис. 17-2), должны содержаться в неоплодотворенной яйцеклетке. Только тогда, когда развивающийся эмбрион становится способным самостоятельно добывать себе пищу (у лягушки

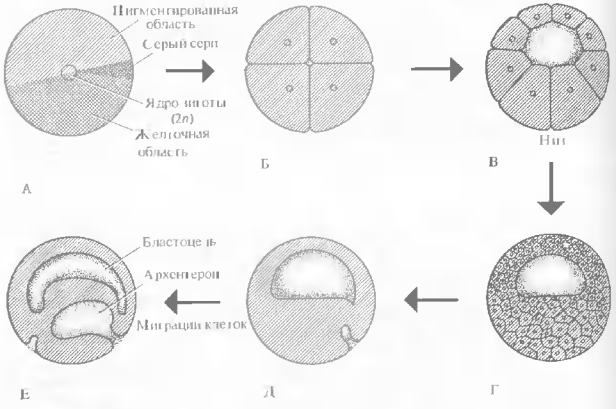


Рис. 17-2. Ранние стадии эмбрионального развития у земноводных. *А*. Яйцеклетка. *Б*. Дробление. *В*. Ранняя бластула. *Г*. Поздняя бластула. *Д*. Ранняя гаструла. *Е*. Поздняя гаструла.

это соответствует стадии сформировавшихся головастиков), начинается действительный рост массы тела. Вследствие этого яйцеклетки иглокожих и земноводных характеризуются очень крупными размерами по сравнению с клетками взрослых особей того же вида, а в ходе дроблений после оплодотворения образуются клетки все меньших и меньших размеров. Отсюда и само слово «дробление». Ранние дробления быстро следуют одно за другим и характеризуются короткими периодами интерфазы, в течение которых происходит — в убыстренном темпе — синтез ДНК. В каждом из ядер тысячи или более клеток на стадии гаструлы точно столько же ДНК, сколько ее в ядре только что оплодотворенной яйцеклетки.

ЦЕНТРАЛЬНОЙ ПРОБЛЕМОЙ ЭМБРИОЛОГИИ ЯВЛЯЕТСЯ ПРОБЛЕМА КЛЕТОЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Конечно, дробления сами по себе еще не приводят к эмбриональному развитию. Саму суть этого процесса составляет клеточная дифференцировка. Все высшие растения и животные построены из огромного множества клеток самых разных типов (нервные клетки, мышечные клетки, клетки щитовидной железы, форменные элементы крови), которые должны образовываться согласно некоему упорядоченному механизму.

Дифференцировка начинается в процессе дробления оплодотворенного яйца. У некоторых организмов она начинается уже после нескольких дроблений. У других должно произойти очень много дроблений, прежде чем появятся клетки, судьба которых окончательно предопределена. Однако, каков бы ни был точный ход этого процесса во времени, результат его всегда один — превращение одной родительской клетки в большое число клеток различных типов.

Дифференцировку можно изучать в трех различных аспектах. Прежде всего можно пытаться установить природу тех внешних сил, под действием которых в недифференцированной родительской клетке начинается цепь событий, приводящая в конце концов к появлению двух дочерних клеток с различной конституцией. Иногда легко заметить, что действие какой-либо внешней силы неравномерно. Так, например, сила тяжести смещает желток оплодотворенного яйца лягушки книзу, поэтому уже после первых нескольких дроблений такого яйца одни клетки должны содержать больше желтка, чем другие.

Второй подход состоит в выяснении молекулярных различий между дифференцированными клетками. Можно ли считать их фундаментальными или же морфологические различия следует приписать лишь присутствию нескольких особых белков в ненормально больших количествах? Все имеющиеся в настоящее время данные говорят в пользу первого предположения: дифференцированная клетка каждого типа содержит много различных молекул, характерных только для данного типа. Поэтому полное описание дифференцировки на молекулярном уровне неизбежно оказывается крайне сложной задачей.

Третий вопрос, на который необходимо получить ответ, это вопрос о необратимости всех разнообразных изменений, ведущих к дифференцировке. Если эти изменения необратимы, то какие молекулярные механизмы обеспечивают их закрепление? Ответы на эти вопросы всегда были главной целью биологов. Однако до совсем недавнего времени дифференцировку изучали изолированно, в отрыве от генетики и биохимии. По теперь уже совершенно ясно, что морфологический подход, который использует классическая эмбриология, не может дать вполне удовлетворительных результатов. Как и в генетике, фундаментальное решение вопроса следует искать на молекулярном уровне. В настоящее время эмбриологи полагают, что многие контрольные механизмы, предопределяющие потенциальные хими-

ческие процессы в клетке, действуют на уровне генов. Совершенствование в последнее время методов исследования способствовало сближению биохимии и генетики. Это сближение, по всей вероятности, служит залогом бурного развития эмбриологии в ближайшем будущем.

Хотелось бы только обратить внимание на то, что по сравнению с такими высшими организмами, как *Drosophila* и мышь, генетика морских ежей, а также лягушек, саламандр и жаб находится в зачаточном состоянии.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЧАСТО НЕОБРАТИМА

Исследователи научились выделять и выращивать вне организма в лабораторных условиях многие дифференцированные клетки. Некоторые из них можно выращивать точно так же, как и бактерии, на питательных средах известного состава. Подобная техника выращивания клеток в культуре позволяет, например, экспериментально решить вопрос о том, сохраняет ли, скажем, первая клетка все свои свойства в отсутствие нормального клеточного окружения. Ответ оказался утвердительным. Какие-то факторы, запрещающие первой клетке синтезировать не характерные для нее белки, продолжают действовать и в этих условиях. Подобные результаты были получены для многих типов клеток высших животных. Но в случае высших растений чаще получали противоположный результат. Как правило, из высокодифференцированных клеток корня или эпидермиса может развиться целое растение.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ОБЫЧНО НЕ СВЯЗАНА С ПРИОБРЕТЕНИЕМ ИЛИ УТРАТОЙ ХРОМОСОМ

Поскольку дифференцировка необратима, простейшее ее объяснение можно было бы видеть в том, что только часть генов оплодотворенного яйца передается дифференцирующимся клеткам (нервным, мышечным и т. п.). Однако такого рода объяснение оказывается совершенно ложным. Насколько нам известно, все клетки данного организма, за очевидным исключением гаплоидных половых клеток, содержат один и тот же хромосомный набор. Делению клеток всегда предшествует митотическое деление хромосом, так что все дочерние клетки, как правило, получают одинаковые хромосомные наборы. Однако мы, разумеется, не можем утверждать, что на уровне отдельных генов не происходит стойких изменений. Остается решить вопрос, могут ли эти изменения иметь избирательный характер, т. е. могут ли они обусловливать инактивирование (или, напротив, активирование) совершенно определенных генов. Чтобы решить этот вопрос, необходимо разработать методы, которые позволили бы проверить такую возможность. К сожалению, эта задача представляется в настоящее время трудноразрешимой.

МНОГОКЛЕТОЧНЫЕ ОРГАНИЗМЫ ДОЛЖНЫ ИМЕТЬ КАКИЕ-ТО ПРИСПОСОБЛЕНИЯ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ

Весьма убедительные данные показывают, что у многоклеточных организмов (точно так же, как у бактерий) не все гены функционируют одновременно. Например, в мышечной клетке какие-то механизмы определяют преимущественный синтез белков, используемых для построения мышечных волокон, и т. п.

Таким образом, эмбриологические проблемы могут быть в какой-то мере сведены к выяснению того, почему гены функционируют избирательно. Мы должны понять, что́ же, собственно, заставляет две дочерние клетки синтезировать разные белки и, более того, что вынуждает их продолжать синтез белков только одной определенной группы. При такой формулировке сразу становится ясным, насколько непосильной задачей было бы выяснение всех химических деталей процесса развития какого-нибудь высшего растения или животного. Даже при самом скромном подсчете нам, очевидно, потребовалось бы изучить поведение сотен различных белков. Однако здравый смысл говорит, что и здесь, видимо, должны существовать какие-то общие принципы, наподобие тех, которые определяют избирательный синтез белков у бактерий. Можно, например, представить себе, что дифференцировка происходит на хромосомном уровне путем регуляции синтеза специфической мРНК. Действительно, мы теперь располагаем прекрасными доказательствами того, что в разных участках хромосомы РНК синтезируется с разной скоростью (см. ниже). Показано, что участки хромосомы, активно функционирующие на определенной стадии, на других стадиях развития неактивны.

В последнее время многие эмбриологи склоняются к мысли, что функции некоторых генов в клетках млекопитающих и у высших растений могут контролироваться негативно подобно тому, как лактозный оперон контролируется репрессором, или позитивно, аналогично синтезу вирусспецифических белков в бактериальной клетке, заражепной фагом Т4. К сожалению, почти все изучаемые эмбриологами признаки в химическом отношении невероятно сложны (попробуйте, например, представить себе такую систему, как глаз!), лишь очень немногие из них можно связать с какими-нибудь хорошо изученными химическими реакциями. Мы можем, например, легко идентифицировать нервную клетку по чисто морфологическим данным, но мы почти ничего не знаем о ее строении на молекулярном уровне. Более того, из сотен белков нервной ткани до сих пор достаточно хорошо охарактеризовано всего лишь несколько. О мышечных белках мы, правда, знаем больше, но и в этом случае наши химические представления столь примитивны, что анализ точных взаимоотношений между геном и соответствующим белком в настоящее время вряд ли возможен.

НЕОБХОДИМА МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА, НА КОТОРОЙ МОЖНО БЫЛО БЫ ИЗУЧАТЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ

Попробуем задать вопрос: можно ли достаточно глубоко исследовать на молекулярном уровне какую-нибудь из тех систем, с которыми работают эмбриологи? Для начала отметим, что простая регистрация явных различий в белках и нуклеиновых кислотах между различными дифференцированными клетками еще недостаточна для получения существенных данных, ведь уже из классической морфологии мы знаем, что дифференцированные клетки неодинаковы. Чтобы получить четкие ответы, нужно ставить себе более осмысленные задачи. Первой такой задачей может быть идентификация внешних факторов (эмбриональных индукторов), обусловливающих направленную дифференцировку клеток. Известно, например, что дифференцировка многих нервных клеток зависит от какого-то внешнего фактора, выделяемого соседними клетками. Второй важнейшей задачей представляется выяснение того, как индуктор действует на недифференцированную клетку. Особенно важно понять ту цепь событий, которая связывает действие индуктора с функционированием соответствующих генов.

По всей вероятности, эти проблемы можно будет решить лишь после того, как мы научимся с помощью эмбриональных индукторов вызывать специфическую дифференцировку клеток, растущих в культуре ткани.

Ранее в целом ряде работ сообщалось, что дифференцировка может происходить in vitro. Однако всякий раз при тщательном изучении экспериментов обнаруживалось, что в оценке результатов были допущены ошибки. Было показано, например, что при добавлении самых различных химических соединений недифференцированные клетки цыпленка легко превращаются в нервные клетки. На первый взгляд этот результат представляется очень важным и обнадеживающим. Однако в действительности это не так. К сожалению, речь идет не об одном определенном веществе, а о целом ряде неродственных веществ, способных вызывать одинаковый результат. Роль индуктора может играть даже поваренная соль в определенных концентрациях. Большинство эмбриологов полагают, что все известные в настоящее время химические агенты из числа индуцирующих трансформацию in vitro действуют неспецифично и что истинные эмбриональные индукторы до сих пор еще не обнаружены.

СПОРУЛЯЦИЯ БАКТЕРИЙ КАК НАИБОЛЕЕ ПРОСТАЯ ИЗ ВСЕХ МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ

Колоссальная сложность такой задачи, как постижение молекулярных основ процесса дифференцировки (скажем, развития нервных клеток), побудила многих исследователей предпринять поиски клеточных систем, которые были бы во много раз проще, чем классические объекты эмбриологии. Некоторые биохимики зашли столь далеко, что сосредоточили все свое внимание на образовании спор у бактерий. Споры представляют собой сильно обезвоженные клетки, которые формируются внутри некоторых бактерий (например, рода *Bacillus*) при субоптимальных условиях окружающей среды. Споры, не обладающие метаболической активностью, в каком-то смысле напоминают семена высших растений. Их отличает от вегетативных клеток бактерий высокая устойчивость к неблагоприятным условиям, таким, как сильное повышение температуры или сухость. Поэтому бактерии, способные к споруляции, оказываются более жизнеспособными в экстремальных условиях внешней среды, с которыми приходится сталкиваться многим формам микроорганизмов.

Некоторые стадии спорообразования показаны на рис. 17-3 и 17-4. Можно видеть, что на самых ранних этапах происходит впячивание участка бактериальной мембраны, причем внутрь образующегося отсека попадают хромосома и часть цитоплазмы. После этого на внешней стороне отсека откладывается очень толстый и плотный поверхностный слой белка, полностью отличающегося по составу от белка, располагающегося на поверхности соответствующих вегетативных форм. Эти морфологические перемены сопровождаются важными изменениями и в составе ферментов. Молекулы цитохромов, необходимых для аэробного метаболизма, полностью исчезают, и появляются новые системы транспорта электронов. Снижается также содержание рибосом, и еще сильнее падает число молекул мРНК. Остается незначительное количество молекул ферментов, участвующих в белковом синтезе,— они необходимы для возобновления синтеза белка при прорастании споры, когда она попадает в более благоприятные условия.

Таким образом, при споруляции прекращается синтез практически всех белков, необходимых для вегетативного существования. Прорастание спор представляет собой процесс, направленный в противоположную сторону: когда споры попадают в соответствующие условия, они становятся способными продуцировать вегетативные белки. Следовательно, образование споры должно сопровождаться торможением синтеза большинства, если не всех, вегетативных мРНК и заменой их молекулами мРНК, несущими информацию для спороспецифических белков.

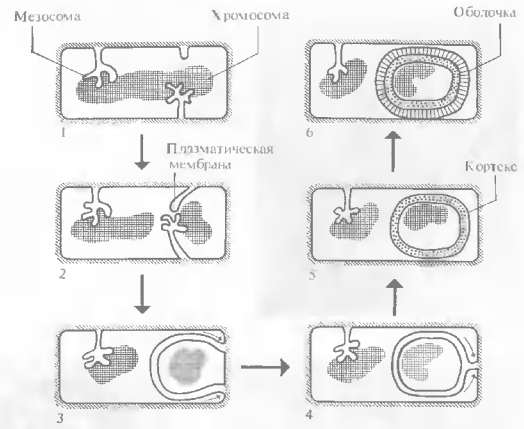


Рис. 17-3. Схематическое изображение последовательных стадий споруляции.
1 Стадия, предшествующая образованию септ; хромосома расположена вдоль оси клетки. *2* Появление септ; плазматическая мембрана образует впячивание и отграничивает область, содержащую интактную хромосому. *3*, *4*. Стадии образования оболочки вокруг протопласта. *5*. Образование кортекса, между двумя мембранами откладывается вещество. *6*. Образование оболочки и созревание, в конечном счете спора отделится от остальной части бактериальной клетки.

До самого последнего времени молекулярные основы этого переключения оставались абсолютно загадочными. Недавние опыты показали, что спорулляция сопровождается появлением нового фактора специфичности РНК-полимеразы, который считывает гены, ответственные за спорулляцию. В то же время наблюдается инактивация одного (или нескольких?) вегетативного фактора специфичности. Таким образом, тот главный механизм контроля, который регулирует последовательный синтез белков у фагов, играет ключевую роль и в спорулляции. Безусловно, множество вопросов остается до сих пор без ответа, в частности вопрос о том, каким образом стимуляция спорулляции (или прорастания) приводит к изменению набора факторов специфичности. Однако после многих лет разочарований появились хоть какие-то основания думать, что биохимические процессы, лежащие в основе превращения вегетативной клетки в спору, поддаются анализу, приносящему ощутимые плоды.

ПО МНОГИМ ПРИЧИНАМ СЛЕДУЕТ УСИЛИТЬ ИЗУЧЕНИЕ ТАКИХ ОРГАНИЗМОВ, КАК ДРОЖЖИ

Одна из основных причин быстрых успехов в молекулярной биологии за последние два десятилетия заключается в том, что усилия исследователей были сосредоточены на изучении многих аспектов одного и того же

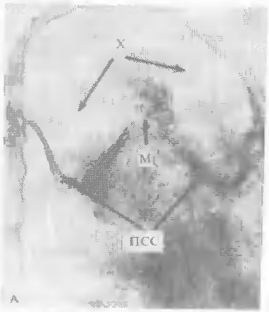


Рис. 17-4. Электронные микрофотографии тонких срезов клеток *Bacillus cereus* в процессе споруляции. (С любезного разрешения д-ра Морелла.)
А. Образование септы. *Б.* Образование кортекса. *В.* Образование оболочки. Х — хромосома, М — мезосома, ПСС — поперечная септа споры, *К* — кортекс, НМ — наружная мембрана, ВМ — внутренняя мембрана, ОС — оболочка споры, ЭС — экзоспорий.

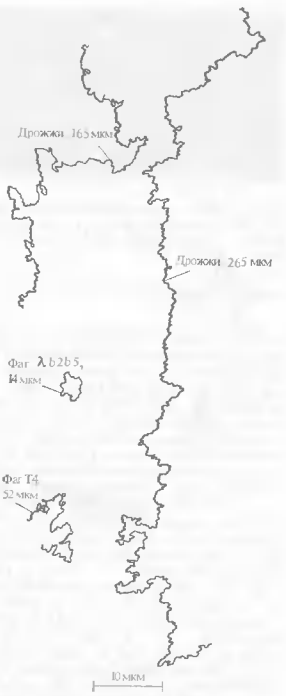


Рис. 17-5. Сопоставление электронных микрофотографий двух молекул дрожжевой ДНК и ДНК фагов λ (мол. вес $32 \cdot 10^6$) и T4 (мол. вес $12 \cdot 10^8$) (Petes et al., Cold Spring Harbor Symp., **XXXVIII**, 9, 1974).

организма — бактерии *E. coli*. Совершенно ясно, что в ближайшее время основное внимание будет перенесено на эукариотические клетки одного или нескольких типов. По многим причинам кажется вполне естественным, что на первый план здесь выйдут некоторые типы клеток человека. Но в то же время было бы разумно сфокусировать внимание и на молекулярной биологии одного-двух низших эукариотов. Такой подход диктуется несколькими обстоятельствами. Во-первых, клетки низших эукариотов содержат гораздо меньше ДНК (рис. 17-1), чем клетки из организма человека. При восхождении по лестнице от *E. coli* к дрожжам или грибу *Aspergillus* наблюдается усложнение генетического аппарата не более чем в 3—10 раз. Во-вторых, не последнюю роль играют соображения

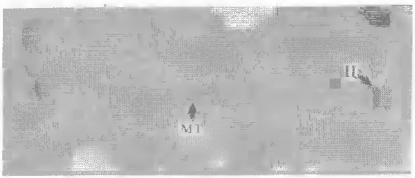


Рис. 17-6. Электронная микрофотография тонкого среза дрожжевой клетки в процессе почкования (Byers, Goetsch, Cold Spring Harbor Symp., XXXVIII, 128, 1974).

Видны микротрубочки (МТ), образующие нити веретена. Плотные тельца на полюсах веретена носят название центриолей (Ц). Возможно, они служат организующими центрами, из которых растут полюсные микротрубочки.

чисто экономического характера: работа с клетками высших эукариотов требует по крайней мере на порядок бо́льших затрат, чем работа с низшими эукариотами (микроорганизмами). Если при решении одной и той же проблемы существует выбор между клетками культур тканей человека и дрожжами или нейроспорой, то здравый смысл заставляет нас остановиться на более простой системе. В-третьих, и это, вероятно, самое важное, подробный генетический анализ осуществляется на многих микроорганизмах довольно легко. Несмотря на большие преимущества, которые дает метод слияния клеток (см. ниже), вряд ли удастся подвергнуть подробному генетическому анализу клетки организма человека.

Таким образом, невзирая на то что главный интерес для нас представляет клетка человека, пришла пора умножить ряды исследователей, работающих на таких организмах, как дрожжи. Клетки дрожжей растут быстро и функционируют как отдельные организмы с гаплоидным или диплоидным набором хромосом; уже к настоящему моменту генетика этих организмов изучена очень подробно. Получить мутации у них столь же легко, как и у *E. coli*; многочисленные гены дрожжевых клеток расположены приблизительно в 17 различных хромосомах. Поскольку общее количество ДНК в гаплоидном наборе дрожжевой клетки всего лишь в 3 раза больше, чем в хромосоме *E. coli*, в среднем молекула дрожжевой ДНК должна быть существенно короче, чем молекула бактериальной ДНК (длина которой $\sim$ 1200 мкм). С помощью недавно полученных электронных микрофотографий молекул дрожжевой ДНК определен ее молекулярный вес: он равен 10^8—10^9 (рис. 17-5); это согласуется с представлением о том, что каждая хромосома дрожжей, как и хромосома *E. coli*, состоит из одной-единственной молекулы ДНК. Все наблюдаемые молекулы имеют линейную форму, и нет никаких данных, которые бы свидетельствовали о наличии кольцевых структур. С помощью генетического анализа всегда получают линейные карты сцепления. Следовательно, если кольцевые формы и существуют, то, вероятно, лишь на короткое время на некоей строго определенной стадии жизненного цикла.

К сожалению, до сих пор не разработано надежного метода, позволяющего получать ядра дрожжевых клеток в интактном состоянии. Поэтому мы по-прежнему ничего не знаем о молекулярном составе дрожжевых хромосом и молекулярных характеристиках новосинтезированной РНК. Однако известно, что в ядерной мембране дрожжевой клетки, как

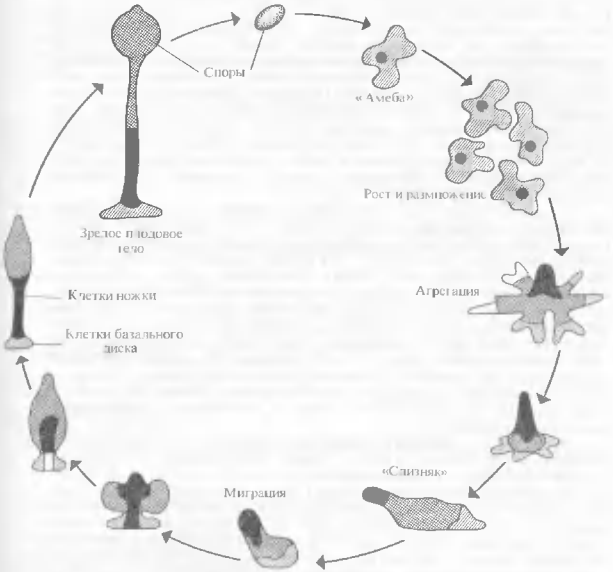


Рис. 17-7. Жизненный цикл плесневого гриба *Dictyostelium discoideum*.

и у высших эукариотов, имеются поры и что новосинтезированная РНК, по всей видимости, проходит через них при движении в цитоплазму. В отличие от всех эукариотов у дрожжей ядерная мембрана не разрушается при митозе. Тем не менее в делящихся ядрах образуется веретено, причем микротрубочки собираются в пучки, расположенные вдоль направления разделения хромосом (рис. 17-6). Поскольку выявлено большое число мутаций, при которых блокируются определенные стадии жизненного цикла, можно надеяться, что в ближайшее время станет возможным глубокий анализ молекулярных механизмов, лежащих в основе разделения хромосом.

ОБРАТИМЫЕ СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК ПЛЕСНЕВОГО ГРИБА

Само собой разумеется, что наиболее интересными для эмбриолога являются микроорганизмы, у которых клеточная дифференцировка представляет собой важный аспект жизненного цикла. Так, большое внимание привлек

в последнее время одноклеточный плесневый гриб *Dictyostelium discoideum*; его жизненный цикл показан на рис. 17-7. Цикл начинается с прорастания спор, в результате чего образуются амебоидные клетки, называемые миксоамебами. Эти клетки неправильной формы ведут себя как мелкие амебы: они питаются в основном бактериями и размножаются делением. Если в окружающей среде уменьшается количество пищи, то они начинают активно секретировать цАМФ. Последний действует как химический аттрактант, который заставляет голодающие клетки двигаться навстречу друг другу и образовывать конические тельца, которые в конце концов опрокидываются набок. Эти тельца, похожие на слизняков, затем медленно передвигаются по поверхности и наконец останавливаются. В дальнейшем они образуют плодоносящую структуру, состоящую из базального диска, ножки и массы спор.

Все эти компоненты возникают путем прямого превращения (дифференцировки) амебоидных клеток в более специализированные клетки. Специфичность превращения зависит от того, в какой момент данная клетка включилась в исходный агрегат. Те клетки, которые агрегируют первыми, образуют нижнюю часть ножки, следующая группа превращается в верхнюю часть ножки и споры, а базальный диск образуется из клеток, которые присоединялись к уже агрегированным последними. Со временем все клетки диска и ножки отмирают, а оставшиеся споры начинают новый жизненный цикл при благоприятных изменениях внешних условий. За исключением конечных этапов спорообразования, все стадии дифференцировки полностью обратимы. Например, если клетки ножки отделить от плодоносящего тела до того, как начнется распад клеток, то они могут снова превратиться в амебоидные клетки и приобретут способность размножаться делением.

Синтез многих ключевых ферментов в жизненном цикле *Dictyostelium* ограничен определенными стадиями, причем синтез каждого специфического фермента требует предварительного синтеза соответствующей мРНК. В высокодифференцированных клетках можно обнаружить только половину из тех мРНК, которые синтезируются в недифференцированных делящихся амебоидных клетках. К тому же дифференцированные клетки содержат те виды РНК, которые на более ранних стадиях развития отсутствуют. Однако до сих пор ни у кого нет сколько-нибудь обоснованных предположений насчет того, каким образом индуцируются эти изменения в продуктах транскрипции. Предварительные исследования, проведенные на РНК-полимеразах I и II, не выявили модификации в составе их субъединиц в ходе развития. К тому же эти опыты еще не завершены и потому не позволяют нам различить факторы, которые непосредственно воздействуют на ДНК, а также обнаружить изменения в полипептидах, образующих различные формы РНК-полимеразы.

ТРАНСКРИПЦИЯ КАК МЕРА БИОЛОГИЧЕСКОГО ВРЕМЕНИ

Тот факт, что эукариотические микроорганизмы имеют тенденцию делиться с постоянными интервалами, позволяет предполагать, что у эукариотов, так же как и у прокариотов, имеются точные часовые механизмы на клеточном уровне. Как мы видели, вирусы бактерий для отсчета времени используют расстояние между генами, что обусловлено относительно низкой скоростью, с которой молекулы РНК-полимеразы движутся по матрицам ДНК (репликация ДНК идет приблизительно в 100 раз быстрее!). При 37 °С скорость движения РНК-полимеразы *E. coli* составляет всего лишь 30—40 нуклеотидов в секунду; это означает, что полная транскрипция одной молекулы ДНК фага λ одной молекулой полимеразы потребует более 25 мин. Поскольку некоторые опероны считываются одновременно,

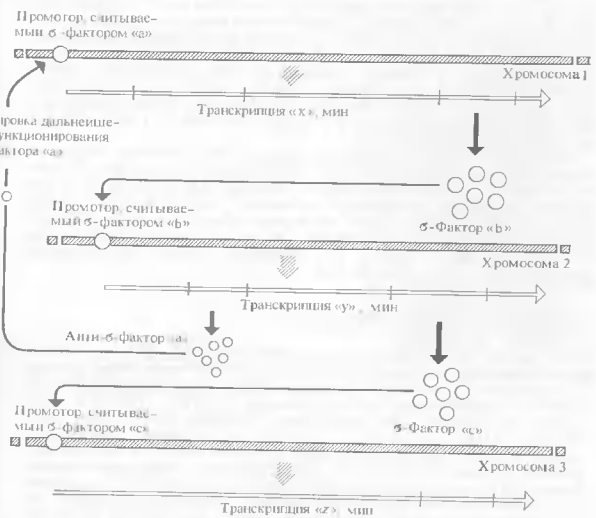


Рис. 17-8. Вероятный механизм, используемый клеткой в качестве биологических часов для отсчета времени используется последовательный синтез разных факторов специфичности.

для одного цикла транскрипции не требуется столь много времени. Тем не менее транскрипция очень длинного позднего оперона фага λ сама по себе занимает около 15 мин.

С помощью аналогичного анализа в приложении к хромосомам *E. coli* общее время транскрипции оценивается в 33 ч. Таким образом, для кодирования периодичности событий, происходящих каждые 20 мин (длительность одного цикла деления), должен использоваться всего лишь 1% общего генома бактерии. На ленте ДНК легко измерить даже те 3—4 ч, которые требуются спорам для прорастания. Безусловно, такие относительно продолжительные интервалы времени не обязательно должны кодироваться одной сплошной последовательностью ДНК. Такую работу могли бы выполнять и несколько опероноп, каждый из которых кодирует уникальную последовательность фактора специфичности, необходимого для считывания оперона, транскрибируемого впоследствии (рис. 17-8).

Вероятнее всего, любые биологические часы такого рода должны зависеть и от регулярного появления антифакторов специфичности, т. е. генных продуктов, которые направленно выводят из игры определенные

факторы специфичности. Такие факторы обеспечивают наиболее прямой путь ограничения синтеза специфических белков для строго определенных периодов жизненного цикла. Их существование известно из данных о клеточном цикле фага Т4 (стр. 400), в котором по крайней мере один ген содержит информацию для продукта, ингибирующего функционирование σ фактора *E. coli*. В жизненных циклах бактерий, которые, вне всяких сомнений, являются гораздо более сложными, чем фаги, должны участвовать наборы различных антифакторов специфичности, каждый из которых работает в определенное время и специфически блокирует функционирование определенных генов.

Циклы деления клеток высших организмов гораздо более продолжительны, и содержание ДНК в них соответственно гораздо выше; одной молекуле полимеразы потребовалось бы около 1000 дней при 37 °С для полного считывания гаплоидного набора всех генов человека. Следовательно, легче всего представить, что временные характеристики суточного цикла клетки человека определяются на уровне транскрипции; то же, по-видимому, можно сказать и о ключевых стадиях эмбрионального развития всех высших организмов.

ХРОМОСОМЫ ВЫСШИХ ОРГАНИЗМОВ

Основополагающие представления о строении хромосом высших растений и животных весьма скудны. До сих пор нет окончательной ясности в вопросе, касающемся связи между индивидуальными молекулами ДНК и хромосомами, наблюдаемыми под микроскопом. В случае ДНК-содержащих вирусов и бактерий ответ однозначен: хромосома представляет собой молекулу ДНК, которая часто имеет кольцевую форму. Что касается хромосом высших организмов, то здесь до истины добраться куда труднее, во-первых, потому что в отдельных хромосомах содержится гораздо больше ДНК, и, во-вторых, потому что ДНК всегда находится в комплексе с белками (хроматин). Надежными данными мы располагаем только для *Drosophila melanogaster*. У этого вида каждая хромосома содержит одну линейную двойную спираль, причем наиболее крупные молекулы характеризуются мол. весом $4 \cdot 10^4$. Каждая молекула ДНК проходит через всю хромосому от одного конца до другого независимо от того, где располагается центромера (с участком присоединения нити веретена — кинетохором) — в центре (метацентрические хромосомы) или на конце молекулы (телоцентрические хромосомы). Кинетохоры следует рассматривать как тельца, присоединяющиеся к ДНК латерально, — такое представление подтверждается данными электронной микроскопии (рис. 16-22).

Обычно хромосомы удается наблюдать при помощи светового микроскопа только в ходе митоза или мейоза, когда они уплотняются. Образующиеся при этом компактные структуры в электронном микроскопе видны как необычайно сложные образования, для которых характерно присутствие множества хроматиновых волокон, напоминающих лапшу, причем эта картина довольно хорошо воспроизводится. Бо́льшая часть этих волокон имеет один и тот же диаметр 200—250 Å, вместе с тем на некоторых срезах обнаруживаются более тонкие нити диаметром 100—120 Å (рис. 17-9). Скорее всего эти два типа волокон отражают два различных типа укладки, соответствующие закручиванию двухцепочечной ДНК в суперспирализованные структуры первого (волокна диаметром 100 Å) или второго (200 Å) порядка.

Столь же трудным для понимания было до самого последнего времени и строение интерфазного хроматина, гораздо более растянутого по сравнению с хроматином, присутствующим в клетке во время ее деления. Его неупорядоченную конформацию невозможно изучать методом электронной

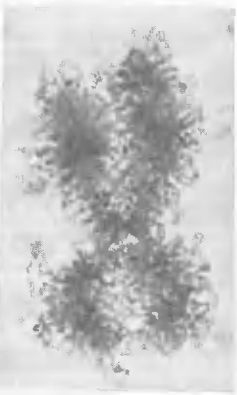
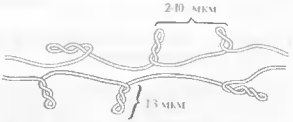


Рис. 17-9. Электронная микрофотография двух хроматид (хромосома 16 человека), выделенных из клетки на стадии метафазы до полной репликации центромеры (Du Praw, DNA and Chromosomes. Holt, 1970).

микроскопии ультратонких срезов, кроме того, когда хроматин экстрагировали из клеток, он очень быстро агрегировал с образованием структур, никоим образом не отражающих его внутриклеточное состояние. Теперь в опытах, проведенных с большой тщательностью, удалось выявить его внешний вид (стр. 461): он напоминает бусы, «нанизанные» на частиц диаметром 100 Å (нуклеосом), внутри которых компактно уложена двухцепочечная ДНК. Иногда бывает видно, что от некоторых интерфазных хроматиновых волокон ответвляются петли, имеющие одинаковый диаметр. Эти петли, отходящие от основного тела хромосомы, располагаются неупорядоченно, так что зачастую на участок в 10 мкм приходится от одной до пяти петель (рис. 17-10). Поскольку они встречаются in vivo как в ламповых щетках, так и в политенных хромосомах (см. ниже), высказываются предположения, что петли представляют собой важную особенность хроматина вообще.

Рис. 17-10. Схематическое изображение формы изолированного и промытого солевым раствором хроматина из ядер яйцеклетки дрозофилы, рассматриваемого в электронный микроскоп. Области относительно прямолинейные (толщиной около 60 Å) чередуются с петлями (каждые 2—10 мкм). По этой схеме нельзя судить о распределении на ДНК различных белков хроматина (гистонов и кислых белков).



РЕПЛИКАЦИЯ ДНК НАЧИНАЕТСЯ В НЕСКОЛЬКИХ УЧАСТКАХ ОДНОЙ И ТОЙ ЖЕ ХРОМОСОМЫ

У всех эукариотов репликация ДНК инициируется в многочисленных участках одной и той же хромосомы. В результате каждого акта инициации появляются две вилки репликации, образующие репликативный пузырь, который в конечном итоге сливается с соседними репликативными пузырями (рис. 17-11). Число стартовых участков в хромосоме является функцией времени, т. е. зависит от того, в какой стадии жизненного цикла находится клетка. Например, при дроблениях в ходе эмбриогенеза дрозофилы синтез ДНК начинается в существенно большем числе участков, чем в растущих клетках взрослого животного. При каждом дроблении для репликации хромосом дрозофилы требуется всего лишь около 3,5 мин, тогда как в клетках дрозофилы, растущих в культуре, этот процесс занимает более 200 мин. Эти различия отражают разницу в числе участков, в которых начинается репликация, а не различия в скоростях, с которыми движутся репликативные вилки. В обоих случаях при 25 °С они проходят в среднем по 2600 пар оснований в минуту. Внутри очень быстро дробящихся (через каждые 9,5 мин) ядер репликация ДНК начинается приблизительно в 30 000—50 000 различных «открытых» участков, каждый из которых обычно отделен от другого примерно 3000—4000 пар оснований. В клетках взрослых животных существует, однако, гораздо меньше «открытых» участков (около 3000) и лишь немногие репликативные пузыри подходят друг к другу ближе чем на 30 000 пар оснований.

В настоящее время высказываются предположения, что внутри данной клетки репликация инициируется почти одновременно во всех «открытых» участках. Тогда общее время внутриклеточного синтеза ДНК должно определяться максимальным расстоянием между соседними «открытыми» участками (рис. 17-12). Внутри сильно уплотненных гетерохроматиновых участков (см. ниже), обнаруживаемых вблизи центромеры, расположено очень мало «открытых» участков; следовательно, в клетках взрослых животных последним реплицируется тот участок ДНК, который примыкает к центромере. В дробящихся ядрах уплотнения центромерной ДНК не происходит, поэтому данная область ДНК реплицируется одновременно с другими областями. Однако в ходе эмбрионального развития центромерные области уплотняются, и время, необходимое для синтеза ДНК, соответственно увеличивается во много раз.

После того как данный «открытый» участок реплицировался один раз, он не может служить стартовой точкой репликации до следующего жизненного цикла клетки. Молекулярная основа этого явления остается до сих пор неясной, хотя важность ее очевидна. Можно думать, что некие химические изменения (например, метилирование), происходящие одновременно с инициацией, приводят к блокированию дальнейшей репликации до начала следующего жизненного цикла, когда в результате соответствующих молекулярных изменений снимается действие блокирующего фактора. Вместе с тем может существовать механизм контроля, действующий на уровне специфических белков хромосом.

АКТИВНЫЕ (ЭУХРОМАТИНОВЫЕ) И НЕАКТИВНЫЕ (ГЕТЕРОХРОМАТИНОВЫЕ) ОБЛАСТИ ХРОМОСОМ

Термин *гетерохроматин* часто используется для обозначения сильно уплотненного хроматина, который можно видеть под световым микроскопом даже во время интерфазы. Ранние генетические эксперименты показали, что такие области содержат очень небольшое число генов. Это натолкнуло на мысль, что гетерохроматиновая ДНК не играет генети-

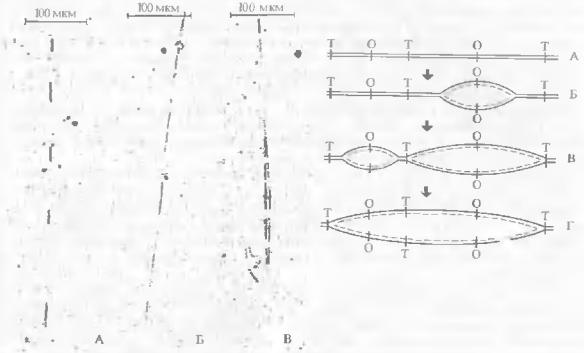


Рис. 17-11. Рост хромосомы млекопитающего идет в двух направлениях (Huberman, Riggs, *J. Mol. Biol.*, **32**, 327, 1968).
А. Радиоавтограмма молекулы ДНК китайского хомячка из клетки, меченной в течение короткого времени ^{3}H-тимидином. Тандемные пучки радиоактивных зерен показывают наличие многих точек репликации на изучаемом участке ДНК. *Б.* Тандемные пучки, обнаруживаемые при импульсной метке, после которой клетку инкубировали в среде с нерадиоактивным тимидином. Плотность зерен уменьшается при переходе от центра к концам, что может указывать на движение точек роста в противоположных направлениях. *В.* Пример репликации сестринских молекул, удерживаемых вместе вилкой репликации. *Г.* Схема, поясняющая процессы, фиксированные на фотографиях *А*, *Б* и *В*.

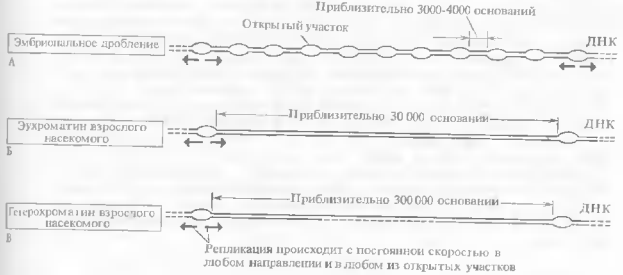


Рис. 17-12. Схематическое изображение репликации ДНК на одном из участков хромосомы дрозофилы.
А. Репликация завершается очень быстро (~ 5 мин) благодаря присутствию большого числа открытых участков. *Б.* Репликация завершается примерно за 1 ч. *В.* Репликация завершается за время, превышающее 10 ч.

ческой роли. Как обнаружилось в дальнейшем, такая уплотненная ДНК не служит матрицей для синтеза РНК, что подтверждает высказанное выше предположение. Соответственно гораздо более «открытый» хроматин (эухроматин), который обычно во время интерфазы не виден под микроскопом и который, согласно генетическим данным, полностью состоит из активных генов, энергично транскрибируется с образованием цепей РНК. Вначале казалось, что нефункциональные гетерохроматиновые области содержат большее количество гистонов и это делает их менее доступными для РНК-полимеразы. Однако те немногочисленные измерения, которые были проведены до сих пор, свидетельствуют об одинаковом уровне связывания гистонов гетерохроматином и эухроматином.

Существует много случаев, когда ген теряет активность вследствие перестроек хромосом, в результате которых он попадает в гетерохроматиновую область. Это предполагает наличие таких механизмов контроля, которые могли бы осуществлять включение или выключение чрезвычайно длинных областей данной хромосомы. Это положение, впервые продемонстрированное на дрозофиле, оказалось справедливым и для клеток млекопитающих.

Наиболее ошеломляющие результаты были получены для половых хромосом примерно 15 лет назад. Гомологичные Х-хромосомы выглядят абсолютно по-разному. Одна всегда находится в сильно уплотненном состоянии (подразумевается, что она не функционирует), а вторая всегда растянута. Предположение о неактивном состоянии одной из хромосом подтвердилось данными биохимического анализа, свидетельствующими о том, что только в одной из двух Х-хромосом данной клетки женской особи гены активны. Удивительно, что в разных клетках инертными являются разные хромосомы; вследствие этого ткань женской особи по существу представляет собой мозаику, содержащую смесь клеток двух разных типов. Хотя молекулярные механизмы этого странного явления до сих пор неизвестны (по-видимому, оно характерно только для Х-хромосом), его можно использовать как яркую иллюстрацию положения о том, что существуют специальные механизмы, благодаря которым специфически блокируется функционирование целой хромосомы.

Хотя для других хромосом эукариотических клеток эффекты «все или ничего» нетипичны, они также могут содержать протяженные области гетерохроматина, длина которых зависит от периода жизненного цикла. Важнее всего, пожалуй, то, что многие области, которые на поздних стадиях являются полностью гетерохроматиновыми, на ранних этапах развития выступают как эухроматиновые. Они скорее всего содержат гены, которые предназначены функционировать на одной из ранних стадий эмбрионального развития. Функция же ДНК, примыкающей к центромере, которая сразу после окончания дроблений становится необратимо гетерохроматиновой, по-прежнему остается загадкой. РНК на ней не синтезируется — ни в ходе эмбрионального развития, ни позже, в клетках взрослых особей. И тем не менее ее содержание всегда составляет от 5 до 10% всей хромосомной ДНК. Можно полагать, что при ее уплотнении скорость репликации участка ДНК, непосредственно примыкающего к центромере, замедляется, вследствие чего этот участок реплицируется только непосредственно перед моментом расщепления центромеры во время метафазы.

ХРОМОСОМЫ ТИПА ЛАМПОВЫХ ЩЕТОК

Наиболее важные выводы были сделаны на основании данных по изучению гигантских хромосом, обнаруживаемых в яйцеклетках позвоночных непосредственно перед первым мейотическим делением. На этой стадии

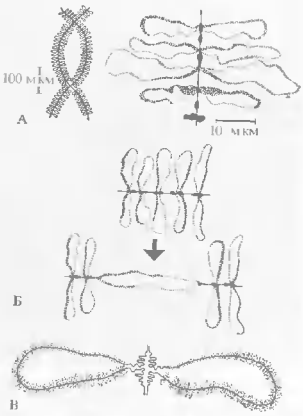


Рис. 17-13. Схематическое изображение хромосом типа ламповых щеток (Gall, Brookhaven Symp. in Biol., 8, 17, 1955).
А. Две гомологичные хромосомы в мейозе (слева) конъюгируют и в месте перекреста образуют хиазмы. На участке основного тела хромосомы (справа) показано, что две морфологически тождественные петли возникают в определенной точке — это свидетельствует о том, что каждая хромосома уже расщепилась на две хроматиды. *Б.* При случайном растягивании хромосомы выявляется непрерывность петли и основного тела хромосомы (ср. с рис. 17-14). *В.* Отдельная пара петель. Показано, как на ДНК синтезируются цепи РНК.

(которая может длиться сотни дней) яйцеклетки синтезируют большую часть мРНК, которая функционирует после оплодотворения на ранних стадиях развития. Во время такого избирательного синтеза хромосомы яйцеклеток находятся в частично уплотненном состоянии, причем большая часть их ДНК упакована в плотные структуры (хромомеры), хотя небольшая доля находится в растянутом состоянии и выступает из основного тела хромосомы в виде чрезвычайно длинных петель (рис. 17-13 и 17-14). Своему внешнему виду они и обязаны названием «ламповые щетки».

Вероятнее всего, одна молекула ДНК тянется непрерывно от одного конца хромосомы до другого. ДНК внутри хромомерных участков неактивна, в то время как области петель представляют собой места активного синтеза РНК. Транскрипция обычно начинается с некоего специфического участка, расположенного вблизи основного тела хромосомы. По мере продвижения молекулы РНК-полимеразы по данной петле образуются все более длинные цепи РНК (рис. 17-15). Таким образом, можно говорить о полярности этих петель. Вскоре после начала транскрипции к растущим цепям РНК прикрепляются специфические белки, и зачастую образуются сферические структуры — рибонуклеопротеидные частицы, связанные с соответствующими петлями. Такие петли можно легко отличить от соседних не только по их характерной длине, но и по типичному внешнему виду рибонуклеопротеидных продуктов.

Тот факт, что столь большое число петель характеризуется строго определенными морфологическими особенностями, позволяет предположить, что каждая петля на самом деле представляет собой отдельную функциональную единицу (ген), содержащую информацию для одного первичного полипептидного продукта. Так, число петель, обнаруживаемых в ламповых щетках яйцеклеток (около 600), позволяет оценить

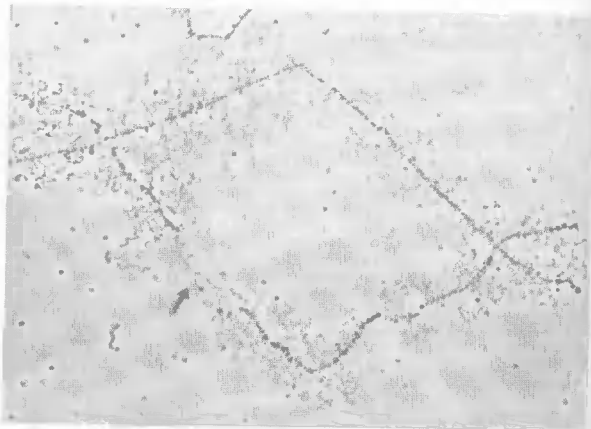


Рис. 17-14. Участок пары сильно растянутых хромосом типа ламповых щеток из яйцеклетки тритона *Triturus viridescens*. (С любезного разрешения д-ра Голда, Йельский университет.) На этой фотографии отчетливо видны две хиазмы; снимок сделан на стадии диплотены мейоза. Стрелкой указан участок, на котором хорошо видно, что каждая из премейотически хромосом является двухцепочечной.

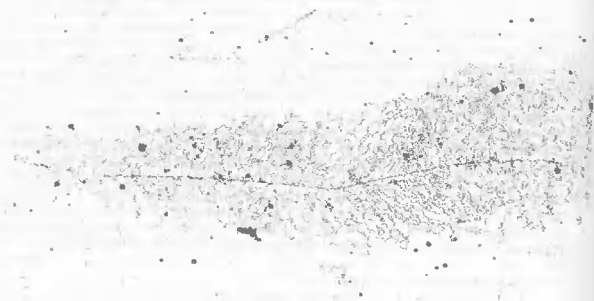
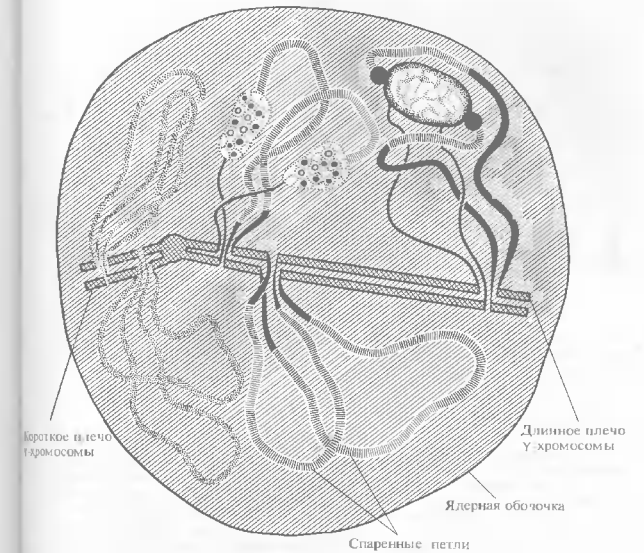


Рис. 17-15. Срез петли хромосомы типа ламповых щеток из клетки *Triturus*. (С любезного разрешения д-ра Миллера и д-ра Бигти, Национальная лаборатория в Окридже.) Виден градиент длины растущих цепей РНК, прикрепленных к ДНК-матрице. Черные точки в местах прикрепления цепей РНК соответствуют молекулам РНК-полимеразы.



17-16. Схематическое изображение участ- Y-хромосомы *Drosophila hydei* во время рматогенеза (внешний вид соответствует ламповых щеток (Hess, Cold Spring Harb. Symp., XXXVIII, 663, 1974). Под световым микроскопом видны петли, каждая из которых характеризуется свойственной только ей морфологией. Возможно, каждая петля представляет собой один ген фертильности.

минимальное число генов, функционирующих при созревании ооцита. В то же время число хромомерных структур, расположенных вдоль оси хромосомы, не может дать сколько-нибудь значительной информации, поскольку мы не располагаем методом, который позволил бы установить, сколько генов находится в свернутом состоянии внутри каждой отдельной хромомеры.

Хромосомы типа ламповых щеток обнаруживаются также в незрелых предшественниках сперматозоидов (сперматоцитах). Здесь, однако, характерную конфигурацию ламповой щетки принимает только половая хромосома Y, в то время как аутосомы и X-хромосомы образуют лишь весьма небольшие петли. В отличие от соматических клеток, где Y-хромосома всегда выглядит сильно уплотненной (гетерохроматиновой), в сперматоцитах она «выпускает» несколько чрезвычайно крупных и морфологически

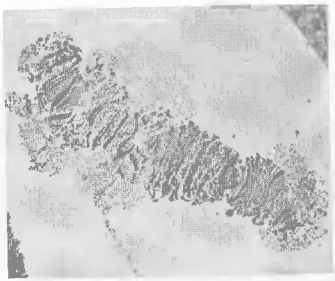


Рис. 17-17. Электронная микрофотография хромосомы 4 из слюнной железы *Chironomus tentans* (Daneholt, Cell, 4, 1, 1975).

различающихся петель. Например, у *Drosophila hydei* можно легко идентифицировать пять различных петель (рис. 17-16), каждая из которых, вероятно, соответствует одному гену фертильности.

ПОЛИТЕННЫЕ ХРОМОСОМЫ

Слюнные железы двукрылых, таких, как *Drosophila* и *Chironomus*, содержат гигантские хромосомы, которые видны даже на стадии интерфазы. Они выглядят полосатыми, что обусловлено чередованием уплотненной хромомерной ДНК и растянутой интерхромомерной ДНК (рис. 17-17). Ширина полос (дисков) варьирует весьма значительно. Некоторые диски настолько тонки, что их едва удается разглядеть, в то время как ширина других составляет несколько процентов от всей длины данной хромосомы. Каждая такая гигантская хромосома состоит из большого числа частично реплицированных хромосом, расположенных бок о бок в виде плотного пучка (политенная хромосома). Они возникают в результате повторяющихся циклов репликации ДНК, не сопровождающейся делением клеток, причем бо́льшая часть участков хромосом реплицируется около 10 раз с образованием примерно 2^{10} копий. Таким способом реплицируется только та ДНК, которая играет генетическую роль; центромерная ДНК остается нереплицированной (рис. 17-18). Для большинства генов синтезируется около 1000 копий, между тем гены, содержащие информацию для рРНК, реплицируются реже, вероятно потому, что в обычной хромосоме (см. стр. 508) они представлены бо́льшим числом тандемов.

Пришлось признать, что выяснить структуру ДНК внутри уплотненных хромомер при помощи электронной микроскопии чрезвычайно трудно. При использовании новейших методов исследования (с удалением большей части хромосомных белков) пришли к выводу, что политенную хромосому следует рассматривать как пучок хромосом типа ламповых щеток, уложенных бок о бок, в которых плотно упакованные гомологичные петли выглядят как диски (рис. 17-18). Что заставляет эти петли занимать строго определенное положение относительно друг друга, остается до сих пор непонятным.

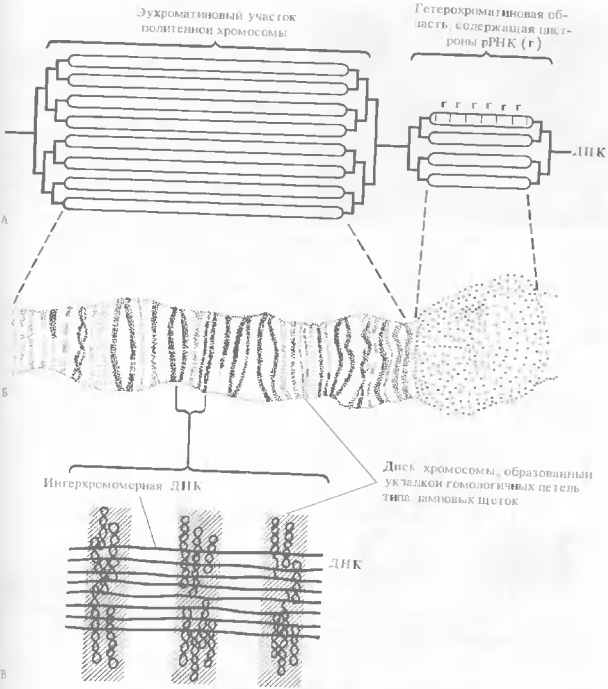


Рис. 17-18. *А*. Схема, показывающая предполагаемое устройство типичной политенной хромосомы из клетки слюнной железы двукрылых, изображенной ниже (*Б*). ДНК, содержащая генетическую информацию, реплицируется до тысячи раз (*А*), в то время как гетерохроматиновая область, содержащая рРНК, имеет существенно меньшее число копий. *В*. Картина хромомерных дисков различимых на таких хромосомах, появляется в результате параллельной укладки в копиях ДНК многочисленных петель гомологичных хромосом типа ламповых щеток

ОБРАЗОВАНИЕ ПУФФОВ

Данные радиоавтографии с использованием радиоактивных предшественников РНК показали, что внутри дисков синтезируется очень мало РНК, следовательно, генетически функциональная ДНК, плотно уложенная

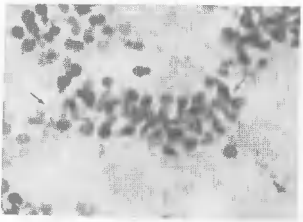


Рис. 17-19. Электронная микрофотография участка петли внутри кольца Бальбиани 2 хромосомы 2 в клетке слюнной железы *Chironomus tentans* (Daneholt, Cell, 4, 1, 1975). Видны сферические гранулы рибонуклеопротеида, прикрепленные «ножками» к тонкому хроматиновому волокну (показано стрелкой). Почти одновременно с синтезом РНК к растущим цепям прикрепляются специфические белки, что приводит к образованию рибонуклеопротеидных гранул. Их форма отражает вторичную структуру входящих в их состав цепей РНК.

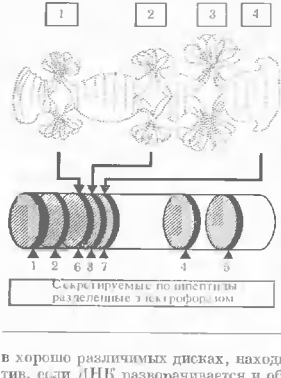


Рис. 17-20. Соответствие специфических генных продуктов (полипептиды слюнного секрета) областям активной транскрипции РНК в кольцах Бальбиани, или хромосомных пуффах, на хромосоме 4 клеток слюнной железы *Chironomus*.

в хорошо различимых дисках, находится в неактивном состоянии. Напротив, если ДНК разворачивается и образует петли, подобные тем, которые обнаруживаются в хромосомах типа ламповых щеток, она приобретает способность транскрибироваться с образованием цепей РНК (рис. 17-19). Группы открытых петель, различимые на политенных хромосомах, называют *пуффами*; чем крупнее они по размеру и чем более разрыхлен в них материал, тем выше в них скорость транскрипции. Весьма вероятно, что локализация пуффов не остается строго постоянной в ходе эмбриогенеза; показано, что отдельные гены функционируют лишь на определенных стадиях развития.

К числу наиболее хорошо изученных пуффов принадлежат пуффы комара *Chironomus*, слюнные железы которого синтезируют и секретируют структурные белки, используемые личинками для образования шелковой нити. Все семь основных секреторных полипептидов характеризуются относительно высокими мол. весами, лежащими в диапазоне от $1{,}5 \cdot 10^5$

до $5 \cdot 10^5$; некоторые из них уже удалось связать с наиболее крупными пуффами, которые называют кольцами Бальбиани (рис. 17-20). Эти особые пуффы транскрибируются приблизительно в 100 раз быстрее, чем обычные,— скорее всего для производства мРНК, требуемой в качестве матрицы для огромных количеств белков типа фиброина, которые необходимы личинкам и куколкам насекомого.

ЧИСЛО ГЕНОВ ДРОЗОФИЛЫ СООТВЕТСТВУЕТ ЧИСЛУ ДИСКОВ В ХРОМОСОМАХ СЛЮННОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Диски в хромосомах слюнных желез были впервые обнаружены в 30-х годах, и тогда думали, что они представляют собой индивидуальные гены, следовательно, число дисков должно было равняться числу генов. При таком допущении пришли к выводу, что у дрозофилы немногим более 5000 генов. Однако эти рассуждения были поставлены под сомнение, когда стало возможно измерять количество ДНК внутри каждого из дисков. Как выяснилось, в среднем диск содержит около 30 000 пар оснований, что по меньшей мере в 20 раз больше того количества, которое необходимо для кодирования полипептидной цепи среднего размера.

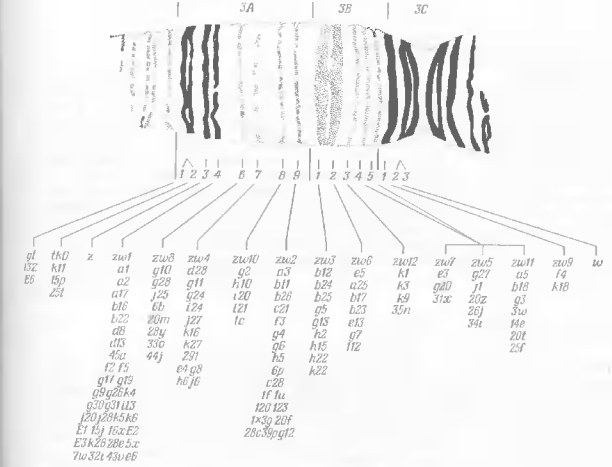


Рис. 17-21. Соответствие отдельных дисков группам комплементации в области 3A1-3C3 хромосомы *Drosophila melanogaster* (Judd et al., Genetics, **71**, 139, 1972).

Тогда было предложено другое объяснение, согласно которому каждый диск аналогичен большому бактериальному оперону, такому, например, как гистидиновый оперон, содержащему информацию приблизительно для 10 разных, но функционально родственных белков. Однако недавно полученные данные генетического анализа делают гипотезу о соответствии каждого диска большому оперону весьма маловероятной. Например, подробное генетическое картирование области 3A1-3C8 (15 дисков) Х-хромосомы *Drosophila melanogaster* выявило 18 групп комплементации (генов) (рис. 17-21). В настоящее время большинство групп комплементации можно связать с отдельными дисками и, принимая во внимание неоднозначность при разграничении дисков, слишком тесно примыкающих друг к другу, можно полагать, что каждый диск в данной области содержит информацию только для одной функциональной единицы. Аналогичным образом картирование очень мелкой хромосомы 4 дрозофилы позволяет различать 43 функциональные группы, в то время как соответствующий цитологический анализ выявляет самое меньшее 33 и самое большее 50 отдельных дисков. Таким образом, либо большинство белков дрозофилы характеризуется необычайно крупными размерами, либо большая часть ДНК внутри данного гена не содержит информации для аминокислотных последовательностей. То же самое, по-видимому, можно сказать и о генах, содержащихся в хромосомах типа ламповых щеток ооцита. Минимальная длина ДНК, находящейся в петлях, составляет 10—40 мкм, что намного превосходит ту, которая требовалась бы для кодирования белка среднего размера.

ЧРЕЗВЫЧАЙНО ПРОТЯЖЕННЫЕ ПРОДУКТЫ ТРАНСКРИПЦИИ ОТДЕЛЬНЫХ ХРОМОМЕР (ГЕНОВ)

Обычно вся ДНК, входящая в состав одной петли ламповой щетки или политенной хромосомы, транскрибируется с образованием одной цепи РНК. Необычайно большую длину таких продуктов легко заметить на электронных микрофотографиях петель ламповых щеток (рис. 17-15) или выявить косвенным способом — при ультрацентрифугировании они осаждаются очень быстро. Насколько известно в настоящему моменту, почти вся мРНК многоклеточных эукариотов исходно существует как часть таких чрезвычайно крупных молекул. Размеры первичных транскриптов существенно варьируют (от 5000 до 50 000 нуклеотидов), что зависит от длины соответствующих петель хромосомы. Поскольку сейчас уже известно, что они представляют собой предшественники матричных РНК, их следует называть пре-мРНК.

ПРЕВРАЩЕНИЕ ПРЕ-мРНК В мРНК

Пре-мРНК находится в ядре крайне недолго, так как быстро распадается на более мелкие молекулы. Каждая молекула пре-мРНК обычно дает начало только одной молекуле мРНК, причем большая часть цепи про-мРНК подвергается ферментативному расщеплению до свободных нуклеотидов. Область РНК, остающаяся нетронутой, всегда расположена на 3′-конце и, следовательно, представляет собой тот участок данной молекулы пре-мРНК, который синтезируется последним (рис. 17-22).

Почему ферментативному расщеплению не подвергается только область, примыкающая к 3′-концу, неизвестно. Можно думать, что она защищена благодаря связыванию с какими-то специфическими белками. Однако возможно, что ответ не столь прост, поскольку получены данные, согласно которым участки пре-мРНК, подвергающиеся быстрому распаду,

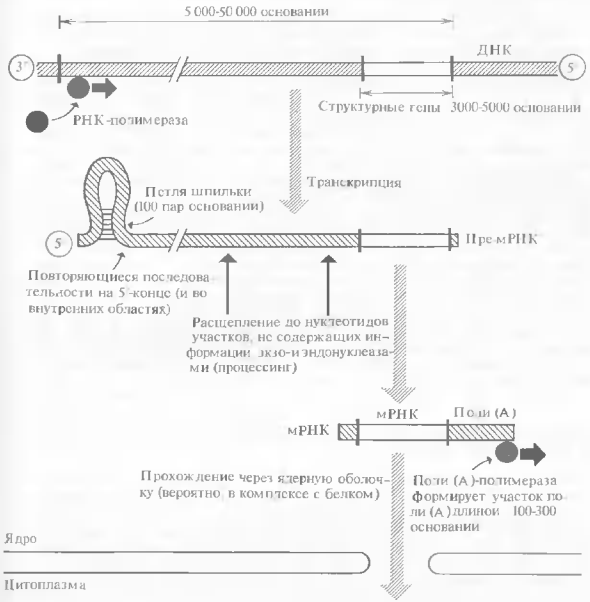


Рис. 17-22. Упрощенная схема, показывающая основные стадии транскрипции мРНК в эукариотических клетках.

также вступают в комплекс с белком сразу же после синтеза. Маловероятно также, что защита обеспечивается протяженными участками поли(А) длиной в 200 нуклеотидов, присоединяющимися уже после транскрипции к тем молекулам мРНК, которые предназначены для транспорта в цитоплазму (стр. 464). Гистоновая мРНК не содержит присоединенных участков поли(А), но функционирует в других отношениях абсолютно нормально.

В среднем та часть молекулы пре-мРНК, которая в конечном счете достигает цитоплазмы, обычно составляет менее 10% всей длины (рис. 17-22), что заставляет задуматься о том, для чего предназначены огромные последовательности нуклеотидов быстро разрушаемой РНК.

Большинство таких последовательностей уникально и не обнаруживается в пре-мРНК других видов.

Между этими на первый взгляд случайно расположенными последовательностями находятся повторяющиеся участки, обнаруживаемые во многих пре-мРНК разных видов. Такие повторяющиеся последовательности, которые составляют до 20% длины данной молекулы пре-мРНК, имеют протяженность приблизительно в 300—500 оснований и встречаются не только на 5′-конце, но также и внутри цепей пре-мРНК; в самых крупных молекулах пре-мРНК они, по-видимому, повторяются много раз. Число эквивалентов ДНК данной повторяющейся последовательности пре-мРНК варьирует в клетках в широких пределах: некоторые из них представлены только 20—100 раз, а другие обнаруживаются много тысяч раз. Весьма заманчиво считать эти последовательности, общие для многих 5′(промоторных)-концов, ответственными за некую регуляторную функцию, которая модулирует координированное выражение нескольких функционально родственных генов. Почему повторяющиеся последовательности помимо концов располагаются также и внутри молекулы РНК, в настоящее время трудно понять даже теоретически. Некоторые из них состоят из инвертированных палиндромных последовательностей, которые самопроизвольно образуют стабильные шпильки длиной до 100 пар оснований (рис. 17-22). В среднем каждая молекула пре-мРНК содержит одну такую шпильку, так что можно думать о некой обязательной роли этих структур. Высказываются догадки по поводу их возможного расположения по соседству с 5′-концом мРНК, и поэтому предполагают, что они отщепляются во время процессинга.

ОДИНОЧНЫЕ КОПИИ ГЕНОВ ГЕМОГЛОБИНА В ГАПЛОИДНОМ НАБОРЕ

Число гибридных молекул ДНК — РНК, образующихся при смешивании очищенных молекул мРНК с клеточной ДНК, позволяет оценить, сколько раз данный ген представлен в гаплоидном наборе генов. Такие измерения стали возможными недавно после выделения молекул специфических мРНК из клеток, избирательно синтезирующих те или иные белки. В частности, в таких опытах была использована молекула мРНК с константой седиментации около 9S, которая содержит информацию для нескольких полипептидов приблизительно одинакового размера, обнаруживаемых в гемоглобинах различных видов. Удалось показать, что в гаплоидном наборе хромосом присутствует только одна копия каждого из соответствующих гемоглобиновых генов. Этот вывод касается не только яйцеклетки и сперматозоида, но также и клеток (эритробластов), специализирующихся почти исключительно на синтезе гемоглобина. Сходным образом и ген, содержащий информацию для белка тутового шелкопряда — фиброина, представлен в гаплоидном наборе всего одной копией даже в клетках шелкоотделительной железы. Эти примеры вряд ли являются исключительными, скорее всего большинство генов способно транскрибироваться с такими огромными скоростями, что достаточно одной-единственной копии.

МНОЖЕСТВЕННЫЕ КОПИИ ГИСТОНОВЫХ ГЕНОВ

Однако для продукции огромных количеств молекул гистоновых мРНК, требуемых в период дроблений на ранних стадиях эмбриогенеза, одной копии каждого из гистоновых генов недостаточно. Необычайно высокая скорость синтеза ДНК обусловливает огромную потребность в новосинте-

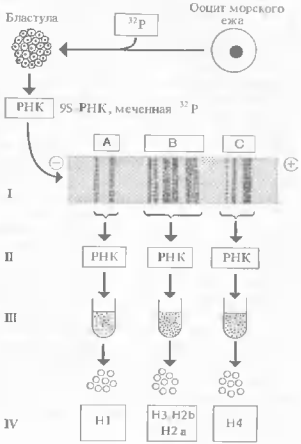


Рис. 17-23. Схема эксперимента, показавшего, что молекулы 9S- мРНК в зародыше морского ежа кодируют в основном огромное число молекул гистонов, необходимых для процесса дробления.
9S мРНК фракционировали методом электрофореза в полиакриламидном геле. *I*. Электрофореза. *II*. РНК экстрагируют из геля. *III*. РНК инкубируют в бесклеточной системе синтеза белка. *IV*. Синтезированные гистоны.

зированных гистонах. Так, при дроблениях практически все молекулы мРНК с константой седиментации около 9S являются гистон-специфическими. При помощи электрофореза в полиакриламидном геле эти гистоновые мРНК можно разделить на три фракции (рис. 17-23). Наиболее быстро движущаяся фракция содержит информацию для гистона H4 — самого мелкого из всех гистонов; в гетерогенную группу, содержащую молекулы средних размеров, входят мРНК, кодирующие гистоны H3, H2b и H2a; наиболее медленно мигрирующая фракция содержит информацию для самого крупного гистона — H1. ДНК-эквивалент каждого из этих видов мРНК повторяется в гаплоидном наборе от 250 до 500 раз.

ВЫСОКОПОВТОРЯЮЩИЕСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК РАСПОЛАГАЮТСЯ ВБЛИЗИ ЦЕНТРОМЕРЫ

Область хромосомы, примыкающая к центромере, состоит из чрезвычайно протяженных блоков *высокоповторяющейся ДНК*, в которых очень простые последовательности повторяются сотни, если не тысячи раз. Во многих случаях эти простые повторяющиеся последовательности существенно отличаются по составу оснований от остальной части ДНК, и потому их легко выделить при помощи центрифугирования в градиенте концентрации CsCl. ДНК, полученную таким способом, называют *сателлитной* ДНК (или сателлитом). Зачастую в данном виде существует несколько различных сателлитов центромерного происхождения. У трех различных сателлитов, выделенных из *Drosophila virilis*, последовательности оказались

весьма сходными. В одной из них основной единицей повтора является последовательность $^{5'}$АЦААЦТ$^{3'}$, в двух других — $^{5'}$АТААЦТ$^{3'}$ и $^{5'}$АЦААТТ$^{3'}$ соответственно. Почему некоторые последовательности имеют тенденцию к повторению, неясно. Поскольку блоки, состоящие из таких последовательностей, обычно расположены вблизи центромерной области более чем в одной хромосоме, ни один из этих сателлитов не является абсолютно чистым повтором одной основной последовательности. Случайным образом в каждом из них представлены и другие основания, скорее всего попавшие туда в результате мутаций. Часто сателлиты, присутствующие в одном виде, не обнаруживаются у близкородственного вида. Однако обычно такие отличия не имеют особого значения, так как они могут возникать из-за изменения всего лишь в одном основании повторяющейся единицы; иногда плотность соответствующего сателлита при этом настолько меняется, что становится очень близкой к плотности остальной части ДНК. У дрозофилы сообщество довольно простых повторяющихся последовательностей составляет примерно 25% всей ДНК, а у большинства высших эукариотов такая ДНК занимает от 10 до 20% генома. Она никогда не транскрибируется, вероятнее всего потому, что ее ограниченные нуклеотидные последовательности не содержат промоторных участков, на которых РНК-полимераза могла бы начать синтез цепей РНК. Вместе с тем эта ДНК должна содержать нуклеотидные последовательности, которые узнают ДНК-полимеразу, поскольку центромерная ДНК реплицируется так же быстро, как и ДНК с уникальной (неповторяющейся) последовательностью на ранних стадиях дробления. Каждый фрагмент ДНК из 3000 пар оснований включает, однако, всего одну такую последовательность, и потому в настоящее время их нельзя выявить при помощи существующих методов определения нуклеотидной последовательности.

РАЗЛИЧИЯ В КОЛИЧЕСТВЕ ДНК МЕЖДУ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫМИ ВИДАМИ

Когда стала понятной кодирующая роль ДНК, высказывалась точка зрения, что по мере продвижения от простых организмов к более сложным количество ДНК на гаплоидный геном должно возрастать пропорционально повышению истинной биохимической сложности. Однако это наблюдается вовсе не всегда. Действительно, высшие растения и животные содержат гораздо больше ДНК, чем низшие организмы (рис. 17-1). Но кто бы мог предвидеть, что у некоторых видов рыб и земноводных обнаружится в 25 раз больше ДНК, чем у любого из видов млекопитающих! И чем больше изучали видов животных и растений, тем чаще выяснялось, что близкородственные виды могут отличаться по содержанию ДНК в пять, а то и в десять раз (рис. 17-24).

Эти различия обычно обусловлены не увеличением числа хромосом, а повышением содержания ДНК в одной хромосоме. При этом количество простых последовательностей, повторяющихся не слишком часто, и количество ДНК с уникальной последовательностью иногда возрастает примерно пропорционально. Однако детального исследования ДНК во фракциях, которыми отличаются определенные виды, до сих пор не проводилось. К примеру, мы не знаем, будет ли в геноме саламандры рода *Necturus* (для клеток которых характерно количество ДНК, в 25 раз большее, чем у жабы) всего лишь по одной копии гена гемоглобинов разных типов. Тот факт, что хромосомы саламандры имеют пропорционально повышенное содержание петель, позволяет предполагать, что это не так; однако до тех пор, пока не будет получено убедительных доказательств, феномен резких сдвигов в общем размере хромосом останется совершенно загадочным.

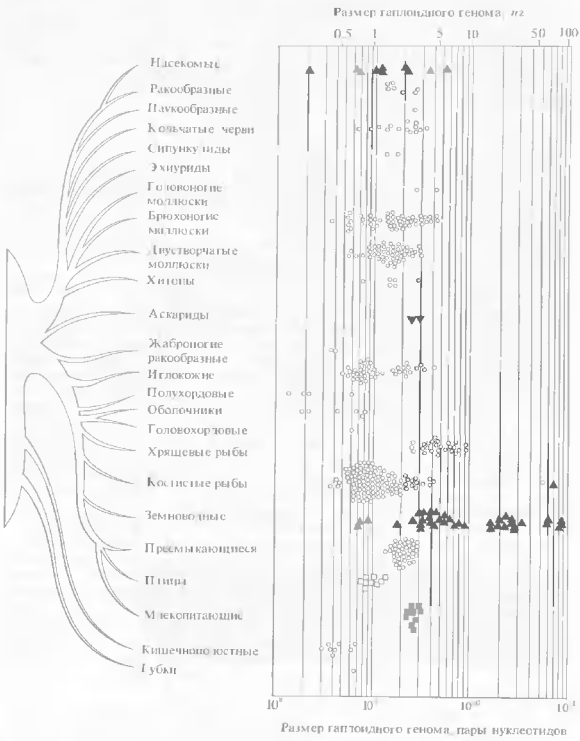


Рис. 17-24. Различия в размерах геномов у представителей эволюционно близких групп животных (Britten, Davidson, Quant. Rev. Biol., 46, 111, 1971).

В настоящее время единственным ключом к решению проблемы мог бы служить тот факт, что у близкородственных растений, где содержание ДНК может различаться до десяти раз, количество ДНК коррелирует со сроком жизни. Меньшие величины характерны для короткоживущих однолетних растений, жизненный цикл которых составляет всего лишь

10—20 дней, в то время как их многолетние «родственники» обычно имеют более высокое содержание ДНК. Можно думать, что некоторые петли имеют функцию определения некоторых временных характеристик. Например, введение приблизительно 100 000 пар оснований между 5′- и 3′-концами молекулы пре-мРНК приводит к тому, что при 25 °С должно пройти 50 мин, прежде чем движущаяся по цепи ДНК РНК полимераза сможет синтезировать требуемый мРНК-продукт.

ЯДЕРНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ СИНТЕЗА рРНК

Все эукариоты содержат по меньшей мере 50, а иногда и до 1000 идентичных копий генов, кодирующих рРНК. Они всегда расположены в виде тандемов в больших блоках ДНК, локализующихся в одной или нескольких определенных хромосомах (рис. 17-23). Такая ДНК обычно выступает из основной массы хромосомных волокон в виде сильно вытянутых петель, причем петли взаимодействуют со специфическими белками и образуют ядрышки. Некоторые организмы характеризуются наличием одного ядрышка на гаплоидный геном, а другие — несколькими. В любом случае, однако, ядрышки прикреплены к определенным участкам хромосом. Внутри каждого ядрышка гены рРНК, расположенные тандемами (попарно друг за другом; каждый ген имеет мол. вес $\sim 8 \cdot 10^6$), транскрибируются порознь с образованием молекул пре-мРНК, имеющих константу седиментации 45S и характеризующихся мол. весом $\sim 4 \cdot 10^6$. Эти 45S-молекулы представляют собой предшественники 28S- и 18S-цепей рРНК, обнаруживаемых во всех эукариотических рибосомах (рис. 17-26). После освобождения с ДНК-матрицы 45S-молекула проходит несколько этапов расщепления (рис. 17-25), в результате чего образуются рРНК, присутствующие в составе рибосом. Удивительно, что почти половина исходного 45S-предшественника не входит в состав рРНК. Отбрасываемые фракции под действием внутриклеточных нуклеаз расщепляются до нуклеотидов.

Внутри ядрышек 28S-цепи взаимодействуют с новосинтезированными рибосомными белками, в результате чего образуются большие 60S-субчастицы рибосом. Синтез рибосомных белков идет не в ядрышках, более того, вообще не в ядре. Он происходит на цитоплазматических полисомах, а затем белки каким-то образом транспортируются в ядрышки. В отличие от больших субчастиц малые 40S-субчастицы эукариотических рибосом проходят сборку не в ядрышке. Где они образуются — в других частях ядра или в цитоплазме, остается выяснить. Неизвестна также форма, в которой мРНК достигает цитоплазмы: в виде свободной мРНК, или в комплексе с 40S-субчастицами рибосом, или, может быть, в комплексе с другими, еще не открытыми белками, основной функцией которых является транспорт мРНК из ядра в цитоплазму.

Каждый ген рРНК отделен от своего партнера по тандему нетранскрибируемой спейсерной (от англ. spacer — разделитель) ДНК строго определенной длины, которая может достигать размеров соседних генов. У данного вида организма последовательности спейсерной ДНК в разных частях генома похожи; в то же время у близкородственных организмов степень их гомологии может быть крайне низкой — это говорит о том, что в отношении определенной последовательности спейсерной ДНК давление отбора, по-видимому, отсутствует. Часто наблюдаемое сходство спейсерной ДНК в разных областях генома у одного и того же вида организма, вероятно, связано с неким, пока еще непонятным механизмом, который ответствен за надежное поддержание тождественности нуклеотидных последовательностей во всех генах рРНК данного вида.

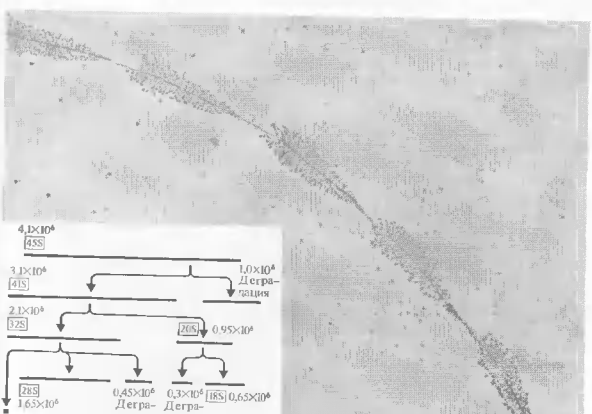


Рис. 17-25. Тандемная укладка генов ядрышковой рРНК в клетках *Triturus viridescens*. (С любезного разрешения д-ра Миллера и д-ра Битти, Национальная лаборатория в Окридже.)

Видны растущие цепи 45S-предшественников рРНК. В левой нижней части рисунка изображены последовательные стадии превращения 45S-молекулы в зрелые молекулы рРНК млекопитающих.

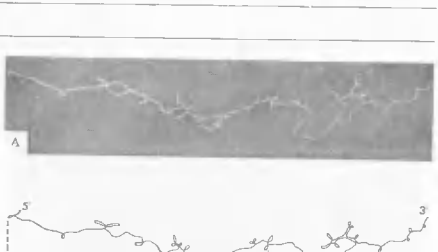


Рис. 17-26. *А*. Электронная микрофотография молекулы 45S-пре-рРНК, растянутой в 80%-ном растворе формамида в присутствии мочевины (4М, для сохранения более устойчивых цепей). *Б*. Схематическое воспроизведение фотографии *А*; указаны области, которые в дальнейшем становятся 28S- и 18S-РНК (Wellauer, David, Cold Spring Harbor Symp., XXXVIII, 325, 1974).

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ УМНОЖЕНИЕ ГЕНОВ рРНК В ООЦИТАХ

Число генов рРНК в ооцитах позвоночных в 100, а то и в 1000 раз превосходит их содержание в других клетках позвоночных. Однако этот избыток ДНК обусловлен не увеличением числа хромосом в результате тетраплоидии, характерной для ооцитов перед первым мейотическим делением,— он связан прежде всего с возникновением огромного числа внехромосомных ядрышек. Каждое из них содержит одну кольцевую молекулу ДНК длиной от 20 до 1000 мкм, в которой находятся многочисленные гены рРНК, уложенные в виде тандемов — один ген рРНК содержит информацию для 45S-предшественника рРНК. На рис. 17-27 показана особенно наглядная электронная микрофотография одного из таких внехромосомных ядрышек, к которому прикреплено более 1000 молекул растущего предшественника рРНК.

Колоссальное число внехромосомных ядрышек, содержащих кольцевую ДНК, требуется для производства рибонуклеиновых компонентов рибосом, которые обнаруживаются в ооцитах — самых крупных из всех клеток — в несметных количествах. Все рибосомы, присутствующие в клетках до стадии гаструляции, синтезируются в яйцеклетках до оплодотворения. В процессе роста яйцеклетки лягушки примерно за несколько недель в ней должно синтезироваться $\sim 10^{12}$ рибосом. Число генов рРНК в хромосомах яйцеклетки, однако, отражает потребность обычной соматической клетки лягушки, которая в 10^5 раз меньше, чем яйцеклетка того же вида. Следовательно, биологически приемлемой скорости роста ооцита можно достичь только путем интенсивной амплификации рДНК.

Большая часть ядрышковых колец ДНК в зрелых яйцеклетках возникает благодаря механизму катящегося кольца (стр. 226) из предварительно образовавшихся кольцевых молекул (рис. 17-28). Однако до сих пор остается неясным происхождение первых внехромосомных ядрышек. Генетические данные, полученные на гибридных лягушках, свидетельствуют о том, что эти ядрышки не являются продуктами внехромосомных генов рРНК, а скорее всего образуются каким-то образом из кластеров (скоплений) хромосомных генов рРНК. Можно думать, что они возникают вследствие кроссинговера, т. е. по механизму, сходному с механизмом исключения профага λ из хромосомы *E. coli*. Однако такая схема подразумевает, что в дальнейшем рДНК должна снова включаться в хромосомы,

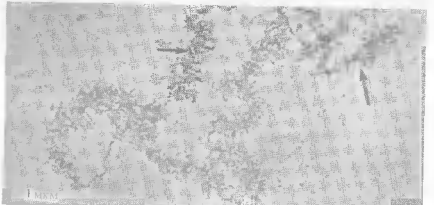


Рис. 17-27. Электронная микрофотография, позволяющая различить сердцевину внехромосомного ядрышка в яйцеклетке африканской шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. (С любезного разрешения д-ра Миллера и д-ра Бэтти, Национальная лаборатория в Оук-Ридже.) В сердцевине содержится 10 генов рРНК, уложенных тандемами в кольцевой молекуле ДНК. Стрелками указаны отдельные гены.

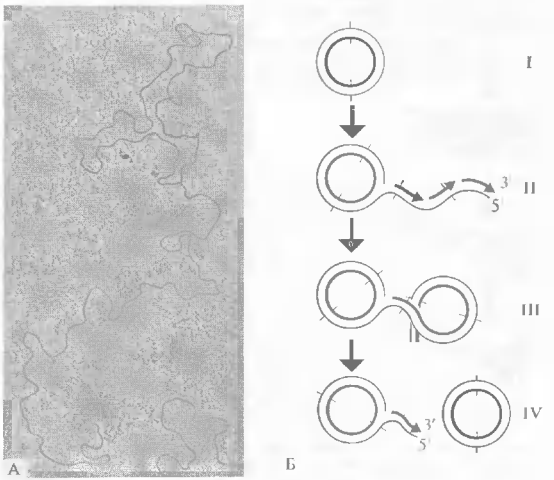


Рис. 17-28. *А*. Электронная микрофотография молекулы рДНК (соответствующей структуре, рассматриваемой в модели катящегося кольца) из яйцеклетки *Xenopus laevis*. Длина окружности кольца матрицы равна трем генам рРНК, а хвоста — 3,4 гена (Hourcade et al., Cold Spring Harbor Symp., XXXVIII, 537, 1974). *Б*. Амплификация рибосомной ДНК из внехромосомного ядрышка при помощи механизма катящегося кольца. (Ср. с рис. 9-20.) *I*. Разрыв в одной из цепей кольцевой ДНК. *II*. Промежуточный продукт — катящееся кольцо. *III*. Кроссинговер в хвостовой части структуры. *IV*. Катящееся кольцо и интактное кольцо.

чтобы число хромосомных генов рРНК оставалось относительно постоянным. Другим объяснением происхождения первых ядрышек может служить образование специфических одноцепочечных отрезков в хромосомной рДНК под действием определенных ферментов, что приводит к вытеснению длинных одноцепочечных участков. Такие вытесненные цепи могут затем превращаться в двухцепочечные кольца с помощью механизма катящегося кольца (рис. 17-28). Эту гипотезу можно будет считать справедливой только после того, как удастся получить такие кольца в экстрактах ооцитов in vitro.

ГЕНЫ 5S-РНК ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ ХАРАКТЕРИЗУЮТСЯ МНОЖЕСТВЕННОЙ ТЕЛЕЦЕНТРИЧЕСКОЙ ЛОКАЛИЗАЦИЕЙ

В отличие от 18S- и 28S-рРНК, которые кодируются одним или несколькими блоками генов, 5S-РНК, входящая в состав рибосом шпорцевой лягушки, кодируется генами, расположенными почти в каждой хромо-

Рис. 17-29. Схема опыта, показывающего, что множественные копии генов 5S-РНК расположены в теломерной области (или вблизи от нее) длинных плеч большинства хромосом в клетках *Xenopus*. Меченые копии гена 5S-РНК (указаны на рисунке) или 5S-РНК, меченной in vivo, гибридизуют с денатурированной ДНК хромосом и выявляют с помощью радиоавтографии. *А*. Меченые копии 5S-РНК, транскрибированные на ДНК in vitro. *Б*. Хромосома, денатурированная NaOH, инкубируется с меченой РНК. *В*. На радиоавтографе выявляется меченая РНК, гибридизовавшаяся с концами длинных плеч хромосомы.

соме. Более того, существует два различных набора генов 5S-РНК (5S-ДНК), причем один из них содержит информацию для 5S-РНК яйцеклеток, а другой — для 5S-РНК соматических клеток. Длина цепи у обоих видов 5S-РНК абсолютно одинакова, и из 120 нуклеотидов, входящих в их состав, отличаются только 8. Но если число копий соматической 5S-ДНК составляет всего лишь около 450, то 5S-ДНК яйцеклетки представлена примерно 24 000 копий. Поэтому во время оогенеза не требуется внехромосомной амплификации 5S-ДНК. В этом случае, наоборот, действует некий регуляторный механизм, который включает функционирование большого набора тех генов, которые необходимы для синтеза рибосом яйцеклетки. До сих пор загадочной остается локализация 5S-ДНК в хромосомах. Эта ДНК обоих типов сосредоточена в виде кластеров на концах (теломерах) длинных плеч многих, если не всех хромосом лягушки (рис. 17-29).

У *Drosophila melanogaster* все гены 5S-РНК располагаются во внутренних областях той же хромосомы, которая содержит гены рРНК. Почему между лягушкой и дрозофилой существуют столь существенные различия, выяснить довольно трудно.

СКОПЛЕНИЯ ГЕНОВ СПЕЦИФИЧЕСКИХ тРНК

Гены, содержащие информацию для разных видов тРНК лягушки, также представлены многочисленными повторами, причем гены, кодирующие один и тот же вид тРНК, образуют кластеры, в которых они располагаются тандемами,— эти кластеры представляют собой протяженные блоки тДНК. В каждом гаплоидном геноме имеется около 8000 генов тРНК, т. е. в среднем по 140 генов для каждого из 56 выявленных к настоящему моменту основных видов тРНК. К примеру, ген одного вида тРНК^{Met}

представлен приблизительно 330 копиями, а ген другого вида — 170 копиями. Спейсерная ДНК, по-видимому, отделяет каждый ген тРНК от его тандемного соседа, причем длина спейсерной области может примерно в 10 раз превышать длину каждого из соседних генов тРНК. Локализуются ли все гены тРНК данного вида в единственном кластере, неизвестно. Не знаем мы также и того, располагаются ли кластеры, соответствующие разным видам тРНК, в одной или разных хромосомах.

АМПЛИФИКАЦИЯ ГЕНА КАК МЕХАНИЗМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ВЫРАЖЕНИЯ

Когда открыли внехромосомную амплификацию рДНК ооцитов, стали усиленно обсуждать вопрос о том, что аналогичные явления, возможно, играют важную роль в процессе дифференцировки. Масла в огонь подлило сообщение о том, что у мух семейства Sciaridae на определенных стадиях развития не только увеличивается количество ДНК в некоторых политенных дисках, но, что еще важнее, большая часть новосинтезированного генетического материала отделяется от той хромосомы, в которой располагался исходный материал. Кто-то в то времена даже предсказывал, что ожидается лавина сообщений об амплификации специфических генов. Однако теперь, по прошествии почти десяти лет, мы, напротив, изумляемся тому, что гены гемоглобина и фиброина представлены в гаплоидном наборе единственной копией. Эти исключительные в своем роде данные отражают тот факт, что конечный уровень белкового синтеза является результатом двух уровней амплификации: на первом уровне данный ген много раз транскрибируется, в результате чего образуется колоссальное количество мРНК, а на втором молекулы мРНК в свою очередь действуют в качестве матриц для многочисленных циклов белкового синтеза. К примеру, один ген фиброина в течение 4 дней может «породить» около 100 000 молекул фиброиновой мРНК, которые в свою очередь служат основой для синтеза приблизительно 10^{10} молекул фиброина.

Однако, когда транскрибируется рДНК, цепи рРНК являются конечными продуктами синтеза и дальнейшего усиления ее активности не происходит. Это и определяет наличие огромного числа копий рДНК в соматических клетках и потребность во внехромосомной амплификации во время развития яйцеклетки.

ВРЕМЯ ЖИЗНИ ПОЛИСОМ В БЫСТРО ДЕЛЯЩИХСЯ КЛЕТКАХ

По сравнению с тем, что мы знаем о бактериальных мРНК, сведения о времени жизни функционирующих мРНК в клетках высших организмов весьма скудны. Многие из них характеризуются ограниченным временем жизни, и проведенная оценка позволяет заключить, что среднее время жизни для мРНК в быстро растущих клетках позвоночных, которые делятся примерно раз в сутки, составляет около 3 ч. Если эта величина верна, то относительное время жизни этих мРНК не столь уж разительно отличается от той же характеристики большинства бактериальных мРНК, которые «оборачиваются» в течение жизненного цикла примерно 10 раз.

В НЕДЕЛЯЩИХСЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ СУЩЕСТВУЮТ СТАБИЛЬНЫЕ мРНК

Кажется все более правдоподобным, что большая часть мРНК высокодифференцированных клеток высших животных метаболически стабильна. Эритробласты (незрелые клетки эритроидного ряда) являются в этом

смысле хорошим примером. Когда в этих клетках идет интенсивное образование основного белка — гемоглобина, в них практически не образуется РНК. Если бы происходил быстрый синтез и распад молекул мРНК, можно было бы выявить включение предшественников РНК в РНК; между тем такое включение зарегистрировать не удалось. Такая стабильность мРНК имеет явные преимущества, в особенности если принять во внимание постоянные условия окружающей среды, что характерно для эритробластов, в отличие от сильно изменяющихся условий роста бактерий. Именно поэтому в случае эритробластов отпадает потребность в большой гибкости механизмов приспособления. Эритробласты предназначены производить в основном (более 90%) гемоглобин. Нет нужды способствовать распаду цепей гемоглобиновых мРНК только затем, чтобы потом снова синтезировать их. Сходным образом большая часть мРНК, обнаруживаемой в клетках печени взрослых особей, ответственна за синтез белков плазмы, которые должны поступать в систему кровообращения. Соответственно и большая часть цитоплазматических мРНК в клетках печени является относительно стабильной. Однако медленный их оборот все-таки существует; при этом не только мРНК, но и сами рибосомы, по-видимому, подвергаются распаду. Недавно было оценено время жизни рибосом — оно оказалось равным приблизительно 100 ч, что намного меньше среднего времени жизни клеток, равного примерно 100 дням. Почему и как происходят процессы распада, отыскать пока трудно. Особенно загадочен распад рРНК. Если это явление и наблюдается у бактерий, так только в случае ухудшения питательных характеристик окружающей среды. Между тем в клетках печени, насколько известно, распад рРНК происходит при вполне нормальных условиях развития клеток.

НА ЯДЕРНОМ УРОВНЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ОБЫЧНО НЕ ЯВЛЯЕТСЯ НЕОБРАТИМОЙ

Опыты по пересадке ядер позволяют получить надежные данные, противоречащие представлению о том, что изменения в ядре (например, образование внехромосомной ДНК) приводят к необратимой дифференцировке клеток и установлению специализированного избирательного синтеза ограниченного набора генных продуктов. В этих опытах диплоидные ядра из дифференцированных клеток пересаживали в неоплодотворенные яйцеклетки, из которых предварительно удаляли гаплоидные ядра. Образующиеся в результате такой операции генетически полноценные диплоидные яйцеклетки заставляли путем определенных воздействий делиться и расти, причем часто образовывался взрослый организм, хромосомный аппарат которого вел свое происхождение только от ядер-доноров и формировался путем клональной репродукции (рис. 17-30). До сих пор лягушка является наиболее сложным организмом, для которого удалось осуществить клональную репродукцию после пересадки ядра. Успех в этом случае обязан во многом очень большим размерам яйцеклетки земноводных, благодаря чему можно проводить микрохирургическое удаление материнского ядра. В конечном счете, однако, есть надежда получить положительные результаты практически для всех позвоночных, в отношении которых эта цель заслуживает осуществления.

НЕОБРАТИМАЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА СОПРОВОЖДАЕТСЯ УТРАТОЙ СПОСОБНОСТИ К ДЕЛЕНИЮ

Многие клетки содержат ядра, которые в нормальных условиях никогда не будут делиться снова. Часто это касается случаев далеко зашедшей дифференцировки, когда в основном общий синтез направлен на производ-

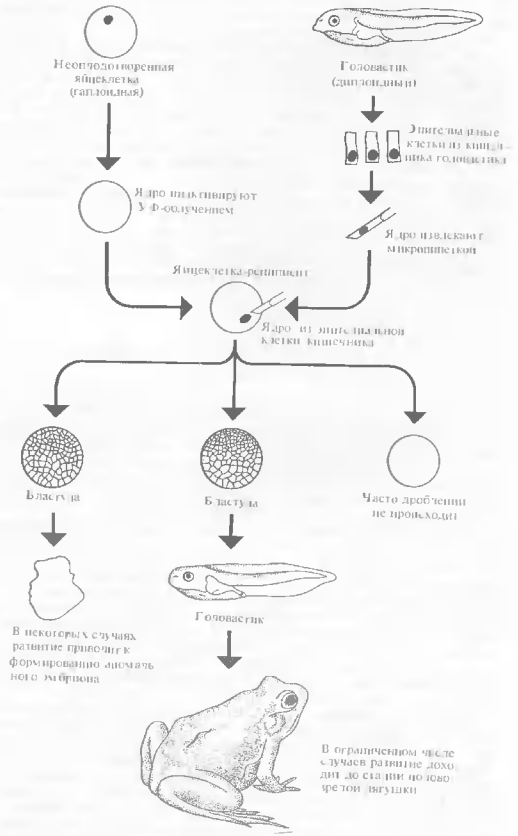


Рис. 17-30. Стадии формирования организма «клональной» лягушки (Gurdon, Scientific American, декабрь 1968).

ство очень небольшого числа разных белков. Зрелые эритроциты, вероятно, могут служить наиболее ярким примером. Они никогда не делятся, и единственной их функцией является синтез молекул гемоглобина, способных обратимо связывать кислород. Более того, у некоторых видов (включая всех представителей млекопитающих) ядра в этих клетках в конечном счете разрушаются, и в результате синтез гемоглобина в образующихся зрелых эритроцитах прекращается. Время жизни эритроцитов обычно не превышает нескольких месяцев, по истечении которых они замещаются новообразующимися клетками. Сходным образом ведут себя и взрослые плазматические клетки, продуцирующие специфические антитела. Они также никогда не делятся, синтезируют специфические продукты в течение нескольких дней, а затем отмирают. Во время их функционирования ядра остаются полностью активными и продуцируют молекулы мРНК, содержащие информацию для антител. Многие специализированные клетки других типов (в частности, нервные клетки), хотя никогда не делятся, живут на протяжении многих лет. Функционирование таких долгоживущих клеток всегда зависит от присутствия ядра, способного к синтезу мРНК. По-видимому, определенный уровень белкового синтеза, хотя бы и очень низкий, необходим для непрерывного функционирования клетки.

ВЫЖИВАНИЕ ПОКОЯЩИХСЯ ЯДЕР ЗА СЧЕТ СЛИЯНИЯ С БОЛЕЕ АКТИВНЫМИ КЛЕТКАМИ

Состояние покоя у многих ядер прерывается, если клетки, их содержащие, сливаются с клетками другого типа. До самого последнего времени слияние клеток, растущих в культуре ткани, было редким явлением, которое не удавалось осуществить по воле экспериментатора. Однако было замечено, что адсорбция определенных вирусов (в частности, вируса Сендай, сходного с вирусом гриппа) индуцирует слияние многих клеток. Инфекционные вирусные частицы, по-видимому, каким-то образом модифицируют поверхность клеток, так что клетки приобретают способность сливаться. Еще важнее то, что слияние клеток индуцируют даже вирусы, инактивированные УФ-облучением. Это позволяет изучать метаболизм слившихся клеток без помех, которые обычно вносит в метаболизм клетки вирусная инфекция. В настоящее время с использованием вируса-помощника Сендай можно легко осуществлять эксперименты по слиянию клеток, задаваясь определенными целями, и уже получены новые очень важные данные, позволяющие сделать определенные выводы о механизмах регуляции в клетках высших организмов. Например, когда эритроцит курицы, содержащий ядро, сливается с клеткой человека из линии HeLa (стр. 529), ядро эритроцита продолжает синтез ДНК и РНК. Ядерная реактивация начинается с увеличения объема ядра, что позволяет уплотненным хромосомам курицы вытянуться и приступить к синтезу РНК (рис. 17-31). Можно думать (хотя и непонятно, каким образом это происходит), что цитоплазма клетки HeLa поставляет определенные компоненты ядру куриной клетки и тем самым открывает ему путь к функционированию. По крайней мере на первый взгляд кажется, что синтезы и ДНК, и РНК должны находиться под воздействием позитивной регуляции того или иного типа, поскольку, будь регуляторные механизмы негативными, цитоплазма эритроцитов индуцировала бы выключение функции ядра HeLa. Однако такого торможения не наблюдается как в данной паре клеток, так и во многих других случаях, изученных к настоящему моменту. Еще одним подтверждением гипотезы о наличии позитивной регуляции синтеза ДНК могут служить данные опытов, в которых клетка HeLa

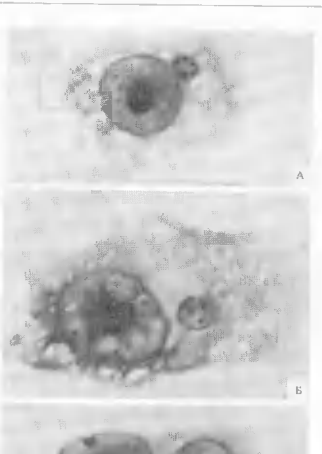


Рис. 17-31. *А.* Клетка, образовавшаяся после слияния куриного эритроцита и клетки линии HeLa. Слияние произошло совсем недавно, видны мелкое ядро эритроцита и крупное ядро клетки HeLa. *Б.* На более поздней стадии происходит увеличение размера ядра эритроцита. *В.* В дальнейшем происходит еще более отчетливое увеличение его размера. (Фотографии получены д-ром Харрисом и воспроизводятся с разрешения *J. Cell Science.*)

на стадии G_1 жизненного цикла (стр. 537) сливается с такой же клеткой на стадии S. Вскоре после слияния в покоившемся до этого ядре G_1 начинается синтез ДНК.

ПОЗИТИВНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИИ ГЕНА

Таким образом, встает очень важный вопрос о том, какие компоненты непосредственно заставляют функционировать специфические гены высших организмов. Здесь наши знания практически равны нулю — надежные данные удалось получить только в опытах по изучению дифференцировки, индуцируемой специфическими стероидными гормонами. На генетическом уровне наиболее изученным из стероидных гормонов является экдизон — гормон роста, ответственный у насекомых за переход из личиночного состояния в состояние куколки. Его действие определяется индукцией строго определенных пуффов в «покоившихся» дисках. На ранних стадиях личиночного периода распределение пуффов в политенных хромосомах слюнных желез дрозофилы представляется простым и стабильным. В это время существует примерно 10 основных пуффов. Но как только в гемолимфу насекомого поступает экдизон, существовавшие до этого пуффы подвергаются обратному развитию, и быстро образуется ряд

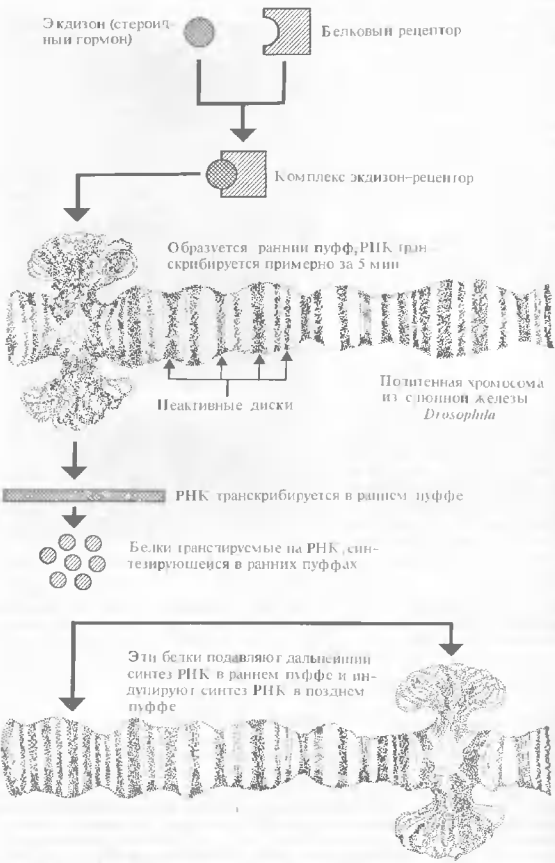


Рис. 17-32. Схема действия экдизона на последовательное образование поздних и ранних хромосомных пуффов. Хромосома и пуффы изображены схематически.

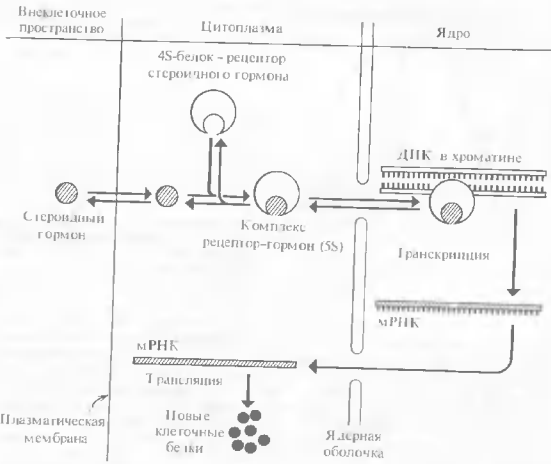


Рис. 17-33. Диаграмма, иллюстрирующая вероятный механизм действия стероидных гормонов.
Комплекс стероидного гормона с рецепторным белком (константа седиментации комплекса 5S) проходит через ядерную оболочку и связывается с определенным участком хромосомы, что приводит к активированию синтеза специфической мРНК.

повых пуффов — в целом на стадии перехода от личинки к куколке появляется около 125 подобных структур. Каждый диск превращается в пуфф в строго определенный момент времени и остается активным в течение опять-таки строго определенного промежутка времени (рис. 17-32). Первые пуффы (ранние) начинают формироваться уже через 5 мин после добавления гормона. Их образование является, по-видимому, прямой ответной реакцией на гормон, поскольку ингибиторы белкового синтеза не влияют на их появление. Напротив, поздние пуффы, которые появляются лишь через несколько часов после добавления экдизона, при подавлении белкового синтеза не формируются. Кажется вероятным, что белковый продукт(ы) одного или нескольких ранних пуффов индуцирует образование поздних пуффов.

Вопрос о том, каким образом экдизон вызывает образование ранних пуффов, до сих пор остается открытым, хотя чрезвычайная быстрота ответной реакции позволяет предполагать, что этот стероид непосредственно индуцирует транскрипцию в соответствующих участках хроматина. Совершенно ясно, что именно так действует целый ряд стероидов позвоночных. Например, стероидные половые гормоны типа эстрогенов стимулируют синтез РНК в матке еще до того, как удается заметить какие-либо иные изменения метаболизма. Такие стероиды, однако, дей-

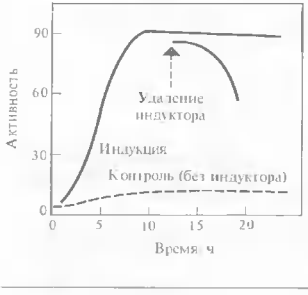


Рис. 17-34. Индукция тирозин — аминотрансферазы в клетках гепатомы крысы под действием синтетического гормона надпочечников дексаметазонфосфата.

ствуют не сами по себе. Их действие зависит от прочного связывания с высокоспецифическими белковыми *рецепторами*. Каждая клетка-мишень содержит много тысяч молекул таких гормональных рецепторов — все они имеют константу седиментации 4S и в отсутствие соответствующих стероидов обнаруживаются исключительно в цитоплазме. Однако сразу же после образования комплексы рецептор — стероид транспортируются в ядро, где они связываются с хроматином и снимают торможение синтеза РНК. Смешивание с ДНК одних очищенных рецепторов никогда не приводит к их связыванию. Они способны прикрепляться к хроматину только в присутствии своих партнеров — стероидов (рис. 17-33). В высшей степени загадочным является огромное число (около 1000) участков хромосомы, к которым, по-видимому, присоединяются комплексы стероид — рецептор. Если учитывать высокую специфичность большинства ответных реакций на гормоны, то a priori можно предсказать, что число участков связывания должно быть ограниченным.

Совершенно ясно, что надо пытаться найти такие системы in vitro, где было бы возможно изучать прямое воздействие стероидных гормонов на синтез РНК. К сожалению, до сих пор подобные системы не разработаны, хотя надо надеяться на успехи в этом направлении в течение ближайших нескольких лет. Однако существуют клетки культур тканей, которые специфически реагируют на добавление стероидов. Одной из наиболее хорошо изученных клеточных линий является культура клеток гепатомы (опухоли печени). Когда такие клетки выращиваются в присутствии стероидных гормонов надпочечников, наблюдается 5—10-кратное увеличение активности тирозин — аминотрансферазы по сравнению с ее активностью в клетках, растущих без этих гормонов (рис. 17-34). Такая стимуляция является высокоспецифической, поскольку уровень синтеза общей РНК и белка после добавления гормонов не изменяется. Более того, это увеличение активности отражает синтез нового белка, так как при добавлении таких ингибиторов белкового синтеза, как пуромицин или циклогексимид, повышения активности не происходит. Поскольку ингибитор синтеза РНК актиномицин D также блокирует образование фермента, индукция скорее всего включает синтез новых молекул мРНК. Это еще раз говорит в пользу представления, согласно которому действие любого стеронда опосредовано индукцией синтеза специфической РНК. К сожалению, такая система сама по себе не может служить источником получения

надежных данных о молекулярных механизмах, используемых комплексом стероид — рецептор для превращения покоящегося хроматина в активно транскрибирующиеся гены. Мы опять-таки приходим к необходимости разработки систем in vitro, которые позволили бы отвечать на точно поставленные вопросы.

ПРЕДОБРАЗОВАННАЯ мРНК НА СТАДИЯХ, ПРЕДШЕСТВУЮЩИХ ГАСТРУЛЯЦИИ

Важна ли в жизни эукариотических клеток регуляция на уровне трансляции, до сих пор неизвестно. Мысль, которая напрашивается сама собой, к чему попусту тратить энергию на синтез нуклеотидных последовательностей молекул РНК, которые никогда не понадобятся, гораздо более правомерна по отношению к бактериальным клеткам, чем к клеткам, содержащим выраженное ядро — в последних новосинтезированной молекуле мРНК требуется гораздо больше времени, чтобы занять соответствующее положение в синтезе белка. Предобразованные завершенные, но до поры до времени не функционирующие цепи мРНК, возможно, необходимы для быстрых метаболических реакций в клетках высших организмов. При наличии их в определенных областях цитоплазмы белковый синтез может начаться сразу же после получения некоего молекулярного сигнала.

Именно такая ситуация характерна для неоплодотворенных яйцеклеток иглокожих, в которых белковый синтез начинается сразу после оплодотворения весьма бурно. Большинство цепей мРНК, используемых на стадии гаструляции, было синтезировано еще до оплодотворения, поэтому последующее блокирование синтеза РНК актиномицином абсолютно не тормозит ранние дробления. Следовательно, мы неизбежно приходим к выводу, что неоплодотворенная яйцеклетка наполнена мРНК, ждущей сигнала, чтобы начать функционировать в качестве матрицы. Этот сигнал не обусловлен изменением числа рибосом, поскольку они уже присутствуют в клетке в огромных количествах. (Правда, большая часть рибосом не вступает в комплекс с мРНК с образованием полисом.) После оплодотворения клетка получает сигнал, который заставляет рибосомы формировать полисомы, и тем самым приводится в действие механизм быстрой смены дроблений, приводящих сначала к бластуляции, а затем к гаструляции. В ходе ранних дроблений образуются некоторые новые виды мРНК, которые в основном функционируют на стадии гаструляции.

Существование предобразованной мРНК в неоплодотворенных яйцеклетках сразу наталкивает нас на вопрос о том, насколько широко это явление распространено среди других клеток. Но прежде чем энергично браться за решение этого вопроса, необходимо выяснить состояние предобразованной мРНК в яйцеклетке. Есть указания на то, что она находится там в комплексе со специфическими белками, но окончательные выводы зависят от данных будущих опытов.

ДАЛЬНЕЙШАЯ РАСШИФРОВКА ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ ХРОМОСОМЫ

Как показало предшествующее изложение, специалисты в области молекулярной биологии больше не рассматривают проблемы эмбриологии как абсолютно безнадежные, в лучшем случае способные дать начало теориям, которые проверить на практике невозможно. Если вопросы ставить точно, то можно получать ответы и на молекулярном уровне, хотя, конечно, для этого требуются огромные затраты труда. Новая волна оптимизма вызвана

открытием факторов специфичности РНК-полимеразы и появлением точно сформулированных теорий о гормональной регуляции функции гена. В настоящее время первоочередной задачей являются поиски подходящих клеток высших организмов, на которых можно было бы тщательно проверить новые концепции регуляторных механизмов. Сейчас представления эти почти полностью покоятся на данных, полученных в прокариотических системах. В такого рода поисках особое внимание следует обратить на выбор экспериментальных объектов. Целесообразно выбирать организмы, хромосомы которых можно было бы изучать детально как на генетическом, так и на молекулярном уровне. Можно думать, что если эмбриологи сосредоточат свои усилия на дрозофиле или всерьез пойдут на приступ генетики земноводных, то эмбриология в конце концов обретет четкое молекулярное направление.

ВЫВОДЫ

Молекулярные основы регуляции белкового синтеза у многоклеточных высших организмов изучены еще очень слабо. В частности, мало что можно сказать о механизмах клеточной дифференцировки. Если клетка становится дифференцированной, то все ее потомки обычно продуцируют строго определенные белки. Высказывается мнение, что этот избирательный синтез белков, так же как и в бактериальных клетках, обычно основан на избирательном синтезе РНК строго определенных типов. Следовательно, дифференцированные клетки должны обладать механизмами, которые регулируют скорость считывания определенных участков ДНК. Главная трудность в понимании ключевых процессов дифференцировки состоит в отсутствии методов, позволяющих изучать это явление вне клетки. Хотя эмбриональную дифференцировку можно смоделировать в культурах клеток, до сих пор не удалось выделить специфические внешние факторы, которые в нормальных условиях заставляли бы клетку дифференцироваться в данном направлении.

У бактерий процесс дифференцировки, который ведет к образованию спор, запускается субоптимальными условиями питания. Этот сигнал включает целую цепь событий, которая вызывает исчезновение одного или нескольких нормальных факторов специфичности РНК-полимеразы и его (или их) замещение фактором специфичности, характерным для споруляции; в присутствии нового фактора считываются только те гены, которые участвуют в образовании спор. Являются ли аналогичные временные замещения одного фактора специфичности другим основой процессов дифференцировки (например, у плесневого гриба или насекомых), вскоре, вероятно, удастся проверить.

До сих пор полностью неясными остаются структура хромосом высших организмов и механизм, с помощью которого репликация их ДНК может начинаться во многих участках одной и той же хромосомы. Отсутствие соответствия между содержанием ДНК и числом генов также остается загадкой. Если у прокариотов и у низших эукариотов бо́льшая часть ДНК содержит информацию для аминокислотных последовательностей, то у многоклеточных организмов значительная часть ДНК не обладает явной генетической функцией. У дрозофилы последовательность аминокислот в полипептидах определяет только 5% всей ДНК, а у человека для этой цели используется еще меньшее количество ДНК. Бо́льшая часть такой «негенетической» ДНК расположена в промежутках между функционально активной ДНК, причем главные продукты транскрипции (пре-мРНК) представляют собой смесь «генетических» и «негенетических» последовательностей. После образования пре-мРНК «негенетический» компонент

удаляется в ходе процессинга, а последовательности, имеющие кодирующую функцию (мРНК), сохраняются.

Определенные сложности возникают и в связи с тем, что у высших организмов присутствуют последовательности ДНК трех классов: высокоповторяющиеся, умеренно повторяющиеся и уникальные. Высокоповторяющиеся последовательности, в которых очень простые сочетания нуклеотидов повторяются тысячи раз, локализуются исключительно в центромерных областях. Они никогда не транскрибируются, и функция их неизвестна. Столь же неясными с функциональной точки зрения являются и умеренно повторяющиеся последовательности, которые распределяются в геноме бессистемно и перемежаются с участками уникальной ДНК. Многие умеренно повторяющиеся последовательности транскрибируются с образованием РНК, что дало основания для предположений, будто они могут иметь какую-то, пока еще не выясненную регуляторную функцию. Хотя многие уникальные последовательности и содержат информацию для аминокислот, обо всех таких последовательностях сказать этого нельзя, и у большей части высших организмов функция подавляющего большинства уникальных последовательностей остается абсолютно неясной.

У высших растений и животных многие гены представлены в гаплоидном геноме всего одной копией. Единственной копией представлены даже такие гены (например, гены различных цепей гемоглобина), которые содержат информацию для наиболее распространенных клеточных белков. Однако существуют и исключения из этого правила. К примеру, у морских ежей гены разных гистонов присутствуют в количестве 100—200 копий. Множественность характерна также для генов, содержащих информацию для рРНК и тРНК. В соматических клетках огромное число генов рРНК обнаруживается в виде тандемов в одном или нескольких ядрышках, прикрепленных к хромосомам. Многие яйцеклетки также содержат большое количество внехромосомных ядрышек, каждое из которых содержит кольцевую молекулу ДНК, состоящую из 10, а иногда и 1000 тандемно расположенных генов рРНК.

Во многих высокоспециализированных клетках ядра обычно не делятся. Однако это свойство не отражает необратимости дифференцировки, поскольку при пересадке в менее дифференцированную цитоплазму, осуществляемой микрохирургическим методом или в результате слияния клеток, эти ядра часто претерпевают обратное развитие. Поведение ядер, следовательно, во многом зависит от молекулярных сигналов, получаемых из окружающей ядро цитоплазмы. Например, определенные стероидные гормоны избирательно воздействуют на синтез РНК в результате связывания с цитоплазматическими рецепторами стероидов, которые затем в виде комплекса транспортируются в ядро и там прикрепляются к специфическим участкам хроматина. Многие исследователи полагают, что регуляция белкового синтеза у высших организмов осуществляется на уровне транскрипции, в то же время в неоплодотворенной яйцеклетке многие синтезированные до конца молекулы мРНК каким-то образом остаются в состоянии покоя до момента оплодотворения. Является ли регуляция на уровне трансляции отличительной чертой жизнедеятельности соматических клеток, остается выяснить в будущем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Hood L. E., Wilson J. H., Wood W. B., Molecular Biology of Eucaryotic Cells, W. B. Benjamin, Inc., 1975. Великолепная монография, рассчитанная на специалистов, которая сама по себе может служить введением в генетические аспекты молекулярной биологии эукариотических клеток.

Sussman M., Developmental Biology, Prentice-Hall, 1973. (М. Зуссман, Биология развития, изд-во «Мир», М., 1977.) Первая книга, представляющая собой введение в современную эмбриологию.

Markert C. L., Ursprung H., Developmental Genetics, Prentice-Hall, 1971. (К. Маркерт, Г. Урипрунг, Генетика развития, изд-во «Мир», М., 1973.) Подробное изложение наиболее важных аспектов современной эмбриологии.

Ebert J., Interacting Systems in Development, 2nd ed., Holt, New York, 1970. (Имеется перевод 1-го изд.: Дж. Иберт, Взаимодействующие системы в развитии, изд-во «Мир», М., 1968.) Великолепное содержательное введение в эмбриологию, в котором подчеркивается необходимость объяснения явлений на молекулярном уровне.

Gurdon J. B., Control of Gene Expression in Animal Development, Harvard University Press, 1975. (Дж. Гёрдон, Регуляция функции генов в развитии животных, изд-во «Мир», М., 1977.)

Control Mechanisms of Growth Differentiation, Symposium of the Society for Experimental Biology XXV, Academic Press, 1971. Сборник разнородных статей, освещающий классический и биохимический подходы к эмбриологии.

The Bacterial Spore, G. W. Gould and A. Hurst (eds.), Academic, New York, 1969. Обзор исследований бактериальных спор, к настоящему времени несколько устаревший.

Microbial Differentiation, Twenty-third Symposium of the Society for General Microbiology, Cambridge University Press, 1973. Описание ряда микроорганизмов, способных к дифференцировке.

Losick R., Sonenshein A. L., Changes in the Template Specificity of RNA Polymerase During Sporulation, Nature, 224, 35 (1969). В статье обсуждаются факторы специфичности, а также даются первые реальные объяснения механизма спорообразования.

Duprae E. J., DNA and Chromosomes, Holt, Rinehart and Winston, 1970. Теоретическое введение в проблему взаимоотношения ДНК и хромосомы.

White M. J. D., The Chromosome, 6th ed., John Wiley, New York, 1972. Описание структуры и поведения хромосом.

Chromosome Structure and Function, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, XXXVIII, 1974. Сборник, включающий 88 статей, в большинстве которых подчеркивается необходимость молекулярного подхода.

Britten R. J., Kohne D. A., Repeated Sequences of DNA, Scientific American, April 1970. Работа, касающаяся присутствия повторяющихся последовательностей в ДНК различных организмов.

Miller O. L., The Visualization of Genes in Action, Scientific American, March 1978. Обзор данных о функционировании генов, полученных автором с помощью электронного микроскопа.

Developmental Studies on Giant Chromosomes, W. Beermann (ed.), Springer-Verlag, 1972. Сборник великолепных обзоров, посвященных хромосомам слюнных желез.

Daneholt B., Transcription in Polytene Chromosomes, Cell, 4, 1 (1975). Очень полезный обзор, в котором основное внимание уделено кольцам Бальбиани.

Brown D. D., The Isolation of Genes, Scientific American, August 1973. Описание нескольких изящных экспериментов, с помощью которых была выявлена организация генов, кодирующих рРНК.

Harris H., Cell Fusion, Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1970. Один из ранних обзоров, посвященных слиянию клеток.

Ephrussi B., Hybridization of Somatic Cells, Princeton University Press, 1972. (Б. Эфрусси, Гибридизация соматических клеток, изд-во «Мир», М., 1976.) Обсуждение метода слияния клеток и его роли в генетических исследованиях.

Harris H., Cells and Cytoplasm, 3rd ed., Clarendon Press, Oxford, 1972. Введение в проблему регуляции у клеток высших организмов; большое внимание уделяется методу слияния клеток.

Ruddle F. H., Kucherlapati R. S., Hybrid Cells and Human Genes, Scientific American, July, 1974. Современный обзор на тему о том, что могут дать опыты по слиянию клеток для выяснения локализации генов и контроля их функции.

Gurdon J. B., Transplanted Nuclei and Cell Differentiation, Scientific American, December 1968. Описание наиболее демонстративных опытов по пересадке ядра, осуществленных к настоящему времени.

ГЛАВА

18 Контроль клеточной пролиферации

Биологам хорошо известно, что контроль клеточного деления является одним из наиболее важных аспектов существования многоклеточных систем. На протяжении всего эмбрионального развития и всей жизни взрослого организма большинство дифференцированных клеток стоит перед выбором: делиться или нет; организмы могут нормально функционировать только в том случае, если осуществлена запрограммированная серия правильных решений. Но одного желания охватить все важные вопросы недостаточно для того, чтобы дать на них ясные ответы. Мы были бы неоткровенны, если бы не признали, что многие из проведенных ранее исследований относительно факторов, контролирующих клеточную пролиферацию, не столько прояснили, сколько запутали суть дела. И все же в настоящее время нам кажется, что некоторые ключевые факты наконец установлены и что при достаточной удаче в следующее десятилетие может быть создана основа для понимания механизмов, регулирующих пролиферацию самых разнообразных типов животных клеток, на первый взгляд имеющих между собой мало общего. Нынешний оптимизм основан на осознании того факта, что опыты не должны более проводиться исключительно на интактных организмах — вполне возможно, что многие вопросы будут разрешены в результате исследований на культурах клеток.

Любая работа по изучению пролиферации клеток всегда имеет прямое отношение к природе рака. Эта группа устрашающих заболеваний по определению связана с клетками, которые делятся, когда им не следует делиться, что обычно ведет к образованию клеточных масс, называемых опухолями. Разные формы рака возникают в результате изменения дифференцированных клеток различных типов, причем у образующихся раковых клеток сохраняются многие морфологические и функциональные признаки, присущие их нормальным предшественникам. Чаще всего эти изменения возникают в клетках, которым свойственно частое деление (например, в эпителиальных клетках кожи), поэтому главная особенность раковой клетки — не то, что она способна быстро делиться, а то, что она утратила нормальные системы контроля, предотвращающие нежелательную пролиферацию. Из этого ясно, почему основная научная задача почти всего текущего столетия состояла в том, чтобы выяснить существенные биохимические различия между нормальной и раковой клеткой.

ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Вплоть до последнего времени в росте клеток в культуре было много мистического. Для успеха, по-видимому, требовалось очень точное соблюдение необходимых условий, но и в этом случае не каждому удавалось завладеть желанной волшебной палочкой. Долгое время рост можно было с уверенностью получать только при использовании кусочков ткани, да и то лишь тогда, когда их имплантировали в весьма неопределенного рода сгустки

кровяной плазмы или эмбриональные экстракты. Бывали случаи, когда такие «тканевые культуры» при отсутствии бактериального загрязнения и регулярной смене питательной среды росли неопределенно долго. Хотя неоднократно предпринимались попытки выращивать культуры из диссоциированных клеток, это очень редко приводило к успеху, пока не начали применять для диссоциации клеточных масс небольшие количества протеолитического фермента трипсина. Тогда диссоциированные (*первичные*) клетки после помещения их в чашку стали хорошо расти при высокой плотности посева. В то же время первые попытки получить клональный рост одиночных клеток не приводили к успеху. Отдельные клетки в лучшем случае несколько раз делились, а затем неизбежно погибали. Основной причиной этих неудач в первых опытах по клонированию клеток было то, что большинство первичных клеток позвоночных в условиях культуры «протекают»: жизненно необходимые питательные вещества диффундируют из них наружу. Поэтому рост идет лучше всего при высокой исходной плотности культуры — при этом становится возможным перекрестное питание. Отсюда возникла практика помещения одиночных первичных клеток в очень мелкие капельки культуральной жидкости. В этом случае значительное разведение веществ невозможно и клетки дают небольшие клоны. Другой способ повышения эффективности клонирования состоит в помещении одиночных диссоциированных клеток на слой «питающих» клеток, стерилизованных большими дозами рентгеновского облучения. Ни одна из таких облученных клеток-кормилиц размножаться не может, но все они остаются метаболически активными и высвобождают питательные вещества в количестве, достаточном для того, чтобы большинство высеянных первичных клеток могло образовать видимые простым глазом колонии.

Таблица 18-1. Некоторые свойства наиболее важных клеточных линий

Линия	Происхождение		Характерные особенности				
	Вид животного (в скобках указано нормальное диплоидное число хромосом)	Ткань	Морфологический тип клеток	Рост в суспензии	Эффективность образования клонов из отдельных клеток, %	Образование опухолей	Хромосомный набор
3T3	Мышь (40)	Эпителиальная	Фибробласты	—	50	+ (редко)	Гетероплоидный (в разных клетках различия)(мода = 65)
L	Мышь (40)	Соединительная	То же	+	90	—	Гетероплоидный (мода =65)
CHO	Китайский хомячок (22)	Яичник	Эпителиальные	+	95	?	Псевдодиплоидный
BHK21	Сирийский хомячок (22)	Почка	Фибробласты	+	20	+ (редко)	Диплоидный
BSC	Обезьяна (40)	»	Эпителиальные	—	Низкая	?	»
MPC	Мышь (40)	Миелома костного мозга	Лимфоидные	+	0	?	Гетероплоидный
RPH	Лягушка (26)	Яйцеклетки	Эпителиальные	—	0	+	Гаплоидный (N = 13)
HeLa	Человек (46)	Опухоль шейки матки	То же	+	95	?	Гетероплоидный (мода = 75)
KB	Человек (46)	Опухоль носоглотки	» »	+	95	?	То же

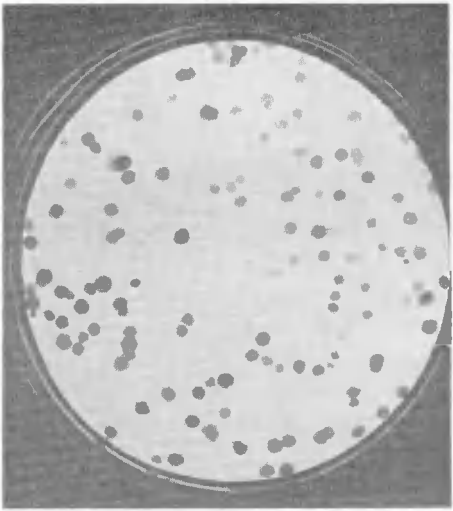


Рис. 18-1. Клоны клеток линии HeLa (из ткани человека), растущие на поверхности агара в чашке Петри (фотография предоставлена д-ром Паком, медицинский факультет Колорадского университета).

Клетки культур, возникающих в результате размножения первичных клеток, называются вторичными клетками. Такие клетки обычно живут не бесконечно долго — они делятся лишь какое-то ограниченное число раз, а затем погибают. Например, вторичные клетки из организма курицы делятся от 20 до 40 раз, после чего неизменно гибнут. Аналогичным образом и клетки кожи человека делятся в культуре в лучшем случае 50—100 раз, а потом погибают. Интересно отметить, что число делений в культуре совпадает с числом делений тех же клеток в течение жизни соответствующего позвоночного. В связи с этим напрашивается мысль — не связана ли эта как будто бы запрограммированная гибель клеток с нормальными процессами старения у позвоночных?

К счастью, клетки некоторых животных не обязательно гибнут, пройдя в культуре определенное число делений. Хотя большая часть клеток мыши или хомячка, проделав 30—50 делений, погибает, все же некоторые из них проходят через «критический период» и приобретают способность размножаться неопределенно долго. Потомство таких «избранных» клеток образует непрерывные *клеточные линии* (табл. 18-1). Хотя еще не удалось

Рис. 18-2. 73 хромосомы клеток HeLa (*вверху*) в сопоставлении с нормальным набором из 46 хромосом мужчины (*внизу*) (любезно предоставлено д-ром Паком, медицинский факультет Колорадского университета).

получить такие линии из нормальных клеток человека, известен ряд линий опухолевых клеток (табл. 18-1). Раковый фенотип каким-то образом часто дает возможность клеткам легче адаптироваться к условиям культуры. Может быть, это связано с тем фактом, что и раковые клетки, и клетки, приспособившиеся к перманентному росту в культуре, характеризуются

аномально высоким числом хромосом, нередко почти вдвое превышающим нормальное диплоидное число. Например, раковые клетки человека линии HeLa содержат примерно от 70 до 80 хромосом, в то время как нормальный набор состоит из 46 хромосом (рис. 18-1, 18-2). Видимо, наличие избыточных хромосом (анэуплоидия) часто дает клеткам в культуре какое-то преимущество перед клетками с нормальным диплоидным набором.

НЕЯСНОЕ ПРОИСХОЖДЕНИЕ МНОГИХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

Первичные культуры обычно получают из больших масс ткани, а иногда даже из отдельных органов или из целого эмбриона. Вначале они содержат разнообразные типы дифференцированных клеток (например, фибробласты, макрофаги, эпителиальные клетки, лимфоциты и т. п.), так что в ряде случаев трудно определить, от каких именно клеток произошла данная линия. При большинстве условий роста в культуре лучше всего размножаются клетки, имеющие веретенообразную форму и растущие со скоростью, присущей клеткам соединительной ткани; поэтому их обычно называют *фибробластами* (рис. 18-3, *А*). Совсем недавно, однако, были найдены условия культивирования, избирательно благоприятствующие росту некоторых *эпителиальных* клеток (рис. 18-3, *Б*). Эти клетки могут использовать D-валин в качестве единственного источника валина, так как у них имеется оксидаза D-аминокислот — фермент, способный превращать D-валин в L-валин. Фибробласты же не содержат этого фермента и потому не могут расти, когда единственным источником валина в среде является D-валин.

Форма, которую клетки данной линии принимают в культуре, может изменяться. Например, некоторые штаммы клеток HeLa, выращиваемые в богатой среде (с высоким содержанием сыворотки), имеют сильно удлиненную форму, характерную для фибробластов, тогда как в более бедной среде они тесно прилегают друг к другу и образуют слой, напоминающий булыжную мостовую (рис. 18-4). Таким образом, если какую-то линию обычно

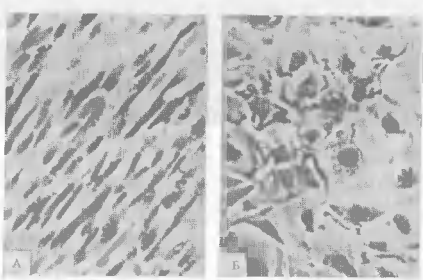


Рис. 18-3. Рост вторичных клеток, ведущих свое происхождение от легочной ткани человека (Gilbert, Migeon, Cell, 5, 11, 1975.)
Избирательная пролиферация фибробластов в присутствии L-валина (*А*) и эпителиальных клеток в присутствии D-валина (*Б*).

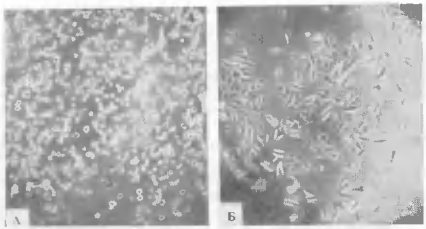


Рис. 18-4. Зависимость формы клеток HeLa от условий роста (Puck, The Mammalian Cell as a Microorganism, Holden-Day, Inc., 1972). При низком содержании сыворотки в среде форма округлая, клетки похожи на бульжники (*А*), в среде, обогащенной сывороткой (*Б*), они приобретают веретенообразную форму фибробластов.

Рис. 18-5. Фазово-контрастная микрофотография клеток нейробластомы мыши, растущих на твердой поверхности. (С любезного разрешения д-ра Альбрехт-Бюлера, Лаборатория в Колд Спринг Харборе). От каждой клетки отходит большое число удлиненных отростков (нейритов). При росте в суспензии такие клетки имеют округлую форму, характерную для раковых клеток, однако после прикрепления к твердой поверхности они уплощаются и образуют многочисленные нейриты.

относят к эпителиальным клеткам, а другую к фибробластам, это не обязательно означает, что они произошли из эпителиальной или соединительной ткани соответственно.

Иногда, однако, присутствие специфических клеточных продуктов позволяет точно установить происхождение определенных клеточных

линий. В частности, легко догадаться о происхождении клеток, которые секретируют специфические гормоны. Клетки из опухолей яичка выделяют андрогены, а клетки, полученные из опухолей гипофиза, продуцируют АКТГ и гормон роста. Подобным же образом клетки, происходящие от многих опухолей печени, выделяют преимущественно основной белковый продукт печени — альбумин. Столь же ясно и происхождение культур нейробластомы (опухоли первой ткани), поскольку клетки их обладают возбудимыми мембранами и при определенных условиях питания образуют многочисленные нейриты (рис. 18-5).

Не все свойства дифференцированных клеток сохраняются у их потомства, растущего в культуре. При отсутствии отбора по определенным признакам большинство клеточных линий кажутся менее дифференцированными, чем их предшественники in vivo, и часто проявляют черты сходства с «недифференцированными» эмбриональными клетками, характерными для ранних стадий развития. Поэтому клетки многих так называемых «нормальных» линий сильно напоминают раковые клетки, многие типы которых также соответствуют частично «недифференцированному» состоянию. Например, в большинстве гепатом не образуются нормальные ферменты печени. Это сравнение покажется еще более убедительным, если мы примем во внимание, что длительный рост клеток в культуре, возможно, обусловлен утратой каких-то механизмов, замедляющих, а иногда и полностью тормозящих клеточное деление в соответствующем многоклеточном организме, с чем может быть связано и развитие ракового состояния. Таким образом, выделение многих клеточных линий могло быть результатом отбора мутантных клеток, менее чувствительных к сигналам, прекращающим деление.

РОСТ НА ТВЕРДЫХ ПОВЕРХНОСТЯХ И РОСТ В СУСПЕНЗИИ

Большинство «фибробластов» и «эпителиальных» клеток растут лучше всего тогда (или только тогда), когда они прикреплены к твердой поверхности и образуют низкие «газоны» из одного или нескольких клеточных слоев. В оптимальных условиях первичные эпителиальные клетки образуют слой толщиной в одну клетку (монослой), а в культурах фибробластов клеточные газоны часто состоят из двух-трех слоев клеток. Только в редких случаях можно получить такие клеточные линии, которые хорошо размножались бы в суспензии. Эти линии происходят от опухолевых (трансформированных) клеток; дело, вероятно, в том, что адгезия выражена у опухолевых клеток слабее, чем у нормальных, которые образуют организованные тканевые массы. Культуры, хорошо растущие в суспензиях, дают значительно больше клеток, чем выращиваемые на твердых поверхностях. Поэтому в работах по молекулярной биологии позвоночных в качестве объектов обычно используют клетки типа HeLa или KB, способные расти в суспензиях.

Лимфоидные клетки тоже лучше всего растут в суспензиях — либо в виде одиночных клеток, либо в виде мельчайших комочков (рис. 18-6). Как правило, можно добиться, чтобы покоящиеся лимфоциты делились только в присутствии определенных митогенов (см. стр. 541) или после заражения некоторыми вирусами. Такие линии лимфоидных клеток обычно «бессмертны», и их легко получать в количествах, измеряемых граммами. Другие клетки крови все еще очень трудно выращивать в культуре; однако недавнее открытие факторов (см. стр. 549), способствующих дифференцировке эритроцитов, гранулоцитов и макрофагов, позволяет надеяться, что в ближайшее время культивирование всех основных клеточных элементов крови станет стандартной процедурой.

Рис. 18-6. Лимфоидные клетки человека, растущие в суспензии; × 250. (С любезного разрешения д-ра Дж. Хинка. Институт Слоуна-Кеттеринга.)

РАЗРАБОТКА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Наличие детально охарактеризованных клеточных линий дает возможность направленно подбирать питательную среду, наиболее подходящую для тех или иных клеток позвоночных. Оптимальный рост клеток HeLa и клеток L до высоких плотностей оказался возможным при использовании полусинтетической среды, состоящей из 13 различных аминокислот, 8 витаминов, смеси неорганических солей и диализованной сыворотки человека, с добавлением в качестве источника энергии глюкозы (табл. 18-2). Если клетки, выращиваемые в условиях низкой плотности, отдают в окружающую среду слишком большие количества жизненно важных метаболитов, приходится добавлять еще некоторые вещества (например, серин, инозит и пируват). Длительно пассируемые клеточные линии обычно лучше растут при низких плотностях, чем только что полученные линии,— возможно,

Таблица 18-2. Состав среды для культивирования клеток линии HeLa (по Eagle, Science, 122, 501, 1955)

L-аминокислоты (мМ)		Витамины (мМ)		Соли (мМ)		Другие компоненты	
Аргинин	0,1	Биотин	10^{-9}	NaCl	100	Глюкоза	5 мМ
Цистеин	0,05	Холин	10^{-3}	KCl	5	Пенициллин [1]	0,005%
Глутамин	2,0	Фолиевая кислота	10^{-3}	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	1	Стрептомицин [1]	0,005%
Гистидин	0,05	Никотинамид	10^{-3}	$NaHCO_3$	20	Диализованная сыворотка человека	5%
Изолейцин	0,2	Пантотеновая кислота	10^{-3}	$CaCl_2$	1		
Лейцин	0,2	Пиридоксаль	10^{-3}	$MgCl_2$	0,5		
Лизин	0,2	Тиамин	10^{-3}				
Метионин	0,05	Рибофлавин	10^{-4}				
Фенилаланин	0,1						
Треонин	0,2						
Триптофан	0,02						
Тирозин	0,1						
Валин	0,2						

[1] Для предотвращения бактериального загрязнения

потому, что при клонировании происходит отбор на повышенную «герметичность» клеток.

Добавление сыворотки необходимо почти для всех клеточных линий, полученных от позвоночных. Это позволяет предполагать, что один или несколько сывороточных факторов играют ключевую роль в регуляции деления клеток in vivo. In vitro конечная плотность клеток в культурах той или иной клеточной линии часто определяется концентрацией сыворотки. Некоторые клеточные линии, образующие в 1%-ной сыворотке монослой, в 10%-ной сыворотке дают газоны толщиной в 3—4 клетки. Большое значение имеет и величина pH. Для разных клеточных линий оптимум pH может быть различным, но большинство нормальных клеток лучше всего растет при pH около 7,6.

ЛИНИИ «НОРМАЛЬНЫХ» КЛЕТОК

В ранний период работы с культурами клеток высказывалось подозрение, что клетки приобретают способность расти в культуре только после определенных мутаций, которые делают их способными к неограниченному росту и тем самым похожими на раковые клетки. Такое мнение возникло не только потому, что линии раковых клеток, как правило, получать было гораздо легче, но также и потому, что клетки многих так называемых «нормальных» линий своей округлой формой и неорганизованным ростом напоминают раковые клетки (рис. 18-7). К счастью, эти предположения оказались ошибочными. Выяснилось, что у линий мышиных клеток особенности роста зависят от плотности, при которой выращиваются вторичные клетки. Если вторичные культуры всегда выращивать до высоких конечных плотностей, то получающиеся линии образуют газоны дезорганизованных клеток толщиной в несколько слоев. Такие клетки, будучи «нормальными» по происхождению, обычно выглядят как раковые и при введении иммунологически идентичным мышам образуют опухоли. Если же вторичные культуры таких клеток выращивать только при низких плотностях, когда межклеточные контакты редки, то образующиеся клеточные линии морфологически сходны с нормальными фибробластами и растут в виде тонких организованных монослоев, характерных для нормальных клеток (рис. 18-8). В соответствии со своей морфологией они редко вызывают образование опухолей при введении мышам.

Осознание того факта, что в «критический период» действуют мощные факторы отбора, дало возможность относительно легко выделять клеточные линии с желаемыми особенностями роста. Поддерживая число клеток на низком уровне, можно исключить отбор в пользу опухолеподобных клеток, способных хорошо расти даже при высокой плотности культуры. В настоящее время имеется ряд клеточных линий (например, 3T3), рост которых во многом сходен с ростом «нормальных» клеток и которые можно поэтому использовать для сравнения с анадогичными раковыми клетками.

ТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК

Внезапное превращение клетки нормального типа в клетку, которой присущи многие особенности ракового роста, называется *трансформацией*. Спонтанно это явление происходит очень редко, но, как мы увидим в одной из последующих глав, частота трансформации резко возрастает после заражения клеток опухолевыми вирусами, воздействия канцерогенных веществ и облучения. Независимо от своего происхождения трансформированная клетка не только часто оказывается способной давать начало опухолям, но и характеризуется обычно более округлой формой (из-за менее упоря-

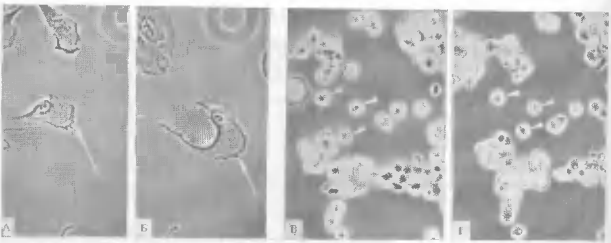


Рис. 18-7. Сравнение морфологии нормальных (линия 9) и трансформированных (линии 14b) клеток из эмбриона хомячка (Goldman et al., Cold Spring Harbor Symp., **XXXIX**, 601, 1973). На фазово-контрастных микрофотографиях *А* и *Б* (× 250) видно, что нормальные клетки при росте на плоской поверхности имеют уплощенную форму. Клетка в центре движется направо, причем ее веерообразный передний край снабжен волнистыми выступами (указано стрелкой). Эти две фотографии сделаны с интервалом 5 ч. На фото *В* и *Г* показаны раковые клетки хомячка (× 300), возникшие в результате трансформации аденовирусом 2. Они имеют значительно более округлую форму и очень малоподвижны (стрелками показаны клетки, не сдвинувшиеся с места за 19-часовой интервал между двумя фото). Дочерние клетки обычно не расходятся и образуют мельчайшие клеточные островки.

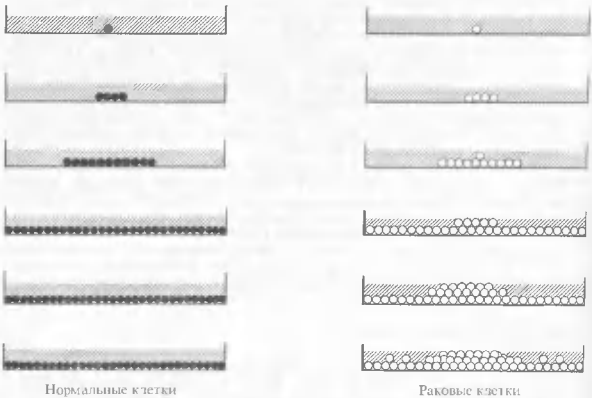


Рис. 18-8. Сравнение пролиферации нормальной и раковой клеток на твердой поверхности (схема). Нормальные клетки делятся до тех пор, пока не образуют сплошного монослоя. Раковые же клетки часто обнаруживают меньшее сродство к твердым поверхностям и образуют неправильные скопления толщиной в несколько слоев.

дочернего расположения цитоплазматических микротрубочек и микрофиламентов); ее движения значительно менее подвержены контактному торможению, рост таких клеток продолжается до более высоких плотностей и часто в меньшей степени зависит от наличия твердой поверхности; такие клетки менее разборчивы в отношении питания (в частности, не столь сильно нуждаются в сыворотке). Однако не все трансформированные клетки даже из одной и той же линии морфологически идентичны; как мы увидим позже, раковый фенотип, вероятно, складывается в результате ряда независимых биохимических изменений.

КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ

Длительность клеточного цикла при оптимальных условиях питания в разных клеточных линиях различна. При 37° С клетки некоторых линий могут делиться каждые 10—12 ч, но для большинства линий этот период составляет 18—24 ч. В настоящее время большинство исследователей делят клеточный цикл на период митоза (М), фазу G_1 (до синтеза ДНК), фазу S (синтез ДНК) и фазу G_2 (период между синтезом ДНК и митозом) (рис. 18-9). Самая короткая стадия — М, она обычно продолжается около часа. В фазе М все клетки, какой бы формой они до этого ни обладали, полностью округляются в результате деполимеризации микротубулярного остова, который в другие периоды вплотную прилегает к плазматической мембране. Длительность других фаз у разных клеточных линий различна, причем фазы G_1 и S часто имеют одинаковую продолжительность — примерно от 8 до 10 ч. Однако есть такие линии, у которых фаза G_1 длится только 1—2 ч.

Очень большое значение для анализа клеточного цикла имеет синхронизация роста, позволяющая работать в условиях, когда практически все клетки находятся в одной и той же фазе цикла. Один из самых эффективных методов синхронизации основан на том, что сферические клетки в фазе М (рис. 18-10) прикрепляются к стеклянным поверхностям значительно хуже, чем клетки на стадии интерфазы. Поэтому встряхивание культуры позволяет выделять большое число клеток, находящихся в фазе М, и определять в дальнейшем скорость образования различных жизненно важных веществ в разные моменты клеточного цикла. В клетках HeLa РНК и белок синтезируются на протяжении всей интерфазы (G_1, S и G_2);

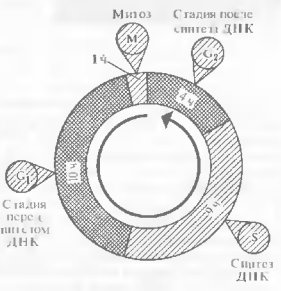


Рис. 18-9. Фазы жизненного цикла клеток злокачественной гепатомы, растущих в культуре ткани и делящихся один раз в сутки.

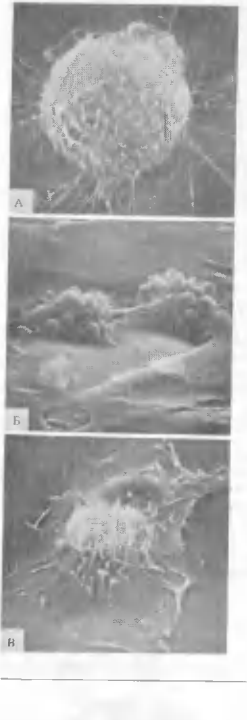


Рис. 18-40. Микрофотографии нормальных клеток хомячка (линия 9), сделанные с помощью сканирующего электронного микроскопа (Goldman et al., Cold Spring Harbor Symp., XXXIX, 601, 1975).
А. Клетка, принявшая округлую форму для прохождения митоза; ее поверхность покрыта микроворсинками, что характерно для всех клеток в фазе М. (× 3260). *Б*. Две дочерние клетки (× 1830) в процессе расхождения. Отметим, что каждая из них покрыта выступами, характерными для поздней фазы М и ранней фазы G_1. *В*. Клетка на поздней стадии G_1 (× 3260). Выступов не видно, зато появились микроворсинки, особенно в центральных, менее уплощенных участках. Когда уплощение заканчивается и начинается фаза S, наружная поверхность становится очень гладкой и можно видеть только единичные микроворсинки.

их синтез внезапно падает до низкого уровня, если не до нуля, во время митоза, когда хромосомы сокращаются и выстраиваются вдоль волокон веретена. Прекращение синтеза РНК может быть связано с изменением хроматина в результате конденсации хромосом, однако причины снижения синтеза белка остаются неясными. Возможно, при остановке синтеза РНК быстро снижается поступление мРНК; но если причина действительно в этом, то приходится предположить, что время жизни мРНК у высших животных меньше принятых величин (3—4 ч). Как бы то ни было, при электронно-микроскопическом исследовании клеток HeLa в метафазе полирибосом обнаружить не удается.

Во время митоза в клетках отмечается также значительно более низкое содержание цАМФ, чем в фазах G_1, S и G_2. На протяжении этих трех фаз

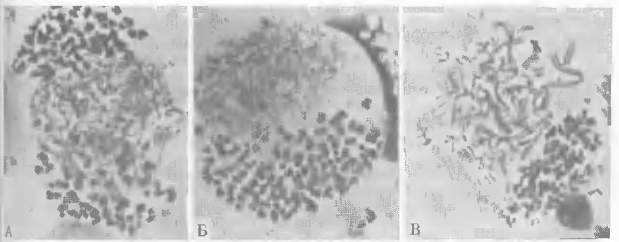


Рис. 18-11. Вид хромосом в гибридных клетках, которые образовались в результате слияния двух клеток HeLa, находившихся в разных фазах клеточного цикла (Puck, The Mammalian Cell as a Microorganism, Holden-Day, 1972). *А* — М, и G_1; *Б* — М и S; *В* — М и G_2.

уровень цАМФ остается относительно постоянным, однако при переходе в фазу М клетка теряет примерно половину количества цАМФ, характерного для предыдущих стадий. Можно думать, что радикальные изменения в мембране, приводящие к округлению клетки, подавляют функцию аденилатциклазы — фермента, ответственного за образование цАМФ. Возможно, впрочем, что, наоборот, падение уровня цАМФ ведет к разрушению фибриллярного остова клетки и изменению ее формы.

СЛИЯНИЕ КЛЕТОК В РАЗЛИЧНЫЕ ФАЗЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Слияние клетки, находящейся в интерфазе (G_1, S или G_2), с клеткой в фазе М быстро приводит к появлению уплотненных хромосом в ядре интерфазной клетки (рис. 18-11). Таким образом, в период митоза клетки содержат какой-то химический фактор, вызывающий конденсацию хромосом даже в интерфазе. Если в таких экспериментах используются клетки в фазе G_1, то после конденсации их хромосомы оказываются тоньше, чем хромосомы митотических клеток, так как каждая хромосома состоит из одной хроматиды. Если же клетки находились в фазе G_2, конденсированные хромосомы в большей степени напоминают нормальную двухроматидную хромосому, характерную для митоза. При слиянии клеток в фазе S хромосомы после уплотнения обычно сильно фрагментированы — вероятно, вследствие того, что они начали конденсироваться в период дупликации и потому легко доступны для воздействия нуклеаз.

ИНИЦИАЦИЯ СИНТЕЗА ДНК

После того как клетка «примет решение» вступить в новый цикл митоза, задолго до начала синтеза ДНК запускается серия заранее запрограммированных операций. Уровень дезоксирибонуклеозидтрифосфатов — предшественников ДНК (дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ) — в начале стадии G_1 резко снижается и не возрастает снова до тех пор, пока до начала син-

теза ДНК не останется около 30 мин. Затем во время фазы S их уровень быстро повышается до максимального и остается относительно высоким до окончания фазы M и начала фазы G_1. Каковы ферментативные механизмы регуляции уровня этих веществ, еще не выяснено. По существу, энзимология синтеза эукариотической ДНК находится еще в зачаточном состоянии, поэтому до сих пор нельзя сказать ничего определенного о регуляторных процессах, которые обеспечивают однократность репликации хромосом во время каждой фазы S. Эксперименты со слиянием клеток, находящихся на разных фазах клеточного цикла, возможно, откроют путь к решению этой проблемы. Когда два ядра, одно из которых находится в фазе S, а другое в фазе G_1, сближаются, ядро в фазе G_1 также начинает синтезировать ДНК, что указывает на существование инициирующего фактора (или факторов). Однако слияние двух клеток в фазах S и G_2 не приводит к синтезу ДНК в G_2-ядре или к его подавлению в S-ядре. Вероятно, рефрактерность хромосом в фазе G_2 связана с быстрым «одеванием» вновь образующейся ДНК одновременно синтезируемыми хромосомными белками. Возможно, что для начала нового «тура» синтеза ДНК необходимо, чтобы в одном или нескольких хромосомных белках произошли определенные изменения, связанные с клеточным циклом.

МУТАЦИИ В КЛЕТКАХ, РАСТУЩИХ В КУЛЬТУРЕ

В настоящее время ведется все больше исследований, посвященных мутационному анализу надежно охарактеризованных клеточных линий. Учитывая диплоидную (гетероплоидную) природу таких клеток, следует ожидать, что большинство мутаций, не сцепленных с полом, будет проявляться крайне редко. Поэтому было предпринято много попыток выявить субдиплоидные клеточные линии, в нормальном диплоидном наборе которых отсутствовали бы одна или несколько хромосом. В этом отношении была проделана большая работа с клетками китайского хомячка; во-первых, диплоидный набор у них представлен всего лишь 24 хромосомами, а во-вторых, эти клетки часто дают линии, в которых нет одной или нескольких аутосом. Изучение этих линий уже позволило обнаружить мутации, блокирующие биосинтез некоторых ключевых метаболитов, таких, как глицин, аденин или инозит. Кроме того, широкое использование специфических мутагенов намного повышает частоту таких мутаций.

Ключевую роль в этих экспериментах играют методы отбора желаемых мутантов среди множества нормальных клеток. Лучший из таких методов основан на том, что облучение видимым светом приводит к быстрой гибели клеток, в состав ДНК которых входит модифицированное основание 5-бромурацил (рис. 18-42). Только активно размножающиеся клетки способны включать это основание (или тимин) в ДНК, поэтому те мутировавшие клетки, которые не способны расти, не погибают после облучения видимым светом, в то время как практически все размножающиеся клетки гибнут.

Метод, основанный на применении 5-бромурацила и видимого света, оказался особенно успешным при выделении *температурочувствительных* (*ts*) мутантов, неспособных размножаться или при высоких, или при низких температурах. Мутации этого типа могут затрагивать практически все клеточные функции, поскольку в основе их лежат замены аминокислот, приводящие к утрате функции того или иного белка либо при низкой, либо при высокой температуре. Сейчас уже существуют *ts*-мутанты, дефектные в отношении репликации ДНК, синтеза РНК, синтеза белка и транспорта ионов, а также мутанты, неспособные проходить определенные стадии клеточного цикла. Имеются, кроме того, мутации, влияющие на проявление трансформированного состояния клеток: у одних мутантов это состояние

Рис. 18-12. Применение бромурилдезоксирибозы (5-БУдР) и видимого света для выделения мутантных клеток, неспособных размножаться вследствие недостаточности питания или наличия температурочувствительного жизненно важного фермента (или структурного белка). После обработки мутагеном смешанную популяцию помещают в среду с 5-БУдР, подбирая такие условия, в которых только клетки дикого типа растут и включают 5-БУдР в ДНК. Последующая обработка видимым светом приводит к гибели лишь клеток дикого типа, а мутантные клетки сохраняют жизнеспособность. При добавлении обогащенной среды [либо при понижении (повышении) температуры] мутантные клетки получают возможность расти и образовывать колонии.

может проявляться только при низкой температуре (~30 °С), а у других — только при высокой (~37 °С) (рис. 18-13). Поэтому в настоящее время кажется вероятным, что, как и в случае *E. coli*, получение ключевых мутантов может сыграть решающую роль в понимании важных биологических процессов.

ОСТАНОВКА НА РАННИХ ЭТАПАХ СТАДИИ G_1

Изучение фибробластов, прекративших деление после образования сплошного монослоя, показывает, что все клетки блокированы на ранней стадии фазы G_1. Если рост таких клеток заблокировать преждевременно, удалив из питательной среды такие важные факторы, как изолейцин, глутамин, фосфат или сыворотка, голодающие клетки тоже прекращают деление не на любой стадии клеточного цикла, а всегда проходят через митоз, так что количество ДНК в них становится равным 2N. Все клетки перестают расти на очень раннем этапе фазы G_1, поскольку синтез ДНК начинается примерно через 8 ч после добавления факторов, лимитировавших рост

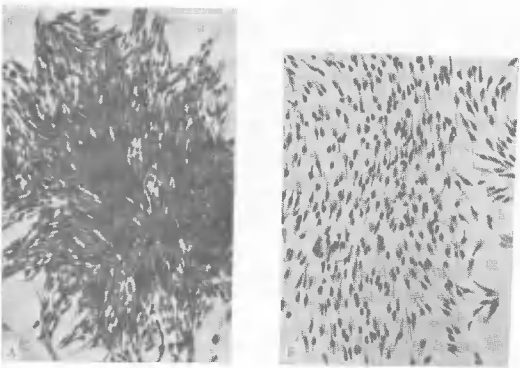


Рис. 18-43. Микрофотография температурочувствительных мутантов трансформированной линии легочных клеток китайского хомячка; трансформированное состояние у них при высоких температурах не проявляется (Miyashita, Kakinaga, Cell, 5, 131, 1975)
А. «Раковый» характер роста при 34°С.
Б. Нормальный характер роста при 39°С.

(что приблизительно соответствует длительности стадии G_1 у этих клеток). Будучи блокированы таким способом в начале фазы G_1, покоящиеся клетки остаются «здоровыми» даже в том случае, если необходимые питательные вещества не поступают в течение времени, достаточного для нескольких последовательных делений. Это характерно и для большинства клеток животных in vivo — они сохраняют жизнеспособность и метаболическую активность, находясь в непролиферирующем состоянии многие месяцы (вплоть до года). Напротив, если к клеткам добавляют такие яды, как колхицин или оксимочевина, то блокады на стадии G_1 не происходит. Колхицин прекращает деление клетки на стадии М, а оксимочевина прерывает синтез ДНК в фазе S. Ингибированные таким способом клетки не способны долго сохранять жизнеспособность и обычно погибают в первые сутки после обработки этими ядами.

Многие раковые клетки утратили регуляторный механизм, заставляющий нормальные клетки при недостаточном питании переходить в состояние покоя в фазе G_1. Поэтому, если по той или иной причине клетки перестают делиться, образуется популяция раковых клеток, блокированных в разных фазах клеточного цикла. Такая популяция бывает значительно менее «здоровой», чем соответствующие нормальные клетки, и вымирает быстрее. Эти наблюдения позволяют объяснить часто наблюдаемую избирательную гибель раковых клеток в присутствии антиметаболитов.

АКТИВАЦИЯ ПОКОЯЩИХСЯ КЛЕТОК В ФАЗЕ G_1 ПОД ВЛИЯНИЕМ МИТОГЕННЫХ СТИМУЛОВ

Под воздействием любого из многочисленных стимулов, в совокупности именуемых *митогенами*, многие клетки, заблокированные в фазе G_1, начинают делиться. Некоторые митогены, такие, как гормон *соматомедин* или специфические «факторы роста», содержащиеся в нормальной сыворотке, являются, по всей вероятности, нормальными физиологическими эффекторами. Однако другие сильные митогены — например, некоторые бактериальные липополисахариды и определенные белки из семян растений, вызывающие агглютинацию клеток (*лектины*), — в нормальных условиях, возможно, никогда не служат стимуляторами митоза. И тем не менее их добавление неизменно приводит к делению покоящихся клеток определенных типов. Точно так же после обработки некоторых типов клеток небольшими количествами протеолитического фермента трипсина или же нейраминидазой (ферментом, отщепляющим сложный аминосахар — сиаловую кислоту — от молекул поверхностных белков) часто наблюдается пролиферация.

Обычно от момента обработки митогеном до инициации синтеза ДНК проходит 8—10 ч, поэтому возникает вопрос о том, в чем же состоит первичное действие различных митогенов. В настоящее время разумнее всего предположить, что большинство митогенов каким-то образом модифицирует поверхность клетки, генерируя сигналы, которые корейным образом изменяют внутриклеточный метаболизм.

СОМАТОМЕДИН КАК ПОСРЕДНИК В МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ГИПОФИЗАРНОГО ГОРМОНА РОСТА

При очистке *сывороточных факторов*, необходимых для роста вторичных фибробластов из куриных и крысиных эмбрионов, была выявлена активность нескольких коротких полипептидов сходной величины (мол. вес около 8000), но различающихся своим зарядом. Эти полипептиды пока не удалось выделить в количествах, достаточных для детального химического анализа. Поэтому нельзя сказать, насколько близки они друг к другу по структуре. Важнее всего то, что эти активные вещества, по-видимому, сходны с соматомедином — полипептидным гормоном, синтезируемым в клетках печени в присутствии гипофизарного гормона роста (рис. 18-14). Хотя давно известно, что от гормона роста зависят размеры тела животного, механизм его действия на молекулярном уровне до последних лет оставался абсолютно непонятным. Затем было обнаружено, что сыворотка крови гипофизэктомированных животных (т. е. животных с удаленным гипофизом), которым вводили гормон роста, содержит фактор, стимулирующий включение SO_4^{2-} в срезы хондроитина (хряща), а также окисление жиров и синтез ДНК. Поскольку сам гормон роста при добавлении его к сыворотке гипофизэктомированных животных не оказывает такого действия, начались поиски активного вещества-посредника. В настоящее время показано, что такой активностью обладает полипептидная фракция с мол. весом около 8000. Она получила название соматомедина за способность регулировать рост большинства соматических тканей.

Работа с соматомедином еще только начата, поэтому нельзя сказать, является ли эта фракция молекулярно гомогенной или существует много различных молекул, индуцирующих деление покоящихся клеток. Хотя, по некоторым данным, в большинстве сывороток содержатся стимулирующие рост молекулы разной величины, это может объясняться тем, что соматомедин образует прочные комплексы с различными сывороточными белками, которые сами по себе активностью не обладают.

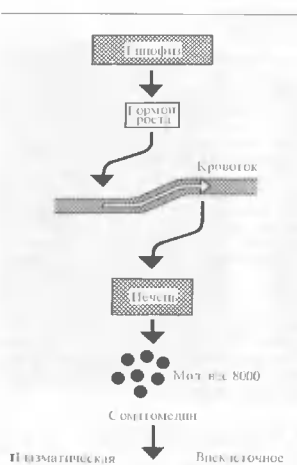


Рис. 18-14. Механизм действия гипофизарного гормона роста (схема). Этот гормон воздействует через посредство соматомедина на связанную с мембраной аденилатциклазу, в результате чего снижается содержание цАМФ в клетке. Сравните с механизмом действия инсулина (рис. 18-18).

По биологическому действию соматомедин легко спутать с гормоном поджелудочной железы *инсулином*. Добавление инсулина к некоторым клеткам (например, куриным), блокированным в фазе G_1 в бессывороточной среде, вызывает цикл деления, что полностью имитирует действие соматомедина. Естественно возник вопрос, не является ли сам инсулин активным сывороточным фактором. Сейчас на этот вопрос, по-видимому, можно ответить отрицательно, так как определяемое иммунологически количество инсулина в сыворотке почти в 1000 раз меньше того, которое необходимо для эффекта стимуляции роста.

Оказалось, что некоторые клетки, не нуждающиеся, как раньше полагали, в факторах сыворотки, сами секретируют соматомедин и тем самым стимулируют свой рост. Определенные клетки печени в культуре секретируют такое большое количество соматомедина, что среда, где они росли, служит самым богатым из известных источников соматомедина (для его очистки).

РЕЦЕПТОРЫ НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК

Ни соматомедин, ни инсулин не проникают внутрь той клетки, на которую они действуют. Эти вещества соединяются со специфическими молекулами-рецепторами, находящимися на плазматической мембране. Каждая клетка-мишень содержит многие тысячи таких рецепторов, которые, как правило, специфичны в отношении соответствующего гормона (фактора роста). Однако соматомедин и инсулин могут связываться с одними и теми же рецепторами на жировых и печеночных клетках; это позволяет предполагать, что молекулы двух гормонов имеют общие структурные особенности. Рецептор жировых клеток для инсулина (и соматомедина) был в высокой степени очищен методом специфической адсорбции (аффинной хроматографии) на колонках, содержащих инсулин, ковалентно связанный с нерастворимым матриксом. Этот рецептор оказался очень крупным гликопротеидом (мол. вес около 300 000), который растворяется только в среде с высоким содержанием углеводов (похожей по составу на двойной липидный слой мембраны).

Насколько сейчас известно, все остальные полипептидные гормоны с небольшим молекулярным весом (например, глюкагон, АКТГ, пролактин и вазопрессин) тоже связываются со специфическими поверхностными рецепторами. Поэтому реакция данной клетки на такие гормоны зависит от того, какие рецепторы имеются на ее поверхности. Например, у малых лимфоцитов (см. стр. 588), нечувствительных к инсулину, инсулиновые рецепторы полностью отсутствуют.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ В ОТНОШЕНИИ СИМПАТИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ

Для роста нейронов симпатической системы необходим специфический фактор, названный фактором роста нервов (ФРН), который представляет собой белок с мол. весом около 26 500 и состоит из двух идентичных полипептидных цепей, построенных из 118 аминокислот каждая. Его можно выделить из различных тканей и из сыворотки, однако до сих пор его в наибольших количествах находили в яде определенных змей и в слюнных железах мыши. Антитела к ФРН, введенные мышам, вызывают специфическую дегенерацию симпатической нервной системы, что указывает на жизненно важную роль этого фактора в поддержании нормального состояния нервных структур. Исследования in vitro на симпатических ганглиях показывают, что добавление ФРН быстро стимулирует различные анаболические процессы, которые приводят к росту нейритов из ганглионарных масс (рис. 18-15). ФРН связывается только с поверхностными рецепторами, находящимися на симпатических нейронах, и не обнаруживает сродства к рецепторам, выделенным из клеток многих других типов (например, клеток сердца или почек). Его связывание не подавляется конкурентно ни гипофизарным гормоном роста, ни фактором роста эпидермиса (см. ниже). Чрезвычайно высокая тканевая специфичность ФРН обусловлена тем, что соответствующие рецепторы имеются только на нервных клетках одного определенного типа.

При изучении последовательности аминокислот в молекуле ФРН выявляются явные гомологии с первичной структурой проинсулина — белка, из которого в дальнейшем образуется инсулин; это позволяет думать об общем эволюционном предшественнике обоих белков, существовавшем в далеком прошлом (рис. 18-16). ФРН, однако, не обнаруживает сродства к рецептору инсулина, а инсулин в свою очередь не связывается с рецепторами ФРН.

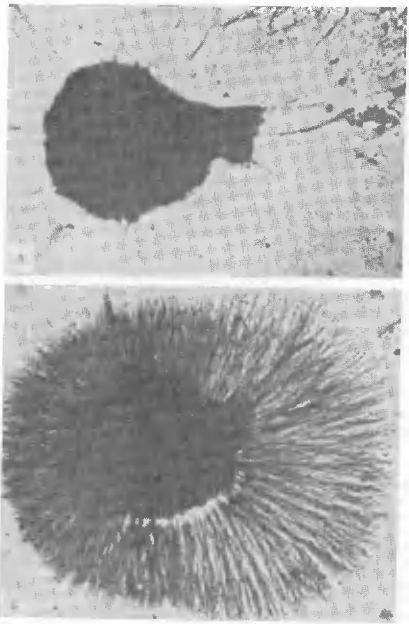


Рис. 18-15. Рост нейритов от клеток симпатического ганглия после стимуляции фактором роста нервов (ФРН) (Levi-Montalcini, Science, 143, 105, 1964).
А. Ганглий куриного эмбриона в «бесфакторной» среде. *Б*. Ганглий в среде, содержащей ФРН из слюны в концентрации 0,01 мкг/мл.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕЦЕПТОРЫ ФАКТОРА РОСТА ЭПИДЕРМИСА

Слюнные железы служат также богатым источником фактора роста эпидермиса (ФРЭ) — полипептида с мол. весом 6400, специфически стимулирующего рост клеток эпидермиса как in vivo, так и in vitro. Специфичность связывания ФРЭ еще детально не изучена, однако уже ясно, что он не связывается ни рецепторами инсулина, ни рецепторами ФРН. Работа с ФРЭ осложнена трудностью получения воспроизводимых результатов при определении его активности, но можно надеяться, что эту

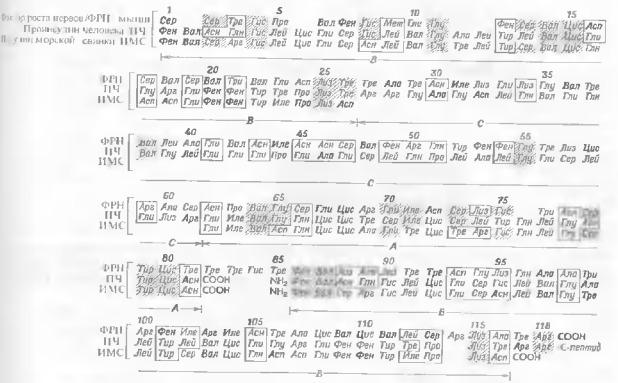


Рис. 18-46. Гомологии в аминокислотных последовательностях фактора роста нервов (ФРН) и инсулина (Frazier et al., Science, 176, 482, 1972).
Первичная структура главной субъединицы ФРН мыши сопоставлена с аминокислотными последовательностями проинсулина человека и инсулина морской свинки. Заштрихованные блоки соответствуют тождественным остаткам, обведенные рамкой блоки отражают отличия, которые могли бы возникнуть в результате замены одного основания в кодоне. Буквами указаны цепи A, B и C инсулина. Сходством первичной структуры определяется сходство трехмерной конформации обеих молекул.

проблему удастся в скором времени решить, и тогда можно будет исследовать механизм его действия после связывания со специфическим рецептором.

ТКАНЬ ГОЛОВНОГО МОЗГА КАК ИСТОЧНИК ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ

Видимо, ничего общего с описанными выше факторами не имеет *фактор роста фибробластов* (ФРФ) — недавно открытый полипептид с мол. весом 13 000. Первоначально он был обнаружен благодаря его способности заменять сыворотку для клеток мышиного эмбриона, растущих в присутствии глюкокортикоидов (род стероидных гормонов). Теперь, однако, стало ясно, что ФРФ не является основным фактором сыворотки, стимулирующим рост; in vivo он находится главным образом в ткани головного мозга. Поэтому можно думать, что в нормальных условиях мишенью для него служит нервная ткань. Если это так, то термин «ФРФ» крайне неудачен. Недавние эксперименты, показавшие, что ФРФ способствует регенерации нервов после удаления конечностей у амфибий, подтверждают это предположение.

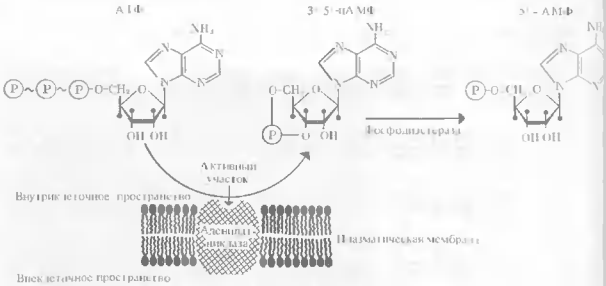


Рис. 18-17. Синтез циклического АМФ (цАМФ) аденилатциклазой, связанной с мембраной. Внутри клетки цАМФ расщепляется под действием фосфодиэстеразы. Такие вещества, как адреналин, простагландины, глюкагон и АКТ могут стимулировать синтез цАМФ опосредованно через связанные с мембраной рецепторные белки.

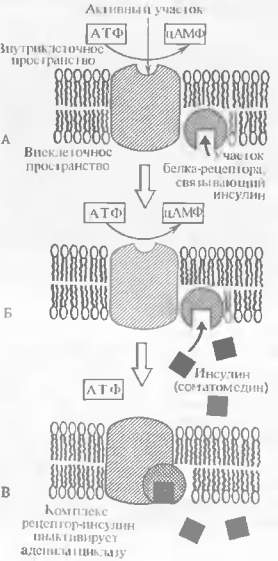


Рис. 18-18. Схема, показывающая, каким образом гормон (инсулин), присоединяясь к белку-рецептору, инактивирует аденилатциклазу, связанную с плазматической мембраной, что ведет к снижению концентрации цАМФ в клетке.

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ, СВЯЗАННОЙ С МЕМБРАНОЙ, В РЕЗУЛЬТАТЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГОРМОНОВ С РЕЦЕПТОРАМИ

Присоединение инсулина или соматомедина к поверхностным клеточным рецепторам мгновенно приводит к ингибированию связанного с мембраной фермента (аденилатциклазы), ответственного за синтез цАМФ (рис. 18-17). Поэтому образование комплекса инсулин — рецептор быстро снижает внутриклеточный уровень цАМФ, что в свою очередь (см. ниже) сдвигает общее направление клеточного обмена в сторону анаболизма (процессов синтеза) (рис. 18-18). Однако не всякое взаимодействие между гормоном и поверхностным рецептором приводит к ингибированию аденилатциклазы. Глюкагон, обладающий антиинсулиновым эффектом, при соединении со своим рецептором стимулирует активность аденилатциклазы. Точно так же связывание АКТГ, адреналина или простагландина E_1 с поверхностными рецепторами приводит к повышению уровня цАМФ внутри клетки. Пока еще никому не удалось получить высокоочищенную аденилатциклазу, отделив ее от мембраны; поэтому мы ничего не знаем о том, каким образом активность этого фермента может изменяться при соединении рецептора с соответствующим гормоном. Скорее всего между рецептором и аденилатциклазой имеется непосредственный физический контакт. Однако ввиду полужидкого характера клеточной поверхности отдельные участки большинства мембран постоянно меняют свое ближайшее окружение, поэтому выяснение механизма регуляции аденилатциклазы может оказаться очень трудной задачей. Такие митогены, как трипсин и конканавалин А (один из лектинов), также ингибируют аденилатциклазу. Трипсин отщепляет фрагменты от многих мембранных белков, что приводит к повышению текучести мембран. Поэтому нельзя, прямо или косвенно он воздействует на аденилатциклазу. Митогенная активность конканавалина А связана с его способностью прочно присоединяться к клеточной мембране, причем надо отметить, что он проявляет высокое сродство к инсулиновому рецептору.

Фактор роста нервов, однако, не оказывает никакого влияния на уровень цАМФ. При связывании ФРН с соответствующими рецепторами активность аденилатциклазы не изменяется; добавление цАМФ к клеткам симпатического ганглия не влияет на скорость роста нейритов.

ПЛЕЙОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ цАМФ

Приводит ли снижение уровня цАМФ само по себе к делению покоящихся клеток, остается совершенно неясным. Когда цАМФ присутствует в высоких концентрациях, клетки находятся в состоянии покоя, для которого характерны низкий уровень активного переноса питательных веществ в клетку, быстрый распад жирных кислот и белков и низкий уровень синтеза РНК и белка. Напротив, при низком уровне цАМФ повышается поглощение сахара, синтетические реакции ускоряются, а катаболические процессы, в частности сгорание жиров, замедляются. Все эти многообразные эффекты, видимо, связаны с тем, что при высоком уровне цАМФ активируется множество различных фосфорилирующих ферментов (киназ); возможно, что сдвиг метаболизма в сторону распада или синтеза зависит от того, фосфорилированы или нет соответствующие ферменты.

ПОВЫШЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ цГМФ ПОСЛЕ МИТОГЕННОЙ СТИМУЛЯЦИИ

В клетках, блокированных в фазе G_1, уровень цАМФ значительно (в 10—50 раз) выше, чем уровень циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ). Однако через несколько минут после введения митогена, воздействующего на поверхность клетки, концентрация цГМФ быстро возрастает и часто достигает уровня цАМФ (рис. 18-19). Вначале было непонятно, как осуществляется повышение уровня цГМФ, поскольку считалось что большая часть гуанилатциклазы (в отличие от аденилатциклазы, которая всегда связана с мембраной) содержится в цитоплазме в свободном виде. В настоящее время есть данные в пользу того, что значительная часть этого фермента находится в связи с мембраной; это позволяет предполагать прямое влияние взаимодействия между гормоном и мембранным рецептором на активность такой гуанилатциклазы.

цГМФ, подобно цАМФ, видимо, стимулирует различные протеинкиназы, причем некоторые киназы явно проявляют специфичность в отношении цГМФ. В связи с этим возникает вопрос, не могут ли в некоторых случаях именно цГМФ-специфические киназы (а вовсе не цАМФ-специфические) служить ключевыми ферментами, запускающими клеточное деление. В пользу этого говорит то, что при активации мутагенами малых лимфоцитов не отмечается каких-либо изменений содержания в них цАМФ. Более того, количество цГМФ в таких лимфоцитах всегда быстро увеличивается вскоре после добавления митогена.

АКТИВАЦИЯ СИНТЕЗА РНК В ЯДРЕ

После добавления митогена, действующего на поверхность клетки, уже примерно через 10 мин отмечается ускорение синтеза РНК. Каким образом снижение концентрации цАМФ (или, возможно, подъем уровня цГМФ) активирует синтез РНК, пока неизвестно. В настоящее время пытаются выяснить, можно ли при этой активации обнаружить изменения в различных хромосомных белках. Особенно тщательно на протяжении клеточного цикла был изучен уровень фосфорилирования пяти главных гистонов, а также различных кислых хромосомных белков; при этом надеялись выявить молекулы, фосфорилирование или дефосфорилирование которых служило бы пусковым механизмом для синтеза специфической

Рис. 18-19. Повышение уровня цГМФ и снижение концентрации цАМФ после воздействия митогенного стимула (добавление сыворотки) на клетки, блокированные в фазе G_1

РНК, определяющего начало нового клеточного цикла. Хотя в фазе G_1 удается обнаружить изменения как в гистонах, так и в негистоновых белках, их значение для активации синтеза РНК неясно; вероятно, этот вопрос останется неразрешенным до тех пор, пока не будут разработаны системы, позволяющие изучать активацию хроматина in vitro.

ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ СТЕРОИДОВ

Механизм, при помощи которого определенные стероидные гормоны, в частности эстрогены, стимулируют клеточную пролиферацию, может в корне отличаться от механизма действия полипептидов, связываемых поверхностными рецепторами, например соматомедина. Последние вызывают только пролиферацию и не изменяют состояние дифференцировки клеток-мишеней. Напротив, эстроген не только запускает пролиферативный рост матки (или яйцевода), но и радикально изменяет характер клеточного метаболизма. В яйцеводе курицы первая видимая реакция на эстроген — это заметное увеличение размеров клеток, сопровождающее перестройку белоксинтезирующего аппарата для выработки огромных количеств главного продукта секреции — альбумина. Нам пока еще не известно, являются ли пролиферативные процессы, наблюдаемые при дифференцировке яйцевода, прямым результатом действия эстрогена или же отдаленным следствием ряда прогрессивно нарастающих биохимических изменений, происходящих после индукции синтеза специфических белковых секретов.

Во всяком случае, стероидные гормоны не оказывают прямого влияния на концентрации циклических нуклеотидов. Будучи углеводородами, они легко проходят через плазматическую мембрану и взаимодействуют в цитоплазме со своими белковыми рецепторами (см. рис. 17-33). Образующиеся комплексы стероид — рецептор попадают затем в ядро и связываются специфическими участками хромосом. Как полагают, последующая активация синтеза специфических РНК является прямым результатом присоединения таких комплексов к хроматину и не связана с изменением хромосомных белков под действием какого-либо из циклических нуклеотидов.

ЭРИТРОПОЭТИН ИНДУЦИРУЕТ ВЫРАБОТКУ ЭРИТРОЦИТОВ

Содержание эритроцитов в крови находится под контролем определенного вещества — эритропоэтина, гликопротеида с мол. весом около 46 000. Он вызывает избирательную пролиферацию и дифференцировку проэритробластов — непосредственных клеточных предшественников эритроцитов (рис. 18-20). Самым ранним эффектом эритропоэтина, который удается обнаружить, является селективная стимуляция синтеза РНК. Она наблюдается уже через час после добавления эритропоэтина и затрагивает синтез тРНК, рРНК и мРНК. Молекулы мРНК, кодирующие гемоглобин, появляются лишь спустя примерно 10 ч; это указывает на то, что образование гемоглобина представляет собой конечный результат сложного процесса дифференцировки, приводящего не только к синтезу гемоглобина, но и к митотическим делениям, в результате которых увеличивается число клеток, чувствительных к эритропоэтину. Проникает ли эритропоэтин в клетки-мишени или же связывается со специфическими рецепторами на их поверхности, неизвестно. К сожалению, эритропоэтин трудно выделить, и получить его в чистом виде до сих пор не удалось.

ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЛЕЙКОБЛАСТОВ В ГРАНУЛОЦИТЫ И МАКРОФАГИ НУЖЕН БЕЛКОВЫЙ ИНДУКТОР

Гранулоциты и макрофаги крови образуются в результате процессов дифференцировки и митотического деления из общих предшественников (бластов), находящихся в костном мозге (рис. 18-20). В настоящее время, после открытия специфического белкового индуктора *гранулопоэтина* [вначале его называли фактором, стимулирующим колонии (ФСК), или индуктором гранулоцитов и макрофагов (ИГМ)], эти процессы можно изучать in vitro. Бо́льшая часть активности сосредоточена в гликопротеиде с мол. весом около 70 000, который содержится в сыворотке в концентрациях, физиологически эффективных in vitro. В каких клетках вырабатывается в норме этот гликопротеид, неизвестно, так как его выделяют клетки многих типов (в том числе сами фибробласты и макрофаги!) В присутствии ФСК бласты-предшественники размножаются в культуре с образованием колоний, состоящих вначале из недифференцированных

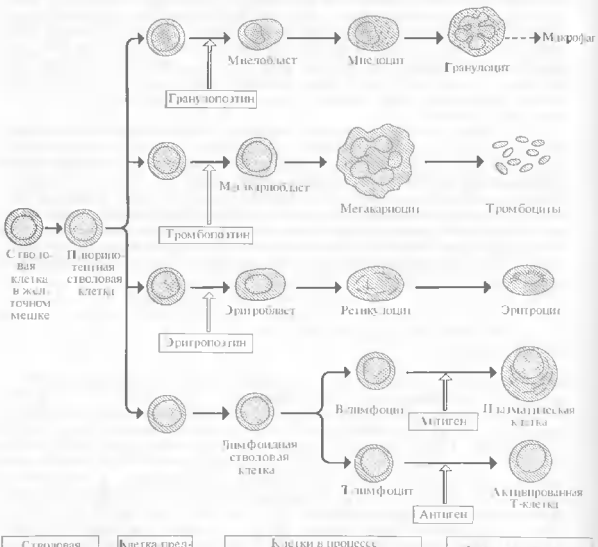


Рис. 18-20. Схема вероятных путей дифференцировки различных клеток крови у позвоночных.

Рис. 18-21. Образование жировых клеток в сплошном слое мышиных фибробластов (линия 3T3 L1) (Green, Meuth, Cell, 3, 127, 1974). Через три недели после слияния колоний культуру окрасили масляным красным О, который избирательно окрашивает в красный цвет отложения жира. Заметные различия в распределении и интенсивности окраски указывают на то, что доля клеток, подвергающихся жировому перерождению, в разных колониях варьирует.

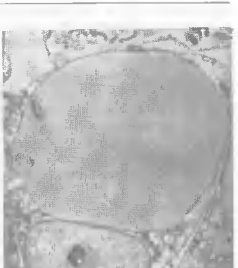


Рис. 18-22. Тонкий срез зрелой жировой клетки. Электронная микрофотография Элеин Ленк из Массачусетского технологического института (Green, Meuth, Cell, 3, 127, 1974). Виден узкий ободок цитоплазмы вокруг большой капли жира. Ядро занимает эксцентрическое положение, типичное для жировой клетки.

клеток. Однако при последующих делениях возникают сначала гранулоциты, а затем макрофаги. По-видимому, бласты сначала дифференцируются в гранулоциты, которые в свою очередь могут превращаться в макрофаги. Пока еще не ясно, индуцируются ли оба этапа дифференцировки одной и той же молекулой или, может быть, ФСК представляет собой смесь двух веществ с различной активностью.

ПРЕВРАЩЕНИЕ ФИБРОБЛАСТОВ В ЖИРОВЫЕ КЛЕТКИ

Не для всех процессов дифференцировки нужны специфические внешние индукторы. Например, для превращения фибробластов в жировые клетки необходимо только обилие питательных веществ в условиях, когда деление клеток невозможно (например, при переуплотнении клеточной популяции). Клетки линии 3T3, размножаясь, всегда сохраняют форму фибробластов. Однако после образования сплошного слоя повышается вероятность их превращения в очень крупные, округлые жировые клетки (рис. 18-21). В таких условиях не все фибробласты подвергаются дифференцировке, и только для некоторых линий 3T3 (так называемых преадипозных линий) характерна высокая вероятность превращения в жировые клетки. К накоплению жира приводит отсутствие роста, а не контакт между заторможенными клетками. Это можно показать, если суспендировать одиночные клетки 3T3 в метилцеллюлозном геле. В таких условиях клетки могут

увеличиваться в размерах, но не способны синтезировать новую ДНК и делиться. По мере их укрупнения в них накапливается нейтральный жир (триглицерид) и в конце концов вся середина клетки заполняется огромной каплей жира, оттесняющей ядро к клеточной мембране (рис. 18-22).

До тех пор пока в цитоплазме сохраняется эта огромная жировая капля, клетка не может делиться. Однако если неблагоприятные условия питания приводят к расщеплению жира на богатые энергией продукты, то клетка вновь принимает форму фибробласта, и тогда она способна вступать в новые циклы роста и деления. Таким образом, нельзя сказать, что дифференцировка сама по себе несовместима с дальнейшим делением. Только в том случае, когда функция высокодифференцированной клетки требует сохранения неизменной физической формы, митоз становится невозможным. Ясно, что для нервных клеток с их сложными взаимными связями нет никакого смысла обладать способностью к митотическому делению; поэтому они и утратили эту способность. Так же как и разнообразные клеточные элементы крови, они возникают в результате деления частично дифференцированных, функционально неактивных предшественников, называемых нейробластами.

ПОДДЕРЖАНИЕ НЕПРЕРЫВНОЙ КУЛЬТУРЫ МИОБЛАСТОВ

В настоящее время разработан метод культивирования миобластов — предшественников многоядерных клеток поперечнополосатой мускулатуры. Хотя миобласты имеют вид по существу недифференцированных клеток, в культуре они обычно делятся всего лишь несколько раз, а затем начинают агрегировать и сливаются в постмитотические многоядерные мышечные клетки, которые вскоре приобретают поперечную исчерченность и способность к сокращению. На этой стадии процесс дифференцировки уже необратим и дальнейший синтез ДНК невозможен. Тем не менее многоядерные клетки сохраняют способность вырабатывать мРНК для многих белков, непрерывный синтез которых необходим для нормального функционирования мышцы.

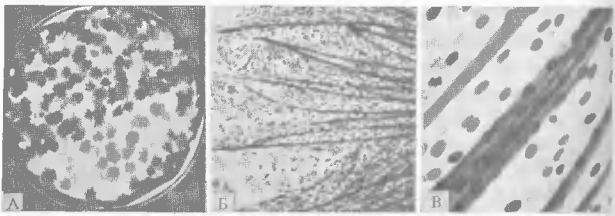


Рис. 18-23. Слияние клеток и развитие поперечнополосатых мышечных волокон в колониях размножающихся миобластов (Yaffee, Proc. Nat. Acad. Sci., **61**, 477, 1968).
А. Чашка Петри, на которую 13 дней назад было помещено 150 миобластов. *Б.* Часть отдельной колонии (микрофотография); видно большое число ядер вокруг каждого из развивающихся волокон. *В.* При еще большем увеличении видна исчерченность отдельных волокон.

Такая необратимая дифференцировка не является, однако, неизбежной участью всех делящихся миобластов. Недавно удалось подобрать условия, при которых культуру многенных клеток можно поддерживать непрерывно. Ключевую роль играют здесь условия, подавляющие слияние клеток (в частности, низкое содержание Ca^{2+} или периодическое добавление трипсина), а также применение сильно обогащенной сыворотки плода. Таким образом, передача дочерним клеткам способности к специфической дифференцировке не всегда связана с видимыми морфологическими признаками. Все потомки единичного клонированного миобласта могут давать колонии, в которых образуются мышечные волокна (рис. 18-23).

ПОИСКИ ХИМИЧЕСКИХ РАЗЛИЧИЙ МЕЖДУ НОРМАЛЬНЫМИ И РАКОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Почти одновременно с исследованием химизма нормальных клеток ученые пытались выяснить, насколько молекулярные механизмы раковых клеток сходны с нормальными. Точно так же если в раковой клетке находили какую-нибудь новую химическую реакцию (или новый фермент), то часто тут же стремились удостовериться, нет ли такой же реакции и в нормальных клетках. Нередко эти поиски приводили как будто к интересному результату — оказывалось, что опухолевые клетки содержат значительно больше (или, наоборот, меньше) какого-то вещества, чем нормальные клетки той же ткани. Однако при дальнейшем анализе надежды на то, что данное отличие и есть основа ракового фенотипа, обычно не оправдывались. Главная трудность при таком подходе заключалась в том, что невозможно было решить, является ли то или иное изменение первичным нарушением обмена, ведущим к раку, или же это всего лишь несущественное, вторичное следствие, обусловленное первичной причиной. Более того, во многих экспериментах такого рода нельзя было подобрать хороший контроль, с которым можно было бы сравнивать клетки растущей опухоли, поскольку мы никогда не можем точно знать, в какого рода нормальных клетках произошла опухолевая трансформация. К тому же сравнения часто проводились между клетками из активно растущих опухолей животных и их так называемыми «нормальными» аналогами, растущими в культуре. Между тем многие «нормальные» клеточные линии в ходе адаптации к росту в искусственных условиях клеточной культуры могут претерпевать ряд генетических изменений.

Поэтому в настоящее время все больше проявляется тенденция сравнивать линии «нормальных» клеток (например, 3T3) с трансформированными линиями, возникающими при воздействии на «нормальные» клетки онкогенного вируса. Но здесь опять-таки следует опасаться ошибочных выводов, так как при дальнейшем росте соответствующих нормальных и трансформированных клеточных линий в культуре в них могут возникать новые спонтанные мутации. Даже при использовании так называемых параллельных культур нормальных и трансформированных клеток многие биохимики ухитрились спутать независимые вторичные изменения с первичным метаболическим дефектом, обусловливающим раковый статус. Изменения, которые вначале считали ключевыми для данного типа рака, очень часто не удавалось обнаружить в других раковых клетках того же самого типа. Поэтому сейчас при изучении биохимии рака чаще всего работают с линиями клеток, трансформированных мутантами опухолеродных вирусов (см. стр. 654); образующиеся клетки ведут себя как раковые при низких температурах (скажем, 32 °С) и как нормальные при более высоких температурах (например, 38 °С).

ВАРБУРГ И ЗНАЧЕНИЕ УСИЛЕННОГО ГЛИКОЛИЗА

Впервые существенное биохимическое различие между нормальными и раковыми клетками было открыто более пятидесяти лет назад немецким биохимиком Варбургом. Он наблюдал, что практически все виды раковых клеток, формирующих обычные опухоли (в противоположность раку крови — лейкозу), выделяют значительно больше молочной кислоты, чем нормальные клетки. Это отмечается как при росте их в виде компактных опухолей у животных, так и при размножении в виде одиночных клеток в культуре. Со времени этого первого наблюдения, сделанного в начале 20-х годов, значение избыточного образования молочной кислоты (часто называемого эффектом Варбурга) изучалось вновь и вновь, и тем не менее его истинное значение остается неясным. Метаболический источник избытка молочной кислоты, однако, известен. Она образуется из глюкозы в процессе гликолиза. Но эта интенсификация брожения (анаэробного обмена) — не результат недостаточности каких-либо ферментов, участвующих в различных окислительных процессах (например, окислительное фосфорилирование протекает нормально). Тем не менее опухолевые клетки потребляют значительно больше глюкозы, чем это нужно для роста и размножения.

Это наводит на мысль, что клетки утратили нормальный механизм, регулирующий поглощение глюкозы. К сожалению, несмотря на долгие годы, потраченные множеством биохимиков, никому до сих пор не удалось узнать, как вообще регулируется потребление глюкозы. Можно думать, что в опухолевой клетке нет каких-то мембранных белков, участвующих в активном транспорте глюкозы через плазматическую мембрану. Но даже если это подтвердится, мы все равно не сможем связать подобные изменения с потерей нормального контроля пролиферации.

КОНТАКТНОЕ ТОРМОЖЕНИЕ ДВИЖЕНИЯ

Веским доводом, говорящим о существенном различии между плазматическими мембранами раковых и нормальных клеток, служит их поведение при взаимном контакте. У нормальных клеток такой контакт часто приводит к адгезии, и при этом беспорядочные амебоидные движения, с помощью которых клетка перемещается по поверхности субстрата, замедляются (*контактное торможение движения*). В самом начале этого процесса (через 10-20 с после контакта) под волнистыми краями в цитоплазме, которая кажется дезорганизованной, начинают образовываться пучки, содержащие актин (рис. 18-24). В то же самое время волнистые края мало-помалу утрачивают свойственную им морфологию и вскоре перестают отличаться от менее активных областей плазматической мембраны. Образование новых внутриклеточных актиновых пучков в ответ на контакт с другой клеткой может, таким образом, быть существенным моментом в контактном торможении движения.

ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЙ РОСТ КАК СЛЕДСТВИЕ УТРАТЫ НОРМАЛЬНОГО КЛЕТОЧНОГО СРОДСТВА

Способность нормальных клеток к слипанию (адгезии) характеризуется значительной специфичностью. Например, печеночные клетки предпочитают слипаться с другими такими же клетками и проявляют лишь небольшое сродство (если оно вообще имеется) к клеткам других типов — скажем, к клеткам почек. Этот тип специфичности был изящно продемонстрирован в экспериментах, в которых ткань печени или почек диспергирова-

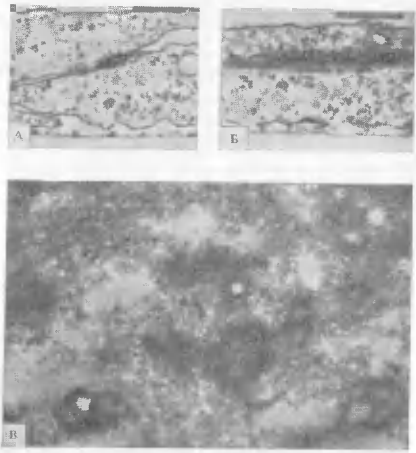


Рис. 18-24. *А* и *Б*. Электронные микрофотографии «адгезивных бляшек» (указаны стрелками), образующихся в течение 10-20 с при контакте волнистых краев двух клеток. Упорядоченные группы актинсодержащих нитей формируются под «бляшками» менее чем за минуту. Масштаб: длина черной полоски 0,5 мм [Haeysman in: Locomotion of Tissue Cells, CIBA Foundation Symp., 14 (new series), 190, 1973]. *В*. Электронная микрофотография тонкого среза, проходящего над самой областью соприкосновения поверхностей двух клеток из эмбриона хомячка (× 42 000). Видны кристаллоподобные решетки адгезивных бляшек (темные участки). (С любезного разрешения д-ра Голдмана, Карнеги-Меллонский университет).

ли на отдельные клетки с помощью небольших количеств протеолитического фермента трипсина. При последующей инкубации без трипсина эти клетки вновь агрегировали, образуя скопления, близкие по структуре к исходному органу (как бы маленькие кусочки исходной ткани). В смешанных суспензиях, состоящих из клеток двух типов — почечных и печеночных — опять-таки образовывались два типа скоплений — кусочки ткани печени и почек. Таким образом, почечная клетка предпочитает склеиваться с почечной, а печеночная — с печеночной.

Однако в аналогичных опытах с раковыми клетками нормальное клеточное сродство уже не проявляется. Если, например, смешать клетки рака кожи с нормальными клетками почек, образуются агрегаты, в которых раковые клетки лежат бок о бок с почечными. Видимо, неспособность раковых клеток образовывать прочные адгезивные связи позволяет им внедряться в скопления клеток почти любого типа. В этом, возможно, и кроется причина того, что злокачественные клетки легко инвазируют различные здоровые органы.

Природа «липкого» вещества, используемого нормальными клетками для соединения друг с другом или для прикрепления к твердым (стеклянным или пластмассовым) поверхностям, до сих пор не выяснена. На электронных микрофотографиях клеток, прикрепленных к стеклу (или слипшихся друг с другом), можно видеть плотные адгезивные области (бляшки) толщиной 60—80 Å, расположенные под самой плазматической мембраной. Их химическую природу установить пока не удалось (рис. 18-24). В последние годы было выдвинуто много гипотез о слипании клеток за счет взаимодействия углеводных остатков, входящих в состав поверхностных гликопротеидов. Однако до тех пор, пока молекулярные свойства наружных поверхностей клеток не будут изучены более детально, проверить эти гипотезы не представляется возможным.

ДЕЗОРИЕНТАЦИЯ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

Значительно более слабая адгезивность раковых клеток и часто происходящая миграция их в нежелательных направлениях как будто бы позволяют предположить, что они лучше приспособлены для движения, чем

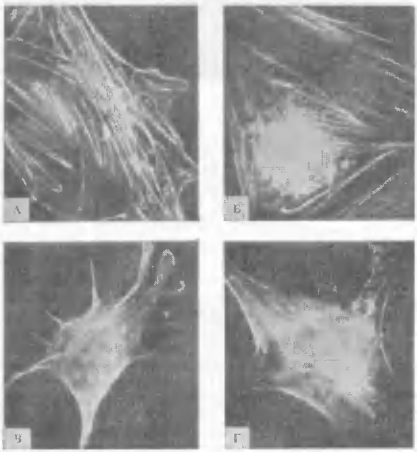


Рис. 18-25. Сравнение укладки «мышечных» белков в нормальных и трансформированных клетках мыши (Pollack et al., Proc. Nat. Acad. Sci., **72**, 994, 1975)

Иммунофлуоресцентный метод позволил выявить актин в «нормальной» клетке 3T3 (*А*), миозин в клетке 3T3 (*Б*), актин в клетке 3T3, трансформированной вирусом SV40 (SV3T3) (*В*) и миозин в клетке SV3T3 (*Г*).

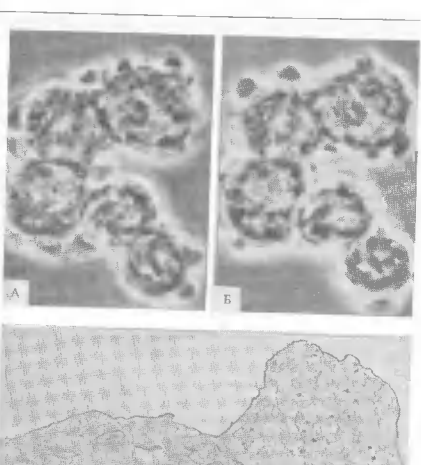


Рис. 18-26. Образование «пузырьков» на поверхности раковой клетки. *А* и *Б*. В тех раковых клетках, которые возникли в результате трансформации аденовирусом 5, образование пузырьков характерно для всех фаз клеточного цикла, за исключением фазы М. Фото сделаны с интервалом в 1 мин, и видно, что «пузырьки» весьма нестабильны — время их жизни составляет обычно меньше минуты. В раковых клетках других типов пузырьки образуются реже. Вместо них возникают многочисленные микроворсинки и волнистые выступы, которые, так же как и пузырьки, постоянно выпячиваются наружу и затем втягиваются обратно (R. Goldman et al., Cold Spring Harbor Symp., XXXIX, 601, 1975). *В*. Электронная микрофотография тонкого среза через участок куриной клетки, трансформированной вирусом саркомы Рауса. Виден крупный «пузырек». Он заполнен главным образом свободными полирибосомами. Отсутствие связанных с мембраной телец, таких, как митохондрии и элементы эндоплазматической сети, позволяет предположить, что эти структуры каким-то образом прикреплены к ядру. (Фото любезно предоставлено Линь-Бо-Ченем и Элейн Ленк, Массачусетский технологический институт.)

соответствующие нормальные клетки. Однако исследование разнообразных раковых клеток показывает, что сократимые белки в них расположены гораздо менее организованно, чем в нормальных клетках той же ткани. Например, в мигрирующих фибробластах имеется множество тончайших фибрилл мышечного типа, в которых мышечные белки (актин,

миозин, тропомиозин) расположены регулярным образом, что обеспечивает координированное движение клетки. Трансформированные же клетки содержат значительно меньше таких фибрилл, а сами фибриллы обычно гораздо тоньше (рис. 18-25). Поэтому «прикосновение» к раковой клетке не приводит к прекращению движения, а часто вызывает неупорядоченное образование на ее поверхности новых углублений и выпячиваний в количестве, не характерном для нормальных клеток (рис. 18-26).

Причина пониженной способности раковых клеток к образованию большого числа высокоорганизованных мышечных фибрилл неясна. Дело, однако, не в недостатке структурных мышечных белков. Актина, например, в опухолевой клетке столько же, сколько и в нормальной. Поэтому можно думать, что первичный дефект состоит в изменении одного или нескольких компонентов плазматической мембраны, препятствующем прикреплению отдельных нитей актина к ее внутренней поверхности. Для уточнения этого вопроса потребуется, вероятно, гораздо больше сведений о тонкой структуре различных компонентов поверхностной мембраны, а также отдельных мышечных белков.

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ОСАЖДЕНИЕ РАКОВЫХ КЛЕТОК ЛЕКТИНАМИ

Дополнительные данные в пользу того, что мембрана раковой клетки существенно отличается от мембраны нормальной клетки, были получены в экспериментах с лектинами. Оказалось, что ряд лектинов (белки, вызывающие агглютинацию клеток) избирательно осаждает опухолевые клетки. Например, лектин гликопротеидной природы из семян пшеницы (агглютинин зародыша пшеницы) вызывает специфическую агглютинацию раковых клеток практически любого типа, образующих солидные опухоли. Впачале думали, что лектины прикрепляются только к опухолевым клеткам, связываясь с углеводсодержащими белковыми рецепторами, специфическими для поверхности раковых клеток. Сейчас, однако, получены данные о том, что нормальные и раковые клетки, по-видимому, не различаются по числу и типу агглютининовых рецепторов; разница лишь в том, что рецепторы раковой клетки гораздо легче диффундируют в двойном липидном слое, чем рецепторы соответствующих нормальных клеток. Поэтому в раковой клетке они значительно легче «скучиваются» и связываются между собой, образуя плотные участки (рис. 18-27), которые прочно удерживают вместе агглютинированные клетки (рис. 18-28). У нормальных клеток лектиновые рецепторы по какой-то причине не обладают такой свободой движения, как у раковых клеток.

Очень важным для понимания природы агглютинации, вызываемой лектинами, может оказаться тот недавно установленный факт, что нормальные клетки в фазе митоза (но не в фазах G_1, S или G_2) агглютинируются так же легко, как раковые клетки в фазе G_1, S или G_2. Возможно, что эта повышенная способность делящихся клеток к агглютинации обусловлена почти полным исчезновением организованных мышечных белков в поверхностной зоне цитоплазмы. Прикрепление внутриклеточных волокон миофибриллярного типа к плазматической мембране могло бы каким-то образом ограничивать свободу диффузии многих мембранных белков.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТКИ ПРИ ТРАНСФОРМАЦИИ

Химические методы, позволяющие сравнивать состав плазматических мембран нормальных и трансформированных клеток, появились лишь недавно. Поэтому, несмотря на большой интерес к проблеме, полученные

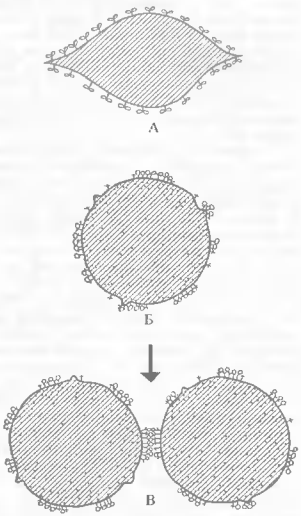


Рис. 18-27. Механизм, с помощью которого можно объяснить избирательное осаждение опухолевых клеток агглютинирующими белками (лектинами) (Nicolson, Nature New Biology, (239, 193, 1972).
А. В нормальных клетках места связывания (рецепторы) агглютинина разбросаны на клеточной поверхности случайным образом, что не способствует агглютинации. *Б.* Агглютининовые рецепторы опухолевых клеток более подвижны и легче образуют скопления, в которых они связываются между собой поливалентными агглютининами. *В.* Агглютинация происходит тогда, когда такие же связи образуются между скоплениями рецепторов на разных клетках

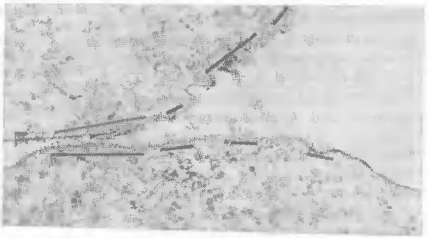


Рис. 18-28. Места клеточных контактов в агрегате клеток SV3T3, агглютинированных комплексом конканавалина с ферритином (× 82 000) (Nicolson, in: Control of Proliferation in Animal Cells, Clarkson and Baserga (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, 1974). Концентрация ферритина в пространстве между агглютинированными клетками выше, чем в близлежащих областях мембраны.

данные все еще крайне неполны и не всегда надежны. Эта проблема очень трудна из-за сложности строения большинства плазматических мембран, содержащих как минимум сотни различных компонентов. По необходимости внимание исследователей было сосредоточено либо на основных структурных компонентах, либо на тех относительно немногочисленных мембранных ферментах, активность которых легко определять. Поэтому если свойства мембраны раковой клетки зависят от изменения какого-то в количественном отношении второстепенного вещества или еще не известного фермента, то до разрешения этой проблемы может пройти много лет.

Кроме того, становится все более очевидным, что и структура нормальных плазматических мембран не остается неизменной. Природа групп, «высовывающихся» с наружной поверхности, не только изменяется в различные фазы клеточного цикла, но и в значительной степени зависит от контактов с другими клетками. При сравнении нормальных и трансформированных клеток нужно проявлять крайнюю осторожность, если нет уверенности в том, что оба вида клеток взяты в одной и той же фазе клеточного цикла, при одной и той же плотности клеточной популяции и при одинаковых условиях роста.

В настоящее время более или менее точно известно, что относительные количества четырех главных фосфолипидов, образующих двойной липидный слой, при раковой трансформации не изменяются. Однако наблюдались отличия, которые иногда могли показаться весьма специфическими; они касались гликопротеидных и гликолипидных молекул, погруженных в бимолекулярный слой липида (рис. 16-3). В частности, многочисленные исследования были посвящены ганглиозидам (рис. 18-29)— сложным гликолипидам, содержащим сиаловую кислоту. В некоторых раковых клетках мышей количество более сложных ганглиозидов специфически снижено, так же как и активность ферментов, участвующих в их биосинтезе. Совершенно неясно, однако, служат ли эти изменения первичной причиной трансформации. Во-первых, они часто появляются уже после характерного изменения морфологии раковой клетки (при вирусной трансформации). Во-вторых, и это еще важнее, в других трансформированных линиях мышиных клеток содержание ганглиозидов совершенно нормально. Таким образом, можно предполагать, что либо «раковые» свойства мембраны могут быть обусловлены изменением в одном из многих различных молекулярных компонентов, либо снижение содержания ганглиозидов — признак несущественный, возникающий в резуль-

Таблица 18-3 Характеристики главных полипептидов, концентрация которых снижается после трансформации куриных клеток вирусом саркомы Рауса (по данным Robbins et al., Cold Spring Harbor Symposium, XXXIX, 1173, 1975)

Белок	Мол. вес [1]	Локализация в клетке	Углеводные остатки	Чувствительность к протеазам	Время выключения синтеза после трансформации
Z	230 000	На наружной поверхности	?	Очень чувствителен к трипсину и коллагеназе	Несколько дней
Ω	206 000 (миозин?)	Прикреплен к внутренней поверхности клеточной мембраны (?)	?	Нечувствителен	3 ч
Δ	47 000	В плазматической мембране	Есть	»	3,6 ч

[1] По данным электрофореза в полиакриламиде с додецилсульфатом натрия. Этот метод дает завышенные оценки молекулярного веса, если белок содержит много сахарных групп.

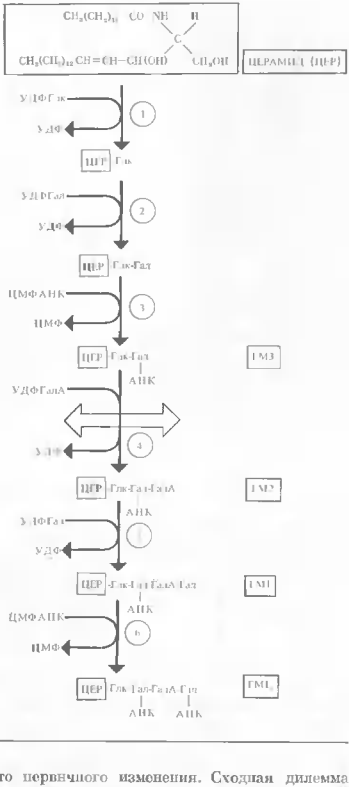


Рис. 18-29. Синтез ганглиозидов. Горизонтальной стрелкой указан этап, который, по-видимому, блокирован в опухолевых клетках. Нормальные клетки содержат все четыре ганглиозида, в то время как в опухолевых имеется в основном лишь самый простой из них — ГМ3. Указан углеродный атом церамида, к которому последовательно присоединяются остатки сахаров. Глк — глюкоза, Гал — галактоза, АНК — ацетилнейраминовая кислота, ГалА — N-ацетилгалактозамин. Ферменты обозначены цифрами: *1* — глюкозилтрансфераза, *2* — галактозилтрансфераза, *3* — сиалилтрансфераза, *4* — ацетилгалактозаминилтрансфераза, *5* — галактозилтрансфераза, *6* — сиалилтрансфераза.

тате отбора после какого-то первичного изменения. Сходная дилемма встает и при оценке изменений гликолипидов, не содержащих сиаловой кислоты, в клетках хомячков. Опять-таки выясняется, что некоторые линии трансформированных клеток содержат менее сложные компоненты (рис. 18-30). Но и здесь такие изменения либо возникают не на самых ранних этапах вирусной трансформации, либо отмечаются не во всех линиях клеток, трансформированных данным вирусом.

В последние годы значительно больше внимания стали уделять изучению главных белковых компонентов наружной плазматической мембраны, особенно гликопротеидам, поверхность которых, выступающая

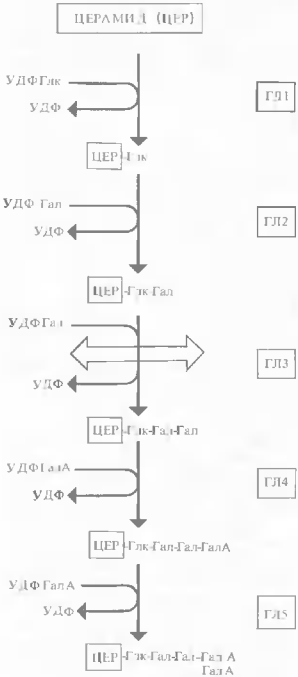


Рис. 18-30. Путь синтеза гликолипидов в клетках хомячка. Превращение ГЛ-2 в ГЛ-3 в опухолевых клетках хомячка подавлено, что приводит к образованию меньших количеств ГЛ-3, ГЛ-4 и ГЛ-5. ГЛ-1 — церамидмоногексозид, ГЛ-2 — церамиддигексозид, ГЛ-3 — церамидтригексозид, ГЛ-4 — церамидтетрагексозид, ГЛ-5 — церамидпентагексозид = антиген Форсмана. Остальные сокращения те же, что и на рис. 18-29.

наружу, несет углеводные группы (табл. 18-3). Возможно, что здесь удалось обнаружить изменения, присущие всем типам раковых клеток. Одно из них — это утрата трансформированной клеткой поверхностного гликопротеида с мол. весом около 46 000 (рис. 18-31). Это изменение происходит на очень раннем этапе трасформации и потому может претендовать на роль первичного события. Предстоит еще выяснить, чем обусловлено резкое снижение уровня гликопротеидов в трансформированных клетках — сокращением их синтеза или увеличением отдачи во внеклеточную среду. Еще одним характерным изменением является медленное исчезновение белка с мол. весом около 240 000, который находится на наружной поверхности. Оно происходит спустя долгое время после полного проявления «раковой» морфологии, так что отсутствие

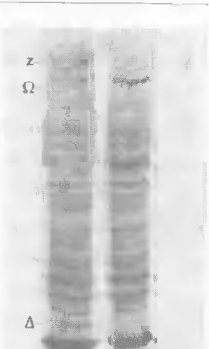


Рис. 18-31. Сравнение важнейших белковых компонентов нормальной куриной клетки и клетки, трансформированной вирусом саркомы Рауса (Robbins et al., Cold Spring Harbor Symp., XXXIX, 1173, 1975).
Белки были окрашены после электрофореза в полиакриламидном геле, в котором разделение идет по молекулярному весу. В трансформированной клетке содержание трех белков Δ, Ω и Z, характерных для нормальной клетки, значительно снижено, а иногда их даже вовсе нет.

данного белка, видимо, нельзя считать существенной особенностью ракового состояния клетки.

Более важным признаком могло бы быть отсутствие белка с мол. весом около 200 000, который исчезает после трансформации клеток вирусом саркомы Рауса и аденовирусами. По величине молекулы он близок к миозину, и возможно, что речь идет здесь о каком-то изменении в организации внутриклеточных фибрилл мышечного типа.

ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ СЕКРЕЦИЯ ПРОТЕАЗ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ

Любая форма рака, за исключением рака кроветворных тканей, характеризуется внеклеточной секрецией аномально больших количеств протеолитических ферментов. Хотя и нормальные клетки обычно секретируют протеазы в гранулах (лизосомах?), в опухолевых клетках этот процесс значительно усилен. Главной из этих столь избирательно секретируемых протеаз является фермент, называемый «клеточным фактором»; его мол. вес около 40 000. В растущих опухолях, а также в культуре клеток основное действие этого белка, по-видимому, состоит в протеолитической активации инертного сывороточного белка плазминогена. В результате образуется плазмин — протеолитический фермент, известный до последнего времени главным образом по его способности растворять сгустки крови (рис. 18-32). В результате этого каскадного процесса в непосредственной близости от всех опухолевых клеток образуются большие количества протеолитически активных белков. В связи с этим возникает вопрос о чувствительности клеточных поверхностей к плазмину. Действительно ли этот фермент действует подобно трипсину, который в опытах

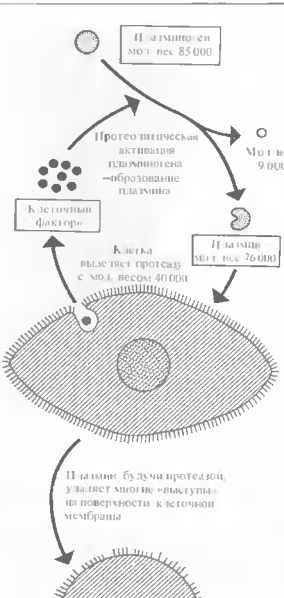


Рис. 18-32. Схема цепи событий, в результате которых секреция «клеточного фактора» может приводить к изменениям клеточной поверхности.

in vitro отщепляет более половины белковых групп, выступающих наружу из двойного липидного слоя? Судя по некоторым предварительным данным, плазмин не только может переваривать часть поверхности раковой клетки, но и придает таким образом раковым клеткам определенных типов многие из их характерных свойств. Наиболее убедительные данные получены в экспериментах, в которых раковые клетки мыши выращивали в среде с сывороткой, очищенной от плазминогена. В этих условиях клетки сохраняют способность к дальнейшему росту, но утрачивают характерную для раковых клеток морфологию и выглядят почти нор-

мальными. Таким образом, не исключено, что сигналом, заставляющим некоторые раковые клетки делиться, служит не прикрепление специфических молекул, регулирующих рост, а частичное ферментативное переваривание оболочек этих клеток.

ПОНИЖЕННАЯ ПОТРЕБНОСТЬ РАКОВЫХ КЛЕТОК В СЫВОРОТКЕ

Многие раковые клетки могут расти в культуральной среде со значительно меньшей добавкой сыворотки, чем соответствующие нормальные клетки. Вероятнее всего, это различие отражает сниженную потребность в одном или нескольких факторах, контролирующих рост, которые содержатся в сыворотке. Например, линия мышиных клеток 3Т3 растет в среде, содержащей 10% сыворотки, быстрее и до более высоких плотностей, чем в среде с 1% сыворотки, тогда как трансформированные клетки растут одинаково хорошо и при 1%, и при 10% сыворотки. Это позволяет предполагать, что раковые клетки часто размножаются лучше, чем нормальные, потому что меньше нуждаются в «помощи извне» для снижения внутриклеточного уровня цАМФ (или подъема уровня цГМФ?), необходимого для запуска цикла клеточного деления. Эту гипотезу подкрепляют данные о том, что содержание цАМФ в трансформированных клетках обычно вдвое меньше, чем в нормальных. Как и в нормальных клетках, уровень цАМФ непостоянен — он наиболее низок в фазе М.

КРАЙНЯЯ НЕПОЛНОТА НАШИХ ЗНАНИЙ О БИОХИМИИ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Тот факт, что мы уже находим некоторые постоянные различия между нормальной и раковой клеткой — или по крайней мере начинаем их находить, — говорит о том, что изучение рака на молекулярном уровне не является больше донкихотством, существующим только потому, что ученые не задают себе вопроса, что можно «купить» на деньги, ассигнуемые на изучение рака. С другой стороны, мы не должны обманывать самих себя и думать, что если нам удается измерить уровень цАМФ (или даже уровень цГМФ), то мы уже в каком-то смысле приближаемся к вершинам проблемы рака. В сравнении с тем, что мы знаем об *E. coli*, наши знания о структурной организации и биохимии нормальных эукариотических клеток удручающе скудны. И пока это так, значительная часть исследований по проблеме рака будет напоминать поиски монеты на мостовой, лишь в отдельных местах освещенной уличными фонарями. Мы вынуждены искать только в этих освещенных местах, ибо вглядываться в полную темноту бесполезно. Поэтому до тех пор, пока большая часть компонентов нормальной клеточной мембраны будет оставаться по существу «черными ящиками», биохимия рака останется загадкой, разрешения которой можно будет ждать лишь от будущих поколений.

ВЫВОДЫ

Уже давно одна из главных задач экспериментальной биологии состоит в том, чтобы выяснить, каким образом контролируется пролиферация клеток у многоклеточных организмов. Если бы мы это знали, нам было бы гораздо легче понять и процессы эмбрионального развития, и функционирование взрослого организма высшего животного. И мы смогли бы

наконец подойти к выяснению сути различных форм рака — наследственного изменения клеток, приводящего к их бесконтрольной пролиферации.

Сейчас почти во всех подходах к изучению механизмов, регулирующих клеточную пролиферацию, используются культуры клеток, растущих in vitro. Клетки, взятые из тела животного и давшие начало культуре, называют первичными клетками, а их потомство, образовавшееся в результате нескольких циклов клеточного деления, — вторичными клетками. Большая часть вторичных клеток может делиться не более 20—50 раз, и только единичные клетки приобретают способность размножаться неопределенно долго и образовывать клеточные линии. Почему только «избранные» клетки обладают потенцией неограниченного роста, абсолютно неясно; существует предположение, что запрограммированная гибель клеток может иметь прямое отношение к явлению старения у высших позвоночных. До сих пор клеточные линии удалось получить только от отдельных видов животных (например, мыши, хомячка, человека, но нет линии куриных клеток!). И вообще становится все очевиднее, что получить клеточные линии от опухолевых клеток гораздо проще, чем от нормальных клеток из тех же тканей.

Повышенная способность опухолевых клеток давать клеточные линии в течение многих лет порождала мнение, что, вероятно, все клетки, обладающие такой способностью, приобретают ее в результате мутаций, обусловливающих многие существенные свойства раковых клеток. Теперь, однако, мы знаем, что только те вторичные фибробласты (или эпителиальные клетки), которые длительное время росли при высокой плотности клеточной популяции, позже дают линии, растущие в свою очередь до высоких плотностей, характерных для раковых клеток. Но если вторичные клетки отбирать при низкой плотности, то соответствующие линии будут расти до значительно более низких плотностей и, как правило, прекратят деление после образования организованного клеточного слоя.

Наличие хорошо охарактеризованных клеточных линий, таких, как линия раковых клеток человека HeLa и линия L мышиных клеток, позволило детально разработать режим питания для клеток, растущих в культуре. Как правило, для роста необходим не только определенный набор аминокислот и витаминов, но также белковые факторы, содержащиеся в сыворотке крови. До последнего времени природа «сывороточных факторов» оставалась загадкой, однако сейчас накапливается все больше данных о том, что большинство их — полипептидные гормоны, которые действуют, присоединяясь к поверхности клеток-мишеней. При этом они способны изменять активность ферментов, связанных с мембраной, — аденилатциклазы и гуанилатциклазы, что в свою очередь приводит к снижению уровня цАМФ и повышению уровня цГМФ в соответствующих клетках. Эти изменения концентраций цАМФ или цГМФ каким-то неизвестным образом запускают процесс клеточного деления. Это прежде всего проявляется в ускорении синтеза РНК в ядре примерно через час после воздействия митогеном. Синтез ДНК начинается лишь спустя 8—12 ч.

В отсутствие факторов, способствующих росту (митогенов), большинство клеток переходит к состоянию покоя в фазе G_1; поэтому они содержат диплоидное количество ДНК. Если уж в клетке началась репликация ДНК, то клетка неизбежно проходит через фазу G_2 и вступает в митоз. Для начала нового митотического цикла клетка, пребывающая в фазе G_1, нуждается в новом митогенном стимуле; если его нет, клетка переходит в состояние покоя, и это часто приводит к дифференцировке — в результате может образоваться высокоспециализированная клетка (например, нервная), неспособная начать новый цикл роста и деления. Дифференцировка сама по себе не ведет, однако, к утрате способности

делиться. Например, широко используемые для культивирования фибробласты, эпителиальные клетки и лимфобласты соответствуют определенным состояниям дифференцировки. Таким образом, способность к делению утрачивается только в том случае, когда физиологическая роль данной клетки делает дальнейшее деление нежелательным (примером могут служить нервные клетки, эритроциты и т. п.).

Для многих видов дифференцировки необходимо присутствие специфических факторов, которые, по-видимому, не только способствуют дифференцировке как таковой, но и приводят к избирательной пролиферации частично дифференцированных «бластов». В частности, образование различных клеток крови находится под контролем ряда специфических белков (например, продукция эритроцитов регулируется белком эритропоэтином). Специфические белки контролируют дифференцировку нейронов определенного типа (фактор роста нервов), а также эпидермальных клеток (фактор роста эпидермиса). Некоторые стероидные гормоны также могут индуцировать дифференцировку и избирательную пролиферацию. Рост матки, например, регулируется стероидным гормоном эстрадиолом.

Но существуют и другие этапы клеточной дифференцировки, которые, видимо, не нуждаются в специфических молекулах-индукторах. Стимулом для превращения фибробласта в жировую клетку, очевидно, служат богатые пищевые ресурсы среды в сочетании с неспособностью клеток к делению. Точно так же поперечнополосатые мышцы образуются в культуре при спонтанном слиянии миобластов.

Трансформация представляет собой процесс, в результате которого нормальные клетки приобретают многие морфологические и пролиферативные свойства, присущие раковым клеткам. Как правило, трансформированные клетки отличаются более округленной формой по сравнению с нормальными клетками той же ткани; они во многом напоминают клетки, только что прошедшие стадию митоза. На поверхности многих опухолевых клеток на протяжении всего клеточного цикла встречается много выступов, что характерно в норме только для ранней стадии фазы G_1. Соответственно и многие мембранные белки у раковых клеток оказываются более подвижными, чем у нормальных клеток в интерфазе, что, возможно, связано с менее упорядоченным расположением мышечных белков. Для трансформированных клеток характерна также утрата многих адгезивных свойств, в результате чего они не способны «пристраиваться» к надлежащим соседним клеткам. По каким-то совершенно еще неясным причинам опухолевые клетки утратили нормальные механизмы, регулирующие использование глюкозы. Они поглощают гораздо больше глюкозы, чем могут эффективно переработать, что ведет к выделению больших количеств молочной кислоты.

Для многих, хотя и не для всех, трансформированных клеток характерна повышенная секреция одного или нескольких протеолитических ферментов («клеточных факторов»). Освобождающиеся ферменты могут вызывать активацию неактивных предшественников важнейших сывороточных протеаз (в частности, плазмина — главного фермента, растворяющего кровяные сгустки). В свою очередь эти «сывороточные протеазы» могут переваривать некоторые участки поверхности опухолевой клетки. Вопрос о том, не связано ли возникновение каких-либо характерных поверхностных свойств опухолевых клеток с действием этих протеаз, еще ждет своего решения. В пользу такой гипотезы говорит то, что способность многих трансформированных клеток к образованию опухолей четко коррелирует с количеством выделяемого ими «клеточного фактора».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Puck T. T., The Mammalian Cell as a Microorganism, Holden-Day, 1972. Введение в исследования роста клеток высших животных в культуре.

Readings in Mammalian Cell Culture, R. Pollack (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed., 1975. Очень полезный сборник статей с описанием опытов, которые легли в основу приводимых в данной главе выводов.

Tooze J., The Molecular Biology of Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, 1973. Прекрасная итоговая работа о росте клеток животных в культуре приведена в гл. 2 этой книги.

Paul J., Cell and Tissue Culture, 4th ed., Livingston, Edinburgh and London, 1970. Описание методов, используемых для выращивания клеток в культуре.

Mitchison J. M., The Biology of the Cell Cycle, Cambridge University Press, 1971. Заслуживающее внимания описание клеточного цикла прокариотов и эукариотов.

The Cell Cycle in Development and Differentiation, M. Balls and F. S. Billett (eds.), British Society for Developmental Biology Symposium, Cambridge University Press, 1973. Обзор различных типов клеточных циклов с большим числом примеров.

Mazia D., The Cell Cycle, Scientific American, January 1974. Прекрасно иллюстрированная статья, посвященная вопросам роста и деления клетки.

The Cell Cycle and Cancer, R. Baserga (ed.), Marcel Dekker, New York, 1971. Обзор различных аспектов клеточного цикла у позвоночных, в котором рассматривается вопрос, каким образом происходит утрата механизмов, контролирующих деление клетки.

Rao P. N., Johnson R. T., Induction of Chromosome Condensation in Interphase Cells, Advances in Cell and Molecular Biology, 3, 136, Academic Press (1974). Обзор, посвященный преждевременной конденсации хромосом, наблюдаемой после слияния клеток.

Patterson D., Kao F. T., Puck T. T., Genetics of Somatic Mammalian Cells: Biochemical Genetics of Chinese Hamster Cell Mutants with Deviant Purine Metabolism, Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 2057 (1974). В статье приведены доступные в настоящее время методы генетического анализа клеток в культуре.

Chasin L. A., Mutations Affecting Adenine Phosphoribosyl Transferase Activity in Chinese Hamster Cells, Cell, 2, 37 (1974). Изящный анализ частоты мутаций, из которого следует, что обычные генные мутации являются причиной образования «вариантных» клеток, обнаруживаемых после воздействия мутагена.

Growth Control in Cell Cultures, a CIBA Foundation Symposium, G. E. W. Wolstenholme and J. Knight (eds.), Churchill Livingston, Edinburgh and London, 1971. Интересная подборка статей, посвященных поиску тех факторов, которые управляют клеточным ростом.

Control of Proliferation in Animal Cells, B. Clarkson and R. Baserga (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, 1974. Восемьдесят докладов, представленных на симпозиуме, посвященном контролю клеточной пролиферации (итоги работ, сделанных к маю 1973 г.).

Pastan I., Cyclic AMP, Scientific American, August 1972. Описание разнообразных путей контроля поведения клетки «вторичным мессенджером» — цАМФ.

Seifert W. E., Rudland P. S., Possible Involvement of Cyclic GMP in Growth Control of Cultured Mouse Cells, Nature, 248, 138 (1974). Пример того, как повышается уровень цГМФ при воздействии мутагенного фактора.

Gospodarowitz D., Localization of a Fibroblast Growth Factor and its Effect Alone and with Hydrocortisone on 3T3 Cell Growth, Nature, 249, 123 (1974). Первая статья о свойствах фактора роста фибробластов.

Green H., Meuth M., An Established Pre Adipose Cell Line and its Differentiation in Culture, Cell, 3, 127 (1974). Важное дополнение к системам, в которых можно изучать дифференцировку в клеточной культуре.

Revel J. P., Contacts and Junctions between Cells, Transport at the Cellular Level, Soc. Exp. Biol. Symp., 28, 447 (1974). Очень хорошая работа, посвященная механизму прикрепления клеток друг к другу.

Nicolson G., The Interaction of Lectins with Animal Cell Surfaces, Int. Rev. Cytology, 39, 90 (1974). Очень полный, прекрасно написанный обзор по лектинам.

Miyashita K., Kakunaga T., Isolation of Heat- and Cold-Sensitive Mutants of Chinese Hamster Lung Cells Affected in Their Ability to Express the Transformed State, Cell, 5, 131 (1975). В работе показана легкость получения ts-мутаций, влияющих на проявление трансформированного фенотипа.

Proteases and Biological Control, E. Reich, D. Rifkin and E. Shaw (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, 1975. Шестьдесят восемь докладов на конференции, посвященной механизмам, с помощью которых протеолитические ферменты участвуют во многих ключевых процессах контроля, в том числе в пролиферации клеток.

ГЛАВА

19 Проблема биосинтеза антител

Вопрос о том, каким образом организмы осуществляют специфические иммунные реакции, занимает биологов с самого начала нашего века. Первоначально этот интерес определялся соображениями чисто практического характера: ведь чем лучше мы будем понимать, что собой представляют антигены и антитела, тем легче нам будет добиваться повышения эффективности иммунных реакций на опасные болезнетворные агенты. Однако в последнее время иммунологии стали уделять столь большое внимание еще и потому, что индукция синтеза специфических антител при ближайшем рассмотрении оказалась связанной со специфической и необратимой дифференцировкой клетки. Интерес к иммунологии еще более повысился, когда были разработаны методы получения больших количеств высокоочищенных антител — это открыло возможность детально изучать их строение в химическом аспекте. Можно думать, что раскрытие молекулярных основ биосинтеза антител может стать подлинным «прорывом» в тайны живого, а это в свою очередь будет иметь существенное значение не только для медицины, но и для всех аспектов биологии многоклеточных организмов.

АНТИГЕНЫ — ЭТО АГЕНТЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ СИНТЕЗ АНТИТЕЛ

Выработка антител — это защитная реакция высших позвоночных, которая позволяет им бороться с вредным воздействием патогенных микроорганизмов и препятствует размножению раковых клеток. Например, введение вируса в кровеносную систему высшего позвоночного побуждает лимфоциты, представляющие собой особый тип белых кровяных клеток, продуцировать антитела, которые специфически взаимодействуют с вирусной частицей и тем самым мешают дальнейшему размножению вируса (рис. 19-1). Данный индивидуум сохраняет *иммунитет* к вирусу до тех пор, пока в его крови имеются соответствующие антитела (наука, изучающая антитела и реакции, в которых они участвуют, называется *иммунологией*). Объекты, вызывающие образование антител, были названы *антигенами*.

Антигенными свойствами обладают те вещества, которые отличаются от нормальных компонентов данного организма иным расположением атомов на поверхности молекулы. Таким образом, система иммунологической защиты организма основана на способности организма отличать «свои» молекулы от «чужих». Организм вырабатывает антитела против данного вируса или раковой клетки не потому, что он узнает в них возможных возбудителей болезни, а потому, что это чужеродные объекты, подлежащие удалению из организма-хозяина.

Что требуется для того, чтобы какой-нибудь объект обладал антигенными свойствами? Одно из главных требований заключается в том,

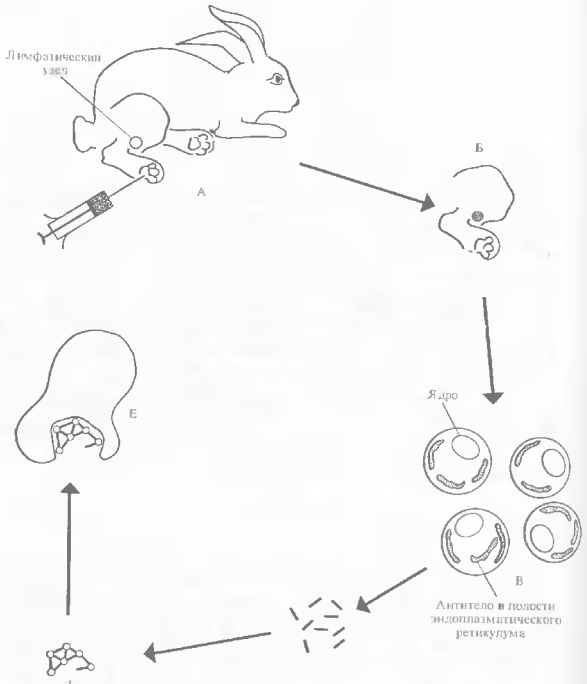


Рис. 19-1. Схематическое изображение последовательности событий между инъекцией антигена и появлением циркулирующих антител. *А*. Инъекция антигена в лапку кролика. *Б*. Накопление антигена в лимфатическом узле. *В*. Появление плазматических клеток, содержащих большие количества антител. *Г*. Освобождение антител. *Д*. Агглютинация молекул антигена, сохранившегося в крови и лимфе. *Е*. Поглощение комплекса антиген – антитело особыми белыми кровяными клетками, так называемыми клетками-мусорщиками.

чтобы данный объект либо сам был макромолекулой, либо был построен из макромолекул (как построена из них, например, вирусная частица). Большинство белков, а также некоторые полисахариды и нуклеиновые кислоты — антигены. Малые молекулы сами по себе очень редко вызы-

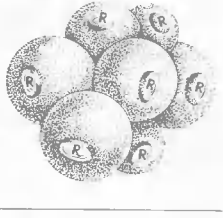


Рис. 19-2. Схематическое изображение молекулы антигена. Символом R обозначены детерминанты иммунологической специфичности, т. е. те группы, которые участвуют в реакции с антителом.

вают появление специфических антител. Отсутствие реакции на низкомолекулярные вещества не является результатом отсутствия специфичности. Многие низкомолекулярные вещества, не обладая сами антигенными свойствами, могут тем не менее изменять антигенные свойства какой-нибудь макромолекулы (например, белка), к которой они присоединяются ковалентной связью. Антитела, образующиеся в ответ на воздействие таких сложных молекул, частично направлены также и против малых молекул. Низкомолекулярные вещества, обладающие потенциальными антигенными свойствами, называются *гаптенами*.

Маловероятно, чтобы вся поверхность макромолекулы была необходима для проявления антигенных свойств. Скорее всего иммунологическая система реагирует на те или иные атомные группировки (*антигенные детерминанты*), расположенные определенным образом на поверхности молекулы (рис. 19-2). Молекула белка часто содержит несколько антигенных детерминант и вызывает образование нескольких типов антител, а объект, обладающий размерами бактерии, должен содержать огромное число различных антигенных детерминант.

В настоящее время трудно еще сказать, сколько всего антигенных детерминант существует в природе. Несомненно, число их велико: вполне возможно, что оно превышает 10 000. Эта оценка получена на основе экспериментов, в которых выяснялось, могут ли антитела, возникшие в ответ на введение какого-нибудь белка, соединиться с другим, неродственным белком. Оказалось, что перекрестные реакции почти никогда не происходят. Между тем, если бы число всех антигенных детерминант было небольшим, мы вправе были бы ожидать, что одна и та же детерминанта содержится во многих белках, а это, конечно, приводило бы к неожиданным перекрестным реакциям между антигенами и антителами.

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ АНТИТЕЛА И АНТИТЕЛА, СВЯЗАННЫЕ С ПОВЕРХНОСТЬЮ КЛЕТОК

Долгое время считали, что антитела начинают функционировать только после того, как они выделятся в кровь или другие жидкости организма (в частности, секрет слизистой оболочки носа, слюну и т. п.), где они вступают в контакт с потенциально вредными агентами. Такие антитела называются *гуморальными антителами*. Затем постепенно стало ясно, что многие иммунные реакции определяются антителами другого типа — антителами, которые остаются связанными с родительскими лимфоцитами и составляют основу так называемого *клеточного иммунитета*. Весьма разнообразные и, казалось бы, неродственные антигены (например, токсин

ядопосного сумаха, палочка туберкулеза и многие опухолевые клетки) вызывают реакции клеточного иммунитета. Почему данный антиген предпочтительно вызывает либо гуморальные, либо клеточные реакции, остается в высшей степени непонятным. На основании эмпирических выводов, однако, можно сказать, что у свободных белков (а также у вирусов) есть тенденция стимулировать синтез гуморальных антител, в то время как антигенные детерминанты, связанные с живыми клетками, чаще приводят к проявлению клеточного иммунитета. Однако у этого правила столько очевидных исключений, что, может быть, лучше вообще отказаться от каких бы то ни было обобщений до тех пор, пока не будет достигнут более высокий уровень понимания клеточных и молекулярных основ этих двух форм иммунитета.

СУДЬБА КОМПЛЕКСОВ АНТИГЕН — АНТИТЕЛО

Соединение антигена с гуморальным антителом обычно является первым этапом в длинной цепи событий, которая ведет к удалению образующегося комплекса из организма. Каким-то образом комплекс «маркируется» и в зависимости от «маркировки» подвергается либо фагоцитозу, либо ферментативному разрушению. Маркировка обычно осуществляется *комплементом* — системой, состоящей из девяти последовательно действующих белковых компонентов (С1 — С9) сыворотки крови (рис. 19-3). Первый компонент С1 активируется при связывании с антителом, находящимся в комплексе с антигеном. С1 никогда не связывается со свободным антителом; присоединение становится возможным лишь после изменения формы антитела, неизбежно происходящего в результате взаимодействия с антигеном. Активированный С1 обладает эстеразной активностью и оказывается способным в свою очередь активировать С4, а затем С2. Образующийся при этом многокомпонентный фермент, так называемая С3-конвертаза, всегда остается связанным с исходным комплексом антиген — анти-

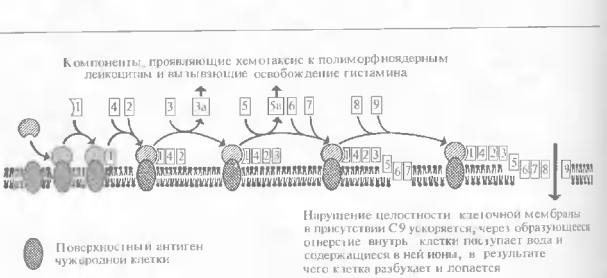


Рис. 19-3. Схема, иллюстрирующая механизм действия комплемента (сложной группы ферментов, присутствующих в нормальной сыворотке крови) при лизисе чужеродных клеток.

Разные компоненты комплемента действуют в определенной последовательности; исходным пунктом является активация С1 иммунным комплексом (чужеродного антигена, связанного антителом).

тело. Под действием этого фермента С3-компонент расщепляется на несколько фрагментов, один из которых (связанный С3) обладает участком связывания для макрофагов и тем самым облегчает последующий фагоцитоз, приводящий к разрушению комплекса антиген — антитело.

Этот «ферментативный каскад» состоит из нескольких последовательных стадий, на каждой из которых одна молекула данного компонента системы активирует несколько молекул следующего компонента, что еще более усиливает ступенчатый характер всего процесса. В результате этого тысячи активированных молекул С9, образующихся благодаря одному-единственному комплексу антиген — антитело, получают возможность сформировать крупные отверстия в плазматической мембране. Поэтому, когда комплемент связывается с теми антителами, которые вступили в комплекс с антигенами, расположенными на поверхности клеток, цепь последовательно развивающихся событий очень часто может привести к гибели клетки. По существу, вся система комплемента и была открыта благодаря этому наблюдению. В присутствии комплемента антитела к эритроцитам барана быстро вызывают лизис этих клеток, однако, если комплемент сыворотки разрушить нагреванием при 56 °С в течение получаса, лизис не происходит.

События, происходящие после связывания антигена с поверхностным антителом, столь подробно до сих пор не изучены. В некоторых условиях присоединение антигена к соответствующим лимфоцитам приводит к освобождению ряда факторов (лимфокинов), с которыми связано возникновение гиперчувствительности замедленного типа (например, к токсину ядовитого сумаха; см. ниже). Другие лимфоциты, специфичность которых направлена по отношению к чужеродным клеткам, обладают способностью убивать эти клетки. Точно не установлено, участвует ли комплемент в этом «убийстве».

ВСЕ АНТИТЕЛА ИМЕЮТ БЕЛКОВУЮ ПРИРОДУ

Все антитела — белки. Поэтому избирательный синтез определенного антитела — это не что иное, как синтез специфического белка. Название *иммуноглобулин* используется в настоящее время как родовое понятие по отношению ко всем антителам. У человека существует 5 основных классов гуморальных иммуноглобулинов (IgG, IgM, IgA, IgD и IgE), каждый из которых обладает характерным строением и скорее всего играет строго определенную функциональную роль (табл. 19-4). Все они построены из упорядоченных агрегатов полипептидных цепей двух типов — одна из цепей обычно называется «легкой», другая — «тяжелой». Во всех основных группах обнаружены сходные типы легких цепей. Специфичность данного класса определяется природой тяжелой цепи.

Функциональные различия между классами в настоящее время только начинают проясняться. IgG является основным компонентом сыворотки крови и главным агентом, «сражающимся» с микроорганизмами и обеспечивающим их фагоцитоз. IgM, который выполняет ту же функцию, появляется первым при развитии иммунного ответа, но затем по мере усиления специфической иммунной реакции его сменяет IgG. Главным иммуноглобулином секрета слизистых является IgA, и в его задачу входит прежде всего защита наружных поверхностей организма. Для IgD не удалось выявить нормальной функции; IgE, по-видимому, участвует в удалении кишечных паразитов. Вероятно, он является также главным виновником аллергий типа сенной лихорадки.

До сих пор лучше всего охарактеризован IgG, и в следующих разделах мы остановимся на его свойствах.

Таблица 19-1 Свойства основных классов иммуноглобулинов человека

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Коэффициент седиментации	7S	7S, 9S, 11S	19S	7S	8S
Молекулярный вес	150 тыс.	160 тыс. 320 тыс. 480 тыс.	900 тыс.	185 тыс.	200 тыс.
Число основных четырехцепочечных субъединиц	1	1, 2, 3	5	1	1
Тяжелые цепи	γ	α	μ	δ	ε
Легкие цепи	κ или λ	κ или λ	κ или λ	κ или λ	κ или λ
Молекулярная формула	$\gamma_2\kappa_2$ или $\gamma_2\lambda_2$	$(\alpha_2\kappa_2)_{1-3}$ или $(\alpha_2\lambda_2)_{1-3}$	$(\mu_2\kappa_2)_5$ или $(\mu_2\lambda_2)_5$	$\delta_2\kappa_2$ или $\delta_2\lambda_2$	$\varepsilon_2\kappa_2$ или $\varepsilon_2\lambda_2$
Валентность при связывании антигена	2	2, 4, 6	10	?	2
Содержание в сыворотке (в % от общего количества иммуноглобулинов)	80	13	6	1	0,002
Содержание углеводов (в %)	3	8	12	13	12

МОЛЕКУЛА ИММУНОГЛОБУЛИНА IgG СОСТОИТ ИЗ ДВУХ ЛЕГКИХ И ДВУХ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ

Антитела IgG седиментируют при 7S и имеют молекулярный вес около 150 000. В каждой молекуле содержится четыре полипептидные цепи. Они разделяются на две пары: две тяжелые цепи (мол. вес ~53 000) и две легкие цепи (мол. вес ~22 500). Таким образом, каждая молекула имеет две одинаковые тяжелые и две одинаковые легкие цепи. Каждая легкая цепь присоединена к тяжелой цепи одной ковалентной S—S-связью, две такие же связи соединяют между собой 2 тяжелые цепи; в результате образуется характерная структура, показанная схематически на рис. 19-4. Вполне вероятно, что в поддержании целостной структуры IgG участвуют и некоторые слабые связи.

Цепи уложены в молекуле таким образом, что каждая молекула антитела обладает двумя идентичными, разделенными в пространстве активными центрами, каждый из которых способен связывать антиген, используя слабые связи для сближения их комплементарных поверхностей (рис. 19-5).

Изучение антител под электронным микроскопом позволяет выявить их Y-образную форму, причем активные центры расположены на конце двух ответвлений. Каждое ответвление при помощи своего рода «шарнира» соединено с главной осью; при связывании антигена расстояния между активными центрами обычно увеличиваются.

Наличие двух одинаковых антигенсвязывающих участков позволяет одной молекуле антитела связывать два сходных антигена. Эта особенность дает большие преимущества антителам в борьбе против инфекции, вызываемой микроорганизмами, поскольку все микроорганизмы содержат большое число идентичных антигенных детерминант. В присутствии специфических антител микроорганизм оказывается связанным с огромным количеством сходных микроорганизмов своего рода мостиками, образуемыми антителами (рис. 19-6); такие агрегаты легко захватываются и разрушаются макрофагами.

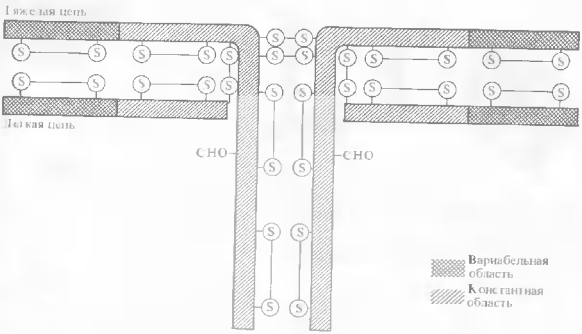


Рис. 19-4. Модель структуры иммуноглобулина IgG человека.
Указаны дисульфидные связи, расположенные внутри полипептидных цепей и между ними. CHO — остаток углевода, связанный с тяжелой цепью (местоположение указано приблизительно).

СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНТИТЕЛ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ АМИНОКИСЛОТ

Примерно 10 лет назад для объяснения специфичности антител были предложены две разные гипотезы. Одна из них основывалась на том факте, что основные черты молекулярной структуры всех антител класса IgG одинаковы. Это позволяло думать, что аминокислотные последовательности тождественны у всех антител и что основные различия между ними определяются трехмерной структурой, т. е. укладкой идентичных цепей. Если это действительно так, то антиген должен определять образование соответствующего антитела путем взаимодействия с новосинтезированной полипептидной цепью антитела еще до того, как она примет свою конечную трехмерную конформацию. Во время такого взаимодействия часть молекулы антитела должна свертываться вокруг антигена, и это должно автоматически обеспечивать комплементарность поверхности этих двух молекул. Так как, согласно этой гипотезе (и различным ее вариантам), антиген непосредственно определяет форму молекулы антитела, такая гипотеза получила название *инструктивной гипотезы образования антител* (рис. 19-7).

В последнее время инструктивная гипотеза утратила свою популярность. Накапливается много данных, из которых следует, что различие между антителами заложено уже в первичной структуре (т. е. в аминокислотной последовательности), а не только в трехмерной конформации молекул. Наиболее неопровержимые доказательства этого были получены в экспериментах по ренатурации денатурированных антител в отсутствие соответствующего антигена: молекулы антител при этом восстанавливали свою специфичность! Имеются прямые химические данные, основанные на анализе аминокислотных последовательностей очищенных антител

Рис. 19-5. Наличие двух одинаковых участков связывания антигена на каждой молекуле 7S-антитела.
В формировании активных центров принимают участие аминокислоты цепей обоих типов (как легких, так и тяжелых).

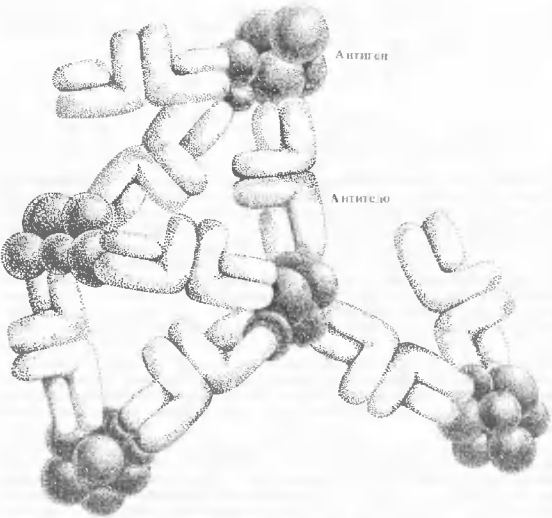


Рис. 19-6. Схематическое изображение крупных агрегатов, образованных молекулами антигена и антитела.

Рис. 19-7. Сравнение инструктивной и селекционной гипотез, объясняющих формирование специфических участков связывания антигена при образовании антител.

Обнаружены отчетливые различия, причем выяснилось, что молекулы антител содержат, по-видимому, два участка: один — одинаковый для всех антител (благодаря чему и создается впечатление, что все антитела в химическом отношении сходны) и другой — строго специфичный для каждого отдельного антитела по своей аминокислотной последовательности (а значит, и по трехмерной структуре).

Различия в аминокислотных последовательностях у разных молекул антител наводят на мысль о существовании различных генов, которые могли бы кодировать синтез специфических антител. Поскольку любой вырабатывающий антитела организм способен синтезировать очень большое число различных антител, можно, очевидно, допустить существование такого же числа соответствующих генов. На протяжении многих лет большинству иммунологов это предположение казалось непремлемым, так как им хорошо известно, что число различных антигенных детерминант огромно. Однако в настоящее время это предположение находит все большую поддержку. Если существуют различия в аминокислотных последовательностях, то, очевидно, должны существовать и различия в РНК-матрицах, а следовательно, и в определенных участках ДНК.

Мы стоим также еще перед одной нерешенной проблемой. Если такие различные гены действительно существуют, то должен существовать и контрольный механизм, с помощью которого ген, определяющий синтез соответствующего антитела, активировался бы в присутствии антигена. Очевидно, тем или иным способом это присутствие антигена обеспечивает избирательный синтез, т. е. синтез только одной определенной последовательности аминокислот (*селекционная гипотеза образования антител*).

БЕЛКИ МИЕЛОМЫ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ

В любой данный момент времени антитела, присутствующие в сыворотке любого индивидуума, являются совокупностью антител многих типов, специфичных в отношении огромного числа разных антигенов. Даже после длительной иммунизации каким-то одним сильным антигеном ни один из типов антител не присутствует в сыворотке в достаточно чистом состоянии, что позволило бы легко выделить его. В сыворотке не только остаются следы многих других антител, индуцировавших ранее в результате воздействия тех или иных антигенов, но, что еще важнее, данный конкретный антиген, по-видимому, всегда индуцирует синтез нескольких разнохарактерных антител с различными аминокислотными последовательностями, причем все они способны специфически связывать один и тот же антиген.

Однако антитела одного определенного типа можно получить из крови некоторых индивидуумов, страдающих болезнью костного мозга — *множественной миеломой*. Это заболевание, представляющее собой одну из форм рака, характеризуется бесконтрольным размножением клеток, продуцирующих антитела. Весьма важно, что данная специфическая опухоль продуцирует только один тип антител, характеризующийся специфической аминокислотной последовательностью. Кроме того, антитела, синтезируемые разными миеломными опухолями, имеют разные аминокислотные последовательности, что дает возможность сравнительного изучения многих аминокислотных последовательностей различных антител. До самого последнего времени никому не удалось выявить такой антиген, который характеризовался бы высоким сродством к какому-либо из миеломных белков. Однако теперь такие антигены найдены.

Белки миеломы продуцируются в организме больного в огромных количествах, что позволяет легко определять их аминокислотную последовательность. Кроме того, есть целый ряд сходных опухолей и у лабораторных животных. В частности, мыши представляют собой великолепную систему для изучения миеломных белков, поскольку в данном случае представляется возможным интенсивно изучать и генетику этих животных.

БЕЛКИ БЕНС-ДЖОНСА ПРЕДСТАВЛЯЮТ СОБОЙ СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЛЕГКИЕ ЦЕПИ

У многих больных миеломой в моче обнаруживаются значительные количества специфических белков, называемых *белками Бенс-Джонса* по имени открывшего их английского врача XIX века. Их удалось обнаружить в столь давние времена, потому что в отличие от многих белков они не осаждаются при кипячении. В настоящее время стало ясно, что белки Бенс-Джонса представляют собой не что иное, как легкие цепи соответствующего миеломного антитела. Их выведение с мочой является следствием перепроизводства легких цепей антител клетками миеломы. Каким-то образом утрачивается регуляторное приспособление, которое в норме обеспечивает выработку равных количеств легких и тяжелых цепей, и происходит избыточный синтез легких цепей. Высокая концентрация и аномальная растворимость белков Бенс-Джонса делает их выделение весьма простой процедурой; многие важные выводы о последовательности аминокислот в молекулах антител были сделаны впервые при изучении именно этих белков.

1 10 20
Асп-Иле-Глн-Мет-Тре-Глн-Сер-Про-Сер-Тре-Лей-Сер-Ала-Сер-Вал-Глу-Асп-Арг-Вал-Тре-

30 40
Иле-Тре-Цис-Арг-Ала-Сер-Глн-Сер-Иле-Асн-Тре-Три-Лей-Ала-Три-Тир-Глн-Глн-Лиз-Про-

50 60
Глу-Лиз-Ала-Про-Лиз-Лей-Лей-Мет-Тир-Лиз-Ала-Сер-Сер-Лей-Глу-Сер-Глн-Вал-Про-Сер-

70 80
Арг-Фен-Иле-Глн-Сер-Глн-Сер-Глн-Тре-Глу-Фен-Тре-Лей-Тре-Иле-Сер-Сер-Лей-Глн-Про-

90 100
Асп-Асп-Фен-Ала-Тре-Тир-Тир-Цис-Глн-Глн-Тир-Асн-Сер-Асп-Сер-Лиз-Мет-Фен-Глн-Глн-

110 120
Глн-Тре-Лиз-Вал-Глу-Вал-Лиз-Глн-Тре-Вал-Ала-Ала-Про-Сер-Вал-Фен-Иле-Фен-Про-Про-

130 140
Сер-Асп-Глу-Глн-Лей-Лиз-Сер-Глн-Тре-Ала-Сер-Вал-Вал-Цис-Лей-Лей-Асн-Асн-Фен-Тир-

150 160
Про-Арг-Глу-Ала-Лиз-Вал-Глн-Тре-Лиз-Вал-Асп-Асн-Ала-Лей-Глн-Сер-Глн-Асн-Сер-Глн-

170 180
Глу-Сер-Вал-Тре-Глу-Глн-Асп-Сер-Лиз-Асп-Сер-Тре-Тир-Сер-Лей-Сер-Сер-Тре-Лей-Тре-

190 200
Лей-Сер-Лиз-Ала-Асп-Тир-Глу-Лиз-Гис-Лиз-Вал-Тир-Ала-Цис-Глу-Вал-Тре-Гис-Глн-Глн-

210 214
Лей-Сер-Сер-Про-Вал-Тре-Лиз-Сер-Фен-Асн-Арг-Глн-Глу-Цис

Рис. 19-8. Аминокислотная последовательность легкой цепи иммуноглобулина EU человека.

В ЛЕГКИХ И ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЯХ ЕСТЬ КОНСТАНТНЫЕ И ВАРИАБЕЛЬНЫЕ ОБЛАСТИ

Определение аминокислотной последовательности в легких цепях, которые удалось выделить первыми, показало, что они состоят из соединенных между собой вариабельных N-концевых последовательностей (остатки 1—108, V-область), специфичных для каждого типа иммуноглобулина, и константных С-концевых областей (остатки с 109-го примерно до 214-го, С-область) [1], которые одинаковы у всех легких цепей. Совсем недавно, когда стали накапливаться сведения и о тяжелых цепях, выявились те же свойства: вариабельность N-концевой области и постоянство С-концевого участка. Константная область у тяжелых цепей гораздо протяженнее и примерно в три раза превосходит по длине (~330 аминокислот) вариабельный участок (~110 аминокислот). Поэтому, хотя тяжелые цепи намного длиннее легких, длина вариабельных участков в цепях обоих видов приблизительно одинакова.

На рис. 19-8 и 19-9 показаны аминокислотные последовательности легких и тяжелых цепей иммуноглобулина EU. Это было первое антитело, для которого удалось установить полную двумерную структуру. Был определен порядок расположения для 660 остатков; до сих пор EU остается самым крупным белком, для которого полностью расшифрована аминокислотная последовательность.

[1] V- и С-области — от англ. variable — вариабельный и constant — константный (постоянный) соответственно. — *Прим. перев.*

1 ПКК–Вал–Глн–Лей–Вал–Глн–Сер–Глн–Ала–Глу–Вал–Лиз–Лиз–Про–Глн–Сер–Сер–Вал–Лиз–Вал–
Сер–Цис–Лиз–Ала–Сер–Глн–Глн–Тре–Фен–Сер–Арг–Сер–Ала–Иле–Иле–Тре–Вал–Арг–Глн–Ала–
Про–Глн–Глн–Глн–Лей–Глу–Тре–Мет–Глн–Иле–Вал–Про–Мет–Фен–Глн–Про–Про–Асн–Тир–
Ала–Глн–Лиз–Фен–Глн–Глн–Арг–Вал–Тре–Иле–Тре–Ала–Асп–Глу–Сер–Тре–Асн–Тре–Ала–Тир–
Мет–Глу–Лей–Сер–Сер–Лей–Арг–Сер–Глу–Асп–Тре–Ала–Фен–Тир–Фен–Цис–Ала–Глн–Глн–Тир–
Глн–Иле–Тир–Сер–Про–Глу–Глу–Тир–Асн–Глн–Глн–Лей–Вал–Тре–Вал–Сер–Сер–Ала–Сер–Тре–
Лиз–Глн–Про–Сер–Вал–Фен–Про–Лей–Ала–Про–Сер–Сер–Лиз–Сер–Тре–Сер–Глн–Глн–Тре–Ала–
Ала–Лей–Глн–Цис–Лей–Вал–Лиз–Асп–Тир–Фен–Про–Глу–Про–Вал–Тре–Вал–Сер–Тре–Асн–Сер–
Глн–Ала–Лей–Тре–Сер–Глн–Вал–Тис–Тре–Фен–Про–Ала–Вал–Лей–Глн–Сер–Сер–Глн–Лей–Тир–
Сер–Лей–Сер–Сер–Вал–Вал–Тре–Вал–Про–Сер–Сер–Сер–Лей–Глн–Тре–Глн–Тре–Тир–Иле–Цис–
Асн–Вал–Асн–Тис–Лиз–Про–Сер–Асн–Тре–Лиз–Вал–Асп–Лиз–Арг–Вал–Глу–Про–Лиз–Сер–Цис–
Асп–Лиз–Тре–Тис–Тре–Цис–Про–Про–Цис–Про–Ала–Про–Глу–Лей–Лей–Глн–Глн–Про–Сер–Вал–
Фен–Лей–Фен–Про–Про–Лиз–Про–Лиз–Асн–Тре–Лей–Мет–Иле–Сер–Арг–Тре–Про–Глу–Вал–Тре–
Цис–Вал–Вал–Вал–Асп–Вал–Сер–Тис–Глу–Асп–Про–Глн–Вал–Лиз–Фен–Асн–Тре–Тир–Вал–Асп–
Глн–Вал–Глн–Вал–Тис–Асн–Ала–Лиз–Тре–Лиз–Про–Арг–Глу–Глн–Глн–Тир–Асх–Сер–Тре–Тир–
Арг–Вал–Вал–Сер–Вал–Лей–Тре–Вал–Лей–Тис–Глн–Асн–Три–Лей–Асп–Глн–Лиз–Глу–Тир–Лиз–
Цис–Лиз–Вал–Сер–Асн–Лиз–Ала–Лей–Про–Ала–Про–Иле–Глу–Лиз–Тре–Иле–Сер–Лиз–Ала–Лиз–
Глн–Глн–Про–Арг–Глу–Про–Глн–Вал–Тир–Тре–Лей–Про–Про–Сер–Арг–Глу–Глу–Мет–Тре–Лиз–
Асн–Глн–Вал–Сер–Лей–Тре–Цис–Лей–Вал–Лиз–Глн–Фен–Тир–Про–Сер–Асп–Иле–Ала–Вал–Глу–
Три–Глу–Сер–Асн–Асп–Глн–Глу–Про–Глу–Асн–Тир–Лиз–Тре–Трг–Про–Про–Вал–Лей–Асп–Сер–
Асп–Глн–Сер–Фен–Фен–Лей–Тир–Сер–Лиз–Лей–Тре–Вал–Асп–Лиз–Сер–Арг–Три–Глн–Глу–Глн–
Асн–Вал–Фен–Сер–Цис–Сер–Вал–Мет–Тис–Глу–Ала–Лей–Тис–Асн–Тис–Тир–Тре–Глн–Лиз–Сер–

Рис. 19-9. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина EU человека.

ПКК — пирролидонкарбоновая кислота (циклическое производное глутаминовой кислоты).

СТРОЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ МОЖНО ОБЪЯСНИТЬ, ИСХОДЯ ИЗ ПОВТОРНОЙ ДУПЛИКАЦИИ ПЕРВИЧНОГО ГЕНА АНТИТЕЛА

Анализ вышеупомянутых последовательностей позволяет с уверенностью заключить, что тяжелая цепь образовалась в ходе эволюции вследствие последовательного удвоения предкового гена антитела. Для того чтобы показать это нагляднее, разделим последовательность аминокислот в тяжелой цепи на четыре части (рис. 19-10). Первая, вариабельная область проявляет определенное сходство с вариабельной частью легкой цепи. В свою очередь три участка константной области характеризуются существенной гомологией как друг с другом, так и с константной областью легкой цепи. Эти взаимоотношения можно легко увидеть на рис. 19-11, где сравниваются последовательности C_L, C_H1, C_H2 и C_H3 [1]. В последовательности длиной в 100 остатков удается выявить до 30 одинаковых аминокислот при сравнении любой пары областей. Более того, в пределах каждой области содержится одна S—S-связь, причем два атома серы отделены друг от друга примерно 50—60 аминокислотами. В то же время нет ни одной S—S-связи, которая соединяла бы остатки, принадлежащие двум областям одной цепи. Это позволяет думать, что каждая гомологичная область существует как более или менее отдельная единица, не слишком уж прочно связанная с другими областями.

Тот факт, что все вариабельные области также содержат одну внутреннюю S—S-связь, говорит о том, что константная и вариабельная области могут вести свое происхождение от одного предка. Если это так, то первой стадией в эволюции иммуноглобулина было скорее всего удвоение первичного гена, в результате чего образовался сложносоставной ген

[1] L и H — от англ. light — легкий и heavy — тяжелый. — *Прим. перев.*

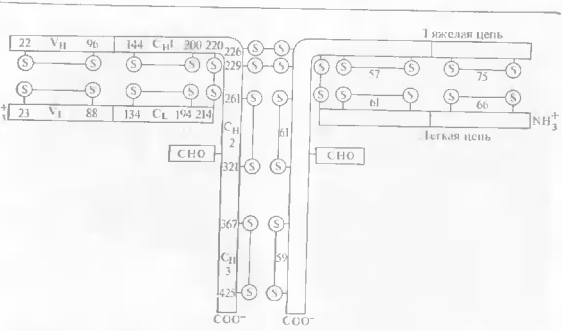


Рис. 19-10. Гомологичные участки в молекуле антитела IgG.
Гомологичными являются вариабельные области V_L и V_H, а также константные области C_L, C_H1, C_H2 и C_H3.

только небольшая часть активного центра принимает участие в связывании гаптена, причем взаимодействие обеспечивается в основном вариабельными аминокислотами тяжелой цепи (рис. 19-18).

В отличие от гипервариабельных аминокислот, которые участвуют в связывании антигена, многие аминокислоты, расположенные в вариабельной области, характеризуются довольно слабой изменчивостью у антител с разной специфичностью (рис. 19-19). Это полное или почти полное постоянство некоторых частей вариабельной области, необходимо, вероятно, для создания такой укладки полипептидных цепей, которая обеспечила бы общность основных черт строения иммуноглобулинов (рис. 19-15).

В настоящее время можно предполагать, что форма активного центра не меняется при связывании антигенной детерминанты. Большая гибкость скорее характерна для участка между двумя доменами легкой (или тяжелой) цепи. В частности, между C_H1 и C_H2 находится гибкий участок, представляющий собой своего рода шарнир, вокруг которого может происходить сгибание молекулы — за счет этого и осуществляется изменение формы антитела при образовании комплекса антиген — антитело.

МАЛЫЕ ЛИМФОЦИТЫ ЯВЛЯЮТСЯ ПРАРОДИТЕЛЯМИ ВСЕХ КЛЕТОК, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ

Все иммунные реакции зависят от наличия огромных популяций «малых» лимфоцитов — особых белых кровяных клеток, характеризующихся внешне инертным ядром, окруженным лишь ничтожными количествами цитоплазмы, которая к тому же бедна эндоплазматической сетью (рис. 19-20). Почти во всех условиях эти клетки находятся по существу в состоянии покоя, поддерживая лишь тот низкий метаболический уровень, который необходим для выживания,— так продолжается до тех пор, пока не поступит соответствующий антигенный сигнал. После этого они быстро увеличиваются в размерах и начинают интенсивно делиться.

Рис. 19-20. Электронная микрофотография тонкого среза малого лимфоцита (Roitt, Essential Immunology, 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, London, 1974). Видно, что цитоплазма занимает относительно небольшой объем.

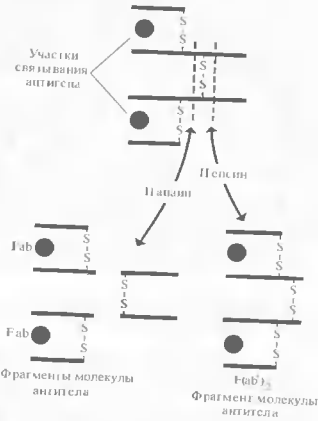


Рис. 19-12. Образование фрагментов Fab и $F(ab')_2$ в результате специфического действия протеолитических ферментов на интактную молекулу IgG.

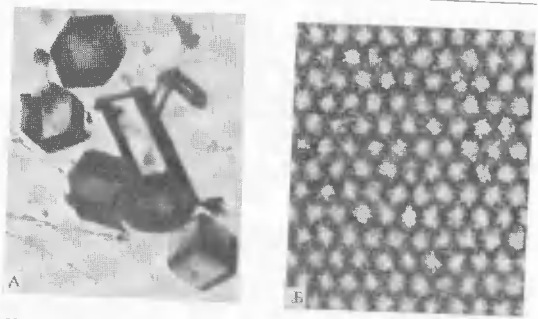


Рис. 19-13. *А*. Микрофотография кристаллов Fab — фрагментов иммуноглобулина МеРС 603 (× 72). *Б*. Электронная микрофотография участка окрашенного кристалла (× 400 000). Видна гексагональная симметрия фрагментов в кристалле. Сами фрагменты окрашены, а пространство между ними остается бесцветным (Laban et al., Ultrastructure Res., **51**, 362, 1975).

Образующиеся при такой обработке фрагменты Fab (Fab′) (рис. 19-12) удается закристаллизовать (рис. 19-13); получены также подробные данные о конформации двух других фрагментов миеломного белка (рис. 19-14). Все это дает возможность сравнивать основные черты структуры константной и вариабельной областей, а также выявлять те аминокислоты, которые непосредственно вовлечены во взаимодействие с антигенными детерминантами.

В настоящее время можно почти наверняка утверждать, что обе области — и константная и вариабельная — характеризуются примерно одинаковым способом укладки полипептидных цепей (рис. 19-15). Каждая область содержит два слоя растянутых β-структур (см. стр. 134), более или менее параллельных друг другу и окружающих внутреннюю часть молекулы, в которой находятся боковые группы гидрофобных аминокислот. V-области имеют тенденцию упаковываться вместе и образовывать вариабельный «домен», а две константные области образуют константный домен. Основное отличие V-домена от С-домена состоит в том, что он содержит дополнительные аминокислоты, многие из которых используются для связывания соответствующей антигенной детерминанты.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНТИТЕЛ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ КАК ЛЕГКИМИ, ТАК И ТЯЖЕЛЫМИ ЦЕПЯМИ

Активные центры, связывающие антигенные детерминанты, включают в себя вариабельные участки как легких, так и тяжелых цепей. Вначале предполагали, что специфичность антитела определяется в основном различиями в аминокислотной последовательности тяжелой цепи, однако в настоящее время стало ясно, что во многих случаях аминокислотная последовательность легкой цепи также участвует в определении специфичности. Обнаружение этого факта помогает обойти затруднения, связанные с уже обсуждавшейся гипотезой, согласно которой для кодирования разнообразных антител необходимо допустить существование огромного числа генов. Поскольку каждая молекула антитела должна кодироваться двумя генами (один для легкой и один для тяжелой цепи), число возможных антител будет равно произведению числа легких цепей на число тяжелых цепей. В этом случае миллион различных антител можно получить при наличии всего лишь двух тысяч генов, содержащих информацию для тысячи легких и тысячи тяжелых цепей.

Не все аминокислоты в вариабельных областях непосредственно участвуют в образовании активных центров. Эту функцию выполняет примерно треть всех аминокислот, входящих в состав вариабельных областей, причем именно они и проявляют наибольшую изменчивость у разных иммуноглобулинов. Соответствующие им участки в легких и тяжелых цепях получили название *гипервариабельных участков* (рис. 19-16).

Все гипервариабельные аминокислоты расположены на одном конце молекулы иммуноглобулина и обращены в сторону растворителя. Они образуют полость (активный центр), которая по форме соответствует определенной антигенной детерминанте. Точная геометрия активного центра зависит, очевидно, от аминокислот, «выстилающих» полость. Во фрагменте Fab′ иммуноглобулина NEW гипервариабельные аминокислоты окружают неглубокую щель ($16 \times 7 \times 6$ Å), образовавшуюся между доменами V_L и V_H, с которой специфически связывается оксипроизводное витамина K_1 (рис. 19-17). Более вместительная полость ($15 \times 20 \times 12$ Å) образуется гипервариабельными аминокислотами фрагмента Fab иммукоглобулина MePC 603 — белка мышиной миеломы, характеризующегося способностью связывать фосфорилхолин. В этом случае

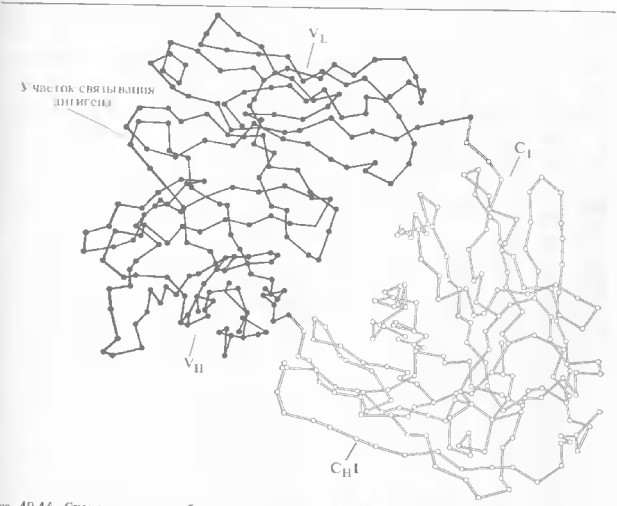


Рис. 19-14. Схематическое изображение углеродного остова FAb′ — фрагмента иммуноглобулина NEW (Poljak et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 3305, 1973). С-домен обозначен тонкими линиями, V-домен — жирной линией.

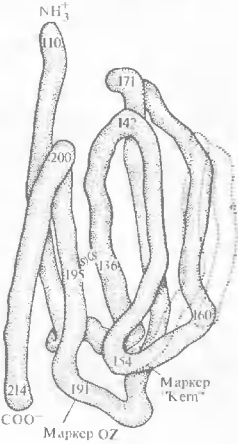


Рис. 19-15. Схематическое изображение укладки полипептидной цепи иммуноглобулина (Poljak et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 3305, 1973).
Сплошной линией показана укладка полипептидной цепи в C_L-домене. Дополнительные аминокислоты, выявленные в области V_L, расположены в петлях, очерченных штриховыми линиями.

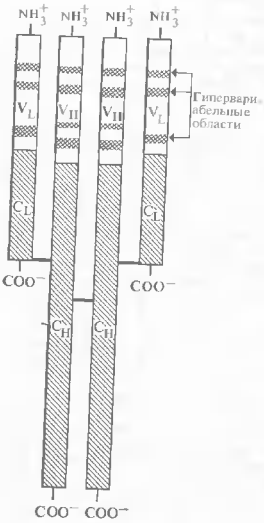


Рис. 19-16. Гипервариабельные участки V-областей молекулы иммуноглобулина.

Рис. 19-17. Схематическое изображение (вид сверху) неглубокой полости, которая расположена между вариабельными областями легких и тяжелых цепей белка NEW миеломы человека, специфически связывающего гаптен — оксипроизводное витамина K_1 (показан черным цветом (Richards et al., The Immune System, Acad. Press, 1974).

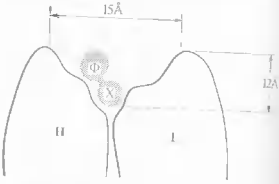


Рис. 19-18. Схема расположения фосфорилхолина (ФХ, заштрихован) в полости, образованной гипервариабельными участками вариабельных областей тяжелой (H) и легкой (L) цепей белка McPC 603 из клеток миеломы мышей. На этой схеме (вид сбоку) видно, что во взаимодействии антиген — антитело участвует в основном тяжелая цепь (Padlan et al., The Immune System, Acad. Press, 1974).

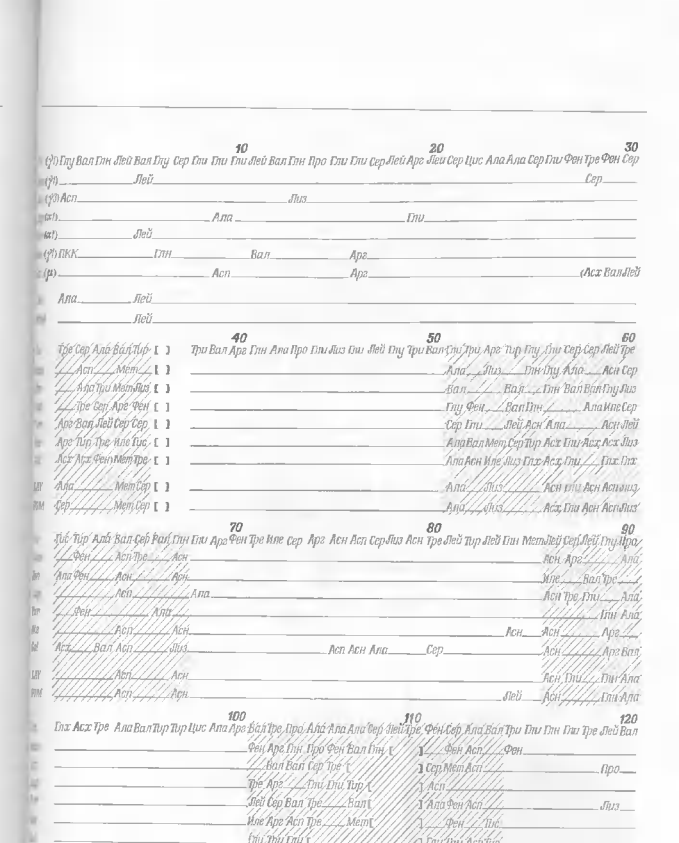


Рис. 19-19. Последовательности вариабельных областей тяжелых цепей девяти типов иммуноглобулинов человека (Capra, Kehoe, Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 4032, 1974). Тождественность с белком The обозначена горизонтальными линиями. Неидентичные аминокислоты заштрихованы, они имеют тенденцию группироваться в определенных участках (гипервариабельных), LAY и POM — два антитела против гамма-глобулина, характеризующиеся одинаковой специфичностью (идиотипией), но полученные от разных особей; у них обнаруживается поразительная идентичность в гипервариабельных участках, ответственных за связывание антигена.

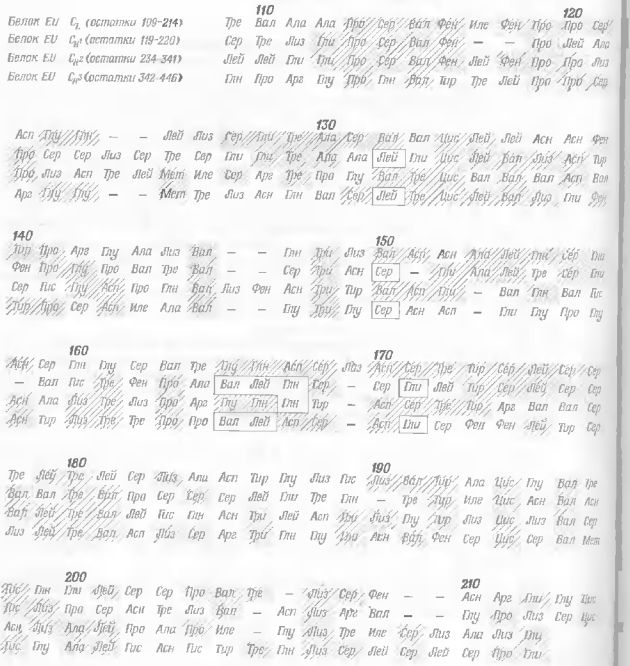


Рис. 19-11. Гомологичные аминокислотные последовательности в константных областях молекулы иммуноглобулина EU (Edelman et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 63, 78, 1969). Пропуски, отмеченные черточками, введены для более отчетливого выявления гомологии. Тождественные остатки заштрихованы. Одинаковые пары остатков, встречающиеся в одинаковых положениях, заштрихованы и заключены в рамку.

с двумя идентичными нуклеотидными последовательностями. Одна последовательность, не слишком существенно изменившаяся в дальнейшем, могла сохраниться в качестве константной области, а из другой в результате изменений образовалась вариабельная область. Эта точка зрения была убедительно подтверждена данными рентгеноструктурного анализа фрагментов антител, полученных при обработке специфических белков миеломы папаином или пепсином.

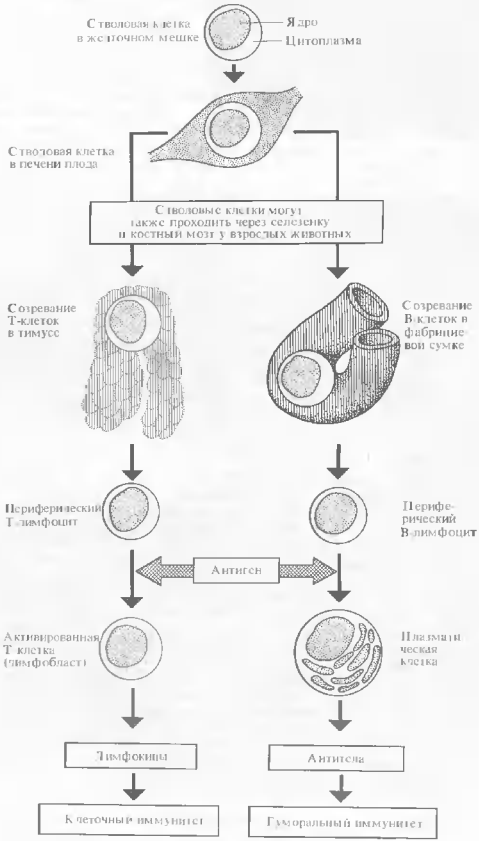


Рис. 19-24. Возможное образование лимфоцитов В- и Т-типа путем дифференцировки стволовых клеток.

Т-ЛИМФОЦИТЫ И В-ЛИМФОЦИТЫ

Существует две популяции малых лимфоцитов, которые очень существенно отличаются друг от друга. Представители одной популяции — *Т-лимфоциты* — продуцируются в *тимусе*, или вилочковой (зобной) железе (лимфоидная железа, эмбриологически ведущая свое происхождение от эпителия желудочно-кишечного тракта). Представители второй популяции — *В-лимфоциты* — ответственны за синтез циркулирующих антител. Их непосредственное происхождение у млекопитающих неясно, а у птиц они образуются в лимфоидной железе, называемой *фабрициевой сумкой* [1], которая также ведет свое происхождение от эмбрионального кишечника. Клеточными прародителями обеих популяций лимфоцитов являются стволовые клетки костного мозга — некоторые из них мигрируют в тимус, где дифференцируются в Т-клетки, а другие попадают в сумку (или в ее эквивалент у млекопитающих), где превращаются в В-клетки (рис. 19-21). Поэтому у животных, которые подвергались операции по удалению тимуса на ранних этапах развития, не наблюдается реакции клеточного иммунитета. Соответственно удаление сумки приводит к исчезновению циркулирующих антител.

Под микроскопом Т- и В-клетки морфологически неразличимы, но Т-клетки можно узнать по специфическому поверхностному компоненту — θ-антигену, который впервые появляется, когда Т-клетки завершают в тимусе процесс дифференцировки. В настоящее время очень полезным оказалось использование мутантов, у которых отсутствуют либо Т-, либо В-клетки. Особенно много ценных сведений было получено в экспериментах на так называемых мышах «nude» (т. е. бесшерстных), которые вообще не имеют тимуса и по этой причине не способны продуцировать Т-клетки.

ТРАНСФОРМАЦИЯ ЛИМФОЦИТОВ

Восприятие соответствующего антигенного раздражителя приводит к превращению Т-клеток в *лимфобласты* (рис. 19-22), а В-клеток — *в плазматические клетки* (рис. 19-23). Хотя внешне они довольно сходны, отличить их друг от друга весьма несложно: лимфобласты не секретируют огромных количеств антител и поэтому не содержат шероховатой эндоплазматической сети, которая в плазматических клетках участвует в транспорте синтезирующихся в изобилии гуморальных антител. Трансформация В-клеток в плазматические клетки происходит отнюдь не сразу. Вначале они превращаются в незрелые плазматические клетки, называемые плазмобластами. Каждый плазмобласт существует очень короткое время: довольно скоро он начинает делиться с образованием дочерних клеток. Однако эти дочерние клетки морфологически неидентичны родительским. При каждом последующем цикле деления образуются клетки со все более выраженной цитоплазмой, заполненной все возрастающим числом рибосом (рис. 19-24). На пятый день после антигенной стимуляции в результате ряда последовательных циклов клеточных делений образуется колония зрелых плазматических клеток, которые с большой скоростью продуцируют антитела.

КАЖДАЯ ПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ КЛЕТКА ПРОДУЦИРУЕТ ЛИШЬ ОДИН ОПРЕДЕЛЕННЫЙ ТИП АНТИТЕЛА

Как будут вести себя плазматические клетки, если мы одновременно введем в организм несколько различных антигенов? Будет ли при этом каждая данная клетка продуцировать все типы антител к введенным

[1] По лат. bursa, отсюда название В-лимфоциты — *Прим. перев.*

Рис. 19-22. Электронная микрофотография тонкого среза трансформированного Т-лимфоцита (лимфобласта) (Roitt, Essential Immunology, 2nd ed., Blackwell Scientifte Publications, London, 1974).

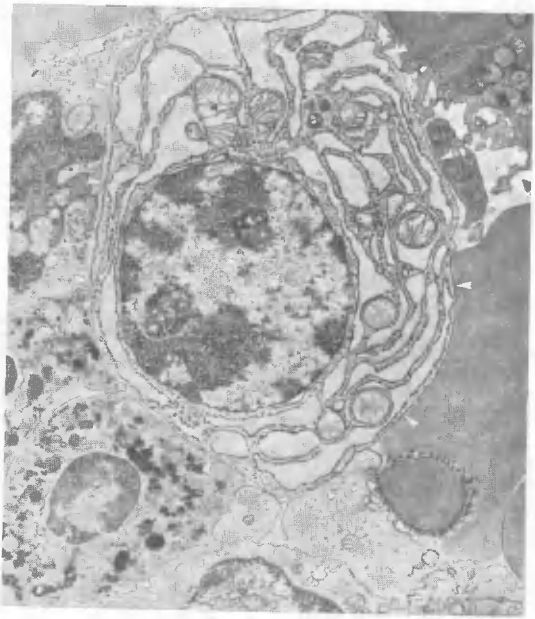


Рис. 19-23. Электронная микрофотография плазматической клетки из селезенки морской свинки. (С любезного разрешения д-ра Портера из биологической лаборатории Гарвардского университета.)
Граница клетки отмечена белыми стрелками. Плотность эндоплазматической сети сильно растянута благодаря присутствию большого количества антител. Рибосомы видны в виде темных точек, прикрепленных к эндоплазматической сети. Вокруг плазматической клетки располагаются другие типы белых кровяных клеток.

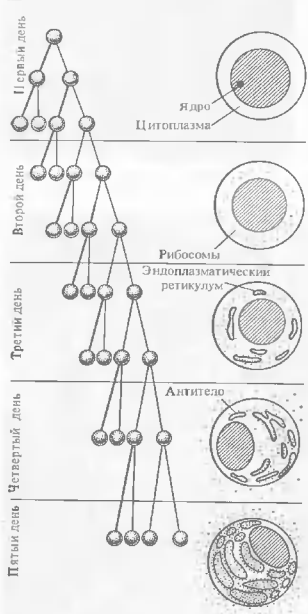


Рис. 19-24. Последовательные стадии созревания плазматической клетки.
Клетки, продуцирующие значительное количество антител, появляются не раньше чем на 5-й день, приблизительно после 8 клеточных генераций. Наиболее характерная черта зрелых клеток — наличие хорошо развитой эндоплазматической сети, внутренние полости которой заполнены молекулами антитела.

антигенам или только один из них? Исходя из инструктивной гипотезы следует ожидать, что справедливым окажется первое предположение, так как в каждую клетку может проникнуть несколько разных антигенов. Однако эксперимент дает противоположный ответ. Проверка антител, образованных одиночными плазматическими клетками (которые можно отделить после того, как они начнут продуцировать антитела), показала, что большинство клеток синтезирует только один тип антител. Каждая плазматическая клетка представляет собой, таким образом, как бы высокоспециализированную фабрику, занятую выработкой только одного вида продукта (одного типа белка).

В КЛЕТКАХ, ВЫРАБАТЫВАЮЩИХ АНТИТЕЛА, НЕ ОБЯЗАТЕЛЬНО ДОЛЖЕН ПРИСУТСТВОВАТЬ АНТИГЕН

Вначале казалось очевидным, что в антителообразующих плазматических клетках должно присутствовать большое число молекул антигена. Однако теперь мы располагаем убедительными данными, показывающими, что

число таких молекул (если только они вообще присутствуют в плазматических клетках) должно быть очень мало и что они не играют никакой функциональной роли. Эти данные получены в экспериментах на животных, которым вводили антиген, меченный высокорадиоактивным изотопом. Чтобы проследить судьбу антигена, через несколько дней после инъекции готовили тонкие срезы ткани, вырабатывающей антитела, и исследовали их методом радиоавтографии. Оказалось, что большая часть антигена обнаруживалась в макрофагах, которые не имеют прямого отношения к синтезу антител. В большинстве плазматических клеток, наоборот, не содержалось ни одной молекулы антигена, и только несколько таких молекул обнаруживалось в плазмобластах. Эти наблюдения явились еще одним опровержением инструктивной гипотезы. Каждая антителообразующая клетка вырабатывает одновременно тысячи молекул антител, и, значит, согласно инструктивной гипотезе, в ней должны были бы присутствовать и тысячи молекул антигена, быть может, связанных с рибосомами — центрами белкового синтеза.

КЛОНАЛЬНО-СЕЛЕКЦИОННАЯ ТЕОРИЯ

Тот факт, что присутствие антигена вызывает резкое увеличение числа клеток, вырабатывающих специфические антитела, подтверждают общепризнанную теперь *клонально-селекционную теорию* (клоном называется группа идентичных клеток, ведущих свое происхождение от одной клетки). Эта теория предполагает, что единственная функция антигена заключается в том, что своим присутствием он стимулирует деление определенных клеток. Никакой другой информации антиген не вносит в клетку. Согласно этой теории, в организме *предсуществует* — до всякого контакта с антигеном — очень большой набор дифференцированных малых лимфоцитов. Каждый клон этих клеток наделен способностью образовывать только какой-нибудь один тип антител. Действие антигена сводится к тому, что он стимулирует размножение соответствующих клонов, вызывая избирательную пролиферацию малых лимфоцитов (рис. 19-25).

Даже на ранних стадиях эмбрионального развития число различных лимфоцитов, вырабатывающих один, строго определенный вид иммуноглобулина, чрезвычайно велико. К тому времени, когда удается выявить выход первых В- (или Т-) клеток из мест, где они образуются (т. е. сумки или тимуса соответственно), уже существуют многие тысячи разных типов. Поэтому многие считают, что процесс дифференцировки, в результате которого образуется столь широкий спектр специфичности, происходит в сумке (тимусе), и главной, если не единственной, функцией этих лимфоидных желез является превращение неспецифических стволовых клеток костного мозга в малые лимфоциты, которым присуща только одна, строго определенная специфичность.

ИММУНОГЛОБУЛИНЫ НА ПОВЕРХНОСТИ МАЛЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Оба типа иммунных клеток — как В, так и Т — характеризуются наличием молекул иммуноглобулина, внедренных в плазматическую мембрану таким образом, что их активные центры обращены кнаружи и потому способны связывать антигены. Предполагают, что эти поверхностные антитела представляют собой клеточные рецепторы, которые воспринимают антигенный стимул, играющий роль пускового механизма в соответствующей иммунной реакции. Каждый лимфоцит содержит только один тип рецептора (поверхностного антитела); после иммунной стимуляции потомство этой клетки продолжает вырабатывать только один, строго

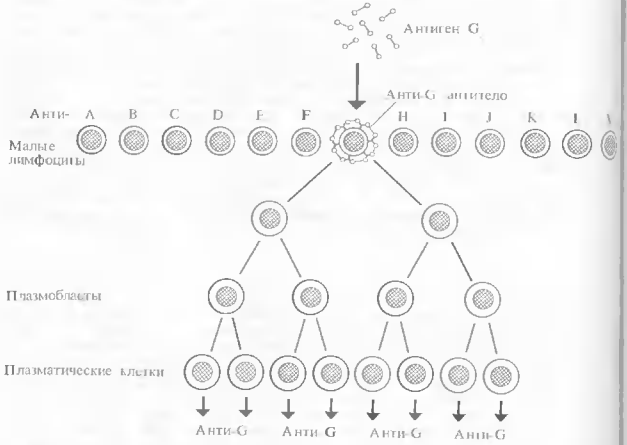


Рис. 19-25. Клонально-селекционная модель образования антител.
Согласно этой теории, антиген стимулирует синтез комплементарных антител благодаря тому, что он вызывает избирательное деление и дифференцировку тех малых лимфоцитов, которые уже подготовлены к синтезу данного типа антител.

определенный тип молекул иммуноглобулина. На поверхности В-клеток находится гораздо больше молекул иммуноглобулина, чем на поверхности Т-клеток (в последнем случае число молекул составляют всего лишь несколько сотен рецепторов). Поскольку эти клетки столь бедны антителами, до сих пор не удалось установить, относятся ли иммуноглобулины, находящиеся на их поверхности, к одному из пяти известных классов иммуноглобулинов.

Нам почти ничего не известно о механизме, с помощью которого связывание антигена вызывает увеличение размеров малых лимфоцитов и их деление. В настоящее время единственным важным наблюдением, позволяющим надеяться получить в будущем более четкие сведения, является то, что мультимерные вещества, состоящие из набора идентичных повторяющихся субъединиц, обладают значительно большей антигенной эффективностью, чем вещества, в которых антигенные детерминанты представлены однократно. Кажется теперь вероятным, что антигенную активность проявляют те вещества, которые способны образовывать поперечные сшивки между подвижными иммуноглобулинами, играющими роль поверхностных рецепторов (рис. 19-26). Если эта гипотеза справедлива, то она позволяет разумно объяснить, почему молекулы, характеризующиеся небольшими размерами и наличием одновалентного заряда, например ДНФ (динитрофенол), сами по себе не могут действовать в каче-

Рис. 19-26. Схема, иллюстрирующая возможный механизм действия мультимерного антигена, который вызывает связывание подвижных иммуноглобулинов, группирующихся на определенном участке клеточной мембраны малого лимфоцита.

стве антигенов. Только после соединения с крупными молекулами они приобретают способность вызывать агрегацию поверхностных иммуноглобулинов. Но каким образом появление поперечных сшивок между поверхностными иммуноглобулинами может служить сигналом для начала клеточной пролиферации, пока еще совершенно непонятно.

ДАННЫЙ АНТИГЕН СВЯЗЫВАЕТСЯ ЛИШЬ С ОЧЕНЬ МАЛОЙ ЧАСТЬЮ ПОПУЛЯЦИИ МАЛЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Если маркировать какой-либо антиген радиоактивной меткой или флуоресцирующим красителем, то можно непосредственно измерить процентное отношение малых лимфоцитов, содержащих поверхностные иммуноглобулины с активными центрами, комплементарными данному антигену. Если выделить лимфоциты из животного, никогда ранее не имевшего контакта с данным антигеном, то лишь очень небольшая доля их (от 10^{-4} до 10^{-6}) будет содержать радиоактивную метку (или флуоресцентный краситель) (рис. 19-27). Однако, если выделить лимфоциты из крови животного, повторно иммунизированного данным антигеном, количество меченых (или сильно флуоресцирующих) клеток существенно возрастет. Число таких клеток представляет всегда верхний предел числа клеток, содержащих один вид специфических иммуноглобулинов. Это объясняется не только тем, что многие антигены содержат более одной сильной антигенной детерминанты, но также и тем, что данная антигенная детерминанта часто связывается более чем с одним видом иммуноглобулина. В настоящее время есть данные, согласно которым у данного индивидуума по крайней мере от 5 до 10 различных антител (т. е. иммуноглобулинов, характеризующихся разными аминокислотными последовательностями) обладают способностью связывать таптен динитрофенол (ДНФ). Степень иммунологического разнообразия, таким образом, еще больше, чем можно было предполагать несколько лет назад.

ПЕРВИЧНЫЙ И ВТОРИЧНЫЙ ИММУННЫЕ ОТВЕТЫ

Если первое (*первичное*) введение антигена в организм животного вызывает превращение лишь небольшого числа малых лимфоцитов в плазматические клетки (лимфобласты), то повторное введение того же антигена

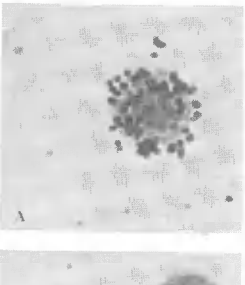


Рис. 19-27. Радиоавтограф малого лимфоцита из лимфатического узла неиммунизированной мыши после обработки in vitro флагеллином, меченным ^3H (Dietzer, Packkau, Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 2364, 1972).
Специфическое связывание метки отмечается для одной из 10^5 клеток. *А*. Равномерное связывание при инкубации в течение 30 мин при 0°С. *Б*. Агрегация (образование «шапочки») антигена на одном из полюсов клетки после инкубации в течение 15 мин при 37°С. «Шапочка» образуется за счет перекрестной агрегации поверхностных иммуноглобулиновых рецепторов в присутствии полимерного антигена.

спустя несколько недель приводит к более бурной реакции (рис. 19-28). Не только увеличивается число функционирующих клеток, но и образующиеся антитела прочнее связываются с соответствующими антигенами. Усиление реакции при *вторичном* ответе указывает на существование *иммунологической памяти* — механизма, при помощи которого организм запоминает предшествующий контакт с антигеном. В формировании этого механизма непосредственное участие принимают сами малые лимфоциты; это показано в опытах, в которых лимфоциты из иммунизированных животных переносили в организм неиммунизированных: иммунная реакция в этом случае шла по типу вторичного ответа.

Развитие первичного ответа ведет, таким образом, не только к производству плазматических клеток (лимфобластов) в больших масштабах, но и к избирательному образованию еще большего числа копий стимулированных исходных малых лимфоцитов (*клеток иммунологической памяти*). Предполагают, что эти новые малые лимфоциты не являются сами плазматическими клетками (лимфобластами), поскольку через несколько дней после проявления первичного ответа большая часть этих клеток отмирает. Можно думать, что клетки памяти образуются либо в результате обратной дифференцировки незрелых плазмобластов (лимфобластов), либо благодаря некоему процессу, при котором антигены вызывают клеточное деление самих малых лимфоцитов, не сопровождающееся их превращением в зрелые бласты.

Повышение сродства связывания у антител, обнаруживаемое при вторичном ответе, отражает избирательное размножение только тех лим-

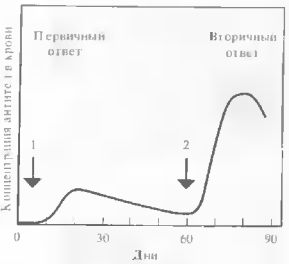


Рис. 19-28. График, иллюстрирующий первичный и вторичный ответы у кролика. Стрелки 1 и 2 соответствуют моментам инъекции антигена. Вторичный ответ отличается существенно большей быстротой и интенсивностью по сравнению с первичным.

фоцитов, которые способны связывать антиген наиболее прочно. Очевидно, вероятность возникновения большого числа потомков (клеток памяти) из малого лимфоцита непосредственно связана со сродством его антител к индуцирующему антигену. Те малые лимфоциты, которые содержат иммуноглобулины со сравнительно слабым сродством, порождают очень небольшое число клеток памяти. Постоянное повышение сродства связывания обнаруживается не только в ходе вторичного ответа, но также и при развитии первичной реакции.

Таким образом, мы видим, что точная специфичность антител, вырабатываемых на начальных этапах вторичного ответа, на самом деле предопределена точной специфичностью антигена, используемого для индукции первичного ответа. Например, при заражении вирусом гриппа первоначально вырабатываемые антитела, по всей видимости, гораздо лучше приспособлены к тому штамму вируса, который был в нашем организме несколько лет назад, чем к тому, который вызвал заболевание в данном случае.

НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ЛИМФОЦИТОВ, ИНДУЦИРУЕМАЯ ПОВЕРХНОСТНО СВЯЗЫВАЕМЫМИ АГЕНТАМИ

Если специфический антиген индуцирует трансформацию только тех лимфоцитов, которые обладают комплементарными поверхностными иммуноглобулинами, то существуют и такие вещества, которые вызывают общую неспецифическую трансформацию. Обычно такие агенты воздействуют либо на В-, либо на Т-клетки. Сложный бактериальный липополисахарид, например, трансформирует только В-клетки, в то время как митогенные лектины растений — конканавалин А (из лаконоса) и фитогемагглютинин (из каиавалии мечевидной) специфически стимулируют деление и дифференцировку Т-клеток (рис. 19-29). Эти неспецифические митогены существенно облегчают биохимический анализ при изучении трансформации, поскольку соответствующие реакции протекают у большого числа лимфоцитов, подвергшихся их воздействию, в отличие от очень малой доли клеток, претерпевающих трансформацию при воздействии специфического антигена.

Обычно трансформация нормальных клеток in vitro прекращается уже через несколько циклов клеточных делений. Это соответствует тому,

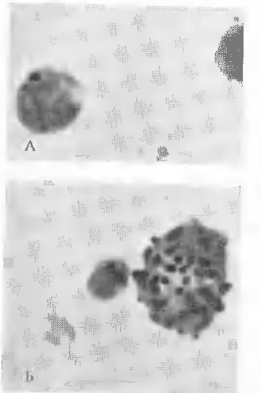


Рис. 19-29. Превращение малого лимфоцита из селезенки мыши в лимфобласт после инкубации в течение 48 часов в растворе конканавалина А (3 мкг/мл) и последующей инкубации в течение 2 ч в присутствии ^{3}H-тимидина (Cunningham et al., Cellular Selection and the Immune Response, G. M. Edelman (ed.), Raven Press, New York, 1974).
А. Нестимулированный малый лимфоцит, способный к синтезу ДНК. *Б.* Трансформированная клетка, активно продуцирующая ДНК

что происходит в живом организме, где данный антигенный стимул приводит к ограниченной пролиферации клеток. Однако бессмертные линии клеток можно получить, если заразить малые лимфоциты определенными вирусами из группы герпеса лизогенизирующего типа (см. ниже).

ПРИЧИНА РАЗНООБРАЗИЯ АНТИТЕЛ

Тот факт, что каждый данный индивидуум обладает потенциальной способностью вырабатывать такое огромное количество разных лимфоцитов (примерно 10^6—10^7), в то время как каждый данный малый лимфоцит неизбежно обречен продуцировать иммуноглобулины одной специфичности, представляет собой в настоящее время главную нерешенную проблему иммунологии. Попытки понять суть этого вопроса вначале привели к возникновению двух кардинально противоположных гипотез. Первая утверждала, что существует один-единственный гаметный ген иммуноглобулина [1], а разнообразие является следствием *соматических мутаций* в этом гене. Обычно при этом допускали, что участки ДНК, содержащие информацию для вариабельных областей легких и тяжелых цепей, в особенности те нуклеотиды, которые непосредственно кодируют аминокислоты «активных центров», отличаются гипервариабельностью. Вторая гипотеза постулировала существование *отдельных генов* для всех отличающихся друг от друга легких и тяжелых цепей. Даже если учитывать последние данные, согласно которым бо́льшая часть ДНК позвоночных не кодирует аминокислотные последовательности (и потому размер гена примерно

[1] По *англ.* germ line gene, т. е. ген клеток зародышевого пути. В специальной литературе этот термин часто употребляется без перевода, мы будем использовать термин «гаметный ген». — *Прим. перев.*

в 30 раз больше предполагавшегося ранее), количество необходимого для этого генетического материала (1000—3000 генов легких цепей × 1000—3000 генов тяжелых цепей — 10^6—10^7 различных антител) все равно бы заняло всего лишь от 1 до 10% всей ДНК. Поэтому a priori предположение о существовании относительно большого числа иммуноглобулиновых генов не противоречит ни одному из современных представлений о кодирующей способности ДНК.

Теперь мы понимаем, что ни одна из гипотез в ее исходной форме «все или ничего» не может считаться верной, и, по всей вероятности, когда все окончательно прояснится, в реальной действительности найдется место и для теории соматических мутаций, и для теории множественных генов. Во всяком случае, уже и сейчас накоплено достаточно убедительных доказательств, заставляющих отвергнуть упрощенные формулировки обеих гипотез.

ДВЕ ФОРМЫ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ

Иммуноглобулины каждого человека характеризуются наличием двух разных типов легких цепей. Одна из них называется $\varkappa$ (каппа), другая — λ (лямбда). Каждая цепь имеет определенную аминокислотную последовательность, поэтому любую легкую цепь можно безошибочно отнести либо к каппа-, либо к лямбда-типу (рис. 19-30). Вряд ли можно себе представить, что они образовались в результате соматических мутаций одного гаметного гена легких цепей. Скорее, наоборот, следует допустить существование по меньшей мере одного отдельного гаметного гена для каждой группы. Принадлежность к типу каппа или лямбда определяется не только константной областью данной цепи, но также и ее вариабельной областью. Те вариабельные последовательности, которые не участвуют непосредственно в формировании активного центра, распадаются на две категории, причем одна из них, $V_\varkappa$, всегда выступает в паре с последовательностью $C_\varkappa$, а другая, V_λ, неизменно соединена с последовательностью C_λ.

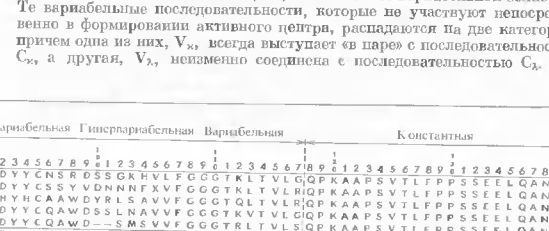


Рис. 19-30. Отдельные аминокислотные последовательности из V- и C-областей некоторых легких цепей иммуноглобулинов человека (H. Eisen, Immunology, Harper and Row, 1974). Последовательности цепей типа $\varkappa$ находятся в верхней части рисунка, а последовательности цепей типа λ — в нижней части. Число аминокислот не строго одинаково во всех цепях, поэтому последовательности выравнены для более отчетливого выявления гомологии.

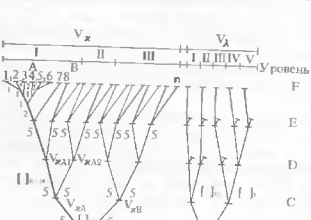


Рис. 19-31. Гипотетическое генеалогическое древо для подгруппы вариабельных областей легких цепей иммуноглобулинов человека (Hood, Campbell, Elgin, Ann. Rev. Genetics, 9, 1975).
Число ветвей указывает на число аминокислотных замен, имевших место между точками ветвления. Генетические события, ответственные за данную картину, могут отражать мутации, возникающие как в ходе эволюции позвоночных, так и при соматической дифференцировке.

Разные последовательности V_κ и V_λ можно разбить на более мелкие подгруппы. У человека различают по крайней мере три разные подгруппы V_κ, а для V_λ выявлено не менее пяти подгрупп (рис. 19-31). Напротив, все последовательности C_κ (C_λ) фактически одинаковы. Наличие отчетливых подгрупп вариабельных последовательностей и отсутствие в них каких бы то ни было «промежуточных» вариантов кажется аргументом против предположения о том, что они возникли в результате соматических мутаций в ходе эмбрионального развития. Большинство ученых склоняется в настоящее время к мнению, что для каждой подгруппы существует по крайней мере один гаметный ген, кодирующий аминокислотную последовательность в цепях данной подгруппы. Окончательное решение этого вопроса следует, однако, отложить до получения дополнительных данных об аминокислотных последовательностях.

РАЗНЫЕ ГЕНЫ СОДЕРЖАТ ИНФОРМАЦИЮ ДЛЯ РАЗНЫХ ФОРМ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ

Получены также надежные данные, свидетельствующие о том, что существует ряд различных генов, содержащих информацию для тяжелых цепей антител. Все классы иммуноглобулинов (IgG, IgM, IgA, IgD и IgE) характеризуются настолько разными тяжелыми цепями, что невозможно предложить никакого иного объяснения, кроме предположения о существовании отдельного гена для каждого типа. Каждую тяжелую цепь γ (IgG) можно разделить, кроме того, на четыре «блока» специфических аминокислотных последовательностей, отличающихся разными антигенными свойствами: (γ_1, γ_2, γ_3 и γ_4). И здесь опять-таки мы склоняемся к мнению, что каждый «блок» должен кодироваться отдельным гаметным геном. Для иммуноглобулинов человека IgA и IgM описаны к настоящему времени только два подкласса, но эти антитела исследовались гораздо менее интенсивно. Вероятно, со временем обретут более отчетливые очертания и представления об остальных подклассах тяжелых цепей, а также о соответствующих им гаметных генах.

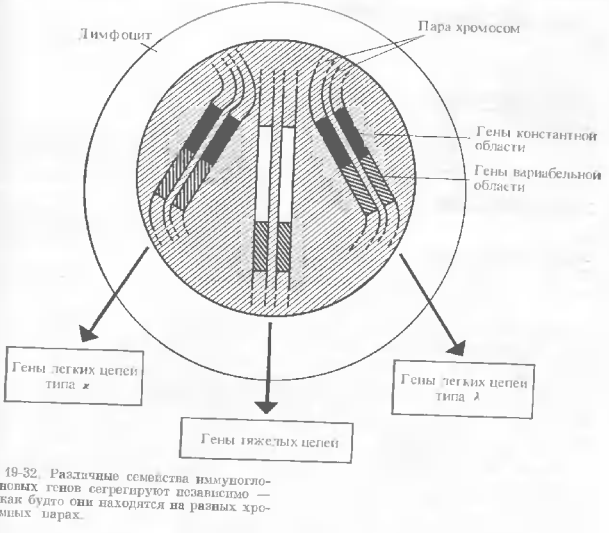


Рис. 19-32. Различные семейства иммуноглобулиновых генов сегрегируют независимо — так, как будто они находятся на разных хромосомных парах.

АЛЛОТИПЫ

Каждый отдельный гаметный ген иммуноглобулина может существовать в виде разнообразных аллелей, которые содержат информацию для цепей иммуноглобулина, отличающихся характерными аминокислотными маркерами (*аллотипы*). Например, индивидуумы, гомозиготные в отношении аллеля Gma^+, имеют последовательность в константной области цепи γ_1 ...Асп.Глу.Лей.Тре.Лиз..., в то время как индивидуумы, несущие альтернативные аллели GMA^-, вырабатывают тяжелые цепи γ_1 с последовательностью ...Мет.Глу.Глу.Тре.Лиз... Подробный анализ наследования аллотипических маркеров у кролика показывает, что гены, содержащие информацию для легких цепей λ, вовсе не сцеплены с генами, кодирующими цепи κ, или с генами тяжелых цепей (рис. 19-32). Интересно, что гены, содержащие информацию для тяжелых цепей различных групп (например, γ_2, α_1, γ_1, μ_2), расположены близко друг от друга.

ОТДЕЛЬНЫЕ ГАМЕТНЫЕ ГЕНЫ ДЛЯ ОБЛАСТЕЙ V И C

Каким образом отдельные гены для разных подгрупп могли бы легко обеспечить образование тождественных последовательностей (аллотипов) на константных «половинках» и в то же время дать возможность развиться

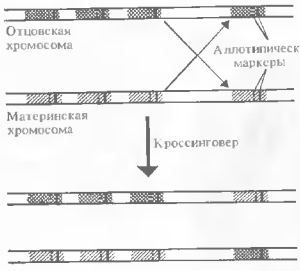


Рис. 19.33. Схема, иллюстрирующая исчезновение четко выраженных аллотипических маркеров вследствие кроссинговера между большим числом тандемно расположенных генов антител.
Поскольку аллотипы ведут себя как отдельные менделевские признаки, те гены, которые несут аллотипические маркеры, должны быть представлены в гаплоидном геноме единственной копией.

выраженной эволюционной дивергенции в определенных областях вариабельных «половинок»? Механизмы всех этих процессов всегда казались в высшей степени сложными — ведь для этого необходимо было найти какой-то способ не только ограничить бо́льшую часть спонтанных мутаций вариабельной областью, но и предотвратить рекомбинацию аллельных маркеров при кроссинговере (рис. 19-33). Хотя теоретически возможно предложить усложненные *ad hoc* гипотезы, которые могли бы объяснить поддержание идентичных аллотипов тандемно сцепленными V- и C-генами, но все эти гипотезы по существу очень далеки от истины. Кажется гораздо более вероятным, что для константной и вариабельной областей существуют отдельные гаметные гены. Более того, строгое наследование аллотипов позволяет полагать, что каждая специфическая последовательность C-области кодируется одним C-геном. И, напротив, V-гены могут быть множественными — по крайней мере по одному на каждую подгруппу (а может быть, и намного больше, если причиной столь значительного многообразия вариабельной области являются соматические мутации).

СОХРАНЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ПРИ ПРЕВРАЩЕНИИ IgM В IgG

Убедительное свидетельство в пользу существования разных генов для константных и вариабельных областей было получено при изучении взаимоотношений между молекулами IgM и IgG, вырабатываемыми в ходе иммунной реакции. При первичной антигенной (или неспецифической) трансформации лимфоцитов первыми начинают секретироваться антитела, которые всегда принадлежат к классу IgM (19S). После нескольких клеточных делений и обычно только в ходе вторичного ответа начинают преобладать молекулы IgG (7S) (рис. 19-34). Это переключение происходит при отсутствии каких бы то ни было изменений в специфичности активного центра. В соответствующих 7S- и 19S-иммуноглобулинах тождественны не только легкие цепи, но и вариабельные области тяжелых цепей μ(IgM) и γ(IgG). В отличие от V-областей соответствующие константные области тяжелых цепей имеют разные последовательности (рис. 19-35). Таким образом, одна и та же вариабельная область присоединяется к двум разным константным областям — как мы рассмотрим ниже, это и является узловым моментом в проблеме формирования специфичности антитела.

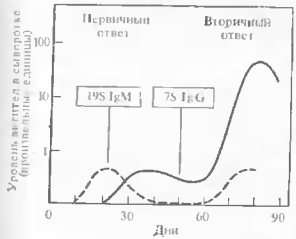


Рис. 19-34. Переключение с синтеза IgM на синтез IgG в процессе развития иммунной реакции.

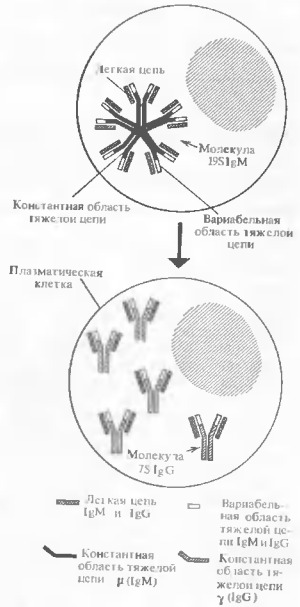


Рис. 19-35. Присоединение одной и той же области V_H к разным областям C_H при переключении синтеза IgM → IgG.

Непонятно, почему данный активный центр сначала должен входить в состав молекулы IgM, а затем в состав молекулы IgG. Одно из возможных объяснений заключается в следующем: иммуноглобулины IgM, относящиеся к олигомерным белкам с константой седиментации 19S, легко выпадают в осадок уже при низких концентрациях и потому могут быть легко захвачены макрофагами на ранних стадиях развития иммунного ответа, когда концентрация антител невысока. И наоборот, при высокой концентрации антител может не возникать потребности в высокой валентности антитела.

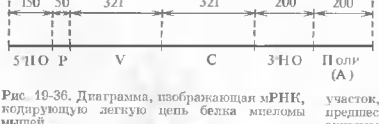


Рис. 19-36. Диаграмма, изображающая мРНК, кодирующую легкую цепь белка миеломы мышей.
Относительные длины областей V и С определяются числом аминокислот. Р обозначает участок, обнаруживаемый в короткоживущем предшественнике 13S-мРНК. НО — нетранслируемая область.

ОДНА ЦЕПЬ мРНК КОДИРУЕТ ПОЛНУЮ ЦЕПЬ ИММУНОГЛОБУЛИНА

В связи с тем что данная вариабельная область может соединяться с константными областями различных типов и, наоборот, многие различающиеся вариабельные последовательности могут связываться с данной константной областью, возникает совершенно очевидный вопрос о том, осуществляется ли эта «сборка» уже после завершения синтеза соответствующих V- и С-полипептидных цепей. Можно было бы предположить, что какая-то форма полипептидлигазы соединяет вместе новосинтезированные V- и С-цепи. Однако в настоящее время данные, полученные в самых разнообразных опытах, делают это предположение несостоятельным. Во-первых, кинетические исследования показали, что в данной цепи иммуноглобулина N-терминальные аминокислоты (вариабельная область) соединяются в полипептидную цепь всегда до того, как начнется образование пептидных связей между аминокислотами С-области. Во-вторых, из результатов опытов с использованием бесклеточной системы синтеза белка стало ясно, что цепи мРНК, выделенные из антителообразующих плазматических клеток, кодируют целые полипептидные цепи — либо легкие, либо тяжелые, а вовсе не отдельные V- или С-компоненты этих цепей. Молекулы мРНК, содержащие информацию для легких цепей (мол. вес 23 000), седиментируют при 13S, а мРНК, кодирующие тяжелые цепи (мол. вес. 55 000),— при 16S. В молекулах мРНК легких цепей около 200 нуклеотидов на 5′-конце и около 400 нуклеотидов на 3′-конце не используются для кодирования аминокислот, обнаруживаемых в зрелых цепях иммуноглобулинов. Функции этих последовательностей остаются в основном неизвестными; исключение составляют лишь около 50 нуклеотидов, расположенных на 5′-конце: известно, что они кодируют аминокислоты, которые содержатся в недолго живущем предшественнике легкой цепи (рис. 19-36).

ЧИСЛО ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ V- И С-ОБЛАСТИ

Прямые измерения числа V- и С-генов в опытах по гибридизации клеточной ДНК с высокоочищенной 13S-мРНК (легких цепей) из специфических клеток миеломы пока не дали однозначных результатов. В первой серии этих опытов примерно половина мРНК гибридизовалась со скоростью, соответствующей скорости гибридизации одиночных копий данных генов. Было высказано предположение о том, что эти результаты отражают гибридизацию с ДНК, кодирующей С-области. Другая половина мРНК

гибридизовалась примерно в 200 раз быстрее, что может свидетельствовать о наличии нескольких сотен копий V-генов, сходных по своим последовательностям с теми генами, на которых образуется соответствующая миеломная мРНК. Однако неизвестно, при какой степени дивергенции V-последовательностей мРНК, синтезируемая на этих генах, вообще перестает гибридизоваться с ними. Поэтому вначале предполагали, что результаты этих опытов дают представление лишь о нижнем пределе для числа эквивалентов гена. Поскольку одинаковые результаты были получены при использовании двух разных ДНК (из миеломных клеток и из клеток нормальной печени), можно считать, что трансформация лимфоцитов в плазматические клетки, специализирующиеся на синтезе иммуноглобулинов, по-видимому, не влечет за собой амплификации генов.

К сожалению, не все опыты такого рода дают одинаковые результаты, поэтому теперь можно услышать прямо противоположные выводы (сделанные также на основании опытов по гибридизации): если не все, то большинство генов V-областей представлено одиночными копиями. Эти сообщения, если они верны, говорят о том, что подгруппы генов, кодирующих вариабельные области цепей иммуноглобулинов, представлены, возможно, лишь одиночными копиями. Подтверждение этой точки зрения получено при генетическом анализе системы, ответственной за синтез иммуноглобулинов у кролика. Были обнаружены аллельные различия, которые приводят к аминокислотным заменам не только в С-, но и в V-области тяжелых цепей. Три альтернативных аллеля a_1, a_2 и a_3 определяют весьма отличающиеся друг от друга последовательности для первых 30 N-концевых аминокислот вариабельной области. Если бы V-гены присутствовали в виде сотен копий, поддержание столь четко воспроизводимых отличий было бы просто невозможно себе представить.

Таким образом, делать окончательный вывод об относительном числе V- и С-генов не стоит до тех пор, пока не будет доказана достаточная степень чистоты препаратов мРНК, использованных в опытах по гибридизации, и пока существование аллотипических различий в V-области не будет подтверждено на других видах животных.

Большую пользу могут принести мутантные клетки миеломы, вырабатывающие неполные иммуноглобулины, которые состоят из одной константной области. Образование таких иммуноглобулинов объясняется тем, что молекулы иммуноглобулиновых мРНК в этих клетках представляют собой, по-видимому, транскрипты только соответствующих С-генов. Если это так, то их можно использовать в опытах по гибридизации для точной оценки абсолютного числа С-генов.

ИДИОТИПЫ

Иммунизация животного антителом, вырабатываемым генетически идентичной инбредной линией того же животного, приводит к образованию антител, направленных против активного центра того иммуноглобулина, который используется в качестве антигена. Антитела к специфическим антигенсвязывающим участкам (*идиотипам*) известны под названием *идиотипических антител*. Соответственно те антигенные детерминанты в активном центре, которые индуцируют образование таких антител, называют *идиотипическими маркерами*. Имея в руках антиидиотипические антитела, можно тестировать способность разных линий одного и того же животного к образованию специфических идиотипов. Когда такие опыты были проведены на кроликах и мышах, выявилось лишь ограниченное число линий, способных продуцировать какой-либо специфический идиотип (активный центр). Скорее всего иммунологические различия, наблюдающиеся у этих животных, отражают различия в гамет-

гомозиготность по аллелю Ir^a проявляется в слабой реакции на ТГАЛ и сильной реакции на ГГАЛ. Интересно, что гетерозиготные особи (Ir^b/Ir^a) характеризуются сильными ответными реакциями на оба антигена. Весьма неожиданным оказалось то, что локус иммунного ответа располагается в середине генного комплекса, который кодирует основные поверхностные белки, ответственные за отторжение трансплантата, пересаженного от неродственного индивидуума (рис. 19-38).

ТРАНСПЛАНТАЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ

Если кусочек кожи от одной особи пересадить другой особи с иной наследственной конституцией, то вначале этот кусочек кожи как будто бы приживляется и в него даже прорастают кровеносные сосуды. Однако через 7—14 дней он заполняется лейкоцитами, затем появляются признаки некроза, после чего происходит быстрое отторжение трансплантата. Иммунная природа процесса отторжения явствует из сопоставления скорости распада первичного трансплантата и скорости отторжения кусочка ткани, пересаженного повторно. Вторичные трансплантаты, для которых используется кожа того же донора, что и в первый раз, отторгаются в течение 3—4 дней, но если для вторичной пересадки используется ткань неродственного животного, то процесс распада длится, как и ранее, от одной до двух недель (рис. 19-39). Вначале предполагали, что в процессе отторжения принимают участие циркулирующие антитела, однако в дальнейшем выяснилось, что действующим началом являются интактные малые лимфоциты. Эти клетки распознают, является ли поверхность трансплантированных клеток «собственной» или чужеродной, и специфически разрушают клетки, несущие на поверхности чужеродные антигены.

Генетический анализ высокомбредлной линии мышей выявил наличие группы смежных генов — генов *тканевой совместимости* (комплекс H-2 [1]). Под контролем этих генов находится процесс отторжения трансплантата (рис. 19-38). Они определяют специфичность основных антигенов тканевой совместимости у мышей — белков H-2. В геноме человека аналогичная группа сцепления генов тканевой совместимости носит название «комплекс HL-A». Показано, что внутри каждого комплекса H-2 (HL-A) есть кодирующие последовательности для двух разных антигенных детерминант, следовательно, каждая диплоидная клетка обладает четверной специфичностью.

ПОЛИПЕПТИДНЫЙ ПРОДУКТ HL-A (БЕЛОК H-2) ПО СТРУКТУРЕ НАПОМИНАЕТ ИММУНОГЛОБУЛИН

Совсем недавно, к великому удивлению всех исследователей, было обнаружено, что основные поверхностные белки, ответственные за тканевую совместимость (мол. вес ~ 125 000), обладают структурой, очень похожей на структуру иммуноглобулина. Они построены из двух легких (мол. вес ~12 000) и двух тяжелых цепей (мол. вес ~50 000), соединенных дисульфидными связями. Еще важнее то, что легкий компонент тождествен β2-микроглобулину — сывороточному белку, аминокислотная последовательность которого содержит S—S-область, в высшей степени гомологичную области C_H3 тяжелой цепи IgG_1, в которой также имеется внутренняя дисульфидная связь. Поскольку структура β2-микроглобулинового компонента, по всей видимости, не изменяется, то, следовательно, различия в аминокислотных последовательностях, определяющие разную специфичность белков HL-A и H-2, должны обнаруживаться в тяжелом

[1] От англ. histocompatibility — тканевая совместимость. — *Прим. перев.*

ных генах иммуноглобулина, при этом приходится допустить, что только определенные нуклеотидные последовательности (или их производные, образовавшиеся вследствие соматических мутаций) обладают способностью кодировать данные идиотипы. Если это так, то генетический анализ идиотипических маркеров должен в конечном счете дать прямую информацию об организации V-генов. Результаты по скрещиванию, полученные к настоящему времени, показывают, что все различные идиотипические маркеры данного типа V-цепей прочно сцеплены друг с другом. Отражает ли низкий уровень рекомбинаций, наблюдаемый в этих опытах, внутригенную рекомбинацию между отдельными V-генами или межгенную рекомбинацию между группами прочно сцепленных V-генов, пока не известно.

СОЧЕТАНИЕ V- И C-ГЕНОВ

В какой момент происходит соединение V- и C-генов, не установлено. Тем не менее кажется весьма вероятным, что именно эта стадия является ключевым событием в тех процессах, которые приводят к тому, что малый лимфоцит приобретает способность продуцировать только один, строго определенный тип иммуноглобулина. Использование аллотипических маркеров у кролика показывает, что V- и C-области объединяются в диплоидных клетках отнюдь не случайным образом. Напротив, маркеры константных и вариабельных областей данного иммуноглобулина обычно происходят от одного и того же родителя, что предполагает близкое расположение соответствующих генов по отношению друг к другу на одной хромосоме. Можно думать, что несколько совершенно определенных делеций приводят к соединению V- и C-областей (рис. 19-37). Однако эти соображения будут иметь смысл только тогда, когда удастся уточнить расположение иммуноглобулиновых генов на хромосомах.

ГЕНЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ИММУННУЮ РЕАКЦИЮ

Не все животные того или иного вида дают иммунный ответ на специфический антиген. Недавно было показано, что эти различия имеют генетическую основу — у мышей был открыт ген, который контролирует уровень ответной реакции на определенные антигены. Например, гомозиготность по аллелю Ir^h ведет к высокому уровню ответной реакции на ГТАЛ (синтетический полипептид, содержащий остатки лизина, аланина, тирозина и глутаминовой кислоты) и слабой реакции на ГГАЛ (аналогичный полипептид, в котором остаток тирозина замещен на гистидин). Напротив,

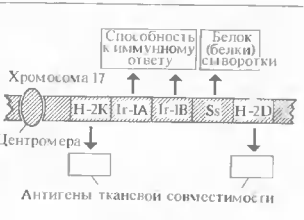


Рис. 19-38. Генетическая карта хромосомы 17 мыши.
Показано, что гены, ответственные за иммунный ответ, находятся между генами H-2, кодирующими основные антигены тканевой совместимости.

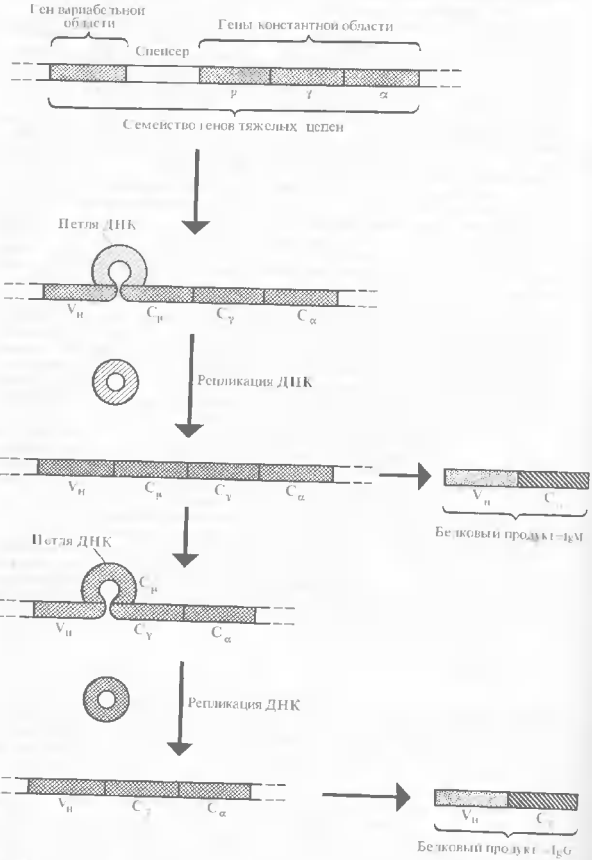


Рис. 19-37. Гипотеза, согласно которой сцепление V- и C-областей происходит вследствие хромосомных делеций

Эта схема легко объясняет, каким образом V-область сначала присоединяется к области $C_μ$, а затем к области $C_γ$.

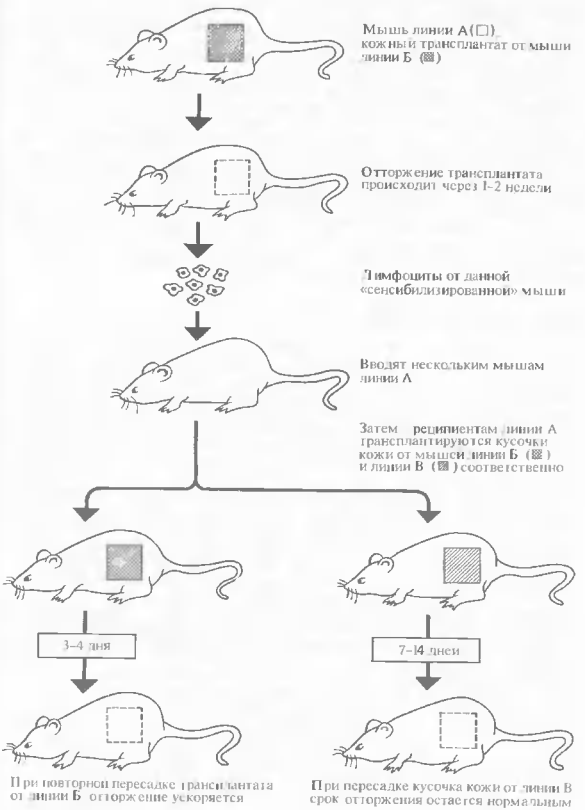


Рис. 19-39. Экспериментальное доказательство того, что тканевая несовместимость обусловлена клеточным иммунитетом.

компоненте. Прямой анализ тяжелой цепи по-прежнему представляет большие трудности, потому что концентрации белков HL-A (H-2) на клеточной поверхности относительно низки. Предварительные опыты с антигеном H-2 дали основания предполагать, что каждая цепь состоит из трех областей, внутри которых имеются дисульфидные связи, причем каждая такая область также напоминает С-область тяжелой цепи иммуноглобулина. Учитывая чрезвычайную важность этой проблемы как с теоретической, так и с практической точки зрения, нужно ожидать в самое ближайшее время выяснения тонких деталей структуры HL-A (H-2).

Это близкое сходство между антигенами тканевой совместимости и иммуноглобулинами дает возможность предполагать, что на ранних этапах эволюции позвоночных иммуноглобулины образовались вследствие дупликации генов, кодирующих поверхностные антигены, похожие на антигены тканевой совместимости. Можно думать, что нормальная функция антигенов тканевой совместимости состоит в обеспечении некоей формы межклеточных взаимодействий. Когда окончательно определились особенности их трехмерной структуры, образовались специфические полости в области между легкими и тяжелыми цепями.

ИММУННАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ

До сих пор мы еще не касались одной очень важной характеристики иммунологической реакции организма. Каким образом система синтеза антител узнает, что данная молекулярная поверхность принадлежит *чужой* молекуле? Почему организм не вырабатывает антител против собственных белков и нуклеиновых кислот? Это отсутствие реакции никак не связано с антигенными свойствами веществ, о которых идет речь. Почти любой белок человека, будучи введен кролику, вызывает в организме этого животного образование специфичных антител. И наоборот, белки кролика вызывают синтез антител в крови человека. Все это показывает, что иммунологическая система научается отличать «свои» молекулы от «чужих». Процесс обучения происходит в очень ранний период жизни, еще до появления активной иммунной реакции на «чужие» белки. Если новорожденному животному ввести какой-нибудь чужеродный антиген в период, когда система синтеза антител еще не развилась, то в будущем, во взрослом состоянии, этот организм уже не сможет вырабатывать антитела к данному чужеродному антигену. Он будет воспринимать его уже как свой собственный белок (рис. 19-40). Это отсутствие иммунологической чувствительности ко всем антигенам, находившимся в организме в период развития системы синтеза антител, носит название *иммунной толерантности*.

Было бы удивительным, если бы специфическая иммунная толерантность и иммунная реакция (образование специфических антител) — эти на первый взгляд противоположные явления — не были никак связаны между собой. В очень ранний период жизни существует, вероятно, лишь очень небольшое число клеток, генетически компетентных в отношении образования антител к определенному антигену. Если в это время введение избыточного количества нормального антигена приведет к немедленной гибели этих клеток, то в результате может появиться иммунная толерантность (рис. 19-41).

РЕАКЦИЯ СМЕШАННЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Смешение лимфоцитов от двух разных особей (близкородственных видов) часто приводит к тому, что небольшое их количество (1%) претерпевает трансформацию и начинает ограниченную пролиферацию. Такого рода

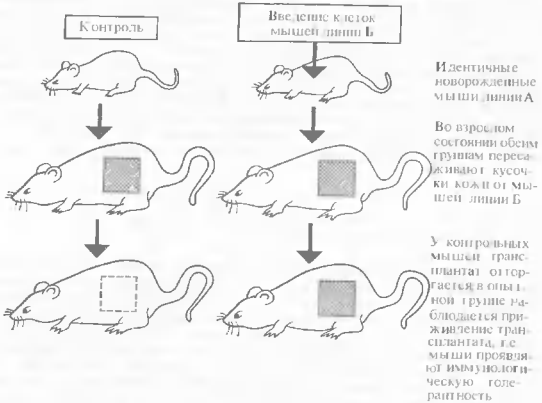


Рис. 19-40. **Выявление иммунной толерантности опытным путем.**
Введение чужеродных антигенов тканевой совместимости на ранних стадиях развития позволяет приживляться кожным трансплантатам, несущим те же самые специфические антигены.

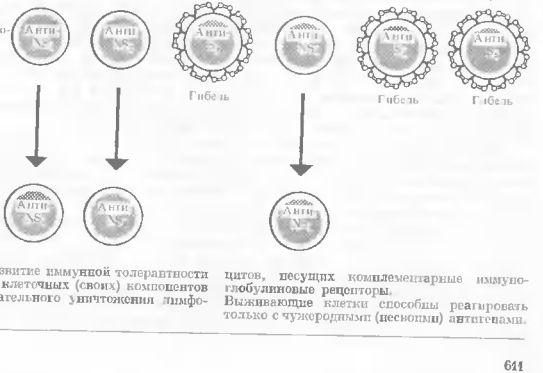


Рис. 19-41. **Развитие иммунной толерантности у нормальных клеточных (своих) компонентов за счет избирательного уничтожения лимфоцитов, несущих комплементарные иммуноглобулиновые рецепторы.**
Выживающие клетки способны реагировать только с чужеродными (несвоими) антигенами.

реакции смешанных лимфоцитов представляют собой иммунные ответы, развивающиеся вследствие наличия на некоторых лимфоцитах антител, специфичных по отношению к антигенам тканевой совместимости других особей того же или близкородственного вида. Существование таких реакций само по себе не удивительно, если принять во внимание широкий спектр иммунологической специфичности, присущий лимфоцитам данной особи. Однако весьма неожиданным является высокий уровень этого эффекта. Если в норме только один из 10^5—10^6 лимфоцитов характеризуется способностью прочно связывать случайно выбранный антиген, то антитела, комплементарные антигенам тканевой совместимости других представителей того же вида, присущи гораздо большему числу клеток.

СОМАТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ФОРМИРОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ ИММУННОГО РАСПОЗНАВАНИЯ

Можно думать, что многие гены, находящиеся в клетках *зародышевого пути* данной особи, кодируют антитела, направленные против основных поверхностных антигенов (тканевой совместимости?) соответствующего вида. Если это так, то значительная часть лимфоцитов, образовавшихся непосредственно из недифференцированных стволовых клеток, будет постоянно делиться в результате стимуляции, обусловленной контактами с нормальными клетками, содержащими на поверхности соответствующие антигены тканевой совместимости. Многократно повторяясь, такие акты связывания могут не только служить пусковыми сигналами для ограничения пролиферации лимфоцитов, но также и приводить к уничтожению образующихся при этом «клеток памяти». Выжить могут только те лимфоциты, которые обладают *мутантными генами иммуноглобулинов*, кодирующими антитела с некоей новой иммунологической специфичностью. А поскольку изменение в одном из многочисленных участков гипервариабельной области должно снижать, если не полностью сводить к нулю, специфическое связывание поверхностного антигена, то должны образовываться огромные количества антител с новой специфичностью (рис. 19-42). Осуществление такого длительного негативного отбора, может быть, и является основной функцией тимуса и фабрициевой сумки. Создается впечатление, что подавляющее большинство лимфоцитов в этих лимфоидных железах делится лишь для того, чтобы погибнуть, и только малая их часть покидает орган для выхода в кровоток. Такая ситуация казалась до самого последнего времени весьма странной, потому что постоянное клеточное деление, неизменно ведущее к гибели клеток, представлялось бесцельным. Однако, как только было высказано предположение о том, что повторные клеточные циклы необходимы для выработки мутантных антител, неспособных связываться с нормальными клеточными антигенами, картина в целом стала совершенно ясной.

Весьма отрадным аспектом этой теории является то, что она дает предпосылки для объяснения столь странной на первый взгляд связи между мутациями в генном комплексе H-2 и изменением конечной напряженности иммунного ответа. Можно думать, что эти гены иммунного ответа каким-то образом контролируют специфичность одного или нескольких белков тканевой совместимости. Если они мутируют из одной формы в другую, то в результате могут образовываться слегка отличающиеся друг от друга группы активных центров за счет негативного отбора, направленного против тех клеток, которые несут антитела, комплементарные к соответствующим генам тканевой совместимости. Эта гипотеза позволяет также объяснить аномально сильную иммунную реакцию на чужеродные антигены II-2 (III-A). Те лимфоциты, которые несут коди-

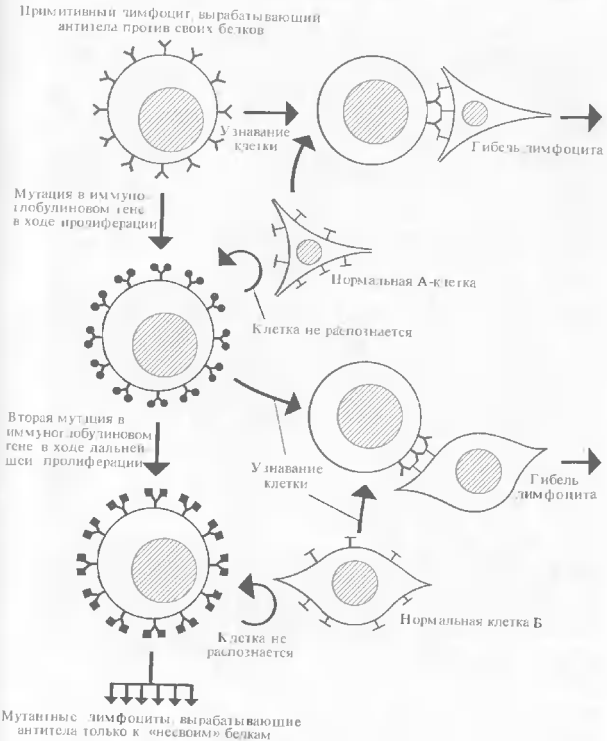


Рис. 19-42. Соматическое развитие иммунного реагирования в результате последовательных мутаций, блокирующих узнавание нормальных поверхностных антигенов.

руемые в клетках зародышевого пути антитела, комплементарные к «чужеродным» антигенам, не будут «выбраковываться» в ходе отбора и в большинстве своем будут оставаться по существу в состоянии покоя до контакта с соответствующими чужеродными клетками.

РАЗВИТИЕ АНТИТЕЛ В ХОДЕ ЭМБРИОГЕНЕЗА

Несколько лет назад казалось, что выяснить происхождение разнообразия антител удастся с помощью бесклеточных систем, в которых можно было бы моделировать индукцию первичного и вторичного ответов. Теперь, когда установлено, что рецепторы, распознающие антигены, сами являются антителами, эта задача не кажется столь уж невыполнимой, и сама возможность моделирования иммунного ответа in vitro больше не рассматривается с враждебным скептицизмом. Очевидно, следующей стадией исследований должно стать выяснение вопроса о том, каким образом связывание антигена с поверхностными иммуноглобулиновыми рецепторами может служить пусковым механизмом для пролиферации клеток. Однако, даже когда мы выясним этот вопрос, это нисколько не углубит наши представления о том, каким образом происходит дифференцировка малого лимфоцита и он настраивается на выработку одного, строго определенного вида антител: ведь все лимфоциты, которые мы изучаем, «запрограммированы» еще до начала наших экспериментов.

Таким образом, совершенно ясно, что мы должны попытаться приблизиться к самым ранним стадиям эмбрионального развития, чтобы узнать, когда же впервые появляются большие количества различных антител. До сих пор никому еще не удалось выявить этот решающий момент. Для головастиков, обладающих всего лишь несколькими миллионами лимфоцитов, характерны иммунные ответы, весьма похожие на иммунные ответы половозрелых лягушек. Поэтому кажется целесообразным продвигаться к еще более ранним этапам развития кроветворных клеток, когда спектр специфичности ограничен. Если на одной из таких ранних стадий удастся выявить существенно меньшее число типов антител и если они будут предпочтительно направлены против поверхностных антигенов, тогда соматическая теория образования антител получит надежное подтверждение. Но если, наоборот, значительная часть спектра иммунологической специфичности будет обнаружена уже тогда, когда появятся первые антителообразующие клетки, предпочтение придется отдать теории гаметных генов.

Итак, мы можем убедиться в том, что специалисты в области молекулярной биологии, которые решили сосредоточить свои усилия на изучении синтеза антител в качестве модели клеточной дифференцировки, оказались перед лицом проблемы, еще более сложной, чем могла бы представляться на первый взгляд сама эмбриологическая дифференцировка. Но все равно нет оснований считать, что фундаментальные проблемы эмбриологии, если они будут сформулированы надлежащим образом, окажутся более легкими для разрешения.

ВЫВОДЫ

Ощущается острая необходимость в такой «упрощенной» системе, в которой необратимая дифференцировка клеток (т. е. приобретение ими способности к синтезу какого-либо определенного белка) происходила бы в ответ на добавление извне молекул какого-либо вполне определенного вещества. Первоначально надеялись, что такой «упрощенной» системой может явиться система синтеза специфических антител в ответ на инъекцию чужеродного вещества. Вещества, индуцирующие синтез специфических антител, называются антигенами. Антигенными свойствами обладают многие макромолекулы — большинство белков, а также некоторые углеводы и нуклеиновые кислоты.

Большинство антител (или иммуноглобулинов, сокращенно Ig) функционирует после выхода из клеток, где они синтезируются. Такие анти-

тела, называемые гуморальными, обычно вызывают инактивацию антигенов, связываясь с ними и образуя комплексы, которые затем захватываются белыми кровяными клетками, так называемыми клетками-«мусорщиками». Другая разновидность антител функционирует, не теряя связи с клетками, в которых они образовались (клеточные антитела). Эта разновидность ответственна за различные реакции клеточного иммунитета, в том числе «убийство» клеток, несущих комплементарные поверхностные антигены. Причина, по которой одни антигены вызывают развитие гуморальных иммуиных реакций, а другие — клеточных, остается неизвестной.

Первоначально полагали, что антиген индуцирует образование специфических антител, соединяясь с новосинтезированной молекулой иммуноглобулина, которая еще не приняла окончательной трехмерной конфигурации. Согласно этой гипотезе, молекула антитела должна обволакивать поверхность антигена, образуя при этом участок, по форме комплементарный определенной поверхности данного антигена (инструктивная гипотеза). Однако в настоящее время известно, что каждый тип специфического антитела характеризуется строго определенной аминокислотной последовательностью, которая складывается опять-таки в строго определенную трехмерную структуру. Поэтому в функцию антигена входит запуск некоей цепи событий, которые в конечном счете приводят к синтезу специфических мРНК-матриц, кодирующих желательную аминокислотную последовательность (селекционная гипотеза).

Все антитела построены по единому принципу и состоят из определенных групп полипептидных цепей. Каждая группа содержит четыре полипептидные цепи: две одинаковые легкие цепи (мол. вес ~22 500) и две одинаковые тяжелые цепи (мол. вес ~53000), соединенные между собой дисульфидными мостиками. Все молекулы наиболее распространенного класса гуморальных антител IgG содержат одну такую группу и имеют молекулярный вес около 150 000. Функционально активные молекулы класса IgM состоят из пяти аналогичных групп, определенным образом связанных друг с другом, а молекулы класса IgA состоят из одной, двух или трех таких групп. Антитела нормальной сыворотки крови представляют собой совокупность многочисленных типов белков с разными аминокислотными последовательностями. Напротив, клетки опухоли миеломы синтезируют один, строго определенный тип иммуноглобулина; именно эти клетки служат источником практически всех антител, использующихся для расшифровки аминокислотных последовательностей. При некоторых формах миеломы синтезируется избыток легких цепей по сравнению с тяжелыми. Легкие цепи, вырабатываемые в избытке и выводимые из организма с мочой, носят название белков Бенс-Джоиса.

Существует две формы легких цепей ($\varkappa$ и λ); аминокислотные последовательности в их константных и вариабельных областях отличаются друг от друга весьма существенно. В построении молекул всех классов иммуноглобулинов используются либо $\varkappa$-, либо λ-цепи. Отличительным свойством каждого из классов иммуноглобулинов является строение тяжелых цепей. Для IgM характерны μ-цепи, для IgG — γ-цепи и для IgA — α-цепи. Все гены, содержащие информацию для $\varkappa$-цепей, находятся в одной группе сцепления (хромосоме). Для генов, кодирующих λ-цепи, характерно полное отсутствие сцепления. Гены тяжелых цепей образуют еще одну группу сцепления.

Как легкие, так и тяжелые цепи содержат вариабельные аминокислотные последовательности на N-конце и постоянные (константные) участки на С-конце. Участки связывания антигена (активные центры) образуются аминокислотами, находящимися в вариабельных областях легких и тяжелых цепей. В прямом взаимодействии между антигеном и антителом обычно участвует менее одной четвертой части аминокислот, составляющих вариабельную область. Фактически многие аминокислоты в варнабельной

области по существу являются неизменяемыми — по-видимому, они необходимы для формирования основных черт третичной структуры иммуноглобулина. Напротив, аминокислоты, участвующие в образовании активного центра, обнаруживают крайне высокую изменчивость в зависимости от специфичности антитела (гипервариабельные области).

Единый тип укладки характерен не только для всех вариабельных областей, но также и для константных. Одна такая структура обнаруживается в константной области каждой легкой цепи, а константная область тяжелой цепи образуется в результате соединения трех таких структур. Существует предположение, что современные типы иммуноглобулинов возникли в ходе эволюционного процесса, в котором вслед за дупликацией первичного гена иммуноглобулина последовала дивергенция на специфические гены для вариабельной и константной областей.

Антигены инициируют иммунный ответ, соединяясь с молекулами иммуноглобулинов (рецепторами) на поверхности малых лимфоцитов. Даже на ранних стадиях эмбрионального развития можно выявить огромное количество разных типов малых лимфоцитов, каждый из которых уже в это время направлен на синтез одного, строго определенного иммуноглобулина. Все малые лимфоциты бездействуют до тех пор, пока в результате связывания с антигеном молекулы иммуноглобулина, расположенные на их поверхности, не соединятся между собой при помощи поперечных сшивок; это приводит каким-то образом к трансформации клеток. При этом процессе малые лимфоциты увеличиваются в размерах, делятся и в конечном счете превращаются в зрелые бласты (клонально-селекционная теория). Малые лимфоциты подразделяются на два типа — В-клетки и Т-клетки. При трансформации Т-клеток образуются лимфобласты, ответственные за клеточный иммунитет. Потомством В-клеток являются плазматические клетки, в которых вырабатываются гуморальные антитела.

В ответ на воздействие специфического антигена В-клетки вначале начинают вырабатывать антитела, принадлежащие к классу IgM. Спустя несколько недель синтез IgM прекращается и начинается синтез иммуноглобулинов IgG. Неизвестно, может ли одна и та же плазматическая клетка вести синтез иммуноглобулинов обоих типов. Весьма важно, что специфичность активного центра при переходе от IgM к IgG не меняется. Специфическая область V_H, первоначально соединенная с С-областью μ-цепи, каким-то образом оказывается перенесенной на С-область γ-цепи. Такие транслокации дают основания полагать, что в клетках зародышевого пути V и С-области кодируются разными генами, они соединяются друг с другом только после того, как данный лимфоцит получит свое «предназначение», т. е. подготовится к синтезу иммуноглобулина строго определенного типа. В настоящее время существует мнение, что каждый гаплоидный геном содержит только один ген для каждого типа константной области. Первоначально наиболее правдоподобным казалось предположение о том, что в клетках зародышевого пути имеется огромное число разных V-генов. Однако в настоящее время предпочтение отдается гипотезе, согласно которой разнообразие антител объясняется в основном отбором соматических мутантов, образующихся при формировании малых лимфоцитов из неких клеток-предшественников, которые пока еще обнаружить не удалось.

Так как антитела образуются только против чужеродных белков, иммунная система животного должна обладать способностью узнавать свои собственные белки. Этот процесс «обучения» идет на ранних этапах развития организма, еще до появления циркулирующих в крови антител. Если чужеродный белок ввести в организм новорожденного животного, то позже это животное окажется неспособным продуцировать антитела против данного чужеродного белка (иммунная толерантность). В настоящее

время мы склонны думать, что в норме толерантность является следствием избирательного уничтожения лимфоцитов, несущих антитела, которые комплементарны к антигенам, введенным в иммунную систему в тот момент, когда она еще только «зарождалась» в ходе эмбрионального развития.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Landsteiner K., The Specificity of Serological Reactions, rev. ed., Dover, New York, 1964. Перепечатка в виде брошюры издания, в последний раз пересмотренного в 1943 г. Эта книга, давно ставшая классической, до сих пор может служить введением в иммунологию.

Antibodies, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., XXXII (1967). Сборник докладов на конференции, вошедшей в историю развития иммунологии. Заключительное слово Нильса Йерне является своего рода маленьким шедевром.

Burnet F. M., Cellular Immunology, Cambridge University Press, 1969. (Ф. Бернет, Клеточная иммунология, изд-во «Мир», М., 1971.) Творчески осмысленный обзор работ по клеточному иммунитету.

Rotti I., Essential Immunology, Blackwell Scientific Publications, 2nd ed., Oxford, 1974. Великолепное изложение основных положений иммунологии.

Davis B. D., Dulbecco R., Eisen H. N., Ginsberg H. S., Wood W. B., Jr., McCraty M., Microbiology, 2nd ed., Harper and Row, 1973. Прекрасная глава по иммунологии, принадлежащая перу Германа Айзена, издана также отдельной книжкой.

Defense and Recognition, R. R. Porter (ed.), University Park Press, Baltimore, Butterworths, London, 1973. Великолепный сборник обзорных статей, посвященных природе, происхождению и функции иммуноглобулинов.

The Immune System: Genomes, Receptors, Signal, E. Sercarz, A. R. Williamson and C. F. Fox (eds.), Academic Press, 1974. Труды конференции, проходившей в Сково-Ваддли в марте 1974 г.; быстрота их издания отражает растущий интерес, который вызывает современная иммунология.

Edelman G. P., The Structure and Function of Antibodies, Scientific American, August 1970. Простое объяснение основных принципов строения молекулы антитела.

Poljak R. J., Amzel L. M., Avey H. P., Chen B. L., Phizackerly R. P., Saul F., Three-Dimensional Structure of the Fab' Fragment of a Human Immunoglobulin at 2,8-Å Resolution, Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 3305 (1973).

Segal M., Padlan E. A., Cohen G. H., Rudikoff S., Potter M., Davies D. R., The Three-Dimensionef Structure of a Phosphoryl Choline-Binding Mouse Immunoglobulin Fab and the Nature of the Antigen Binding Site, Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 4298 (1974). В этой и предшествующей статьях впервые представлены долгожданные результаты рентгеноструктурного анализа фрагментов молекулы антитела при высоком разрешении.

Amzel L. M., Poljak R. J., Saul F., Varga J. M., Richards F. F., The Three-Dimensional Structure of a Combining Region-Ligand Complex of Immunoglobulin NEW at 3.5-Å Resolution, Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 1427 (1974). Точное описание связей, участвующих в образовании комплекса антиген — антитело.

Cunningham B. A., Wang J. L., Gunther G. R., Reeke G. N., Jr., Becker J. W., Molecular Analysis of the Initial Events in Mitogenesis, Cellular Selection and Regulation in the Immune Response, G. M. Edelman (ed.), Raven Press, New York, 1974. Обзорная статья; основное внимание уделено трансформации лимфоцитов под действием лектинов.

Hood L., Campbell J. H., Elgin S. C. R., The Organization, Expression and Evolution of Antibodies and Other Multigene Families, Ann. Rev. Genetics, 9 (1975). Очень полезный обзор, в котором последние данные и гипотезы об организации иммуноглобулиновых генов связываются с представлениями о других мультигенных системах.

Levin A. S., Fudenberg H. H., Hopper J. E., Wilson S. K., Nisonoff A., Immunofluorescent Evidence for Cellular Control of Synthesis of Variable Regions of Light and Heavy Chains of Immunoglobulins G and M by the Same Gene, Proc. Nat. Acad. Sci., 68, 169 (1971). Важные экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу существования отдельных V- и C-генов.

Milstein C., Brownlee G. G., Cartwright E. M., Jarvis J. M., Proudfoot N. J., Sequence Analysis of Immunoglobulin Light-Chain Messenger RNA, Nature, 252, 354 (1974). Наиболее полный анализ последовательности мРНК IgG, проведенный к настоящему времени.

Barstad P., Farnsworth V., Weigert M., Cohn M., Hood L., Mouse Immunoglobulin Heavy Chains are Coded by Multiple Germ Line Variable Region Genes, Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 4096 (1974). В статье приведены детали аминокислотных последователь-

ностей, которые используются для доказательства гипотезы о существовании множественных гаметных генов V-области.

Premkumar E., Shoyab M., Williamson A. R., Germ Line Basis for Antibody Diversity: Immunoglobulin V_H-and C_H-gene Frequencies Measured by DNA-RNA Hybridization, Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 99 (1974). Опыты, в которых данные по гибридизации используются для доказательства существования огромного числа гаметных генов V-области.

Rabbitts T. H., Milstein C., Mouse Immunoglobulin Genes: Studies on the Reiteration Frequency of Light-Chain Genes by Hybridization Procedures, Eur. J. Biochem., 52, 125 (1975).

Tonegawa S., Steinberg C., Dube S., Bernardini A., Evidence for Somatic Generation of Antibody Diversity, Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 4027 (1974). В этой и предшествующей статьях авторы, также используя данные по гибридизации ДНК и РНК, приходят к противоположному выводу о том, что существует лишь ограниченное число V-генов и что иммунологическое разнообразие должно иметь соматическую основу.

Capra J. D., Kehoe J. M., Hypervariable Regions, Idiotypy, and the Antibody-Combining Site. In: Advances in Immunology, F. J. Dixon and H. G. Kunkel (eds.), Academic Press, New York, 20, 1 (1975). Очень полный и весьма полезный обзор.

Pink J. R. L., Askonas B. A., Diversity of Antibodies to Cross-reacting Nitrophenyl Haptens in Inbred Mice, Eur. J. Immunol., 4, 426 (1974). Остроумный подход к выявлению огромного числа разных идиотипов, которые могут образоваться в одной инбредной линии мышей в ответ на введение одного гаптена.

Weigert M., Potter M., Sachs D., Genetics of the Immunoglobulin Variable Region, Immunogenetics, 1, 511, Springer-Verlag, New York (1975). Долгожданная сводка последних данных по генетическому анализу и картированию идиотипических маркеров.

Shreffler D. C., David C. S., The H-2 Major Histocompatibility Complex and the I Immune Response Region: Genetic Variation, Function, and Organization. In: Advances in Immunology, F. J. Dixon and H. G. Kunkel (eds.), Academic Press, New York, 20, 1 (1975). Подробный обзор, особое внимание уделено результатам генетических исследований.

Peterson P. A., Rask L., Sege K., Klareskog L., Anundi H., Östberg L., Evolutionary Relationship Between Immunoglobulins and Transplantation Antigens, Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 1612 (1975). Наиболее полная сводка данных по молекулярной структуре антигенов тканевой совместимости.

Jerne N. K., The Somatic Generation of Immune Recognition, Eur. J. Immunol., 1, 1 (1971). Очень важная концепционная статья.

Spear P. G., Wang A., Rutishauser U., Edelman G. M., Characterization of Splenic Lymphoid Cells in Fetal and Newborn Mice, J. Exp. Med., 138, 557 (1973). Рассмотрение идиотипического разнообразия на ранних этапах эмбрионального развития.

ГЛАВА

20 Вирусная природа рака

До сих пор ученым не удается нарисовать стройную картину биохимических процессов, протекающих в клетках позвоночных в норме,— это, естественно, заставляет нас задуматься, не слишком ли огромная армия исследователей занимается изучением больных клеток. Может быть, им следовало бы пока сосредоточиться на здоровых клетках. Разрабатывая, скажем, проблему атеросклероза или умственной отсталости, можно сослаться на их социальную значимость, однако всегда ли такие, казалось бы, вполне общественно мотивированные исследования имеют в своей основе серьезную науку или они в лучшем случае являются лишь плодом романтических устремлений дилетантов с добрыми намерениями? С этой точки зрения особое значение приобретает вопрос о том, не слишком ли много внимания уделяется сейчас изучению рака; известно, что на него идет львиная доля денег, отпускаемых на медицинские исследования.

Многочисленные неоправдавшиеся заверения в том, что разгадка рака совсем не за горами, вызывают недоверие к его исследованию. Это недоверие можно будет преодолеть только после того, когда человечеству предоставит обоснованные и четкие ответы, касающиеся природы рака. Удручающая эфемерность множества былых «побед» привела к тому, что на исследования в области рака стали смотреть как на научную дисциплину, результаты которой отвечают скорее человеческим чаяниям, чем общепринятым критериям научной достоверности. Правда, сейчас это положение быстро меняется, и бо́льшая часть последних исследований в области рака не отличается по качеству от работ в области молекулярной биологии *E. coli*. Основой для такого сдвига послужила разработка систем, в которых надежно охарактеризованные вирусы животных трансформируют здоровые клетки в раковые, причем для этих систем удалось добиться хорошей воспроизводимости. Такая трансформация часто происходит в результате интеграции специфических вирусных генов с клеточными хромосомами. Следовательно, вопрос можно поставить прямо: почему ген(ы), нормально функционирующий при размножении вируса, обладает способностью превращать нормальные клетки в раковые? Для того чтобы найти ответ, неисчислимая армии исследователей пытается в настоящее время как можно детальнее описать механизмы размножения опухолевых вирусов — они надеются, что если будут раскрыты функции ключевых вирусных генов, то станет ясным и путь малигнизации клетки. Как мы увидим ниже, окончательных ответов пока нет, однако все возрастающее изящество подходов в современной вирусологии опухолей всеяет в нас уверенность в том, что это направление еще скажет свое слово в вопросе не только о происхождении рака, но и о его биохимической сущности.

РАК КАК НАСЛЕДСТВЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ

Две дочерние клетки, возникающие при делении раковой клетки, обычно тождественны родительской. Следовательно, раковая клетка регулярно передает своим потомкам тот фактор или те факторы, которые наделяют ее

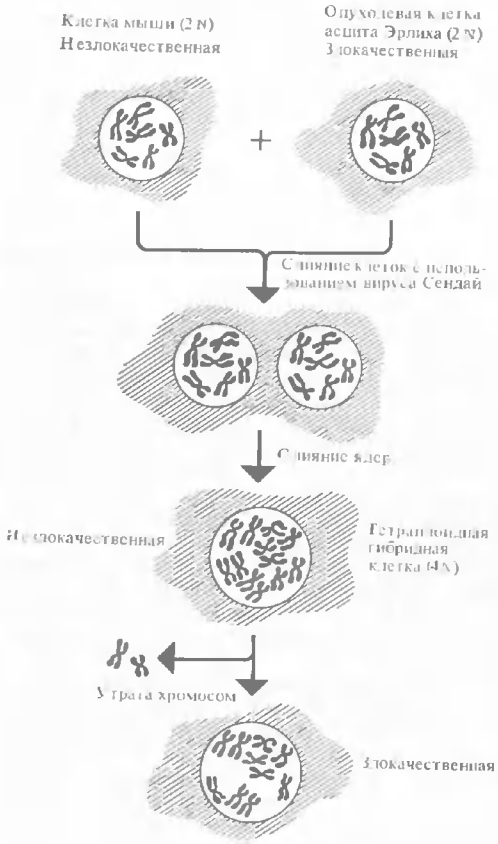


Рис. 20-1. Слияние раковой и нормальной клеток позволяет установить, каким является раковый фенотип — доминантным или рецессивным.

способностью к неудержимому росту. Изменения стойко сохраняются не только в опухолях, растущих в организме, но и в раковых клетках, растущих в культуре ткани. Сотни генераций раковых клеток могут сменить друг друга в культуре ткани без каких бы то ни было признаков возврата к нормальному состоянию. Устойчивость изменений проявляется не только в воспроизведении типичной морфологии, но также и в том, что клетки-потомки, если их ввести животным того самого вида, от которого была выделена исходная культура, вызывают у этих животных опухоли.

Наследственный характер изменений, обусловливающих неограниченный рост, наводит на мысль, что эти изменения происходят на хромосомном уровне. Подтверждением этой точки зрения служат данные экспериментов, в которых для индукции слияния раковой клетки со здоровой использовали вирус Сендай. Тетраплоидные клетки, образовавшиеся в результате слияния ядер, как правило, характеризуются нормальным фенотипом и при введении генетически тождественным хозяевам опухолей не образуют. Большинство тетраплоидных клеток, однако, отличается нестабильностью и часто имеет тенденцию делиться с образованием клеток

с меньшим числом хромосом. Многие из таких субтетраплоидных клеток оказываются раковыми; это указывает на то, что утрата одной или нескольких клеточных хромосом вновь приводит к проявлению ракового фенотипа (рис. 20-1). На первый взгляд это свидетельствует о том, что раковые свойства генетически являются рецессивным признаком, возможно, обусловленным потерей нормального генетического материала. Однако почти все «нормальные» генетические ревертанты, образующиеся из трансформированных вирусом раковых клеток, характеризуются очень большим числом хромосом (от 4N до 8N). Следовательно, избыточность хромосом сама по себе может приводить к нормализации клеточного фенотипа. Совершенно ясно, что необходимы дальнейшие эксперименты для того, чтобы убедиться, действительно ли во всех случаях превращение тетраплоидных клеток в раковые сопровождается утратой определенных хромосом.

СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ КАК ВОЗМОЖНАЯ ПРИЧИНА РАКА

Многие важные изменения, в результате которых происходит превращение нормальной клетки в раковую, могут возникать за счет соматических мутаций (т. е. мутаций в клетках, не являющихся предшественниками гамет). Согласно этой точке зрения, соматическая мутация может обусловить образование рака, если она приводит к нарушению нормальных контрольных механизмов, регулирующих клеточное деление. Сторонники этой гипотезы считают, что для раковой трансформации, как правило, необходимо несколько соматических мутаций. Это предположение основано на том, что частота заболеваемости раком с возрастом увеличивается. Последнее утверждение объяснялось бы в том случае, если бы в каждой отдельной клетке перед ее превращением в раковую накапливалось несколько мутаций, каждая из которых происходила бы случайно. В настоящее время нет прямых доказательств ни за, ни против этой теории, которую лучше всего было бы назвать теорией возникновения рака в результате утраты существенной функции определенного гена (генов). Однако даже и без доказательств ясно, что соматические мутации должны иметь место; было бы удивительно, если бы по крайней мере некоторые из них не приводили к нарушению нормального контроля деления клетки.

ИНДУКЦИЯ РАКА ПРИ ОБЛУЧЕНИИ

Известно, что очень многие вещества, воздействие которых увеличивает частоту возникновения опухолей, являются также сильными мутагенами. Этот факт косвенно указывает на то, что соматические мутации являются важной причиной индукции рака. Все вещества, обусловливающие развитие рака, называются канцерогенами. К наиболее сильным канцерогенным факторам относятся ультрафиолетовое и ионизирующее излучения — их высокая мутагенная активность давно известна. Так, например, воздействие ультрафиолетового света на кожу и рентгеновских лучей на щитовидную железу вызывает развитие рака соответствующего органа. Однако никакое излучение не может индуцировать трансформацию во всех клетках популяции. Происходит это потому, что радиация вызывает в клетке и другие различные повреждения, причем некоторые из них приводят к ее гибели. Доза облучения, достаточная для того, чтобы практически все клетки трансформировались в раковые, совпадает с дозой, при которой все клетки гибнут. Вопрос о том, как именно излучение приводит к развитию рака, далеко не ясен. Помимо того что ионизирующее излучение вызывает простые мутации, оно индуцирует также и разрывы хромо-

сом, в результате чего часто наблюдаются значительные делеции генетического материала. Поэтому было бы в высшей степени странным, если бы оно вызывало развитие рака за счет изменений в каком-то одном определенном гене. Скорее всего при этом возникает целый набор генетических изменений, каждое из которых может способствовать возникновению рака

ПРЕВРАЩЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ КАНЦЕРОГЕНОВ В СИЛЬНЫЕ МУТАГЕНЫ IN VIVO

Тесная связь между многими химическими канцерогенами и мутагенами была обнаружена совсем недавно. Если для некоторых соединений, сходных по вызываемым ими физиологическим последствиям с ионизирующим излучением (например, иприт), и мутагенная и канцерогенная активности были давно известны, то у многих наиболее мощных канцерогенов мутагенных свойств долго обнаружить не удавалось. Особенно поражало отсутствие сколько-нибудь заметных мутагенных свойств у различных полициклических углеводородов типа бензпирена и бензантрацена, являющихся сильными канцерогенами (рис. 20-2). Они не проявляют особого сродства к ДНК; было высказано предположение, что их канцерогенность обусловлена связыванием с ключевыми белками и инактивацией этих белков. За последние несколько лет накоплено огромное количество данных, свидетельствующих о том, что эти канцерогены как таковые не являются мутагенами. Однако при проникновении в некоторые клетки они претерпевают химические превращения с образованием производных, которые обладают очень высокой мутагенной активностью, а их канцерогенная активность намного превышает активность предшественников. Например, нитраты сами по себе не вызывают генетических (или раковых) изменений, однако в клетках они способны превращаться в очень сильные мутагены (или канцерогены) нитрозамины (рис. 20-3).

Рис. 20-2. Превращение бензпирена (присутствующего в пищевых продуктах, подвергающихся обжариванию) и афлатоксина B_1 (найденного в заплесневевших земляных орехах и фисташках) под влиянием ферментов печени в канцерогенные (мутагенные) эпоксидные производные.

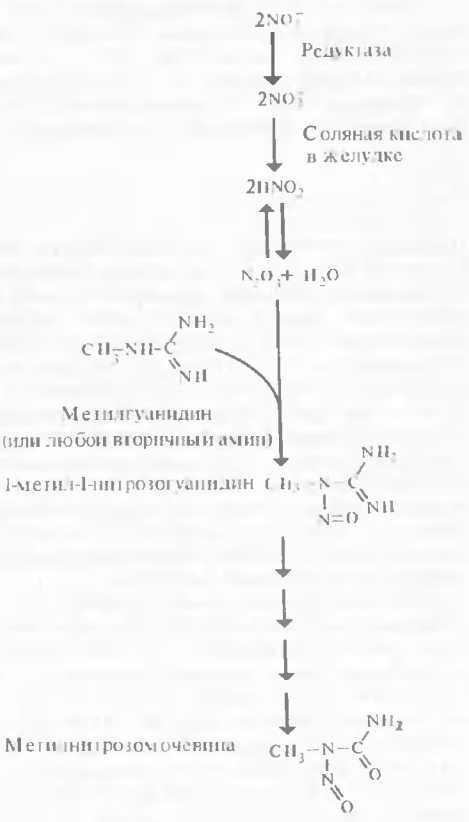


Рис. 20-3. Диаграмма, иллюстрирующая превращение нитратов (имеются в копчениостях, сосисках, ветчине и т. д.) в мощные канцерогенные (мутагенные) нитрозамины.

Значительная часть их мутагенных свойств обусловлена способностью химически модифицировать остатки гуанина, что приводит к замещениям в основаниях во время репликации ДНК, а также к разрывам полинуклеотидного остова, в результате чего возможны обширные генетические перестройки. В целом можно сказать, что соединения, которые способны превращаться в сильные канцерогены, по-видимому, одновременно приобретают свойства сильных мутагенов, и наоборот. Поэтому вряд ли есть основания сомневаться в том, что канцерогенез (если не полностью, то по большей части) является следствием изменений в ДНК.

Долгое время не удавалось объяснить поразительно разнохарактерные реакции на один и тот же канцероген у отдельных особей одного и того же вида. Сейчас выяснилось, что многие различия являются отражением генетически детерминированного содержания внутри клетки ферментов, от функционирования которых зависит образование активных форм различных канцерогенов. К наиболее мощным ферментам такого типа относятся арилгидроксилазы, нормальная функция которых в печени заключается в детоксикации ароматических углеводородов. В то время как эти ферменты катализируют превращение большинства углеводородов

в безвредные метаболиты, при действии на молекулы, подобные бензпирену, они, наоборот, катализируют образование продуктов с выраженными канцерогенными свойствами. Поэтому прием внутрь значительных количеств бензпирена ведет неминуемо к возникновению гепатомы (опухоли печени). Почему различные группы населения проявляют вариабельность в отношении уровня ариглидроксилаз, остается неизвестным, хотя этот факт пытаются объяснить различными типами питания популяций.

ИММУННЫЙ НАДЗОР

Поскольку спонтанные мутации внутри данного гена могут происходить с частотой 10^{-6}—10^{-9} на клеточное деление и поскольку 1 г ткани содержит 10^9 клеток, естественно возникает вопрос: почему опухоли не образуются значительно чаще в более крупных эукариотических организмах? Либо должен существовать какой-то путь специфического подавления мутаций, приводящих к раку, либо должны существовать какие-то механизмы специфического разрушения вновь возникших раковых клеток. Теперь мы считаем, что верно последнее. Возникающие раковые клетки и их потомство распознаются и разрушаются в реакциях клеточного иммунитета (*иммунный надзор*). Этот защитный механизм основан на том, что на поверхности опухолевых клеток, как правило, находятся антигенные детерминанты, не обнаруживаемые в нормальных клетках. Зачем нужны специфические опухолевые антигены, абсолютно не ясно, известно лишь, что почти всегда глубокие изменения клеточной поверхности — неотъемлемое свойство ракового фенотипа.

Вопрос о почти обязательном присутствии опухолеспецифического антигена уже давно обсуждается исследователями. Аргументы против его присутствия основывались на том, что это автоматически приводило бы к гибели всех возникающих раковых клеток; между тем опухоли на первый взгляд растут бесконтрольно, и, следовательно, опухолевые клетки не должны существенно отличаться по антигенным свойствам от нормальных клеток-предшественников. В действительности, однако, большинство опухолей растет очень медленно. В настоящее время большинство исследователей считают, что in vivo опухоли растут несмотря на приобретение новых антигенных маркеров. Придерживающиеся этой точки зрения полагают, что у большинства животных иммунный ответ отсутствует только в отношении какой-то исключительной раковой клетки и ее потомства. Неизвестно, почему реакция антител хозяина оказывается в этих редких случаях несостоятельной, несмотря на то что сыворотка крови животных с растущими опухолями часто содержит большое число лимфобластов (производных Т-клеток), обеспечивающих иммунную реакцию специфически против соответствующих опухолевых клеток. Одним из возможных ответов является одновременное существование циркулирующих антител сходной с лимфобластами специфичности. Эти *блокирующие антитела* (В-клетки) могут, обволакивая поверхности опухолевых клеток, предотвращать прикрепление лимфобластов-убийц. Эффективность иммунного ответа на опухоль, таким образом, вероятно, зависит от соотношения иммунных реакций В- и Т-клеток.

Во всяком случае, теперь ясно, что неспособность к эффективному иммунному ответу приводит к значительному увеличению случаев возникновения спонтанных опухолей. Следовательно, эволюция позвоночных, живущих относительно долго, должна зависеть от развития иммунного ответа на рак. Можно думать, что использование организмом антител для борьбы с бактериальными инфекциями является случайным побочным преимуществом системы, исходно предназначенной для защиты животных от рака.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВОРОЖДЕННЫХ ЖИВОТНЫХ (БЕСШЕРСТНЫХ МЫШЕЙ) ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ОНКОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА РАКОВЫХ КЛЕТОК

Большинство раковых клеток подвергается иммунному отторжению даже при идентичности по генам тканевой совместимости. Их *онкогенность* (способность вызывать опухоли), как правило, можно выявить лишь при введении многих десятков миллионов клеток — только такое количество позволяет преодолеть иммунные механизмы хозяина. Некоторые раковые клетки, однако, обладают такими сильными опухолевыми антигенами, что они не способны образовать опухоль в обычных условиях; в то же время есть раковые клетки, образующие опухоли, которые растут лишь до определенных размеров, а затем начинают регрессировать и в конце концов исчезают. Для временного подавления иммунной системы хозяина широко используют различные обходные пути. Прежде чем определять способность клеток вызывать опухоли, организм реципиента часто подвергают воздействию больших доз ионизирующего излучения или иммунодепрессантов типа кортикостероидов. После этого для индукции различимых невооруженным глазом опухолей требуется на несколько порядков меньшее количество клеток. Другая уловка состоит в использовании новорожденных животных, поскольку у многих видов животных иммунная система непосредственно после рождения еще недостаточно эффективна. За последний год широкое применение нашли «бесшерстные мыши» (недавно открытая мутантная линия мышей) с врожденным пороком — сильно выраженной недостаточностью тимуса, в результате чего они не способны к эффективной иммунной реакции Т-клеток. Даже у таких мышей для образования опухоли обычно необходимо ввести более миллиона опухолевых клеток. Следует, однако, отметить, что для предотвращения гибели бесшерстных мышей от микробных инфекций необходимо соблюдать чрезвычайные предосторожности; лучше всего содержать клетки с такими мышами в полустерильных условиях.

Итоговая онкогенность данной раковой клетки зависит, таким образом, от того, насколько она утрачивает способность регулировать свой рост, а также от силы опухолеспецифических антигенов.

ВИРУСЫ КАК ПРИЧИНА РАКА

Наряду с теорией соматических мутаций существует гипотеза о том, что многие опухоли вызываются вирусами. По существу, это уже не гипотеза, поскольку есть убедительные доказательства, что причиной некоторых специфических раковых заболеваний у животных (от рыб до млекопитающих) являются вирусы. Таким образом, вопрос не в том, могут ли вирусы вызывать рак, а в том, действительно ли значительная часть раковых заболеваний вызывается вирусами. До последнего времени не было сколько-нибудь четко сформулированной схемы, объясняющей механизм вирусного происхождения рака. Теперь в основном благодаря работам с бактериальными вирусами мы знаем, что после проникновения в клетку некоторые вирусы стоят перед выбором: либо начать размножаться и убить клетку-хозяина, либо встроить свои хромосомы в хромосомы клетки-хозяина и принять на первый взгляд инертную форму провируса. Таким образом, существенное свойство вирусного канцерогенеза состоит во введении нового генетического материала, и этим он отличается от соматических мутаций, которые, как мы полагаем, часто связаны с утратой функционального генетического материала.

Хотя первый опухолевый вирус — вирус саркомы Рауса — был открыт более 60 лет назад, в 1912 г., в последующем сведения о новых опу-

холевых вирусах появлялись так редко, что представление о вирусах как об основной причине рака было крайне мало популярным. Но как только (приблизительно в 1950—1955 гг.) в качестве тест-систем начали использовать новорожденных животных, стало гораздо легче демонстрировать онкогенное действие вирусов. Кроме того, сначала многие исследователи воздерживались от принятия вирусной теории потому, что при электронно-микроскопическом исследовании в большинстве опухолевых клеток вирусы не обнаруживались. Теперь, однако, мы знаем, что довольно часто генетический материал вирусов вводится в хромосомы клетки-хозяина в форме провируса, а в таком случае никаких вирусных частиц и не может быть видно. Таким образом, отсутствие видимых вирусных частиц не говорит ни за, ни против вирусного происхождения данной раковой клетки.

В настоящее время можно думать, что не все опухолевые вирусы действуют одинаково. Многие раковые опухоли вызываются РНК-содержащими вирусами. Среди таких вирусов лучше всего известен вирус саркомы Рауса, вызывающий солидные опухоли у кур (саркома представляет собой опухоль соединительной ткани). Некоторые другие РНК-содержащие вирусы вызывают лейкозы и саркомы как у птиц, так и у млекопитающих, в том числе, возможно, и у человека. Совершенно по-иному действуют некоторые группы ДНК-содержащих вирусов. Одна группа таких вирусов вызывает рост бородавок на коже многих видов млекопитающих — от грызунов до человека. Другие отдаленно родственные между собой ДНК-содержащие вирусы, из которых лучше всего изучены мышиный вирус полиомы и обезьяний вирус SV40, при введении новорожденным животным вызывают целый набор опухолей. Вирус Эпштейна — Барра (ЭБ) из группы герпеса вызывает, по-видимому, не только мононуклеоз, но также и редкое опухолевое заболевание, встречающееся у африканских детей,— лимфому Беркитта. Ниже мы сосредоточим наше внимание прежде всего на ДНК-содержащих опухолевых вирусах, которые охарактеризованы более подробно, а затем перейдем к рассмотрению РНК-содержащих вирусов, изученных до сих пор весьма недостаточно.

ОЧЕНЬ ПРОСТАЯ СТРУКТУРА ЧАСТИЦ ВИРУСА SV40 (ИЛИ ВИРУСА ПОЛИОМЫ)

Вирус SV40 представляет собой сферический вирус диаметром 450 Å, обычно он размножается в организме обезьяны. Он относится к самым мелким ДНК-содержащим вирусам; его мол. вес составляет $\sim 28 \cdot 10^6$. Снаружи вирус SV40 покрыт белковой оболочкой, которая, как показано с помощью электронного микроскопа, построена из 72 морфологически идентичных субъединиц (рис. 20-4). Каждая из этих субъединиц состоит из 5 или 6 белковых молекул, так что в целом в оболочке находится 420 полипептидных цепей. Большинство, если не все, из этих полипептидов оболочки (VP1) характеризуются мол. весом $\sim 47\,000$. В каждой вирусной частице SV40 обнаруживается также около 40 копий второго полипептида (VP2) с мол. весом $\sim 34\,000$. Где он локализуется и каковы его функции, неизвестно. Белковая оболочка окружает одну-единственную кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК с мол. весом, несколько превышающим $3 \cdot 10^6$, и длиной развернутой цепи 1,6 мкм (рис. 20-5). В комплексе с этой ДНК находится 4 из 5 главных гистонов клетки-хозяина — H4, H2a, H2b и H3 (рис. 20-6). Отсутствует лишь гистон H1, который, как считают, участвует в скручивании хромосомы.

Практически идентичен вирусу SV40 по форме и основным особенностям структуры вирус полиомы, размножающийся в организме мышей. Как и вирус SV40, он способен вызывать рак при введении новорожденным животным; это позволило изучить его столь же подробно. Во всех важней-

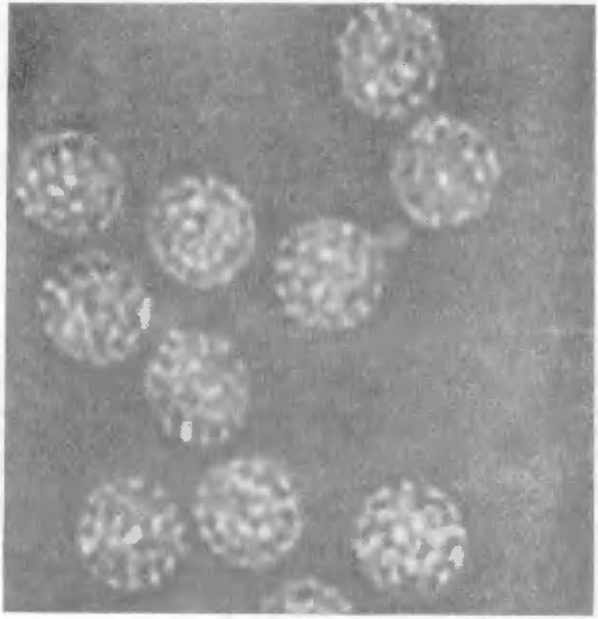


Рис. 20-4. Электронная микрофотография частиц вируса полиомы. (С любезного разрешения д-ра Кроуфорда, Институт вирусологии, Глазго.)

Диаметр частицы равен приблизительно 550 А. Внешняя белковая оболочка вируса построена из 72 субъединиц. Две частицы вверху справа соединены молекулой соответствующего антитела.

ших аспектах вирусы SV40 и полиомы биологически ведут себя тождественно, поэтому результаты, полученные для одного вируса, обычно приложимы и к другому.

Поскольку хромосома вируса SV40 (полиомы) состоит всего лишь из 4800 нуклеотидов, максимальное число аминокислот, которое она может кодировать, составляет ~1600. Если принять вполне правдоподобное предположение, согласно которому белки с мол. весом 47 000 (430 аминокислот) и 34 000 (300 аминокислот), обнаруживаемые в зрелых вирусных частицах, кодируются вирусной ДНК, то приблизительно 45% всего генома используется для структурного белка. Значит, для кодирования белка, участвующего в размножении вируса, остается около 2600 нуклеотидов. Приблизительно 900 аминокислот, которые он может максимально кодировать, вполне достаточно для образования от 3 до 5 полипептидных цепей средней величины. Если это так, то число генов вируса SV40 (полиомы) составляет 5—7, это очень похоже на мелкие фаги, содержащие одноцепочечную ДНК,— у них каждая из хромосом содержит 8—9 генов. Последние генетические данные (см. ниже), однако, позволяют предположить, что ДНК вируса SV40 (полиомы) состоит всего лишь из трех генов. Таким образом, вирус SV40, возможно, имеет такую же простую генетическую структуру, как и любой известный ДНК-содержащий вирус (рис. 20-7).

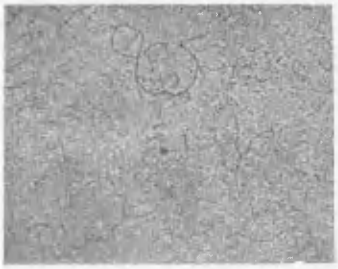


Рис. 20-5. Электронная микрофотография нескольких молекул очищенной ДНК вируса полиомы. (С любезного разрешения д-ра Стокенпуса, Рокфеллеровский институт.) Отчетливо видно, что все молекулы имеют кольцевую форму. Длина каждой такой молекулы ~ 1,6 мкм, что соответствует мол. весу $3 \cdot 10^6$.

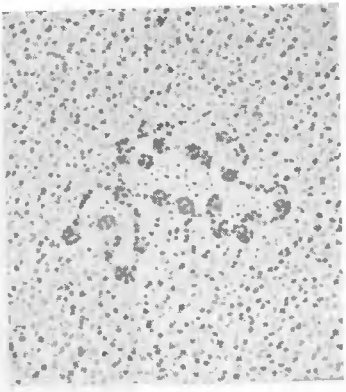
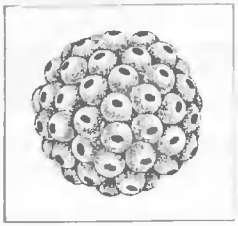


Рис. 20-6. Хроматиноподобная структура комплексов гистон — ДНК вируса SV40, выделенных из частиц вируса SV40. (С любезного разрешения д-ра Кремзи, д-ра Пинатти, д-ра Круассана и д-ра Яппва, Пастеровский институт, Париж). Плотные тельца соответствуют нуклеосомам хроматина эукариотов.



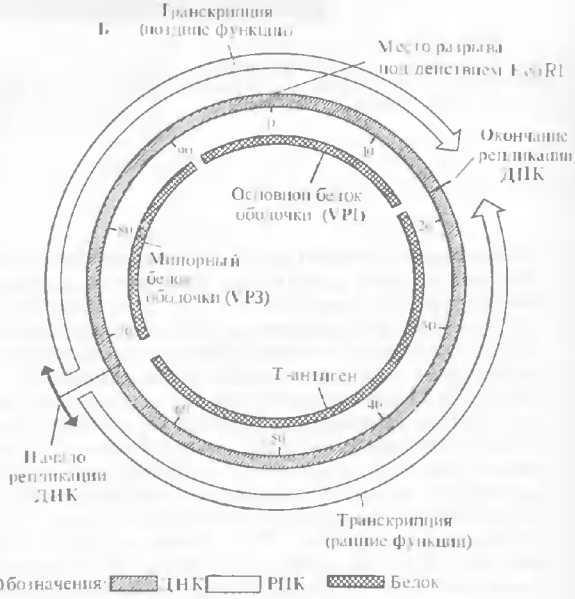


Рис. 20-7. *А*. Схематическое изображение вируса SV40, 72 капсомера которого расположены икосаэдрически. *Б*. Кольцевая хромосома вируса SV40 (или вируса полиомы); указаны три гена, точки инициации репликации ДНК и особенности транскрипции ранних и поздних генов.

ЛИЗИС И ТРАНСФОРМАЦИЯ

Когда вирус SV40 проникает в восприимчивую клетку обезьяны, он обычно бесследно исчезает. Реже (приблизительно с частотой 10^{-2}) он размножается как обычный вирус, продуцируя большое количество новых вирусных частиц. Местом окончательного созревания в клетке-хозяине является ядро, которое в итоге оказывается заполненным дочерними частицами в огромном количестве (приблизительно 10^6). Во время этого процесса, который занимает от 24 до 48 ч при температуре 37° С, нормальные функции ядра постепенно нарушаются, и инфицированная клетка обязательно погибает (литическая инфекция). Между тем никакого потомства не образуется, если частица вируса SV40 проникает в клетку мыши или хомячка. При этом весьма незначительная доля инфицированных клеток ($\sim 10^{-5}$) трансформируется в морфологически отличимые раковые клетки.

Как лизис, так и реакции трансформации можно наблюдать вне живых организмов, в культуре клеток. Культуру клеток (часто полученную от эмбрионов) выращивают на стекле, погруженном в питательный раствор. Затем к ней добавляют вирусные частицы. Некоторые из частиц размножаются в клетках с образованием потомства, которое затем адсорбируется соседними клетками — образуется круглое пятно из погибших клеток, похожее на стерильные пятна в случае бактериальных вирусов (рис. 20-8). Если же одну из клеток в культуре вирус трансформирует, то она начинает беспорядочно размножаться, что позволяет легко идентифицировать ее как раковую (рис. 20-9). Главной отличительной особенностью трансформированных клеток является их беспорядочный рост, который приводит к образованию групп клеток, хаотически нагроможденных одна на другую.

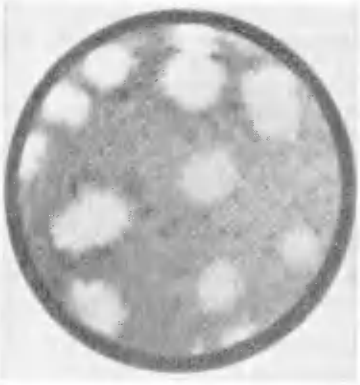


Рис. 20-8. Бляшки, образованные вирусом полиомы (Crawford, Diamond, Virology, 22, 235, 1964).
Препарат вируса добавляют к клеткам мышиного эмбриона, растущим на поверхности стекла. Бляшки, которые становятся видимыми после 25 дней инкубации,— это плотные массы убитых клеток, окрашивающихся иначе, нежели живые растущие клетки.

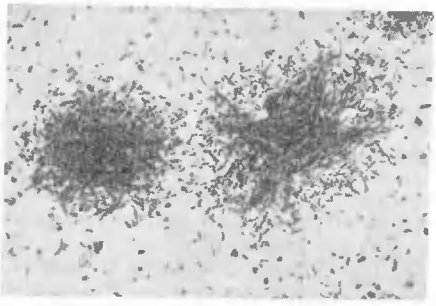


Рис. 20-9. Клоны, образованные трансформированными (слева) и нормальными (справа) клетками мышиного эмбриона. (С любезного разрешения д-ра Стоукера, Институт вирусологии, Глазго, Англия.) Трансформированные клетки громоздятся друг на друга, образуя более плотную (более темную) массу, чем нормальные клетки.

ПЕРМИССИВНЫЕ И НЕПЕРМИССИВНЫЕ КЛЕТКИ

Клетки, в которых данный вирус способен размножаться, называются пермиссивными, а клетки, в которых рост вируса невозможен, носят название непермиссивных. Линия пермиссивных клеток обычно ведет свое происхождение от животного, в котором в норме репродуцируется данный вирус, линии же непермиссивных клеток обычно происходят от животных, в организме которых вирус размножаться не способен. Таким образом, в зависимости от вируса та или иная клетка может быть либо пермиссивной, либо непермиссивной. Например, очень хорошо известная линия 3Т3 мышей оказывается пермиссивной для вируса полиомы мыши, но непермиссивной для вируса обезьян SV40. Если клетки 3Т3 заразить вирусом SV40, то последний не станет в них размножаться, но иногда может вызвать трансформацию клеток. Точно так же, когда вирусом полиомы заражают непермиссивную клеточную линию ВНК (почки хомячка), он может трансформировать клетку, но размножаться не способен; поэтому клетки ВНК часто используются в опытах по трансформации вирусом полиомы.

ФИЗИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ ДНК ВИРУСА SV40

В настоящее время расщепление молекул ДНК на мелкие фрагменты определенной структуры является обычной процедурой. Под действием рестриктаз происходит разрыв двухцепочечной молекулы ДНК в середине определенных последовательностей. Один из ферментов рестрикции, рестриктаза R_1 из *E. coli* (Eco R1) узнает последовательность

ГААТТЦ
ЦТТААГ,

которая в ДНК вируса SV40 встречается только один раз. Этот фермент превращает кольцевую ДНК вируса SV40 в линейную палочкообразную молекулу, концы которой имеют строго определенную последовательность (рис. 20-10). Другие рестриктазы распознают в ДНК вируса SV40 более часто встречающиеся последовательности; поэтому в результате их действия образуется большее число отдельных фрагментов. Например, смесь рестриктаз из *Hemophilus influenzae* вызывает разрывы в 11 сайтах, тогда как ферменты из *Hemophilus parainfluenzae* катализируют только три разрыва. Установить порядок отдельных частей в молекуле ДНК можно, анализируя состав более крупных фрагментов, образующихся при неполном расщеплении. Этот порядок уже удалось установить (рис. 20-11). Поэтому, если учесть успехи в определении нуклеотидных последовательностей отдельных фрагментов, можно надеяться, что в течение ближайших лет будет полностью расшифрована вся последовательность нуклеотидов (~4800) ДНК вируса SV40.

Полученные с помощью Eco R1 линейные молекулы ДНК вируса SV40 можно характеризовать далее посредством картирования методом неполной денатурации. Этот метод основан на том, что молекулы ДНК с высоким содержанием пар оснований А — Т денатурируют быстрее, чем ДНК, богатые более устойчивыми парами Г — Ц. Поэтому, когда ДНК вируса SV40 подвергают частичной денатурации щелочью, участки с высоким содержанием А — Т расходятся, а участки с высоким содержанием Г — Ц остаются интактными. На электронных микрофотографиях в таких молекулах видны одноцепочечные области в виде «пузырей», связанных между собой двухцепочечными линейными участками (рис. 20-12). Структуры, образующиеся при такой обработке, хорошо воспроизводимы; по картинам, которые получаются при этом, легко отличать одну ДНК от другой.

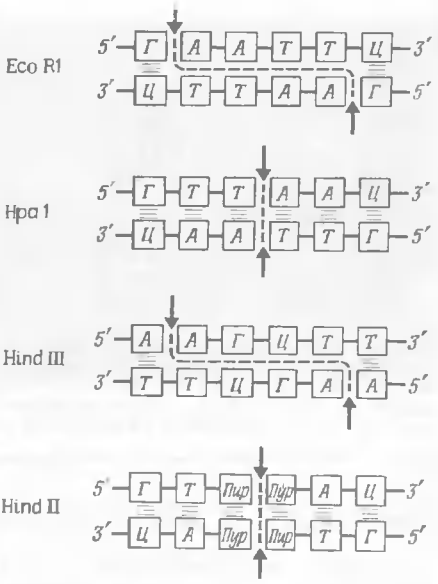


Рис. 20-10. Диаграмма, на которой представлены основные последовательности, узнаваемые некоторыми рестриктазами. Стрелками указаны места разрыва цепи. Ферменты из *Hemophilus influenzae* d II и из *H. parainfluenzae* (Hpa 1) разрывают обе цепи в одном и том же месте. Ферменты из *E. coli* (Eco R1) и и *H. influenzae* d III (Hind III) делают разрывы в разных местах, после чего образуются цепи с липкими концами. Указанные последовательности оснований представляют собой палиндромы относительно центральной точки в каждой из них.

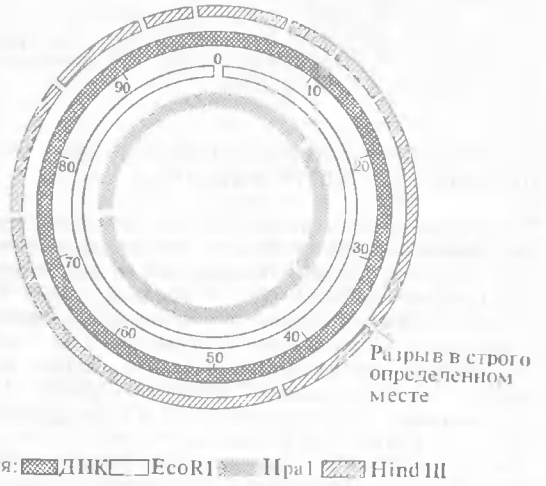
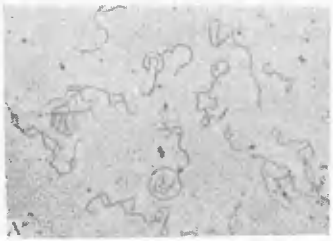
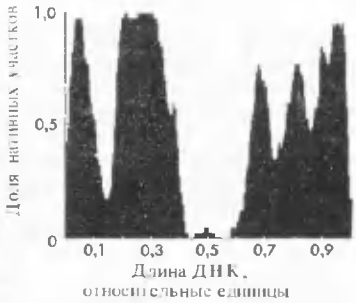


Рис. 20-11. Места разрывов хромосомы вируса SV40 под действием некоторых широко используемых рестриктаз.
Сравните их с разрывом под действием фермента Eco R1, показанного на генетической карте (рис. 20-7).



А



Б

Рис. 20-12. *А*. Электронно-микроскопическое изображение ДНК вируса SV40, превращенной в линейную форму под действием эндонуклеазы R1 и частично денатурированной при pH 10,9. (С любезного разрешения д-ра Делиуса.) *Б*. Гистограмма нативных областей, обнаруженных на электронной микрофотографии линейной ДНК вируса SV40, представленной в (*А*). (С разрешения д-ра Малдера и д-ра Делиуса.)

ИНФЕКЦИОННОСТЬ ДНК ВИРУСА SV40

Добавление высокоочищенной ДНК к пермиссивным или непермиссивным клеткам приводит соответственно либо к литической, либо к трансформирующей реакции. Однако частота возникновения этих реакций при добавлении интактных вирусных частиц на несколько порядков выше, вероятно потому, что свободные молекулы ДНК с трудом адсорбируются на клетке-хозяине. Если все же молекулы свободной ДНК индуцируют инфекционный процесс (или трансформацию), то конечный эффект нельзя отличить от эффекта, вызываемого зрелыми вирусными частицами. Этот факт еще раз свидетельствует о том, что носителем генетической специфичности является только ДНК.

НА РАННЕЙ СТАДИИ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА ПРЕОБЛАДАЕТ СИНТЕЗ Т-АНТИГЕНА

Жизненный цикл вируса SV40, так же как и у фагов, можно подразделить на раннюю и позднюю стадии. На ранней стадии, продолжающейся примерно 8—10 ч, подготавливается синтез ДНК и структурных белков вируса SV40, который происходит на поздней стадии. Сначала считали, что на ранней стадии синтезируется ряд вирус-специфических ферментов. Однако в настоящее время мы располагаем фактами, свидетельствующими о том, что вначале синтезируется, вероятно, только один SV40-специфический белок. Этот белок назван Т-антигеном (рис. 20-13). Вскоре после синтеза в цитоплазме он транспортируется в ядро. До сих пор ничего нельзя сказать о его физических свойствах, так как при осторожном способе выделения он ведет себя как крупная молекула (мол. вес более 500 000), а при менее щадящем мол. вес этого белка оказывается равным ~75 000.

Ранняя мРНК, кодирующая Т-антиген, имеет константу седиментации 19S и характеризуется мол. весом ~800 000. Она синтезируется в направлении против часовой стрелки (когда хромосома вируса SV40 ориентирована так, как показано на рис. 20-7) с «е»-цепи (от англ. early — ранний). Общая кодирующая способность этой мРНК в лучшем случае соответствует 750 аминокислотам, что более или менее совпадает с длиной цепи меньшей

Рис. 20-13. Демонстрация наличия ядерного антигена, специфичного к вирусу SV40 (с помощью иммунофлуоресцентного метода) в непермиссивных клетках хомячка, трансформированных вирусом SV40. (С любезного разрешения д-ра Дефенди, Вистаровский институт, Филадельфия.)

формы Т-антигена. Отсюда следует, что более крупная форма Т-антигена либо представляет собой агрегат нескольких идентичных полипептидов Т-антигена, либо возникает в результате прикрепления Т-антигена к значительно более крупной молекуле одного из клеточных белков.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВА НАЛИЧИЯ ТРЕХ ГЕНОВ В ДНК ВИРУСА SV40 (ПОЛИОМЫ)

За последние 5 лет с помощью обработки азотистой кислотой было изолировано множество различных температурочувствительных мутантов вируса SV40 (полиомы). Как оказалось, эти мутанты распадаются только на три группы комплементации, причем две из них соответствуют поздним генам, кодирующим два структурных белка вируса SV40 — VP1 и VP2. Третью группу можно соотнести с ранним геном, кодирующим Т-антиген. В мутантах блокируется не только накопление Т-антигена, но и репликация ДНК и синтез структурных белков вируса SV40. Кроссинговер в данном случае наблюдается редко, поэтому установить порядок расположения этих генов только при помощи генетического подхода оказывается невозможным. Однако данные экспериментов, в которых для комплементации с температурочувствительными мутантами из разных групп использовались малые фрагменты ДНК, полученные при действии рестриктаз, позволили установить точный порядок генов в ДНК вируса SV40 (рис. 20-14).

ИНДУКЦИЯ ФЕРМЕНТОВ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА, УЧАСТВУЮЩИХ В СИНТЕЗЕ ДНК

Отсутствие четких представлений о том, каким образом Т-антигену удается контролировать почти все поздние процессы, в настоящее время является, по-видимому, основным препятствием на пути к пониманию репликации вируса SV40. Ключом к разгадке этого вопроса могут стать данные о том, что количество ряда ферментов клетки-хозяина, участвующих в синтезе ДНК, резко увеличивается после заражения вирусом. Это происходит, в частности, тогда, когда вирусом SV40 заражают клетки, блокированные на стадии G_1, синтез ДНК в которых прекратился. Рост вируса в таких

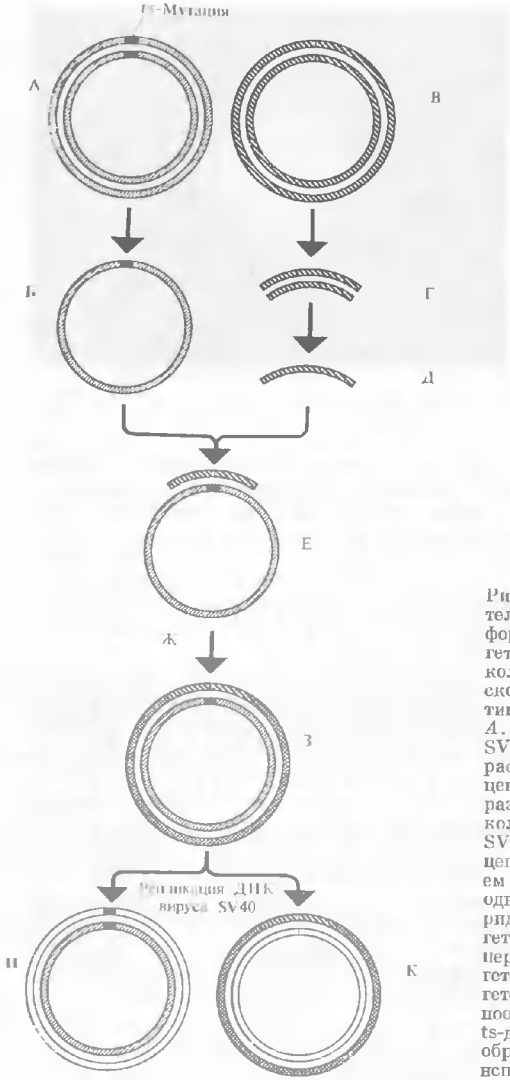


Рис. 20-14. Локализация температурочувствительной мутации вируса SV40 путем трансформации клеток под влиянием частичных гетеродуплексов, образованных из мутантной кольцевой одноцепочечной ДНК и специфического фрагмента одноцепочечной ДНК дикого типа, полученного под действием рестриктазы. *А*. Температурочувствительный мутант вируса SV40. Он образует бляшки в культуре клеток, растущих при 32, но не при 40 °С. *Б*. Одноцепочечное кольцо образуется в результате разрыва в одной из цепей двухцепочечного кольца. *В*. Двухцепочечная ДНК вируса SV40 дикого типа (ДТ). *Г*. Фрагмент двухцепочечной ДНК ДТ образуется под действием рестриктазы. *Д*. При нагревании получают одноцепочечный фрагмент ДНК ДТ. *Е*. Гибридизация (отжиг) приводит к образованию гетеродуплекса. *Ж*. При непермиссивной температуре (40 °С) клетки заражают частичным гетеродуплексом. *З*. В результате репарации гетеродуплекс превращается в двухцепочечное кольцо. *И*. В дочерней ДНК вируса SV40 ts-дефект сохраняется; при 40 °С бляшки не образуются. *К*. В этой дочерней ДНК ts-дефект исправляется и при 40 °С образуются бляшки.

клетках происходит несмотря на то, что до инфекции в них отсутствуют многие ферменты (например, ЦДФ-редуктаза, дТМФ-синтетаза и ДНК-полимераза), катализирующие образование различных нуклеотидов — предшественников ДНК и синтез полинуклеотидов. Следовательно, эффективное заражение вирусом SV40 должно каким-то образом деблокировать механизмы клеточного контроля, которые в норме выключают синтез ферментов, необходимых для образования ДНК, если их присутствие более

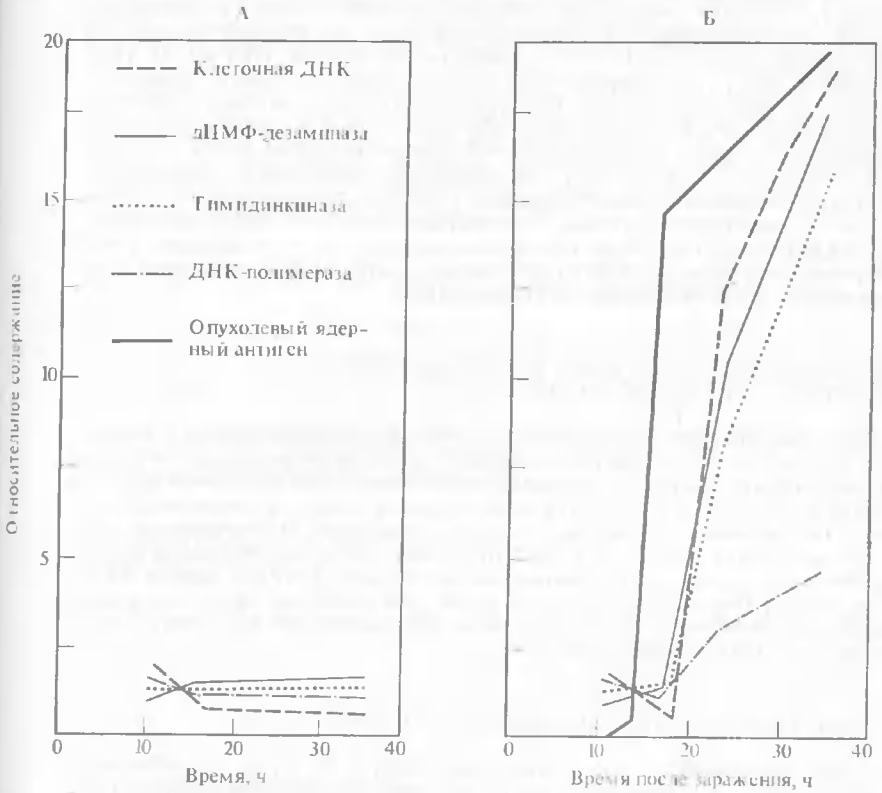


Рис. 20-15. Индукция ферментов, участвующих в синтезе ДНК после заражения пермиссивных клеток обезьян вирусом SV40 (Dulbecco, Scientific American, апрель 1967).

До появления клеточных ферментов начинается синтез вирус-специфического белка —ядерного Т-антигена.
А. Незараженные клетки. *Б*. Зараженные клетки.

не требуется. Скорее всего Т-антиген участвует в процессах индукции, так как количество различных ферментов начинает увеличиваться сразу же после появления Т-антигена в ядре (рис. 20-15).

Индукция ферментов, необходимых для образования ДНК, приводит не только к синтезу ДНК вируса SV40, но также к усиленному синтезу ДНК клетки-хозяина. Те определенные сигналы, считывание которых обусловливает начало репликации кольцевой хромосомы вируса SV40, действуют также и на многие клеточные хромосомы. Это явление, представляющееся на первый взгляд странным, приобретает определенный смысл, если принять во внимание генетическое происхождение ферментов, необходимых для образования ДНК. Они должны кодироваться клеточными хромосомами, так как хромосома вируса SV40 слишком коротка, чтобы справиться с этой задачей. Информация для всех этих ферментов потребовала бы значительно большей величины ДНК — такой, например, как у ДНК фага λ (т. е. в 10 раз больше, чем у ДНК вируса SV40).

Индукции не происходит, если блокирован синтез РНК; следовательно, Т-антиген либо прямо, либо опосредованно влияет на специфичность транскрипции. Как показывают недавно полученные данные, он прочно связывается с ДНК в стартовых точках синтеза ДНК и РНК (или вблизи от них), что свидетельствует в пользу прямого эффекта. Возможно, Т-антиген действует подобно белку, активирующему катаболитные гены (БАК) (стр. 374), и изменяет состояние ДНК таким образом, что она становится более легко транскрибируемой (или реплицируемой). Вместе с тем он может быть не чем иным, как σ-подобным фактором специфичности, который связывается непосредственно с РНК-полимеразой и определяет порядок транскрипции генов. Исключительно высокая скорость седиментации нативного Т-антигена может быть результатом его связывания с той формой эукариотической РНК-полимеразы, которая ответственна за синтез мРНК (а также инициацию синтеза ДНК).

РЕПЛИКАЦИЯ ДНК ВИРУСА SV40 НАЧИНАЕТСЯ В СТРОГО ОПРЕДЕЛЕННОМ МЕСТЕ

При электронно-микроскопическом изучении реплицирующегося вируса SV40 показано, что он сохраняет ковалентно замкнутую кольцевую форму на протяжении всего процесса репликации. Репликация начинается в одной точке (см. рис. 9-28 и 20-7); при этом две вилки движутся в противоположных направлениях до тех пор, пока не встретятся. Примечательно, что стартовая точка находится вблизи от промотора (а может быть, и прямо в них), контролирующих синтез ранней и поздней мРНК вируса SV40 (см. ниже). Поэтому встает вопрос о том, действительно ли нуклеотидная последовательность, сигнализирующая «начало репликации ДНК», распознается РНК-полимеразой.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОЗДНЕЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ВИРУСА SV40

мРНК, кодирующая структурный белок вируса SV40, начинает накапливаться в то же самое время, когда запускается репликация ДНК. Она кодируется l-цепью (от англ. late — поздний) ДНК и синтезируется, следовательно, в направлении по часовой стрелке (в отличие от ранней мРНК, синтез которой идет против часовой стрелки). Участок ДНК, на котором происходит транскрипция, кодирует только раннюю или позднюю РНК; большая часть, если не вся ДНК, по-видимому, содержит информацию для аминокислотных последовательностей. Это может означать, что 5′-концы ранней и поздней РНК вируса SV40 кодируются близко расположенными нуклеотидами (рис. 20-7).

Суть дела, однако, может быть и не столь простой, поскольку поздняя мРНК, изолированная из ядер, значительно крупнее, чем мРНК, обнаруживаемая в цитоплазме в комплексе с рибосомами. Размер полисомной мРНК вируса SV40, возможно, частично отражает явление процессинга, происходящего в ядре и приводящего каким-то образом к деградации тех последовательностей РНК, которые не кодируют вирус-специфические белки. Таким образом, первичная структура как 5′-, так и 3′-конца мРНК, выделенной из полисом, совсем не обязательно соответствует последовательности стартового участка или стоп-сигнала транскрипции.

До сих пор ничего не известно о том, почему поздняя мРНК вируса SV40 накапливается только в самой поздней фазе. Сначала думали, что это должно свидетельствовать о синтезе в ранней фазе нового σ-подобного фактора специфичности траскрипции (Т-антигена?), однако теперь нельзя исключать возможность того, что поздняя мРНК синтезируется рано,

однако быстро разрушается еще до соединения с рибосомами. Работа с использованием очищенной эукариотической РНК-полимеразы II, предпринятая для выяснения этого вопроса, не дала желаемых результатов, возможно из-за того, что в качестве препарата ДНК использовали очищенную ДНК вируса SV40. В настоящее время есть основания полагать, что ДНК вируса SV40 никогда не существует внутри ядра в свободном состоянии: при связывании с клеточными гистонами она быстро входит в состав хроматина. Можно надеяться, что изучение in vitro транскрипции ДНК вируса SV40 в составе хроматина прольет свет на механизмы регуляции синтеза поздней мРНК вируса SV40.

ТРАНСФОРМАЦИИ ПРЕДШЕСТВУЕТ АБОРТИВНАЯ ИНФЕКЦИЯ

Многие из вирусных частиц SV40, инфицирующих непермиссивные клетки 3T3, проходят через раннюю стадию репродукции. При этом синтезируются ранняя мРНК, T-антиген и некоторое количество вирусной ДНК. Однако никаких структурных белков вируса не образуется, хотя удается выявить значительное количество поздней мРНК (особенно в ядре). По каким-то пока неизвестным причинам непермиссивные клетки не позволяют функционировать поздней мРНК.

ТРАНСФОРМАЦИЮ КЛЕТКИ СПОСОБНА ВЫЗВАТЬ ОДНА ЧАСТИЦА

При добавлении вирусных частиц SV40 к непермиссивным клеткам число трансформированных клеток прямо пропорционально количеству введенного вируса (рис. 20-16). Если определенное число частиц трансформирует одну клетку из тысячи, то число частиц, в десять раз большее, трансформирует одну клетку из ста. Это соотношение говорит нам о том, что одной частицы как таковой вполне достаточно для того, чтобы осуществить трансформацию. Более того, при добавлении достаточного числа частиц практически все используемые в эксперименте клетки способны трансформироваться. Этот факт свидетельствует о том, что все растущие в культуре клетки способны подвергаться трансформации. Однако вероятность

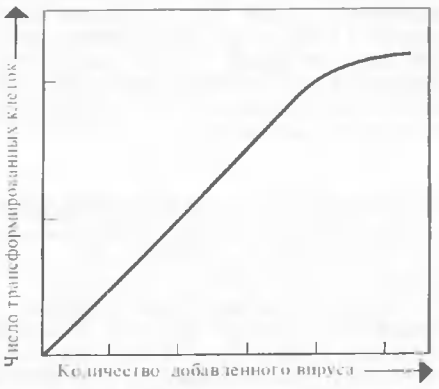


Рис. 20-16. Линейная зависимость числа трансформированных непермиссивных клеток от количества добавленного вируса SV40. Плато при высоких дозах вируса отражает неспособность некой фракции (обычно 50—99%) непермиссивных клеток подвергаться трансформации. Значение такой невосприимчивой популяции клеток остается неясным.

трансформации под воздействием одной частицы вируса SV40 крайне низка. Обычно для создания 50 %-ной вероятности перехода клетки в раковое состояние необходимо наличие нескольких десятков тысяч инфекционных частиц.

В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ ЧАСТИЦЫ ВИРУСА SV40 ОТСУТСТВУЮТ

Инфекционные частицы вируса SV40 в трансформированных клетках не обнаруживаются. Конечно, не удивительно, что ядра трансформированных клеток не заполнены вирионами — иначе клетка просто погибла бы. Дело, однако, в том, что не удается выявить вообще ни одной частицы. Здесь имеет место очевидное сходство с лизогенизирующими вирусами бактерий (гл. 7). Лизогенизирующие фаги также имеют два возможных пути развития. Они способны либо размножаться и вызывать лизис клеток, либо встраиваться в хромосому клетки-хозяина в результате кроссинговера.

ПРИ ТРАНСФОРМАЦИИ ПРОИСХОДИТ ВКЛЮЧЕНИЕ ДНК ВИРУСА SV40 В ХРОМОСОМЫ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА

Метод гибридизации РНК с ДНК использовали сначала для выявления последовательностей ДНК вируса SV40 в ДНК, выделенной из трансформированных клеток. Когда исследовали ДНК из нормальных клеток, последовательности ДНК вируса SV40 обнаружить не удавалось. Интегрированная ДНК вируса SV40 локализуется в ядре; в цитоплазматических органеллах (митохондриях) ее нет. В ядре она, по всей видимости, ковалентно связана с хромосомной ДНК, поскольку при использовании метода щадящей экстракции оказалось, что последовательности ДНК, гибридизующиеся с мРНК вируса SV40, являются частью очень длинных молекул ДНК (мол. вес $> 10^8$).

Каждая трансформированная клетка содержит приблизительно от 1 до 20 геномов вируса SV40; их число может отражать число частиц вируса SV40, вызвавших трансформацию соответствующей непермиссивной клетки. Если клеткой из организма человека интегрируется только одна (или несколько?) молекула ДНК вируса SV40, то чаще всего она включается в хромосому 7. Фермент(ы), участвующий(ие) в процессе интеграции, неизвестен; проще всего объяснить происходящее кроссинговером, схема которого изображена на рис. 20-17. Поскольку при интеграции предпочтение отдается одной определенной хромосоме, можно предположить что в процессе кроссинговера принимают участие строго определенные нуклеотидные последовательности (это касается как хромосом вируса SV40, так и хромосом человека).

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЧАСТИЦ ПОСЛЕ СЛИЯНИЯ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ НЕПЕРМИССИВНЫХ КЛЕТОК С НЕТРАНСФОРМИРОВАННЫМИ ПЕРМИССИВНЫМИ

В течение многих лет предпринимались попытки индуцировать в клетках, трансформированных вирусом полиомы, формирование инфекционных вирусных частиц. Безуспешным было даже использование агентов, вызывающих исключение профага λ из хромосомы *E.coli*. Между тем в случае вируса SV40 метод слияния клеток оказался эффективным. Через 24 ч

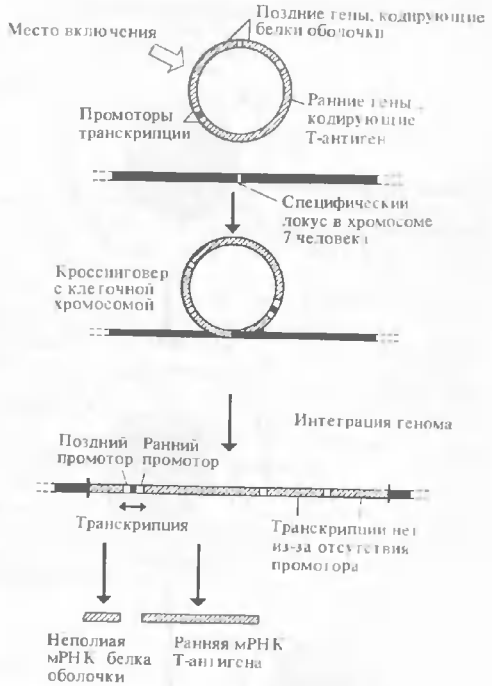


Рис. 20-17. Схематическое изображение включения ДНК вируса SV40 в определенную клеточную хромосому. Важно то, что место включения вирусной ДНК находится в области поздних генов, в результате чего синтез интактной поздней мРНК вируса SV40 становится невозможным. Однако в таких трансформированных клетках могут образовываться интактные молекулы ранней мРНК.

после слияния клетки 3Т3, трансформированной вирусом SV40, с нетрансформированной клеткой, пермиссивной для этого вируса, во многих слившихся клетках наблюдается формирование дочерних частиц вируса SV40 (рис. 20-18). Складывается впечатление, что некое вещество, содержащееся в пермиссивных клетках, обеспечивает вирусу возможность пройти полный цикл размножения. До сих пор эти результаты не удалось воспроизвести на клетках, трансформированных вирусом полиомы. Видимо, объясняется это какими-то тривиальными, а не фундаментальными причинами. Есть основания полагать, что, как и в случае вируса SV40, у вируса полиомы в составе трансформированной клетки находится весь геном целиком, а не какой-то его отдельный фрагмент.

СОДЕРЖАТ ЛИ ПЕРМИССИВНЫЕ КЛЕТКИ ФАКТОРЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ТРАНСЛЯЦИИ ПОЗДНЕЙ мРНК

Обнаружение частиц вируса SV40 в трансформированных ядрах непермиссивных клеток после слияния с пермиссивными указывает на то, что в отличие от профага λ геномы вируса SV40 находятся под позитивным, а не под негативным контролем. Геном профага λ находится в неактивном состоянии из-за присутствия репрессора, который специфически препятствует транскрипции как ранней, так и поздней мРНК. Но если бы отсут-

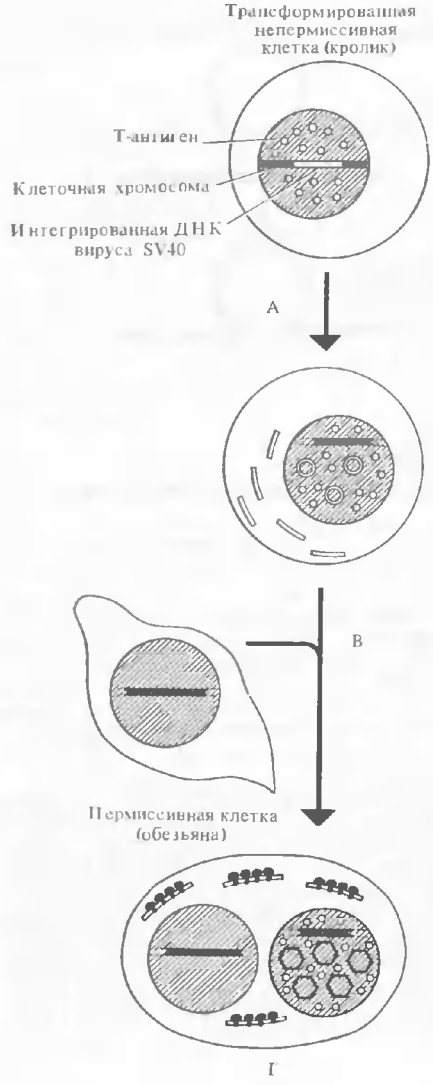


Рис. 20-18. Освобождение инфекционных частиц вируса SV40 из трансформированных непермиссивных клеток кролика после слияния с пермиссивными клетками обезьян. В небольшой доле непермиссивных клеток геном вируса SV40 исключается из хромосомы хозяина и временно существует в виде свободной молекулы ДНК (эписомы). После слияния с пермиссивными клетками вирус SV40 обнаруживается только в этих клетках. *А*. Изредка наблюдается спонтанное исключение ДНК вируса SV40 из клеточной хромосомы. *Б*. Поздняя мРНК не способна транслироваться с образованием белков оболочки. *В*. Слияние клеток. *Г*. В результате трансляции поздней мРНК вируса SV40 с использованием факторов трансляции из пермиссивных клеток образуются структурные белки оболочки и в ядре происходит сборка зрелых частиц вируса SV40.

ствие транскрипции поздних генов вируса SV40 обусловливалось репрессором, то слияние с пермиссивными клетками не обязательно приводило бы к индукции: репрессор продолжал бы связываться с промотором поздних генов вируса SV40. Теперь, однако, мы склонны думать, что пермиссивная клетка содержит некую молекулу, необходимую для трансляции поздней мРНК вируса SV40. Для проверки этой гипотезы понадобится разра-

ботка таких систем in vitro, в которых добавление ДНК вируса SV40 к бесклеточным экстрактам приводило бы к синтезу структурных белков вируса SV40.

ВИРУС-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ мРНК В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

В трансформированных клетках эффективно функционирует только ранний ген, кодирующий Т-антиген. Поздние гены либо вообще неактивны, либо работают с крайне низкими скоростями и потому вряд ли участвуют в превращении здоровых клеток в раковые. Следовательно, действующим началом должен быть Т-антиген, который, как указывалось ранее, обладает способностью включать работу группы генов, участвующих в репликации ДНК. Эта группа функционально родственных генов, возможно, представляет собой лишь небольшую часть множества генов, активируемых Т-антигеном; следовательно, нельзя утверждать, что именно эти гены и только они ответственны за раковый фенотип. Клетки, трансформированные вирусом SV40, в частности, секретируют значительно большее количество «клеточного фактора»— протеолитического фермента, быстро превращающего фибриноген в фибрин; активная секреция его (стр. 563) характерна, по-видимому, почти для всех клеток, образующих солидные опухоли. Существует точка зрения, что одна только секреция «клеточного фактора» может приводить к трансформации нормальной клетки в раковую. Однако не следует пренебрегать и другой гипотезой, согласно которой совместно действуют и формируют раковый фенотип многие гены, активируемые Т-антигеном.

ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПОВЕРХНОСТНЫЕ АНТИГЕНЫ

Упрощенная гипотеза, согласно которой вся ранняя мРНК вирусов SV40 и полиомы кодирует только Т-антиген, не объясняет присутствия опухолеспецифических антигенов на поверхности трансформированных клеток. Эти антигены, по-видимому, специфичны для данного вируса, а не для трансформируемой клетки. Это подтверждается тем, что клетки, трансформированные вирусом SV40 или вирусом полиомы, не способны образовывать опухоли при введении взрослым животным с теми же генетическими свойствами. В частности, поверхностный антиген SV40-трансформированных клеток линии ВНК отличается от антигена тех же клеток, трансформированных вирусом полиомы. Поэтому многие исследователи допускают существование второго раннего гена, кодирующего опухолеспецифические трансплантационные антигены (ОСТА). Однако какие-либо генетические доказательства существования второго раннего гена отсутствуют. Кроме того, в «ранней» области попросту не хватает нуклеотидов для кодирования второго белка. Имеет смысл рассмотреть иное объяснение отличия антигенов: Т-антигены вирусов полиомы и SV40 активируют разные наборы генов клетки-хозяина, которые в свою очередь обусловливают появление различных молекул на поверхности клетки.

Во всяком случае, антигенность должна быть необходимым свойством индуцированных вирусом опухолей, обеспечивающим выживание организма хозяина, а следовательно, и самого вируса. Если бы образующиеся опухоли не содержали специфических антигенов, то почти все вирусные инфекции приводили бы к гибели организма-хозяина от рака. Однако эти аргументы не могут объяснить, почему опухолевый антиген обязательно должен быть вирус-специфическим, так как в принципе эту роль мог бы играть некий общий для всех антиген рака.

АДЕНОВИРУСЫ — ЕЩЕ ОДНА СИСТЕМА ВЫЯВЛЕНИЯ ОНКОГЕНА

Аденовирусы тоже представляют собой перспективную модельную систему для выяснения механизма возникновения рака под влиянием интегрированного вирусного гена. Они представляют собой довольно крупные вирусы животных; некоторые разновидности их, размножаясь в человеке, вызывают симптомы обыкновенной простуды. Частица аденовируса имеет

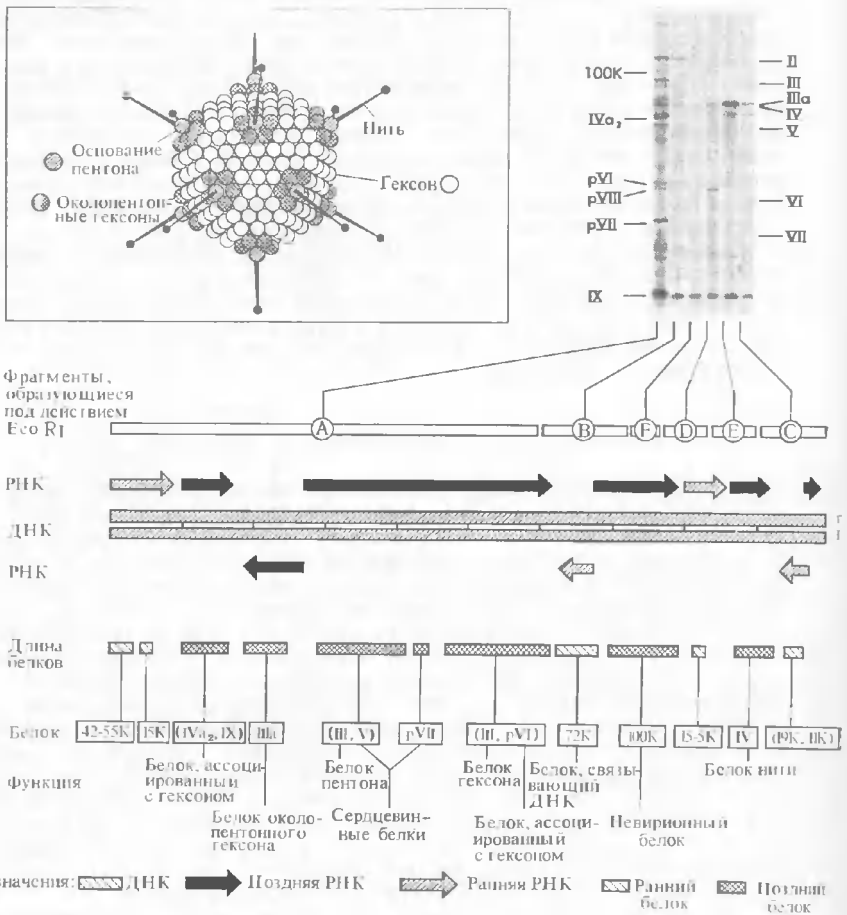


Рис. 20-19. Схематическое изображение частицы аденовируса, а также диаграмма линейной молекулы его ДНК и фрагментов, образующихся в результате расщепления под действием фермента R1 *E. coli* (R1-фрагментов). Показана также локализация нескольких видов ранней и поздней мРНК аденовируса, а также белки, которые, по-видимому, кодируются этими мРНК. Вверху справа показана электрофореграмма (в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия, ДСН) белков, которые синтезируются на мРНК, транскрибированных с R1-фрагментов ДНК аденовируса.

диаметр $\sim$ 800 Å и мол. вес $\sim 175 \cdot 10^6$. Она состоит из ДНК и белковой оболочки икосаэдрической формы (20 граней), образованной правильной агрегацией специфических белковых субъединиц нескольких типов (рис. 20-19). Оболочка окружает двухцепочечную молекулу ДНК с мол. весом около $25 \cdot 10^6$ в комплексе с сердцевинными белками двух типов. Всего внутри каждой вирусной частицы находится около девяти (десяти?) различных белков, каждый из которых играет, вероятно, определенную жизненно важную роль.

Заражение восприимчивых клеток человека аденовирусами человека приводит к развитию литической инфекции, кульминация которой состоит в появлении приблизительно 10^5 новых вирусных частиц. Эти дочерние частицы накапливаются в ядре, функционирование которого в результате размножения вируса нарушается. Геном аденовируса подавляет активность синтезирующего аппарата клетки-хозяина куда эффективнее, чем геном вируса SV40,— в последнем случае хромосомы клетки-хозяина продолжают нормально функционировать до самых поздних стадий инфекционного процесса. При аденовирусной инфекции, напротив, синтез ДНК, так же как и синтез РНК в клетках-хозяевах, быстро замедляется и уже через 15 ч большинство вновь синтезированных белков является вирус-специфическим.

ГЕНОМ АДЕНОВИРУСА КОДИРУЕТ ПРИБЛИЗИТЕЛЬНО 20 РАЗЛИЧНЫХ БЕЛКОВ

В клетках, зараженных аденовирусом, уже идентифицировано приблизительно 20 различных вирус-специфических белков (а следовательно, и генов). Если некоторые из них относительно малы (мол. вес $\sim$ 10 000), то другие характеризуются достаточно крупными размерами (мол. вес $\sim$ 100 000); при суммировании молекулярных весов получается величина, почти точно соответствующая общей кодирующей способности молекулы ДНК аденовируса (мол. вес $25 \cdot 10^6$). Следовательно, почти весь геном аденовируса используется для кодирования специфических аминокислот, за исключением очень небольшого фрагмента ДНК, имеющего, возможно, регуляторную функцию. Относительное расположение многих генов аденовирусов можно определить генетическими методами, поскольку заражение одной клетки несколькими частицами с разными генетическими свойствами приводит к появлению рекомбинантов. В последнее время для определения расположения отдельных генов вдоль молекулы ДНК был использован ряд генетических и биохимических подходов (рис. 20-19); можно надеяться, что через несколько лет будет установлена точная локализация каждого гена аденовируса.

РАННИЕ И ПОЗДНИЕ ГЕНЫ

В течение первых нескольких часов инфекции функционирует только несколько генов аденовирусов (ранние гены); подавляющее большинство генов (поздние гены) включается только после того, как ранние гены сыграют какую-то жизненно важную, но пока еще неведомую роль. Когда начинает накапливаться поздняя мРНК, ранняя мРНК не исчезает и сохраняется в течение всего жизненного цикла вируса. В отличие от фага T7, у которого молекула ДНК примерно того же размера, ранние мРНК аденовирусов кодируются не смежными областями ДНК. Две ранние мРНК кодируются *h*-цепью, а две другие — *l*-цепью (рис. 20-19). Поздние мРНК синтезируются также на обеих цепях (по большей части на *l*-цепи). Как происходит переключение с синтеза ранней мРНК на совместный

синтез ранней и поздней мРНК аденовируса, неизвестно. Можно думать, что на каких-то этапах происходит процессинг гораздо более крупного предшественника. Новосинтезированные цепи мРНК, обнаруживаемые в ядре, значительно крупнее и гетерогеннее, чем отдельные зрелые мРНК в цитоплазме, присоединяющиеся к рибосомам (создается впечатление, что они являются полными транскриптами либо *l*-, либо *h*-цепей)

ИНВЕРТИРОВАННЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НА КОНЦАХ ДНК АДЕНОВИРУСОВ

Механизм, при помощи которого реплицируются линейные молекулы аденовирусов, представляется весьма загадочным. Синтез ДНК обычно асимметричен: матрицей служит только одна цепь, в результате чего образуются одноцепочечные хвосты, отходящие от двухцепочечных родительских молекул. Одиночные цепи позже должны каким-то образом превращаться в двойные спирали (рис. 20-20).

Репликация, вероятно, может начаться на любом конце молекулы, поскольку последовательности нуклеотидов на обоих концах идентичны и их отличие заключается только в разной полярности. Почему эти две концевые последовательности (около 100 пар оснований) тождественны,

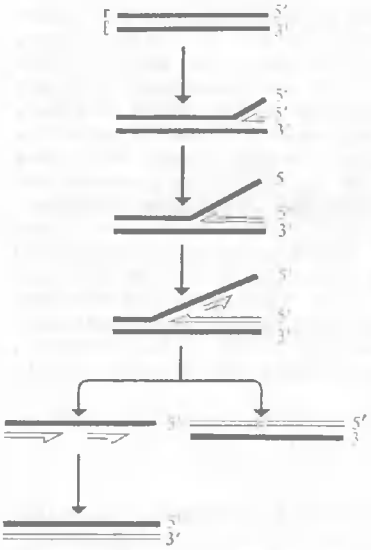


Рис. 20-20. Схема, показывающая временное образование одноцепочечных 5′-хвостов на начальной стадии репликации ДНК аденовируса.
На этом рисунке репликация идет только с левого конца, хотя вполне вероятно, что она начинается и справа.

Рис. 20-21. Электронная микрофотография кольцевой хромосомы аденовируса 2, выявляемой после разрушения инфекционных частиц щадящим способом. (С любезного разрешения д-ра Дэниэл, Лаборатория в Колд Спринг Харборе.) Под действием протеолитических ферментов кольцевая форма очищенной ДНК аденовируса превращается в линейную.

предстоит выяснить. Скорее всего они играют определенную роль при репликации ДНК, поскольку не существует аденовирусных мРНК, комплементарных к инвертированным последовательностям.

Высокоочищенные ДНК аденовирусов всегда имеют линейную форму; между тем ДНК из вирусных частиц, разрушенных щадящим способом, первоначально представляет собой кольцевые молекулы (рис. 20-21). Поскольку после обработки кольцевых комплексов протеолитическими ферментами образуются линейные молекулы, какие-то структурные белки вирусной частицы должны удерживать вместе концы линейной молекулы ДНК аденовируса. Кольцевые формы видны также в инфицированных клетках, из чего можно предположить, что кольцевая структура сама по себе может играть важную роль в репликации ДНК.

ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ НИКОГДА НЕ СОДЕРЖАТ ПОЛНОГО ГЕНОМА АДЕНОВИРУСА

Заражение аденовирусами клеток, в которых они не способны размножаться (непермиссивных), иногда приводит к образованию трансформированных клеток, образующих опухоли. Процесс трансформации в данном случае, так же как и под влиянием вируса SV40, является результатом включения генов аденовируса в хромосомы хозяина. Как он происходит, пока не ясно, известно лишь, что трансформированные клетки всегда содержат неполный вирусный геном. В нем отсутствуют строго определенные блоки генов — вероятно потому, что продолжение их функционирования в составе клеточной хромосомы немедленно привело бы к гибели клетки (к примеру, в результате полного выключения синтеза клеточных

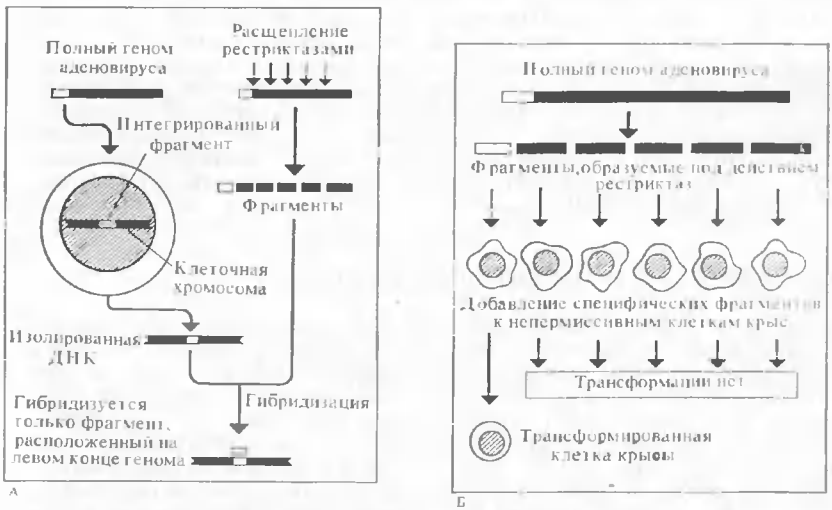


Рис. 20-22. Схема опытов, показавших, что только левый конец молекулы ДНК аденовируса участвует в клеточной трансформации. *А*. Присутствующая в трансформированных клетках аденовирус-специфическая ДНК образует гибриды только с фрагментами ДНК, расположенными на левом конце генетической карты. *Б*. Трансформировать непермиссивные клетки способен только фрагмент ДНК, расположенный на левом конце молекулы.

ДНК и РНК). Многие трансформированные клетки содержат половину вирусного генома, однако есть и такие, в которых представлено всего 4% полного генома. В этих случаях генетический материал аденовируса происходит исключительно из крайнего левого конца генетической карты и всегда содержит ранний ген, считанный с *l*-цепи (рис. 20-22).

В трансформированных клетках обнаруживаются большие количества мРНК, транскрибированной с этого раннего гена (генов), однако молекулярные свойства соответствующего ей белкового продукта (или продуктов) до сих пор еще недостаточно охарактеризованы. Его можно легко обнаружить иммунологически, поскольку все трансформированные аденовирусом клетки, так же как и клетки, подвергающиеся литической инфекции, содержат вирус-специфический Т-антиген — и в цитоплазме, и в ядре. Связывается ли он с ДНК, подобно Т-антигену вируса SV40, неизвестно. Поскольку Т-антиген аденовируса относительно стабилен, есть надежда получить его в ближайшее время в высокоочищенном виде — тогда можно будет приступить к выяснению того, каким образом его функционирование может превращать нормальную клетку в злокачественную.

КЛЕТКИ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ АДЕНОВИРУСОМ, ЛЕГКО ОТЛИЧИМЫ ОТ КЛЕТОК, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ВИРУСОМ SV40

Морфология клеток хомячка, трансформированных аденовирусами, всегда отличается от морфологии тех же клеток, трансформированных вирусом SV40 (полиомы). Большинство клеток, трансформированных аденовирусом, сохраняет округлую форму в течение всего клеточного цикла и напоминает сферические клетки, находящиеся в середине митоза (рис. 20-23). В клетках, трансформированных аденовирусом, почти не содержится волокон, подобных мышечным, и, вероятно, поэтому они не способны прикрепляться к твердым поверхностям и впоследствии принимать плоскую форму. В то же время клетки, трансформированные вирусом SV40, характеризуются менее плоской формой, чем их нормальные прототипы, и редко обнаруживают сходство с клетками, находящимися в митозе: в них на протяжении всего клеточного цикла содержится значительное количество организованных волокон, напоминающих мышечные. Поэтому можно думать, что развитие ракового фенотипа идет по нескольким биохимическим путям и что функция Т-антигена аденовируса отличается от функции Т-антигена вируса SV40 (полиомы).

ГЕРПЕСВИРУСЫ КАК ОНКОГЕННЫЕ АГЕНТЫ

Хотя теперь имеются веские доказательства участия ряда герпесвирусов в образовании определенных форм рака, только в течение последних нескольких лет были начаты серьезные исследования механизма их действия на молекулярном уровне. До последнего времени трудность экспериментов обусловливалась отсутствием систем клеточных культур, на которых можно было бы получать воспроизводимые данные по трансформации in vitro. Еще одним препятствием на пути к экспериментальному изучению этой проблемы была колоссальная сложность структуры герпесвирусов — всем было ясно, что здесь молекулярный подход будет во много раз более трудоемким, чем при работе с вирусом SV40 и аденоподобными вирусами.

Все герпесвирусы содержат одну линейную двухцепочечную молекулу ДНК с мол. весом $\sim 10^8$ (рис. 20-24). Герпесвирусы относятся к генетически наиболее сложным вирусам — число нуклеотидов в их ДНК доста-

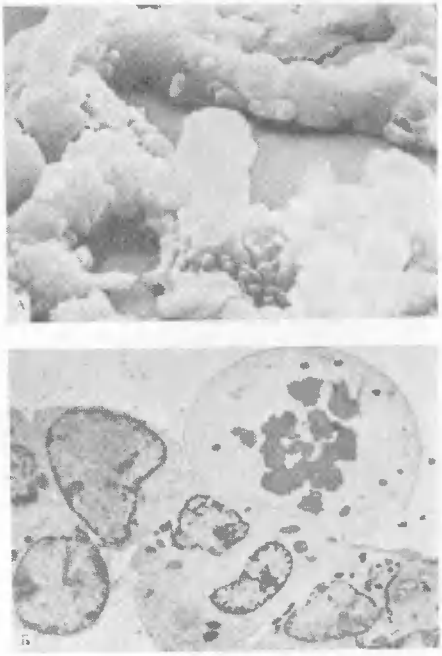


Рис. 20-23. *А*. Микрофотография трансформированных аденовирусом клеток хомячка, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. После митоза сферические клетки не отделяются друг от друга, а образуют скопления, в которых невозможно различить границы каждой отдельной клетки. *Б*. Электронная микрофотография тонкого среза через скопления трансформированных клеток. В верхней части скопления можно различить клетки в состоянии митоза (Goldman et al., Cold Spring Harbor Symp., XXXIX, 601, 1974).

точно для кодирования примерно 100 белков средней величины. Приблизительно 20 % генома используется для кодирования около 25 различных белков, участвующих в образовании центральной сердцевины, окружающего ее капсида и наружной липидсодержащей мембраны (рис. 15-1). Скорее всего бо́льшая часть остающегося генома кодирует огромное число специфических ферментов, необходимых для синтеза вирусной ДНК и белка. В частности, большинство герпесвирусов содержит ген, кодирующий вирус-специфическую тимидинкиназу. Следует отметить, что генетический анализ различных герпесвирусов только начался, и может пройти несколько лет, прежде чем удастся точно локализовать многочисленные гены в ДНК. Анализ их мРНК-продуктов тоже только начинается; поскольку существуют различия между ранними и поздними продуктами, для достоверного определения точных размеров и функций всего множества различных молекул мРНК герпесвирусов потребуется, вероятно, довольно много времени.

Чрезвычайная сложность геномов герпесвирусов означает, что молекулярный подход будет успешным только в том случае, если сосредоточить внимание на отдельных вирусах, не задаваясь целью охватить великое множество герпесвирусов, которые считают ответственными за развитие определенных видов рака у животных. В настоящее время складывается впечатление, что для экспериментов на молекулярном уровне будут использовать либо известную группу вирусов *Herpes simplex*, либо вирус Эпштейна — Барра, вызывающий инфекционный мононуклеоз и опухоль Беркитта, обнаруживаемую у детей в некоторых тропических странах.

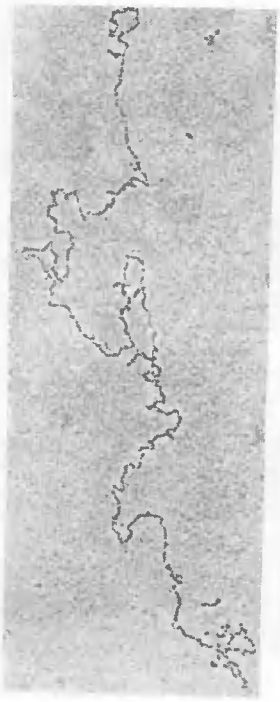


Рис. 20-24. Электронная микрофотография линейной одноцепочечной ДНК *Herpes simplex* (мол. вес ~ $45 \cdot 10^6$), обнаруженной после денатурации двухцепочечной формы (мол. вес ~ $90 \cdot 10^6$) (Sheldrick, Berthelot, Cold Spring Harbor Symp., **XXXIX**, 607, 1974).

ТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТКИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ИНАКТИВИРОВАННЫХ ГЕРПЕСВИРУСОВ

Вирусы группы *Herpes simplex* после заражения пермиссивной клетки претерпевают обычный литический цикл. В этом процессе ДНК инфицирующего вируса перемещается в ядро, в котором она сначала транскрибируется с образованием РНК, а затем реплицируется и дает начало большому числу дочерних молекул ДНК (рис. 20-25). Если, однако, инфекционную ДНК повредить, например УФ-облучением или расщеплением на мелкие фрагменты, процесс размножения вируса блокируется и большинство зараженных клеток продолжает нормальный рост. Небольшая часть клеток при этом трансформируется и приобретает способность образовывать опухоли (рис. 20-26). И в этом случае трансформация является результатом введения вирусного генетического материала в ДНК хромосом клетки-хозяина. Предварительные эксперименты дают основания предполагать, что большинство трансформированных клеток содержит только небольшую долю вирусного генома; ее локализация в хромосоме герпесвируса остается неизвестной. Последние опыты, однако, показывают, что фрагменты ДНК герпесвируса, образующиеся под действием рестриктаз, могут трансформировать и пермиссивные клетки; вероятно, вскоре мы узнаем, какая именно по положению и величине часть генома герпесвируса необходима для трансформации. Есть основания полагать, что так же, как и в случае виру-

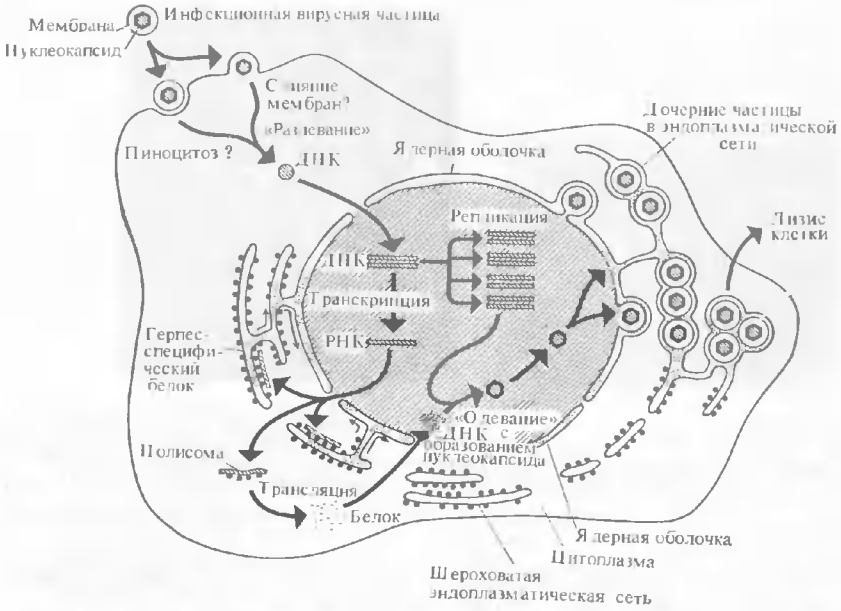


Рис. 20-25. Схематическое изображение процесса размножения вируса *Herpes simplex* в пермиссивной клетке.

са SV40 и аденовирусов, за раковое перерождение клетки ответственны только один или, может быть, несколько генов.

Еще не установлено, полный ли геном *Herpes simplex* встраивается в клеточную ДНК в виде провируса. У человека, однажды заразившегося вирусом герпеса (например, в виде «лихорадки»), вирусный геном, по-видимому, сохраняется неопределенно долго в латентном состоянии, из которого он может легко перейти в активное под влиянием внешних раздражителей, в частности под воздействием избыточного солнечного света. Однако неизвестно, характерно ли для латентного состояния включение ДНК герпесвируса в хромосомы хозяина (как в случае профага λ); различные предположения на этот счет существуют уже не одно десятилетие. Видимо, благодаря герпес-специфическому репрессору большинство интегрированных геномов герпесвирусов находятся в нефункциональном состоянии. Если это так, то клетки, содержащие полный геном *Herpes simplex*, должны иметь нормальный фенотип и раковое перерождение является результатом введения только неполных геномов, не блокируемых репрессором.

ВИРУС ЭПШТЕЙНА — БАРРА (ЭБ) И ЕГО СВЯЗЬ С ЛИМФОМОЙ БЕРКИТТА И МОНОНУКЛЕОЗОМ

Вирус ЭБ является широко распространенным представителем группы герпеса, которым инфицируется большинство людей в ранние периоды жизни, причем заражение не сопровождается никаким серьезным заболе-

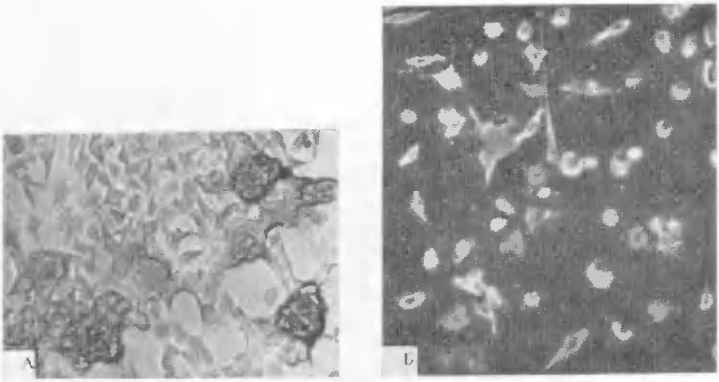


Рис. 20-26.
А. Очаги клеток эмбриона крысы, трансформированных фрагментами ДНК вируса простого герпеса (ВПГ). *Б*. Флуоресцирующие антитела свидетельствуют о присутствии в клетках крысы, трансформированных ВПГ, специфического антигена (антигенов) (Wilkie et al, Cold Spring Harbor Symp., XXXIX. 657, 1974).

ванием. Этот вирус лучше всего растет в клетках лимфоидной ткани и в соответствующих условиях (найти их пока не удалось) вызывает инфекционный мононуклеоз — заболевание, которое проходит за определенный срок само по себе и характеризуется избыточной пролиферацией лимфоидной ткани. Вероятно, этот вирус вызывает и лимфому Беркитта — рак лимфоидных клеток, встречающийся преимущественно среди населения тропических стран с влажным климатом. В то время как нормальные лимфоидные клетки не способны расти в перевиваемой культуре, от лимфоидных клеток, характерных для мононуклеоза или болезни Беркитта, легко получают непрерывные клеточные линии. Отличительное свойство клеток расти в культуре обусловлено тем, что в их состав входит в виде провируса одна (или несколько) копия полного генома вируса ЭБ. В какой форме эти геномы находятся в ядре — в виде свободных молекул ДНК или в виде провирусов, интегрированных с клеточной ДНК,— все еще остается неясным. Иногда провирусы ЭБ переходят в активное состояние и размножаются; в большинстве культур лимфоидных клеток содержится небольшой процент погибших клеток, внутри которых выявляются зрелые вирусные частицы ЭБ. Факторы, определяющие долю клеток, в которых размножается вирус ЭБ, все еще не выяснены; можно только сказать, что у многих штаммов в среде без аргинина или в присутствии галогенозамещенных пиримидинов, например 5-бромдезоксиуридина, процент клеток, содержащих вирус, значительно увеличивается.

Вирус ЭБ, выделенный из клеток Беркитта, по-видимому, идентичен вирусу, вызывающему мононуклеоз, однако почему один и тот же вирус приводит к развитию двух столь различных заболеваний, неясно. Есть основания полагать, что опухоль Беркитта встречается только у людей, зараженных одновременно малярийным плазмодием и вирусом ЭБ. Малярия может приглушать иммунную реакцию организма и тем самым подавлять реакцию Т-клеток, в норме разрушающих пролиферирующие клетки, характерные для мононуклеоза.

Вплоть до настоящего времени изучение вируса ЭБ на молекулярном уровне идет очень медленно: дело в том, что не удается найти такие клетки,

в которых этот вирус мог бы успешно размножаться сразу же после заражения. Всегда наблюдается только трансформирующая реакция. Когда вирус ЭБ добавляют к популяции малых лимфоцитов, находящихся в состоянии покоя, незначительная их часть увеличивается в размерах, начинает синтезировать ДНК и включается в непрерывные циклы клеточного деления. Следовательно, нет никаких сомнений в том, что присутствие генома вируса ЭБ обеспечивает трансформированным лимфоцитам неопределенно долгую жизнь. Но поскольку мы до сих пор не располагаем популяцией клеток, все представители которой продуцировали бы зрелые частицы вируса ЭБ, изучение размножения этого вируса на молекулярном уровне осложнено многими факторами методического порядка. Выяснился, однако, один важный факт. Все клетки, в которых есть геномы вируса ЭБ, содержат ядерный антиген, специфически связанный с хроматином. Вероятно, он нарушает общую схему транскрипции и потому может быть непосредственно связан с пролиферативной активностью клеток, несущих геномы вируса ЭБ.

РНК-СОДЕРЖАЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ ВИРУСЫ

В то время как ДНК-содержащие опухолевые вирусы существенно отличаются друг от друга по структуре, РНК-содержащие вирусы, обладающие способностью вызывать рак, морфологически сходны и, по-видимому, происходят от одного вируса-предшественника. Все они характеризуются более или менее сферической формой с диаметром около 1000 Å и построены по единому типу: содержащая липиды мембранная оболочка окружает РНК-содержащую сердцевину (рис. 20-27). Оболочка содержит фосфолипидные компоненты, типичные для плазматических мембран клеток, а также большое число вирус-специфических гликопротеидов двух типов, агрегаты которых выпячиваются на поверхности оболочки в виде бугорков. Сердцевина состоит из центрального РНК-содержащего нуклеоида, окруженного икосаэдрической белковой оболочкой, которая построена из капсомеров. Каждый из капсомеров (их примерно 390) образуется путем правильной агрегации нескольких вирус-специфических полипептидных цепей. Нуклеоид обычно плотно скручен внутри оболочки: его нитевидную форму можно увидеть только после осторожного разрушения вируса.

Таблица 20-1 Белки опухолевых РНК-содержащих вирусов птиц

Белок	Мол вес	Приблизительное число молекул на вирион	Локализация
gp70	70 000	600	Наружная оболочка
gp35	35 000	1500	То же
p27	27 000	4000	Сердцевина
p19	19 000	3600	»
p15	15 000	5500	» (?)
p12	12 000	6000	Нуклеоид
p10	10 000	< 1500	Сердцевина (?)

В нуклеоиде обнаружен лишь один из вирус-специфических белков. В оболочке же содержатся белки трех-четырех различных типов (табл. 20-1).

Было показано, что РНК-содержащие опухолевые вирусы вызывают рак у самых разных позвоночных животных. Однако лучше всего изучены

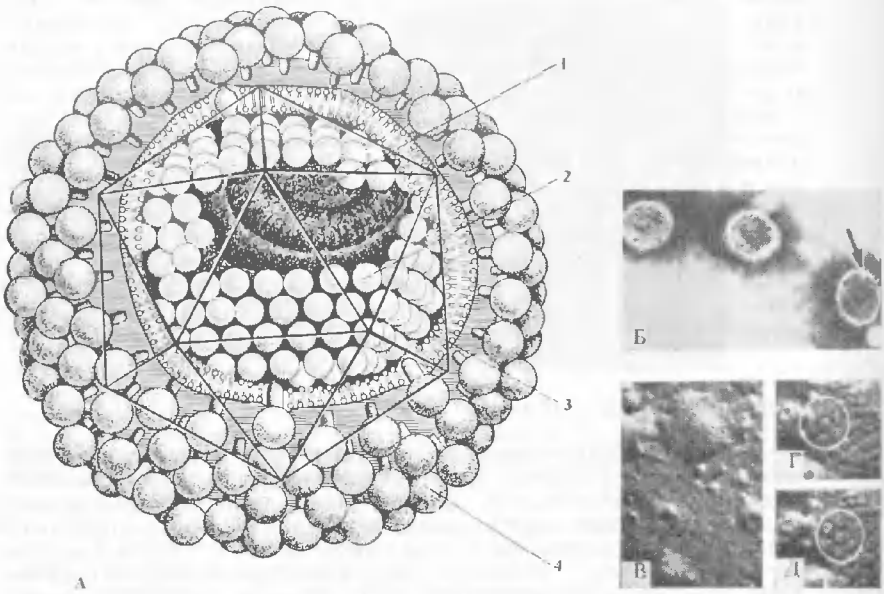


Рис. 20-27. *А*. Обобщенное схематическое изображение РНК-содержащего опухолевого вируса. У некоторых вирусов (например, у вируса опухоли молочной железы мыши) гликопротеидные бугорки (шипы) видны очень отчетливо, у других они плотно примыкают друг к другу и как отдельные тельца неразличимы. *1* — РНК-содержащей нуклеоид; *2* — белковые капсомеры икосаэдрической оболочки, окружающей нуклеоид; *3* — оболочка из двойного слоя липидов; *4* — гликопротеидные бугорки на поверхности мембраны.
Б. Электронная микрофотография вирусных частиц опухоли молочной железы мыши. Видны окрашенные фосфорновольфрамовой кислотой гликопротеидные бугорки (Sarker et al., Cancer Res., 55, 740, 1975). *В*. Электронная микрофотография разрушенных частиц вируса лейкоза Френд. Видна оболочка икосаэдрической формы, образуемая правильно уложенными крупными белковыми субъединицами (капсомерами). *Г*. Пентон, соседствующий с пятью субъединицами (обведен кружком), обнаруживаемый в вершинах белковой оболочки. *Д*. Гексон, соседствующий с шестью субъединицами (Nermut et al., Virology, 49, 345, 1972).

те, которые размножаются в организме кур (вирус саркомы Рауса) или мышей (вирус лейкоза Раушера и вирус опухоли молочной железы мышей). В целом результаты, полученные на одном вирусе, справедливы для всех других видов РНК-содержащих вирусов. Ниже мы в основном рассмотрим вирус саркомы Рауса (ВСР) и родственные ему вирусы, поскольку до настоящего времени они изучались наиболее интенсивно.

ОБОБЩЕННЫЙ ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ ВИРУСОВ

Жизненный цикл всех РНК-содержащих вирусов начинается с адсорбции инфекционной частицы на поверхности восприимчивой клетки-хозяина. Затем вирус проходит через наружную клеточную мембрану — обычно путем пиноцитоза; в результате частица, все еще остающаяся интактной,

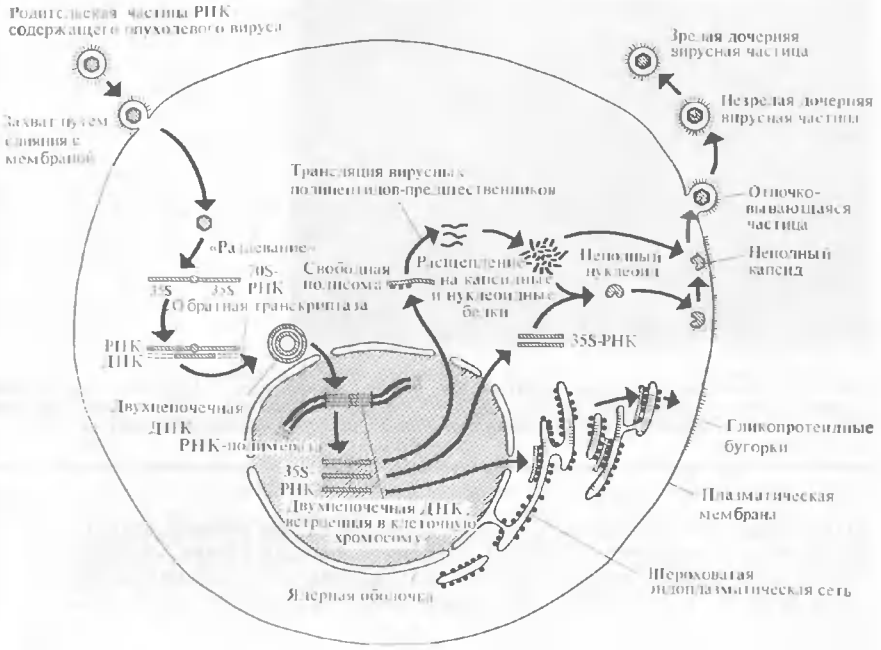


Рис. 20-28. Схема основных этапов репликации РНК-содержащего опухолевого вируса.

попадает в цитоплазму (рис. 20-28). Здесь РНК-геном после отделения его от оболочки начинает транскрибироваться с образованием комплементарной цепи ДНК при участии вирус-специфического фермента — обратной транскриптазы. В свою очередь одноцепочечная ДНК ферментативным путем превращается в кольцевую двухцепочечную ДНК-провирус. Провирус затем включается в хромосомную ДНК клетки-хозяина, скорее всего в результате рекомбинации, подобно тому как ДНК фага λ интегрирует с хромосомой *E. coli*.

После интеграции провирусная ДНК транскрибируется с образованием цепей РНК, большинство из которых служит вначале матрицами для синтеза вирус-специфических белков. По мере развития инфекции все большее число вновь синтезированных цепей РНК соединяется с новообразованными нуклеоидными и капсомерными белками — в результате формируются сердцевины, которые движутся к поверхности клетки. Здесь сердцевины окружаются участками наружной клеточной мембраны, в которые включены вирус-специфические гликопротеиды. Когда построение внешней оболочки завершается, новообразованные РНК-содержащие опухолевые вирусы отделяются от поверхности клетки в виде зрелых вирусных частиц.

Наиболее важен тот факт, что ни один из этапов размножения РНК-содержащего опухолевого вируса не связан с обязательным нарушением нормальных клеточных процессов. В отличие от размножения различных

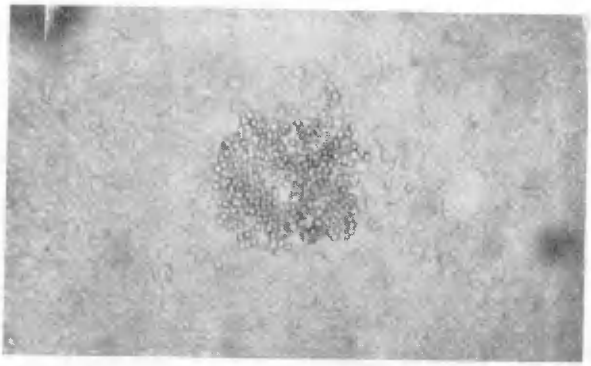


Рис. 20-29. Фотография группы (очага) клеток курицы, трансформированных вирусом саркомы Рауса; × 30. (Фото Рубина, Калифорнийский университет, Беркли.) Сферические трансформированные клетки легко различаются на фоне нормальных клеток.

ДНК-содержащих опухолевых вирусов в данном случае инфицированные клетки вовсе не обязательно должны погибнуть. Каждая клетка, зараженная опухолевым РНК-вирусом, по мере прохождения цикла деления может, таким образом, выделять со своей поверхности тысячи дочерних частиц.

ВЫДЕЛЕНИЕ МУТАНТОВ, СПОСОБНЫХ К РЕПРОДУКЦИИ, НО НЕ СПОСОБНЫХ ВЫЗЫВАТЬ ТРАНСФОРМАЦИЮ КЛЕТОК

Для трансформации восприимчивой здоровой клетки в раковую достаточно интеграции одного-единственного провируса. Этот переход происходит относительно быстро; например, в течение суток после заражения вирусом саркомы Рауса нормальные куриные фибробласты в культуре синхронно превращаются в округлые трансформированные клетки (рис. 20-29). Поэтому РНК-содержащие опухолевые вирусы служат идеальной модельной системой для изучения химических событий, лежащих в основе малигнизации клеток. Наиболее пригодными для этого анализа оказались температурочувствительные мутанты РНК-вирусов, не проявляющие трансформирующей активности при высокой температуре (около 39°С), но способные трансформировать клетки при более низких температурах (например, при 32°С). При высокой температуре такие мутанты нормально размножаются — у них утрачена лишь способность трансформировать клетки. Они все шире применяются для изучения трансформации, поскольку клетки, трансформированные такими мутантами, теряют признакиракового перерождения в течение нескольких часов после переноса из среды при 32°С в среду, имеющую температуру 39°С. И, наоборот, если температура меняется от 39 до 32° С, то нормально функционировавшие клетки приобретают раковые свойства. Такие температурные сдвиги не влияют на размножение опухолевого вируса: скорость его размножения не зависит от того, как ведет себя клетка — как нормальная или как раковая.

НЕРАЗРЕШЕННЫЙ ПАРАДОКС С 70S-ГЕНОМОМ

РНК-геном, выделенный из РНК-содержащей вирусной частицы, разрушенной щадящим методом, имеет константу седиментации 70S, что, по-видимому, соответствует мол. весу несколько более 10^7. Однако прямые определения мол. веса путем измерения длины контура с помощью электронного микроскопа показали, что мол. вес равен $\sim 6 \cdot 10^6$ (рис. 20-30). 70S-РНК должна быть, таким образом, более компактной, чем большинство молекул РНК, и поэтому она быстрее седиментирует. Нагревание молекулы 70S-РНК (рис. 20-30) до температур, при которых разрушаются водородные, но сохраняются ковалентные связи полинуклеотидного остова, приводит к образованию двух 35S-РНК, мол. вес каждой из которых равен $3 \cdot 10^6$ (рис. 20-30).

Естественно, возникает вопрос, все ли 35S-субъединицы имеют одинаковые последовательности или в каждой частице представлены две цепи с разными последовательностями. В настоящее время складывается впечатление, что все 35S-цепи характеризуются одинаковыми последовательностями оснований и что по абсолютно загадочным пока причинам каждая частица зрелого вируса содержит только две такие цепи.

Данные о том, что величина мол. веса основной единицы генома составляет $\sim 3 \cdot 10^6$ ($\sim 9 \cdot 10^3$ нуклеотидов, или информация примерно для 3000 аминокислот), означают, что разработка основ генетической организации опухолевых РНК-вирусов вряд ли представляет собой неразрешимую задачу. Суммарное значение молекулярных весов восьми известных полипептидов (7 структурных полипептидов + обратная транскриптаза) составляет около 300 000 (2700 аминокислот), что соответствует более чем 80 % аминокислот, информацию для которых может содержать вирусный геном. Следовательно, остается охарактеризовать, по всей видимости, всего лишь 1—3 вирус-специфических белка, и тогда станут известны все гены вируса. Достижению этой цели способствует легкость получения

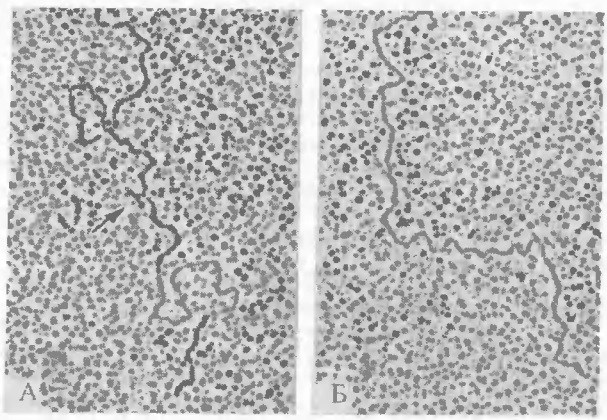


Рис. 20-30. Электронные микрофотографии РНК вируса лейкоза кошек (Kung et al., Cold Spring Harbor Symp., XXXIX, 827, 1974). *А*. 70S-молекула, в которой две 35S-цепи удерживаются вместе в области, отмеченной стрелкой. *Б*. 35S-цепь, образующаяся при нагревании 70S-молекул.

большого числа генетических мутантов. При смешанной инфекции наблюдается кроссинговер, скорее всего на стадии ДНК провируса. Можно надеяться, что в скором времени будет построена полная генетическая карта РНК-содержащего опухолевого вируса.

тРНК, ПРИКРЕПЛЕННАЯ К РНК-ГЕНОМУ

В каждой зрелой частице вируса саркомы Рауса обнаруживается значительное число молекул тРНК. Внутри частицы много разных видов тРНК, и, хотя некоторые из них могут быть в виде примесей случайно захвачены из клетки во время процесса почкования, более половины этих молекул прочно связано с комплексом 70S-РНК и освобождается только под действием веществ, разрушающих водородные связи, когда происходит разделение 70S-комплекса на две 35S-цепи. Вероятно, тРНК участвует в соединении двух 35S-цепей, причем на каждую 35S-цепь приходится 4—8 молекул тРНК. Ниже мы остановимся на другой возможной функции вирусной тРНК: в качестве затравки она способна инициировать синтез ДНК обратной транскриптазой.

ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ ЦЕПЕЙ ДНК ПОД ДЕЙСТВИЕМ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ

Каждая частица ВСР содержит от одной до нескольких копий фермента обратной транскриптазы. Этот кодируемый вирусом фермент (мол. вес $\sim$ 110 000) вначале катализирует образование цепей ДНК, комплементарной инфекционным РНК-геномам, а затем — превращение одноцепочечных ДНК в двухцепочечные. Открытие этого фермента явилось решающим шагом в понимании того, как вирус с РНК-геномом может сообщать стабильную генетическую информацию делящейся клетке. До того как стало известно о существовании обратной транскриптазы, считали, что в каждой трансформированной клетке имеется очень большое число свободных РНК-геномов. Если бы их число было незначительным, то можно было бы постоянно выделять нормальные клетки, которые вообще не содержат генома опухолевого вируса. Этот аргумент, однако, никогда не был достаточно убедительным, поскольку ингибиторы синтеза ДНК всегда блокируют синтез РНК опухолевого вируса, что само по себе необъяснимо, если синтез ДНК не является обязательным этапом образования опухоли. В противовес этому была выдвинута другая гипотеза, согласно которой генетическая информация, заключенная в инфекционном РНК-геноме, переносится на цепь ДНК во время процесса трансформации. Сначала, однако, эта точка зрения казалась крайне еретической, и только с открытием обратной транскриптазы существование ДНК на стадии провируса стало общепризнанным.

Вопрос о том, каким образом обратная транскриптаза катализирует образование начальной комплементарной ДНК (кДНК), все еще находится в стадии разрешения. Подобно другим ДНК-полимеразам, она не способна инициировать новые цепи ДНК, а может лишь добавлять дезоксинуклеотиды к коротким РНК-затравкам. Весьма неожиданным оказалось то, что затравками могут служить, по-видимому, некоторые молекулы тРНК, связанные с 70S-РНК. Рост большинства, если не всех, цепей ДНК начинается с присоединения нуклеотидов к 3′-концу $тРНК^{Три}$. Сколько молекул-затравок тРНК используется для образования кДНК для 35S-РНК, неизвестно. Можно лишь предположить, что, поскольку с каждой 35S-цепью связывается 1—2 молекулы $тРНК^{Три}$, в этом процессе участвует только одна молекула тРНК.

Еще не удалось установить, в какой момент РНК-затравка удаляется с 5′-концов; не знаем мы также и того, какие ферменты выполняют эту функцию. Ключом к разгадке могут послужить данные, согласно которым полипептид с мол. весом 110 000, проявляющий активность обратной транскриптазы, обладает также вторым активным центром, в котором катализируется расщепление РНК в гибридных молекулах РНК — ДНК. Однако далеко не ясно, каким образом такая активность позволяет удалять РНК-затравку.

КОЛЬЦЕВЫЕ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫЕ ПРОВИРУСЫ

Все еще пребывая в цитоплазме, образовавшиеся одноцепочечные молекулы кДНК превращаются в кольцевые двойные спирали. Каким образом это происходит, известно лишь отчасти. Мол. вес двухцепочечных структур составляет $6 \cdot 10^6$; следовательно, их непосредственными прешественниками являются ДНК, комплементарные РНК 35S-цепей, а не целого 70S-комплекса. В этом процессе опять-таки принимает участие обратная транскриптаза, но что служит затравкой — неизвестно. Мы не знаем также, как двойная спираль приобретает кольцевую форму, поскольку не располагаем данными о том, что одноцепочечные геномы 35S-РНК вообще способны принимать кольцевую конфигурацию.

После образования кольцевые провирусы направляются в ядро, где они включаются в хромосомы клетки-хозяина, причем это может происходить на любой из фаз клеточного цикла. По-видимому, для интеграции не обязателен синтез ДНК дочерней хромосомы. Очень возможно, что достаточно лишь присутствия ферментов, способствующих генетической рекомбинации. Вопрос о том, является ли один или несколько таких ферментов специфическими для ВСР, еще нуждается в выяснении, хотя высокая эффективность процесса позволяет предполагать, что он (они), возможно, кодируется вирусным геномом.

ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО ТРАНСФОРМАЦИИ ПРИ ПОМОЩИ ДНК, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ГИПОТЕЗУ О СУЩЕСТВОВАНИИ ДНК-ПРОВИРУСА

Само по себе существование фермента, превращающего РНК в ДНК, еще не доказывает, что образуемые при его участии ДНК-продукты включаются в дальнейшем в ДНК клеточных хромосом. Четкое доказательство того, что этот процесс действительно имеет место, получено в экспериментах, в которых ДНК, изолированную из хромосом клеток, трансформированных под действием ВСР, добавляли к нормальным фибробластам кур. После абсорбции ДНК некоторые из клеток не только оказывались трансформированными, но и начинали продуцировать дочерние частицы ВСР. Для образования полной частицы ВСР в клетку должна была попасть генетическая информация в виде провируса, интегрированного с клеточной ДНК. Если ДНК из нормальных клеток добавлять к другим нормальным клеткам, то трансформации не происходит. По-видимому, как для передачи способности продуцировать активный дочерний вирус, так и для развития ракового фенотипа требуются молекулы ДНК таких размеров, которые могут заключать в себе полный вирусный геном. Последнее требование в отношении ракового фенотипа несколько странно, поскольку неясно, почему для осуществления трансформации необходима бо́льшая часть генома ВСР.

ТРАНСКРИПЦИЯ ДНК ПРОВИРУСА

После интеграции ДНК в виде провируса транскрибируется РНК-полимеразой II эукариотов — ферментом, ответственным за синтез клеточной РНК. По сравнению с другими генетическими ДНК провирусная ДНК транскрибируется предпочтительно, причем около 1 % всей клеточной мРНК является BCP-специфической. Таким образом, исследовать эти транскрипты относительно легко. Большинство из них имеют константу седиментации 35S и представляют собой скорее всего полные транскрипты провируса BCP. Другие транскрипты имеют константу седиментации 20S и являются, возможно, частичными транскриптами. Однако до последнего времени еще никому не удалось показать, есть ли в 35S- и 20S-РНК общие нуклеотидные последовательности.

Сначала бóльшая часть транскриптов связывается с рибосомами и направляет синтез BCP-специфического белка. Все еще остается неясным, каким образом сердцевинные белки BCP освобождаются в цитоплазму, а два мембранных белка BCP внедряются исключительно в мембрану эндоплазматической сети. Наиболее простым объяснением явилось бы существование двух различных транскриптов. Один из них прикрепляется к рибосомам, связанным с мембраной, и играет роль матрицы для белков BCP, обнаруживаемых во внешней оболочке. Второй транскрипт, который должен связываться исключительно со свободными рибосомами, кодирует при этом все внутренние белки. Однако доказательств существования двух подобных транскриптов нет. Предварительные эксперименты показывают, что BCP-специфические транскрипты с константами седиментации 35S и 20S прикреплены как к связанным с мембранами, так и к свободным рибосомам. Правда, следует обратить внимание на то, что в этих экспериментах могло проявиться действие примесей рибонуклеаз; не исключено, что в последующем будут получены принципиально иные результаты.

СЕРДЦЕВИННЫЕ СТРУКТУРНЫЕ БЕЛКИ ОБРАЗУЮТСЯ ИЗ ОБЩЕГО ПОЛИПЕПТИДНОГО ПРЕДШЕСТВЕННИКА

Пять сердцевинных белков BCP не синтезируются в виде отдельных белков, а сначала являются частью большого полипептидного предшественника, который под действием протеаз быстро расщепляется на белки тех размеров, которые характерны для зрелой частицы вируса. Убедительных данных в пользу существования еще более крупного предшественника, расщепление которого приводило бы к образованию и поверхностных гликопротеидов, и сердцевинных белков, получить не удалось. Каждая мРНК BCP может иметь по крайней мере два независимых участка инициации (связывания рибосом) и терминации: один для синтеза предшественника сердцевинных полипептидов и один или более для синтеза гликопротеидов оболочки. Если это так, то РНК BCP в таком случае должна напоминать скорее бактериальную, чем эукариотическую мРНК. Безусловно, для понимания молекулярных механизмов транскрипции и трансляции в опухолевых РНК-вирусах нужны дальнейшие исследования.

ПРЕВРАЩЕНИЕ 35S-РНК В 70S-РНК ВНУТРИ ПОЧКУЮЩИХСЯ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ

После внедрения в клеточную мембрану вирусные гликопротеиды начинают агрегировать. Белки клеточной мембраны вытесняются из этих агрегатов, что приводит к образованию обширных мембранных бляшек (patches), в которых все белковые компоненты являются вирус-специфи-

ческими (рис. 20-28). Эти бляшки обладают высоким сродством к РНК-содержащим сердцевинам, формирующимся в процессе сборки, и быстро окружают их, заключая в вирус-специфическую оболочку. Зрелые вирусные частицы образуются, таким образом, в результате отпочковывания от клеточных мембран. Обычно большинство частиц отпочковывается от наружной плазматической мембраны, а часть почкуется во внутренние полости эндоплазматической сети. Когда начинается почкование, геномная РНК все еще существует в виде отдельных 35S-цепей. Однако по мере появления зрелых форм 35S-цепи соединяются вместе и образуют 70S-комплекс.

ТРАНСФОРМАЦИЯ В ОТСУТСТВИЕ РАЗМНОЖЕНИЯ ВИРУСА

В течение нескольких лет изменения, вызываемые на клеточной поверхности отпочковыванием дочерних вирусных частиц, рассматривались как возможный механизм образования рака под влиянием РНК-содержащих вирусов. Но сейчас накоплено много примеров, показывающих, что РНК-содержащие вирусы могут вызывать трансформацию и при этом не размножаются. Часто это происходит при заражении чужеродных клеток. Например, частицы ВСР никогда не отпочковываются от трансформированных этим вирусом клеток крысы, несмотря на интеграцию полного генома ВСР. Трансформация, не сопровождающаяся размножением, наблюдается также при заражении клеток кур при температуре 39° С некоторыми температурочувствительными мутантами ВСР, неспособными размножаться при этой температуре. В данном случае образуется очень незначительное количество структурных белков вируса или они вообще не образуются. Подобные результаты ставят под сомнение гипотезу о том, что внедрение специфического белка ВСР в клеточные мембраны является причиной вызываемого ВСР рака.

НЕКОТОРЫЕ МУТАНТЫ НОРМАЛЬНО РАЗМНОЖАЮТСЯ, НО НЕ СПОСОБНЫ ТРАНСФОРМИРОВАТЬ КЛЕТКИ

При размножении ВСР возникают мутанты, которые полностью утрачивают способность трансформировать клетки, но при этом размножаются нормально. Многие из этих мутантов возникают в результате делеций. Выяснилось, что при делециях всегда утрачивается определенный участок генома дикого типа. Этот трансформирующий участок, или онкоген (раковый ген), составляет около 15% генома дикого типа и, следовательно, обладает способностью кодировать 450 аминокислот. И в этом случае картина опять-таки существенно отличается от того, что известно для ДНК-содержащих опухолевых вирусов, в которых вирусные гены, необходимые для трансформации, играют, по-видимому, незаменимую роль в размножении вируса. Изучение размножения РНК-содержащих опухолевых вирусов само по себе вовсе не обязательно должно пролить свет на возникновение рака в их присутствии. Для того чтобы решить эту проблему, необходимо сконцентрировать внимание на том конкретном генетическом материале, который присутствует в трансформирующих вирусах и отсутствует в вирусах, неспособных трансформировать клетки.

Один из подходов идентификации онкогена состоит в использовании обратной транскриптазы для получения кДНК (рис. 20-31), которая поможет специфически выявить онкогенный участок. Такую же кДНК можно в дальнейшем использовать для того, чтобы показать, присутствуют ли невыражающиеся онкогеноподобные последовательности ДНК в нормаль-

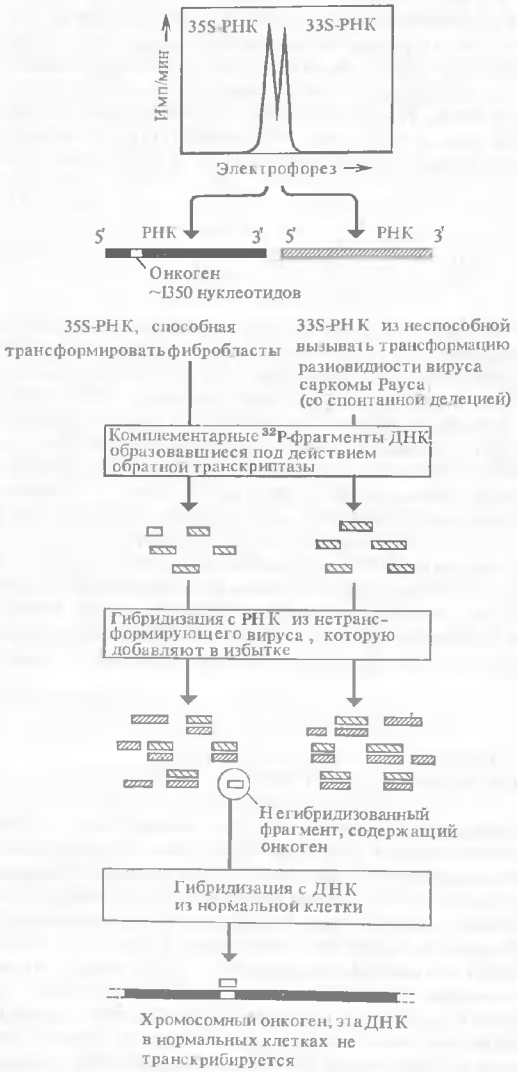


Рис. 20-31. Использование обратной транскриптазы для получения комплементарных ДНК, специфичных в отношении онкогенов.

ных клетках. Очень важны данные последних экспериментов, показавших, что онкогеноподобные последовательности ДНК, по-видимому, присутствуют во все клетках — и нормальных, и трансформированных. Онкогены нормальных клеток, однако, не транскрибируются в отличие от патологических клеток, в которых они проявляют очень высокую активность.

Таким образом, все больше данных свидетельствует о том, что онкогенность многих, если не всех, РНК-содержащих опухолевых вирусов

является результатом случайного приобретения ими одного или нескольких «нормальных» генов клетки-хозяина. Следовательно, онкоген может быть геном клетки-хозяина, функционирование которого после внедрения (трансдукции) в вирусный геном перестает зависеть от эффективных механизмов контроля.

Сейчас мы можем лишь строить догадки о биохимической роли этих потенциально онкогенных нормальных генов. Ключом к разгадке могут стать последние данные о том, что трансформация под влиянием ВСР вызывает синтез гемоглобиновой мРНК в куриных фибробластах. Напротив, нетрансформированные клетки в той же культуре не стимулируют синтеза гемоглобиновой мРНК. Интересно, что при этом повышается содержание только мРНК, характерных для раннего периода жизни (мРНК гемоглобина плода). Стимуляции синтеза гемоглобиновой мРНК взрослых животных не происходит. Отсюда следует, что онкогенным «партнером» ВСР может быть ген хозяина (курицы), участвующий во включении большого набора генов, обычно функционирующих только во время эмбрионального развития.

ОПУХОЛЕВЫЕ ВИРУСОПОДОБНЫЕ РНК-ГЕНОМЫ КАК НОРМАЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ КЛЕТКИ

Все клетки позвоночных, по-видимому, содержат от одного до нескольких латентных опухолевых вирусоподобных РНК-геномов, интегрированных с их хромосомами. Эти геномы обычно транскрибируются с очень низкой скоростью, и только изредка от соответствующих поверхностей клеток отпочковываются вирусные частицы. В норме дочерние частицы не способны размножаться в клетках того вида животных, в которых они продуцируются. Напротив, они часто весьма эффективно размножаются в клетках животных других видов. Например, латентный вирус кошек в норме не может размножаться в клетках кошки, но в клетках человека растет очень хорошо. Неспособность эндогенных вирусов размножаться в клетках, где они сформировались, возможно, обусловлена присутствием молекул типа репрессоров, которые специфически ингибируют активность эндогенных геномов, но не могут блокировать выражение чужеродных геномов, так как в норме они не подвергаются их воздействию.

Выражение некоторых эндогенных провирусных геномов значительно усиливается, если соответствующие клетки-хозяева выращивать в присутствии галогензамещенных пиримидинов. Каким-то образом включение бромдезоксиуридина или иоддезоксиуридина в клеточную (провирусную?) ДНК сводит к нулю нормальный контроль транскрипции провируса, что приводит к репродукции большого числа зрелых вирусных частиц. Другие эндогенные провирусы активируются, если действовать на клетки определенными стероидными гормонами. Например, обработка эстрогенами значительно увеличивает число РНК-содержащих опухолевых вирусоподобных частиц, присутствующих в клетках матки. В стимулированной гормонами ткани плаценты также обнаруживается множество РНК-содержащих частиц, похожих на опухолевые вирусы.

В отличие от ВСР или вируса лейкоза Раушера эндогенные опухолеподобные РНК-вирусы не являются истинно опухолевыми. Хотя они очень хорошо размножаются в чужеродных клетках, их вирусные частицы, как правило, не вызывают трансформации и не содержат онкогенов. Возникновения рака (обычно лейкоза) можно добиться только если вводить восприимчивым животным колоссальное число частиц вируса. Следовательно, лейкоз или другую форму рака может вызвать лишь крайне редкий вариант вируса, в который случайно включились клеточные гены. Поэтому возникает вопрос, является ли большинство нормальных эндо-

Рис. 20-32. Выявление гликопротеида эндогенного РНК-содержащего вируса в цилиндрических клетках эпидидимиса новозеландской мыши. (С любезного разрешения д-ра Лемера, д-ра Дельвилано и д-ра Вильсона, Клиника Скриппса, Ла Джолла, Калифорния.) Выявление методом иммунофлуоресцентной микроскопии; кольца флуоресценции очерчивают границы срезов через извитой семявыносящий проток.

генных провирусов «партнером» без функции или они необходимы на какой-то стадии нормального существования клетки. Поскольку практически все известные клетки позвоночных содержат эндогенные провирусы, напрашивается предположение, что они не могут обходиться без провирусов, и, следовательно, нам нужно активно заняться поиском роли провирусов в нормальной функции клетки.

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ВЫРАЖЕНИЕ ЭНДОГЕННЫХ ГЕНОМОВ ВО ВРЕМЯ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

Уже имеются убедительные доказательства, что эндогенные вирусные геномы кодируют специфический поверхностный антиген, обнаруживаемый у мышей во время эмбрионального развития. Главный поверхностный белок тимоцитов мышей (G_{TX}) оказался идентичным гликопротеиду gp70, кодируемому одним из эндогенных вирусных РНК-геномов. Он впервые был обнаружен в кроветворных клетках печени на 14-й день развития. На 18-й день его выражение достигает уровня, характерного для взрослого организма. Этот белок обычно встречается в некоторых лимфоидных тканях взрослых организмов, а также в эпидидимисе (рис. 20-32) и на поверхности сперматозоидов. Итак, мы считаем сейчас, что выражение этого эндогенного вирусного РНК-генома строго регулируется во время дифференцировки и развития. Остается загадкой вопрос о том, почему эти поверхностные компоненты должны кодироваться геномом, обладающим способностью к независимой саморепликации.

ПОИСК ОПУХОЛЕВЫХ ВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА

Коль скоро множество различных раковых заболеваний птиц и грызунов имеет вирусную этиологию, было вполне обоснованно предположить, что многие раковые заболевания человека также обусловлены вирусами. Поэтому за последнее десятилетие были предприняты попытки устано-

вить связь между основными раковыми заболеваниями человека и определенными вирусами. В целом эти эксперименты ни к чему не привели, и вопрос о вирусной природе большинства раковых заболеваний человека все еще остается открытым. Сначала казалось резонным искать в клетках опухоли зрелые вирусы. Теперь мы, однако, уже достаточно, много знаем о ДНК-содержащих опухолевых вирусах, и в частности то, что их размножение всегда приводит к гибели клеток-хозяев. Таким образом, отсутствие ДНК-содержащих частиц само по себе ничего не говорит о возможной вирусной этиологии рака. Ее можно попытаться установить косвенными путями, например путем поиска вирус-специфических опухолевых антигенов или вирус-специфической ДНК или РНК.

Хотя размножение РНК-содержащих опухолевых вирусов не приводит к гибели клеток-хозяев, электронно-микроскопическое изучение РНК-содержащих опухолевых вирусов человека осложняется тем, что клетки человека содержат и неопухолевые эндогенные РНК-содержащие вирусы, морфологически тождественные вирусам, вызывающим рак. Таким образом, обнаружение в раковой клетке большого числа РНК-содержащих частиц, подобных частицам опухолевого вируса, может означать, что при раковом поражении индуцируется выражение эндогенного вирусного генома. И наоборот, если не наблюдается РНК-содержащих опухолевых вирусов, это не исключает того, что опухоль обусловлена РНК-содержащим вирусом, поскольку нам известно много модельных систем, в которых РНК-содержащие вирусы при инфицировании чужеродной клетки трансформируют ее, но не размножаются. Следовательно, вполне вероятно, что многие виды рака человека возникают в результате инфицирования РНК-содержащими вирусами, которые у других видов животных в норме размножаются, но рака не вызывают. Единственный вывод, который вытекает из сказанного, состоит в том, что чем больше мы узнаем о модельных системах опухолевых вирусов, тем более изощренными должны становиться методы установления вирусной этиологии рака человека.

ИЗУЧЕНИЕ РАКА НА МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ

Абсолютно ясно, что между изучением опухолевых вирусов на молекулярном уровне и прикладными исследованиями, в которых делается попытка понять биохимическую сущность раковых клеток, все еще пролегает безграничная пропасть. С одной стороны, существует много причин (правда, скорее всего косвенных) считать, что обусловливающие рак гены (онкогены) опухолевых вирусов вызывают рак совершенно различными путями. Хотя все онкогены способны каким-то образом активировать репрессированные участки клеточного хроматина, все же нет оснований считать, что все опухолевые вирусы включают в действие одни и те же неактивные гены хозяина. С другой стороны, большинство злокачественных клеток, которые обладают способностью разрастаться в солидные опухоли (например, карциномы и саркомы), по-видимому, имеют общее свойство секретировать аномально большое количество определенных протеолитических ферментов. Характерно, что из соответствующих клеток хозяина выделяются одни и те же специфические протеазы независимо от того, обусловлена ли трансформацин ДНК-содержащим или РНК-содержащим опухолевым вирусом. Более того, эксперименты, проведенные с температурочувствительными мутантами, показывают, что освобождение протеаз зависит от продолжительности функционирования онкогенов опухолевого вируса, и, следовательно, онкогенную функцию и освобождение протеаз должна связывать какая-то прямая цепь событий. Однако в настоящее время трудно сказать, достаточно ли

для выявления этиологии рака изучить лишь несколько биохимических этапов, участвующих в этой цепи, или нам следует сначала исследовать в мельчайших подробностях биохимию эукариотов.

Итак, мы пришли к тому же, о чем уже говорили в заключительных разделах глав, касающихся вопросов эмбриологии и иммунологии. Дело не в том, насколько умны наши рассуждения или насколько щедро мы тратим огромные суммы денег на «ударные» программы, а в том, что присущая клеткам эукариотов сложность все еще превышает возможности нашего интеллекта. Вот почему так часто мы должны удовлетворяться скромными целями. Этот трезвый итог, однако, не должен заслонить того факта, что изучение опухолевых вирусов стало почти точной наукой, и мы вправе ожидать непрерывного и стремительного, если не сенсационного, прогресса в последующие одно-два десятилетия.

ВЫВОДЫ

Раковой называется такая клетка, которая утратила способность контролировать рост и деление. Она делится там и тогда, где и когда она делиться не должна, и в результате такого дезорганизованного роста в организме хозяина появляются опухоли. Существуют две основные гипотезы о происхождении раковых клеток — обе они по сути генетические. Согласно одной из них, возникновение раковых клеток происходит за счет накопления соматических мутаций, причем результатом прогрессирующей серии мутаций являются предельно выраженные раковые фенотипы. Согласно другой гипотезе, большинство злокачественных новообразований появляется в результате внедрения нового генетического материала при инфицировании нормальных клеток опухолевыми вирусами. Сейчас мы считаем, что ни то, ни другое из этих двух объяснений не раскрывает сущности всех раковых заболеваний и что некоторые формы рака возникают скорее всего благодаря соматическим мутациям, в то время как другие являются следствием заражения опухолевыми вирусами.

Большинство (если не все) соматических мутаций, приводящих к раку, возникает в результате присутствия в окружающей среде канцерогенов. Воздействие ультрафиолетовых лучей, например, приводит к образованию раковых клеток вследствие генетических изменений в клеточной ДНК. Канцерогенные углеводороды, такие, как бензпирен, становятся мощными мутагенами после преобразования их под действием ферментов печени—арилгидроксилаз. Подобным же образом нитраты, сами по себе не обладающие мутагенными свойствами, после превращения в нитриты могут реагировать с множеством вторичных аминов с образованием высокомутагенных нитрозаминов. Тот факт, что все эти канцерогены являются мутагенами, говорит о том, что к раковому фенотипу могут приводить мутации самых разных генов.

Раковая клетка, появляясь в организме животного, не обязательно вызывает образование опухоли. Большая часть этих клеток разрушается под влиянием иммунных реакций, обусловленных клеточными антителами (иммунный надзор). Эти иммунные реакции направлены против опухолеспецифических антигенов, локализующихся на поверхности раковой клетки. Несомненно, что переход к раковому состоянию почти всегда приводит к радикальной перестройке внешней поверхности клетки, в результате чего возникают новые поверхностные конфигурации, распознающиеся иммунной системой хозяина как чужеродные. Почему отдельная раковая клетка при каких-то обстоятельствах выходит из-под контроля и разрастается в опухоль, совершенно неясно. В любом случае онкогенность данной опухолевой клетки лучше всего определяется при введении ее в организм животного с нарушенной иммунной системой.

Рак могут вызывать вирусы многих типов. ДНК-содержащие вирусы представляют собой очень гетерогенное семейство, в которое входят и очень мелкие вирусы группы папова, и крупные вирусы из группы герпеса и оспы. Простейшие ДНК-содержащие вирусы, вызывающие рак, принадлежат к группе папова — это вирус SV40 (обезьяний) и вирус полиомы (мышиный). Оба эти вируса имеют мол. вес $\sim 25 \cdot 10^6$ и содержат одноцепочечные кольцевые молекулы ДНК с мол. весом $\sim 3 \cdot 10^6$, которые могут кодировать всего три гена. Жизненный цикл каждого из этих вирусов подразделяется на раннюю и позднюю стадии. Во время ранней стадии образуется ранняя мРНК, которая кодирует Т-антиген (опухолевый) — белок, локализующийся в ядре, где он предпочтительно связывается с ДНК вируса SV40 (или вируса полиомы) в месте инициации синтеза ДНК. Каким образом функционирует Т-антиген, неизвестно, однако, согласно наиболее правдоподобному предположению, он участвует в инициации синтеза вирусной ДНК. Он способствует также синтезу поздней мРНК вируса SV40 (или полиомы), которая кодирует два структурных вирусных белка — VP1 и VP2.

Когда вирус SV40 (или полиомы) инфицирует восприимчивую (пермиссивную) клетку, он размножается в ней и вызывает лизис клетки. Однако, когда тот же вирус инфицирует непермиссивную клетку, развивается абортивная инфекция, при которой синтезируются только ранняя мРНК и Т-антиген (и вирусная ДНК?). Очень небольшая часть клеток с абортивной инфекцией трансформируется в раковые. Трансформация происходит в результате включения интактных вирусных геномов (провирусов) в специфические клеточные хромосомы, вероятнее всего путем кроссинговера, как в случае фага λ. При внедрении в клеточную хромосому синтезируется Т-антиген, а белки VP1 или VP2 не продуцируются. Таким образом, специфическим продуктом гена, приводящим к развитию ракового фенотипа, является Т-антиген. Скорее всего Т-антиген включает транскрипцию различных наборов генов, функции которых у взрослых животных в норме блокированы. Слияние непермиссивной клетки, трансформированной вирусом SV40, с нормальной пермиссивной клеткой приводит к тому, что трансформированное ядро начинает продуцировать дочерние частицы вируса SV40. Возможно, непермиссивные для вируса SV40 клетки не способны транслировать позднюю мРНК вируса SV40.

Аденовирусы также вызывают рак путем внедрения вирусных генов в хромосомы хозяина. Эти значительно более крупные, чем паповавирусы, ДНК-содержащие вирусы имеют линейные молекулы ДНК с мол. весом $\sim 25 \cdot 10^6$. Их жизненный цикл также разделяется на раннюю и позднюю стадии — в инфицированных пермиссивных клетках образуется примерно 4 вида ранней и 5 (или 6) видов поздней мРНК. Трансформация происходит в результате включения небольшой части генома аденовируса в хромосому непермиссивной клетки, причем включается только левый конец (около 7%) хромосомы аденовируса; это свидетельствует о том, что при развитии ракового фенотипа функционируют только один-два ранних гена.

Трансформация под влиянием герпесвирусов выяснена в значительно меньшей степени. Показано, что для нее необходима только часть их ДНК-геномов, но в каком месте вирусной ДНК она расположена, неизвестно. Наличие интактной хромосомы герпесвируса не обязательно приводит к гибели клетки-хозяина, но поскольку клетки, трансформированные герпесвирусом, иногда обладают способностью инициировать цикл размножения вируса, при котором происходит продукция большого числа дочерних вирусов, в конечном счете соответствующие клетки гибнут.

Все РНК-содержащие опухолевые вирусы имеют в сущности одинаковую структуру: они содержат центральную РНК-содержащую сердце-

вину, окруженную наружной липидной мембраной, в которую внедрены вирус-специфические гликопротеиды. В зрелой вирусной частице РНК представлена 70 S-молекулами с мол. весом ~60·10⁶. Каждая 70S-молекула составлена из двух идентичных 35S-цепей (приблизительно 9000 нуклеотидов), удерживаемых вместе водородными связями. После проникновения вирусной частицы в цитоплазму восприимчивой пермиссивной клетки происходит отделение части белков от генома 70S-РНК. Затем 70S-РНК служит матрицей для синтеза кДНК с участием обратной транскриптазы, несколько копий которой имеется в каждой вирусной частице. В свою очередь кДНК служит матрицей для синтеза комплементарной цепи, становится кольцевой и внедряется в результате кроссинговера в клеточную хромосому в виде линейной молекулы. Интегрированная ДНК провируса последовательно транскрибируется с образованием вирус-специфических цепей 35S-РНК, которые служат матрицами для различных вирус-специфических белков. Дочерний вирус образуется затем путем почкования от клеточной мембраны.

Существуют вирусные мутанты, которые нормально размножаются, но утратили способность трансформировать клетки. Эти мутанты часто возникают в результате делеции гена (онкогена), который кодирует белок, ответственный за раковый фенотип. Онкогены РНК-содержащих опухолевых вирусов, по-видимому, возникают благодаря генетическим перестройкам, при которых происходит включение (перенос) генов, управляющих ключевыми процессами клеточного контроля, в геномы эндогенных РНК-содержащих вирусов, обнаруживаемых в норме во всех клетках позвоночных. В норме эти эндогенные вирусные геномы не образуют дочерних частиц. Вместе с тем при некоторых специфических условиях (например, под действием гормонов) они транскрибируются, и в результате от плазматической мембраны отпочковываются вирусные частицы. Обычно эти частицы не размножаются в клетках, из которых они высвободились. Однако они часто размножаются в чужеродных клетках. Истинная роль этих эндогенных геномов в клетке неясна, известно лишь, что некоторые из них избирательно функционируют в некоторых дифференцированных клетках, кодируя специфические поверхностные гликопротеиды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Burnet F. M., Cancer: Biological Approach. I. Processes of Control, Brit. Med. J., **1**, 779 (1957). Прекрасная работа, описывающая сложности проблемы рака и рассматривающая последствия соматической мутации.

Suss R., Kingel F., Scribner J. D., Cancer: Experiments and Concepts, Springer Verlag, 1973. Описание исследований в области рака, отличающееся широким охватом проблемы и высоким качеством изложения.

Klein G., Bregula U., Wiener F., Harris H., The Analysis of Malignancy by Cell Fusion, J. Cell Sci., 8, 659 (1971). Эксперименты, в которых показано, что злокачественность опухолевых клеток подавляется при их слиянии с нормальными.

Burnet F. M., Immunological Surveillance, Pergamon Press, 1970. (Ф. Бернет, Клеточная иммунология, изд-во «Мир», М., 1971.) Полупопулярное издание, посвященное контролю злокачественного роста реакциями клеточного иммунитета.

Cross L., Oncogenic Viruses, 2nd ed., Pergamon Press, 1970. Несколько устаревшая, но благодаря исключительной полноте до сих пор не утратившая своего значения книга о ранних этапах в исследовании опухолевых вирусов.

Tooze J., The Molecular Biology of Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, 1973. Введение в современные исследования опухолевых вирусов с позиции молекулярного биолога.

Fenner F., McAuslan B. R., Mims C. D., Sambrook J., White D. O., The Biology of Animal Viruses, Academic Press, 1974. (Ф. Феннер, Б. Мак-Ослен, С. Мимс, Дж. Сэмбрук, Д. Уайт, Биология вирусов животных, т. 1, 2, изд-во «Мир», М., 1977.) Обширная монография, затрагивающая практически все аспекты размножения вирусов животных. Несколько глав посвящено специально опухолевым вирусам.

RNA Viruses and Host Genome in Oncogenesis, P. Emmelot and P. Bentvelzen, North-Holland, Amsterdam, 1972. Статьи конференции по РНК-содержащим опухолевым вирусам.

Temin H. M., RNA-Directed DNA Synthesis, Scientific American, 1972. Опыты, в которых был открыт и доказан перенос информации с РНК на ДНК.

Selected Papers in Tumor Virology, J. Tooze and J. Sambrook (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, 1974. Большой сборник оригинальных статей, посвященных молекулярным подходам в вирусологии опухолей.

The Herpes Viruses, A. Kaplan (ed.), Academic Press, 1973. Полезный сборник обзорных статей.

Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, XXXIX, 1974. 137 различных статей, дающих представление о состоянии исследований по вирусологии опухолей к июню 1974 г.

Cancer, F. F. Backer (ed.), Plenum Press, 1975. Обзорная серия в четырех томах, содержащая много данных по опухолевым вирусам и мутагенезу.

Ames B. N., Kommen H. O., Yamsaki E., Hair Dyes are Mutagenic: Identification of a Variety of Mutagenic Ingredients, Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 2423 (1975).

Fraenkel-Conrat H., Wagner R. R., Comprehensive Virology, Plenum Press, 1974. Подробное многотомное руководство, в котором имеется обширная информация по опухолевым вирусам.

Словарь терминов

Адапторные молекулы. Небольшие молекулы РНК (тРНК), с помощью которых в процессе белкового синтеза аминокислоты выстраиваются в порядке, определяемом матричной молекулой мРНК. Каждая молекула тРНК специфична по отношению к определенной аминокислоте и к определенному кодону матрицы.

Аденилатциклаза. Фермент, катализирующий образование циклического АМФ и АТФ.

Аденовирусы. Вирусы животных, частицы которых (их диаметр равен ~80 нм) содержат линейную двухцепочечную молекулу ДНК, окруженную белковой оболочкой икосаэдрической формы. Многие серотипы этого вируса, будучи патогенными, вызывают симптомы обычной простуды. Во время инфекции вирусные частицы находятся в ядре клетки.

Аденозинтрифосфат (АТФ). Высокоэнергетический эфир фосфорной кислоты, молекулы которого служат основными хранилищами энергии в клетке.

Азотистая кислота (HNO_2). Очень мощный мутаген, под действием которого в основаниях ДНК происходит замещение аминогрупп кетогруппами.

Азотистое основание. Ароматическая N-содержащая молекула, имеющая основные свойства (способность связывать атом водорода). В клетке важную роль играют такие азотистые основания, как пурины и пиримидины.

Аксоподии. Жесткие, вытянутые в длину клеточные выросты, состоящие главным образом из микротрубочек.

Активирующий фермент. см. Аминоацилсинтетаза.

Активный центр. Участок молекулы фермента, взаимодействующий с другими молекулами.

Актин. Глобулярный белок (мол. вес ~70 000), молекулы которого в результате полимеризации образуют очень длинные тонкие нити.

α-Актинин. Мышечный белок (мол. вес ~95 000), содержащийся в Z-пластинках мышечных волокон, где он прикреплен к нитям актина.

Актиномицин D. Антибиотик, блокирующий элонгацию цепей РНК.

Аллель. Одна из двух или большего числа альтернативных форм гена.

Аллергия. Повышенная чувствительность организма к антигену, вызванная предшествующим воздействием этого антигена на данный организм.

Аллостерические белки. Белки, биологические свойства которых изменяются под воздействием небольших специфических молекул (аллостерических эффекторов), связывающихся с этими белками не в активном центре, а в каком-то другом участке.

Аллостерические эффекторы. Небольшие молекулы, которые обратимо связываются с аллостерическими белками в участках, не являющихся активными центрами этих белков, что вызывает изменение формы белковых молекул.

Аллотип. Термин, применяемый в иммунологии вместо термина *аллель*.

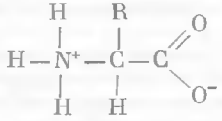
Амебоидное движение. Движение клеток, которое осуществляется благодаря перетеканию цитоплазмы в клеточные выросты, называемые *псевдоподиями*.

Аминоациладениловая кислота (АА ~ АМФ). Участвующее в синтезе белка активированное соединение, которое является промежуточным продуктом в процессе образования ковалентной связи между аминокислотой и ее адаптором — молекулой тРНК.

Аминоацилсинтетаза. Любой из 20 (по меньшей мере) различных ферментов, которые катализируют: 1) реакцию образования аминоацил-АМФ (активированной аминокислоты) и пирофосфата при взаимодействии специфической аминокислоты с АТФ; 2) перенос активированной аминокислоты на тРНК с образованием аминоацил-тРНК и свободного АМФ.

Аминогруппа. Химическая группа $—NH_2$, характеризующаяся основными свойствами благодаря ее способности присоединять протон с образованием группы $—NH_3^+$.

Аминокислоты. Блоки, из которых построены белки. Имеется двадцать наиболее часто встречающихся аминокислот, и все они являются L-стереоизомерами. В основе всех аминокислот лежит одна и та же структура, различаются же они только своими боковыми группами (R):



Аналоги оснований. Пурины и пиримидины, которые несколько отличаются по своей структуре от нормальных азотистых оснований нуклеиновых кислот. Некоторые аналоги оснований (например, 5-бромурацил) могут включаться в нуклеиновые кислоты в процессе их синтеза вместо нормальных компонентов.

Ангстрем (Å). Единица длины, которую удобно использовать для описания размеров атомов; 1 Å равен 10^{-8} см.

Анеуплоидия. Наличие хромосомных наборов, в которых число хромосом не кратно гаплоидному набору хромосом.

Антиген. Любое вещество, которое, попадая в организм позвоночного животного, способно стимулировать образование нейтрализующих действие этого вещества антител.

Антиген Т. Антиген, обнаруженный в ядрах клеток, инфицированных или трансформированных некоторыми опухолевыми вирусами (например, вирусами полиомы и SV40). Возможно, что он является ранним вирус-специфическим белком.

Антигенная детерминанта. Химическая структура (небольшого размера по сравнению с макромолекулой), которую узнает активный центр антитела. Определяет специфичность взаимодействия между антителом и антигеном.

Антигены тканевой совместимости. Специфические клеточные белки, участвующие в создании иммунитета при трансплантации тканей. Чужеродные антигены тканевой совместимости, введенные в организм (например, при пересадке кусочка кожи от генетически отличающегося индивидуума), вызывают ответную реакцию, обусловленную клеточным иммунитетом.

Антикодон. Находящаяся в молекуле тРНК группа из трех оснований, которая «узнает» соответствующую ей группу из трех оснований (кодон) в молекуле мРНК и комплементарно спаривается с нею.

Это приводит к тому, что аминокислота занимает правильное положение в растущей цепи белка.

Антитела см. Иммуноглобулины.

Антитерминатор. Белок, предотвращающий нормальную терминацию синтеза РНК, может быть, вследствие того, что он препятствует действию ρ-фактора. Вероятно, продукт гена N бактериофага λ является антитерминатором.

Аппарат Гольджи. Клеточная органелла, состоящая из сложной системы уплощенных, параллельно расположенных мембран. При участии аппарата Гольджи происходит, по-видимому, формирование гранул, а также созревание (процессинг) макромолекул. Здесь же образуются лизосомы, а секреторные продукты упаковываются в вакуоли.

Ароматические аминокислоты. Аминокислоты, боковые цепи которых содержат производное фенильной группы. К ароматическим аминокислотам, встречающимся в белках, относятся фенилаланин, тирозин и триптофан.

Аттенуатор — участок затухания синтеза мРНК (Attenuator region.) Участок оперона, на котором большинство молекул РНК-полимеразы прекращает элонгацию цепей РНК. Транскрипция протекает нормально только при получении системой особого молекулярного сигнала (такой сигнал подает антитерминатор).

Аффинная хроматография (хроматография по сродству). Метод разделения различных веществ, в котором используется связанный с молекулами какого-либо вещества нерастворимый матрикс (например, сефароза). На таком матриксе удерживаются молекулы только тех веществ, которые имеют сродство к связанным с матриксом молекулам (в качестве примера можно привести сродство между антителом и его антигеном). Такие «попавшие в ловушку» молекулы затем элюируют.

Ацетил-КоА. Высокоэнергетический эфир уксусной кислоты (активный ацетат), который является важным метаболитом, участвующим как в цикле Кребса, так и в процессе биосинтеза жирных кислот.

Базальное тельце. Состоящая из микротрубочек органелла, расположенная в основании реснички. Предполагается, что она участвует в организации микротрубочек в ресничках.

Бактериофаги (фаги) см. Вирусы бактерий.

Белки лики (leaky). Белки, кодируемые мутантным геном, но сохраняющие некоторую остаточную активность.

Белки ранние (или поздние). В процессе вирусной инфекции каждый вирусспецифический белок синтезируется в определенный промежуток времени после момента заражения клетки. В соответствии с временем синтеза белки можно разделить на две группы, классифицируемые как *ранние* и *поздние* белки. Их синтез часто находится под позитивным контролем бактериальных и вирусных факторов специфичности.

Белок, активирующий катаболитные гены (БАК). Димерный белок с мол. весом ~44 000. Он является элементом позитивного контроля для всех чувствительных к глюкозе оперонов.

Белок Бенс-Джонса. Легкие цепи антител одного определенного типа, продуцируемые клетками миеломы. Обычно обнаруживаются в моче больных множественной миеломой.

Белок (или белки) оболочки. Внешний структурный белок (или белки) вируса.

Бесклеточный экстракт. Жидкость, содержащая бо́льшую часть растворимых веществ клетки; ее получают в результате разрушения оболочек клеток и удаления оставшихся неразрушенными целых клеток.

Бесшерстные мыши (nude mices). Недавно открытая линия мышей, у которых имеется врожденная патология, проявляющаяся в очень низком содержании тимусной ткани, вследствие чего эти мыши не способны к выраженным иммунным ответам, обусловленным Т-лимфоцитами.

Биологические часы. Механизмы, которые обеспечивают периодическое выражение определенных биологических структур (генов). Возможно, что это происходит при участии факторов специфичности и антиспецифичности.

Блокированные 5′-концы РНК («шапочки»). После транскрипции 5′-концы почти всех мРНК эукариотических клеток модифицируются благодаря присоединению к ним молекулы ГТФ. Это присоединение осуществляется в результате реакции конденсации с образованием 5′—5′-пирофосфатной связи.

Боковые группы аминокислот. см. Аминокислоты.

Брожение. Анаэробный метаболизм глюкозы.

5-бромуридиндезоксирибоза (5-БУдР). Мутагенный аналог тимина, в котором группа 5-CH_3 замещена бромом.

Вандерваальсовы силы. Слабые силы, возникающие в результате притяжения индуцированных диполей и действующие только на очень коротких расстояниях.

Веретено. Клеточная структура, состоящая в основном из микротрубочек и принимающая участие в процессе расхождения эукариотических хромосом.

Вироиды. Патогенные агенты, состоящие предположительно только из одних очень коротких молекул РНК.

Вирус-специфический фермент. Фермент, продуцируемый клеткой-хозяином после заражения ее вирусом на основе вирусной генетической информации.

Вирусы. Более мелкие, чем бактерии, инфекционные, болезнетворные агенты, для репликации которых требуется интактная клетка-хозяин. В качестве генетического компонента они содержат либо ДНК, либо РНК.

Вирусы бактерий. Вирусы, которые размножаются в бактериях.

Внутригенная супрессия. Восстановление какой-либо утраченной в результате мутации функции с помощью второй мутации, локализованной в том же гене, что и первая мутация.

Водородная связь. Связь, обусловленная слабым притяжением между отрицательно заряженным атомом и атомом водорода, который ковалентно связан со вторым отрицательно заряженным атомом.

Волнистые края (ламеллоподии). Многочисленные пластинчатые выступы, которые участвуют в прикреплении клеток к твердой поверхности.

Волокна напряжения. Пучки микрофиламентов, расположенные параллельно друг другу непосредственно под плазматической мембраной клетки. Эти волокна содержат миозин, тропомиозин, актин и α-актинин. По-видимому, они участвуют в движении клеток.

Время генерации. Время, необходимое для того, чтобы число клеток, растущих в определенных условиях, удвоилось.

Вставка. Мутация, при которой одно или несколько новых оснований присоединяется к цепи нуклеиновой кислоты, включаясь между двумя старыми основаниями.

Вторичная структура белков. Спиральная или какая-либо другая структура полипептидной цепи (например, α-спираль, β-структура типа складчатого слоя).

Вторичные клетки. Клетки, образующиеся в культуре в результате пролиферации первичных клеток. Обычно они делятся только определенное число раз, после чего большинство из них погибает.

Вторичный ответ. Выраженная реакция иммунной системы на воздействие повторно введенного антигена. Характеризуется в основном синтезом антител класса IgG.

Вырожденные кодоны. Два или большее число кодонов, которые кодируют одну и ту же аминокислоту.

Высокоэнергетическая связь. Связь, гидролиз которой сопровождается значительным уменьшением свободной энергии (по крайней мере на 5 ккал/моль).

β-Галактозидаза. Фермент, катализирующий гидролиз лактозы, расщепляющейся на глюкозу и галактозу. β-Галактозидаза *E. coli.* является классическим примером индуцибельного фермента.

Гаметы. Гаплоидные клетки (яйцеклетки и сперматозоиды), которые соединяются при оплодотворении с образованием диплоидной зиготы.

Ганглиозиды. Гликолипиды, содержащие сиаловую кислоту. Чаще всего их находят на наружной поверхности клеточной мембраны; в особенно больших количествах они содержатся в нервных клетках.

Гаплоидное состояние. Такое состояние хромосом, при котором каждая хромосома представлена только одной копией.

Гаптены. Низкомолекулярные вещества, которые сами по себе не обладают иммуногенными свойствами, но способны стимулировать синтез специфических антител после присоединения к каким-либо более крупным молекулам.

Гемоглобин. Белок, который содержится в красных кровяных клетках и служит переносчиком кислорода. Он состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей и четырех железосодержащих групп гема.

Ген. Участок хромосомы, который кодирует какой-либо функционально активный продукт (либо РНК, либо продукт ее трансляции — полипептид).

Ген дикого типа. Форма гена (аллель), встречающаяся обычно в природе.

Генетическая информация. Информация, содержащаяся в последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК (или РНК).

Генетическая карта. Схема расположения на хромосоме мутабильных сайтов, основанная на результатах экспериментов по генетической рекомбинации.

Геном. Совокупность всех генов, присутствующих в гаплоидном наборе хромосом.

Генотип. Генетическая конституция организма (следует отличать от фенотипа, т. е. совокупности всех признаков особи).

Гены ранние (или поздние). Гены, транскрибируемые на ранних (или поздних) стадиях размножения бактериофагов в инфицированных ими клетках бактерий. Возможно, что для узнавания их промоторов нужны различные факторы специфичности.

Гены, сцепленные с полом. Гены, локализованные в половых хромосомах (хромосомах, определяющих пол).

Гепатома. Особая форма рака печени.

Герпес. Окруженный внешней оболочкой вирус животных, частицы которого имеют диаметр ~200 нм. Вирус содержит линейную двухцепочечную молекулу ДНК, упакованную внутри капсида, имеющего форму икосаэдра. Вирусы типа герпеса считаются возбудителями заболевания, проявляющегося в появлении пузырьков на коже в области рта («лихорадка»), а также опоясывающего лишая и мононуклеоза.

Гетеродуплекс. Двухцепочечная молекула ДНК, в которой последовательности оснований в обеих цепях не полностью комплементарны друг другу. Такие молекулы могут образоваться в результате мутации, рекомбинации или при отжиге in vitro одиночных цепей ДНК.

Гетерозиготная пара генов. Два различных аллеля данного гена, присутствующие в гомологичных хромосомах диплоидного организма.

Гетерохроматин. Очень компактно упакованный хроматин, который не транскрибируется в РНК. Гетерохроматиновые участки хромосом остаются в компактном состоянии и на стадии интерфазы.

Гибрид ДНК — РНК. Двойная спираль, которая состоит из одной цепи ДНК и одной цепи РНК, соединенных водородными связями между комплементарными парами оснований.

Гибридизация нуклеиновых кислот. Образование двухцепочечных участков в процессе отжига одиночных цепей нуклеиновых кислот, что указывает на комплементарность нуклеотидных последовательностей этих участков.

Гидролиз. Расщепление молекулы на две или большее число более мелких молекул в результате присоединения молекулы воды:

$$H_2O + A{-}B \rightarrow H{-}A + HO{-}B.$$

Гидрофильный. Этот термин относится к молекулам или химическим группам, легко соединяющимся с H_2O.

Гидрофобное связывание. Ассоциация неполярных групп друг с другом в водном растворе, возникающая благодаря стремлению молекул воды отталкивать неполярные молекулы.

Гидрофобный (буквально: ненавидящий воду). Этот термин используется для описания молекул или определенных функциональных групп в молекулах, которые в лучшем случае лишь в незначительной степени растворимы в воде.

Гипервариабельные участки. Те участки вариабельной области цепи антитела, которые очень сильно варьируют у антител с разной специфичностью. Складываясь определенным образом, эти участки сближаются между собой и образуют активный центр антитела, в котором происходит связывание антигена.

Гистоны. Белки, богатые основными аминокислотами (например, лизином), входящие в состав хромосом всех эукариотических клеток, кроме сперматозоидов рыб, в которых ДНК образует специфический комплекс с другой группой основных белков — протаминами.

Гладкая эндоплазматическая сеть. Многочисленные, образованные внутриклеточной мембраной мешочки, к которым не прикреплены рибосомы. Гладкая эндоплазматическая сеть, по-видимому, является основным центром образования гликопротеидов в результате присоединения остатков сахара к новосинтезированным белкам.

Гладкие мышцы. Непроизвольно сокращающиеся, лишенные поперечной исчерченности мышечные клетки, которые находятся в выстилке внутренних органов и кровеносных сосудов.

Гликоген. Полимеры разной длины, состоящие из остатков глюкозы, соединенных между собой 1—4-гликозидными связями.

Гликолиз. Анаэробный процесс катаболизма глюкозы.

Гликолипиды. Липиды, содержащие полярные, гидрофильные углеводные группы в головной части молекулы.

Гликопротеид. Полипептид, к которому присоединены остатки сахара.

Глюкозочувствительные оперопы. Оперопы, функционирование которых блокируется в присутствии глюкозы. Косвенным путем глюкоза снижает уровень цАМФ, блокируя тем самым сигнал позитивного контроля.

Глюкокортикоиды. Стероидные гормоны, вырабатываемые корой надпочечников. При их воздействии происходят, в частности, изменения углеводного обмена. Одним из представителей глюкокортикоидов является кортизон.

Гомозиготная пара генов. Идентичные аллели данного гена, находящиеся в гомологичных хромосомах диплоидного организма.

Гомологичные хромосомы. Хромосомы, спаривающиеся в процессе мейоза; они морфологически одинаковы и содержат гены, определяющие одинаковые признаки.

Гормоны. Химические вещества (часто представляющие собой низкомолекулярные полипептиды), которые синтезируются в одном органе тела, а стимулируют функциональную активность в клетках других тканей и органов. Действие многих гормонов обусловлено стимуляцией активности аденилатциклазы в клеточной мембране, что приводит к образованию цАМФ.

«Горячие точки». Участки генов, в которых мутации происходят с необычно высокой частотой.

Градиент полярности. Количественное влияние полярной мутации, локализованной в одном гене, на выражение более поздних генов, расположенных в том же опероне. Это влияние зависит от расстояния между полярной мутацией (приводящей часто к образованию бессмысленного кодона) и инициирующим кодоном гена, который детерминирует синтез следующей полипептидной цепи.

Гранулоциты. Лейкоциты, содержащие различные цитоплазматические гранулы. К ним относятся эозинофилы, базофилы и нейтрофилы.

Группа (функциональная). Группа ковалентно связанных атомов, которая ведет себя в химических реакциях как единое целое.

Гуморальный иммунитет. Иммунитет, обусловленный наличием свободно циркулирующих в крови иммуноглобулинов.

Дальтон. Единица веса, равная весу одного атома водорода.

Двойной липидный слой. Модель структуры клеточной мембраны, в основе которой лежит представление о гидрофобных взаимодействиях между фосфолипидами. Согласно модели, полярные головы фосфолипидов обращены наружу к растворителю, а гидрофобные хвосты сгруппированы во внутреннем пространстве мембраны.

Двухфакторное скрещивание. Эксперимент по генетической рекомбинации, в котором используются два маркера (например, $a^+b^+ \times ab$).

Дезоксирибонуклеозид. Продукт конденсации пуринового или пиримидинового основания с пятиуглеродным сахаром 2-дезоксирибозой.

Дезоксирибонуклеотид. Соединение, состоящее из пуринового или пиримидинового основания, связанного с 2-дезоксирибозой, которая в свою очередь присоединена к фосфатной группе.

Деления дробления. Митотические деления оплодотворенного яйца, происходящие вплоть до наступления стадии, на которой различные участки яйца перемещаются относительно друг друга (стадия гаструляции).

Делеции. Утрата части генетического материала, находящегося в хромосоме. Размер делеции может варьировать от одного нуклеотида до участка, содержащего несколько генов.

Денатурация. Утрата нативной конфигурации макромолекулы, например в результате нагревания, изменения pH до экстремальных значений, химической обработки или воздействия каких-либо денатурирующих агентов. Обычно денатурация сопровождается потерей биологической активности.

Димер. Структура, образующаяся при ассоциации двух идентичных субъединиц.

Диплоидное состояние. Такое состояние хромосом, при котором все хромосомы, кроме половых, представлены двумя копиями (2N).

Дисульфидная связь. Ковалентная связь между двумя атомами серы, входящими в состав остатков цистеина, расположенных в разных

местах в молекуле белка. Играет важную роль в формировании вторичной и третичной структуры белка.

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота). Полимер, состоящий из дезоксирибонуклеотидов; является генетическим материалом всех клеток.

ДНК-полимераза I. Фермент, обнаруженный первым среди ферментов, катализирующих образование 3′—5′-фосфодиэфирных связей в ДНК. Он обладает также двумя различными экзонуклеазными активностями, одна из которых, выполняющая корректирующую функцию, ответственна за расщепление одноцепочечных участков ДНК в направлении 3′ → 5′, а другая — за расщепление двухцепочечных участков в направлении 5′ → 3′; эти активности используются при репарации поврежденных участков ДНК, что, по всей вероятности, является основной биологической функцией ДНК-полимеразы I.

ДНК-полимераза III. Фермент, который катализирует образование 3′—5′-фосфодиэфирных связей, происходящее с очень большой скоростью. Фермент обладает также 3′ → 5′-экзонуклеазной активностью, при помощи которой исправляются ошибки, возникающие при репликации ДНК. Его главной функцией является, по-видимому, осуществление репликации ДНК.

Доминантный ген. Аллель, который проявляет свое фенотипическое действие как в гомозиготной, так и в гетерозиготной форме.

Единица карты. Число, пропорциональное частоте рекомбинаций между двумя генами; одна единица карты соответствует частоте рекомбинаций 1%.

Затравка. Определенная химическая структура, которая служит точкой роста в процессе полимеризации.

Зигота. Клетка, образующаяся при слиянии мужской и женской половых клеток; в результате зигота обладает диплоидным набором хромосом.

Идиотип. Индивидуальная характеристика иммуноглобулина, обусловленная способностью специфически связывать определенный антиген.

Идиотипические антитела. Антитела против идиотипических детерминант.

Идиотипические маркеры. Те антигенные детерминанты в антигенсвязывающем участке иммуноглобулина, которые стимулируют образование идиотипических антител.

Избыточность генов. Присутствие в клетке многих копий одного гена. Множественность копий передается по наследству или возникает в результате избирательной репликации генов в процессе развития организма.

Икосаэдр. Правильный многогранник, состоящий из 20 граней, каждая из которых представляет собой равносторонний треугольник.

Иммунная толерантность. Отсутствие иммунной реакции на антигены, обусловленное либо утратой способности отличать «свое» от «несвоего», либо введением слишком большой дозы антигена.

Иммунный надзор. Иммунологический защитный механизм, с помощью которого происходит опосредованное клетками узнавание и уничтожение новообразованных раковых клеток и их потомков.

Иммуноглобулины. Y-образные по своей форме белковые молекулы, которые связывают и нейтрализуют антигены. Они состоят из субъединиц, каждая из которых содержит 4 полипептидные цепи (2 тяжелые и 2 легкие), соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая цепь имеет один константный и один вариабельный участок. На основе различий между тяжелыми цепями иммуноглобулины можно разделить на пять классов: IgG, IgM, IgA, IgD и IgE.

Иммунодепрессант. Лекарственный препарат, блокирующий нормальную ответную реакцию клеток, вырабатывающих антитела, на введение антигена.

Иммунология. Наука, изучающая антитела и их взаимодействия с антигенами.

Ингибирование по принципу обратной связи. Процесс, называемый также ретроингибированием или ингибированием конечным продуктом, заключается в подавлении активности первого фермента какого-либо метаболического пути конечным продуктом этого пути.

Индукторы. Молекулы, вызывающие образование большего количества ферментов, участвующих в их потреблении и метаболизме, по сравнению с количествами, которые содержатся в клетках, растущих в отсутствие индуктора.

Индуцибельные ферменты. Ферменты, скорость образования которых повышается, если в клетке присутствует соответствующий индуктор.

Инфекционная вирусная нуклеиновая кислота. Очищенная вирусная нуклеиновая кислота, которая может инфицировать клетку-хозяина и вызвать образование потомства вирусных частиц, из которых была получена нуклеиновая кислота.

Калория. Мера энергии, определяемая как количество энергии, которое необходимо затратить, чтобы поднять температуру 1 $см^3$ воды на 1 °С.

Канцероген. Агент, вызывающий рак.

Капсид. Вирусная оболочка с высокоупорядоченной структурой, состоящая из агрегированных субъединиц белка. Внутри нее находится молекула нуклеиновой кислоты вируса.

Капсомеры. Белковые субъединицы, агрегирующие с образованием капсида.

Карбоксильная группа $-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-OH$. Химическая группа, характеризующаяся кислотными свойствами, обусловленными тем, что при диссоциации гидроксила образуется отрицательно заряженная группа $-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-O^-$.

Карбоксильный конец. Конец полипептидной цепи со свободной α-карбоксильной группой.

Картирование тонкой структуры гена. Генетический анализ, который позволяет определить с высоким разрешением локализацию мутаций в хромосоме.

Катаболитная репрессия. Снижение скорости синтеза определенных ферментов в бактериях, выращиваемых на глюкозе или на каком-либо другом очень хорошем источнике продуктов катаболизма. Обусловлена низким уровнем содержания цАМФ в таких клетках.

Катаболиты. Соединения, образующиеся при распаде молекул питательных веществ.

Катализатор. Вещество, в присутствии которого увеличивается скорость химической реакции; само оно при этом не расходуется (так, например, ферменты являются катализаторами биологических реакций).

Кинетохор. Тельце, присоединенное к центромере хромосомы и являющееся местом прикрепления хромосомных трубочек.

Кислые аминокислоты. Аминокислоты, которые при нейтральном pH имеют суммарный отрицательный заряд.

Клетка. Фундаментальная единица жизни; наименьшее живое тело, способное к самовоспроизведению. Клетки всегда окружены мембраной.

Клетка-хозяин. Клетка, метаболические реакции которой используются для обеспечения роста и воспроизведения вируса.

Клетки зародышевого пути. Клетки, которые дифференцируются на ранних стадиях эмбриогенеза; на более поздних стадиях они становятся способными исключительно к мейотическому делению, при-

водящему к образованию половых клеток (яйцеклеток и сперматозоидов).

Клетки памяти. Малые лимфоциты, образующиеся в результате первичного иммунного ответа и создающие, вероятно, основу для вторичного ответа.

Клетки HeLa. Стабильная линия раковых клеток, выделенных из опухоли больной, умершей от рака шейки матки. Используется в течение многих лет для изучения процессов метаболизма и роста культивируемых клеток человека.

Клетки Hfr (от *англ.* High frequency of recombination — высокая частота рекомбинации). Штаммы *E. coli*, у которых обнаруживается необычно высокая частота рекомбинаций. В этих клетках фактор F включен в бактериальную хромосому; предполагают, что он играет определенную роль в переносе хромосомы из клеток Hfr в клетки F⁻ (см. также Половой фактор).

Клеточная дифференцировка. Процесс развития и поддержания различных специализированных структур и функций у потомков одной общей родительской клетки.

Клеточный иммунитет. Иммунный ответ, связанный непосредственно с образованием Т-лимфоцитов, а не циркулирующих в крови (гуморальных) молекул антител.

Клеточный фактор. Протеаза с мол. весом ~40 000. Секретируется в больших количествах исключительно клетками опухолей. Основная функция, которую она выполняет в крови, заключается, по-видимому, в протеолитической активации плазминогена, превращающегося при этом в плазмин.

Клеточный цикл. Временная последовательность событий, происходящих в клетке в период между двумя митотическими делениями.

Клон. Группа клеток, происходящих от одной клетки, которая является их общим предком.

Ковалентные связи. Прочные химические связи, возникающие между атомами в результате образования общих электронных пар.

Кодон. Последовательность из трех смежных нуклеотидов, кодирующая какую-нибудь аминокислоту (или терминацию полипептидной цепи).

Колония. Растущая на поверхности твердой среды группа соседних клеток, которые обычно происходят от одной клетки.

Колхицин. Ядовитый алкалоид, который содержится в растении, известном под названием безвременника. Он связывает в эквимолярном соотношении тубулин и поэтому вызывает распад микротрубочек.

Кольца Бальбиани. Сильно пуффированные участки политенных хромосом.

Комплемент. Ряд последовательно действующих белков, присутствующих в сыворотке крови; в активированном состоянии лизируют чужеродные клетки.

Комплементарные последовательности оснований. Полинуклеотидные последовательности, которые могут быть связаны между собой в соответствии с правилами спаривания оснований.

Комплементарные структуры. Две структуры, каждая из которых определяет другую; например, две цепи, образующие спираль ДНК.

Комплементационный тест (тест на комплементацию). Введение двух мутантных хромосом (или их отдельных участков) в одну и ту же клетку с целью выяснить, находятся ли соответствующие мутации в одном или в разных генах.

NH_2-конец. Конец полипептидной цепи, на котором находится свободная α-аминогруппа.

Конечный продукт. Химическое соединение, образующееся в результате какой-либо определенной последовательности метаболических реакций.

Конканавалин А. Митогенный лектин, выделенный из растения *Phytolacca americana*.

Конкатемер. Структура, образующаяся при агрегации одинаковых по размеру компонентов.

Конститутивные ферменты. Ферменты, синтезируемые клетками в постоянных количествах, не зависящих от условий выращивания.

Контактное торможение. Прекращение передвижения (деления?) клеток, часто наблюдаемое в тех случаях, когда свободно растущие в культуре клетки, полученные из многоклеточного организма, приходят в соприкосновение друг с другом.

Координированный синтез ферментов. Одновременное изменение скорости синтеза нескольких ферментов. Например, в клетках *E. coli*, выращенных в отсутствие β-галактозидов, добавление лактозы к среде вызывает индукцию координированного синтеза β-галактозидазы и β-галактозидпермеазы.

Копирование с переменой матриц. Отвергнутая в настоящее время модель кроссинговера, в которой не требуется разрыва хромосом в процессе рекомбинации. Согласно этой модели, механизм кроссинговера заключается в том, что синтез новой молекулы ДНК, образующейся на отцовской хромосоме, переключается в какой-то момент на материнскую хромосому и рост ДНК продолжается уже на этой матрице. Подобным же образом происходит переключение на отцовскую хромосому цепи, растущей вначале на материнской хромосоме.

Корепрессоры. Такие метаболиты, присоединение которых к репрессорам приводит к специфическому ингибированию синтеза фермента (или ферментов), участвующих в их метаболизме.

Коррекция. Процесс, с помощью которого неправильно включенный нуклеотид или неправильно выбранная аминоацил-тРНК могут быть удалены и заменены правильной молекулой.

Коферменты. Небольшие молекулы, связываясь с которыми белки становятся активными ферментами (например, $НАД^+$).

Кривая роста. Кривая, описывающая изменение числа клеток в растущей культуре как функцию времени.

Критический период. Период, наступающий после определенного для каждого типа культивируемых клеток числа клеточных делений и характеризующийся тем, что большинство вторичных клеток погибает, но отдельные клетки выживают.

Кроссинговер. Процесс обмена генетическим материалом между гомологичными хромосомами.

Культура клеток. Выращивание in vitro клеток, изолированных из многоклеточных организмов.

Легкие цепи. Термин, относящийся обычно к легким полипептидным компонентам (мол. вес ~23 000) иммуноглобулина.

Лейкоз. Форма рака, для которой характерна сильно выраженная пролиферация незрелых и функционально неактивных белых кровяных клеток (лейкоцитов).

Лектины. Белки, агглютинирующие клетки. Большинство изученных до сих пор лектинов выделено из семян растений.

Лизирующие вирусы. Вирусы, размножение которых приводит к лизису клетки-хозяина.

Лизогенизирующие вирусы. Вирусы, которые способны превращаться в профаги.

Лизис. Распад клетки в результате разрушения ее мембраны.

Лизогенная бактерия. Бактерия, содержащая профаг.

Лизосомы. Внутриклеточные гранулы, содержащие большое число разнообразных гидролитических ферментов. Эти гранулы сливаются

с пищеварительными вакуолями, образующимися при поглощении клеткой пищи, в результате чего содержимое вакуолей расщепляется.

Лизоцимы. Ферменты, которые расщепляют полисахариды, находящиеся в клеточных стенках некоторых бактерий.

Лимфатические ткани. Ткани, которые производят и содержат лимфоциты. К ним относятся лимфатические узлы и сосуды, зобная железа (тимус), селезенка и фабрициева сумка (у птиц).

Лимфобласты. Богатые цитоплазмой клетки, дифференцирующиеся из стимулированных антигенами Т-лимфоцитов.

Лимфокины. Факторы, которые высвобождаются антиген-стимулированными Т-лимфоцитами и притягивают фагоцитирующие моноциты.

Лимфома. Рак лимфатической ткани.

Лимфоциты В. Малые лимфоциты, которые синтезируют и секретируют гуморальные антитела в ответ на антигенную стимуляцию.

Лимфоциты Т. Малые лимфоциты, несущие на своей поверхности Θ-антиген и определяющие реакции клеточного иммунитета.

Линия клеток. Те вторичные клетки, которые пережили критический период и приобрели каким-то образом способность размножаться в течение неопределенно долгого времени.

Липиды. Большой класс разнообразных водонерастворимых органических веществ. К нему относятся стероиды, жирные кислоты, простагландины, терпены и воска.

Липкие концы. Комплементарные одноцепочечные хвосты, выступающие из двухцепочечных молекул нуклеиновых кислот, в которых имеется так называемая концевая избыточность.

Литическая инфекция. Вирусная инфекция, приводящая к лизису клетки и выходу из нее потомства вируса.

Макромолекулы. Вещества с молекулярным весом от нескольких тысяч до сотен миллионов.

Макрофаг. Большая белая кровяная клетка, способная к фагоцитозу.

Малые лимфоциты. Белые кровяные клетки, имеющиеся в больших количествах у высших позвоночных; характеризуются наличием в них, по-видимому, инертного ядра, окруженного лишь следовыми количествами бедной эндоплазматической сетью цитоплазмы. Они разделяются на две группы — В- и Т-клетки, которые внешне неразличимы между собой при рассматривании их в световой микроскоп.

Матрица. Макромолекулярный «шаблон» для синтеза другой макромолекулы.

Матричная (информационная) РНК (мРНК). РНК, которая служит матрицей для синтеза белка.

Межгенная супрессия. Восстановление какой-либо утраченной в результате мутации функции с помощью второй мутации, локализованной в другом гене, а не в том, в котором возникла первая мутация.

Мезосома. Впячивание бактериальной клеточной мембраны, связанное с процессом репликации ДНК.

Мейоз. Процесс, в котором из диплоидных клеток зародышевого пути образуются гаплоидные половые клетки.

Метаболизм. Совокупность всех химических реакций, происходящих в живой клетке.

Метаболический путь. Ряд последовательных ферментативных реакций, с помощью которых в клетке происходит превращение одной молекулы в другую.

Метка (радиоактивная). Радиоактивный атом, введенный в молекулу с целью облегчить наблюдение за ее метаболическими превращениями.

Метод замораживания — скалывания. Замороженные образцы разрезают ножом, после чего комплементарные поверхности срезов оттеняют

напылением на них металла. Образовавшиеся слепки рассматривают в электронный микроскоп.

Метод флуоресцирующих антител. Обнаружение в клетках специфического антигена при его взаимодействии со специфическим антителом, содержащим флуоресцирующий краситель.

Миелома. Рак клеток, продуцирующих антитела. Характерной особенностью миеломы является пролиферация только какого-либо одного клона плазматических клеток, которые производят иммуноглобулин одного типа.

Микроворсинки. Длинные узкие цитоплазматические выросты, которые образуют в некоторых клетках (например, в клетках слизистой тонкого кишечника) щеточную каемку, увеличивающую поверхность клетки.

Микрон, или микрометр (мкм). Единица длины, удобная для описания размеров клеток и их компонентов; 1 мкм равен 10^{-4} см, или 10^4 Å.

Микротрубочки. Полые цилиндрические трубочки диаметром 250 Å, образующиеся в результате спиральной агрегации молекул тубулина.

Микрофиламенты. Длинные внутриклеточные нити толщиной 60 Å, содержащие полимеризованный актин. Предполагают, что они выполняют функцию опорных и двигательных элементов клетки.

Микрошипы. Узкие (~0,2 мкм) цитоплазматические отростки, достигающие длины 20 мкм. Они то быстро вытягиваются с поверхности клетки, то втягиваются обратно. Возможно, что они выполняют сенсорную функцию.

Миобласты. Клетки-предшественницы, агрегация которых приводит к формированию многоядерной клетки поперечнополосатой мышцы.

Миозин. Белок, каждая молекула которого состоит из двух спирально скрученных субъединиц (мол. вес ~220 000). При агрегации последних образуется толстая нить, которая на обоих концах имеет глобулярную структуру.

Миссенс-мутация. Мутация с изменением смысла кодона, в результате которой кодон, кодирующий какую-либо аминокислоту, изменяется, превращаясь в кодон для другой аминокислоты.

Митогены. Вещества, стимулирующие клеточное деление (митоз).

Митоз. Процесс удвоения и расхождения хромосом, сопровождающийся клеточным делением.

Митотическая рекомбинация. Кроссинговер между гомологичными хромосомами в процессе митоза, приводящий к расхождению гетерозиготных аллелей.

Митохондрии. Органеллы, находящиеся в цитоплазме всех аэробных эукариотических клеток и являющиеся центрами производства АТФ в процессе окислительного фосфорилирования.

Модель катящегося кольца. Один из предполагаемых механизмов репликации кольцевой ДНК. Согласно этой модели, репликация начинается со специфического разрыва одной родительской цепи двойной спирали ДНК, что приводит к появлению 5′- и 3′-концов. 3′-конец служит затравкой при репликации ДНК на интактной кольцевой цепи как на матрице, тогда как 5′-конец вытесняется, образуя постепенно увеличивающийся длинный свободный хвост.

Модель скользящих нитей. Механизм мышечного сокращения, в основе которого лежит образование и разрыв поперечных мостиков между толстыми (миозиновыми) и смежными с ними тонкими (актиновыми) нитями.

Молекулярный вес. Сумма атомных весов всех атомов, входящих в состав молекулы.

Мономер. Основная субъединица, из которой с помощью одной многократно повторяющейся реакции строится полимер. Например, аминокислоты (мономеры) вступают в реакцию конденсации с образованием полипептидов или белков (полимеров).

Монослой. Равномерный слой клеток толщиной в одну клетку.

Моноциты. Самые большие из всех обнаруженных в крови лейкоцитов (макрофаги); они обладают способностью к фагоцитозу и амебоидному движению.

Мочевина. Органическое соединение $CO(NH_2)_2$, используемое как агент, денатурирующий белки.

Мутагены. Физические или химические агенты (например, радиация, повышенная температура, алкилирующие или дезаминирующие вещества), значительно повышающие частоту мутаций над уровнем фона спонтанных мутаций.

Мутации со сдвигом рамки. Мутации, нарушающие порядок считывания кода. Они представляют собой вставки или делеции в молекуле ДНК, сдвигающие границы кодонов при нормальном считывании кода в процессе трансляции, что часто приводит к образованию функционально неактивных белковых продуктов.

Мутация. Наследственное изменение, происходящее в хромосоме.

Мутирующие сайты. Те участки в хромосоме, в которых происходят мутации. Результаты генетических экспериментов указывают на то, что каждый мутирующий сайт может существовать в нескольких альтернативных формах.

Мышечные белки. Белки, которые содержатся в мышечных волокнах и участвуют в процессе мышечного сокращения. К ним относятся актин, миозин, тропомиозин и α-актинин.

Наследственная болезнь. Патологическое состояние, причиной которого является мутация гена, вследствие чего оно может передаваться от одного поколения к другому.

Негативный контроль. Подавление биологической активности в присутствии специфической молекулы. Ярким примером негативного контроля является ингибирование инициации синтеза мРНК в результате связывания специфического репрессора с определенными сайтами в молекуле ДНК.

Неоднозначное соответствие (wobble — качание). Способность третьего (5′-концевого) основания в антикодоне тРНК образовывать водородные связи с любым из двух или трех оснований, расположенных на 3′-конце кодона мРНК. Поэтому молекулы тРНК одного типа могут часто узнавать несколько различных кодонов.

Неосновные белки хромосом. Не являющиеся гистонами кислые белки, ассоциированные с хромосомами (например, ДНК-полимераза).

Нонсенс-мутация (бессмысленная мутация). Мутация, которая превращает кодон, определяющий какую-либо аминокислоту, в кодон, не соответствующий никакой аминокислоте (бессмысленный кодон). Бессмысленные кодоны выполняют функцию терминации полипептидной цепи.

Нуклеазы. Ферменты, расщепляющие фосфодиэфирные связи в цепях нуклеиновых кислот.

Нуклеиновая кислота. Полимер, состоящий из нуклеотидов (см. также ДНК и РНК).

Нуклеоид. Сердцевина частиц РНК-содержащих опухолевых вирусов; состоит из РНК, окруженной белковой оболочкой в форме икосаэдра.

Нуклеосомы. Сферические образования диаметром ~ 100 Å, визуально обнаруживаемые в частично диссоциированном хроматине.

Обратная мутация (реверсия). Наследственное изменение мутантного гена, восстанавливающее его исходную нуклеотидную последовательность.

Обратная транскриптаза. Фермент, кодируемый некоторыми РНК-содержащими вирусами, который обладает способностью синтезировать комплементарные одноцепочечные молекулы ДНК на РНК-матрицах, а затем превращать их в двухцепочечные.

Окислительно-восстановительные реакции. Химические реакции, в процессе которых происходит перенос электронов от восстановителя к окислителю. Обычно говорят, что в результате такого переноса восстановитель окисляется, а окислитель восстанавливается.

Окислительное фосфорилирование. Образование АТФ, сопряженное с переносом электронов. Эти два процесса происходят на митохондриальной мембране.

Онкоген. Ген канцерогенных вирусов, ответственный за образование трансформированного фенотипа.

Ооцит. Клетка, из которой образуется яйцеклетка животных.

Оператор. Участок хромосомы, способный взаимодействовать прямо (или косвенно?) со специфическим репрессором и регулировать таким образом функционирование соседнего оперона.

Оперон. Генетическая единица, состоящая из нескольких смежных генов, которые функционируют согласованно, находясь под совместным контролем оператора и репрессора.

Оплодотворение. Слияние гамет противоположного пола с образованием диплоидной зиготы.

Опухолевый вирус. Вирус, индуцирующий образование опухоли.

Опухоль. Скопление клеток, образовавшееся в результате неконтролируемой пролиферации раковых клеток.

Опыты с использованием импульсной метки и последующим ее вытеснением (Pulse-chase experiments). Суть этих опытов сводится к тому, что к живым клеткам или к экстракту, полученному из клеток, добавляют радиоактивное соединение (предшественник), а затем через короткий промежуток времени (например, через 5 с) в эту систему вводят большое количество того же, но немеченого соединения, чтобы разбавить радиоактивную метку. Через определенные промежутки времени после введения импульсной метки из реакционной смеси отбирают пробы для прослеживания за судьбой метки в процессе метаболического превращения введенного предшественника.

Органелла. Окруженная мембраной структура эукариотической клетки, содержащая ферменты, необходимые для осуществления какой-либо специализированной функции. Некоторые органеллы, в том числе митохондрии и хлоропласты, имеют в своем составе ДНК и способны к автономной репликации.

Основной постулат. Основные взаимоотношения между ДНК, РНК и белком: ДНК служит матрицей как для собственной репликации, так и для синтеза РНК; РНК в свою очередь служит матрицей для синтеза белка.

Основные аминокислоты. Аминокислоты, которые при нейтральном pH имеют положительный суммарный заряд.

Остов молекулы полимера. Те группы атомов в полимере, которые являются общими для всех составляющих этот полимер молекул (например, остатки сахара и фосфата в молекуле РНК).

Отношение (А + Т)/(Г + Ц). Выражение для обозначения относительного содержания пар оснований(аденин — тимин и гуанин — цитозин) в молекуле ДНК.

Ошибка считывания кода. Неправильное включение аминокислотного остатка в полипептидную цепь в процессе белкового синтеза.

Палиндром. Участок ДНК, в котором идентичные (или почти идентичные) последовательности оснований направлены в противоположные стороны.

Пептидная связь. Ковалентная связь между двумя аминокислотами, образующаяся в результате соединения α-аминогруппы одной аминокислоты с α-карбоксильной группой другой аминокислоты с одновременным выделением одной молекулы H_2O.

Первичная структура белка. Число полипептидных цепей в белке, порядок расположения в них аминокислот (последовательность аминокислот), а также локализация межцепочечных и внутрицепочечных дисульфидных мостиков.

Первичные клетки. Клетки, полученные из многоклеточного организма и высеянные в культуральную среду.

Первичный иммунный ответ. Довольно слабая ответная реакция иммунной системы организма при первом воздействии на нее какого-либо антигена. Для этой реакции характерна определенная последовательность синтеза иммуноглобулинов разных классов: вначале синтезируются IgM, а затем IgG.

Пермиссивные (или непермиссивные) клетки. Пермиссивные клетки способствуют развитию литической инфекции определенным вирусом. В непермиссивных клетках данный вирус не способен к литической инфекции.

Пероксисомы. Внутриклеточные органеллы, содержащие мелкогранулированный матрикс, а также нередко и сердцевину, которая имеет вид кристаллической структуры. Было обнаружено, что в пероксисомах присутствуют четыре фермента, участвующие в метаболизме перекиси водорода, в том числе каталаза—фермент, расщепляющий H_2O_2. Возможно, что пероксисомы играют важную роль в процессах, связанных с распадом пуринов, фотодыханием, а также с метаболическим путем, известным под названием глиоксилатного цикла.

Пиноцитоз. Процесс захвата частиц пищи, имеющих размеры макромолекул. Предполагают, что его механизм в основе своей сходен с механизмом фагоцитоза.

Плазматическая мембрана. Наружный покров, окружающий клетку и являющийся физическим барьером, который отделяет цитоплазму клетки от внешней среды.

Плазматические клетки. Клетки, образующиеся в процессе дифференцировки стимулированных антигенами В-лимфоцитов. Для этих клеток характерно наличие развитой шероховатой эндоплазматической сети, что связано с их способностью секретировать громадные количества различных антител.

Плазмиды. Автономно реплицирующиеся хромосомные элементы, обнаруженные в цитоплазме бактерий.

Плазмин. Фермент, образующийся в результате протеолитической активации плазминогена. Его функция заключается в том, что он гидролизует белок фибрин, обеспечивающий свертывание крови.

Плазминоген. Ферментативно неактивный белок крови, который активируется при расщеплении в нем одной пептидной связи между аргинином и валином, в результате чего образуется плазмин.

Плазмобласты. Интенсивно размножающиеся клетки, которые образуются в процессе дифференцировки В-лимфоцитов и являются предшественниками плазматических клеток.

Позитивный контроль. Контроль, осуществляемый с помощью регуляторного белка, присутствие которого в надлежащей конформации необходимо для выражения гена.

Поли(А) в молекулах мРНК эукариотических клеток. На 3′-концах почти всех молекул мРНК в эукариотических клетках имеются относительно длинные последовательности поли(А), которые присоединяются к молекулам мРНК с помощью ферментов уже после завершения транскрипции.

Полимер. Регулярно построенная цепь, состоящая из ковалентно связанных между собой основных субъединиц (мономеров), присоединяющихся друг к другу в химических реакциях одного или нескольких типов.

Полимераза см. ДНК-полимераза и РНК-полимераза.

Полинуклеотид. Линейная последовательность нуклеотидов, в которых сахар одного нуклеотида связан в 3′-положении посредством фосфатной группы с сахаром соседнего нуклеотида в 5′-положении.

Полинуклеотидлигаза. Фермент, с помощью которого цепи ДНК соединяются между собой ковалентной связью.

Полинуклеотидфосфорилаза (полирибонуклеотид — нуклеотидилтрансфераза). Фермент, содержащийся в клетках бактерий и катализирующий полимеризацию рибонуклеозиддифосфатов, что приводит к образованию РНК и свободного фосфата. Физиологическая функция этого фермента до сих пор остается неизвестной.

Полипептид. Полимер, состоящий из аминокислот, связанных между собой пептидными связями.

Полирибосома (полисома). Комплекс, образующийся между молекулой мРНК и рибосомами (число которых зависит от размера молекулы мРНК). Полисомы принимают активное участие в синтезе полипептидов.

Политенная хромосома. Гигантская хромосома, состоящая из многих нитей (их число может достигать 2000), которые возникают в результате последовательных циклов удвоения хроматид. Большое число скопъюгированных идентичных хромомер образует характерные для этих хромосом диски.

Половой фактор (F^+). Эписома, определяющая пол бактерии. Клетка, в которой присутствует этот фактор, становится мужской (женские клетки обозначаются F^-).

Полюсные трубочки. Микротрубочки, образующие веретено. Они берут свое начало в тех участках цитоплазмы, где расположены центриоли, в непосредственной близости от ядерной мембраны.

Полярная мутация. Мутация, локализовавшая в каком-либо одном гене, но снижающая выражение других, более удаленных от промотора генов, расположенных в том же опероне. Мутации, приводящие к образованию нонсенс-кодонов («бессмысленных»), часто бывают полярными.

Поперечнополосатые мышцы. Мышечные клетки, содержащие параллельно расположенные миофибриллы, повторяющиеся структурные элементы которых создают впечатление поперечной исчерченности этих мышц.

Последовательность аминокислот. Линейный порядок расположения аминокислот в пептиде или в белке.

Правила спаривания оснований. Требование, согласно которому в двойной спирали нуклеиновой кислоты аденин всегда образует пару с тимином (или урацилом), а гуанин — с цитозином.

Провирус. Состояние вируса, при котором он интегрирован с хромосомой клетки-хозяина и в таком виде передается от одного поколения клеток к другому.

Прокариот. Простой одноклеточный организм (например, бактерия или сине-зеленая водоросль), у которого отсутствуют ядерная мембрана и окруженные внутриклеточными мембранами органеллы. Вместе

с тем он имеет 70S-рибосомы и обладает некоторыми характерными для него особенностями биохимических процессов.

Промежуточный метаболизм. Протекающие в клетке химические реакции, с помощью которых молекулы пищевых веществ превращаются в молекулы, необходимые для построения и роста самой клетки.

Промотор. Участок ДНК, с которым связывается РНК-полимераза и на котором инициируется транскрипция.

Простетические группы. Коферменты, которые очень прочно связаны со своими ферментами (например, гем).

Протамины. Класс белков, характеризующихся высоким содержанием основной аминокислоты аргинина. В комплексе с ДНК они встречаются в сперме многих беспозвоночных животных и рыб.

Профаг. Провирусная стадия лизогенизирующего фага (см. Провирус).

Пуромицин. Антибиотик, ингибирующий синтез полипептидных цепей вследствие того, что он конкурирует с молекулами аминоацил-тРНК за рибосомный участок связывания А.

Путь Эмбдена — Мейергофа см. Гликолиз.

Пуффы. Открытые петли политенных хромосом, подобные петлям, находящимся в хромосомах типа ламповых щеток. Чем больше величина пуффа и чем более рыхлым он выглядит, тем выше скорость транскрипции в данном участке хромосомы.

Равновесное центрифугирование. Метод разделения молекул на основе различий в их плотности. Очень часто этот метод используется для разделения фрагментов нуклеиновых кислот. Центрифугирование производится при высоких скоростях в концентрированном солевом растворе, в котором устанавливается градиент плотности; в этих условиях различные фрагменты нуклеиновых кислот перемещаются в ту часть центрифужной пробирки, в которой их плотность будет равна плотности солевого раствора.

Радиоавтограф. Изображение, которое получается при контакте фотоэмульсии с радиоактивным материалом (например, с тонкими срезами клетки). В тех местах, где эмульсия подвергается воздействию излучения, выявляются детали расположения и формы радиоактивных компонентов исследуемого объекта.

Радиоавтография. Метод выявления радиоактивной метки в цитологических препаратах и макромолекулах в результате их воздействия на фотографическую пленку.

Радиоактивный изотоп. Изотоп элемента, обладающий нестабильным ядром и стабилизирующийся в результате испускания ионизирующей радиации.

Разрыв и воссоединение. Классическая модель кроссинговера, согласно которой во время мейоза происходит разрыв хроматид и их последующее перекрестное воссоединение.

Рак. Название, данное группе болезней, для которых характерен неконтролируемый рост клеток.

Расплетающий белок. Полипептид, связывающийся с одноцепочечными участками ДНК и стабилизирующий их. При этом он облегчает расплетание двойной спирали ДНК.

Реакции переноса групп. Реакции (кроме реакций окисления и восстановления), в которых молекулы обмениваются функциональными группами.

Регуляторные гены. Гены, основной функцией которых является регуляция скорости синтеза продуктов, детерминированного другими генами.

Рекомбинация. Появление в потомстве признаков в таком сочетании, которого не было ни у одного из родителей.

Ренатурация. Обратный переход молекулы белка или нуклеиновой кислоты из денатурированного состояния в нативное.

Рентгеноструктурная кристаллография. Использование дифракционных картин, получаемых в результате рассеяния рентгеновских лучей атомами кристаллов, для определения трехмерной структуры молекул.

Репарационный синтез. Ферментативное вырезание и замещение участков поврежденной ДНК. Удаление димеров тимина, образовавшихся под действием УФ-облучения,— лучше других изученный пример репарационного синтеза.

Репликативная вилка. Участок хромосомы, имеющий Y-образную конфигурацию и являющийся точкой роста в процессе репликации ДНК.

Репликативные формы нуклеиновых кислот (РФ). Структура молекулы нуклеиновой кислоты во время ее репликации. Этот термин наиболее часто употребляется для обозначения двухцепочечных промежуточных продуктов, образующихся при репликации вирусных одноцепочечных молекул ДНК и РНК.

Репрессируемые (репрессибельные) ферменты. Ферменты, скорость образования которых уменьшается при увеличении концентрации некоторых метаболитов внутри клетки.

Репрессор. Продукт регуляторного гена, являющийся по современным представлениям белком и обладающий способностью соединяться как с индуктором (или корепрессором), так и с оператором (или с его продуктом — мРНК).

Реснички. Двигательные органеллы, локализованные на поверхности клетки. Состоят из определенным образом расположенных микротрубочек, находящихся в выростах клетки.

Ретикулоциты. Незрелые клетки эритроидного ряда, активно синтезирующие гемоглобин.

Рецессивный ген. Аллельный ген, проявляющий свое фенотипическое действие только в гомозиготе; в гетерозиготе он маскируется доминантным аллелем.

Рибонуклеаза. Фермент, расщепляющий фосфодиэфирные связи в РНК.

Рибонуклеотид. Соединение, состоящее из пуринового или пиримидинового основания, связанного с рибозой, которая в свою очередь соединена с помощью сложноэфирной связи с фосфатной группой.

Рибосомная РНК (рРНК). Входящая в состав рибосом нуклеиновая кислота, составляющая до $^2/_3$ всей массы рибосом у *E.coli* и около половины всей массы рибосом в клетках млекопитающих. На долю рРНК приходится около 80 % всей РНК бактериальной клетки.

Рибосомные белки. Группа белков, которые присоединяются к рРНК с помощью нековалентных связей, что приводит к образованию трехмерной структуры рибосомы.

Рибосомы. Небольшие внутриклеточные частицы диаметром ~ 200 Å, состоящие из рРНК и белка. Рибосомы являются центрами белкового синтеза.

Риккетсии. Болезнетворные, сходные с бактериями мелкие клетки, которые являются облигатными внутриклеточными паразитами. Они содержат ДНК и РНК, а также белоксинтезирующий аппарат. Риккетсии вызывают лихорадку Q, сыпной тиф и пятнистую лихорадку Скалистых гор.

Рифампицин. Ингибитор бактериальной РНК-полимеразы.

РНК (рибонуклеиновая кислота). Полимер, состоящий из рибонуклеотидов.

РНК-полимераза. Фермент, который катализирует образование РНК из рибонуклеозидтрифосфатов, используя ДНК в качестве матрицы.

Саркома. Рак соединительной ткани.

Саркомер. Характерная для волокон поперечнополосатых мышц повторяющаяся единица длиной ~ 2,5 мкм, состоящая из набора взаимодействующих нитей актина и миозина.

Сателлитная ДНК. ДНК, содержащаяся в эукариотических клетках и образующая при равновесном центрифугировании отдельную полосу, плотность которой отличается от плотности основной части клеточной ДНК. Во многих случаях сателлитная ДНК состоит из большого числа повторяющихся нуклеотидных последовательностей. Иногда она представляет собой ДНК, содержащуюся в клеточных органеллах.

Сведберг. Единица коэффициента седиментации (S), который пропорционален скорости седиментации молекулы при данном центробежном ускорении и, следовательно, зависит от молекулярного веса и формы молекулы.

Свободная энергия. Энергия, которая способна производить работу.

Селезенка. Лимфоидный орган, расположенный в верхней левой части брюшной полости и функционирующий в качестве хранилища клеток эритроидного ряда, а также благодаря большому числу находящихся в нем макрофагов в качестве фильтра крови.

Сера ^{35}S. Радиоактивный изотоп серы, испускающий β-частицы; его период полураспада равен 87 дням. Этот изотоп очень полезен при изучении белковых систем благодаря его способности включаться в белки в составе серусодержащих аминокислот.

Сиаловая кислота. Производное нейраминовой кислоты, образующееся в результате ацетилирования ее свободной аминогруппы.

Симпатические нейроны. Клетки вегетативной нервной системы; в их функцию входит ослабление секреторных процессов, снижение мышечного тонуса и сужение кровеносных сосудов.

Синапсис. Спаривание (напоминающее соединение застежки-молнии) двух гомологичных хромосом на стадии профазы первого мейотического деления.

Синтез белка in vitro. Включение аминокислот в полипептидные цепи в бесклеточной системе.

Синтетические полирибонуклеотиды. РНК, синтезированные в системе in vitro либо ферментативным, либо химическим путем без использования нуклеиновой кислоты в качестве матрицы.

Сканирующая электронная микроскопия. Электронно-микроскопический метод, позволяющий рассматривать трехмерные структуры, а не тонкие срезы, как при обычной электронной микроскопии.

Скрещивание фагов. Множественное заражение одной бактериальной клетки бактериофагами, различающимися между собой по одному или нескольким генетическим сайтам. Это приводит к образованию в потомстве фагов рекомбинатных частиц, которые несут гены, полученные ими от родительских фагов разных типов.

Слабые взаимодействия (называемые также вторичными связями). Силы, возникающие между атомами и являющиеся более слабыми, чем силы, участвующие в образовании ковалентной связи. К ним относятся ионные и водородные связи, а также вандерваальсовы силы.

Слияние клеток. Образование одной гибридной клетки с ядрами и цитоплазмой, полученными от двух разных клеток. Нередко индуцируется обработкой культуры, содержащей смесь разных клеток, убитым вирусом Сендай.

Соматическая мутация. Мутация любой клетки, которая не предназначена стать зародышевой клеткой.

Сополимер. Полимерная молекула, содержащая мономерные единицы более чем одного вида.

Сопряженная реакция. Термодинамически невыгодная реакция, которая благодаря тому, что она связана с термодинамически выгодной реакцией, направлена в сторону образования продукта.

Спаривание. Сближение двух лежащих бок о бок гомологичных хромосом перед началом кроссинговера.

Спираль. Винтообразная структура, повторяющиеся элементы которой можно описать двумя одновременными движениями — вращением и перемещением вдоль оси. Спираль является природной конформацией многих регулярных биологических полимеров.

Спонтанные мутации. Мутации, возникающие без «видимой» причины.

Спорообразование. Образование из вегетативных клеток бактерий и других микроорганизмов сухих, метаболически неактивных клеток (спор), покрытых толстой оболочкой и способных переносить неблагоприятные условия окружающей среды.

Сродство клеток. Стремление клеток специфически слипаться с клетками только такого же, а не другого типа. Это свойство утрачивается у раковых клеток.

Стабильная линия клеток. Культура клеток, образовавшихся из одной родительской клетки и обладающих способностью к стабильному росту в течение многих поколений.

Стволовая клетка. Клетка, из которой образуются или возникают путем дифференцировки другие клетки.

Стереоизомеры. Молекулы, имеющие одинаковые структурные формулы, но неодинаковое пространственное расположение различных групп, связанных с одним общим атомом. Многие физические и химические свойства стереоизомеров одинаковы, однако они различаются по своей кристаллической структуре, по направлению, в котором они вращают поляризованный свет, а также (что очень важно для биологических систем) по своей способности принимать участие в ферментативных реакциях.

Стерильные пятна. Круглые прозрачные зоны в сплошном слое бактериальных клеток, растущих на поверхности плотной питательной среды. Они образуются в результате того, что после нескольких циклов размножения вирусов в группах соседних клеток последние претерпевают лизис и погибают.

Стерический (стереохимический). Термин, относящийся к расположению в пространстве атомов, входящих в состав молекул.

Стероиды. Соединения, являющиеся производными тетрациклической структуры, которая состоит из циклопентанового кольца, сочлененного с замещенным фенантреновым ядром. Многие стероиды обладают сильно выраженной биологической активностью; к ним относятся, например, половые гормоны и гормоны коры надпочечников (адренокортикостероиды).

Стрептомицин. Антибиотик ($C_{21}H_{39}N_7O_{12}$), выделенный из почвенной бактерии *Streptomyces griseus*. Он специфически связывается с 30S-субчастицами бактериальных рибосом, что приводит к блокировке белкового синтеза.

Субстрат. Вещество, химическое превращение которого катализируется ферментом.

Сумка. Любое образование у животных, имеющее вид сумки или мешка. Фабрициева сумка — это главный лимфоидный орган птиц, в котором В-лимфоциты становятся иммунологически компетентными.

Суперспирали. Скрученные формы ковалентно замкнутых кольцевых двухцепочечных молекул ДНК, образующиеся в результате удаления в процессе очистки белковых компонентов хромосомы, что приводит к небольшому изменению шага двойной спирали.

Супрессорная мутация. Мутация, благодаря которой полностью или частично восстанавливается функция, утраченная в результате первичной мутации. Она локализована в генетическом сайте, отличном от сайта первичной мутации.

Супрессорный ген. Ген, способный подавить фенотипическое проявление различных мутаций в других генах.

Сцепленные гены. Гены, которые локализованы в одной и той же хромосоме и имеют тенденцию наследоваться совместно.

Сывороточный белок. Белок, находящийся в сыворотке крови (т. е. в жидкой фракции крови, не содержащей форменных элементов и белка фибриногена). К сывороточным белкам относятся иммуноглобулины, альбумин, факторы свертывания крови и ферменты.

Таутомерные сдвиги. Обратимые перемещения протона в молекуле, приводящие к изменению химических свойств этой молекулы.

Температурочувствительная мутация. Мутация, приводящая к образованию белка, который функционально активен при низкой (или высокой) температуре, но инактивируется при повышении (или снижении) температуры.

Тетрамер. Структура, образующаяся в результате ассоциации четырех субъединиц.

Тимус (зобная железа). Лимфоидная железа, расположенная в верхней части грудной клетки; особенно развита у животных в молодом возрасте. В тимусе Т-клетки становятся иммунологически компетентными.

Трансдукция. Перенос бактериальных генов из одной бактерии в другую частицами бактериофага.

Транскрипция. Процесс синтеза РНК, направляемый генетической информацией, содержащейся в ДНК. В этом процессе с помощью специфического спаривания оснований на ДНК-матрице образуется комплементарная цепь РНК.

Транслоказа см. Фактор элонгации G.

Трансляционный контроль. Регуляция выражения гена, осуществляемая с помощью контроля над скоростью трансляции, происходящей на определенной молекуле мРНК.

Трансляция. Процесс, с помощью которого генетическая информация, заключенная в молекуле мРНК, определяет порядок расположения аминокислот в синтезируемом белке.

Транспортная РНК (тРНК). РНК, имеющая по меньшей мере 20 структурно сходных типов молекул, характеризующихся мол. весом 25 000. Молекулы тРНК обладают способностью ковалентно связываться с определенной аминокислотой и соединяться с помощью водородных связей по меньшей мере с одним нуклеотидным триплетом молекулы мРНК. РНК этого типа называются также адапторными РНК.

Трансферазы. Ферменты, катализирующие реакции обмена функциональными группами.

Трансформация. Генетическая модификация, индуцированная введением в клетку ДНК, выделенной в чистом виде из других клеток или вирусов.

Третичная структура (белка). Трехмерная укладка полипептидной цепи (или цепей), характерная для белка в его нативном состоянии.

Трехфакторные скрещивания. Эксперименты по генетическому скрещиванию с использованием трех различных генетических маркеров (например, $a^+b^+c^+ \times abc$).

Трипсин. Протеолитический фермент (мол. вес ~23 800), секретируемый поджелудочной железой; расщепляет в белках пептидные связи,

образованные с участием карбоксильных групп основных аминокислот аргинина или лизина.

Тритий ^{3}H. Радиоактивный изотоп водорода, испускающий мягкое β-излучение (период полураспада 12,5 года).

Тропомиозин. Мышечный белок, взаимодействующий с актином с образованием длинных тонких волокон; играет определенную роль в регуляции мышечного сокращения.

Тубулин. Глобулярный белок, состоящий из субъединиц (мол. вес 55 000 и 57 000), правильная спиральная укладка которых обусловливает образование полых цилиндрических микротрубочек.

Тяжелые изотопы. Атомы этих изотопов содержат большее по сравнению с обычным число нейтронов и поэтому имеют большую плотность, чем обычные изотопы (например, ^{15}N, ^{13}C).

Тяжелые цепи. Этот термин относится обычно к тяжелым полипептидным компонентам (мол. вес ~55 000) иммуноглобулина.

Углеводородные боковые группы. Боковые цепи аминокислот, состоящие только из атомов углерода и водорода.

Углерод ^{14}C. Радиоактивный изотоп углерода, испускающий β-частицы (электроны) малой энергии и имеющий период полураспада 5700 лет.

Ультрацентрифуга. Высокоскоростная центрифуга, которая может развивать скорость до 60 000 об/мин и создавать центробежные ускорения, в 500 000 раз превышающие ускорение земного притяжения, что обеспечивает быстрое осаждение макромолекул.

Условно летальные мутанты. Класс мутантов, жизнеспособность которых зависит от условий выращивания (например, мутанты, чувствительные к температуре).

УФ-излучение. Электромагнитное излучение с более короткими длинами волн по сравнению с видимым светом (390—200 нм). Вызывает мутационные изменения пар оснований ДНК и разрывы хромосом.

Фаги см. Бактериальные вирусы.

Фагоцитоз. Процесс поглощения пищи, используемый многими клетками. Он состоит в том, что частицы пищи, соответствующие по своим размерам клеткам, окружаются со всех сторон цитоплазматическими выступами наподобие псевдоподий.

Фазово-контрастный микроскоп. Прибор, позволяющий изменять контрастность изображения наблюдаемых объектов по сравнению с окружающим фоном за счет преобразования разности фаз проходящего или отраженного света.

Фактор антиспецифичности. Белок, в присутствии которого фактор специфичности РНК-полимеразы перестает узнавать сайты инициации. Фактор антиспецифичности синтезируется при заражении клетки фагом Т4.

Фактор роста. Определенное вещество, присутствие которого в питательной среде необходимо для нормального роста клеток.

Фактор элонгации G (EF-G). Белок, называемый также транслоказой, осуществляющий перемещение пептидил-тРНК на рибосоме из участка А в участок П.

Фактор элонгации Т (EF-T). Белок, ответственный за связывание комплексов АА ~ тРНК с рибосомным участком А.

Фактор ρ. Белок, участвующий в процессе правильной терминации синтеза молекул РНК.

Фактор σ. Субъединица РНК-полимеразы, ответственная за узнавание специфических участков на молекуле ДНК, предназначенных для инициации синтеза РНК.

Факторы инициации. Три белка (IF1, IF2, IF3), необходимые для инициации белкового синтеза.

Факторы освобождения. Специфические белки, участвующие в считывании генетических стоп-сигналов в процессе белкового синтеза.

Факторы переноса устойчивости к антибиотикам. Относятся к наиболее часто встречающимся плазмидам, обусловливающим устойчивость бактерий к антибиотикам.

Факторы специфичности. Белки, обратимо ассоциирующиеся с кор-ферментом РНК-полимеразы и определяющие промоторы, с которыми должна связаться РНК-полимераза.

Фенотип. Совокупность всех признаков организма. Фенотип образуется в результате совместного действия генотипа и окружающей среды.

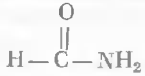
Ферменты. Белковые молекулы, обладающие способностью катализировать химические реакции.

Ферменты рестрикции (рестриктазы). Компоненты клеточной защитной системы рестрикции — модификации, направленной против чужеродных нуклеиновых кислот. Эти ферменты расщепляют немодифицированные двухцепочечные ДНК по определенным последовательностям, обладающим осью симметрии 2-го порядка относительно точки расщепления.

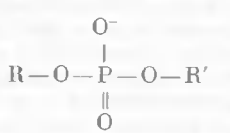
Ферритин. Железосодержащий запасной белок, первоначально обнаруженный в печени и селезенке. Железо составляет до 20 % его веса.

Фибробласты. Дифференцированные клетки, которые очень хорошо растут в культуре. Они имеют форму веретена и растут со скоростью, характерной для клеток соединительной ткани.

Формамид. Низкомолекулярное органическое соединение, используемое для денатурации двухцепочечной ДНК. Формамид присоединяется к свободным NH_2-группам аденина, препятствуя тем самым образованию пар A—T. Он имеет следующую структуру:



Фосфодиэфир. Молекула, имеющая структуру



где R и R′ — углеродсодержащие группы (например, нуклеозиды), O — кислород и P — фосфор.

Фосфолипиды. Липиды, содержащие заряженные гидрофильные фосфатные группы, расположенные в головной части молекулы. Они являются основными компонентами клеточных мембран.

Фосфор ^{32}P. Радиоактивный изотоп фосфора, испускающий β-частицы с высокой энергией и имеющий период полураспада 14,3 дня.

Фузидиевая кислота. Антибиотик, который подавляет действие фактора элонгации G.

Хемио-осмотическая теория. Гипотеза, объясняющая сопряжение процессов переноса электронов и образования АТФ. В этой гипотезе предполагается формирование градиентов концентрации ионов H^+ в направлении, перпендикулярном мембране митохондрии.

Химический канцероген. Вещество, способное вызывать рак.

Холофермент. Активная (полная) форма фермента.

Хроматиды. Две дочерние нити удвоившейся хромосомы, все еще соединенные одной центромерой.

Хроматин. Нуклеопротеидные нити, из которых состоят хромосомы эукариотических клеток.

Хромомера. Конденсированный хроматин эукариотической хромосомы, имеющий вид бусины. Возможно, что хромомера — это область избыточности генов. Она образуется в результате местного скручивания непрерывной хромосомной нити.

Хромосома типа ламповой щетки. Гигантская хромосома, которая образуется в ядре ооцита на стадии диплотены. Почти от всех хромомер этой хромосомы отходят парные петли, которые являются участками активной работы генов.

Хромосомные трубочки. Микротрубочки веретена, которые начинаются у кинетохоров.

Хромосомы. Нитевидные структуры, содержащие наследственный материал клеток и вирусов.

Центриоли. Парные цилиндрические структуры, расположенные в животных клетках в непосредственной близости от ядра. Они состоят из микротрубочек, образующих в каждой центриоли 9 групп по 3 трубочки в каждой группе. Возможно, что центриоли участвуют в формировании веретена.

Центрифугирование в градиенте плотности. Метод разделения молекул или органелл, основанный на различиях в их скорости седиментации при центрифугировании в заранее созданном градиенте плотности раствора какого-либо вещества.

Центрифугирование в растворе CsCl см. Равновесное центрифугирование.

Центромера. Гетерохроматиновый участок эукариотической хромосомы, являющийся местом прикрепления к ней кинетохора. Центромера делится непосредственно перед расхождением реплицированной хромосомы, и, следовательно, она соединяет две сестринские хроматиды.

Церамид. Липид, в состав которого входит жирная кислота, соединенная амидной связью со сфингозином, ненасыщенным аминоспиртом с длинной цепью.

Цереброзиды. Липиды, которые содержат полярную группу углевода, присоединенную к аминоспирту сфингозину. Они находятся в большом количестве в миелиновой оболочке нервных клеток.

Циклический АМФ. Аденозинмонофосфат, фосфатная группа которого образует внутримолекулярную фосфодиэфирную связь между 3′- и 5′-атомами углерода, что приводит к образованию циклической молекулы. Участвует в регуляции выражения генов в бактериальных и эукариотических клетках.

Циклический ГМФ. Гуанозинмонофосфат, фосфатная группа которого образует внутримолекулярную фосфодиэфирную связь между 3′- и 5′-атомами углерода, что приводит к образованию циклической молекулы.

Циклогексимид. Ингибитор белкового синтеза.

Частицы «С»-типа. Класс РНК-содержащих вирусов, определяемых по их внешнему виду в электронном микроскопе. Частицы «С»-типа имеют расположенный в центре сферический РНК-содержащий нуклеоид. Эти вирусы ответственны, по-видимому, за возникновение многих видов сарком и лейкозов.

Частичная денатурация ДНК. Частичное раскручивание двойной спирали ДНК. Участки, сохраняющие интактность, вероятно, богаты ГЦ-парами, поскольку ГЦ-пары, в которых основания связаны между собой тремя водородными связями, более устойчивы, чем АТ-пары, содержащие две водородные связи.

Число оборотов (фермента). Число молекул субстрата, превращаемых за 1 мин одной молекулой фермента в условиях, когда фермент работает с максимальной скоростью.

Шаг спирали ДНК. Число пар оснований, приходящихся на один виток двойной спирали ДНК.

Шероховатая эндоплазматическая сеть. Заполняющие внутреннее пространство клетки многочисленные мешочки, образованные мембранами, к которым прикреплены рибосомы. На этих связанных с мембраной рибосомах синтезируются, по-видимому, секретируемые клеткой белки.

Шпилькообразные петли. Двухцепочечные участки, образовавшиеся в результате спаривания двух смежных комплементарных последовательностей оснований, расположенных в одной и той же цепи ДНК или РНК.

Экзонуклеаза. Фермент, который расщепляет ДНК, начиная с концов цепей.

Экзоцитоз. Процесс, называемый также обратным пиноцитозом. Экзоцитоз представляет собой слияние внутренних мембран клетки с внешней плазматической мембраной. Этот процесс уравновешивает перенос внешних мембран во внутреннее пространство клетки при пиноцитозе и фагоцитозе.

Электронная микроскопия. Метод визуального изучения объектов с помощью электронного микроскопа, в котором вместо световых лучей используются потоки электронов. Позволяет получать большее увеличение, чем световая микроскопия. На биологических объектах дает разрешение ~ 10 Å.

Электрофильный атом. Атом, проявляющий склонность к присоединению электронов.

Электрофорез в полиакриламидном геле. Метод разделения веществ, основанный на том, что при наложении электрического поля молекулы различных веществ движутся через слой полиакриламидного геля с разными скоростями.

Эндогенный вирус. Вирус, который существует внутри клетки-хозяина в провирусной, частично неактивной форме.

Эндонуклеаза. Фермент, который производит внутренние разрывы в цепях углеводно-фосфатного остова молекулы ДНК.

Энергия активации. Энергия, которую необходимо сообщить системе, чтобы данная химическая реакция могла осуществиться.

Эписома. Генетический элемент, который может существовать либо в свободном состоянии, либо как часть нормальной хромосомы клетки. Эписомами являются, например, половой фактор F^+ и ДНК лизогенизирующих фагов.

Эпителий. Ткань, образующая наружный покров или выстилающая внутренние поверхности любого органа или организма.

Эритробласт. Клетка костного мозга, содержащая ядро и превращающаяся в процессе дифференцировки в эритроцит.

Эритроцит. Зрелая, богатая гемоглобином, не содержащая ядра клетка эритроидного ряда, которая участвует в переносе кислорода.

Эстроген. Гормон, продуцируемый яичниками.

Эукариот. Организм, клетки которого содержат ядерные мембраны, окруженные мембраной органеллы и 80S-рибосомы, а также отличаются характерными для них особенностями биохимических процессов.

Эухроматин. Активный хроматин, который обычно не обнаруживается визуально на протяжении всей интерфазы. Эухроматиновые участки хромосом активно транскрибируются.

Ядрышко. Круглая гранулярная структура, находящаяся в ядре эука-

риотических клеток и ассоциированная обычно со специфическим участком хромосомы. Принимает участие в синтезе рРНК и формировании рибосом.

In vitro (лат. «в стекле»). Этот термин относится к экспериментам, которые проводятся с использованием бесклеточной системы. В последнее время этим термином обозначают также эксперименты по выращиванию клеток многоклеточных организмов в культуре.

In vivo (лат. «в живом»). Термин, относящийся к экспериментам, в которых используются условия, не нарушающие целостности организма. Такие эксперименты проводятся либо на уровне клетки (бактерии), либо на уровне целого многоклеточного организма.

Предметный указатель

Адапторная гипотеза 289, 291
Адгезивные бляшки 554, 555
Аденилатциклаза 373—374
— действие соматомедина 541—542
— ингибирование комплексом инсулин — рецептор 547
— синтез цАМФ 547
— стимуляция активности 547
Аденовирусы, влияние на клетки человека 642—643
— геном 643
— ДНК 644—645
— — репликация 644
— жизненный цикл 643—644
— литическая инфекция 643
— структура 643
— трансформация клеток 645—646
— электронная микрофотография 396, 644
Аденозиндифосфат (АДФ) 113, 115
— акцептор фосфата 42, 48, 49
Азотистая кислота, замены аминокислот в белке ВТМ 349
— — как мутаген 241, 242
Аксоподии, структура 455
Активация аминокислот 117—118, 299—301
— нуклеотидмонофосфатов 118—119
— путем переноса групп 115—117
Активированное состояние 110
Активированные молекулы 116
Активирующие ферменты, роль в биосинтезе белка 208—290, 301—302
— — специфичность узнавания 290, 301
Актин 445—448
α-Актинин 445
— роль в мышечном сокращении 449—450
Аланиновая тРНК, нуклеотидная последовательность 292
Аллели 21
Аллостерические белки 406
— эффекторы 406
Аллотипы 601
α-Аманитин 462
Амебоидное движение клеток 445
— — — роль мышечных белков 445—449
Аминоациладенилаты 113
— синтез белка 118
Аминоацилсинтетаза 118
— активация аминокислот 299—301
— специфичность 301
Аминокислотная последовательность инсулина 128, 131
— — химотрипсина 128, 131
Аминокислотное голодание 326
Аминокислотные замещения в белке А триптофан-синтазы 182
— — — мутантных типах гемоглобина 180
Аминокислоты, активация при биосинтезе белка 117—118, 299—302
— последовательность в белках, контроль генами 180—182
— разделение 53
— стереоизомеры 96
— формулы 71
Амплификация гена 513
— генов рРНК 510—511
Аденозинмонофосфат (АМФ), образование в реакциях биосинтеза 115
Антибиотики, действие на трансляцию 324
Антиген, комплекс с антителом 91, 572, 574—576
— определение 569
— свойства 569—571
— связывание с лимфоцитами 595
— функция 593
Антигенные детерминанты 571
Антиметаболит 3′-дезоксиаденозин 282
Антитела, активные центры 584
— — — сохранение специфичности при превращении IgM в IgG 602—603
— аллотипы 601
— белки миеломы 578
— вариабельные области 579, 580
— — — последовательность 587, 588
— гены для разных форм тяжелых цепей 600
— — расположение 601
— гипервариабельные участки 584, 586
— гуморальные 571
— классы 573—574
— клонально-селекционная теория 593
— константные области 579, 580
— легкие цепи, две формы 599—600
— мРНК 604
— на поверхности малых лимфоцитов 593—594
— причина разнообразия 598
— протеолитическое расщепление 582—584
— связывание с антигеном 574, 576
— синтез плазматическими клетками 590—592
— сочетание V- и C-генов 607
— специфичность 575—577
— структура тяжелой цепи 580, 581
— — IgG 574—575
— — — гомологичные участки 581
— узнавание чужой молекулы 600

Антитела, укладка полипептидной цепи иммуноглобулина 584, 585
— число генов 604—605
Антитерминатор, роль в жизненном цикле фагов 415
Антифакторы специфичности 489—490
Анэуплоидия 529
Аппарат Гольджи 466—468
Арабинозный оперон, контроль 381—383
Аргинин, биосинтез 175—176
Аттенуатор 383—384
АТФ, активация аминокислот 117—118, 299—301
— — дезоксимононуклеотидов 118—119
— в гликолизе 114
— — реакции переноса групп 115—117
— генерация в цикле Кребса 47
— донор энергии 42, 115—119, 120
— образование при окислительном фосфорилировании 47, 50
— — — фотосинтезе 48
Афлатоксин В 662
Аффинная хроматография, очистка гормонального рецептора 543
Ацетил-КоА, биосинтез жирных кислот 79, 113
— образование из пирувата 46
— роль в обмене веществ 80

Базальное тельце 457
Бактериофаг Т2, доказательство существования мРНК 306
— — жизненный цикл 400
— — структура 152, 395
— — хромосома 204, 205
— — электронная микроскопия 395
— Т4, генетическая карта 168
— — делеции в области r II 173, 174
— — жизненный цикл 400
— — карты генов 171—174
— — компоненты белковой оболочки 180
— — контроль функционирования генов 406—409
— — кроссинговеры в процессе размножения 169
— — модификация рибосом *E. coli* и синтез новых тРНК 404
— — мутанты по области r II 171
— — области r II в генетической карте 172
— — отсутствие цитозина в ДНК 399, 401, 402
— — разрушение хромосомы *E. coli* 404
— — регуляция белкового синтеза 406
— — сборка 401, 403
— — синтез лизоцима in vitro 336
— — средний размер гена 246
— — структура 152
— — транскрипция в клетке-хозяине 407—409
— — фактор специфичности 407—409
— Т6, структура 152
— Т7, генетическая карта 411
— — — характеристика 409—410
— — конкатемеры ДНК 220—221
— — контроль функционирования генов 410—412
— — размер генома 409—410
— — репликация ДНК 211—212, 419, 420
Бактериофаг Т7, РНК-полимераза 410
— — транскрипция in vitro 279, 280
— — электронная микроскопия 410
— λ, взаимопревращения линейной и циклической форм ДНК 205—207
— — включение ДНК в хромосому клетки 154—155
— — генетическая карта 245,412
— — инактивация репрессора 415
— — корреляция генетической карты и участков ДНК 242—246
— — кроссинговеры при размножении 169
— — лизогенизация 154—155
— — модель интеграции 262
— — поздние гены 415—417
— — последовательность правого оператора 413—414
— — размер 413
— — репрессорный контроль профаговой формы 413—415
— — средний размер гена 246
— — структура 152
— — фактор терминации 415
— ϕ X174, генетическая карта 418
— — функции генов 417—419
— — электронная микроскопия 418
Бактериофаги, генетическая рекомбинация 166—169
— *E. coli* 152—153
— морфология стерильных пятен 153
— трансдукция 162
— условно летальные мутанты 166
— частота кроссинговера 169
Бактерия, гаплоидное состояние 13
— карта хромосомы *E. coli* 229—230
— кольцевая структура хромосомы 205
— мезосомы 233—234
— метаболическая неустойчивость мРНК 385—386
— образование колоний 63
— плазмидные компоненты 161, 162
— преимущества для генетических исследований 147—148
— спорулияция 482—483
— формирование метионил-тРНК 314—317
Белки, аминокислоты как строительные блоки 72—73
— Бенс-Джонса 578
— биосинтез, адапторная гипотеза 289, 291
— — инициация 314, 316—317
— — — инициирующий комплекс 317—319
— — мРНК в роли матрицы 305—306, 333—335
— — направление трансляции 314—315
— — при функционировании клетки 516
— — роль активирующих ферментов 290, 301—302
— — — РНК 269—271, 329
— — факторы инициации 319
— — — освобождения 325
— — — элонгации 321—324
— важность участия во всех клеточных процессах 122
— вирус-специфические 404
— вторичная структура 134
— денатурация 135, 136
— матрицы для синтеза 136—139

Белки, нативная конформация 134—135
— первичная структура 132—133
— принцип самоорганизации 105—106
— процессы после завершения синтеза 326—327
— различное содержание в разных клетках 366
— содержание в хромосомах высших организмов 142
— субъединичная структура 104—105
— третичная структура 134—135
— химические доводы против самокопирования 198—199
Белок, активирующий катаболитный ген (БАК) 374—375
— — — — активация циклическим АМФ 374
— — — — действие на уровне транскрипции 379
— — — — структура 374
Бензпирен 622
Бессмысленные мутации (нонсенс-мутации) 348
— — образование неполных полипептидных цепей 350
— — супрессоры 352—355
Бесшерстные мыши 590
— — выявление онкогенного потенциала раковых клеток 625
Биосинтез аргинина 175—176
— белков *см.* Белки, биосинтез
— гистидина 177
— гликогена 128—129
— пуринов 122—125
— серина 123
— триптофана 182
— уридин-5′-фосфата 124
— хлорофилла 125—128
Биосинтетические пути у *E. coli* 78—79
Бластула 478
Блокирующие антитела 624
Брожение 37
— в бесклеточном экстракте 39
— фосфорилированных промежуточных продуктов 39
5-бромурацил 241, 243
— применение при отборе мутантных клеток 538—539

Валин 529
Ван-дер-ваальсовы силы 87—88, 89—91, 96—97
— — гидрофобное взаимодействие между неполярными группами 96—97
— — радиус атомов в биологических молекулах 89
— — роль в биосинтезе белка 290
— связи 87
Веретено 12—13
— выделение in vitro 459
— структура 457—458
— функционирование 458—459
Вироиды 432
— электронная микроскопия 433
Вирус полиомы, ДНК 627—628
— — лизис клеток-хозяев 629
— — структура 626
— — трансформация клеток 629
— — хромосома 627—628
Вирус полиомы, число генов 627—628, 633, 634
— — электронная микроскопия 627
— Сендай, слияние клеток 516, 620
— табачной мозаики, доказательство генетической роли РНК 397—398
— — — самосборка 399
— — — структура 396—397
— — — субъединичная структура 104
— — — электронная микроскопия 396
— Эпштейна—Барра 649—651
— SV-40, включение ДНК в хромосому клетки-хозяина 638
— — высвобождение инфекционных частиц после слияния клеток 638
— — жизненный цикл 632—633
— — изучение ДНК с помощью ферментов рестрикции 630—631
— — индукция ферментов клетки-хозяина 633—636
— — инфекционность ДНК 632
— — лизис 629
— — опухолеспецифические трансплантационные антигены 641
— — позитивный контроль генов 639—640
— — репликация ДНК 224, 627—628, 636
— — секреция «клеточного фактора» трансформированными клетками 641
— — синтез поздней мРНК 636
— — структура 626
— — супервитки ДНК 205
— — схематическое изображение 628
— — Т-антиген 632—633
— — — роль в трансформации клеток 641
— — трансформация клеток 629, 637
— — физическое картирование 630—631
— — хромосома 205, 627—628
— — число генов 627—628, 633, 634
Вирусные нуклеиновые кислоты 398
Вирусы, генетическая роль нуклеиновых кислот 192—193
— изменение метаболизма клетки 401—404
— инфекция и размножение 151
— использование в генетических исследованиях 150
— как причина рака 625—626
— контроль наследственности 150
— лизирующие 154
— лизогенизирующие 154
— независимость друг от друга синтезов белка и нуклеиновой кислоты 398
— нижние пределы размеров 429—432
— нуклеиновые кислоты 398
— общая структура 394—398
— отличие от клеток 394—397, 432
— паразиты на генетическом уровне 152
— повторная инициация репликации ДНК 419
— последовательность функционирования генов 406
— размер и форма 150—151, 429—432
— репликация ДНК 197, 201
— — РНК 420
— самосборка 399
— синтез специфических белков 404
— факторы инициации при репликации ДНК 419

«Витализм» 31
Витамины, связь с коферментами 51
Вода, изображение решетки, образованной молекулами воды 94—95
— полярная природа 88—89
Водородные связи 92—93
— — в биологических молекулах 92, 193, 196
— — — третичной структуре тРНК 295—298
— — между молекулами воды 94
— — роль в двухцепочечной структуре ДНК 101—104
— — сила 87, 93
Возбудители пневмонии, роль в открытии трансформации 163
Волнистые края (ламеллоподии) 452
Врожденные нарушения обмена аминокислот 28
— — — серповидноклеточная анемия 175—177, 180
Вставки 238
— мутации со сдвигом рамки 265—266
— происхождение 258—260
— супрессоры 351—352
Вторичная структура белков 134
Вторичные иммунные ответы 595—597
— клетки 527
Второй закон термодинамики 86
Вырожденность генетического кода 342
Высокая частота рекомбинаций (Hfr) бактериальных клеток 156—157
Высокоповторяющиеся последовательности 505—506
Высокоэнергетические связи, активация аминокислот 299—301
— — важнейшие типы 113, 115—116
— — свободная энергия гидролиза 112—113
— — — — образования 112

β-Галактозидаза, количество у *E. coli* 363—364
— репрессор, его структура и количество 367
— структура 364
β-Галактозидацетилаза 370
— система синтеза 371
β-Галактозидпермеаза 370
— система синтеза 371
Ганглиозиды, синтез 561
Гаплоидное состояние 13
Гаптены 571
Гаструла 478
Гем 133
Гемоглобин, замены аминокислот в мутантных типах 180—181
— и серповидноклеточная анемия 175, 180, 181
— использование его системы синтеза для выяснения направления трансляции 314
— контроль α- и β-цепей разными генами 178, 180
— мутации в кодонах 349
— — — — терминации 355
— одиночные копии генов в гаплоидном наборе 504
— связывание кислорода 133
Гемоглобин, стабильность мРНК в эритробластах 513—514
— субъединичная структура 105—106
Генетическая инженерия 263
— — сайт-специфические нуклеазы 261—263
— карта 145
— — дрозофилы 146
— — *E. coli* 161
— — корреляция с участками ДНК 242—246
— — области r II фага T4 172
— — фага T4 168
— рекомбинация в бактериофагах 166—169
— — внутригенная в локусах r II 171—174
— — и половой процесс у бактерий 149—150
— — кроссинговер во время мейоза 142—143
— — трансдукция 162—163
— — трансформация 163—164
Генетический код, вырожденность 342—343
— — использование синтетических мРНК 336—338
— — определение последовательности нуклеотидов в кодонах 340—342
— — состав кодонов, использование в качестве матриц сополимеров 338—339
— — считывание группами из 3 оснований 265—266
— — таблица 341
— — универсальность 360—361
Генетическое картирование 171—175
— — делеций мутантов 173, 244—246
Генная конверсия 256
Генотип 17
Гены антител 604—605
— влияющие на иммунную реакцию 607—608
— дикого типа 22
— *E. coli*, расположение в хромосоме 158—160, 161
— картирование 171—174
— коллинеарность 181—182
— контроль последовательности аминокислот в белках 180—181
— локализация в хромосомах 21, 22
— мутантные 22, 178
— первые представления 27
— рРНК 508—511
— с взаимосвязанными функциями, расположение 178—180
— — — — тест на комплементацию 179—180
— современное определение 174, 190—193
— среднее число нуклеотидов 246
— сцепленные 23
— тканевой совместимости 608
— — — — в гаплоидном наборе 504
— число, соответствие числу дисков у дрозофилы 501—502
Гены-регуляторы 366
Гены-супрессоры 351
— специфичность 352
— считывание бессмысленных кодонов 352—354

Гены-супрессоры, эволюция 360
Герпесвирусы, встраивание в клеточную ДНК 649
— геном 647
— размножение 648—649
— структура 395, 646—647
— электронные микрофотографии 395, 648
— Эпштейна—Барра 647, 649—651
Гетеродуплексы, морфология стерильных пятен 256, 257
— происхождение 256
— расщепление с исправлением и без исправления дефектов 256, 257
Гетерозиготность 17
Гетерозиготы и взаимоотношения ген—фермент 178
Гетерохроматин 492, 494
Гибридизация ДНК—ДНК 196, 244
— ДНК—РНК 277—279, 307
Гидролазы 116
Гидролитические реакции 76
Гидрофобное связывание 96—97
Гипервариабельные участки 584, 586
Гипотеза «качаний» (wobble-гипотеза) 343—345
Гипофизарный гормон роста 541
Гистидин, биосинтез 177
— группировка генов, необходимых для его биосинтеза 179
— ферментативное расщепление 380
Гистоны 142, 459—462
— множественные копии генов 504—505
Гликоген, биосинтез 128—129
— структурная организация 72, 74
— участие в метаболизме клеток 77
Гликолиз 39
— образование и распад АТФ 114
Гликолипиды, путь синтеза 562
— структура 440
Гликопротеиды, внедрение в двойные слои липидов 441—443
— специфические изменения в трансформированных клетках 561—562
Гликофорин 442
Глюкагон, стимуляция аденилатциклазы 547
Глюкоза, источник углерода в процессах метаболизма клеток 77—79
— как источник энергии 110
— катаболизм, влияние на уровень циклического АМФ 37—39, 114, 373—374
Глютаминсинтетаза 380
Гомозиготность 17
Гормональные рецепторы 543
— комплексы со стероидами 520
Гормоны, стероидные 517—521
— эффект на уровень цАМФ 547
Горячие точки 172, 238
— — неправильное спаривание оснований 260—261
Градиенты полярности 423
Гранулоцитопоэтин 550
Группировка взаимосвязанных генов 178—180
Гуанилатциклаза, действие митогенов 548
Гуанозинтрифосфат (ГТФ), действие на трансляцию 325—326
— образование 116
— роль в инициации трансляции 319
Гуанозинтрифосфат, роль в терминации трансляции 325—326
— — — элонгации полипептидной цепи 322—323
Гуморальные антитела 571

Двухфакторное скрещивание 144—145
Делеции 238—239
— картирование в репатурированных ДНК 244—245
— мутантов в области rII бактериофага Т4 173
— — физическое картирование 173, 174
— мутации со сдвигом рамки 265—266
— происхождение 258—260
— супрессоры 351—352
Денатурация макромолекул 41—52, 103—104
— обратимость 135—136
Денатурирующие агенты 135—136
Динеиновые выступы 457
Диплоидное состояние 13
Дисульфидные связи 133
— — важность в структуре антитела 574—575
— — расположение в молекуле химотрипсиногена 133
— — роль в третичной структуре белка 134—135
— — специфичность образования при ренатурации белка 135, 136
ДНК, взаимопревращения линейных и кольцевых молекул 205—207
— водородные связи 101—103
— выделение 191
— высокоповторяющиеся последовательности 505—506
— генетическая роль 55, 163
— двойная спираль 56, 101—103, 193
— денатурация и ренатурация 196, 278
— *E. coli* 81
— инфекционность вирусных молекул 632
— кодирование РНК лягушки 511—513
— кольцевая 205
— — репликация 222—227
— — супервитки 205
— конкатемеры 220—221
— корреляция количества со сроком жизни организма 507—508
— липкие концы 206, 207
— матрица для синтеза РНК 275—279
— модель Уотсона—Крика 57
— отношение АТ/ГЦ 195, 196
— палиндромы 208—209
— пространственная структура, модель 193—196
— раделение цепей 201—202
— ренатурированная, электронная микрофотография 245
— репарационный синтез 232—233
— репликация аденовирусов 644
— — активация предшественников 118—119
— — бактериофага Т7 211—212, 419, 420
— — в вирусе SV-40 627, 628, 636
— — инициация РНК-затравками 217—220
— — исправление ошибок 216—217

ДНК, репликация in vitro 231—232
— — картирование генов в хромосоме *E. coli* 230
— — кольцевых молекул 222—227
— — линейных молекул 211—214
— — общий рост цепи 212—214
— — одноцепочечной ДНК 201—204
— — связь с мезосомами 233—234
— — терминация 220—222
— — у эукариотов 492
— рентгенограмма 194
— самовоспроизведение 197—198
— сателлитные 505
— — различия в количестве у близкородственных видов 506—508
— синтез в бесклеточной системе 199—200
— — in vitro 231
— содержание в различных клетках 476—477
— устойчивость при физиологических температурах 103
— фаговая 417—419
— физическое картирование 630—631
— фрагментация в гомогенизаторе 243
— химическая стабильность 196 198
— химическое сравнение с РНК 272
— частичная денатурация, карты 209—210
— эукариотов, инициация синтеза 537—538
ДНК-полимераза *E. coli*, исправление ошибок 216—217, 240
— свойства 214—216
— I, вырезание тиминовых димеров 232—233
— — выщепление затравки 218—219
— — свойства в бесклеточной системе 199—200
— — структура 199
Доминирование 18
Дробление яйцеклетки 478—479
Дрожжи, аланиновая тРНК 291—294
— как простая модельная система 482—487
— электронная микрофотография ДНК 485
— — — в процессе почкования 486
Дрозофила, наследование признаков, сцепленных с полом 21—24
— определение пола 21—22
— преимущества как объекта исследования 21
— таблица мутаций 25
— установление числа генов 501—502
— участок генетической карты 146
— цвет глаз 25—26
Дыхание, химические реакции 34, 36
Дыхательные ферменты 45—48

Единство биохимических процессов 39
Енолфосфаты как высокоэнергетические соединения 113
E. coli, арабинозный оперон 381—382
— — бактериофаги 152
— — вариации количества различных белков 363—365
— — включение в хромосому ДНК фага λ 154—155
— — влияние температуры на рост 63
E. coli, время генерации 63
— — генетическая карта 161, 230
— — гены-супрессоры 352
— — гены, участвующие в репликации ДНК 229—230
— — ДНК 63—64, 67—69, 81
— — ДНК-полимеразы 214—216
— — клетки Hfr 157
— — кривые роста 64, 65
— — лактозный репрессор 367
— — мембраны 66
— — мРНК 311
— — мутанты с измененной устойчивостью к антибиотикам 149
— — — выделение нуждающихся в факторе роста 148—149
— — — устойчивые к фагам 149
— — направление транскрипции 279
— — основные метаболические пути 78—80
— — половой процесс 66, 149, 154—157
— — — фактор 156
— — предшественники тРНК и рРНК 308—309
— — приблизительный химический состав 70
— — рестриктаза R_1 630
— — свойства 63—66
— — синхронизированный рост 63
— — сравнение содержания ДНК с другими бактериями 476—477
— — стабильность мРНК 385—386
— — структура рибосом 303—305
— — таблица мутантных генов 158—160
— — триптофановый оперон 383—384
— — хромосома 63—66, 70
— — — кольцевое строение 157—161
— — — размер 205
— — штамм К 171, 173
— — экспоненциальный рост 63, 64
— — электронная микрофотография 64, 67, 428

Жировые клетки, образование в культуре клеток 551—552
— — электронная микрофотография 551

Законы Менделя 15—20
Затравка при репликации ДНК 217—220
Земноводные, экспериментальные объекты эмбриологии 478

Иглокожие, особенности эмбрионального развития 478—479
Идиотипы 605—607
Изолейцин, путь биосинтеза 389
Изомеризация при кроссинговере 254
Изотопы, локализация белкового синтеза 269—270
Иммунная реакция 569
— — влияние генов 607—608
— — в ходе эмбрионального развития 614
— — превращение IgM в IgG 602—603
— толерантность 610, 611
Иммунный надзор 624
Иммуноглобулин EU, аминокислотная последовательность 579—580
— — — — гомология в константных областях 581—582

Иммуноглобулин ЕИ, κ-цепь 599—600
— — λ-цепь 599—600
Иммуноглобулины *см.* Антитела
Иммунологическая память 596
Индукторы 365
— взаимодействие с репрессором 369
— эмбриональные 481
Индуцируемые ферменты 365
Инициация, кодоны 347
— факторы 319
— — в процессе репликации вирусной ДНК 419
Инозин 343—345
Инструктивная гипотеза образования антител 575, 577
Инсулин, аминокислотная последовательность 128, 130
— — — гомологии с фактором роста нервов 545
— имитация действия соматомедина 542
— инактивация аденилатциклазы 546
— очистка рецептора 543
— превращение из проинсулина 327
Ионная связь 93
— — сила 87, 93

Канцерогены 621—622
Кинетохор 457, 490
Клетка 11
— нижний предел размера делящихся клеток 433—434
Клетки иммунологической памяти 596
— — — зависимость формы от содержания в среде сыворотки 529
— — — основная ростовая среда 532
— — — слияние 516—517, 537
— HeLa 526—529
Клеточная дифференцировка, внешние силы 479
— — митотическое деление хромосом 480
— — обратимость или необратимость 479—480, 514—515
— — позитивный или негативный контроль 480—481
— — центральная проблема эмбриологии 479—480
— мембрана, принцип самоорганизации 105
— теория 10—11
— — универсальность 14
— трансформация 533
— — аденовирусом 646, 647
— — вирусом полиомы 629
— — — SV-40 629, 646
— — изменение уровня гликопротеидов 562
— — под влиянием инактивированных герпесвирусов 648—649
— — РНК-содержащими онкогенными вирусами 659
— — состав плазматических мембран трансформированных клеток 558, 560—563
Клеточные линии, «нормальные» 533
— — — свойства 526—528
— — происхождение 529—531
— — ЗТ3, превращение фибробластов в жировые клетки 551—552
— — — рост 533
— — — свойства 526
Клеточный иммунитет 571—572
— — отторжение трансплантата 608
— — роль тимуса 589—590
— цикл 535—537
— — вариация уровня дезоксинуклеозидтрифосфатов 537—538
«Клеточный фактор» 563—565
Клонально-селекционная теория 593
Ковалентные связи 42, 110
— — образование 87
— — определение и характеристика 83, 85—87
— — стабильность в физиологических условиях 42, 83
— — энергия активации 110
Кодоны, вырожденность 342—343
— инициации 347
— таблица 341
— терминации 348
— частота встречаемости 345—347
— — — в РНК фага MS2 346
Коллинеарность гена и его полипептидного продукта 181—182
Колхицин, блокирование роста клеток на стадии М 540
— связывание с микротрубочками 455
— — — — веретена 457
Кольца Бальбиани 501
— — электронная микрофотография 500
Комплекс Н-2 607, 608
— HL-A 608
Комплемент 572—573
Комплементарные структуры в комплексе антиген—антитело 91
— — слабые взаимодействия 94
Конканавалин А как митоген 547
— трансформация лимфоцитов 597—598
Конкатемеры ДНК 220—221
Константа равновесия 86, 110
Конститутивные белки 366, 387
— — синтез 371
— мутанты 366
Контактное торможение движения клеток 554
Копирование с переменой матриц 247—249
Корепрессоры 365
— взаимодействие с репрессором 369
Корректирующая роль ДНК-полимеразы
— — фактора EF-T 323
Коррекция ошибок при выборе аминокислот 302
Кор-фермент 283
Коферменты 36—37
— и витамины 51
Кривые роста *E. coli* 64, 65
Кровь, дифференцировка различных клеток 550
— содержание эритроцитов 549
— эритропоэтин 549, 550
Кроссинговер 23, 142
— визуальное наблюдение 255
— внутригенный 171—174
— в хромосомах бактериофагов 168—169
— гетеродуплексы 225—256
— изомеризация цепей ДНК 254
— независимость от репликации ДНК 248—249
— обмен цепями ДНК 252—253
— оценка частот рекомбинаций 144
— ошибка, появление вставок 258—260

Кроссинговер, разрыв и воссоединение 247—249
— ранние представления 247
— расплетающие белки 250
— реципрокная и нереципрокная рекомбинация 256, 258
— роль нуклеаз 250, 252
— современная модель 254—255
— спаривание оснований 249—251
Культура тканей 61
— — блокирование роста 539—540
— — высших организмов 61, 526—529
— — зависимость формы клеток от содержания в ростовой среде сыворотки 529—530
— — «критический период» 527
— — микроорганизмов 62—63
— — необходимость добавления в ростовую среду сыворотки 533
— — основная среда 532—533
— — рост в суспензии и на твердых поверхностях 531
— — синхронизация 535

Лактоза, гидролиз 364
Лактозный оператор, нуклеотидная последовательность 368, 378
— оперон 384—385
— — позитивная регуляция 373
— — схематическое изображение 371
— промотор 375
— — последовательность 376—378
— — функциональные участки 376—379
— репрессор, структура и количества 367
Лектины 541
— избирательное осаждение раковых клеток 558
— трансформация лимфоцитов 597
Лизирующие вирусы 154
Лизис клеток в результате размножения фагов 153
— стерильные пятна 154
Лизогенизирующие вирусы 154—155
— — жизненный цикл 155
Лизогенная бактерия 154
Лизосомы 486—487
Лизоцим, роль при размножении вирусов 399—400
— синтез in vitro 336
Лимфобласты 590
— электронная микрофотография 591
Лимфокины 573
Лимфома Беркита 649—651
Лимфоциты В 590
— возможное образование 589
— Т 590
— трансформация 590, 591
Линкомицин 325
Липидные двойные слои 439—443
— — — внедрение белков 441—443
— — — полужидкое состояние 443
— — — структура 439—441
Липиды, структурная организация 66—68
Липкие концы 206—207
— — образование у фрагментов, полученных после расщепления ДНК сайт-специфическими нуклеазами 261—263
Макромолекулы 31, 75, 76
— денатурация 51—52
— молекулярный вес 52
— рентгеноструктурный анализ 53—54
— структурная организация 72—77
Малые лимфоциты 588
— — иммуноглобулины на поверхности 593—595
— — клетки иммунологической памяти 596
— — неспецифическая трансформация 597—598
— — электронная микрофотография 588
Матрица, требования при синтезе белков и других полимеров 136—138
Межгенная супрессия 351—352
Межгенные промежутки 241
Мезосомы, роль в репликации ДНК 233—234
Мейоз 13—14
— генетические рекомбинации в результате кроссинговера 142—143
— обмен генами 24
Мембраны *E. coli*, электронная микрофотография 66—67
— как компоненты клеток 10—11
— необходимость для сопряжения окислительно-восстановительных реакций 51
— симметричное строение 441
— слияние 443—444
Меркаптоэтанол как денатурирующий агент 135
Метаболические пути 77—80
— — основные для *E. coli* 78—79
— — распада 77—80
— — — и их отличие от путей биосинтеза 80
— — снижение свободной энергии 111
— — точка разветвления 80
Миелома, белки для изучения антител 578
— множественная 578
Микроворсинки 450—452
Микроорганизмы, преимущества их использования в генетических исследованиях 147
Микротрубочки, каркас ресничек 456—457
— контроль формы клетки 455
— структура 452—454
Микрофиламенты 445
Микроцепи 450—452
Минорные основания мРНК 293—294
— — тРНК 345
Миобласты, культивирование 552—553
— поперечнополосатые мышечные волокна 552
Миоглобин 132
— связывание кислорода 133
— трехмерная структура 132
Миозин 445
Миссенс-мутации 348
— супрессия 356—357
Митогены 541
— действие на аденилатциклазу 547
— изменение уровня цГМФ 548
Митоз 11—14
— митогенные стимулы 541
— понижение уровня цАМФ 536
— прекращение синтеза РНК и белков 535—536

Митоз, стимуляция стероидными гормонами 549
— хромосомная сегрегация 457—459
Митохондрия, ДНК 471
— локализация процессов окислительного фосфорилирования 471
— рибосомы 471
— тРНК 471—472
— эволюция 469—471
— электронная микрофотография 270, 470
Множественная миелома 578
Модель катящегося кольца для репликации ДНК 225
— — — амплификация генов 510—511
— — — механизм 225—226
— — — синтез одноцепочечных ДНК 227
— клеверного листа для тРНК 292, 294—299
Молочная кислота, выделение раковыми клетками 554
Мононуклеоз 649—651
Морфогенетические пути сборки вирусов 401—403
Мочевина как денатурирующий агент 105—106, 135
Мутагены 148, 241, 242
Мутантные гены, нефункциональные продукты белка 178
Мутации, вызываемые рентгеновскими лучами 27
— горячие точки 172
— делеции 238—239
— *E. coli* 158—160
— — — использование факторов роста 148—149
— — — устойчивость к антибиотикам 149
— замены одних пар оснований другими 237—238
— изменение морфологии стерильных пятен 165
— кроссинговер 258—260
— локализация в гене, тест на комплементацию 174—175
— миссенс 348
— нонсенс 348
— «обратные» 186—187
— с неполным нарушением функции (leaky-мутации), происхождение 265
— соматические, причины рака 621
— со сдвигом рамки 265—266
— средняя частота 238—240
— супрессия 186—187
— типы 238, 239
— условно-летальные 165—166
Мутирующий участок 183—184
Мышечное сокращение, α-актинин 445—450
— — роль ионов Ca^{2+} 452
— — схема механизма 447
Мышечные белки 445—449
— — дезориентация в раковых клетках 557—558

Наследственность, хромосомная теория 16, 20—21
Негистоновые белки, активизация синтеза РНК в ядре 549
Нейраминидаза как митоген 541
Нейробластома мыши 530
Непермиссивные клетки 630
— — трансформация 638—639
Неполярные молекулы 88—89
Нереципрокная рекомбинация 256, 258
Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) 36—37, 38
Нитрозамины 622—623
Нитрозогуанидин как мутаген 148
Нуклеазы, роль в кроссинговере 250, 252
— типы 207—208, 209
Нуклеиновые кислоты, нуклеотиды как строительные блоки 73, 75
Нуклеосомы 461—462

Обратная транскриптаза 432, 653—654, 656—657
— — подход к идентификации онкогена 659—661
Окисление биологическое 36—37
Окисление—восстановление, образование АТФ 47, 51
Окислительное фосфорилирование 47—48
5-оксиметилцитозин 399, 401
Оксимочевина, блокирование роста клеток в фазе S 540
Онкоген 659—661
Ооцит, гены рРНК 510—511
— петли хромосом при его созревании 494—497
Оператор 367
— конститутивный синтез белка 371
— симметричность нуклеотидной последовательности 368
Оперон Hut, позитивный контроль 379—380
Опероны 370
— генетическое доказательство существования 370—371
— действие специфического репрессора 370
Оплодотворение 13
Определение пола 21
— — и наследование генов, сцепленных с полом 22
Опухолеспецифические трансплантационные антигены 641
Опухоли 525
Основные положения транскрипции 268—269
Открытые участки инициации репликации ДНК 492—493
Отношения АТ/ГЦ 195, 196

Палиндромы 208—209
Папаин, гидролиз антител 582
Пепсин, гидролиз антител 582
Пептидная связь 73
— — гидролитический разрыв 76—77
— — плоская конфигурация 84
— — энергия образования 115
Первичная структура белка 132—133
Первичные иммунные ответы 595—597
— клетки 526
«Первичный бульон» 437
Первый закон термодинамики 86
Пермиссивные клетки 630, 639, 640
Пероксисомы 468

Пиноцитоз 443—444
Пиримидины, биосинтез уридина 124
— строительные блоки нуклеиновых кислот 73—75, 193—196
— формулы 32
Пирофосфат, важность для биосинтетических процессов 119
— как высокоэнергетическое соединение 112—120
— расщепление 119—120
Пирофосфатаза 119—120
Плазматическая мембрана 438—443
Плазматические клетки 590
— — синтез антител одного типа 590, 592
— — электронная микрофотография 591
Плазмиды 161, 162
Плазмин, чувствительность к нему клеточных поверхностей 563—564
Плазминоген, активация «клеточным фактором» 563—564
Плазмобласты 590
Плесневый гриб *Dictyostelium discoideum*, жизненный цикл 487—488
Подавление активности фермента по типу обратной связи 388—390
Позитивная регуляция 373
Поли (А) в молекулах мРНК эукариотов 464, 503
Полинуклеотидфосфорилаза, синтез полинуклеотидов 337—338
Полиовирусы, посттрансляционное расщепление мРНК 465
Полипептид, кодирование одним геном 178
— коллинеарность 181—182
— невероятность самокопирования 138
— α-спираль 100
— β-спираль 134
— трехмерная конфигурация в процессе синтеза 325
Полирибосомы *см.* Полисомы и Рибосомы
Полисахариды, структурная организация 72, 77
Полисомы 327—328
— размер 329
— электронная микрофотография 328
Политенные хромосомы 498—499
— — электронная микрофотография 498
Поли(У), кодирование полифенилаланина 338
Половой процесс, составление генетической карты 154
— фактор (F) в *E. coli* 156
— цикл 13—15
Полярные молекулы 88—89
Порфирин, биосинтез 126—128
Предшественники мРНК 502—504
— рРНК 308—310, 508—511
— тРНК 308—310
Провирусы РНК-содержащих опухолевых вирусов 657
— транскрипция 658
Проинсулин, превращение в инсулин 327
Прокариоты 437
Промежуточный обмен веществ 34
— — — в *E. coli* 76—79
Промотор 375
— функция при транскрипции 283—285
Простетические группы 133
Протамины 460
Протеазы, секреция опухолевыми клетками 563—565
Профаг 154—156
— λ 413—415
Пурины, биосинтез 124—125
— строительные блоки нуклеиновых кислот 73—75, 193—196
— формулы 32
Пуромицин 324
Путь Эмбдена—Мейергофа 39, 40
Пуффы 499—501
— индукция экдизоном 517—519

Равновесное центрифугирование, доказательство кроссинговера 248—249
— — разделение фрагментов ДНК 243
— — — цепей ДНК 201, 202
Разрыв и воссоединение цепей ДНК 247—249
Рак, вирусная теория 625—626
— возможные причины 621
— изучение 565
— иммунный надзор 624
— индукция при облучении 621—622
— наследственность 619—621
— образование клеточных масс 525
— соматические мутации 621
— утрата нормального клеточного сродства 554—556
Раковые клетки 553
— — адгезивность 556
— — блокирование в разных фазах клеточного цикла 540
— — дезориентация сократимых белков 557
— — избирательная секреция протеаз 563—565
— — избирательное осаждение лектинами 558, 559
— — исследования 565, 619, 662—664
— — образование «пузырьков» на поверхности 557
— — поиски отличий от нормальных клеток 553
— — пониженная потребность в сыворотке 565
— — пролиферация на твердой поверхности 533, 534
Распад, пути 37—39, 77—80
Расплетающие белки, кроссинговер 250
— — роль в репликации ДНК 214—215
Распределительная хроматография 53
Расщепление признаков 16—18
Реакции переноса групп 115—116
Регулярные сополимеры, определение последовательности нуклеотидов в кодонах 340—342
Регуляторные гены 366
Рекомбинации внутригенные, составление карты генов 171—174
— роль нуклеаз 261—263
Рекомбинация реципрокная и нереципрокная 256—258
Релаксированные мутанты 326
Релаксирующий фермент 224
Ренатурация белков после денатурации мочевиной 135, 136
Рентгеновские лучи, кристаллографическое исследование 53—54
— — мутации 27
— — получение «питающих» клеток 526

Рентгеновские лучи, рак щитовидной железы 621
— — структура ДНК 194
— — — гемоглобина 54
— — — миоглобина 54, 132
— — — тРНК 295—296
Реовирусы 398
Репарационный синтез, генная конверсия 256—258
Репликазы фага Qβ, структура 424—425
Репрессируемые ферменты 365
Репрессоры 366
— взаимодействие с индуктором или корепрессором 369—370
— две формы 369
— контроль синтеза 387—388
— механизм действия 367—368, 376, 377
— структура 366—367
Реснички, движение 456—457
— структура 455, 457
Рестриктазы 207—209, 630—631
— значение для изучения ДНК 208
— узнавание нуклеотидной последовательности 209, 631
Ретикулоциты, использование для выяснения направления трансляции 314
Рецессивные гены 178
— признаки 16
Рибонуклеаза, ренатурация 135
— использование для доказательства связывания рибосом с определенными нуклеотидными последовательностями мРНК 318
Рибосомы, А-участок 320—322
— П-участок 320—322
— количество структурного белка 364—365
— кристаллизация 330
— молекулярный вес 303
— мутации 358
— последовательность самосборки 310
— распад на субчастицы в процессе синтеза белка 313
— реконструкция 305
— роль в белковом синтезе 269—271
— связывание с мембранами 466—467
— — — определенными нуклеотидными последовательностями 317—319
— структура 303—305
— тРНК-связывающие участки 319—322
— фермент, катализирующий образование пептидных связей 323
— холостая реакция 326
— электронная микрофотография 270
— эукариотов 464—465
Риккетсии 152, 432
— размер хромосомы 434
РНК, активация синтеза в ядре 548—549
— биосинтез, активация предшественников 118—119
— — на ДНК-матрице 275—279, 307
— — направление 5′→3′ 281—282
— — общая схема 286
— вариации размера 281
— генетический компонент вирусов 397—398
— затравка для репликации ДНК 217—220
— и синтез белка 269
— конфигурация 279, 281
РНК, корреляция содержания и количества синтезированного белка 269
— матрица для синтеза белка 269—271, 305—306, 333—335
— матричная, время жизни у эукариотов 502—504, 513
— — замена при споруляции бактерий 482
— — лидер-последовательность 311
— — метаболическая неустойчивость 385—386
— — модификация новообразованных молекул 463—464
— — моноцистронная 465
— — предобразованная у иглокожих 521
— — синтетическая, стимуляция включения аминокислот 336—338
— — стабильность в недифференцированных клетках 513—514
— — ферментативное расщепление 386
— — частота кодонов 345—347
— — число молекул в клетках 366
— методы определения нуклеотидной последовательности 428—429
— новообразованная в ядре 270
— рибосомная, кодирование несколькими генами *E. coli* 309
— — компонент рибосомы 303
— — предшественники 308—309
— — размер и структура 306—307
— — тандемная укладка генов 508—509
— — умножение генов в ооцитах 510—511
— — функция 305—307
— роль в синтезе белка 329
— синтез in vitro 337—338
— с 5′-концевыми пуринами 285
— структурная организация 72—73, 272—274
— типы оснований 272—274
— транспортная 294
— — вторичная структура 294—295
— — как адаптор 291
— — — компонент РНК-генома вируса саркомы Рауса 656
— — кристаллизация 295—298
— — — рентгенограмма 296
— — предшественники 308—310
— — реакция с активированной аминокислотой 118
— — скопление генов у шпорцевой лягушки 512—513
— — супрессия бессмысленных кодонов 352—354
— — — мутаций со сдвигом рамки 357
— — фермент, присоединяющий 3′-конец 345
— — N-формилирование метионина 347
— фага MS2, полная нуклеотидная последовательность 428—429
— — частота встречаемости кодонов 346
— фагов, генетическая карта 423
— — геном, играющий роль мРНК 335
— — гены 421—423
— — основная характеристика 420—423
— — репликаза фага Qβ 424—425
— — репрессия трансляции гена репликазы 424
— — самовоспроизведение 420, 425, 426
— — связывание рибосом 421—422

РНК фагов, считывание гена А 427
— химическое сравнение с ДНК 272
РНК-полимераза 219—277
— бактериофага Т7 410
— влияние репрессора на связывание с ДНК 376, 377
— регуляторная роль факторов специфичности 489
— роль в репликации ДНК 219—220
— смещение после первоначального связывания с ДНК 379
— субъединичная структура 283
— узнавание сигналов начала синтеза РНК в ДНК 283—285
— участок связывания в ДНК 285
— фактор специфичности, считывающий гены, ответственные за споруляцию 483
— факторы специфичности у вирусов 407—409
РНК-репликаза 420
РНК-синтетаза 335
РНК-содержащие опухолевые вирусы, белки 651
— — — выражение генома во время эмбрионального развития 662
— — — геном 655
— — — жизненный цикл 652—653
— — — как эндогенные вирусы 661—662
— — — обратная транскриптаза 656—657
— — — природа почкующихся частиц 658—659
— — — провирусная форма 657
— — — синтез вирус-специфических белков 658
— — — содержание тРНК 656
— — — структура 651—652
— — — температурочувствительные мутанты 654
— — — транскрипция ДНК провируса 658
— — — трансформация клеток 659
— — — электронная микрофотография 652, 655
Родопсин 441

Сайт-специфическая рекомбинация 261—263
Самоорганизация 105—106
Самосборка дочерних частиц фага 427—428
Саркома Рауса 625—626
Сателлитные ДНК 505—506
— РНК 429
Сахарозный градиент, доказательство синтеза белка в рибосомах 271
Свободная энергия гидролиза высокоэнергетических связей 112
— — константа равновесия реакции 87
— — реакций 111—112
— — — равновесия 86
— — сопряженных реакций 115
— — энтропия 86—87
Свободное вращение вокруг ординарной связи 84—85
Седиментация, единица S (Сведберг) 52
Селекционная гипотеза образования антител 577
Серин, биосинтез 123
Серповидноклеточная анемия, генетическая природа 175—177, 180
Синапсис 24
Синхронизация клеточного цикла 535—537
Слабые химические взаимодействия, антиген—антитело 91
— — — в водных растворах 95
— — — — фермент-субстратном комплексе 98
— — — комплементарность взаимодействующих молекул 94
— — — на поверхности матрицы 137
— — — сила 87
— — — типы и характеристика 83—85
Слияние клеток 516
— — в различные фазы клеточного цикла 537
— — высвобождение инфекционных частиц вируса SV-40 638—639
— — индуцирование вирусом Сендай 516
— — раковых 619—621
Смещение лимфоцитов 610, 612
Соматические мутации, возможная причина рака 621
— — их роль в объяснении причин разнообразия антител 598—599, 612—613
Соматомедин 541—542
— связывание с рецепторами 543
Сопряженные реакции, изменение свободной энергии 115
— — окисления—восстановления 47, 51
— — окислительное фосфорилирование 47
Спаривание оснований, специфичность 238, 239
Спарсомицин 313—314, 325
Спейсерные последовательности, разделение генов рРНК 508
α-Спираль 100
— вторичная структура белков 54
— нарушение регулярности пролином, цистеином 134—135
Споруляция бактерий 482—483
— — электронная микрофотография 484
Стерильные пятна двойных мутантов 166—167
— — идентификация мутантных фагов 165—166
— — фагов 153
Стероидные гормоны 517—521
Стероиды, активация синтеза специфических РНК 549
— структура 440
Стрептомицин 325
— использование при получении бактериальных мутантов 149
— связывание с рибосомой 358—360
— устойчивые мутанты *E. coli* 149
Строгая ответная реакция 326
β-Структура полипептидов 134
Субъединицы белковых молекул 104—106
— принцип самоорганизации 105
Супервитки 205
Супрессорные мутации 186—187, 351
— тРНК 356—357
Сцепленные группы генов 23—25
Считывание генетического кода, мутации со сдвигом рамки 265—266
Сыворотка, зависимость формы клеток от ее содержания в среде 529—530

Сыворотка, необходимость для роста клеток in vitro 533
— пониженная потребность в ней раковых клеток 565
Сывороточные факторы 541—542
Salmonella typhimurium, биосинтез гистидина 177
— — — — группировка генов 179
— — Hut-оперон 379

Т-антиген 646
— роль в трансформации клеток 641
— синтез, индуцируемый вирусом SV-40 632—633
— участие в процессах индукции 635—636
Таутомерные превращения пуринов, пиримидинов 193, 195
Температурочувствительные мутанты, выделение 538—539
Терминация 348
— белки, считывающие стоп-сигналы 348, 355—356
— кодоны 348
— супрессоры бессмысленных мутаций 354
Термодинамика биологических систем 109
— второй закон 86
— молекул пищевых веществ 109
— первый закон 86
Тест комплементации 174—175, 178
— — доказательство существования генов со взаимосвязанными функциями 179
Тиминовые димеры, образование и вырезание 232—233
Тимус 590
— основная функция 612
Тиоэфиры, высокоэнергетические соединения 113
Тканевая совместимость генов 608
— — ответственные белки 608, 610
Тонкая структура генетических карт 173—175
Трансдукция 162
Транскрипция, инициация 281—285
— in vitro 379
— как мера биологического времени 488—490
— матрица — одноцепочечная ДНК 277—279
— механизм 277
— модель инициации 378—379
— — начало цепи РНК с пуринтрифосфата 285
— репрессоры 367—368
— терминация 286—287
Транслоказа 323
Транслокация, механизм 323
Трансляция, активация аминокислот 299—301
— действие антибиотиков 324—325
— диссоциация рибосом на субчастицы 312—313
— инициация N-формилметионином 314, 316—317
— инициирующий комплекс 317—319
— in vitro 333, 335—336
— — — концентрация Mg^{2+} 350
— — — ошибки 350
Трансляция, кодоны инициации 347
— — терминации 348
— механизм транслокации 323
— направление 314, 315, 319
— неоднозначность узнавания 358
— роль мРНК 305
— скорость при оптимальных условиях 304, 325
— стрептомицин 358—360
— схема, поясняющая роль РНК в синтезе белка 329
— терминация 325
— точность образования аминоацил-тРНК 302
— — выбора аминокислот 290
— фактор элонгации 321—324
— факторы инициации 319
— частота ошибок 268
Трансплантат вторичный 608
— отторжение 608
— первичный 608
Трансплантационный иммунитет 608
Трансферазы, реакции переноса групп 116
Трансформация генетическая 190—191
— ДНК бактериальных клеток 163—164
Трансформированные клетки, размножение в суспензии 531
— — свойства 533—535
Третичная структура белков 134
Трехфакторные скрещивания для локализации генов 144—145
Трипсин как митоген 541
— механизм каталитического действия 55, 56
— применение для диссоциации клеточных масс 526
Триптофан, биосинтез 181—182
Триптофановый оперон, аттенуатор 383—384
— — регуляция транскрипции 383—384
Триптофан-синтаза, генетическая карта 181—182
— — — мутации 182
— мутантные формы 181—182
Тропомиозин 445
Тубулин 453

Углеводороды алифатические 32
— ароматические 32
Ультрафиолетовый свет, инактивация λ-репрессора 415
— — повреждение ДНК 232
— — рак кожи 621
Ультрацентрифуга 52
Уридин-5′-фосфат, биосинтез 124

Фабрициева сумка 590
Фаги *см.* Бактериофаги
Фагоцитоз 443—444
Фактор переноса устойчивости (RTF) 162
— роста нервов 543—544
— — — уровень цАМФ 547
— элонгации, роль в трансляции 321—324
— ρ 415
— — роль в биосинтезе РНК 285—286
— σ, отделение от кор-фермента при транскрипции 285

Фактор σ, функция 283—284
Факторы освобождения 325, 348
— роста 148—149
— специфичности РНК-полимеразы при споруляции бактерий 483
— — — фага Т4 407—409, 490
— — — последовательный синтез 489—490
Фенотип 17
Фермент-субстратный комплекс 44, 54, 56
— — слабые вторичные силы 98
Ферменты активации 118, 290—291, 301—302
— — снижение энергии активации 111
— активные центры, структура и функция 54—55
— биосинтеза РНК 275—277
— важность в эволюции 438
— гибкость аминокислотных последовательностей 185
— индуцируемые 365
— катализирующие реакции переноса групп 116
— механизм каталитического действия трипсина 55—56
— образующие пептидные связи 323
— равновесие реакций 111
— регуляция по типу обратной связи 388—390
— репрессируемые 365
— синтез, генетический контроль 175—178
— специфичность 42
— участие в рекомбинациях 261—263
Ферритин, субъединицы 104
Фибробласты 529
— фактор роста 545
Фитогемагглютинин, специфическая трансформация лимфоцитов 597
Фитол в молекуле хлорофилла 128
Флавинадениндинуклеотид (ФАД) 36—37, 38
Флавинмононуклеотид (ФМН) 37
Формальдегид, применение при денатурации ДНК 210
N-формилметионин 314, 316
Фосфолипиды, структура 439
Фосфорные эфиры как источники энергии 39, 42
— — формулы 32—33
Фотосинтез, механизм 49
— образование АТФ 48
— химические реакции 34
— эволюция 438
Фрагменты Fab 583
— $F(ab')_2$ 583—584, 585
Фузидиевая кислота 325
Функционирование генов, контроль транскрипции 488—490
— — при инфекции клетки бактериофагом λ 415—417
— — регуляция времени 406

Хиазмы 495
Химио-осмотическая теория 50
Химотрипсиноген, аминокислотная последовательность 128, 131
— расположение дисульфидных связей 133
Хлоропласты, роль в фотосинтезе 11, 48
— эволюция 471
Хлорофилл, биосинтез порфиринового кольца 125—128
— роль в фотосинтезе 48—49
— структура 126
Холестерин, структура 440
Холостая реакция на рибосомах 326
Холофермент 283
Хроматиды 12
— поведение при мейозе 24, 142—143
Хроматин 490—491
— петли 491
— структура 460—462
Хромомеры 495
Хромосома 16 человека, электронная микрофотография 491
Хромосомы бактериальные 157, 161
— вирусов 150
— высших организмов 490—491
— гистоны 459
— горячие точки 172
— *E. coli* 63, 65, 157—161
— кольцевые 205
— комплементация, локализация мутаций 175
— корреляция участков ДНК с генетической картой 242—246
— кроссинговер 23
— линейность генов 144—145
— митотическое деление при дифференцировке 480
— определение пола 20—24
— поведение при мейозе 13, 142—143
— — — митозе 11—14, 459
— политенные 498
— постоянство количества ДНК 191—192
— пуффы 499—501
— рекомбинантные 143
— синапсис 24
— содержание белка у высших организмов 142
— — ДНК 204—205
— соответствие дисков числу генов 501—502
— составление генетических карт 144—147
— типа «ламповых щеток» 494—497
— — — — электронная микрофотография 496
— X 21—23
— — дрозофилы 501—502
— — инертность в клетках женской особи млекопитающих 494
— Y 497
— — петли 495, 497

Центромера 11, 460, 490
Цереброзид 440
Цикл Кребса 45—46
Циклический АМФ, активация БАК 374—375
— — влияние на концентрацию катаболитов глюкозы 373—374
— — низкий уровень при митозе 536
— — плейотропные эффекты изменения концентрации 547
— — роль в образовании микротрубочек в клетках 455

Циклический АМФ, снижение концентрации в клетке 546—547
— — соматомедин 541—542
— ГМФ, повышение концентрации после митогенной стимуляции 548
— — специфические киназы в клеточном делении 548
Цистеин, образование дисульфидных мостиков 133
Цитозин, отсутствие в ДНК Т-четных фагов 399, 401, 402

Частичная денатурация нуклеиновых кислот 196, 209—210
— — — — картирование методом неполной денатурации 210—211, 630—631
Частота мутаций 238—240
Чувствительный к глюкозе оперон 373
— — — — позитивная регуляция 373

Эволюция 9, 10
— наследственная изменчивость 26
— начало жизни на Земле 437
— роль ферментов 438
— теория 9—10
— уровень спонтанных мутаций 241
Экдизон 517—518
Экзоцитоз 443—444
Экспоненциальный рост бактерий 63—64
— — частично денатурированной ДНК 211
Эмбриональные индукторы 481—482
Эндогенные вирусы 661—662
Эндогенные вирусы, выражение геномов во время эмбрионального развития 662
Эндоплазматическая сеть, гладкая 466
— — шероховатая 466
Энергия активации 110
— — влияние ферментов 111
Энтропия 86—87
Эпидермис, фактор роста 544
Эписома, определение 157, 162
Эпителиальные клетки 530
Эритробласты, стабильность мРНК при синтезе гемоглобина 513—514
Эритропоэтин 549—550
Эритроциты, контроль содержания в крови эритропоэтином 549—550
Эстроген, влияние на клеточный метаболизм 549
Эукариоты 437
— внутренние клеточные мембраны 438—441
— микротрубочки 452—459
— мышечные белки 449—450
— репликация ДНК 492
— РНК-полимеразы 462—463
— транскрипции мРНК 502—504
Эухроматин 494
Эффект Варбурга 554

Ядерная мембрана 11
— — структура пор 468—469
— — эволюция 439
Ядро, место синтеза РНК 269—270
— опыты по пересадке 514—515
Ядрышко 12
— локализация синтеза рРНК 508—511