

Макеев Александр Владиславович  
ОСНОВЫ БИОЛОГИИ  
1996 и 1997

ОГЛАВЛЕНИЕ

Часть 1

Введение.4

Лекция 1. АТОМНЫЙ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ СОСТАВ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ.6

Лекция 2. СТРУКТУРНЫЕ УРОВНИ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ.31

Лекция 3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ МАКРОМОЛЕКУЛ.65

Лекция 4. КЛЕТОЧНАЯ ТЕОРИЯ.96

Лекция 5. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН.123

Лекция 6. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ СВЯЗЬ КЛЕТОЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ.156

Лекция 7. ОБЩИЙ ОБЗОР МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТКИ.200

Часть 2

Лекция 8. ЯДЕРНЫЙ АППАРАТ КЛЕТКИ.4

Лекция 9. ТРАНСКРИПЦИЯ И ТРАНСЛЯЦИЯ.30

Лекция 10. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНФОРМАЦИЯ.67

Лекция 11. ПОЛОВОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ.98

Лекция 12. МУТАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ.130

Лекция 13. РАЗНООБРАЗИЕ ОРГАНИЗМОВ И ЭВОЛЮЦИЯ (часть I).157

Лекция 14. РАЗНООБРАЗИЕ ОРГАНИЗМОВ И ЭВОЛЮЦИЯ (часть II).198

Список литературы.234

## Лекция 1. АТОМНЫЙ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ СОСТАВ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ

*Атомный состав живых организмов - органогены, макроэлементы и микроэлементы - биологическое фракционирование изотопов - радиоизотопное определение ископаемых остатков - молекулярный состав живых организмов - вода - неорганические ионы - полисахариды - липиды - белки и нуклеиновые кислоты - разнообразие живых организмов на атомном и молекулярном уровнях*

### АТОМНЫЙ СОСТАВ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ

В живых организмах обнаруживаются только 40 наиболее легких элементов из 92 природных химических элементов, присутствующих в земной коре. Причем из этих 40, вероятно, только 27 существенны для жизнедеятельности организмов, остальные элементы (например, висмут, свинец, олово, кадмий, сурьма, таллий и др.) являются загрязняющими примесями. Атомный состав даже очень разных по уровню сложности организмов различается значительно меньше, чем состав любого организма отличается от состава литосферы (рис. 1).

На долю четырех химических элементов - С, О, Н и N - приходится около 98% веса организма. Из этих элементов состоят все органические соединения, поэтому их называют ОРГАНОГЕНАМИ. Остальные элементы, составляющие организм, подразделяются на МАКРОЭЛЕМЕНТЫ (К, S, P, Cl, Mg, Na, Ca и Fe), которые содержатся в количестве 0.01-0.1 весовых %, и МИКРОЭЛЕМЕНТЫ (Zn, Cu, I, F, Mn, B, Br, Co, Mo, Si, Ba, Se, V, Cr, Ni), содержание которых меньше 0.01%.

Несмотря на малые количества, микроэлементы выполняют некоторые незаменимые функции (например, входят в состав ферментов), поэтому недостаток любого из них приводит к серьезным нарушениям обмена веществ. Избыток микроэлементов столь же опасен из-за возможности их вступления в неспецифические химические реакции. Необходимо, чтобы их концентрации были почти постоянными, т.е. менялись в очень малых пределах от  $10^{-4}$  до  $10^{-6}$  долей весовых процентов. Хотя организмы обладают способностью выведения избытка микроэлементов и тяжелых металлов, они не всегда могут справиться с этой задачей, особенно в условиях техногенного загрязнения, последствия которого еще во многом не ясны.

Возникновение и существование земной жизни, очевидно, стало возможно лишь благодаря уникальной способности углерода образовывать большие молекулы. Из-за малых размеров и наличия во внешней оболочке четырех электронов атом углерода может образовывать четыре прочные ковалентные связи с другими атомами. Наиболее важное значение имеет способность атомов углерода соединяться друг с другом, образуя цепи и кольца и создавая в результате большие и сложные молекулы, на размеры которых не накладывается никаких ограничений. До некоторой степени аналогичной способностью обладает Si, что дало повод для рассуждений о возможности существования внеземной жизни на основе соединений кремния. Однако он уступает углероду в устойчивости соединений, содержащих структуры из одинаковых атомов. После углерода наиболее длинные цепи из одинаковых атомов известны для серы.

Каждый из химических элементов имеет несколько изотопов. Они обладают почти одинаковыми химическими свойствами, однако молекулы, содержащие легкие изотопы, подвижнее, чем молекулы, содержащие тяжелые изотопы, и химические связи, образуемые тяжелыми изотопами, прочнее, чем такие же связи, образуемые легкими изотопами. Поэтому молекулы, содержащие легкий изотоп, легче вступают в химические реакции и такие процессы, как диффузия, абсорбция, испарение и т.д. В результате углерод живых организмов оказывается обогащенным изотопом  $^{12}\text{C}$  по отношению к исходному для всего живого углероду атмосферного  $\text{CO}_2$ , потому что в процессе фотосинтеза растения предпочтительно поглощают  $^{12}\text{CO}_2$ , а органический кислород оказывается обогащен изотопом  $^{18}\text{O}$  сильнее, чем вода и кислород атмосферы, но меньше, чем атмосферный

углекислый газ. Это явление называется **БИОЛОГИЧЕСКИМ ФРАКЦИОНИРОВАНИЕМ ИЗОТОПОВ**.

В состав живых организмов входят и некоторые радиоактивные изотопы, и это используется для определения геологического возраста ископаемых остатков. Природный углерод содержит примерно 99%  $^{12}\text{C}$  и 1%  $^{13}\text{C}$ . Кроме того, при воздействии космических лучей на атмосферный азот образуется радиоактивный углерод  $^{14}\text{C}$ . Этот  $^{14}\text{C}$  окисляется до  $^{14}\text{CO}_2$  и усваивается растениями, а затем попадает и в ткани животных. Поскольку период полураспада  $^{14}\text{C}$   $T = 5\,668$  лет, то между образованием и распадом  $^{14}\text{C}$  устанавливается стационарное равновесие, так что относительная концентрация  $^{14}\text{C}$  в живых организмах равна  $10^{-12}$  г  $^{14}\text{C}$  на 1 г  $^{12}\text{C}$ . После смерти организма обмен между ним и атмосферой прекращается, и доля  $^{14}\text{C}$ , содержащегося в его тканях, начинает уменьшаться вследствие радиоактивного распада. Этот распад происходит как процесс первого порядка по экспоненциальному закону:

$$A = A_0 \exp(-t \ln 2 / T),$$

где  $A_0$  - доля  $^{14}\text{C}$  в современных живых организмах,  $A$  - доля  $^{14}\text{C}$  в ископаемых остатках,  $t$  - возраст найденных ископаемых остатков. В предположении, что скорость образования  $^{14}\text{C}$  в атмосфере была постоянна в истории Земли, измерив  $A$ , можно рассчитать  $t$ .

Проверка этого предположения была проведена сравнением возраста образцов древесины мамонтового дерева (*Sequoia gigantea*), определенного по содержанию радиоактивного углерода, с возрастом, подсчитанным по числу его годовых колец. Такая проверка, так же, как и проверки с использованием других углеродсодержащих материалов, например, древесины из захоронений периода Первой династии египетских фараонов, датированных историческими методами, дали удовлетворительные результаты. Однако радиоуглеродный метод датирования не применим для образцов с возрастом менее 2000 лет, поскольку для них велика ошибка, связанная с сжиганием угля и нефти, в которых почти нет  $^{14}\text{C}$  и которые разбавляют современный атмосферный  $^{14}\text{C}$ , а в последнее время - с увеличением образования  $^{14}\text{C}$  в результате ядерных взрывов.

Другое ограничение радиоуглеродного метода датирования связано с ошибками в измерении очень малых количеств  $^{14}\text{C}$ , оставшегося в образцах, возраст которых превышает 20 000 лет. Поэтому в таких случаях для определения геологического возраста используют более медленно распадающиеся радиоактивные изотопы, например,  $^{40}\text{K}$ , распадающийся до  $^{40}\text{Ar}$  с периодом полураспада  $T = 1.3710^9$  лет и представляющий собой "остатки" того  $^{40}\text{K}$ , который присутствовал при образовании Земли.

Задача 1. Свежесрубленная древесина содержит изотоп  $^{14}\text{C}$ , распадающийся со скоростью 15.3 атома в минуту в расчете на 1 г углерода (это соответствует числу  $\beta$ -частиц, испускаемых изотопом  $^{14}\text{C}$  за 1 минуту, измеренному счетчиком Гейгера). Установлено, что древесина деревьев, засыпанных пеплом при извержении вулкана Мазама на юге штата Орегон (США), дает 6.90  $\beta$ -распадов атомов  $^{14}\text{C}$  в минуту в расчете на 1 г углерода. Когда примерно произошло извержение вулкана?

Задача 2. Найденные в Восточной Африке скелеты синантропа были извлечены из вулканического пепла, содержащего минералы калия. Методом масс-спектропии удалось определить, что  $^{40}\text{Ar}$  в пепле составляет 0.078% от общего количества присутствующего  $^{40}\text{K}$ . В данном случае  $^{40}\text{Ar}$  образовался в результате  $\beta$ -распада  $^{40}\text{K}$ , содержавшегося

в пепле, выпавшем при извержении вулкана, а ранее образовавшийся

$^{40}\text{Ar}$  выделился из лавы в процессе извержения. Какой возраст имеют обнаруженные скелеты?

**МОЛЕКУЛЯРНЫЙ СОСТАВ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ**

Так же, как и по атомному составу, по содержанию основных классов молекул различные организмы не сильно отличаются друг от друга. Молекулярный состав типичной живой клетки приведен в таблице

1.

Таблица 1

Компонент	Доля от общей массы клетки,	%	Молекулярная масса, Да*
Вода	70		18
Неорганические ионы	1		100
Белки	15 - 18		$10^4$ - $10^7$
РНК	1.1 - 6		$237 \cdot 10^3$ - $10^6$
ДНК	0.25 - 1.2		$10^7$ - $10^{12}$ 57103-
Полисахариды	2 - 5	3	105
Липиды			500-103
Низкомолекулярные метаболиты			102-103

\*Дальтон (Да) - принятая в биологии единица массы, практически равная массе атома водорода (т.е. 1.0000 по шкале атомных масс).

## ВОДА

Вода - это самое распространенное соединение в живых организмах. Она заполняет клетки и межклеточные пространства и представляет собой ту среду, в которой осуществляются диффузия веществ, химические реакции и взаимодействия макромолекул (белков и нуклеиновых кислот) друг с другом. Кроме того, вода сама непосредственно участвует во многих химических реакциях клетки. Два свойства воды - *способность образовывать водородные связи* и *обратимая ионизация* - оказываются весьма существенными для протекания внутриклеточных процессов.

Атомы кислорода и водорода обладают разным сродством к электрону (электроотрицательностью), и, хотя молекула воды в целом электрически нейтральна, на кислороде локализуется частичный отрицательный, а на атомах водорода - частично положительный заряды. Благодаря такому пространственному разделению зарядов соседние молекулы могут электростатически притягиваться друг к другу. Такой тип электростатического притяжения между частичными зарядами электронейтральных молекул называется **ВОДОРОДНОЙ СВЯЗЬЮ**, поскольку два электроотрицательных атома оказываются связаны через атом водорода (рис.2). Водородные связи характерны не только для воды. Как будет описано далее, белки и нуклеиновые кислоты содержат большое число внутримолекулярных водородных связей, которые играют важную роль в организации структуры и функционировании этих макромолекул.

Водородные связи намного слабее ковалентных. Энергия водородных связей в жидкой воде (т.е. энергия, необходимая для разрушения одной связи) составляет примерно 18.8 кДж/моль, тогда как энергия ковалентных связей Н-О в молекулах воды равна 460 кДж/моль. Молекулы в жидкой воде находятся в непрерывном тепловом движении, поэтому образующиеся водородные связи постоянно и быстро разрываются и вновь восстанавливаются. Среднее время жизни водородной связи при комнатной температуре не превышает  $1.57 \cdot 10^{-9}$  с. Каждая молекула воды в принципе может образовывать водородные связи максимально с четырьмя соседними молекулами, однако при комнатной температуре в любой данный момент каждая молекула воды образует водородные связи в среднем с 3.4 других молекул.

Биполярный характер молекулы воды делает ее значительно лучшим растворителем, чем большинство других общеизвестных жидкостей. В воде растворяются очень многие вещества, причем растворимость некоторых веществ определяется способностью воды

образовывать водородные связи с гидроксильными и карбоксильными группами других молекул. Кроме того, высокое межмолекулярное сцепление в воде, обусловленное образованием водородных связей, имеет следствием аномально высокие по сравнению с большинством других жидкостей удельную теплоемкость и теплоту испарения воды. Эти особенности воды важны для поддержания постоянства внутренней температуры живыми организмами. При изменении температуры внешней среды в клетке происходит поглощение или выделение тепла благодаря разрыву или новообразованию водородных связей между молекулами воды. Таким образом, колебания температуры внутри клетки, несмотря на резкие ее изменения во внешней среде, ослабляются; вода выступает в роли термостата. Благодаря

высокой теплоте испарения организмы могут эффективно защищаться от перегрева, поскольку на испарение 1 г воды с поверхности листа или в виде пота с поверхности кожи расходуется 2.26 кДж тепловой энергии.

Хотя молекулы воды обладают лишь слабо выраженной способностью к обратимой ионизации, образующиеся при этом ионы гидроксония ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) и гидроксила ( $\text{OH}^-$ ) играют исключительно важную роль в биологических процессах. Поскольку молярная концентрация иона гидроксония мала, ее принято выражать через величину ее отрицательного десятичного логарифма, который обозначается символом р:

$$\text{pH} = -\lg([\text{H}_3\text{O}^+]).$$

От величины рН очень сильно зависят структура, растворимость и биологическая активность макромолекул.

Задача 3. Рассчитайте, какое количество энергии необходимо для одновременного разрыва всех водородных связей в 1 л воды, находящемся при 25°C.

## НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ИОНЫ

Из неорганических веществ клетки большая часть находится в виде солей. Концентрации катионов и анионов в клетке и в среде ее обитания, как правило, сильно отличаются. Например, внутри животной клетки концентрация калия равна 140 мМ, а натрия - от 5 до 15 мМ, тогда как в межклеточной или внешней среде мало калия (5 мМ) и довольно высокая концентрация натрия (145 мМ). Как будет видно из дальнейшего изложения, это различие в концентрации ионов между клеткой и средой выполняет специальную функцию создания разности потенциалов на плазматической мембране и, пока клетка жива, активно поддерживается. После смерти клетки содержание ионов в клетке и среде быстро выравнивается.

От солей в значительной мере зависят поступление воды в клетку и буферные свойства клеток и тканей. Клеточные мембраны проницаемы для молекул воды и непроницаемы для крупных молекул и ионов. Если в среде содержание воды более высокое, чем в клетке, то выравнивание концентрации воды между клеткой и средой происходит путем проникновения воды из среды в клетку. На этом свойстве, например, основано всасывание воды корнями растений.

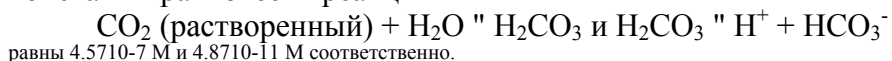
У всех живых организмов внутриклеточные и межклеточные жидкости имеют характерную и постоянную величину рН, которая поддерживается с помощью буферных систем, состоящих из слабой кислоты (донор протона) и сопряженного с ней основания (акцептор протона). Две наиболее важные буферные системы - это *фосфатная* и *бикарбонатная* системы.

Донором протона в фосфатной буферной системе служит ион  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , а акцептором протона - ион  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Эта система обладает максимальной эффективностью вблизи рН 6.86, способна сопротивляться изменениям рН в интервале 6.1 - 7.7 и обеспечивает достаточную буферную емкость внутриклеточной жидкости. Донором протона в бикарбонатной буферной системе служит угольная кислота ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), а акцептором протона - ион  $\text{HCO}_3^-$ . Особенностью этой системы является то, что угольная кислота образуется в результате обратимой гидратации растворенной двуокиси углерода, которая в свою очередь находится

в равновесии с углекислым газом, содержащимся в легких или окружающем воздухе. Поэтому величина рН бикарбонатного буфера зависит от парциального давления  $\text{CO}_2$  в газовой фазе. Бикарбонатная система служит главной буферной системой плазмы крови и эффективно функционирует вблизи рН 7.4.

Некоторые неорганические ионы (например,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ) участвуют в регуляции каталитической способности многих белков-ферментов, связываясь с ними и тем самым активируя, другие (такие как  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) сами входят в состав реакционного центра некоторых ферментов. Ион  $\text{Ca}^{2+}$  играет важную роль в проведении нервного импульса и мышечном сокращении, а неорганический фосфат является необходимым компонентом внутриклеточной АТФ-зависимой системы переноса энергии. Неорганические соли содержатся в клетке не только в растворенном, но и в твердом состоянии, выполняя структурную функцию. В частности, прочность и твердость костной ткани и раковинам моллюсков придает нерастворимый гидроксипатит, состав которого можно приблизительно описать формулой  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3$ .

Задача 4. Рассчитайте, как изменится рН плазмы крови, если концентрация  $\text{CO}_2$  в легких увеличится вдвое. Растворимость  $\text{CO}_2$  при  $36^\circ\text{C}$  составляет 0.1115 г/100 г воды, а константы равновесия реакций



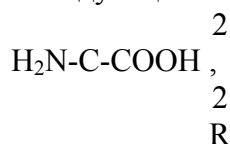
## БЕЛКИ И НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Практически все процессы в живых организмах связаны с функцио-

нированием белков и нуклеиновых кислот. Это самые крупные и сложные молекулы в клетке (таблица 1), являющиеся нерегулярными полимерами, т.е. молекулами, функции которых существенно определяются числом, составом и порядком расположения входящих в них мономеров.

На долю белков приходится не менее половины сухой массы животной клетки. В живых организмах они выполняют самые разнообразные функции (строительную, каталитическую, запасную, транспортную, двигательную, энергетическую, регуляторную, защитную) и служат теми *молекулярными инструментами*, с помощью которых реализуется генетическая информация.

Белки - это одноцепочечные линейные неразветвленные нерегулярные полимеры, мономерами которых служат аминокислоты 20 видов (таблица 2). Общая структурная формула аминокислот выглядит следующим образом: Н



где  $\text{H}_2\text{N}$ - - аминогруппа,  $-\text{COOH}$  - карбоксильная группа, а R - боковая цепь, различная для разных аминокислот. Благодаря специфическим особенностям боковой цепи каждая аминокислота наделена химической индивидуальностью. Поэтому всю эту группу из 20 аминокислот можно рассматривать как алфавит "языка" белковой структуры.

Аминокислоты образуют белки, соединяясь между собой в длинные цепи. При этом аминогруппа взаимодействует с карбоксильной группой, и после отщепления молекулы воды образуется ковалентная связь, называемая ПЕПТИДНОЙ (рис. 3). Два аминокислотных остатка ( $n = 2$ ) образуют *дипептид*, три ( $n = 3$ ) - *трипептид*, четыре ( $n = 4$ ) - *тетрапептид*, пять ( $n = 5$ ) - *пентапептид*; если  $n = 10 \text{ - } 40$ , то молекулу принято называть *полипептид*, а если  $n > 40$ , то *белок*. Типичная белковая цепь содержит от 100 до 500 аминокислотных остатков, а наибольшая из известных белковых цепей состоит из более чем 3000 аминокислотных остатков. Встречаемость данной аминокислоты в белке сильно меняется от белка к белку. Однако в общем некоторые аминокислоты (такие, как метионин

и триптофан) встречаются относительно редко, а аланин и лейцин встречаются чаще всего. Средняя молекулярная масса аминокислотного остатка в типичном белке составляет 110 Да.

Для каждой из аминокислот (исключая глицин) существуют два зеркальных стереоизомера - L- и D-форма (рис. 3). У них одинаковы все химические и физические свойства, однако в состав молекул белков входят только L-стереоизомеры. Живые клетки обладают уникальной способностью синтезировать L-аминокислоты с помощью *стереоспецифических* ферментов, стереоспецифичность которых обусловлена асимметрическим характером их реакционных центров. Оптические изомеры аминокислот претерпевают очень медленное и самопроизвольное неферментативное взаимное превращение, так что за какой-то весьма длительный период времени чистый L- или D-изомер может превратиться в эквимолярную смесь обоих изомеров. Превращение L-аминокислоты в D-форму при постоянной температуре идет с постоянной скоростью, и это иногда удается использовать для определения возраста людей, животных или ископаемых остатков. Однако из-за условия постоянства температуры этот метод определения возраста не всегда применим, в отличие от методов, основанных на радиоактивном распаде, поскольку его скорость не зависит от температуры.

Несмотря на относительно невысокое по сравнению с белками содержание, нуклеиновые кислоты играют центральную роль в клетке, поскольку их функции связаны с хранением и передачей генетической информации. Нуклеиновые кислоты - это линейные нерегулярные полимеры. Мономерами РНК служат рибонуклеотиды, а мономерами ДНК - дезоксирибонуклеотиды. Каждый нуклеотид (рибонуклеотид или дезоксирибонуклеотид) состоит из трех частей: 1) остатка фосфорной кислоты, 2) пятиуглеродного моносахарида в циклической форме - D-рибозы (в случае РНК) или 2-дезокси-D-рибозы (в случае ДНК), 3) азотистого основания. В состав РНК входят только четыре типа рибонуклеотидов, азотистые основания которых представлены аденином (А), урацилом (U), гуанином (G) и цитозином (C), а в состав ДНК - дезоксирибонуклеотиды четырех видов, азотистыми основаниями которых являются аденин (А), тимин (Т), гуанин (G) и цитозин (C). Последовательно расположенные нуклеотиды в молекулах ДНК и РНК ковалентно связаны между собой в цепь через остаток фосфорной кислоты: 5'-гидроксильная группа моносахарида одного нуклеотида присоединена к 3'-гидроксильной группе моносахарида соседнего нуклеотида с помощью **ФОСФОДИЭФИРНОЙ СВЯЗИ** (рис. 4).

Таким образом, ковалентные остовы нуклеиновых кислот состоят из монотонно чередующихся фосфатных и сахаридных групп; основания же можно рассматривать как боковые группы, присоединенные к остову на равных расстояниях друг от друга. Цепи ДНК и РНК обладают определенной полярностью, или направлением, поскольку все межнуклеотидные фосфодиэфирные связи ориентированы вдоль цепи одинаково. Благодаря этой полярности каждая полинуклеотидная цепь имеет 5'-конец и 3'-конец. Сахарофосфатный остов и ДНК, и РНК несет отрицательный заряд, поскольку фосфатные группы депротонированы при характерных для клеток рН. В живых организмах никогда не встречаются молекулы, в которых рибонуклеотиды и дезоксирибонуклеотиды связаны в одну цепь. Вероятно, это связано с тем, что, как будет описано далее, рибо- и дезоксирибонуклеотиды образуют двойные спирали с совершенно разной структурой.

Азотистые основания представляют собой производные двух исходных гетероциклических соединений - *пиримидина* и *пурина*. Аденин и гуанин являются пуриновыми основаниями, а цитозин, тимин и урацил - пиримидиновыми основаниями (рис. 4). Цитозин, входящий в состав нуклеиновых кислот, обладает некоторой лабильностью в водной среде: он очень медленно самопроизвольно теряет свою аминогруппу в результате гидролиза и превращается в урацил. Это обстоятельство, вероят-

но, объясняет, почему ДНК вместо урацила содержит тимин. Дело в том, что урацил, появившийся в ДНК, узнается специальным ферментом - *урацил-ДНК-гликозидазой*, который удаляет неправильное основание из ДНК. Если бы в состав нормальной ДНК входил и цитозин, и урацил, то отличить остатки урацила, исходно присутствующие в ДНК, от остатков урацила, появившихся в результате спонтанного дезаминирования цитозина, было бы невозможно. В отличие от ДНК, молекулы РНК присутствуют в клетке в виде множества копий и "живут" сравнительно недолго, распадаясь после выполнения своей функции. Поэтому спонтанный гидролиз цитозина не так опасен для РНК, как для ДНК. Предполагается, что первыми полинуклеотидами, появившимися в ходе биологической эволюции, были молекулы РНК, и лишь на какой-то более поздней стадии эволюционного процесса для целей долговременного хранения генетической информации появились химически более стабильные молекулы ДНК, и, следовательно, замена урацила на тимин в ДНК, возможно, была одним из эволюционных приобретений организмов, стабилизирующих их геном.

Подробнее особенности структурной организации белков и нуклеиновых кислот будут рассмотрены в следующей лекции.

Задача 5. Выведите формулу для определения возраста биологического образца по отношению содержания D- и L-форм аминокислот:

$$L \text{ " } D \quad \frac{d[D]}{dt} = k([L] - [D]).$$

В начальный момент времени все аминокислоты находились в L-форме, и их содержание составляло [L]<sub>0</sub>.

## УГЛЕВОДЫ

На долю углеводов приходится до 80% сухого вещества некоторых растительных тканей и до 20% некоторых животных тканей. Простейшими углеводами, встречающимися в живых организмах, являются *моносахариды*, имеющие общую формулу (СН<sub>2</sub>О)<sub>n</sub>, где n = 3 \_ 7. Практически все природные моносахариды, так же как и аминокислоты, могут существовать в D-форме и в L-форме, но, в отличие от аминокислот, почти все моносахариды живых организмов относятся к D-ряду. Моносахариды, содержащие 5 и более атомов углерода, в растворах существуют в виде замкнутых циклических структур (рис. 5). Основными моносахаридами живых организмов являются *D-глюкоза*, *D-фруктоза*, *D-рибоза* (входит в состав РНК) и *2-дезоксид-рибоза* (входит в состав ДНК).

Моносахариды могут соединяться друг с другом, образуя **ГЛИКОЗИДНУЮ СВЯЗЬ**, которая образуется между гидроксильной группой одного моносахарида и альдегидной группой или кетогруппой другого моносахарида. При этом отщепляется молекула воды, и образуется *дисахарид* (рис. 5). Присоединение аналогичным путем дополнительных моносахаридов приводит к образованию *олигосахаридов* все возрастающей длины (*трисахаридов*, *тетрасахаридов* и т.д.) вплоть до очень больших молекул *полисахаридов*, содержащих сотни и тысячи моносахаридных остатков (рис. 5). Поскольку у каждого моносахарида имеется несколько свободных гидроксильных групп, способных образовывать связь с другим моносахаридом или каким-либо иным соединением, число возможных структур полисахаридов исключительно велико. Поскольку каждая из гидроксильных групп может находиться с разных сторон от плоскости кольца (α- и β-положения), то каждую конкретную гликозидную связь обозначают как α/β-*m,n*-связь, где *m* и *n* обозначают номер углеродного атома, несущего гидроксильную группу, участвующую в образовании гликозидной связи. Например, на рис. 5 показаны α-1,4- и α-1,6-гликозидные связи. Даже простейший дисахарид из двух остатков глюкозы может быть образован 11-ю различными гликозидными связями, а три различные гексозы (например, глюкоза, фруктоза и галактоза), соединяясь между собой, способны образовать несколько тысяч различных трисахаридов.



В живых организмах углеводы выполняют структурную, энергетическую и специальные функции. Основными структурными полисахаридами служат: у растений - *целлюлоза* и *пектины*, а у животных и грибов - *хитин*.

*Целлюлоза* - самое распространенное органическое соединение на Земле, поскольку из нее построены клеточные стенки растений. В частности, древесина и хлопок почти целиком состоят из целлюлозы. В день на каждого живущего на Земле человека растения синтезируют примерно 50 кг целлюлозы. Целлюлоза - прочное, волокнистое, водонерастворимое вещество, каждая молекула которого состоит из  $10^4$  и более остатков D-глюкозы, соединенных в неразветвленную цепь посредством  $\beta$ -1,4-гликозидных связей. Полимерные цепи целлюлозы сильно вытянуты и соединены друг с другом водородными связями.

*Хитин*, как и целлюлоза, - линейный неразветвленный полисахарид, однако структурными единицами его служит не D-глюкоза, а N-ацетил-D-глюкозамин. Из хитина построены прочные нерастворимые покровы ракообразных и насекомых, а также клеточные стенки грибов. Хитиновый каркас многих ракообразных усилен за счет включений карбоната кальция.

Углеводы служат главным оперативным источником энергии в клетках. В результате последовательного ряда реакций окисления глюкоза и другие моносахариды распадаются до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  и высвобождающаяся при этом химическая энергия используется клеткой. Для запасания энергии впрок используются полисахариды, построенные из повторяющихся остатков глюкозы, - *крахмал* (у растений) и *гликоген* (у животных). Когда необходима энергия, молекулы глюкозы отщепляются от крахмала или гликогена, а при избытке глюкозы ее молекулы присоединяются к полимерным цепям крахмала или гликогена и удлиняют их. Таким образом, резервные полисахариды все время меняют свой размер в зависимости от потребности организма в энергии.

*Крахмал* представляет собой смесь двух полимеров D-глюкозы - *а-амилозы* и *амилопектина*. а-амилоза состоит из длинных неразветвленных цепей с молекулярной массой от нескольких тысяч до  $5710^5$ , построенных из остатков D-глюкозы, соединенных  $\alpha$ -1,4-гликозидными связями. Амилопектин также имеет высокую молекулярную массу, но, в отличие от а-амилозы, его молекулы сильно разветвлены. В неразветвленных участках амилопектина остатки D-глюкозы соединены  $\alpha$ -1,4-гликозидными связями, а в местах ветвления -  $\alpha$ -1,6-гликозидными связями.

*Гликоген* - сильно разветвленный полисахарид, так же, как и амилопектин, состоящий из остатков D-глюкозы, связанных  $\alpha$ -1,4-гликозидными связями, а в местах ветвления -  $\alpha$ -1,6-гликозидными связями. Больше всего гликогена содержится в клетках печени, где на его долю приходится до 7% общего веса органа. В клетках печени гликоген присутствует в виде крупных гранул, состоящих в свою очередь из меньших гранул, каждая из которых образована одной сильно разветвленной молекулой со средней молекулярной массой в несколько миллионов. С этими гранулами прочно связаны ферменты, ответственные за синтез и распад гликогена.

Хотя и целлюлоза, и крахмал, и гликоген состоят из остатков глюкозы, они сильно различаются по своим свойствам из-за различия гликозидных связей, которыми соединены остатки глюкозы в этих молекулах. Благодаря геометрическим особенностям  $\alpha$ -1,4-гликозидных связей линейные участки полимерных цепей в молекулах гликогена и крахмала стремятся принять скрученную, спиральную конформацию, что способствует образованию плотных гранул крахмала и гликогена, обнаруживаемых в клетках. Напротив, из-за структурных особенностей  $\beta$ -1,4-гликозидных связей молекулы целлюлозы имеют сильно вытянутую линейную конформацию.  $\alpha$ -1,4-связи легко гидрализуются ферментом *амилазой*, поэтому крахмал легко усваивается животными и человеком, расщепляясь до D-глюкозы. Однако в кишечнике животных нет фермента, способного гидролизовать  $\beta$ -1,4-

гликозидные связи, поэтому целлюлоза не переваривается, и ее D-глюкозные остатки не могут служить пищей для большинства организмов. Тем не менее жвачные и термиты используют целлюлозу в качестве пищи благодаря обитающим в их кишечнике микроорганизмам (бактериям и простейшим), которые синтезируют *целлюлазу*, - фермент, гидролизующий  $\beta$ -1,4-гликозидные связи. Целлюлазу синтезируют также некоторые грибы, вызывающие гниение древесины.

К полисахаридам со специальными функциями относятся очень сложные соединения, биохимические функции которых не всегда известны точно, например, *камеди* и *слизи*. Кроме того, углеводы могут ковалентно связываться с белками и липидами, образуя *гликопротеины* и *гликолипиды*. Как правило, такие гибридные молекулы входят в состав оболочек клеток, и их олигосахаридная часть участвует в процессах межклеточного узнавания и рецепции сигнальных молекул. Жесткость олигосахаридных структур, их растворимость в воде и огромное разнообразие возможных конфигураций делают их наиболее подходящими для выполнения этих функций. Гликопротеины, в которых на долю полисахарида приходится основная часть молекулы - более 95%, называются *протеогликаны*. Они входят в состав основного вещества, заполняющего пространство между клетками в большинстве тканей, а у бактерий служат структурной основой клеточных стенок.

## ЛИПИДЫ

*Липидами* называют природные соединения, которые получают из растительных или животных тканей экстракцией неполярными растворителями (например, эфиром, бензолом или хлороформом) и которые не растворимы в воде. К ним относятся продукты взаимодействия *жирных кислот* со спиртами (*простые липиды*), аминспиртами и др. соединениями (*сложные липиды*), *простагландины* и *изопреноидные липиды* (например, каротиноиды, хлорофилл, витамины E и K).

*Триацилглицеролы* - простые липиды, представляющие собой эфиры трехосновного спирта глицерола и трех жирных кислот (рис. 6). Они бывают различных типов в зависимости от природы трех остатков жирных кислот, присоединенных к гидроксильным группам глицерина. Большинство природных жиров и масел представляют собой сложные смеси триацилглицеролов, в состав которых входят жирные кислоты, различающиеся как по длине цепи, так и по степени насыщенности связей. Триацилглицеролы, содержащие остатки только насыщенных жирных кислот, при комнатной температуре имеют консистенцию твердого вещества, а триацилглицеролы с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот - жидкие при комнатной температуре.

Основная функция триацилглицеролов в живых организмах - это запасание энергии. Для этого они накапливаются в цитозоле клеток запасующих тканей (например, подкожной клетчатки) в виде мелкодисперсной эмульсии масляных капелек и могут занимать почти весь объем запасующей клетки. В расчете на единицу веса триацилглицеролы запасают вдвое больше энергии, чем углеводы, и, накапливаясь в больших количествах, могут обеспечивать энергетический обмен организма в течение нескольких недель, тогда как в форме гликогена организм может запастись энергией не более чем на сутки. Однако энергия, запасенная в углеводах, становится доступна для использования организмом быстрее, чем запасенная в форме триацилглицеролов. Поэтому полисахариды (крахмал и гликоген) и жиры (триацилглицеролы) работают как оперативная и долговременная системы запасания энергии соответственно. Дополнительно триацилглицеролы могут служить для теплоизоляции и как источник воды: при окислении триацилглицеролов образуется вдвое больше воды, чем из углеводов, и это используется пустынными животными, а толстый подкожный слой жировой клетчатки надежно защищает тюленей, моржей, пингвинов и других полярных теплокровных животных от холода.

*Воска* - простые липиды, представляющие собой эфиры, образованные насыщенными или ненасыщенными жирными кислотами (с числом углеродных атомов от 14 до 36) и длинноцепочечными спиртами (с числом углеродных атомов от 16 до 22) (рис. 6). У позвоночных секретлируемые кожными железами воска выполняют функцию защитного покрытия, смазывающего и смягчающего кожу и предохраняющего ее от воды. У водоплавающих птиц выделяемые копчиковой железой воска придают перьевому покрову водоотталкивающие свойства. Примерами животных восков служат также *пчелиный воск* и *спермацет*, содержащийся в черепной полости кашалота. Листья многих субтропических растений тоже покрыты защитным слоем воска, который препятствует избыточной транспирации в условиях засушливого климата.

*Фосфолипиды* - сложные липиды, похожие на триацилглицеролы наличием жирных кислот, связанных с глицеролом. Однако в фосфолипидах глицерол связан не с тремя, а лишь с двумя цепями жирных кислот, а оставшееся свободное место в молекуле глицерола занимает фосфатная группа, которая в свою очередь соединена с молекулой полярного спирта, различного для разных фосфолипидов (рис. 6). Полярный спирт образует как бы "голову" молекулы фосфолипида, к которой через глицерол присоединены два неполярных "хвоста". *Сфинголипиды* - сложные липиды, которые тоже имеют полярную "голову" и два неполярных "хвоста", один из которых является остатком длинноцепочечной жирной кислоты, а другой - остатком длинноцепочечного аминоспирта *сфингозина* (или его производного). Из фосфолипидов и сфинголипидов построены все клеточные мембраны.

Задача 6. Энергетические запасы человека.

В печени человека содержится до 500 г гликогена, в скелетных

мышцах - до 200 г, в сердечной мышце и в мозгу - около 90 г гликогена. Резервный жир составляет 67 г на 1 кг массы тела и столько же составляют резервные белки. Рассчитайте, на сколько суток хватит этих энергетических запасов человеку массой 70 кг при полном голодании а) в состоянии постельного режима (расход энергии 6500 кДж/сут); б) при интенсивной мышечной нагрузке (расход энергии 20000 кДж/сут). При расщеплении до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  1 г углеводов и белков выделяется 17.6 кДж, а 1 г жиров - 38.9 кДж.

## РАЗНООБРАЗИЕ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ НА АТОМНОМ И МОЛЕКУЛЯРНОМ

УРОВНЯХ Подводя итог краткому рассмотрению химического строения живых организмов, можно сделать вывод, что колоссальное разнообразие живых организмов, наблюдающееся в природе, определяется не атомным, а молекулярным разнообразием, которое носит в основном *комбинаторный характер*. Действительно, тысячи разнообразных больших и сложных молекул, входящих в состав живых организмов, построены лишь из 30 основных простых органических молекул, играющих роль строительных блоков: 20 L-аминокислот, 5 азотистых оснований (урацил, тимин, цитозин, аденин и гуанин), 2 сахара (D-глюкоза и D-рибоза), 1 азотсодержащий спирт (холин), 16-атомная насыщенная жирная кислота (пальмитиновая) и 1 3-атомный спирт (глицерол). При этом в случае нерегулярных полимеров (белки и нуклеиновые кислоты) их разнообразие определяется разнообразием чередования нескольких типов мономеров, а в случае регулярных полимеров (полисахариды) - разнообразием химических связей между однотипными мономерами.

Огромное разнообразие биологических молекул предопределяет еще более значительное разнообразие взаимодействий между ними. Такое разнообразие имеет тенденцию к взрывному росту из-за образования все новых объектов в результате взаимодействия уже существующих, и, следовательно, комбинаторный принцип строения основных биологических веществ представляется совершенно необходимым для эволюции живых организмов, поскольку, вероятно, только таким образом может эффективно возникать

	новый	материал	для	отбора.
--	-------	----------	-----	---------

Таблица 2

Название Обозначение	Мол. масса Свойства и функции
Аланин Ala A	89.09 Гидрофобная
Аргинин Arg R	174.21 Положительно заряженная; участвует в связывании анионных фосфатных групп
Аспарагин Asn N	132.11 Незаряженная полярная
Аспарагиновая к-та Asp D	133.12 Отрицательно заряженная
Валин Val V	117.16 Гидрофобная; незаменимая
Гистидин His H	155.16 Положительно заряженная; часто участвует в формировании реакционных центров
Глицин Gly G	75.07 Незаряженная полярная
Глутамин Gln Q	146.35 Незаряженная полярная
Глутаминовая к-та Glu E	147.13 Отрицательно заряженная
Изолейцин Ile I	131.18 Гидрофобная; незаменимая
Лейцин Leu L	131.18 Гидрофобная; незаменимая
Лизин Lys K	146.19 Положительно заряженная; незаменимая
Метионин Met M	149.22 Гидрофобная; незаменимая
Пролин Pro P	115.14 Гидрофобная; вызывает изгиб полипептидной цепи
Серин Ser S	105.09 Гидрофобная; часто участвует в образовании реакционных центров ферментов
Тирозин Tyr Y	181.19 Незаряженная полярная; образует водородные связи
Треонин Thr T	119.12 Незаряженная полярная; незаменимая
Триптофан Trp W	204.22 Гидрофобная; незаменимая
Фенилаланин Phe F	165.19 Гидрофобная; незаменимая
Цистеин Cys C	121.16 Незаряженная полярная; образует дисульфидные связи

## Лекция 2. СТРУКТУРНЫЕ УРОВНИ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

*Структурные уровни белков - структурные уровни нуклеиновых*

*кислот - растворимость белков и нуклеиновых кислот - структурные переходы в белках и нуклеиновых кислотах - структура и функция некоторых распространенных белков - сравнительный анализ последовательностей биополимеров - краткие выводы*

### СТРУКТУРНЫЕ УРОВНИ БЕЛКОВ

Последовательность аминокислот, составляющих белок, называется ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ белка. Для сокращенной записи последовательности аминокислот в белковых цепях используют трехбуквенные или однобуквенные условные обозначения (табл. 2).

Запись первичной структуры белка выглядит следующим образом:

1 2 3 4 5

124 125

N-конец      H<sub>2</sub>N-Arg-Gln-His-Ser-Ser-. -Pro-Leu-COOH      C-конец

Нумерация аминокислот принята с N-конца белка, т.е. с конца, на котором находится его аминокгруппа.

На основе полярности боковых R-групп аминокислот, т.е. на основе их способности взаимодействовать с водой, аминокислоты делят на 4 группы: 1) неполярные, или гидрофобные (аланин, валин, изолейцин, лейцин, метионин, пролин, триптофан и фенилаланин); 2) полярные, но незаряженные при клеточном значении pH (аспарагин, глицин, глутамин, серин, тирозин, треонин и цистеин); 3) отрицательно заряженные при клеточном значении pH (аспарагиновая и глутаминовая кислоты); 4) положительно заряженные (аргинин, гистидин и лизин). От того, какие аминокислоты входят в состав белка и преобладают в нем, зависят его свойства, в частности, хорошо ли этот белок растворим в воде.

В структуре молекулы белка допустимы вращения вокруг одинарных ковалентных связей. В результате длинная белковая цепь способна изгибаться и принимать различную пространственную структуру. Однако каждая белковая молекула имеет не произвольную, а определенную пространственную структуру. Предполагают, что эта структура определяется таким положением аминокислотных остатков и их боковых групп, при котором достигается минимум свободной энергии белковой молекулы. При этом весьма существенными оказываются разные типы дополнительных взаимодействий между боковыми R-группами аминокислот.

Существуют пять типов взаимодействий, сочетание которых обеспечивает формирование и поддержание пространственной структуры белка (рис. 7): 1) водородные связи между R-группами аминокислотных остатков (например, гидроксильная группа остатка серина в одном участке полипептидной цепи может образовать водородную связь с атомом азота в кольце остатка гистидина, находящегося совсем в другом месте той же цепи); 2) электростатическое притяжение между противоположно заряженными R-группами (например, отрицательно заряженная карбоксильная группа остатка глутаминовой кислоты может притягиваться положительно заряженной аминокгруппой остатка лизина); 3) гидрофобные взаимодействия (гидрофобные R-группы некоторых аминокислотных остатков (табл. 2) избегают контактов с водным окружением и стремятся собраться вместе внутри белковой структуры, где они защищены от соприкосновения с водой (рис. 7)); 4) вандерваальсовы взаимодействия (из-за флуктуаций электрического поля любые два атома на очень близких расстояниях слабо притягиваются (рис. 8); 5) ковалентные поперечные связи (некоторые белки содержат остатки цистеина, которые способны образовывать дисульфидную ковалентную связь (рис. 7), легко разрывающуюся при обработке различными веществами-восстановителями). Характеристики сравнительной силы различных взаимодействий (представленные как энергия связи, т.е. энергия, необходимая для ее разрыва) суммированы в табл. 3. Индивидуальные связи значительно варьируют по силе в зависимости от конкретных участвующих атомов и микроокружения, так что приведенные величины могут служить лишь для грубой ориентировки. Существенно, что водная среда значительно ослабляет ионные и водородные связи между макромолекулами.

Таблица 3

Тип связи	Длина, нм	Энергия связи, кДж/моль	
		в вакууме	в воде
Ковалентная	0.15	375	375
Ионная	0.25	330 16.7	4.2
Водородная	0.30	4.2	4.2
Вандерваальсова	0.20		4.2

Определение аминокислотной последовательности белков в настоящее время автоматизировано и доведено до совершенства. Таким обра-

зом, данные о первичной структуре белка относительно легко получить. Однако функциональные свойства белка зависят прежде всего от его пространственной структуры. Отсюда возникает важная задача о предсказании пространственной структуры белка по его первичной структуре. Конечно, трехмерную структуру белка можно найти и экспериментально - с помощью рентгеноструктурных исследований. Но, во-первых, это достаточно трудоемкий метод. Во-вторых, для этого надо получить кристаллы исследуемого белка, но не все белки кристаллизуются. И, наконец, этот метод не обладает достаточным разрешением, чтобы была видна вся последовательность аминокислот.

Непосредственный расчет наиболее стабильной конформации белковой молекулы путем минимизации суммарной энергии всех видов внутримолекулярных взаимодействий невозможен из-за непреодолимых трудностей, связанных с исключительно большим числом возможных конформаций белка. Так, если считать, что в среднем каждый аминокислотный остаток из  $n$  их общего числа в белковой цепи обладает 10 низкоэнергетическими конформациями, то общее число структурных вариантов составляет  $10^n$ . Такие расчеты можно выполнить с помощью ЭВМ только для 5-6 -членного пептидного фрагмента.

Задача несколько облегчается тем, что в пространственном строении белков прослеживается иерархия уровней. В структуре достаточно большой полипептидной цепи практически всегда обнаруживаются регулярно повторяющиеся участки. Их называют **ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ** белка. В типичном белке обычно 60% аминокислотных остатков участвует в формировании вторичных структур. Наиболее обычны пять элементов вторичной структуры - правая и левая  $\alpha$ -спирали, параллельный и антипараллельный  $\beta$ -слой и  $\beta$ -изгиб, которые стабилизированы водородными связями. Наиболее распространенные правая  $\alpha$ -спираль и антипараллельный  $\beta$ -слой показаны на рис. 9. На 1 виток правой  $\alpha$ -спирали приходится 3.6 аминокислотных остатка, и шаг спирали составляет 0.54 нм, так что на 1 аминокислотный остаток приходится 0.15 нм; диаметр такой спирали без учета боковых групп - 0.6 нм.  $\alpha$ -спираль может быть построена либо из L-, либо из D-аминокислот, но все аминокислоты должны представлять собой стереоизомеры одного и того же типа, так как пептидная цепь, состоящая из смеси остатков L- и D-аминокислот, не способна образовать спираль, и хотя из природных L-аминокислот можно построить как правую, так и левую спираль, правые спирали в белках встречаются намного чаще. В  $\beta$ -слоях полипептидные цепи находятся в максимально вытянутом состоянии и на 1 аминокислотный остаток приходится 0.347 нм.

Анализ частоты встречаемости различных аминокислот в определенных элементах вторичной структуры или расчеты энергии взаимодействий в олигопептидных фрагментах первичной последовательности лежат в основе различных методов предсказания наличия элементов вторичной структуры в белке. В настоящее время расположение  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -изгибов довольно хорошо предсказывается несколькими различными методами, тогда как точность локализации  $\beta$ -слоев все еще оставляет желать лучшего.

Пространственное расположение элементов вторичной структуры образует **ТРЕТИЧНУЮ СТРУКТУРУ** белка. Наглядно представить себе третичную структуру белка очень сложно. Если представить атомы в виде шаров и не принимать во внимание водородные атомы, можно построить объемную модель. Однако детали хода полипептидной цепи и характер вторичных структур по такой модели установить невозможно (рис. 10А). В другом типе моделей каждой химической связи соответствует отрезок прямой линии. Но даже в этом случае трудно разобраться в запутанной сетке связей (рис. 10Б). Поэтому, как правило, используют абстрактные рисунки, на которых изображены лишь ход цепи аминокислотных остатков, элементы вторичной структуры, наиболее важные боковые цепи и положения дисульфидных связей (рис. 10В).

Исследования третичной структуры белков показали, что типичный белок среднего размера (300 аминокислотных остатков) содержит от 3 до 7  $\alpha$ -спиралей, а типичная  $\alpha$ -спираль состоит из 10 аминокислотных остатков. Число  $\beta$ -слоев обычно меньше, но каждый содержит значительно больше аминокислот. Большинство обширных  $\beta$ -слоев состоит из 4 - 6 цепей и содержит от 20 до 40 аминокислот. Антипараллельные слои встречаются чаще, чем параллельные, но бывают и смешанные  $\beta$ -слои, сочетающие параллельные и антипараллельные участки.  $\alpha$ - и  $\beta$ -структуры не имеют тенденции располагаться в каких-либо определенных местах третичной структуры, например, внутри или на поверхности, в области N-конца или C-конца и т.д. Не существует также какой-либо тенденции элементов вторичной структуры образовывать кластеры в третичной структуре. Все это затрудняет предсказание третичной структуры белковой молекулы по ее первичной структуре.

Многие белковые молекулы можно рассматривать только как единое целое, но часто встречается также ситуация, когда белок можно расс-

матривать как состоящий из отдельных доменов. Наличие доменов может отражать ход сворачивания третичной структуры из развернутой цепи. Сворачивание в третичную структуру идет по мере синтеза белковых цепей на рибосомах. Синтез белков идет с N-конца и поэтому молекула тоже начинает сворачиваться с N-конца. В результате трехмерная структура при таком поэтапном, сопряженном с синтезом, сворачивании может отличаться от структуры, которая формируется при сворачивании уже готовой белковой цепи. Это обстоятельство тоже следует учитывать при теоретических расчетах пространственной структуры белковой цепи. Современное состояние проблемы предсказания иллюстрирует рис. 11, на котором сравнивается структура небольшого (всего 58 аминокислотных остатков) белка, полученная методом рентгеноструктурного анализа (слева) и рассчитанная путем минимизации суммы энергий взаимодействия между различными аминокислотными остатками и молекулами растворителя (справа). Хотя получено качественное согласие, очевидно, что проблему таких расчетов нельзя считать решенной.

Интересно, что очень похожие по третичной структуре домены встречаются иногда в белках, выполняющих совершенно непохожие функции. При этом возникает ряд интересных вопросов, на которые пока нет ответа. Чем вызвано это сходство? Имели ли все такие белки в далеком прошлом общего предка? Или, может быть, сходство доменов вызвано простыми структурными ограничениями, налагаемыми на белки? Возможно, что существует не так уж много способов свертывания полипептидной цепи, приводящих к энергетически выгодной структуре. Или, быть может, такие домены обладают какими-то уникальными физическими свойствами - например, структурой, гибкостью или жесткостью, что делает их особенно подходящими для выполнения какой-либо роли? Дальнейшие исследования должны будут ответить на эти вопросы.

Белок представляет собой довольно плотную молекулу. Если считать, что каждый атом представляет собой сферу, радиус которой равен вандерваальсову радиусу атома, то плотность упаковки можно оценить как отношение суммы объемов атомов к полному объему, занимаемому молекулой белка. Это отношение для белков оказывается равным 0.75, что соответствует наиболее плотной упаковке сфер. Тем не менее структуру белка нельзя считать жесткой. Исследования методом ЯМР и расчеты молекулярной динамики приводят к представлению, что положения отдельных аминокислотных остатков не строго фиксированы, так что структура как бы "дышит", при этом подвижность некоторых аминокислотных остатков настолько велика, что их положение, найденное методами рентгеноструктурного анализа, становится непоказательным. Эти результаты объясняют также способность некоторых малых молекул проникать вглубь белка.

Некоторые белки состоят не из одной, а из нескольких полипептидных цепей. Каждая такая цепь называется *субъединицей* белка, а сам составной белок - *олигомерным*. Такие белки имеют еще один структурный уровень, уровень ЧЕТВЕРТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ. Под

четвертичной структурой понимают взаимное расположение субъединиц, т.е. способ их совместной укладки и упаковки с образованием нативной структуры олигомерного белка. Отдельные субъединицы соединяются между собой либо водородными связями, либо "слипаются" своими гидрофобными поверхностями. Обычно олигомерные белки состоят из 3 - 6 субъединиц, но встречаются также содержащие 10 - 12 субъединиц, и как крайний пример известен пируватдегидрогеназный комплекс, состоящий из 72 субъединиц.

Задача 7. Мышечный белок тропомиозин имеет молекулярную массу 70 кДа и представляет собой суперспираль, состоящую из двух  $\alpha$ -спирализованных тяжей. Средняя масса одного аминокислотного остатка составляет 110 Да. Рассчитайте длину молекулы тропомиозина.

Задача 8. Основой структуры волоса служит полипептидная цепь  $\alpha$ -кератина в  $\alpha$ -спиральной конформации. До какой максимальной длины можно растянуть 10-сантиметровый волос после его нагревания и обработки восстанавливающим агентом, разрывающим все дисульфидные связи?

### СТРУКТУРНЫЕ УРОВНИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Последовательность расположения нуклеотидов в ковалентной цепи нуклеиновой кислоты называется ее ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ. Комплементарные азотистые основания способны образовывать водородные связи друг с другом, и это приводит к формированию ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ нуклеиновой кислоты. Подавляющее большинство молекул ДНК являются двухцепочечными (рис. 4), и это накладывает ограничения на их нуклеотидный состав. Для двухцепочечных ДНК всегда  $C_A = C_T$  и  $C_G = C_C$ , где  $c$  - мольная доля. Этот факт, открытый и обстоятельно изученный

Э. Чаргаффом (E. Chargaff), был одним из важнейших среди тех данных, которые привели к концепции двойной спирали для ДНК. Он означает, что для описания состава двухцепочечной ДНК необходима только одна переменная  $C_{G+C}$  (или  $C_{A+T}$ ). Однако из выполнения правил Чаргаффа еще не следует, что ДНК обязательно является двухцепочечной.

GC содержание природных нуклеиновых кислот существенно различается, но нет никаких указаний на то, что нуклеотидный состав РНК или ДНК хоть как-то коррелирует с биологическими функциями этих молекул. Все же для большинства организмов отношение  $C_{A+T}/C_{G+C}$  не слишком далеко отклоняется от среднего значения 1.3 (рис. 12). Исключение составляют некоторые бактерии и минорная фракция эукариотической ДНК - так называемая *сателлитная* ДНК. В состав некоторых ДНК и РНК входят необычные модифицированные основания, называемые *минорными*. Вероятно, они необходимы для выполнения каких-то специальных функций нуклеиновых кислот, поскольку у более развитых в эволюционном отношении организмов содержание необычных нуклеотидов выше, чем у более примитивных. Некоторые основания отдельных ДНК метилированы, причем присутствуют они в очень специфичных последовательностях. Эта модификация служит маркером для опознавания собственных молекул ДНК от чужеродных и является механизмом защиты против внутриклеточных ферментов-*рестриктаз*, которые в отсутствие метилирования расщепляли бы ДНК в этих местах.

Вторичной структурой двухцепочечных молекул ДНК является структура двойной спирали, предложенная Д. Уотсоном (J. Watson) и Ф. Криком (F. Crick). Однако фиксированная структура уотсон-криковских пар оснований допускает большое многообразие форм двойной спирали. На рис. 13 схематически изображена вторичная структура Аи В-форм ДНК. ДНК в водных растворах принимает В-форму, которая считается уотсон-криковской структурой, но при определенных условиях она может быть переведена в А-спираль. Находятся ли природные ДНК в А-форме - неизвестно, но можно с достаточной определенностью сказать, что комплементарные комплексы РНК-ДНК существуют в А-, а не в В-форме. Обе структуры являются правыми спиралью, однако В-форма похожа на обычную винтовую лестницу и содержит 10 пар



оснований на виток, а А-форма - на винтовую лестницу, ступеньки которой наклонены к центру, и имеет 11 пар оснований на виток. В литиевой соли ДНК при низкой влажности обнаружена С-форма ДНК, которую можно рассматривать как разновидность В-формы с числом оснований на виток, равным 9.3. Существуют и другие варианты как А-, так и В-форм, так что они представляют скорее семейства структур, чем строго определенные конформации двойной спирали. Наряду с семействами правоспиральных В- и А-форм существуют участки ДНК, в которых регулярно чередуются пуриновые и пиримидиновые основания и которые могут переходить в левоспиральную Z-форму. Названная так из-за зигзагообразного вида линии сахарофосфатного остова Z-форма может возникать в клетке в виде небольших участков в составе В-формы при возникновении стерических напряжений (при сверхспирализации) в молекуле ДНК. Двухцепочечные РНК образуют правые спирали с 11 или 10 основаниями на виток. При определенных условиях в нуклеиновых кислотах могут формироваться трехцепочечные спиральные участки (*триплексы*).

Одноцепочечные молекулы нуклеиновых кислот, как и двухцепочечные, тоже часто образуют спирали, скручиваясь сами на себя и формируя таким образом определенную последовательность петель, или *шпильки*. Зная нуклеотидную последовательность одноцепочечной молекулы, можно построить предположительные модели ее вторичной структуры, причем часто можно обойтись без применения специальных алгоритмов, если руководствоваться определенными правилами. Так, длинные непрерывные взаимно комплементарные участки почти всегда будут образовывать двухцепочечные шпильки; один длинный двухцепочечный участок предпочтительнее двух более коротких с суммарной длиной, равной протяженности этого участка; из двух эквивалентных взаимно исключających спиральных участков более стабильным является тот, у которого выше GC-содержание (поскольку G и C образуют три водородные связи при комплементарном спаривании, а A и T - только две) и т.д. О взаимодействиях нуклеотидов известно достаточно много для того, чтобы эти правила можно было использовать даже для количественной оценки стабильности конкретных структур.

Помимо формирования спиральных участков вторичной структуры, нуклеиновые кислоты способны и к образованию специфической пространственной конфигурации, т.е. ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ. Первой нуклеиновой кислотой, для которой методом рентгеноструктурного анализа детально установлена третичная структура, была фенилаланиновая тРНК из дрожжей (рис. 14). Вероятно, все тРНК имеют сходную третичную структуру. Детальная информация о третичной структуре ДНК пока отсутствует, хотя предполагают, что в ней могут образовываться изломы с нарушением спаривания двух соседних пар оснований и небольшим раскручиванием остова. Повторяясь, через каждые 10 пар оснований такие изломы способны порождать левую *сверхспираль* с диаметром около 10 нм, каждое звено которой состоит из 10 пар оснований, так что на каждые 140 пар оснований приходится приблизительно 1.5 витка.

Другой тип изломов приводит к образованию правой сверхспирали, содержащей 9.6 пар оснований на виток. Однако в клетке ДНК обычно находится в постоянном контакте с белками, образуя различные ДНК-белковые комплексы, для формирования которых существенной оказывается, вероятно, лишь вторичная структура ДНК.

Примеры ЧЕТВЕРТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ в системах, состоящих исключительно из нуклеиновых кислот, очень немногочисленны. Один из них - очень прочный межмолекулярный комплекс, который образуют молекулы тРНК с комплементарными антикодонами *in vitro*. Роль этого явления *in vivo* не ясна, но может служить указанием на существование еще не известных взаимодействий нуклеиновых кислот на уровне четвертичной структуры в клетке.

Задача 9. ДНК имеет молекулярную массу 250 млн. Да. Вычислите ее длину в см, предполагая, что ДНК находится в В-форме; в А-форме. Сколько витков содержит эта ДНК в каждой из форм?

## РАСТВОРИМОСТЬ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Белки являются *амфолитами* (сокращение от слов "амфотерные электролиты"), т.е. они содержат как положительно, так и отрицательно заряженные аминокислотные остатки при характерных для клетки значениях рН (табл. 2). Заряд боковых R-групп аминокислот зависит от значения рН: при высоких значениях рН карбоксильные группы в водном растворе легко теряют  $H^+$  и приобретают отрицательный заряд, тогда как у аминокислот заряд отсутствует, а при низких значениях рН наблюдается обратная ситуация - карбоксильные группы не несут заряда, тогда как аминокислотные группы захватывают из водного раствора ион  $H^+$  и приобретают положительный заряд. Поэтому при низких рН белки заряжены положительно, а при высоких - отрицательно. Поскольку содержание и состав аминокислот, способных к обратимой ионизации, различны для разных белков, то для каждого белка существует свое характерное значение рН, при котором он является незаряженным; это значение называется *изоэлектрической точкой* (ИЭТ) и обозначается как  $pI$ . Нуклеиновые кислоты в водных растворах всегда сильно отрицательно заряжены, т.к. сахарофосфатный остов ДНК и РНК имеет отрицательный заряд фосфатных групп, которые депротонированы при характерных для клеток значениях рН.

Молекулу белка или нуклеиновой кислоты невозможно представить себе в чистом виде, поскольку являясь полиэлектролитами, они нуждаются в противоионах. Кроме того, всегда наблюдается сильное связывание молекул обычных растворителей (например, воды) с биополимерами. Поэтому реальным объектом в водном растворе всегда является гидратированная молекула, несущая противоионы. Степень взаимодействия белков и нуклеиновых кислот с водой не позволяет считать их растворы идеальными ни при каких концентрациях. Даже сухие пленки белков прочно сорбируют около 0.4 моля воды на моль аминокислот. Дополнительно более слабо связываются еще от 1 до 2 молей воды. Еще некоторая часть воды может задерживаться в полостях или углублениях молекулы белка. Даже не будучи связанной, она будет двигаться с белком, что приведет к увеличению кажущегося размера белка. На практике слишком сложно использовать вышеописанную подробную картину взаимодействия вода-биополимер для расчета гидродинамических свойств белков или нуклеиновых кислот, и обычно используют упрощенную модель гидратации, согласно которой вода заполняет все внутреннее пространство макромолекулы, равномерно покрывает всю ее поверхность и связана одинаково. Экспериментально определенные при таких предположениях значения плотности безводных белков лежат в пределах от 1.33 до 1.45 г/см<sup>3</sup> (среднее значение 1.37 г/см<sup>3</sup>). Нуклеиновые кислоты имеют гораздо большую плотность; так, если противоионом является  $Na^+$ , то плотность равна 2.00 г/см<sup>3</sup>, а если противоионом является  $Cs^+$ , то она равна 2.27 г/см<sup>3</sup>. Для объяснения гидродинамического поведения типичных белков необходимо, чтобы гидратация была равна от 0.3 до 0.4 г H<sub>2</sub>O на 1 г белка.

Задача 10. Рассмотрим твердую сферическую молекулу белка с молекулярной массой 30 кДа средней плотности. Как изменится радиус гидратированной молекулы при гидратации 0.34 г H<sub>2</sub>O /г белка в предположении, что вся вода равномерно распределена по поверхности белка?

Растворимость белков в различных растворителях определяется соотношением и распределением гидрофильных и гидрофобных остатков на поверхности белковой молекулы (рис. 15А) и, следовательно, зависит прежде всего от рН и *ионной силы* раствора. Наименьшей растворимостью белок обладает при рН, равном его изоэлектрической точке: одинаково заряженные молекулы отталкиваются, а если заряд снижается до нуля, электростатическое отталкивание уменьшается, и по мере приближения к ИЭТ молекулы притягиваются друг к другу (рис. 15Б).

Этот процесс называется *изоэлектрическим осаждением*. Ионная сила раствора определяется как  $m = 0.5 \sum C_i Z_i^2$ , где  $C_i$  и  $Z_i$  - соответственно концентрация и заряд иона  $i$ . Для каждого данного электролита ионная сила пропорциональна его концентрации. Например, для элект-

ролита  $A_p^{m+}B_q^{n-}$  при молярной концентрации  $C$  имеем:  $C_A = pC$ ,  $C_B = qC$  и  $m = 0.5SC(pm^2 + qn^2)$ . Ионы экранируют заряды белков и этим уменьшают силы отталкивания между одноименно заряженными молекулами, поэтому растворимость белков обычно снижается по мере уменьшения ионной силы раствора. Однако при высокой ионной силе растворимость белков тоже резко падает, и этот эффект называется *высаливание*. Высаливание происходит в результате гидратации ионов соли: когда свободных молекул воды остается мало, уменьшается гидратация белков, а следовательно, и их растворимость. Температура тоже оказывает действие на растворимость белков. Например, повышение температуры при высокой концентрации солей усиливает гидрофобные взаимодействия, повышая их энергетическую выгодность в растворе, и тем самым уменьшает растворимость белков. Нуклеиновые кислоты хорошо растворимы в воде, но осаждаются спиртами; это используется для выделения и очистки нуклеиновых кислот.

## СТРУКТУРНЫЕ ПЕРЕХОДЫ В БЕЛКАХ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

Большинство белковых молекул сохраняет биологическую активность, т. е. способность выполнять свойственную им функцию, только в пределах довольно узкой области рН и температуре не выше 50-60<sup>0</sup>С. При нарушении этих условий происходят нарушения четвертичной, третичной и вторичной структур белковой молекулы, называемые ДЕНАТУРАЦИЕЙ. Разрыва ковалентных пептидных связей белка при его денатурации не происходит, однако могут разрываться водородные, ионные и дисульфидные связи и нарушаться гидрофобные взаимодействия, что вызывает потерю его биологической активности и часто потерю растворимости. В денатурированном состоянии полипептидная цепь представляет случайный и беспорядочный клубок. Денатурация бывает полная и неполная: полная денатурация обычно необратима, а при неполной денатурации белок может *ренатурировать* (повторно свернуться) при возвращении к первоначальным условиям (рис. 16). Ренатурация возможна только тогда, когда белок не обладал сложной архитектурой вторичной и третичной структуры; в противном случае происходит неправильное сворачивание полипептидной цепи с образованием новых, ранее не свойственных белку, дополнительных взаимодействий между боковыми группами его аминокислот, и биологическая активность такого белка не восстанавливается. Хорошими примерами денатурации служат свертывание белка при варке яиц (тепловая денатурация) и потеря растворимости белков при скисании молока (изменение рН под действием молочнокислых бактерий).

Увеличивая температуру, изменяя рН и концентрации солей или с помощью химической обработки, можно вызвать расплетание двойной спирали ДНК. При этом происходит денатурация в виде перехода СПИРАЛЬ-КЛУБОК, названного так потому, что спирализованная двойная цепь довольно жесткая, а одностаниевая молекула - гибкая (рис. 17). Поэтому переход спираль-клубок часто еще называют плавлением спирали. Аналогия с обычным плавлением твердого вещества углубляется тем, что переход спираль-клубок при изменении температуры происходит очень резко - в узком температурном интервале - и сопровождается заметным поглощением теплоты, которая идет на разрыв стабилизирующих спираль водородных связей. Кроме того, при плавлении ДНК разрушаются не отдельные витки спирали (что было бы аналогично выплавлению отдельных ячеек кристаллической решетки), а сразу весьма длинные куски - это свойство называют *кооперативностью*. Однако есть и отличие от настоящего плавления: спиральные и деспирализованные участки не разделяются вдоль цепи, а остаются перемешанными, что означает, что переход спираль-клубок не является фазовым. С точки зрения теоретической физики плавление ДНК все же есть настоящее плавление, но не трехмерного кристалла, а одномерного, поэтому согласно теореме Л.Д. Ландау оно происходит хотя и резко, но к расслоению фаз не ведет. Следует, однако, иметь в виду, что теорема Ландау была доказана для строго однородных систем, а молекула ДНК содержит два сорта звеньев - пары АТТ и G7С, различающиеся силой связи. Пара АТТ стабилизирована только двумя водородными связями, поэтому ее легче порвать,

чем пару G7C, стабилизированную тремя водородными связями (рис. 4). Поэтому участки ДНК, обогащенные парами A7T, плавятся быстрее или при более низкой температуре, чем участки, обогащенные парами G7C, и, следовательно, переход спираль-клубок происходит не скачком, а поэтапно, участок за участком. Если мерить зависимость поглощения тепла от температуры для раствора молекул ДНК, то на графике, отражающем эту зависимость, вместо одного

бесконечно узкого пика, который характерен для плавления льда, наблюдается множество пиков с шириной примерно  $0.5^{\circ}\text{C}$ , отражающих выплавление отдельных участков в молекуле (рис. 18).

Денатурировавший белок или нуклеиновая кислота представляют собой беспорядочный клубок, и его в первом приближении можно представить как линейный полимер, звенья которого способны свободно вращаться вокруг связывающих их в цепь связей, и в котором нет существенного взаимодействия между боковыми группами. Такой полимер называется СВОБОДНО-СОЧЛЕНЕННОЙ ЦЕПЬЮ. Он не обладает определенной трехмерной структурой или формой, так как она постоянно изменяется под действием броуновского движения. Его размеры описываются усредненной величиной - средним радиусом инерции:

$$R_G = \sqrt{\frac{SL^2}{6n}}$$

где  $n$  - число звеньев в молекуле, а  $R_i$  - среднее расстояние звена  $i$  от центра тяжести молекулы (рис. 19). Свободно-сочлененную цепь можно рассматривать как траекторию в трехмерном пространстве случайно перемещающейся (диффундирующей) молекулы или броуновской частицы. Теория случайного блуждания содержит простой и достаточно важный результат, описываемый формулой Эйнштейна-Смолуховского: если траектория случайного блуждания представляет собой запутанную ломаную линию, состоящую из  $n$  прямолинейных отрезков (звеньев), каждый длиной  $l$ , то среднее расстояние между началом и концом движения, т. е. наиболее вероятное результирующее смещение частицы из начальной точки  $r^2 = nl^2$  или, если обозначить длину пути вдоль контура траектории как  $L = nl$ , то  $r^2 = lL$  (рис. 19). Аналогия между свободно-сочлененной цепью и траекторией случайного блуждания позволяет использовать формулу Эйнштейна-Смолуховского для описания неупорядоченного клубка, рассматривая  $l$  как длину звена биополимера,  $n$  как число таких звеньев,  $L$  - как общую (контурную) длину макромолекулы, а  $r$  - как среднее статистическое расстояние между концами этой молекулы. В пределе бесконечно длинных цепей  $r$  и  $R_G$  оказываются непосредственно связанными:  $R_G^2 = r^2/6$ . Однако эту связь можно также использовать в большинстве оценочных расчетов средних размеров макромолекул.

Что такое длина звена биополимера, рассматриваемого как свободно-сочлененная цепь? Идея заключается в том, что только достаточно удаленные друг от друга мономеры ориентированы по отношению друг к другу случайным образом, поэтому реальная цепь может быть приближенно представлена как цепь из свободно-сочлененных звеньев, которые выбираются достаточно большими, чтобы выполнялось условие случайной ориентации. Таким образом определенное звено обычно состоит не из одного, а из многих мономеров, и называется *статистическим сегментом*. Длина статистического сегмента зависит от жесткости биополимера и - в случае белков - от природы боковых групп аминокислот. Поэтому размер статистических сегментов сильно различается для белков с разным аминокислотным составом, например, для полиглицина - 0.86 нм, для поли-L-аланина - 3.7 нм, а для поли-L-пролина - 46 нм. Двухцепочечные молекулы ДНК обладают большой жесткостью и длина их статистического сегмента в зависимости от нуклеотидного состава составляет  $100 + 10$  нм, т.е. каждый статистический сегмент двухцепочечной ДНК содержит более 294 пар оснований.

Задача 11. Необходимость упаковки в хромосомы. Средняя длина молекулы ДНК, входящей в состав одной хромосомы человека, составляет 4.3 см. Представьте себе, что молекула ДНК представляет собой статистический клубок, и рассчитайте характерный объем такого клубка. Сравните его с объемом клетки тела ( $4710^{-9}$  см<sup>3</sup>).

Задача 12. Как изменится объем белка, представляющего собой  $\alpha$ -спираль длиной 45 нм и диаметром 1.1 нм, после его полной денатурации, когда он превращается в статистический клубок? Используйте для расчета модель свободно-сочлененной цепи, принимая среднюю длину статистического сегмента в полностью денатурированной молекуле, равной 10 нм.

Модель свободно-сочлененной цепи является крайне идеализированной. Во-первых, ясно, что поскольку два звена цепи не могут занимать одну и ту же область пространства, конфигурации с самопересечением, возникающие при "случайном блуждании", не могут реально существовать. Во-вторых, геометрия ковалентных связей между мономерами в биополимерах обычно такова, что углы между связями являются фиксированными, а изгибы макромолекулы возможны лишь в результате свободных поворотов мономеров вокруг связей, что описывается моделью *цепи со свободным вращением*. И, в-третьих, между мономерными звеньями может существовать взаимодействие - притяжение или отталкивание. Если во взаимодействии звеньев доминирует отталкивание, то полимерный клубок набухает. Если преобладает притяжение звеньев, то, когда характерная энергия притяжения велика по сравнению с тепловой энергией  $kT$ , макромолекула должна сжиматься относительно размеров случайного клубка. Когда притяжение звеньев станет достаточно сильным, в макромолекуле должен произойти переход типа газ-жидкость: участки полимерной цепи "сконденсируются сами на себя" и вместо весьма разреженного полимерного клубка возникнет плотная сконденсированная "капля" - полимерная *глобула*. Этот переход называется переходом клубок-глобула.

### СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ НЕКОТОРЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫХ БЕЛКОВ

По общим структурным особенностям белки можно разделить на два основных класса: *фибриллярные белки* - расположенные параллельно друг другу вытянутые полипептидные цепи, образующие длинные нити или слои, и *глобулярные белки*, в которых полипептидные цепи плотно свернуты в компактные структуры - глобулы. Например, белки-ферменты - одни из наиболее важных биологических макромолекул - обычно существуют в живой клетке в виде плотных глобул.

$\alpha$ -КЕРАТИНЫ - это основной тип фибриллярных белков, из которых образуются наружные защитные покровы позвоночных. На их долю приходится почти весь сухой вес волос, шерсти, перьев, рогов, ногтей, когтей, игл, чешуи, копыт, черепашьего панциря, а также значительная часть сухого веса кожи.  $\alpha$ -кератины представляют собой целое семейство белков, сходных между собой по аминокислотному составу.  $\alpha$ -кератины богаты гидрофобными аминокислотами (фенилаланином, изолейцином, валином, метионином и аланином) и поэтому полностью не растворимы в воде. Полипептидная цепь  $\alpha$ -кератина имеет типичное строение правой  $\alpha$ -спирали, описанной в разделе о вторичной структуре белков. Все пептидные группы  $\alpha$ -кератина участвуют в образовании внутрицепочечных водородных связей, стабилизирующих  $\alpha$ -спираль.

Волосы представляют собой скрученные наподобие каната многожильные структуры, основным элементом структуры которого является полипептидная цепь  $\alpha$ -кератина в  $\alpha$ -спиральной конформации: три  $\alpha$ -спиральные цепи обвивают друг друга, образуя трехжильную суперспираль, а 11 таких суперспиралей составляют микрофибриллу волоса (рис. 20).  $\alpha$ -кератины богаты остатками цистеина, способными, как уже было сказано, образовывать дисульфидные связи друг с другом. Образование дисульфидных связей между соседними полипептидными цепями повышает прочность  $\alpha$ -кератиновых волокон. Разные  $\alpha$ -кератины различаются содержанием цистеина, при этом самые прочные и жесткие  $\alpha$ -кератины, например,  $\alpha$ -кератины в панцире черепахи, содержат до

18% цистеина.

**β-КЕРАТИНЫ** (наиболее типичным представителем которых может служить *фиброин* - белок шелка и паутины), в отличие от α-кератинов, имеют максимально вытянутую β-конформацию. Соседние полипептидные цепи β-кератинов соединены между собой водородными связями и образуют антипараллельный складчатый β-слой, описанный в разделе о вторичной структуре белков. Обработанный горячим паром и растянутый α-кератин приобретает β-конформацию.

**КОЛЛАГЕН** - самый распространенный белок у высших животных. На долю коллагена приходится почти треть всей массы белков позвоночных. Например, тело коровы, весящей около 400 кг, скрепляется и поддерживается в основном системой прочных коллагеновых волокон, находящихся в коже, сухожилиях, хрящах и костях животного. Волокна (фибриллы) коллагена могут выдерживать нагрузку, вес которой по меньшей мере в 10000 раз превышает их собственный вес, т. е. по прочности они превосходят стальную проволоку равного поперечного сечения. В сухожилиях фибриллы коллагена расположены в виде попеременно-связанных параллельных пучков, обладающих очень большой прочностью на разрыв и практически нерастяжимых. В коже фибриллы коллагена образуют нерегулярно сплетенную и очень густую сеть. В роговице глаза слои коллагеновых фибрилл уложены крест-накрест.

Фибриллы коллагена состоят из повторяющихся полипептидных субъединиц, называемых *тропоколлагеном*. Тропоколлаген представляет собой палочкообразную молекулу с молекулярной массой около 300 кДа, длиной 300 нм и толщиной 1.5 нм. Эти субъединицы уложены вдоль фибриллы в виде параллельных пучков по типу "голова к хвосту" (рис. 21Б). Головки параллельно расположенных молекул тропоколлагена сдвинуты относительно друг друга ступенчатым образом на одно и то же расстояние в продольном направлении. Этим объясняется характерная для коллагеновых волокон поперечная исчерченность с периодом 64 нм (рис. 21А).

Тропоколлагеновые субъединицы состоят из трех полипептидных цепей, плотно скрученных в виде трехжильного каната, а каждая полипептидная цепь тропоколлагена тоже представляет собой спираль (рис. 21Б). Полипептидная цепь тропоколлагена образует левую спираль, периодичность и размеры которой сильно отличаются от соответствующих параметров α-спирали. Это объясняется необычным аминокислотным составом коллагена, в котором четыре аминокислоты значительно преобладают над всеми другими: 35% приходится на глицин, 11% - на аланин и 21% - на пролин и гидроксипролин. Из-за обилия пролина и гидроксипролина, содержащих в боковой группе жесткие пирролидоновые кольца, затрудняющие сворачивание в α-спираль, тропоколлагеновая спираль содержит только 3 аминокислотных остатка на виток и оказывается гораздо более развернутой по сравнению с туго закрученной α-спиралью.

В коллагене отсутствуют водородные связи, вместо них прочность коллагенового волокна повышают ковалентные поперечные связи: внутримолекулярные (в пределах одной тропоколлагеновой единицы) и межмолекулярные (между отдельными тропоколлагеновыми единицами). По мере старения в коллагене образуется все больше поперечных связей, что делает его фибриллы более жесткими, но более хрупкими. Это изменяет механические свойства хрящей и сухожилий, делает более ломкими кости и понижает прозрачность роговицы глаза. При кипячении в воде происходит гидролиз некоторых ковалентных связей и волокнистый, нерастворимый и неперевариваемый коллаген превращается в *желатину* - растворимую смесь полипептидов.

**ЭЛАСТИН** - фибриллярный белок, по ряду свойств напоминающий коллаген. Он входит в состав эластичного слоя стенок артерий, в желтую эластическую ткань связок и некоторые другие ткани, способные к обратимому растяжению. Подобно коллагену, эластин богат глицином и аланином, но содержит много остатков лизина и мало остатков пролина. Полипептидные цепи эластина образуют спирали особого типа, отличающиеся как от α-спиралей, так и от коллагеновых спиралей. Спиральные участки растягиваются при

натяжении, но возвращаются к исходной длине при снятии нагрузки. Области, содержащие остатки лизина, принимают участие в формировании межмолекулярных ковалентных сшивок. Как показано на рис. 22, эластичность обусловлена способностью индивидуальных молекул обратимо разворачиваться под действием растягивающего усилия.

Глобулярные белки значительно сложнее по конформации, чем фибриллярные белки. Они способны выполнять самые разнообразные биологические функции, причем их активность носит не статический (как у фибриллярных структурообразующих белков), а динамический характер. К глобулярным белкам относятся практически все ферменты. Некоторые глобулярные белки выполняют транспортные функции. К этому же классу белков принадлежат антитела, некоторые гормоны, а также компоненты мембран и рибосом.

Задача 13. До какой максимальной длины можно растянуть 10-сантиметровый волос после его нагревания и обработки восстанавливающим агентом, разрывающим дисульфидные связи?

Задача 14. На сколько станет короче ("сядет") шерстяная нить длиной 1 м после стирки в горячей воде и высушивания в электросушилке?

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ БИОПОЛИМЕРОВ

Сравнение первичных последовательностей белков и нуклеиновых кислот разных организмов позволяет судить об их эволюционном родстве. Например, если сравнивать последовательности аминокислот гемоглобина человека, лошади и акулы, то оказывается, что из 141 аминокислотного остатка этого белка у человека и лошади отличаются 18, а у человека и акулы - 79 аминокислот. Ясно, что это свидетельствует о большей близости нашего родства с лошадью, чем с акулой. Таким образом, сравнивая первичные последовательности аминокислот *гомологичных* белков (т.е. выполняющих одинаковые функции у разных организмов), предполагая, что все они происходят от общего предшественника, и принимая в качестве меры истинного числа эволюционных событий (мутаций) число замен, которое необходимо произвести для того, чтобы превратить одну последовательность в другую, можно строить эволюционные деревья, подобные изображенному на рис. 23. Для построения эволюционных деревьев можно использовать также сравнение нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК.

В последние годы было накоплено большое количество информации о первичных структурах отдельных белков, генов, а также целых геномов. Однако задача построения эволюционного дерева оказывается неоднозначной из-за неаддитивности мутационных расстояний (числа замен) между разными парами организмов. Это происходит вследствие сочетания прямых, повторных, обратных и параллельных мутаций, которые взаимно компенсируют и маскируют друг друга. Поэтому существует несколько групп методов реконструкции эволюционных деревьев по сравнительно-молекулярным данным. Первая группа основана на методологии традиционного кластерного анализа, но с неизбежностью предполагает равномерность накопления мутаций во всех эволюционных линиях, что, как правило, неверно. Вторая группа методов, объединяемых принципом максимальной экономии, ставит задачей построение такого дерева, в котором расстояния между всеми парами организмов были не меньше мутационных расстояний между ними, а суммарная длина ветвей дерева была минимальной. Эти методы обладают чрезвычайной вычислительной сложностью при отсутствии разумной биологической основы для требования минимальности длины дерева. И, наконец, третья группа методов основана на принципе максимального топологического подобия и ставит задачу нахождения такого дерева, топологические свойства которого максимально близки топологическим свойствам исходной матрицы мутационных расстояний. Эти методы не вводят никаких дополнительных допущений по поводу хода эволюционного процесса и скоростей эволюции и, давая оценку величины локального

топологического несовпадения, позволяют выявлять места в эволюционных деревьях, которые требуют более осторожной трактовки. Таким образом, несмотря на свою ценность, эволюционные деревья, построенные по сравнительно-молекулярным данным, не являются более точными, чем деревья, построенные традиционными сравнительно-анатомическими и сравнительно-эмбриологическими методами.

#### КРАТКИЕ ВЫВОДЫ

Функционирование биологических макромолекул определяется их сложной пространственной архитектурой. Задача определения этой пространственной структуры пока не может быть легко решена ни методами прямого экспериментального определения, ни расчетами по известной первичной последовательности мономеров.

При функционировании биологических молекул существенными оказываются также переходы между разными пространственными структурами (конформациями). При нарушении пространственной структуры (денатурации) макромолекулы переходят в состояние неупорядоченного клубка, описываемого простыми статистическими моделями, но полностью теряют свою биологическую функцию. Модель статистического клубка полезна для оценки размеров макромолекулы.

Сравнительный анализ первичных последовательностей мономеров белков и нуклеиновых кислот из различных организмов позволяет строить классификации, основанные на эволюционных связях между организмами, однако реконструкция эволюционных деревьев по сравнительно-молекулярным данным неоднозначна.



Рис.23. Филогенетическое дерево, построенное на основе данных о числе аминокислотных замен в молекулах цитохрома с у различных живых организмов

Температура Теплопоглощение 5'-конец

3'-акцепторный  
конец

Увеличенная D-спираль

Основания антикодона

Рис. 13. Двойная спираль ДНК в В- и А-формах: А - оси спиралей в плоскости рисунка; В - оси спиралей перпендикулярны плоскости рисунка

Величина молярного отношения пар А-Т/Г-С геномной ДНК

Частота встречаемости отношения у различных организмов  
(отн. ед.)

### Лекция 3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ МАКРОМОЛЕКУЛ

*Исследование структуры макромолекул - трение макромолекул в растворе - диффузия макромолекул - ультрацентрифугирование - хроматография белков и нуклеиновых кислот - электрофорез белков и нуклеиновых кислот - спектроскопия поглощения белков и нуклеиновых кислот - другие оптические методы - краткие выводы*

### ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ МАКРОМОЛЕКУЛ

Функционирование биологических макромолекул определяется их пространственной структурой, определение которой представляет собой непростую задачу. В белке или нуклеиновой кислоте средней величины, масса которой составляет 30 кДа, содержится приблизительно 4000 атомов. Пространственная структура такой молекулы будет полностью описана, если будут определены координаты всех атомов, входящих в эту молекулу. Для этого требуется найти примерно 16000 неизвестных параметров. Если исключить из рассмотрения атомы водорода, то это число сокращается наполовину. Задача резко упрощается, если известна первичная структура исследуемой макромолекулы. Чтобы описать относительное расположение двух соседних аминокислотных остатков в полипептидной цепи, достаточно задать два угла, а для описания ориентации боковой цепи каждого аминокислотного остатка нужно в среднем еще 2 параметра. В белке с мол. массой 30 кДа содержится приблизительно 300 аминокислотных остатков, т. е. необходимо определить около 1200 параметров. Для нуклеиновой кислоты той же массы потребуется 800 параметров. Только один метод - рентгеноструктурный анализ - может дать такое количество информации для определения пространственной структуры макромолекулы. Однако это очень трудоемкий метод, применение которого связано с рядом ограничений и не всегда дает достаточно хорошее качество данных, чтобы на их основе можно было найти точные координаты атомов.

К счастью, многие вопросы, связанные с функционированием биологических молекул, можно решить, рассматривая их структуру не на уровне атомного разрешения, а с гораздо меньшей точностью, или исследуя лишь небольшую, но наиболее важную в функциональном отношении часть молекулы. Непосредственно увидеть какие-либо

структурные особенности макромолекул можно лишь с помощью туннельного сканирующего микроскопа, о котором будет рассказано в следующей лекции. Поэтому сведения о размерах и форме макромолекул получают различными косвенными методами, многие из которых были специально разработаны для исследования биологических макромолекул. Каждый из этих методов имеет свои преимущества, но и свои ограничения, которые необходимо сознавать, для того чтобы правильно интерпретировать полученные этим методом данные. Рассмотрим некоторые из этих методов.

### ТРЕНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛ В РАСТВОРЕ

Движение молекул в жидкости происходит со значительно меньшей скоростью, чем в газовой фазе, из-за сил трения между молекулами в конденсированной фазе. Уравнение движения молекулы с массой  $m$  под действием силы  $F$  в вакууме описывается формулой  $F = ma = m(dv/dt)$ , где  $v$  - скорость молекулы. Реально в жидкости на любую движущуюся частицу действует тормозящая сила трения. Если скорость движения не столь велика, чтобы вызвать турбулентность, то сила трения должна быть пропорциональна скорости. В результате уравнение поступательного движения принимает вид  $F - fv = m(dv/dt)$ , где параметр  $f$  - коэффициент трения. Это линейное дифференциальное уравнение легко решается, и, если скорость макромолекулы в начальный момент времени равна  $v_0$  и параллельна приложенной силе, а  $F = \text{const}$ , то решение имеет вид  $v(t) = (F/f) + [v_0 - (F/f)]\exp(-ft/m)$ . Из этого решения следуют два важных вывода: 1) скорость частицы изменяется лишь в течение очень короткого отрезка времени после того, как приложена внешняя сила; 2) скорость уменьшается экспоненциально от начальной величины  $v_0$  до постоянной конечной величины  $v(\infty) = F/f$ , которая пропорциональна приложенной силе. Время достижения постоянной скорости для макромолекул весьма мало. Для обычной макромолекулы, имеющей мол. массу 30 тыс. Да, значение  $f$  порядка  $5710^{-8}$  г/с, а  $m$  равна  $5710^{-20}$  г. Поэтому переменный член  $\exp(-ft/m)$  в уравнении движения молекулы становится пренебрежимо малым уже через  $10^{-12}$  с.

Коэффициент трения  $f$  зависит от вязкости жидкости ( $\eta$ ), а также от размеров и формы движущейся макромолекулы (частицы). Наиболее простая зависимость, называемая *законом Стокса*, выполняется для поступательного движения сферической частицы. При этом обычно рассматривают два предельных граничных условия потока жидкости у поверхности молекулы. В первом из них полагают, что слой жидкости, соприкасающийся с поверхностью частицы, движется со скоростью частицы. Такую смачиваемую поверхность называют липкой, и в этом случае  $f = 6\pi\eta r$ , где  $r$  - радиус частицы. В другом предельном случае граничных условий предполагается отсутствие взаимодействия между частицами и молекулами жидкости; жидкость просто скользит по поверхности частицы, обтекая ее. Для таких граничных условий  $f = 4\pi\eta r$ . Однако, как было показано в предыдущей лекции в разделе "Растворимость белков и нуклеиновых кислот", всегда наблюдается сильное связывание молекул обычных растворителей (например, воды) с биополимерами. Поэтому на практике реализуется случай липкой поверхности, а радиус молекулы  $r$  в выражении закона Стокса должен быть заменен на радиус гидратированной молекулы  $r_{\text{гидр}}$  (см. задачу 10).

Большинство биологических молекул не имеет сферической формы. Биологические молекулы в основном представляют собой компактные, глобулярные, часто несимметричные твердые частицы. Поэтому следующим приближением для описания их формы является эллипсоид вращения, сплюснутый или вытянутый (рис. 24). Сплюснутый эллипсоид имеет дискообразную форму, образованную вращением эллипса вокруг короткой полуоси  $b$ ; обе его длинные полуоси одинаковы. Вытянутый эллипсоид имеет стержнеобразную форму, образованную вращением эллипса вокруг длинной полуоси  $a$ ; его короткие полуоси  $b$  одинаковы. При равных объемах поверхность любого эллипсоида

больше, чем поверхность сферы, поэтому эллипсоиды имеют больший коэффициент трения, чем сфера равного объема. Для граничных условий липкой поверхности можно получить аналитическое выражение зависимости коэффициента трения эллипсоида от соотношения полуосей, аналогичное закону Стокса. Однако оно весьма громоздко, и на практике используют численные значения отношения коэффициента трения эллипсоида ( $f$ ) к коэффициенту трения сферы того же объема ( $f_{сф}$ )  $F = f/f_{сф}$ , называемое фактором формы или фактором Перрена (таблица 4). Одно и то же значение величины  $F$  соответствует многим возможным формам макромолекулы, две из которых являются эллипсоидами вращения, поэтому неопределенность в описании формы с помощью  $F$  очень велика. Однако в предельном случае, при больших значениях величины  $F$ , можно уверенно считать частицу вытянутой, так как дискообразная частица с  $F > 1.5$  должна иметь ничтожную величину малой полуоси, что нереально. При очень малых значениях  $F$  поступательные коэффициенты трения вытянутого и сплющенного эллипсоидов практически не различаются, хотя, как это видно из рис. 24, вытянутый и сплющенный эллипсоиды (оба с  $a/b = 2$ ) являются совершенно различными физическими объектами.

Таким образом, в приближении эллипсоида вращения  $f =$

$6\pi\eta r_{гидр} F$ . Используя формулу для объема шара, удобно связать  $r_{гидр}$  с парциальным удельным объемом макромолекулы  $v_{гидр} = v_{мол} + dv_{вода}$ , где  $v_{вода}$  и  $v_{мол}$  - парциальные удельные объемы растворителя (воды)

Таблица 4 Численные значения

фактора Перрена для вытянутого и сплющенного эллипсоидов вращения.

Отношение $a/b$	Вытянутый	Сплющенный
1	1.000	1.000
2	1.044	1.042
5	1.250	1.224
10	1.543	1.458
50	2.946	2.375
100	4.067	2.974
200	5.708	3.735

и полностью дегидратированной (безводной) молекулы, а  $d$  - степень гидратации (количество воды в г на 1 г сухого вещества):  $r_{гидр} = [(3/4\pi)(M/N_A)(v_{мол} + dv_{вода})]^{1/3}$ , где  $M$  - молекулярная масса, а  $N_A$

- число Авогадро. Парциальный удельный объем - это увеличение объ-

ема, вызываемое прибавлением к раствору единицы массы растворяемого

вещества.  $v_{вода}$  - это просто величина, обратная плотности чистой

воды ( $1 \text{ см}^3/\text{г}$ ), следовательно, коэффициент трения является функцией

4-х переменных, а именно: удельного парциального объема безводной молекулы, соотношения полуосей эллипсоида (фактора формы), молекулярной массы и степени гидратации. Коэффициент трения можно найти из данных по измерению диффузии макромолекул, молекулярную массу можно определить многими экспериментальными методами (например, равновесным центрифугированием или денатурирующим электрофорезом), форму макромолекул и частиц можно иногда выяснить из данных электронной микроскопии, однако  $v_{мол}$  и  $d$ , как правило, однозначно определить нельзя и можно лишь оценить их предельные значения (основная сложность здесь состоит в том, что полностью удалить прочносвязанную с макромолекулой воду очень трудно). Ясно, что

дальнейшее уточнение геометрической формы макромолекул и представление их как тел более сложных, чем эллипсоиды вращения, резко увеличивает число неизвестных параметров, делая невозможной интерпретацию экспериментальных данных по перемещению макромолекул в растворе.

Задача 11. Используя модель свободно-сочлененной цепи, рассчитайте коэффициент трения  $f_{сф}$  полностью денатурированного белка с мол. массой 30 кДа, представляющего собой беспорядочный клубок, невзаимодействующий с молекулами растворителя. Сравните с  $f_{сф}$ , рассчитанным исходя из данных задачи 10.

### ДИФФУЗИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ

В предыдущем разделе было показано, что для того чтобы получить информацию о размере и форме макромолекулы можно использовать коэффициент трения  $f$  между макромолекулой и молекулами растворителя. Проще всего для определения  $f$  использовать процесс *диффузии*, т.е. процесс перемещения молекул из области с высокой концентрацией в область с низкой концентрацией этих молекул при отсутствии движущей силы (беспорядочное тепловое движение), для которого  $f = kT/D$  (*уравнение Эйнштейна-Сазерленда*), где  $k$  - константа Больцмана,  $T$  - абсолютная температура, а  $D$  - коэффициент диффузии.

Коэффициент диффузии макромолекул обычно измеряют путем создания границы между буфером и раствором макромолекул с известной концентрацией, наблюдая уширение этой границы во времени. Хотя это измерение выглядит очень простым, практическое его применение связано с большими экспериментальными трудностями. Константы диффузии макромолекул имеют порядок от  $10^{-7}$  до  $10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с, поэтому для получения измеряемого уширения требуется много часов. В течение всего этого времени система не должна испытывать никаких механических воздействий, а точный контроль температуры должен исключить термическую конвекцию. Если макромолекула заряжена, то наличие в растворе низкомолекулярных ионов, которые диффундируют быстрее, чем макромолекула, приводит к образованию градиента электрического потенциала, который начинает влиять на движение макромолекул. Отсюда следует, что измерение коэффициента диффузии надо проводить в изоэлектрической точке или в растворе с достаточно высокой ионной силой, чтобы нейтрализовать влияние возникающего электрического поля. Кроме того, поскольку теория диффузии основана на допущении о независимом движении молекул (т.е. они не должны взаимодействовать), необходима экстраполяция до бесконечно большого разбавления.

Другой метод основан на измерении возникающего вследствие эф-

фекта Доплера отличия частоты светового луча лазера от частоты рассеянного света, отраженного диффундирующими молекулами. Этот сдвиг частоты связан с  $D$  простой зависимостью и обеспечивает точность измерений до 1%. Однако метод не пригоден для определения  $D$  молекул с очень большой длиной цепи. В настоящее время нет удовлетворительных методов для измерения  $D$  больших несферических молекул, таких как ДНК, поскольку в этих случаях значение  $D$  очень мало.

Коэффициент диффузии молекулы должен быть функцией температуры, при которой проводятся измерения. Он зависит также от вязкости растворителя, а она в свою очередь также является функцией температуры. Вместо того чтобы иметь дело со всеми этими зависимостями, обычно приводят значения измеренных констант диффузии к той величине, которая была бы получена при 20°C в чистой воде:  $D_{20,w}/D = (293/T)(h_{w,T}/h_{w,20})(h_{p,T}/h_{w,T})$ , где  $D_{20,w}$  - константа диффузии в чистой воде при 20°C,  $T$  - абсолютная температура в опыте,  $h_{w,20}$  - вязкость чистой воды при температуре 20°C,  $h_{w,T}$  - вязкость чистой воды при температуре  $T$ ,  $h_{p,T}$  - вязкость исследуемого раствора при температуре  $T$ .

В таблице 5 приведены характерные значения коэффициентов диффузии  $D_{20,w}$  для веществ и частиц, молекулярные массы которых лежат в интервале от меньших, чем 100Да,

до больших чем  $10^7$  Да. Как видно из таблицы, значения коэффициентов диффузии лежат гораздо в более узком интервале, чем молекулярные массы.

Таблица 5

Образец	Мол. масса, Да	$D_{20,w} \cdot 10^7, \text{см}^2/\text{с}$
Глицин	75	93.3
Сахароза	342	45.9
Фермент рибонуклеаза	13 683	11.9
Белок яичный альбумин	42 000	10.4 6.9
Белок гемоглобин	68 000	1.98
Белок фибриноген	400 000	0.44
Вирус табачной мозаики	000 000	

Для белков относительно легко определить их мол. массу и измерить коэффициент диффузии. Поскольку значения плотности безводных белков и степень их гидратации лежат довольно в узких пределах от 1.33 до 1.45 г/см<sup>3</sup> и от 0.3 до 0.4 г Н<sub>2</sub>О на 1 г белка соответственно, то можно использовать их средние значения - 1.37 г/см<sup>3</sup> ( $v_{\text{мол}} = 1/1.37 = 0.73 \text{ см}^3/\text{г}$ ) и 0.34 г Н<sub>2</sub>О /г белка - для оценки формы белковой молекулы с помощью фактора Перрена. Результаты некоторых таких расчетов показаны на рис. 25.

Задача 12. Для данного белка определили  $D_{20,w} = 3.7710^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$  и  $M = 30 \text{ кДа}$ . Принимая удельный парциальный объем безводного белка равным 0.73 см<sup>3</sup>/г, рассчитайте а)  $r_{\text{гидр}}$  для сферической молекулы белка; б) степень гидратации  $d$  такой сферической молекулы; в) отношение осей для гидратированной ( $d = 0.34$ ) молекулы белка, имеющей форму вытянутого эллипсоида.  $h_{w,20} = 0.01 \text{ г} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

### УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

Крупные частицы, суспендированные в воде, оседают на дно под действием силы тяжести, если их плотность выше плотности растворителя. Однако хотя плотность биологических макромолекул намного выше плотности воды, они остаются во взвешенном состоянии в растворе сколь угодно долго, так как гравитационной силе в этом случае успешно противостоит тепловое движение (диффузия).

Задача 13. Сравните величины гравитационной (потенциальной) энергии макромолекулы с мол. массой 100 кДа ( $E_{\text{грав}} = mgh$ ) между двумя точками, отстоящими друг от друга на  $h = 1 \text{ см}$ , и тепловой энергии ( $E_{\text{тепл}} = kT$ ) той же самой молекулы при 20°C.

Для усиления гравитационной составляющей скорости движения макромолекул применяют *седиментацию* с помощью *ультрацентрифуги*. Седиментация - это общий термин для обозначения движения в поле центробежной силы. Измерение движения молекул вдоль направления действия центробежной силы называется *определением скорости седиментации*, в результате чего рассчитывается *коэффициент седиментации*, значение которого дает информацию о молекулярной массе и форме частицы. Когда создаются такие условия центрифугирования, при которых распределение частиц вдоль центрифужной пробирки не изменяется во времени, т.е. частицы достигли *седиментационного равновесия*, то этот метод *равновесного ультрацентрифугирования* дает сведения о молекулярной массе и плотности частиц.

При конструировании ультрацентрифуг - приборов, в которых исследуемый раствор вращается со скоростями вплоть до 70 тыс. оборотов/мин, было проявлено немало изобретательности (рис. 26). При обычно используемых скоростях трение между вращающимся ротором и воздухом может вызвать недопустимый разогрев ротора. Поэтому в камере, в которой вращается ротор, необходимо создать высокий вакуум. Чтобы избежать конвекционного

перемешивания, температура исследуемого образца должна поддерживаться на постоянном уровне с довольно высокой точностью, а это может оказаться нелегкой задачей. Силы, которые развиваются внутри ротора, огромны, и случается, что при больших скоростях ротор разлетается на куски. Чтобы эти осколки не разлетелись, камеру с находящимся в ней ротором должны окружать толстые стальные защитные цилиндры. Крайне важно, чтобы ротор был механически сбалансирован. Допустим, что массы двух ячеек с веществом, расположенных симметрично относительно оси ротора, различаются на 1 мг. При 400 000 g возникающая за счет этого разность сил, действующих на ротор, составит 400 г. Это весьма ощутимая сила, которая приведет к вибрации ротора. Но, как ни важно уравновесить ячейки ротора, этого нельзя сделать идеально. Поэтому в любой ультрацентрифуге используется гибкий вал, чтобы ротор мог сам найти точное положение своего центра масс и вращаться вокруг оси, проходящей через этот центр. Это позволяет уравновешивать образцы с допуском

0.5г без нежелательных последствий.

Как было показано в разделе "Трение макромолекул в растворе", скорость макромолекулы, на которую действует постоянная сила  $F$ , в растворе очень быстро достигает постоянной конечной величины  $v(s) = F/f$ . Сила  $F$  при ультрацентрифугировании складывается из центробежной силы  $F_{ц} = mw^2R$ , где  $m$  - масса частицы,  $w$  - угловая скорость вращения ротора,  $R$  - расстояние до центра вращения, и противоположно направленной центростремительной силы выталкивания, которая возникает вследствие вытеснения движущейся частицей молекул растворителя и равна  $F_{ц}v_{мол}r$ , где  $v_{мол}$  - парциальный удельный объем движущейся частицы, а  $r$  - плотность растворителя (под растворителем здесь понимается суспендирующая среда, т.е. если частица находится в воде, то растворителем является вода, а если она находится в NaCl с определенной концентрацией, то растворителем будет раствор NaCl). Следовательно,  $v(s) = mw^2R(1 - v_{мол}r)/f$ . Скорость молекулы пропорциональна величине центробежной силы, и коэффициент пропорциональности зависит только от свойств движущейся частицы и растворителя. Он обозначается  $s$  и называется *коэффициентом седиментации*:  $s = v(s)/w^2R = m(1 - v_{мол}r)/f$ . Заменяя  $m$  на  $M/N_A$ , где  $M$  - молекулярная масса, а  $N_A$  - число Авогадро, и используя уравнение Эйнштейна-Сазерленда  $f = kT/D$ , получаем *уравнение Сведберга*:  $s = MD(1 - v_{мол}r)/kN_A T = MD(1 - v_{мол}r)/RT$ , где  $R$  - газовая постоянная. Коэффициент седиментации обычно имеет величину порядка  $10^{-13}$  с, поэтому эту величину принимают за единицу седиментации и называют *сведбергом (S)* в честь разработчика и конструктора первой ультрацентрифуги Т. Сведберга (Т. Svedberg, 1923):  $1S = 1710^{-13}$  с.

Также как и в случае с коэффициентом диффузии, из-за сложных температурных зависимостей коэффициент седиментации приводят к той величине, которая была бы получена при  $20^\circ\text{C}$  в чистой воде:  $s_{20,w}/s = [(1 - v_{мол}r_{w,20})/(1 - v_{мол}r_{p,T})](h_{w,T}/h_{w,20})(h_{p,T}/h_{w,T})$ , где  $s_{20,w}$  - коэффициент седиментации в чистой воде при  $20^\circ\text{C}$ ,  $T$  - абсолютная температура в опыте,  $r_{w,20}$  - плотность воды при  $20^\circ\text{C}$ ,  $r_{p,T}$  - плотность растворителя при температуре  $T$ ,  $h_{w,20}$  - вязкость чистой воды при температуре  $20^\circ\text{C}$ ,  $h_{w,T}$  - вязкость чистой воды при температуре  $T$ ,  $h_{p,T}$  - вязкость исследуемого раствора при температуре  $T$ . В таблице 6 приведены определенные опытным путем типичные значения  $s_{20,w}$ .

Таблица 6

Образец	Мол.	масса, Да	$s_{20,w}$	S
Фермент рибонуклеаза		13 683	1.85	
Белок гемоглобин		68 000	4.31	
Белок фибриноген	40	400 000	7.60	
Вирус табачной мозаики		000 000	192	

Коэффициент седиментации определяют измеряя с помощью специальной оптической системы скорость перераспределения макромолекул в центрифужной пробирке непосредственно в ходе ультрацентрифугирования. Хотя теоретически значение коэффициента седиментации при одной и той же температуре должно быть постоянным для частицы в данном растворителе, на практике для макромолекул  $s$  оказывается зависящим от концентрации макромолекул, скорости центрифугирования и ионной силы растворителя. Как правило, наблюдается уменьшение наблюдаемой скорости седиментации с увеличением концентрации макромолекул, связанное с нелинейным увеличением вязкости раствора и с увлечением крупными макромолекулами за собой молекул растворителя и других более медленно седиментирующих молекул (эффект Джонстона-Огстона). Увеличение скорости центрифугирования приводит к увеличению измеряемого значения  $s$  и связано с тем, что при большой скорости крупная макромолекула оставляет после себя след (подобный кильватерной струе, образующейся при движении корабля), увеличивающий скорость движения макромолекул непосредственно позади нее. Часто такой процесс сопровождается агрегированием макромолекул и изменением их формы, что тоже приводит к увеличению  $s$ . Поскольку макромолекулы заряжены, то при низкой ионной силе нейтрализующие ионы, седиментирующие медленнее, чем макромолекулы, отстают, и это приводит к возникновению тормозящего макромолекулы электрического поля. Это осложнение легко устраняется использованием избытка противоионов при высокой ионной силе. Измерив  $s_{20,w}$  и  $D_{20,w}$ , можно по уравнению Сведберга рассчитать молекулярную массу макромолекулы. Учтя все перечисленные выше зависимости, значение  $s$  для ДНК можно измерить с точностью до 2%, что приводит к получению значения  $M$  с ошибкой в 4%, а для белков  $s$  может быть измерен с точностью до 1%, что дает ошибку в определении  $M$ , равную примерно 1.5%. Если для макромолекулы известны  $s_{20,w}$ ,  $D_{20,w}$  и  $M$ , то из уравнения Сведберга можно рассчитать ее  $v_{\text{мол}}$ .

Гораздо более точно определять молекулярную массу макромолекул (ошибка не превышает 1%) позволяет метод *седиментационного равновесия*, заключающийся в том, что центрифугирование проводится при относительно низкой скорости, при которой седиментация макромолекул настолько медленна, что уравнивается диффузией. В этом случае отпадает необходимость определения коэффициента диффузии, но для достижения равновесия обычно требуется не менее суток. Равновесное центрифугирование в градиенте плотности растворителя является чрезвычайно эффективным методом разделения макромолекул. Здесь равновесие устанавливается в градиенте плотности тяжелой соли типа CsCl. Данная макромолекула в таком растворе либо всплывает, либо погружается, пока не достигнет *изопикнической точки*, в которой плотность растворителя равна *плавучей плотности* макромолекулы (которая не совпадает с плотностью собственно макромолекул из-за сложных термодинамических эффектов). Если плотность раствора линейно изменяется на небольшом расстоянии, то макромолекулы с данной молекулярной массой оказываются в узкой зоне с центром в изопикнической точке и шириной, обратно пропорциональной корню квадратному из значения молекулярной массы. Большое достоинство этого метода состоит в том, что после разделения компонентов смеси макромолекул пробы раствора можно отбирать на разной высоте центрифужной пробирки и определять содержание в них исследуемых компонентов химически (и, следовательно, очень селективно).

Задача 14. Используя данные таблиц 5 и 6, рассчитайте  $v_{\text{мол}}$  для рибонуклеазы, гемоглобина и фибриногена.  $r_{w,20} = 1 \text{ г/см}^3$ .

Задача 15. Фермент рибонуклеотидредуктаза с  $s_{20,w} = 9.7 \text{ S}$  полимеризуется в неактивную форму с  $s_{20,w} = 15.5 \text{ S}$ . Рассчитайте вероятное число мономерных молекул в составе полимера, если факторы Перрена как мономера, так и полимера мало отличаются от 1.

## ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Принцип хроматографии состоит в том, что вещества помещают в систему, которая содержит два физически различных компонента - *подвижную* и *неподвижную фазы*, и в которой разделение по типам молекул происходит за счет различий (часто весьма незначительных) в распределении между этими двумя фазами. Относительная подвижность каждой молекулы зависит от соотношения между движущей силой (движение подвижной фазы) и силами удерживания (распределение и адсорбция). Когда эффекты адсорбции невелики, то говорят о *распределительной хроматографии*, а когда адсорбция является главным процессом, приводящим к разделению веществ, то об *адсорбционной хроматографии*.

К распределительной хроматографии относятся *колоночная хроматография*, *хроматография на бумаге* и *тонкослойная*. Колонкой служит трубка, заполняемая неподвижной фазой и растворителем. Когда неподвижная фаза состоит из мелких частиц инертного материала, который содержит маленькие поры, хроматография называется *гель-проникающей* или *молекулярно-ситовой хроматографией*. Если раствор, содержащий молекулы различной величины, пропускать через такую неподвижную фазу, то молекулы, размер которых превышает размер пор, будут двигаться только в пространстве между частицами и поэтому не будут задерживаться неподвижной фазой. Однако молекулы, размеры которых меньше размера пор, диффундируют в частицы и обратно, причем вероятность этого повышается с уменьшением их размера, т.е. их движение вдоль неподвижной фазы замедляется (рис. 27). Если материал частиц

в неподвижной фазе (гель) не адсорбирует движущиеся с раствором молекулы, то вероятность проникновения молекул в поры является основным фактором, определяющим скорость их движения вдоль неподвижной фазы. Следовательно, молекулы вымываются из неподвижной фазы в порядке уменьшения их размера или, если форма их относительно похожа (например, глобулярная или линейная), то в порядке уменьшения молекулярной массы. Для различных типов гелей установлено, что зависимость параметра  $K = (V_e - V_0)/V_s$  от  $\lg M$  практически линейна для всех молекул, исключая очень большие и очень маленькие. Здесь  $V_e$  - объем растворителя, требуемый для вымывания интересующего соединения,  $V_0$

- "холостой" объем, необходимый для вымывания соединения, которое не проникает в неподвижную фазу,  $V_s$  - объем неподвижной фазы и  $M$  - молекулярная масса. Таким образом, для определения  $M$  достаточно пропустить через неподвижную фазу несколько типов молекул с известной молекулярной массой, по полученным данным построить прямую линию, после чего  $M$  образца можно определить интерполяцией. Такой хроматографический метод используется для глобулярных белков и многих углеводов, позволяя определять их  $M$  с точностью около 10%. Однако более тщательный теоретический анализ приводит к линейной зависимости  $K$  от  $\lg r_{гидр}$ , где  $r_{гидр}$  - эффективный радиус гидратированной молекулы. Это та самая величина, которая получалась бы из диффузионных измерений, если бы мы, никак не учитывая форму молекулы, просто формально применили бы закон Стокса:  $kT/D = f = 6\pi\eta r_{гидр}$ . Линейная зависимость  $K$  от  $\lg r_{гидр}$  лучше согласуется с экспериментальными данными, чем зависимость  $K$  от  $\lg M$ . Результаты, полученные с помощью гель-проникающей хроматографии, можно скомбинировать с измерениями коэффициента седиментации, что позволяет точнее определять молекулярную массу. Как метод гель-проникающая хроматография полезна также при изучении систем взаимодействующих молекул. Однако основное применение гель-проникающей хроматографии

- разделение веществ. Она находит широкое применение для очистки белков, в частности ферментов, и нуклеиновых кислот.

В случае *хроматографии на бумаге* неподвижной фазой служит целлюлоза в виде листов бумаги. Движение растворителя по бумаге обеспечивают капиллярные силы. С растворителем двигаются и растворенные вещества, каждое со своей скоростью, определяемой природой вещества, сортом бумаги и природой растворителя. Как только фронт растворителя приблизится к противоположному концу бумаги, его высушивают. Разделенные вещества располагаются пятнами и различаются по их относительному расположению на бумаге. Хроматография на бумаге позволяет осуществлять *двумерную хроматографию*: после проведения хроматографии в одном направлении бумагу высушивают и затем повторно хроматографируют под прямым углом к направлению первоначального движения растворителя с использованием другого растворителя. При этом



часто происходит разделение веществ, которые не разделяются в первом растворителе. Важным применением хроматографии на бумаге в исследовании белков является *метод пептидных карт*. Если белок подвергать расщеплению в стандартных условиях с использованием набора различных *специфических протеиназ* (ферменты, разрывающие пептидные связи только после определенной аминокислоты или класса аминокислот), в качестве продуктов образуются небольшие пептиды. Пептиды можно затем разделить с помощью двумерной хроматографии на бумаге, получая при этом распределение пятен, которое практически никогда не совпадает для различных белков. Такая пептидная карта называется "отпечатками пальцев" (fingerprinting) (рис. 28). Метод пептидных карт можно использовать для идентификации выделенного белка, для установления изменений аминокислотного состава в мутантном белке (если замена аминокислоты не влияет на место разрыва связи протеиназой, на пептидной карте будет исчезать одно пятно, вместо которого будет появляться другое; если замена приводит к изменению места разрыва связи, изменят свое положение сразу несколько пятен) или для доказательства того, что белок А является продуктом расщепления большего белка Б или получается в результате преждевременного обрыва цепи аминокислотной последовательности (если на пептидной карте белка А имеются все те же пятна, что и на пептидной карте белка Б, весьма вероятно, что белок А является частью аминокислотной последовательности белка Б).

*Тонкослойная хроматография* принципиально ничем не отличается от бумажной, но позволяет использовать большое разнообразие материалов для неподвижной фазы. Частицы неподвижной фазы могут быть менее 0.1 мм, поэтому соотношение поверхность/объем очень велико (большая активная поверхность). Активная поверхность в колоночной хроматографии намного меньше, чем в тонкослойной хроматографии, так как слишком мелкие частицы спрессовываются под действием силы тяжести в колонке, что приводит к уменьшению скорости движения жидкости, а это крайне нежелательно из-за размывания зон за счет диффузии при очень малой скорости потока. При этом пятна в тонкослойной хроматографии получаются меньше, чем в бумажной хроматографии, и, следовательно, возрастают разрешающая способность и чувствительность (для тонкослойной хроматографии требуется в 50-100 раз меньше вещества для разделения, чем для бумажной: для аминокислот - в 10 раз меньше, для нуклеотидов - в 100 раз меньше). С помощью тонкослойной хроматографии можно обнаружить вещество в количестве до 1 нмоль.

К абсорбционной хроматографии относятся *ионообменная* и *аффинная хроматография*. Принцип ионообменной хроматографии состоит в том, что заряженные молекулы за счет электростатического взаимодействия обратимо адсорбируются твердой неподвижной фазой, несущей заряженные группы и называемой *ионообменником*. Разделение на ионообменниках обычно проводится в две стадии: сперва соединение, которое требуется отделить, связывается с ионообменником в условиях образования стабильной связи, затем ионообменник промывают буфером с другим значением рН или с другой ионной силой, в результате чего компоненты буфера конкурируют со связанным веществом за связывающие центры и вызывают его вымывание из ионообменника. Ионообменную хроматографию часто используют для разделения белков, полисахаридов, нуклеотидов, аминокислот и других биологически важных небольших молекул. Но наиболее специфическим "биологическим" методом хроматографии является аффинная хроматография, которая использует относительно слабое обратимое взаимодействие (*биологическое сродство*) между выделяемым веществом и специфически связывающейся с ним молекулой (лигандом). Такие силы действуют, например, между ферментом и его субстратом или ингибитором, антигеном и антителом, гормоном и рецептором и т.д. Для осуществления фракционирования по биологическому сродству, т.е. методом аффинной хроматографии, один из "партнеров" такой пары ковалентно "пришивается" к частицам неподвижной фазы, а сорбцией и вымыванием второго "партнера" управляют путем изменения условий биологического взаимодействия в

результате введения в промывающий раствор солей, мочевины, детергентов, конкурирующих за связывание молекул или путем изменения его рН.

Задача 16. При проведении гель-проникающей хроматографии объем растворителя, требуемый для вымывания из колонки высокомолекулярного полисахарида голубого декстрана, который не проникает внутрь геля, составил 78 мл, а объемы растворителя для вымывания белков фиб-

риногена, каталазы и яичного альбумина составили 86, 118 и 172 мл соответственно. Используя данные таблицы 5, оцените  $M$  и  $r_{\text{гидр}}$  для фермента каталазы.

### ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Если молекула обладает суммарным зарядом  $q$  и находится в однородном электрическом поле  $E$ , то на нее действует сила  $F = qE$ . Как было показано в разделе "Трение макромолекул в растворе", скорость макромолекулы, на которую действует постоянная сила  $F$ , в растворе очень быстро достигает постоянной конечной величины  $v(S) = F/f = qE/f$ . Однако такое упрощенное описание электрофореза (т.е. явления переноса заряженных частиц под действием электрического поля) хотя и приводится во многих учебниках, совершенно не соответствует реальной картине. Прежде всего возникает неопределенность с суммарным зарядом макромолекулы, который зависит от ионной силы раствора. При малом количестве противоионов макромолекула будет стремиться перемещаться в одну сторону, а противоионы - в другую. Энергия, которую пришлось бы затратить на преодоление электростатического притяжения при разделении зарядов, чрезвычайно велика, поэтому реально происходящая миграция макромолекул будет незначительна. При избытке противоионов электролит образует ионную атмосферу вокруг полимера, и для того, чтобы учесть этот эффект, можно использовать два подхода. При одном подходе считают, что ионная атмосфера уменьшает эффективный суммарный заряд макромолекулы. При другом полагают, что ионная атмосфера порождает электрическое поле, в котором находится макромолекула и которое следует учитывать наравне с внешним полем. Принято описывать эту атмосферу с помощью непрерывного распределения, игнорируя дискретный характер зарядов. Далее за счет движения макроиона и малых ионов ионное облако постоянно деформируется. Учет всех эффектов представляет собой очень трудную задачу. В результате, существующая теория электрофореза, несмотря на всю ее сложность, не в состоянии удовлетворительно объяснить экспериментальные данные по электрофорезу.

Несмотря на сложность теории, электрофорез является действенным и удобным средством анализа белков и нуклеиновых кислот, если не требовать от него количественных данных о структуре молекул. Все теории согласованно предсказывают, что подвижность прямо пропорциональна отношению суммарного заряда к коэффициенту трения. Такая зависимость позволяет использовать электрофорез для получения информации об относительной величине заряда (для молекул, которые имеют одинаковые размеры и форму) или об относительных размерах (для молекул с одинаковыми зарядами). Существуют, однако, две разновидности электрофореза, которые могут дать некоторую количественную информацию о молекулах - это *изоэлектрическое фокусирование* и *электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия*.

Изучение электрофоретической подвижности белков как функции рН методом изоэлектрического фокусирования позволяет найти изоэлектрическую точку молекулы, о важности которой как характеристики белка рассказано в разделе "Растворимость белков и нуклеиновых кислот" в предыдущей лекции. Этот метод, при котором в геле при добавлении смеси амфолитов под действием электрического поля создается градиент рН, является прямым аналогом равновесного центрифугирования в градиенте плотности. В этот градиент рН добавляют небольшое количество белка. Белковая молекула движется к

катоде, если рН меньше значения ее изоэлектрической точки, или к аноду, если рН больше этого значения. Белок мигрирует, пока не достигнет рН, соответствующего его изоэлектрической точке. Там он концентрируется, образуя узкую зону.

Второй, очень популярный метод - это электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) -  $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$ . Здесь основная идея состоит в том, чтобы превратить все белки в молекулы со сходной структурой, которые отличались бы друг от друга лишь значениями молекулярной массы. ДСН - сильный денатурирующий реагент по отношению к белку. Он связывается со всеми белками примерно одинаково: 1.4 г на 1 г аминокислот. Каждая молекула ДСН несет один отрицательный заряд. Благодаря такому количеству ДСН в комплексе ДСН-белок общая плотность зарядов в комплексе более или менее одинакова для самых разных белков, несмотря на вариации в величине заряда исходных белковых молекул. Добавляемые дополнительно восстанавливающие реагенты, такие как  $\beta$ -меркаптоэтанол, разрывают все дисульфидные связи как внутри цепей, так и между разными цепями. В этих условиях уже ничто не мешает молекулам белка после денатурации находиться в тех равновесных формах, которые обусловлены взаимодействиями в комплексе ДСН-белок. Гидродинамические измерения показали, что эти комплексы представляют собой вытянутые эллипсоиды или стержни постоянного сечения, диаметр которых составляет примерно

1.8 нм, а длина и молекулярная масса связаны линейной зависимостью для белков, мол. масса которых больше 15 кДа. Точность определения молекулярной массы белков таким методом обычно не превосходит 5%.

При любом обычном электрофоретическом опыте разрешение, достигаемое при разделении нескольких компонентов, зависит от двух факторов: ширины зоны образца в начале эксперимента и обусловленного диффузией размывания ее в процессе электрофореза. *Диск-электрофорез* (от английского "discontinuous" - прерывистый) позволил уменьшить ширину зоны исходного образца до нескольких мкм вместо нескольких см, получаемых при менее совершенных методиках электрофореза. Сущность метода состоит в использовании буферов с разными рН на концах геля. Гель состоит из трех областей: 1) стартовой области, в которую вводится исходная смесь макромолекул; 2) концентрирующей области и 3) разделяющей области, в которой происходит само разделение компонентов. Гель готовят на буферных растворах, которые используют в качестве электродных сред. Ионы, движущиеся во время электрофореза в одном направлении с фракционируемыми макромолекулами, разбивают на два класса - ведущие и замыкающие. В начале электрофореза ведущие ионы находятся в геле, замыкающие - в электродном буфере. Когда через систему пропускают ток, ведущие (более подвижные из-за малого размера) ионы обгоняют макромолекулы и замыкающие ионы, оставляя за собой зону с меньшей электропроводностью. Известно, что удельная электропроводность обратно пропорциональна напряженности электрического поля, следовательно, в этой зоне напряженность будет повышена, что ускорит движение макромолекул и замыкающих ионов и заставит их двигаться вслед за ведущими. В системе установится регулируемое равновесие, т.е. между ведущими и замыкающими ионами возникает подвижная граница. Так как у макромолекул подвижность меньше, чем у ведущих ионов, и больше, чем у замыкающих, то они будут концентрироваться в узкой зоне, фронтом которой и служит подвижная граница. На этом этапе начинается разделение макромолекул по заряду: молекулы будут располагаться в геле последовательно между ведущими и замыкающими ионами в соответствии со своей подвижностью, определяемой зарядом. Когда зона белка достигнет границы между концентрирующим и разделяющим гелем, она столкнется с меньшим размером пор и другим значением рН. Величину рН разделяющего геля подбирают таким образом, чтобы увеличить степень диссоциации, а следовательно, и подвижность замыкающих ионов. Замыкающие ионы обгоняют макромолекулы и движутся за ведущими ионами, а макромолекулы теперь движутся в поле с постоянной напряженностью. Стартовый и концентрирующий гели имеют сравнительно

крупные поры, уменьшающие диффузию, но не снижающие скорость движения макромолекул под действием электрического поля. Разделяющий гель более мелкопорист, что замедляет движение макромолекул соответственно их молекулярной массе и улучшает разделение, обусловленное различной электрофоретической подвижностью этих молекул.

Задача 17. При исследовании электрофоретической подвижности белков лизоцим прошел в геле путь, равный 2.5 см, бычий сывороточный альбумин - 1.8 см, а фибриноген - 1.1 см. Мол. масса лизоцима и фибриногена - 14.1 и 330 кДа соответственно. Рассчитайте мол. массу сывороточного альбумина.

## СПЕКТРОСКОПИЯ ПОГЛОЩЕНИЯ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Макромолекулы поглощают свет. Длины волн, при которых происходит поглощение, и степень поглощения зависят от структуры и от окружения макромолекулы, поэтому *спектроскопия поглощения*, или *абсорбционная спектроскопия*, может служить полезным инструментом для характеристики макромолекул. Энергия света равна  $E = hc/\lambda$ , где  $h$  - постоянная Планка,  $c$  - скорость света,  $\lambda$  - длина волны света. Когда свет встречается с молекулой, он может либо *рассеиваться* (т.е. изменять направление своего распространения), либо *поглощаться* (т.е. его энергия передается молекуле). Если произошло поглощение электромагнитной энергии света, о молекуле говорят, что она перешла в *возбужденное состояние*. Возбужденная молекула обладает набором дискретных квантованных энергетических состояний, называемых *энергетическими уровнями* молекулы. Поглощение энергии происходит с наибольшей вероятностью только в том случае, если количество поглощенной энергии соответствует разности энергий квантованных состояний:  $\lambda = hc/(E_1 - E_2)$ , где  $E_1$  - энергетический уровень молекулы до поглощения, а  $E_2$  - энергетический уровень, достигаемый в результате поглощения. Изменения энергетического состояния при испускании или поглощении кванта называется *переходом*. Зависимость вероятности поглощения от длины волны называется *спектром поглощения*. Вероятность перехода при данной длине волны характеризуется *коэффициентом погашения (экстинкции)* при этой длине волны ( $\epsilon$ ). Если свет интенсивности  $I_0$  проходит через раствор с толщиной слоя  $d$  и концентраци-

ей  $c$ , интенсивность прошедшего света  $I$  подчиняется *закону Бугера-Ламберта-Бера*:  $\lg(I_0/I) = \epsilon dc$ . Величину  $\lg(I_0/I)$  называют *оптической плотностью*, ее удобно использовать, так как она линейно

зависит от  $c$ . В некоторых случаях, если  $c$  велико,  $\epsilon$  становится функцией  $c$ , и тогда линейность между оптической плотностью и концентрацией раствора нарушается. Это может быть результатом рассеяния света или структурных изменений (например, димеризации, агрегации или химических изменений) при высоких концентрациях.

Любая молекула поглощает свет в достаточно широкой области длин волн. Однако при данной длине волны в спектре обычно преобладает поглощение химических групп только одного типа. Эти группы называют **ХРОМОФОРАМИ**. Хромофоры, входящие в состав белков и нуклеиновых кислот, поглощают свет только при длинах волн, меньших чем 300 нм. Использование воды в качестве растворителя автоматически ограничивает спектральные измерения областью длин волн, больших, чем 170 нм. Ниже этого предельного значения поглощение даже очень тонких ( $\sim 1$  мкм) водных пленок так велико, что регистрация на его фоне какого бы то ни было вклада от макромолекул требует особой высокой точности. 2

Хромофорами белков являются пептидные группы  $O=C-N-H$  и боко-

2

вые группы аминокислотных остатков. Кроме того, некоторые белки содержат дополнительные хромофоры: например, атомы меди или железа, железосерные кластеры, ретиналь в родопсине, флавины и т.п. Полоса поглощения пептидной группы наблюдается при 210-220 нм, но является слабой. Для боковых групп большинства аминокислот

максимумы поглощения лежат в той же области, что и поглощение пептидной группы. Зарегистрировать их поглощение в белках почти невозможно, поскольку по интенсивности оно сильно уступает пептидной группе и к тому же число соответствующих боковых групп обычно меньше, чем число пептидных групп. Исключение составляют аминокислоты Phe, Trp и Tyr, поглощение ароматических боковых групп которых имеет максимумы при длинах волн, превышающих 230 нм. Спектры поглощения этих трех ароматических аминокислот при нейтральных рН представлены на рис. 29. Поглощение Trp значительно сильнее, чем Phe и Tyr, однако он редко присутствует в белках в больших количествах в отличие от Tyr, вклад которого в поглощение белков также оказывается весьма значительным. Поглощение Phe гораздо меньше и обнаружить его присутствие в белках, содержащих другие ароматические аминокислоты, оптическими методами почти невозможно.

Хромофорами нуклеиновых кислот являются пуриновые и пиримидиновые основания (рис. 30). Электронная структура пуринов и пиримидинов гораздо сложнее, чем белковых хромофорных групп. Поэтому кажущиеся простыми полосы поглощения полинуклеотидов в действительности являются результатами наложения нескольких разных полос. Полосы поглощения отдельных хромофоров типичной нуклеиновой кислоты сливаются и дают простую на вид полосу с максимумом при 258 нм (рис. 31).

Спектр поглощения полимера отличается от суммы спектров составляющих его мономеров по нескольким причинам. Под влиянием окружения (например, заряженных или экранирующих групп) происходят небольшие изменения положения максимума поглощения хромофора - сдвиг полосы поглощения. Поэтому спектры многих хромофоров зависят от растворителя. При сближении хромофоров на расстояние, при котором между ними возникают электронные взаимодействия, становятся возможными еще два явления - расщепление полосы поглощения на несколько полос меньшей интенсивности и ГИПОХРОМИЗМ, который проявляется как снижение суммарной интенсивности поглощения полимера по сравнению с интенсивностью поглощения набора составляющих его мономеров. Эффект гипохромизма отчетливо проявляется в случае ДНК, которая, находясь в форме двойной спирали, поглощает примерно на 30% меньше, чем смесь составляющих ее нуклеотидов (рис. 31).

Задача 18. В неполярном растворителе белок имеет полосу поглощения с  $\lambda = 280$  нм. Предположим, что в воде влияние растворителя сводится только к образованию водородных связей между молекулами воды и остатками тирозина в возбужденном (но не в основном) состоянии белка. Рассчитайте, как изменится положение полосы поглощения этого белка в водном растворе, если энергия водородной связи составляет 4.2 кДж/моль.

Задача 19. Зрительный белок родопсин содержит хромофорную молекулу ретиналя с максимумом поглощения при 498 нм. Коэффициент экстинкции родопсина при этой длине волны  $\epsilon = 348$  (М7см)<sup>-1</sup> при  $d = 1$  см. Оптическая плотность исследуемого раствора родопсина оказалась равной 1.6. При разбавлении 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 и 1:6 величина оптической плотности снижалась и составляла 1.52, 1.42, 1.05, 0.84, 0.70 и 0.61 соответственно. Какова концентрация исходного раствора?

Задача 20. Коэффициенты экстинкции чистого препарата белка при 260 и 280 нм равны соответственно 5248 и 3150 (М7см)<sup>-1</sup> при  $d = 1$  см. Для выделения белка используется реагент с  $\epsilon = 311$  и 350 (М7см)<sup>-1</sup> при 260 и 280 нм и  $d = 1$  см. После выделения белка оптическая плотность его раствора при 260 нм составляла 2.50, а при 280 нм - 2.00. Какова концентрация выделенного белка?

## ДРУГИЕ ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ

Практически все молекулы, синтезируемые живыми организмами, обладают *оптической активностью*, т.е. способностью вращать плоскость поляризации света и по-разному поглощать правый и левый поляризованный по кругу свет. Это свойство является столь универсальным для живых систем, что его наличие или отсутствие служит одним из

критериев в суждениях, например, о том, несут ли метеориты доказательства существования жизни где-либо еще во Вселенной. Оптическая активность биомолекул связана с наличием асимметричных атомов углерода (например, у L- и D-форм аминокислот и моносахаридов, описанных в первой лекции), с влиянием этих асимметричных атомов на соседние хромофоры, а также со сложной асимметричной пространственной структурой макромолекул. Оптическую активность биологических макромолекул исследуют методами *дисперсии оптического вращения* (ДОВ) и *кругового дихроизма* (КД). Главным преимуществом регистрации спектров ДОВ и КД по сравнению с другими оптическими методами является очень высокая чувствительность к изменениям локальных взаимодействий в макромолекулах, что позволяет с успехом использовать эти методы для изучения структурных переходов макромолекул и для изучения связывания белков и нуклеиновых кислот с малыми молекулами. Спектры КД  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -слоя и беспорядочного клубка четко различаются, и путем подгонки спектров КД белков к табличным значениям спектров полипептидов с известной конформацией удается довольно надежно установить долю каждого из типов вторичной структуры в данном белке. В отличие от белков, для нуклеиновых кислот создана приемлемая теория, связывающая спектры ДОВ и КД со структурой молекул. Она позволяет делать однозначный выбор между различными альтернативными структурами, предсказываемыми другими методами. Спектры ДОВ и КД

позволяют также определять ориентацию отдельных групп по отношению к оси молекулы.

В случае некоторых молекул поглощение кванта света приводит затем к испусканию кванта света с меньшей энергией (т.е. большей длиной волны). Это явление называется *флуоресценцией* (или *фосфоресценцией*, если испускание долгоживущее). Флуоресценция хромофора более чувствительна к его окружению, чем поглощение, поэтому путем измерения спектров флуоресценции можно в ряде случаев получить сведения о пространственной структуре, местах связывания, взаимодействиях с растворителем, степени гибкости и коэффициентах вращательной диффузии макромолекул. Но самое главное, что *флуоресцентная спектроскопия* позволяет исследовать перенос энергии возбуждения между соседними хромофорами, поскольку, возбуждая один хромофор, можно наблюдать флуоресценцию другого, а оценивая эффективность переноса энергии (которая обратно пропорциональна шестой степени расстояния между хромофорами), можно рассчитывать внутри- и межмолекулярные расстояния. Помимо поглощения видимого света, макромолекулы способны поглощать свет и в инфракрасной области (от 1000 до 100 000 нм). Различие полос поглощения инфракрасного (ИК) излучения для разных элементов вторичной структуры белков и для разных типов пар оснований позволяет использовать метод *инфракрасной спектроскопии* (*ИК-спектроскопии*) для определения относительного содержания  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -слоя и беспорядочного клубка в белках и соотношения числа пар A7U к числу G7C пар в молекулах РНК. Главная трудность ИК-спектроскопии состоит в том, что нельзя использовать водные растворы из-за сильного поглощения воды в ИК-области.

В молекуле, представляющей интерес для исследователя, часто содержится много хромофоров, но ни один из них не находится в участке, ответственном за биологическую функцию молекулы, или рядом с ним. Эту ситуацию удастся иногда исправить, вводя в нужный участок дополнительный хромофор, называемый "*репортерной*" группой. Для успешного использования "репортерная" группа должна иметь спектр, отличный от остальной части макромолекулы, она должна присоединяться только в одно положение, и ее введение не должно влиять на способность макромолекулы к осуществлению ее биологической функции.

Чаще всего в качестве "репортерных" групп применяются флуоресцирующие хромофоры, называемые *флуоресцентными метками* или *зондами*.

## КРАТКИЕ ВЫВОДЫ

Разработано множество различных методов исследования структуры биополимеров, только некоторые из которых кратко рассмотрены в этой лекции. Однако даже такое краткое рассмотрение показывает неадекватность теоретической и экспериментальной сложности методов скудности, получаемой при их применении количественной информации. Эффективность каждого из методов возрастает, если их комбинировать друг с другом для исследования одной и той же макромолекулы. Тем не менее, поскольку многие вопросы, связанные с функционированием биологических молекул, зависят только от определенных деталей молекулярной структуры или могут быть решены путем приблизительных количественных оценок, набор соответствующих методов из их современного арсенала, как правило, позволяет получить ответ на конкретный вопрос.

Рис. 24. Четыре эллипсоида вращения равного объема. Первый октант вырезан и в разрезе показаны длинная (а) и короткая (b) полуоси.

Рис. 25. Размеры эллипсоидов вращения, которые наилучшим образом объясняют гидродинамические свойства (вязкость и коэффициент трения) различных белковых молекул.

Рис. 26. Общий вид ультрацентрифуги: А - ультрацентрифуга Beckman (Beckman Instruments Inc., США), Б - аналитическая ультрацентрифуга MSE (Measuring and Scientific Equipment Ltd., Великобритания).

Рис. 27. Принцип гель-проникающей хроматографии. Разделение двух типов молекул при прохождении через колонку, содержащую частицы пористого геля.

Рис. 28. Пептидные карты продуктов расщепления трипсином двух различных гемоглобинов человека. Помеченный в случае нормального гемоглобина А (Hb А) пептид отсутствует для гемоглобина С (Hb С), зато появляются два новых пептида, 4а и 4b, что связано с заменой Glu на Lys на участке, показанном под пептидными картами.

Рис. 29. Спектры поглощения трех ароматических аминокислот. Чтобы изобразить все три кривые на одном рисунке, использована логарифмическая шкала.

Рис. 30. Спектры поглощения четырех дезоксирибонуклеотидов. Спектры рибонуклеотидов весьма близки к ним, за исключением спектра уридина, для которого  $I_{\max} = 260$  нм, а не 268 нм, как для Т.

Рис. 31. Спектр ДНК. I - нативная ДНК; II - та же ДНК, обработанная ферментами, расщепляющими ее до мононуклеотидов.

#### Лекция 4. КЛЕТОЧНАЯ ТЕОРИЯ

*Клеточная теория - оптическая микроскопия - электронная микро-скопия - строение эукариотической клетки - рибосомы - митохондрии - пластиды - краткие выводы*

#### КЛЕТОЧНАЯ ТЕОРИЯ

Несмотря на сложность строения биологических макромолекул и их способность самостоятельно осуществлять многие функции, элементарными живыми системами, основными структурными и функциональными единицами всех живых организмов, способными к самообновлению, саморегуляции и самовоспроизведению, являются не макромолекулы, а КЛЕТКИ. Представление о клетках как о маленьких, окруженных мембраной полостях, заполненных концентрированным водным раствором химических веществ, устарело. Современные исследования показывают, что *специфические взаимодействия* макромолекул образуют и поддерживают структурные элементы клетки и образуют упорядоченные молекулярные конвейеры, делая клетку похожей скорее на машину, чем на химический реактор. Даже самые простые клетки значительно сложнее, чем обычно считают, и построены они куда более искусно, чем любой из до сих пор сконструированных компьютеров. Изложенный в этой и последующих лекциях материал является попыткой показать исключительную тонкость и гибкость биологической организации клеток, обеспечивающую их высокорациональное поведение.

Клетка была открыта Робертом Гуком (R. Hooke) в 1665 г., он же ввел сам термин "клетка" ("cellula"). Однако обобщение основных представлений о клеточном строении живых организмов, известное как *клеточная теория*, было сформулировано лишь в 1838-1839 гг. ботаником Маттиасом Шлейденом (M.J. Schleiden) и зоологом Теодором Шванном (T. Schwann). Современная клеточная теория включает следующие положения: 1) клетка - основная единица строения и развития всех живых организмов, наименьшая единица живого; 2) клетки разных организмов сходны (гомологичны) по своему строению,



химическому составу, основным проявлениям жизнедеятельности и обмену веществ; 3) размножение клеток осуществляется только путем деления (клетка от клетки); 4) в сложных многоклеточных организмах клетки специализированы и образуют ткани; они тесно связаны между собой и включены в единую систему нервной и гуморальной регуляции.

Существует два больших класса клеток - ПРОКАРИОТИЧЕСКИЕ и ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ. Наиболее просто устроенные мельчайшие прокариотические клетки имеют самое древнее происхождение: ископаемые остатки этих клеток, возраст которых составляет более 3 млрд. лет, были найдены в древних сланцах в Африке и в Австралии. Прокариотические клетки представлены различными видами одноклеточных микроорганизмов - *бактерий*. В прокариотической клетке генетический материал (ДНК) локализован в довольно неупорядоченном, не окруженном мембраной тельце, называемом *нуклеоидом*. Эукариотическая клетка, напротив, содержит высокоорганизованное, очень сложное ядро, окруженное ядерной оболочкой, состоящей из двух мембран. Эукариотические клетки, возникшие, вероятно, на 1 млрд. лет позднее прокариотических, отличаются также большими размерами и более сложной организацией. Из эукариотических клеток состоят все одноклеточные и многоклеточные растения, животные и грибы.

Клетки почти всегда имеют микроскопические размеры. Размеры прокариотических клеток составляют от 0,5 до нескольких мкм. Например, клетки наиболее распространенной и изученной бактерии *кишечной палочки (Escherichia coli)* имеют форму цилиндра высотой 2 мкм и диаметром 0.8 мкм. Средний диаметр животных клеток - 10-20 мкм, а растительных - 30-40 мкм. Такие размеры клеток являются следствием определенных ограничений. Самая маленькая из известных клеток - *Mycoplasma* - имеет диаметр около 0.33 мкм и не может быть намного меньше, чем она есть, просто из-за того, что молекулы, из которых она построена, имеют размеры, задаваемые размерами атомов углерода, водорода, кислорода и азота. Для обеспечения жизнедеятельности клетки необходимо, чтобы она содержала определенное число макромолекул, поэтому, если бы клетки были меньше, они должны были бы быть построены из более мелких атомов или молекул. С другой стороны, клетки, не могут быть намного больше, чем они есть, потому что в этом случае скорости химических реакций в клетках были бы ограничены скоростью диффузии молекул питательных веществ внутри клетки. Другое ограничение на большие размеры связано с существованием оптимального соотношения между площадью поверхности и объемом клеток. При увеличении размеров клеток объем возрастает гораздо быстрее, чем площадь поверхности, что приводит к резкому уменьшению числа молекул питательных веществ на единицу объема, проникших в клетку за единицу времени.

Существование диффузионных ограничений объясняет, почему эукариотические клетки крупнее, чем прокариотические: цитоплазма эукариотических клеток разделена мембранами на *компартменты* в значительной мере для того, чтобы облегчить возможность быстрых взаимодействий между специфическими молекулами за счет сокращения пути, который они преодолевают, прежде чем встречаются и вступают в реакцию друг с другом. Растительные клетки крупнее животных, во-первых, из-за присутствия крупной центральной вакуоли, которая сама является довольно химически инертным компартментом, тогда как объем цитоплазмы растительной клетки относительно невелик, и, во-вторых, из-за осуществления *циклоза* - постоянного активного (с затратой энергии) движения цитоплазмы со скоростью 0,2-0,4 мм/мин, снижающего диффузионные ограничения. Однако нередко встречаются особые случаи большого размера клеток. Это наблюдается в случаях, когда клетка не осуществляет активные химические превращения, а служит просто как резервуар для запасаения и хранения веществ, например, яйцеклетки (у птиц обычно несколько см в диаметре, рекорд - яйцеклетка сельдевой акулы диаметром 22 см) или клетки мякоти плодов (у цитрусовых до 10 мм). Другой частый случай - увеличение размеров клеток благодаря многократному повторению внутренних элементов клеточной

структуры. Например, многоядерность увеличивает концентрацию молекул информационных РНК в цитоплазме и позволяет многоядерным клеткам быть крупнее одноядерных, поскольку снижает ограничения, связанные с диффузией РНК из ядра. Повторения внутренних структурных элементов часто приводят к увеличению длины клеток при сохранении их микроскопического диаметра (например, у животных мышечные клетки длиной до нескольких см, нервные клетки с отростками длиной до 1 м, а у растений клетки флоэмы длиной до 5 мм).

Число клеток в многоклеточных организмах различно. У примитивных беспозвоночных оно составляет от нескольких сотен до  $10^4$ , а в человеческом организме насчитывают порядка  $10^{14}$  клеток. Такого же порядка число клеток в дереве. В слоне примерно в 6.5 раз больше клеток, чем в человеке. Получившиеся делением одной исходной клетки *зиготы*, клетки многоклеточного организма разнообразны по своему строению и функциям. Так, среди  $10^{14}$  клеток человеческого организма выделяют более 1000 различных разновидностей. Процесс приобретения клетками стойких внутренних различий между собой, связанных с выполнением специфических функций, называется клеточной ДИФФЕРЕНЦИРОВКОЙ. Дифференцировка всегда связана с синтезом специфических белков. Например, клетки эпидермиса кожи синтезируют структурный белок коллаген, мышечные клетки - сократительный белок миозин, клетки сетчатки глаза - зрительный белок опсин и т.д. Возникает вопрос: имеют ли дифференцированные клетки одинаковый геном или утрачивают часть генетического материала в ходе делений?

В 1958 г. Ф. Стюарт (F. Steward) впервые вырастил из одной единственной клетки флоэмы взрослой моркови целое нормальное растение с корнями, листьями, стеблем и цветками. В 1968 г. Дж.Б. Гёрдон (J.B. Gurdon) успешно пересадил ядра из клеток кишечника головастика в яйцеклетки лягушки, лишённые собственных ядер, и получил взрослых нормальных лягушек, самок и самцов, способных размножаться. Эти опыты показали, что любая клетка многоклеточного организма обладает одинаковым полным фондом генетического материала и потенциями для проявления этой генетической информации. Эквивалентность клеток многоклеточного организма по содержащейся в них генетической информации называется ТОТИПОТЕНТНОСТЬЮ клеток. Однако бывают и исключения. Так, при дроблении яиц аскариды клетки, дающие начало тканям тела, теряют часть генетического материала, содержащегося в клетках половых зачатков. Сходный процесс наблюдается и у насекомых-галлин. Однако подобные различия известны только между половыми и соматическими клетками; различий в наборе генов между разными клетками тела не обнаружено.

Таким образом, гены в ходе развития не утрачиваются, они просто переходят в репрессированное "выключенное" состояние. Измерено, что количество активно работающих генов значительно уменьшается (на 80%) в дифференцированных клетках. На этом фоне "выключенных" генов резко активизируется синтез специфических белков: коллагена в клетках кожи, миозина в клетках мышц, опсина в клетках сетчатки глаза и т.д. "Выключают" или, наоборот, "включают" гены специальные белки-репрессоры и белки-активаторы, которые синтезируются с регуляторных генов. По оценкам, в клетках высокоорганизованных организмов только 10% всех генов ответственны за синтез ферментов и структурных белков, а остальные 90% - это "административный аппарат" клетки.

Несмотря на большое разнообразие клеток, все они построены по единому плану. Детали их внутреннего строения можно наблюдать с помощью разнообразных методов световой и электронной микроскопии, о которых будет рассказано ниже.

Задача 21. Сколько весит одна клетка кишечной палочки, если ее плотность (главным образом за счет воды) равна в среднем  $1.1 \text{ г/см}^3$ ?

Задача 22. Согласно теории диффузии Эйнштейна-Смолуховского среднее смещение ( $\mathbf{r}$ ) молекулы от исходной точки за время  $t$  описывается уравнением:  $\mathbf{r} = (2Dt)^{1/2}$ . Используя данные таблицы 5, рассчитайте среднее время, которое понадобится молекуле глицина, сахарозы, рибонуклеазы и фибриногена, чтобы продиффундировать в воде на расстояние, равное диаметру небольшой животной клетки (10 мкм).

### ОПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ

Человеческий глаз в состоянии различить два объекта, если угловое расстояние между ними составляет не менее  $3710^{-4}$  рад. Разрешение глаза определяется дифракцией на зрачке, *абберациями* хрусталика (явление, когда не все лучи, выходящие из данной точки объекта, фокусируются в одной точке) и угловым расстоянием между колбочками сетчатки ( $1.5710^{-4}$  рад). Если объекты находятся на расстоянии 25 см от глаза (самое меньшее расстояние, на котором без особых усилий еще можно видеть четко предмет), то разрешение возможно лишь в том случае, если расстояние между ними составляет не менее 0.07 мм. Для разрешения более мелких деталей необходимо, чтобы угол, на котором их изображение проецируется на сетчатку, был больше  $3710^{-4}$  рад.

Такого эффекта можно добиться с помощью микроскопа. Однако и в этом случае разрешающая способность микроскопа ограничена дифракцией света в его оптической системе. При этом разрешающая способность микроскопа пропорциональна длине волны света, и ее максимальное теоретическое значение составляет 200 нм, поскольку ультрафиолетовое излучение является самым коротковолновым, которое может быть использовано в световом микроскопе. При попытках увеличить разрешающую способность путем использования излучения с более короткой длиной волны возникают следующие трудности: во-первых, в области длин волн  $< 200$  нм вода и воздух интенсивно поглощают; во-вторых, реально существующие источники еще более коротковолнового излучения испускают рентгеновские лучи с длиной волны примерно 0.1 нм или  $\gamma$ -лучи с длиной волны во много раз короче, чем 0.1 нм. Поскольку не существует линз, способных сфокусировать рентгеновские или  $\gamma$ -лучи, то и нельзя построить микроскопа, работающего на этих видах излучения.

Большинство компонентов клеток прозрачны для световых лучей,

поэтому для того, чтобы сделать их видимыми, используют органические красители, избирательно связывающиеся с различными клеточными структурами. Для выявления специфических макромолекул получают антитела к ним. Осуществив ковалентное связывание этих антител с ферментом или флюоресцирующим красителем, можно определить внутриклеточное распределение исследуемых макромолекул. Окрашенные участки клетки изменяют интенсивность (уменьшают амплитуду) проходящих через образец световых волн определенной длины и в результате формируется окрашенное изображение, доступное для прямого наблюдения. Другой способ сделать видимыми детали строения клетки основан на явлении изменения фазы световой волны при прохождении света через биологические ткани. В *фазово-контрастном* и *интерференционном микроскопах* различие фаз света, проходящего через участки клетки, различающиеся толщиной или плотностью, преобразуется в различие интенсивностей света. С помощью фазово-контрастной и интерференционной микроскопии можно наблюдать живые клетки, тогда как большинство биологических образцов перед окраской фиксируют для стабилизации их структуры.

Иногда, например, когда структуру нельзя окрасить или когда ее концентрация и показатель преломления света настолько малы, что не могут привести к достаточно большой разнице фаз, для того чтобы частицы можно было увидеть в фазово-контрастный или интерференционный микроскоп, единственным свойством, делающим структуру видимой, является *двойное лучепреломление*, т. е. разница показателей преломления света в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Двойным лучепреломлением обычно обладают образцы, содержащие однотипные одинаково ориентированные структуры, например, микротрубочки веретена деления или стопки тилакоидных мембран в хлоропластах, и его

наблюдают с помощью *поляризационного микроскопа*. Во многих случаях поляризационная микроскопия дает детальную информацию об ориентации молекул.

Тот же принцип, что и в обычном просвечивающем световом микроскопе, используется в работе *ультразвукового микроскопа* - различные биологические ткани по-разному поглощают ультразвук и контрастирование основано на различиях в поглощении ультразвука разными частями объекта. Источником ультразвукового излучения является пьезоэлектрический кристалл, а детектируются проходящие волны с помощью пластмассового зеркала, в которое они ударяются после прохождения через образец и деформацию которого можно наблюдать оптическими методами с высоким пространственным разрешением. В наиболее типичных биологических тканях длина звуковой волны при частоте 2 ГГц равна примерно 750 нм, что сопоставимо с длиной волны электромагнитного излучения в оптическом диапазоне. Во многих случаях применение ультразвукового микроскопа оказывается предпочтительнее, чем использование оптической микроскопии, поскольку он не требует, чтобы объект исследования был окрашен.

### ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

В предыдущем разделе было рассказано про ограничения по длине волны, используемой в световых микроскопах. Продвинуться дальше в область более коротких волн удалось, используя волновые свойства вещества:  $\lambda = h/mv$ , где  $\lambda$  - длина волны, соответствующая частице с массой  $m$ , движущейся со скоростью  $v$ , а  $h$  - постоянная Планка. В качестве излучения оказалось возможным использовать электроны: они обладают маленькой массой покоя, заряжены и за счет этого могут быть разогнаны до очень больших скоростей, поэтому соответствующая им длина волны очень мала. Кинетическая энергия электрона  $mv^2/2 = eV$ , где  $e$  - заряд электрона, а  $V$  - ускоряющее напряжение, то  $\lambda = 1.23/V^{0.5}$  (нм), и, следовательно, электронам с энергией 40 кэВ - 3 МэВ ( $1 \text{ эВ} \sim 1.6710^{-19} \text{ Дж}$ ) соответствуют  $\lambda = 0.006 - 0.001$  нм. Кроме того, движение электронов легко контролировать наложением электрических и магнитных полей, что позволяет создать "линзы" для фокусировки пучков электронов. Однако на практике невозможность точного регулирования ускоряющего напряжения и корректировки аббераций в электронном пучке ограничивает возможности электронных микроскопов предельным разрешением в 0.2 нм.

В *просвечивающем (трансмиссионном) электронном микроскопе* часть электронов, которые проходят через образец, рассеиваются (в зависимости от плотности вещества в данном месте), а остальные фокусируются и формируют изображение на фотопластинке или фосфоресцирующем экране. Источником электронов служит нить катода, расположенная на вершине цилиндрической колонны, высота которой составляет примерно 2 м. Электроны в воздухе не могут проходить больших расстояний, и поэтому из колонны микроскопа откачивают воздух, создавая высокий вакуум, а образец помещают в микроскоп через воздушный шлюз. Поскольку ткани подвергаются воздействию вакуума, их необходимо высушить, и наблюдение живых объектов невозможно. Но при высушивании структура влажных тканей может нарушаться, и во избежание этого ткани фиксируют последовательно глутаральдегидом, который ковалентно связывает соседние белковые молекулы, и тетраоксидом осмия, который связывает и стабилизирует липиды клеточных мембран и тканевые белки. Электроны обладают очень ограниченной проникающей способностью, и поэтому ткани следует нарезать на срезы толщиной 50 - 100 нм.

Рассеяние электронов пропорционально квадрату атомного номера рассеивающего атома. Поэтому, например, рассеивающая способность урана в  $10^4$  раз больше, чем рассеивающая способность водорода. Биологические образцы и пленки-подложки состоят в основном из легких атомов, и контраст для выявления структурных особенностей образца оказывается недостаточным. По этой причине приходится применять позитивное или негативное контрастирование. Позитивное контрастирование заключается в введении

тяжелых атомов в образец. Это можно сделать химическим путем (например, путем связывания ионов уранила с ДНК или фиксацией осмием липидов мембран) или методом оттенения, т.е. напыления тяжелых металлов на образец, при котором образуются области с высоким и низким содержанием тяжелого металла, отражающие структурные особенности образца. При негативном контрастировании образец помещается в раствор, содержащий тяжелые атомы, например, в раствор уранилацетата, и рассеивающие тяжелые атомы заполняют все пространство вокруг нерассеивающих клеточных структур. Контрастирование образцов, позволяя выявлять отдельные детали их строения, одновременно снижает разрешающую способность микроскопа до 2 нм.

Существует несколько типов взаимодействия электронов с образцом: 1) отсутствие взаимодействия, т.е. прохождение через межатомные пространства, 2) упругое рассеяние (без потери энергии) орбитальными электронами атомов образца и 3) неупругое рассеяние (с потерей энергии) ядрами атомов. Соотношение последних двух видов взаимодействия является характеристическим для каждого элемента, причем для более тяжелых элементов увеличивается доля неупругого рассеяния. Исходя из этого, был разработан новый специальный тип микроскопов. В то время как в обычном электронном микроскопе падающий пучок электронов покрывает весь образец, в *электрон-спектроскопических микроскопах* пучок сжимается до очень малого (0.5 нм диаметром) пятна. Это пятно быстро обегает образец, подобно тому, как это делает луч на экране телевизора. При движении пучка в каждой точке измеряется соотношение электронов с разной энергией и полученное соотношение обрабатывается компьютером и преобразуется в изображение на мониторе. В результате становятся возможными идентификация атомов индивидуальных химических элементов и наблюдение их распределения в образце.

*Сканирующий электронный микроскоп обратного рассеяния* позволяет получать трехмерные изображения клеточных поверхностей. Здесь электронный луч, сжатый в маленькое (10 нм диаметром) пятно, не проходит через образец, а обегает поверхность образца, покрытого толстым (20 нм) слоем золота или другого тяжелого металла. Когда пучок падает на металл и проходит в нем короткое расстояние, золото начинает испускать электроны вследствие вторичной эмиссии или сами электроны пучка за счет обратного рассеяния. Количество рассеиваемых электронов зависит от угла наклона луча к поверхности образца, и в зависимости от кривизны этой поверхности результирующее изображение будет состоять из ярких точек и глубоких теней, что и создает иллюзию трехмерности. Разрешение такого микроскопа ограничено 10 нм, поэтому он используется в основном для исследования объектов, размеры которых лежат в диапазоне между размерами интактных одиночных клеток и небольших организмов.

Специальные методы электронной микроскопии позволяют увидеть особенности строения клетки и улучшить качество изображения. Метод *замораживания-скалывания* дает уникальную возможность наблюдать внутреннее строение мембран клетки. Он основан на том, что если биологический объект быстро заморозить до температуры жидкого азота ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) в присутствии антифриза, а затем сломать резким ударом, то линии излома пройдут по пути наименьшего сопротивления. А так как силы, скрепляющие внешний и внутренний слой биологических мембран, слабее, чем силы сцепления молекул растворителя и силы, которые связывают растворитель с поверхностью мембраны, то трещина часто возникает внутри мембраны, и при этом открывается ее внутренняя поверхность. Наружную поверхность клеток и мембран исследуют с помощью метода *замораживания-травления*, обнажая ее после быстрого замораживания образца при температуре жидкого гелия ( $-269^{\circ}\text{C}$ ) возгонкой воды в вакууме при повышении температуры. К методам, повышающим разрешение и четкость электронной микрофотографии, относятся методы *математической фильтрации изображений*. Наиболее эффективные результаты при этом получаются, если объект исследования обладает симметрией. В этом случае фотография электронно-микроскопического изображения используется как решетка для

получения дифракционной картины, которая может быть вновь преобразована в изображение, аperiodический шум исходного изображения при этом отсекается.

В 1982 г. был сконструирован первый *туннельный сканирующий микроскоп*, в котором в качестве зонда используется специальным образом заточенная игла. Между иглой и атомарно-гладкой подложкой, на которую помещается исследуемый образец, создается зазор величиной порядка десятых долей нм. После создания разности потенциалов 10-1000 мВ между иглой и подложкой возникает туннельный ток, который при изменении зазора между иглой и поверхностью образца на десятую долю нм изменяется на порядок. Игла перемещается вдоль поверхности образца, а результатом измерений служит рельеф этой поверхности. Результаты измерений хранятся в виде файла в памяти ЭВМ и воспроизводятся на цветном мониторе аналогично географическим картам, на которых высоту показывает условный цвет. Туннельный сканирующий микроскоп имеет уникальное разрешение - тысячные доли нм по высоте и сотые доли нм по поверхности - и обладает рядом особенностей, делающих его весьма перспективным для применения в биологических исследованиях. Во-первых, в отличие от традиционной электронной микроскопии новый метод не требует создания вакуума вокруг исследуемого образца и, следовательно, является методом неразрушающей микроскопии. Во-вторых, по достигнутому разрешению новый метод сопоставим лишь с рентгеноструктурным анализом, но, в отличие от него, не требует специальной кристаллизации объектов.

Первыми биологическими объектами, исследованными с помощью туннельного сканирующего микроскопа, были белки. К настоящему времени уже исследован широкий набор самых разных ферментов и структурных белков. С помощью нового прибора удается различить некоторые аминокислоты,  $\alpha$ -спирали полипептидной цепи и более крупные структурные особенности белков. Рекордное разрешение - 1 нм - было достигнуто при исследовании структуры коллагена. Туннельный сканирующий микроскоп позволяет также изучать топографию антител и белков-рецепторов, находящихся непосредственно на клеточной поверхности. Среди исследованных объектов - биомембраны, митохондрии, хлоропласты и спиральные жгутики (рентгеноструктурный анализ позволяет исследовать только прямые жгутики). Новый прибор помог также при изучении структуры гликогена, для которого не удавалось получить кристаллов для рентгеноструктурного анализа. Скорость получения информации с помощью туннельного сканирующего микроскопа настолько велика, что позволяет создать фильм о функционировании биомолекул. Такой фильм был снят о сборке фибриновых волокон.

При помощи нового метода получены изображения нуклеиновых кислот в естественных для них условиях в растворе солей. У двухцепочечных ДНК хорошо видны детали, которые прежде можно было увидеть только на макетах этих макромолекул - спиральная структура, большая и малая бороздки, фосфатные остатки и сахара. В одноцепочечных нуклеиновых кислотах пурины отличаются от пиримидинов. Зарегистрировано получение с помощью атомно-силовой туннельной микроскопии изображения ДНК на слюде, на котором удается различить даже отдельные нуклеотиды. Это сообщение открывает новые возможности для решения проблемы быстрого определения нуклеотидной последовательности генов. Предсказывается, что скорость определения первичной нуклеотидной последовательности при помощи серийного сканирующего туннельного микроскопа составит не менее 600 нуклеотидов/с.

Задача 23. Сферический вирус был смешан с шарами из полистерола диаметром 75 нм. После напыления слоя золота длина тени полистероловых шаров составила 125 нм, а вируса - 82 нм. Чему равен диаметр вируса?

Задача 24. Как сильно будут различаться размеры двух сферических обезвоженных белков на электронно-микроскопической фотографии, если их молекулярные массы различаются вдвое?

## СТРОЕНИЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

Строение животной и растительной клеток показано на рис. 32, а основные компоненты эукариотической клетки перечислены на схеме рис. 33. Основными составными частями ее являются оболочка, ядро и цитоплазма. **ОБОЛОЧКА** клетки состоит из *плазматической мембраны, надмембранного комплекса* (гликокаликс или клеточная стенка) и *субмембранного опорно-сократительного аппарата*. Проявляя тесное функциональное единство, эти три компонента клеточной оболочки образуют *поверхностный аппарат клетки*, выполняющий три универсальные для всех разновидностей клеток функции: барьерную, транспортную и рецепторную. Кроме того, у отдельных разновидностей клеток наряду с

общими функциями он может выполнять и ряд специфических функций, присущих только данному типу клеток (например, механическая тургорная функция клеточной стенки у клеток растений).

**ЯДРО** обеспечивает важнейшие метаболические и генетические функции клетки. Большинство клеток содержит одно ядро, изредка встречаются многоядерные клетки (некоторые грибы, простейшие, водоросли, поперечно-полосатые мышечные волокна и др.). Лишенная ядра клетка быстро погибает. Однако некоторые клетки в зрелом (дифференцированном) состоянии утрачивают ядро. Такие клетки либо живут недолго и заменяются новыми (например, эритроциты), либо поддерживают свою жизнедеятельность за счет притока метаболитов из тесно примыкающих к ним клеток-"кормилец" (например, клетки флоэмы у растений). По форме ядро может быть шаровидным, овальным, лопастным, линзовидным и т.д. Размер, форма и структура ядер изменяются в зависимости от функционального состояния клеток, быстро реагируя на изменение внешних условий. Ядро обычно перемещается по клетке пассивно с током окружающей его цитоплазмы, но иногда оно способно самостоятельно передвигаться, совершая движения амебоидного типа.

**ЦИТОПЛАЗМА** - это внутреннее содержимое клетки. Она пронизана густой сетью белковых волокон, составляющих цитоскелет, содержит органоиды и мембранную вакуолярную систему. Взаимодействие между ними осуществляется через полужидкую составляющую цитоплазмы - **ЦИТОЗОЛЬ**. Цитозоль - это своеобразная коллоидная система с упорядоченной субмикроскопической структурой. Цитозоль содержит 75 - 80% воды, 10 - 12% белков и аминокислот, 4 - 6% углеводов, 2 - 3% липидов и 1% неорганических и других веществ. Все эти вещества образуют полужидкую слизистую бесцветную массу, не смешивающуюся с водой. Она занимает в среднем около 54% общего объема типичной клетки (таблица

7). Цитозоль существенно *неоднороден*: например, цитозоль непосредственно окружающий аппарат Гольджи, не идентичен цитозолю, контактирующему с клеточным ядром.

**ОРГАНОИДЫ** цитоплазмы являются обязательными структурными элементами эукариотической клетки: при их отсутствии клетка теряет способность к дальнейшему существованию. Органоидами цитоплазмы являются **РИБОСОМЫ, МИТОХОНДРИИ** и **ПЛАСТИДЫ**.

Таблица 7 Относительные

объемы, занимаемые основными внутриклеточными компонентами в типичной животной клетке (гепатоците печени).

Внутриклеточный компонент	% от общего объема клетки	Число на клетку
---------------------------	---------------------------	-----------------

Ядро	6 54	1
Цитозоль	9	1
Полость гранулярного ЭПР		1
Цистерны гладкого ЭПР +	6 22	
цистерны аппарата Гольджи	1	? <sup>**</sup>
Митохондрии	1	1700*
Пероксисомы		400*
Лизосомы		300*

\*Среднее число. \*\*Аппарат Гольджи представлен в каждой клетке

рядом разрозненных групп собранных в стопки цистерн; в какой степени эти группы взаимосвязаны, окончательно не установлено.

## РИБОСОМЫ

Из-за малых размеров рибосомы видны лишь в электронный микроскоп как плотные сферические или грибовидные гранулы. Рибосомы являются немембранными надмолекулярными структурами, служащими исключительно для осуществления синтеза полипептидных цепей. Существует два типа рибосом - *прокариотического* и *эукариотического* типа. Оба типа рибосом устроены похоже, состоят из РНК (~ 65%) и белка (~ 35%), но различаются размерами. Каждая рибосома состоит из двух субчастиц неравного размера и может диссоциировать на субчастицы и вновь собираться, так что в клетке постоянно существует динамическое равновесие между диссоциированными и ассоциированными рибосомами. РНК, входящая в состав рибосом, называется рибосомальной РНК (рРНК) и выполняет, по-видимому, роль каркаса, на котором в строго определенном порядке крепятся белковые компоненты рибосомы.

Рибосомы прокариотического типа имеют средние размеры 21&29 нм, массу ~2.8 млн. Да и коэффициент седиментации 70S. Большая и малая субъединицы имеют соответственно массы 1.8 и 1.0 млн. Да и коэффициенты седиментации 50S и 30S. В состав 50S субчастицы входят одна молекула рРНК с коэффициентом седиментации 23S (~3200 нуклеотидов), одна молекула рРНК с коэффициентом седиментации 5S (~120 нуклеотидов) и 34 белка. Субчастица 30S содержит одну молекулу рРНК с коэффициентом седиментации 16S (~1600 нуклеотидов) и 21 белок.

Мол. массы рибосомальных белков лежат в пределах от 6 до 75 кДа. рРНК обладают специфической трехмерной структурой, обусловленной характером внутримолекулярного спаривания оснований. В целом, каждая из субъединиц имеет замысловатую форму. В ассоциированной рибосоме субчастицы хорошо "пригнаны" друг к другу, но в определенном месте между ними остается щель, через которую проходит молекула матричной РНК, и появляется новосинтезированная полипептидная цепь (рис. 34). Рибосомы прокариотического типа содержатся в клетках бактерий. Например, в каждой клетке кишечной палочки (*Escherichia coli*) имеется больше 15 тыс. рибосом, которые составляют почти четверть сухого веса клетки. Кроме того, рибосомы прокариотического типа всегда присутствуют внутри митохондрий и пластид эукариотической клетки, тогда как в цитоплазме той же клетки находятся рибосомы эукариотического типа.

Рибосомы эукариотического типа имеют средние размеры 22&32 нм, массу ~4.5 млн. Да и коэффициент седиментации 80S. Большая и малая субъединицы имеют соответственно массы 3.0 и 1.5 млн. Да и коэффициенты седиментации 60S и 40S. В состав 60S-субчастицы входят одна 5S-рРНК (~120 нуклеотидов), одна 5.8S-рРНК (~160 нуклеотидов), одна 28S-рРНК (~5 тыс. нуклеотидов) и примерно 45 разных белков. В состав 40S-субчастицы входят одна 18S-рРНК (~2 тыс. нуклеотидов) и примерно 33 различных белка. В цитоплазме эукариотической клетки насчитывается порядка 10 млн. рибосом эукариотического типа.

Новые рибосомы образуются в клетках в результате *самосборки* из новосинтезированных рибонуклеиновых и белковых компонентов. Если 21 белок и 16S-



рРНК прокариотической 30S-субъединицы выделить в чистом виде, а затем смешать в соответствующей последовательности при определенных условиях, то макромолекулы самопроизвольно образуют 30S-субъединицы, идентичные по структуре и активности содержащимся в клетке. Аналогичным образом 50S-субъединица может самопроизвольно реконструироваться из смеси своих 34 белков и своих 5S- и 16S-рРНК при условии, что в смеси присутствует также и 30S-субъединица.

Несколько сложнее происходит сборка эукариотических рибосом, которая осуществляется в определенной более плотной и потому хорошо заметной в микроскоп области ядра, называемой ЯДРЫШКОМ. В составе ядрышка выявляются большие петли ДНК (*ядрышковые организаторы*), со- держащие многократно повторенные гены рРНК, с которых с большой скоростью постоянно идет синтез РНК. 5,8S-рРНК, 18S-рРНК и 28S-рРНК синтезируются в составе одной молекулы 45S-РНК, которая потом специфически расщепляется, образуя рРНК. 5S-рРНК синтезируется вне ядрышка. 45S-РНК сначала образует крупные комплексы, связываясь с большим количеством различных белков, импортируемых в ядро из цитоплазмы (рис. 35). Эти комплексы содержат, кроме тех 70 белков, которые составляют рибосому, еще другие белки и малые молекулы РНК, которые, вероятно, катализируют сборку рибосом и остаются в ядрышке после того, как готовые рибосомные субъединицы выходят из ядра в цитоплазму. В процессе созревания гигантские РНК-белковые комплексы постепенно теряют часть белков и последовательностей РНК и затем специфически расщепляются, образуя самостоятельные предшественники большой и малой рибосомных субъединиц. Сборка 40S-субъединицы занимает около 30 мин., а 60S-субъединицы - около 1 ч. Поэтому в ядрышке накапливается гораздо больше недостроенных больших субъединиц, чем малых. Заключительные стадии созревания эукариотических рибосом осуществляются только после выхода рибосомных субъединиц из ядра в цитоплазму.

Задача 25. Рассчитайте  $D_{20,w}$  прокариотической и эукариотической рибосом.

## МИТОХОНДРИИ

Их основная функция связана с окислением органических соединений и использованием освобождающейся при распаде этих соединений энергии на синтез аденозинтрифосфата (АТФ). Поэтому митохондрии поглощают из цитоплазмы органические вещества и кислород, а выделяют в цитоплазму - углекислый газ (конечный продукт распада углеродного "скелета" органических соединений) и АТФ. В связи с их функцией митохондрии называют "энергетическими станциями" клетки. Они есть у всех эукариотических клеток как автотрофных (у фотосинтезирующих растений), так и гетеротрофных (у животных и грибов) и отсутствуют у прокариотических клеток (бактерий).

Количество митохондрий в клетках значительно варьирует в зависимости от потребностей в энергии данного типа клеток. В клетках некоторых водорослей и простейших содержится лишь 1 митохондрия, в сперматозоидах различных видов животных - от 20 до 72, а в клетках тела млекопитающих - от 100 до нескольких тыс. митохондрий.

Больше

всего митохондрий содержится в клетках тканей, постоянно использующих много энергии для выполнения своих функций - в мышцах, в печени и в почках. Митохондрии могут занимать от 2 до 48% от общего объема клетки, но в среднем эта величина составляет 18% (см. также таблицу

7). Митохондрии локализованы в клетке, как правило, либо в тех участках, где расходуется энергия, либо около скоплений субстрата (например, липидных капель), если таковые имеются.

Митохондрии бесцветны, поэтому для изучения их структуры эти органеллы обычно окрашивают различными способами после фиксации осмием. На обычных ультрамикроскопических срезах митохондрии бывают нитевидными, палочковидными,

округлыми и гантелеобразными даже в пределах одной клетки с характерными размерами от 1 до 10 мкм. Однако исследования, в которых были получены объемные реконструкции митохондрий по сериям срезов, показали, что число митохондрий в клетках, по-видимому, значительно меньше, чем предполагалось ранее. Часто в клетках присутствуют крупные сильно разветвленные митохондрии, каждая из которых на срезе выглядит как группа отдельных мелких митохондрий. Кроме того, фазово-контрастная микроскопия и цейт-раферная микрокиносъемка живых клеток показывают, что митохондрии являются очень динамичными структурами: они могут расти в длину, сжиматься, ветвиться или делиться за времена порядка нескольких минут.

Общий план строения митохондрий один и тот же у всех эукариот (рис. 36). Митохондрии имеют внешнюю и внутреннюю мембраны. Внешняя мембрана, отделяющая митохондрию от цитоплазмы, имеет ровные контуры, тогда как внутренняя образует многочисленные впячивания внутрь митохондрий. Такие впячивания называются *кристы*, они обычно имеют вид плоских гребней, расположенных перпендикулярно к длинной оси митохондрии, но иногда они могут ветвиться или образовывать пальцевидные отростки, изгибаться и не иметь выраженной ориентации. Роль крист заключается в увеличении площади поверхности внутренней мембраны митохондрий, поскольку именно она, как будет показано дальше, выполняет основную роль в функционировании митохондрий. Расстояние между внутренней и внешней мембранами и расстояние между мембранами в кристе составляют 10 - 20 нм. Внутреннее содержимое митохондрии называется *матрикс*. В матриксе митохондрий содержатся также митохондриальная ДНК, рибосомы и различные включения (в основном отложения солей магния и кальция).

Митохондрии представляют собой обновляющиеся структуры с довольно кратким жизненным циклом (в клетках печени, например, митохондрии живут около 20 дней). Гибнущие митохондрии сменяются новыми. Этот процесс может иногда идти очень интенсивно, например, при адаптивных перестройках. Новые митохондрии образуются только в результате роста и деления ранее существовавших митохондрий. Деление их может происходить перетяжкой и отпочковыванием. Делению (репродукции) митохондрий предшествует репродукция собственной генетической системы - митохондриальной ДНК. Репликация ДНК митохондрий при делении клеток происходит независимо от ядерной, обычно тогда, когда ядерная ДНК уже реплицировалась.

Кроме своей основной энергетической функции, митохондрии участвуют в специфических синтезах, например в синтезе стероидных гормонов в надпочечниках. Отработавшие митохондрии могут накапливать продукты экскреции. Наконец, в некоторых случаях митохондрии печени и почек способны аккумулировать вредные вещества и яды, попадающие в клетку, изолируя их от цитоплазмы и частично блокируя вредное действие этих веществ. Таким образом, митохондрии способны брать на себя функции других органоидов клетки, когда это требуется для полноценного обеспечения того или иного процесса в норме или в экстремальных условиях.

## ПЛАСТИДЫ

Пластиды встречаются только у фотосинтезирующих эукариотических организмов (высшие растения, водоросли, некоторые одноклеточные простейшие). По пигментному составу, связанному с их функциями, различают три основных типа пластид: ХЛОРОПЛАСТЫ (зеленые пластиды), ХРОМОПЛАСТЫ (желтые или оранжевые пластиды) и ЛЕЙКОПЛАСТЫ (бесцветные пластиды). В каждой клетке встречаются пластиды только одного типа. Хлоропласты содержат зеленый пигмент *хлорофилл* и осуществляют на свету *фотосинтез*, в результате которого энергия света превращается в химическую энергию и используется для синтеза нужных растению веществ. Хлоропласты встречаются почти во всех клетках растения, куда проникает свет, но особенно много их в клетках листьев. Лейкопласты встречаются в тех клетках растения, куда не проникает солнечный свет. Их главная функция - накопление и хранение запасных питательных веществ. Хромопласты

накапливают желтые, оранжевые и красные пигменты (*каротиноиды*). Хромопласты так же, как

и окрашенные вакуоли, придают яркий цвет некоторым частям растений.

Например, хромопласты придают цвет лепесткам лютика, одуванчика или тюльпана, зрелым плодам томатов, рябины, арбуза или апельсина, моркови и свекле. Пластиды способны превращаться друг в друга. Если освещать бесцветную подземную часть растения, то лейкопласты под действием света начнут накапливать хлорофилл и превратятся в хлоропласты. По этой причине, например, зеленеет оставленный на солнце клубень картофеля. Хлоропласты же, старея, теряют свою зеленую окраску и превращаются в хромопласты. Такой процесс происходит в листьях осенью: зеленый хлорофилл в хлоропластах начинает разрушаться и тогда становятся видны каротиноиды, которые все время присутствовали в хлоропластах, но были замаскированы хлорофиллом. В результате зеленые листья становятся желтыми, оранжевыми или красными. Взаимные превращения пластид позволяют рассматривать их как различные типы дифференцировки одного типа органеллы. Это подтверждается общностью строения разных пластид.

Основным типом пластид являются хлоропласты. Они обычно имеют постоянную форму вытянутого эллипсоида вращения с длинной и короткой полуосями 2 - 3 и 0.5 - 1.5 мкм соответственно. Большинство растений имеют хлоропласты объемом от 30 до 60 мкм<sup>3</sup>. Мелкие пластиды (меньше 30 мкм<sup>3</sup>) найдены у тополя, осины, ясеня, некоторых видов осоки. Очень крупные хлоропласты типичны для тенелюбивых растений, например у копытня - 227 мкм<sup>3</sup>, заячьей капусты - 240 мкм<sup>3</sup>, фиалки - 100 мкм<sup>3</sup>. Число хлоропластов на клетку варьирует от 3 до 400, обычно в среднем на клетку приходится 10 - 30 хлоропластов. Более 400 пластид на клетку найдено у табака, ревеня, у некоторых видов лилий. Малопластидными являются, например, клетки тростника (4 - 10), земляники (8 - 12), лимона (5 - 10). Число пластид в клетке значительно коррелирует с содержанием ДНК в ядре и гораздо слабее с объемом клетки. Тем не менее для оценочных расчетов можно использовать среднестатистическую величину - 14 хлоропластов на 10 тыс. мкм<sup>3</sup> объема клетки.

Так же, как и митохондрии, хлоропласты отграничены от цитоплазмы оболочкой из двух мембран - внешней и внутренней, - отделенных друг от друга межмембранным пространством шириной 20 - 30 нм (рис. 37, А). Внутренняя мембрана хлоропластов, как и других пластид, образует складчатые впячивания внутрь хлоропласта. Они представляют собой внутреннюю мембранную систему хлоропласта, окруженную *стромой*, которая аналогична матриксу митохондрий. В зрелом хлоропласте высших растений различают два типа внутренних мембран: плоские протяженные складки, образованные внутренней мембраной оболочки и способные простираться почти через всю пластиду, - *ламеллы стромы* и плоские замкнутые мембранные мешки, имеющие форму диска, - *тилакоиды*. Внутренняя полость тилакоидов имеет ширину 20 - 30 нм и называется *люмен*. Часто тилакоиды образуют стопки наподобие столбика монет, называемые *гранами* (рис. 37, Б). Число тилакоидов на одну грану может варьировать от нескольких штук до 50 и более. Количество гран в хлоропластах может достигать 40 - 60. Тилакоиды в грани сближены друг с другом так, что внешние слои их мембран тесно соединяются (рис. 37, В). В состав грани, кроме тилакоидов, обычно входят и участки ламелл стромы, которые таким образом связывают между собой отдельные граны хлоропласта (рис. 37, Б).

В строме хлоропластов обнаруживаются молекулы пластидной ДНК, рибосомы и различные включения. Среди включений наиболее распространенными являются *крахмальные зерна* и *пластоглобулы*. Отложение крахмальных зерен тесно связано с функционированием хлоропластов: часть образующихся в процессе фотосинтеза углеводов идет на синтез крахмала в строме. Крахмальные зерна имеют овальную, сферическую или неправильную форму, характерную для каждого вида растения, имеют плотность 1.5 - 1.6 г/см<sup>3</sup> и обладают двойным лучепреломлением. Диаметр крахмальных зерен варьирует от 0.2 до 7 мкм, когда крахмальные зерна занимают почти весь объем пластиды, обычно

лейкопласта, называемого в этом случае *амилопластом*. Самые крупные крахмальные зерна у картофеля, а самые мелкие - у риса и гречихи. Размер крахмальных зерен, как правило, непостоянен. Например, он обычно увеличивается днем на ярком свете, когда в хлоропластах идет активный фотосинтез, и уменьшается ночью, когда преобладает отток моносахаридов из хлоропласта, отщепляющихся от молекул крахмала. Пластоглобулы хорошо окрашиваются солями осмия и имеют диаметр от 0.2 до 1 мкм в зависимости от вида растения. Их число и величина в общем случае увеличиваются с возрастом хлоропластов, достигая максимума в период осеннего отмирания листьев. Быстрая сборка мембран тилакоидов при преобразовании лейкопластов в хлоропласты на свету обычно сопровождается уменьшением числа пластоглобул. В этой связи пластоглобулы рассматриваются как резервный фонд липидов пластидных мембран.

Строение хлоропластов низших фотосинтезирующих растений (зеленые, бурые и красные водоросли), называемых *хроматофорами*, в общих чертах сходно со строением хлоропластов клеток высших растений. Водоросли часто содержат по одному большому хроматофору на клетку, форма которого может быть очень разнообразна, например, длинная спиральная лента или разветвленная сеть. Так же, как у высших растений, хроматофоры окружены оболочкой из внешней и внутренней мембран, последняя из которых образует внутренние впячивания в виде параллельных плоских мешков. Однако грани в хроматофорах водорослей не встречаются. У зеленых водорослей в состав хроматофора входят *пиреноиды*, представляющие собой окруженные мелкими пузырьками зоны, вокруг которых происходит отложение крахмала.

Так же, как новые митохондрии, новые пластиды в клетке образуются только за счет деления или почкования уже существующих. Увеличение числа пластид обычно происходит за счет деления не имеющих развитой структуры *пропластид* или *инициальных частиц* с последующим развитием и дифференцировкой их в хлоропласты или лейкопласты (рис. 38). Однако в молодых растущих клетках делятся не только пропластиды, но и хлоропласты с хорошо развитой внутренней мембранной системой. При созревании хлоропластов, когда в них накапливается большая масса пластоглобул, их способность к делению утрачивается. Тем не менее обычно клетка на протяжении всей ее жизни поддерживает фонд хлоропластов, имеющих более мелкие размеры и сохраняющих способность делиться. В молодых листьях такие хлоропласты составляют 5%, у зрелых - 1% от общего числа пластид. Как правило, деление и рост клетки сопровождаются делением хлоропластов, и деление хлоропластов прекращается, когда клетка достигает максимальных размеров. В то же время рост клетки и деление хлоропластов относительно независимы друг от друга, что следует из возможности экспериментального разобщения этих процессов.

Задача 26. В листьях яблони содержится в среднем 7 млн. хлоропластов на 1 см<sup>2</sup> площади листа. Средняя площадь листа яблони - 18 см<sup>2</sup>. Рассчитайте общее количество хлоропластов у дерева яблони с количеством листьев около 20 тыс.

### КРАТКИЕ ВЫВОДЫ

Клетка - это самая элементарная единица, обладающая всеми признаками живого организма (движением, питанием, ростом, способностью к самовоспроизведению, раздражимостью и приспособляемостью к меняющимся условиям). Существуют еще более простые системы, способные к самовоспроизведению, - *вирусы* (надмолекулярные структуры, состоящие из молекулы ДНК или РНК и окружающей ее белковой оболочки) и *вириды* (небольшие фрагменты нуклеиновой кислоты). Однако для их воспроизведения обязательно нужна живая клетка, которую они заставляют воспроизводить копии своей структуры в соответствии с содержащейся в их нуклеиновых кислотах генетической информацией. Вне сформировавшихся их клеток вирусы представляют собой просто неживые частицы, иногда даже способные кристаллизоваться.

Как прокариотические, так и более сложные эукариотические клетки построены по единому плану из однотипных "деталей" (мембраны, набор органоидов, микронити и микротрубочки). Тем не менее у разных организмов эти "детали" могут иметь различный молекулярный состав.

Разнообразие клеток в многоклеточном организме достигается за счет специфического "выключения" одной группы генов и активации другой. Обратимость этого "переключения" позволяет клетке в экстренной ситуации сменить свою специализацию (дифференцировку) в соответствии с нуждами многоклеточного организма.

Рис. 34. Трехмерная структура 50S- и 30S-субъединиц, построенная на основе данных рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии. А - модели 30S- (вверху) и 50S- (внизу) субъединиц, показанные в разных ракурсах. Б - собранная 70S-рибосома в двух ракурсах (30S-субъединица - светлая, 50S-субъединица - темная).

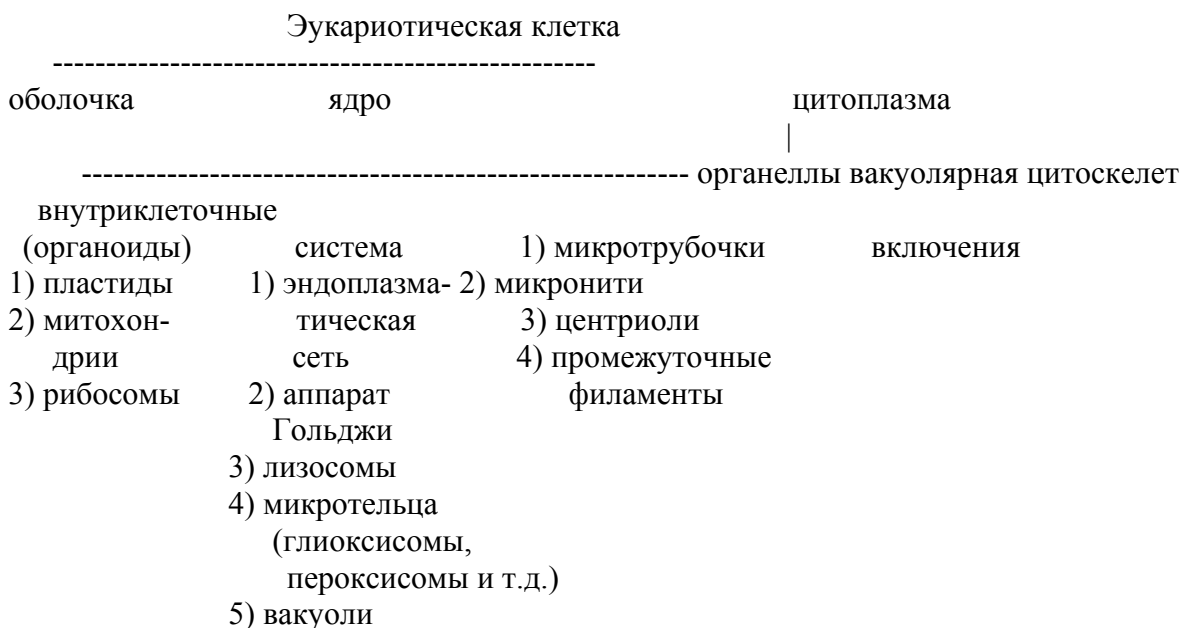
Рис. 35. Схема синтеза эукариотических рибосом.

Рис. 36. Схема организации митохондрии: 1 - наружная мембрана, 2 - межмембранное пространство, 3 - внутренняя мембрана, 4 - кристы, 5 - матрикс, 6 - ДНК, 7 - рибосомы.

Рис. 37. А - общая схема организации хлоропласта: 1 - наружная мембрана, 2 - межмембранное пространство, 3 - внутренняя мембрана, 4 - тилакоиды, 5 - грана, 6 - пластоглобулы, 7 - ДНК, 8 - рибосомы, 9 - строма, 10 - ламеллы стромы. Б - общий вид и В - схема разреза грани: 1 - тилакоид, 2 - ламелла стромы.

Рис. 38. Развитие хлоропластов. Слева - нормальное развитие хлоропластов на свету, справа - их развитие в темноте.

Рис. 33. Строение эукариотической клетки.



*Структура и свойства биологических мембран - установление равновесия по разные стороны мембраны - транспорт через биомембраны малых молекул - транспорт через биомембраны макромолекул - краткие выводы*

## СТРУКТУРА И СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Фосфолипиды, о структуре которых было кратко рассказано в первой лекции, имеют общие структурные особенности. Все они имеют полярную, и следовательно, гидрофильную "голову" и гидрофобные жирнокислотные "хвосты". При взбалтывании в воде или водных растворах такие молекулы спонтанно формируют *мицеллы*, в которых углеводородные "хвосты" липидов спрятаны от воды, а полярные "головы" располагаются на поверхности частицы, взаимодействуя с водным окружением (рис. 39, А). Липиды способны также растекаться по поверхности водных растворов, образуя слой толщиной в одну молекулу - *монослой*. В монослое углеводородные "хвосты" обращены к воздушной среде и избегают таким образом контакта с водой, а гидрофильные "головы" погружены в водную фазу (рис. 39, Б). На поверхности раздела двух водных фаз липиды легко и самопроизвольно формируют *бислои*. В бислоях углеводородные "хвосты" липидов направлены внутрь от водной фазы и образуют непрерывный углеводородный слой, а располагающиеся снаружи гидрофильные "головы" оказываются погруженными в водный раствор (рис. 39, В). При сильном встряхивании бислоев из них формируются *липосомы* - замкнутые пузырьки, окруженные непрерывным липидным бислоем (рис. 39, Г).

Все биологические мембраны устроены сходно. Они представляют собой липидные бислои, в которые вкраплены белковые молекулы. Весовое соотношение белков и липидов изменяется от 1:4 до 4:1. В составе биологических мембран обнаруживаются липиды трех основных классов: *фосфолипиды*, *гликолипиды* и *стероиды*. Хотя наиболее часто встречающиеся фосфолипиды построены по единому плану и их молекулы пространственно хорошо "соответствуют" друг другу (рис. 40), это не исключает наличия огромного числа фосфолипидов, обеспечиваемого разнообразием жирных кислот, которые входят в состав их молекул. Так, существует несколько десятков природных видов одного лишь фосфатидилхолина, причем они существенно отличаются друг от друга по своим физическим и химическим свойствам. Гликолипиды содержат углеводные компоненты и представлены *цереброзидами*, *сульфатидами* и

*ганглиозидами* (рис. 40, А). Стероиды мембран построены на основе жесткого скелета из нескольких углеродных колец и у животных представлены в основном *холестерином* (рис. 40, Б). Плоские стероидные кольца холестерина уменьшают подвижность жирнокислотных "хвостов" окружающих его липидов (рис. 40, В), снижая текучесть липидного бислоя и увеличивая его механическую прочность.

Основные структурные особенности биологических мембран определяются составом липидного бислоя. Многие свойства мембраны связаны с ее *текучестью*, зависящей от подвижности углеводородных "хвостов" липидов. Искусственный липидный бислой, состоящий из липидов одного типа при понижении температуры до строго определенного значения (точки замерзания) переходит из жидкого состояния в кристаллическое (или гелеобразное). Этот переход является *фазовым переходом*. Благодаря многокомпонентному составу мембрана может претерпевать постепенные изменения степени текучести в широком интервале температур, за счет чего клетка может перестраивать свою работу в соответствии с температурой окружающей среды. Температура перехода оказывается ниже (т.е. текучесть выше), если углеводородные цепи короткие (взаимодействие "хвостов" становится менее вероятным) или если в них содержатся двойные связи (которые мешают более компактной упаковке "хвостов"). Понижение температуры окружающей среды увеличивает содержание липидов с полиненасыщенными и более короткими углеводородными "хвостами" в мембранах бактерий, дрожжей, растений и холоднокровных животных таким образом, чтобы текучесть мембраны оставалась примерно постоянной. Так, например, соотношение насыщенных и ненасыщенных остатков жирных кислот в липидах мембраны

кишечной палочки снижалось с 1.6 до 1.0 при понижении температуры среды с 42 до 27°C. У эукариотических организмов есть еще другой способ регуляции текучести мембран - встраивание холестерина в липидный бислой. Избыток холестерина увеличивает вязкость бислоя, что может понижать скорость транспортных и других диффузионно-зависимых процессов в мембранах, поэтому у многих организмов есть специальные ферментативные системы, регулирующие мембранное содержание холестерина.

Липидный состав некоторых животных и бактериальных биологических мембран показан на рис. 41. В фотосинтезирующих тилакоидных мембранах хлоропластов основным компонентом являются гликолипиды: *диацилгалактозилглицерид* (45%), *диацилдигалактозилглицерид* (30%) и *диацилсульфоквиновозилглицерид* (8%), а небольшие количества фосфо-

липидов представлены лишь фосфатидилглицерином, содержащим необычную жирную кислоту - *транс-гексадеценовую*. Аналогичен липидный состав мембран водорослей (хотя у них не встречается *транс-гексадеценовой* кислоты) и цианобактерий. В то же время мембраны других растительных органелл содержат в основном те же липиды, что и мембраны животных клеток. Их главная особенность - низкое содержание или полное отсутствие сфингомиелина и высокий уровень полиненасыщенных жирных кислот.

Хотя основные структурные особенности биологических мембран определяются свойствами липидного бислоя, их специфические функции осуществляются главным образом белками. Типы белков и их количество в мембране отражают ее функцию: в миелиновой мембране, которая служит главным образом для изоляции нервных волокон, белки составляют менее 25% массы мембраны, а в мембранах, связанных с процессами превращения энергии (например, во внутренних мембранах митохондрий и хлоропластов), на белки приходится около 75% массы мембраны. В обычной плазматической мембране белки составляют около 50% ее массы. Поскольку размер липидной молекулы весьма мал по сравнению с размерами молекулы белка, из этого следует, что в мембране всегда содержится значительно больше молекул липидов, чем белков. Например, если белки составляют 50% массы мембраны, то на одну белковую молекулу приходится приблизительно 50 липидных молекул.

Большинство белков, называемых *трансмембранными*, пронизывают бислой насквозь (обычно одним или несколькими  $\alpha$ -спиральными участками) и контактируют с водной средой по обеим сторонам мембраны (рис. 42 и 43, 1). Другая группа белков соприкасается с водой только с одной стороны бислоя. Некоторые из них прикреплены к мембране при помощи нековалентных взаимодействий с трансмембранными белками (рис. 43, 3). Другие связываются с мембраной за счет гидрофобных последовательностей или ковалентно связанных с ними цепей жирных кислот, внедряющихся в один или другой монослой и "заякоривающих" белок в мембране (рис. 43, 2, 4). И, наконец, третьи белки из этой группы "прилипают" к мембране за счет электростатических взаимодействий (рис. 43, 5). По степени прочности связи с мембраной белки делят на *периферические* и *интегральные*. Периферические белки высвобождаются из мембраны в сравнительно мягких условиях (например, путем экстракции солевым раствором). Интегральные белки можно выделить из бислоя только с помощью *детергентов* и органических растворителей. Помимо мембрансвязанных и растворимых белков, существуют *амфитропные белки* - белки с переменной гидрофобностью, способные существовать то в свободном, то в мембрансвязанном состоянии. Специальные ферментные системы управляют гидрофобностью таких белков, ковалентно или нековалентно присоединяя к ним жирные кислоты или диглицериды, и тем самым участвуют в регуляции процессов в клетке.

Отдельные молекулы липидов способны свободно диффундировать в пределах липидного бислоя мембраны. Они очень быстро вращаются вокруг своей продольной оси и легко обмениваются местами со своими соседями в пределах одного монослоя (примерно  $10^7$  раз в 1 с). Такой обмен приводит к быстрой диффузии липидов вдоль поверхности



мембраны (*латеральная диффузия*) с коэффициентом  $D = 10^{-8}$  см<sup>2</sup>/с. Спонтанное перемещение липидов из одного слоя бислоевой мембраны в другой (*поперечная диффузия*, или *flip-flop-перескок*) тоже может происходить, но очень медленно. Любая индивидуальная молекула липида осуществляет такой перескок реже, чем один раз в две недели. Диффузия липидов зависит от температуры, жирнокислотного состава ее компонентов и характера взаимодействий молекул липидов друг с другом. Подвижность липидов при сохранении их упорядоченного расположения в мембране позволяет считать липидный бислой *двумерной жидкостью* или *жидким кристаллом*. Липиды способны образовывать *кластеры* - области, в которых плотность упаковки может существенно отличаться от соседних областей. Время жизни кластеров порядка  $10^{-6}$  -  $10^{-7}$  с, количество молекул в кластере - от нескольких десятков до сотен, а межкластерные зоны могут образовывать зоны дефектов, облегчающих проникновение в бислой небольших молекул.

Подвижность липидов обеспечивает также и подвижность мембранных белков. Способность мембранных белков передвигаться в плоскости мембраны может быть, однако, ограничена притяжением между функционально связанными белками и образованием ими кластеров, что приводит к мозаичному распределению мембранных белков в липидном бислое. Предполагают, что такие кластеры мембранных белков могут латерально диффундировать как одно целое. Этот процесс лежит, по-видимому, в основе так называемого *кэппинга*, т.е. перемещения определенных мембранных белков в специфические участки и зоны мембраны, происходящего на протяжении их жизненного цикла. Подвижность липидов, которые непосредственно примыкают к мембранным белкам, сильно уменьшается (на 2 - 3 порядка) вследствие их взаимодействия с белковой молекулой. Такие липиды называются *аннулярными*, или связанными, и могут существенно влиять на функционирование мембранных белков. Изложенные выше представления о строении биологических мембран называются *жидкостно-мозаичной моделью* мембраны (рис. 44). Основные ее положения были сформулированы в 1972 г. С. Джонотаном Сингером (J. Singer) и Гартном Николсоном (G. Nicolson).

Все биологические мембраны *асимметричны*. Это выражается в том, что их наружная и внутренняя поверхности всегда различаются по составу и ферментативной активности. Так, например, внутренний липидный слой мембраны эритроцитов человека содержит в основном фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин, а внешний - фосфатидилхолин и сфингомиелин. Асимметричное расположение липидов в мембране отчасти связано с термодинамической выгодностью их распределения по соответствию пространственной конфигурации липидов локальной кривизне монослоя, а отчасти - с функционированием липид-переносящих белков и асимметричным расположением ферментов липидного обмена. Кроме того, транспортные системы в мембранах, как правило, действуют только в одном направлении, поскольку трансмембранные белки-переносчики ориентированы в мембранах строго в одном направлении.

В мембранах имеются также углеводные компоненты, связанные с липидами (*гликолипиды*) и белками (*гликопротеины* и *протеогликаны*) (см. первую лекцию). В мембранах гликозилировано около 10% всех белков и от 5 до 26% липидов в зависимости от объекта. Углеводные цепи белков колеблются по составу от двухзвенных структур до разветвленных 18-членных олигосахаридов весьма разнообразного строения, называемых *гликанами*. Несмотря на огромное разнообразие мембран-связанных олигосахаридов, в них обычно встречаются только 8 из более чем 100 существующих в природе различных моносахаридов, а именно: глюкоза, галактоза, галактозамин, глюкозамин, сиаловая кислота, нейраминовая кислота, фукоза и манноза. Таким образом, здесь так же, как и в строении белков, нуклеиновых кислот и полисахаридов осуществляется *комбинаторный принцип обеспечения разнообразия*. В составе мембран соединительной ткани встречаются протеогликаны: углеводные компоненты в них сульфатированы. Углеводный компонент гликолипидов тоже может быть сульфатирован. В плазматических мембранах углеводные компоненты экспонированы в межклеточное пространство, тогда как на внутренней

поверхности плазматической мембраны олигосахаридных группировок практически нет. В целом в плазматической мембране содержание углеводов варьирует от 2 до 10% по весу. Слой углеводов, расположенный на поверхности большинства эукариотических клеток, называется ГЛИКОКАЛИКС. Особенно хорошо гликокаликс развит на поверхности животных клеток. Например, "пушистая" углеводная оболочка на поверхности эритроцитов (рис. 45) имеет толщину около 100 нм, что приблизительно в 10 раз превышает толщину липидного бислоя. Основной функцией гликокаликса, вероятно, является рецепторная функция и участие в процессах межклеточного узнавания. Именно различия в структуре олигосахаридных групп гликопротеина мембраны эритроцитов *гликофорина* определяют различия групп крови у людей, существенные для ее переливания. И именно из-за различия углеводных компонентов гликопротеинов гликокаликса при пересадке кожи или какого-либо другого органа (например, почек или сердца) от одного человека другому необходима идентичность тканей донора и реципиента для успешного приживания трансплантируемой ткани.

Задача 27. Сколько молекул липидов содержится в плазматической мембране сферической клетки млекопитающего объемом  $4710^{-9} \text{ см}^3$ , если одна молекула липида занимает площадь  $0.7 \text{ нм}^2$ ?

Задача 28. За какое среднее время молекула мембранного липида совершит "кругосветное путешествие" по экватору сферической клетки объемом  $4710^{-9} \text{ см}^3$ ?

Задача 29. Предположим, что белок является негидратированной, жесткой сферической частицей с плотностью  $1.35 \text{ г/см}^3$  и мол. массой 100 кДа. Чему равен коэффициент диффузии этого белка при  $37^\circ\text{C}$  в мембране, вязкость которой составляет 1 пуаз ( $1 \text{ пуаз} = 1 \text{ эрг}\cdot\text{с/см}^2$ )? Сравните полученное значение с коэффициентом латеральной диффузии липидов и с данными таблицы 5.

#### УСТАНОВЛЕНИЕ РАВНОВЕСИЯ ПО РАЗНЫЕ СТОРОНЫ МЕМБРАНЫ

Если мембрана является проницаемой для молекул растворителя и непроницаемой для молекул растворенного вещества, то она называется *полупроницаемой*. Если молекулы, неспособные пройти сквозь мембрану, находятся только по одну сторону мембраны, то стремление к выравниванию концентраций вызовет перенос молекул растворителя через мембрану, направленный на разбавление раствора этих молекул (рис. 46). Этот перенос растворителя прекратится лишь тогда, когда он будет скомпенсирован возникшим избыточным гидравлическим давлением раствора. Это давление называется ОСМОТИЧЕСКИМ ДАВЛЕНИЕМ ( $p$ ) и в *приближении идеального раствора* описывается уравнением  $p = cRT/M$ , где  $c$  - концентрация не проникающих через мембрану молекул в г/л,  $R$  - универсальная газовая постоянная ( $8.31 \text{ Дж}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ),  $T$  - абсолютная температура, а  $M$  - молекулярная масса непроникающих молекул.

Для биологических систем это уравнение показывает, что в случае накопления по одну сторону фосфолипидной мембраны относительно малых концентраций крупных молекул может возникать весьма значительная разность давлений. Например, различие концентраций белков в

$0.1 \text{ моль/л}$  по разные стороны мембраны приводит к возникновению осмотического давления  $2.5 \text{ атм}$ . Именно осмотическое давление приводит к разрыву оболочки прорастающего семени, оно также играет большую роль в процессах всасывания влаги из почвы корнями и подъеме веществ по стеблю растения. Живая клетка чувствует себя по-разному в растворах с разным осмотическим давлением (рис. 48): в растворах с пониженным осмотическим давлением (*гипотонический раствор*) клетки поглощают воду, и если они не защищены клеточной стенкой, то лопаются (*лизис*); в растворах с повышенным осмотическим давлением (*гипертонический раствор*) клетки теряют воду, содержащее

растительной клетки отстает от клеточной стенки (*плазмолиз*), а животная клетка сморщивается. Хорошо себя чувствуют клетки только в *изотоническом растворе*.

Измерения осмотического давления раствора известной концентрации непроницающего через мембрану вещества позволяют определить молекулярную массу этого вещества. Для реальных растворов может быть использовано более точное уравнение в виде вириального разложения по степеням  $c$ :  $p = RT (M^{-1}c + Bc^2 + \dots)$ , где  $B$  - второй вириальный коэффициент. Обычно для этого строят график зависимости  $p/c$  от  $c$ . В большинстве случаев такой график представляет собой прямую с наклоном, равным  $RTB$ , которая пересекает ось ординат в точке  $RT/M$ . Однако достаточно трудно осуществить точные измерения небольших значений осмотического давления, поэтому для таких измерений необходимы довольно большие количества измеряемого вещества, особенно по сравнению с другими методами.

Если макромолекулы, находящиеся по одну сторону полупроницаемой мембраны, электрически заряжены, как это обычно и бывает, то они будут влиять на распределение малых ионов по разные стороны мембраны (рис. 47). Это явление называется эффектом Доннана (Donnan

F.J., 1911). Если заряд макромолекулы  $z$ , а концентрация  $[M]$ , то уравнения электронейтральности растворов для ситуации, показанной на рис. 47, следует записать как:

$[A^+]^{(1)} = [B^-]^{(1)}$  и  $[A^+]^{(2)} + z[M] = [B^-]^{(2)}$ , где индекс в скобках показывает сторону от мембраны. И если концентрация малых ионов на стороне 1:  $[A^+]^{(1)} = [B^-]^{(1)} = [C]$ , то равновесное соотношение

$$r_D = [A^+]^{(1)}/[A^+]^{(2)} = [B^-]^{(1)}/[B^-]^{(2)} = z[M]/2[C] + 1 + (z[M]/2[C])^2{}^{1/2},$$

называемое также доннановским отношением, в общем случае будет отлично от 1. Эффект Доннана будет тем сильнее, чем больше заряд макромолекул и выше их концентрация; напротив, повышение ионной силы раствора, т.е. концентрации  $[C]$ , уменьшает этот эффект вплоть до полного устранения. Даже при отсутствии в растворе ионов солей из-за диссоциации воды в нем всегда есть ионы  $H^+$  и  $OH^-$ , и в результате присутствия заряженных макромолекул с одной стороны мембраны концентрации  $H^+$  и  $OH^-$  по разные стороны мембраны различны. Неравномерное распределение в свою очередь приводит к поляризации мембраны и появлению на ней *мембранного потенциала*  $(RT/F) \ln r_D$ , где  $R$  - универсальная газовая постоянная,  $T$  - абсолютная температура, а  $F$  - число Фарадея (96 487 Кл/моль).

Задача 30. В 1 мл воды растворено 80 мг исследуемого белка. Осмотическое давление этого раствора при 25°C оказалось равным 12 мм рт. ст. (1 атм = 760 мм рт. ст. = 101 325 Па). Какова мол. масса исследуемого белка?

Задача 31. Концентрации исходных растворов слева и справа от полупроницаемой мембраны равны соответственно  $[MgCl_2] = 0.003$  М и  $[Mg(Prot)_2] = 0.001$  М, где  $Prot^-$  - белок. Пренебрегая диссоциацией и переносом воды, рассчитайте равновесные концентрации  $Mg^{2+}$  и  $Cl^-$  по обе стороны мембраны и мембранный потенциал.

## ТРАНСПОРТ ЧЕРЕЗ БИОМЕМБРАНЫ МАЛЫХ МОЛЕКУЛ

В предыдущем разделе были описаны физико-химические основы неравномерного распределения молекул и ионов по разные стороны липидной мембраны в случае термодинамического равновесия. Однако живая клетка не довольствуется пассивным перераспределением веществ между областями, разделенными полупроницаемой мембраной, а активно влияет на это распределение, т.е. осуществляет *транспорт* веществ. Молекулы

транспортируемых веществ или ионы могут переноситься через мембрану

1) независимо от наличия и переноса других соединений - *унипорт*, 2) их перенос может осуществляться одновременно и однонаправленно с другими соединениями - *симпорт* и 3) транспорт соединений может быть обусловлен одновременным и противоположно направленным транспортом другого соединения - *антипорт* (рис. 49). Симпорт и антипорт

представляют собой виды *котранспорта*, при которых скорость суммарного процесса контролируется наличием и доступностью для систем переноса обоих партнеров транспортного процесса. Если транспорт идет самопроизвольно по градиенту концентрации и(или) электрическому градиенту, он называется *пассивным*. Напротив, перенос веществ против градиента концентрации и(или) электрического градиента, требующий затрат энергии, называется *активным* (рис. 50).

К пассивному транспорту относят *простую диффузию*, *канальный транспорт* и *облегченную диффузию* (рис. 50). Простая диффузия осуществляется, не требуя специальных механизмов. Липидная двуслойная мембрана обладает очень малой проницаемостью для ионов и большинства полярных молекул. Исключение из правила составляет вода, проникающая через такие мембраны. Экспериментально полученные коэффициенты проницаемости разных веществ варьируют в пределах от  $10^{-12}$  см/с для  $\text{Na}^+$  до  $10^{-2}$  см/с для воды. Коэффициенты проницаемости для низкомолекулярных соединений коррелируют с отношением их растворимости в неполярных растворителях к растворимости в воде. Эта зависимость дает основание думать, что низкомолекулярные соединения проходят сквозь двуслойную липидную мембрану следующим образом: сначала они теряют окружающую их гидратную оболочку, затем растворяются в углеводородном внутреннем слое мембраны, после чего диффундируют через этот внутренний слой к другой стороне мембраны, где вновь растворяются в воде. Канальный транспорт осуществляют специальные трансмембранные белки, формирующие в липидном слое сквозные проходы - *каналы*. Каналы делятся на *индифферентные*, *аллостерические* и *потенциал-зависимые*. Если индифферентные каналы открыты все время, то последние две разновидности имеют "ворота", которые открываются только при наличии молекулы-лиганда (рис. 51, А) или изменении мембранного потенциала (рис. 51, Б). Облегченная диффузия осуществляется *белками-переносчиками*, которые специфически связывают и переносят молекулы через липидный бислой. Это не требует перескакивания белка-переносчика из одного монослоя в другой или перемещения его взад-вперед через липидный бислой, он просто претерпевает обратимые изменения пространственной структуры в результате связывания-отсоединения переносимых молекул (рис. 52).

Активный транспорт бывает *первично-активным* (осуществляется непосредственно за счет использования какой-либо энергии) и *вторично-активным* (осуществляется по градиенту, созданному в процессе первично-активного транспорта). Первично-активный транспорт может приводиться в действие энергией света или химической энергией гидролиза аденозинтрифосфата (АТФ). Примером светозависимого насоса является белок *бактериородопсин* бактерии *Halobacterium halobium*. Этот трансмембранный белок с мол. массой 26 кДа (248 аминокислотных остатков) содержит в своем составе хромофор *ретиаль*. Поглощение кванта света ретиалем вызывает его *транс* в *цис* изомеризацию, что приводит к изменению конформации бактериородопсина и отщеплению иона  $\text{H}^+$  в водную фазу снаружи клетки. Депротонизация бактериородопсина опять меняет его конформацию, после чего он протонируется, но для этой цели используется  $\text{H}^+$ , поступающий изнутри бактериальной клетки. Таким образом, на каждый поглощенный фотон из бактериальной клетки "выкачивается" протон. Чаще всего встречается использование энергии АТФ для активного транспорта через мембрану. В плазматической мембране как животных, так и растительных клеток всегда имеются *натриево-калиевые насосы* ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы), которые работают по принципу антипорта, перенося 3 иона  $\text{Na}^+$  из клетки в обмен на 2 иона  $\text{K}^+$  против градиентов их концентраций (а в случае ионов  $\text{Na}^+$  и против электрического градиента). Этот обмен нужен клеткам для генерации и поддержания разности потенциалов на плазматической мембране. В любой живой клетке внутренняя поверхность плазматической мембраны заряжена отрицательно по отношению к ее наружной поверхности, и величина мембранного потенциала варьирует в пределах от -20 до -200 мВ в зависимости от организма, типа и функционального состояния клетки. Эта разность

потенциалов может в свою очередь служить как источник энергии для трансмембранных транспортных процессов, использоваться для регуляторных нужд (например, регуляции состояния канала, как показано на рис. 51), а в нервных клетках на ее основе формируется потенциал действия (*нервный импульс*).  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза помогает также регулировать объем клетки, так как она контролирует внутриклеточные концентрации растворенных веществ, а следовательно, и осмотические силы, приводящие к разбуханию или сжатию клетки. Поэтому при обработке животных клеток убаином, ингибирующим  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазу, они разбухают и разрываются. Вот почему на обеспечение работы этого насоса затрачивается более трети необходимой животной клетке энергии.

Механизм работы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы показан на рис. 53. Концевая фосфатная группа АТФ в присутствии  $\text{Na}^+$  присоединяется к остатку аспарагиновой кислоты в молекуле АТФазы.  $\text{Na}^+$ -зависимое фосфорилирование изменяет конформацию АТФазы, что приводит к выведению  $\text{Na}^+$  из клетки. Наоборот, в присутствии  $\text{K}^+$  происходит дефосфорилирование АТФазы, что вызывает перенос  $\text{K}^+$  внутрь клетки и возвращение  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -насоса в первоначальное состояние. В результате при гидролизе каждой молекулы АТФ 3 иона  $\text{Na}^+$  выкачиваются наружу и 2 иона  $\text{K}^+$  закачиваются внутрь. Одна молекула  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы может гидролизовать до 100 молекул АТФ за 1 с. Лучше всего изучена  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза плазматической мембраны животной клетки: она состоит из двух субъединиц. Большая субъединица (~100 кДа) обладает каталитической активностью и имеет участки связывания  $\text{Na}^+$  и АТФ на цитоплазматической поверхности и для  $\text{K}^+$  на наружной, а ассоциированная с ней меньшая субъединица (~45 кДа) является гликопротеином, и ее функция не известна.

Другим широко распространенным ионным насосом является  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза. Концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле эукариотических клеток поддерживается на гораздо более низком уровне ( $10^{-7}$  М) по сравнению с его концентрацией снаружи клетки ( $10^{-3}$  М) с помощью работы  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз. Поток ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , устремляющийся по столь крутому концентрационному градиенту в ответ на внешние сигналы, - важный способ передачи таких сигналов через плазматическую мембрану внутрь клетки. Больше всего данных имеется о  $\text{Ca}^{2+}$ -насосе из мембран эндоплазматического ретикулума мышечных клеток, называемого *саркоплазматическим ретикулумом*. Саркоплазматический ретикулум служит внутриклеточным хранилищем ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , которые высвобождаются в цитозоль в ответ на нервный импульс, стимулируя мышечную клетку к сокращению.  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза саркоплазматического ретикулума представляет собой белок (~110 кДа), закачивающий внутрь ретикулума 2 иона  $\text{Ca}^{2+}$  на каждую гидролизованную молекулу АТФ, чтобы убрать высвободившийся во время сокращения  $\text{Ca}^{2+}$  из цитозоля и сконцентрировать его для следующего сокращения мышечной клетки.  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза гидролизует до 10 молекул АТФ за 1 с и составляет 90% всего белка мембран саркоплазматического ретикулума. Различные виды транспорта ионов через клеточные мембраны суммированы на рис. 54.

Еще один способ активного транспорта заключается в том, что молекулы, проникшие в клетку посредством пассивного транспорта, химически модифицируются с затратой энергии, так что модифицированные молекулы уже не могут выйти обратно через тот же канал. Такой способ называется *векторным переносом групп*. Он часто встречается у бактерий при транспорте сахаров: при переносе через плазматическую мембрану сахара фосфорилируются, становятся заряженными и не могут выйти обратно, поэтому они начинают накапливаться в клетке. При этом концентрация нефосфорилированных сахаров внутри клетки остается очень низкой, и сахара продолжают поступать в клетку по градиенту концентрации. Механизм сопряженного с транспортом фосфорилирования сахаров у бактерий довольно сложен: в нем участвуют, по крайней мере, четыре разных мембранных белка, а в качестве донора фосфатной группы используется не АТФ, а фосфоенолпируват (рис. 55).

Вторично-активные транспортные системы работают как котранспортные системы. В животных клетках котранспортируемым ионом обычно является  $\text{Na}^+$ . Например, активный

транспорт некоторых сахаров и аминокислот внутрь животных клеток обуславливается градиентом  $\text{Na}^+$  через плазматическую мембрану. Всасывание глюкозы в клетки кишечника и почек достигается с помощью системы симпорта, в которой глюкоза и ионы  $\text{Na}^+$  связываются с различными участками на белке-переносчике глюкозы (рис. 56).  $\text{Na}^+$  стремится войти в клетку по своему электрохимическому градиенту и как бы "тащит" глюкозу внутрь за собой. Чем выше градиент  $\text{Na}^+$ , тем больше скорость всасывания глюкозы. И наоборот, если концентрация  $\text{Na}^+$  во внеклеточной жидкости заметно уменьшается, транспорт глюкозы останавливается. Ионы  $\text{Na}^+$ , проникающие в клетку вместе с глюкозой, выкачиваются обратно  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазой, которая, поддерживая градиент концентрации  $\text{Na}^+$ , косвенным путем контролирует транспорт глюкозы. В плазматических мембранах многих животных клеток существует, по крайней мере, 5 различных белков переносчиков аминокислот, которые действуют как системы симпорта, перенося одновременно ионы  $\text{Na}^+$ , причем каждый из этих белков специфичен для группы родственных аминокислот. У бактерий большинство систем активного транспорта, приводящихся в действие ионными градиентами, использует в качестве котранспортируемого иона  $\text{H}^+$ , а не  $\text{Na}^+$ . В частности, активный транспорт большей части сахаров и аминокислот в бактериальные клетки обусловлен градиентом  $\text{H}^+$  через плазматическую мембрану. Наиболее хорошо изученный пример такого рода - это трансмембранный белок-переносчик лактозы (*пермеаза*, или *M-белок*), состоящий из одной полипептидной цепи (30 кДа) и осуществляющий  $\text{H}^+$ -зависимый симпорт: с каждой транспортируемой в клетку молекулой лактозы переносится один протон.

#### ТРАНСПОРТ ЧЕРЕЗ БИОМЕМБРАНЫ МАКРОМОЛЕКУЛ

Транспортные белки мембран осуществляют перенос многих полярных молекул небольшого размера, но они не способны транспортировать макромолекулы, например, белки, полинуклеотиды или полисахариды. Перенос таких макромолекул происходит за счет слияния или отщепления окруженных мембраной пузырьков, содержащих транспортируемые вещества. Процесс слияния пузырьков с плазматической мембраной, в результате которого содержимое пузырька оказывается снаружи от клетки, называется ЭКЗОЦИТОЗ (рис. 57). Пузырьки, содержащие транспортируемые макромолекулы, могут также отщепляться от плазматической мембраны. Если при этом транспорт направлен внутрь клетки, то такой процесс называется ЭНДОЦИТОЗ, а если - из клетки, то - ОТПОЧКОВЫВАНИЕ (рис. 57). Различают два вида эндоцитоза - ПИНОЦИТОЗ (поглощение жидкости и (или) растворенных веществ с помощью небольших пузырьков) и ФАГОЦИТОЗ (поглощение больших частиц, таких, как микроорганизмы или обломки клеток).

Хотя большинство макромолекул транспортируется через клеточные мембраны посредством эндоцитоза и экзоцитоза, встречаются особые случаи, когда большие молекулы проходят прямо через клеточные мембраны. У бактерий специальные каналы дают возможность молекулам ДНК проходить через клеточную мембрану и таким образом обеспечивают генетический обмен. Например, в процессе *генетической трансформации* геном некоторых типов бактерий может быть изменен, если эти бактерии поместить в среду, содержащую очищенную ДНК. Транспорт ДНК в бактериальную клетку требует затраты энергии и осуществляется очень быстро: при конъюгации и генетической трансформации импорт ДНК происходит со скоростью 600 и 55 нуклеотидных остатков в 1 с соответственно.

Другой случай - транспорт белков в митохондрии и пластиды. Большинство белков митохондрий и хлоропластов кодируется ядерными генами, эти белки синтезируются в цитозоле, а затем переносятся через мембраны соответствующей органеллы с помощью специального энергетически зависимого механизма. Такие белки имеют на N-конце последовательность аминокислот, которая называется *лидерная последовательность*, или *сигнальный полипептид*, которая

может иметь мол. массу от 0.5 до 10 кДа. В мембранах органелл содержатся специфические рецепторы, узнающие "сигнал" и функционально связанные с энергозависимым насосом, который "перекачивает" узнанный белок сквозь мембрану и при этом, возможно, осуществляет его кратковременное разворачивание (рис. 58). Предполагают, что такой транспорт осуществляется в зонах слипания между наружной и внутренней мембранами этих органелл. Очевидно, что в белках должно существовать много различных типов сигнальных последовательностей, направляющих белки по разным внутриклеточным "адресам". Достигнув места назначения, такой белок становится объектом действия *лидер-пептидазы*, протеолитического фермента, который специфически узнает и отщепляет сигнальную последовательность. Лишившись лидерного полипептида, белок становится "зрелым" и не может уже пройти через мембрану обратно.

#### КРАТКИЕ ВЫВОДЫ

Биологические мембраны - это универсальные структуры, устроенные одинаково у всех живых организмов. Однако несмотря на структурное однообразие, наблюдается функциональное разнообразие мембран. В биологических мембранах мы опять встречаемся с *комбинаторным принципом обеспечения разнообразия*, когда в результате сочетания разных липидных молекул из ограниченного набора конструируются бислои с широким (и легко регулируемым) спектром физических и химических свойств. Модификация этого бислоя белками, которые способны осуществлять специфические биологические функции, увеличивает разнообразие мембран, делая его преимущественно функциональным разнообразием.

Биологические мембраны могут служить одним из примеров структур, способных к *самосборке*. Образование липидных бислоев может осуществляться путем самосборки, поскольку способность к образованию бислоя заложена в самой структуре липидных молекул. Ассоциация белков с мембраной тоже может осуществляться самопроизвольно за счет гидрофобных и в меньшей мере электростатических взаимодействий белковой молекулы с липидным бислоем. Это позволяет реконструировать *in vitro* функционирующие мембранные системы из очищенных компонентов. Однако обеспечение асимметрии, т.е. *векторных свойств* мембран, осуществляется в клетке специальными системами.

Рис. 39. Фосфолипидные структуры, самопроизвольно возникающие в водных растворах: А - мицелла; Б - монослой; В - бислой; Г - липосома.

Рис. 40. Распространенные гликолипиды и стероиды биологических мембран: А - цереброзид; Б - холестерин; В - упаковка молекулы холестерина между двумя молекулами фосфолипидов: а - наименее упорядоченная область бислоя, б - область, упорядочиваемая холестерином, в - область полярных голов.

Рис. 41. Липидный состав некоторых животных и бактериальных клеточных мембран. А - кишечная палочка (*Escherichia coli*); Б - мембраны митохондрии сердца быка; В - плазматическая мембрана эритроцита человека; Г - миелин человека (плазматическая мембрана особых клеток нервной ткани). 1 - фосфатидная кислота; 2 - фосфатидилхолин; 3 - фосфатидилэтанолламин; 4 - фосфатидилглицерин; 5 - фосфатидилинозит; 6 - фосфатидилсерин; 7 - кардиолипин; 8 - сфингомиелин; 9 - гликолипиды; 10 - холестерин.

% различных липидов от их общего количества

Рис. 42. Схема, показывающая связь двух интегральных белков с липидным бислоем.

Рис. 43. Различные способы связывания белков с липидным бислоем.

Рис. 44. Схематическое трехмерное изображение небольшого участка клеточной мембраны площадью около  $10 \text{ нм}^2$ .

Рис. 45. Схематическое изображение гликокаликса.

Рис. 46. Схема возникновения осмотического давления р.

Рис. 47. Эффект Доннана. Ионы  $A^+$  и  $B^-$  распределены по разные стороны мембраны неравномерно.

Рис. 48. Влияние осмотического давления на растительную (слева) и животную (справа) клетку.

молекула воды      молекула, непроникающая через мембрану клетки  
плазмолиз лизис

А. ГИПОТОНИЧЕСКИЙ РАСТВОР. Молекулы воды поступают в клетку.

Б. ГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ РАСТВОР. Молекулы воды выходят из клетки.

В. ИЗОТОНИЧЕСКИЙ РАСТВОР. Молекулы воды с равной скоростью диффундируют в клетку и из клетки.

Рис. 49. Классификация способов транспорта через мембрану.

Рис. 50. Пассивный и активный транспорт через мембрану.

Рис. 51. Аллостерический (А) и потенциал-зависимый (Б) каналы.

Рис. 52. Схема, показывающая как конформационные изменения в белке-переносчике могут обеспечить облегченную диффузию незаряженного растворенного вещества.

Рис. 53. Модель функционирования  $Na^+, K^+$ -АТФазы.

Рис. 54. Виды транспорта ионов через клеточные мембраны: 1 -  $Na^+/Li^+$ -обмен; 2 - ( $Na^+ + K^+ + Cl^-$ )-симпорт; 3 - выход калия через  $K^+$ -каналы; 4 -  $Na^+, K^+$ -АТФаза; 5 - вход натрия через  $Na^+$ -каналы; 6 -  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмен; 7 -  $Ca^{2+}$ -насос плазматических мембран; 8 -  $HCO_3^-$  ( $NaCO_3^-$ )/ $Cl^-$ -антипорт; 9 - транспорт кальция в митохондрии; 10 -  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмен через митохондриальную мембрану; 11 -  $Ca^{2+}/H^+$ -обмен через митохондриальную мембрану; 12 -  $Ca^{2+}$ -насос саркоплазматического ретикулума; 13 -  $Ca^{2+}$ -каналы саркоплазматического ретикулума; 14 - плазматическая мембрана; 15 - митохондриальная мембрана; 16 - мембрана саркоплазматического ретикулума.

Рис. 55. Схема активного транспорта сахаров внутрь бактериальных клеток за счет векторного переноса групп.

Рис. 56. Схема вторично-активного симпорта глюкозы.

Рис. 57. Схема слипания и объединения бислоев в трех процессах, приводящих к слиянию мембран - экзоцитозе, эндоцитозе и отпочковывании.

Рис. 58. Схема работы энергозависимого белкового "насоса".



*Цитоскелет - движение эукариотических клеток - молекулярные механизмы движения - вакуолярная система клетки - функционирование вакуолярной системы - поверхностный аппарат клетки - краткие выводы*

Отдельные элементы и органеллы клетки функционально связаны друг с другом и совместно функционируя образуют *цитоскелет, поверхностный аппарат, вакуолярную систему и ядерный аппарат.*

### ЦИТОСКЕЛЕТ

Разные клетки эукариот обладают различной характерной формой, способны изменять свою форму и расположение своих органелл и во многих случаях могут передвигаться с места на место. Всеми этими способностями эукариотические клетки обязаны развитой сети белковых нитей (*филаментов*), образующих в цитоплазме своего рода опорно-двигательную систему, называемую цитоскелетом. Цитоскелет состоит из трех типов белковых нитей - актиновых филаментов, или микронитей, микротрубочек и промежуточных филаментов, - а также множества разнообразных вспомогательных белков.

Актиновые филаменты состоят из двух цепей глобулярных молекул *актина*, полипептида с молекулярной массой около 42 кДа и диаметром около 4 нм. Эти цепи образуют двойную спираль, на каждый виток которой приходится 13.5 молекулы актина (рис. 59). Микротрубочки состоят из *α*- и *β*-*тубулина* - глобулярных полипептидов с мол. массой 50 кДа. При формировании микротрубочки *α*- и *β*-тубулина образуют гетеродимеры, которые соединяются друг с другом в *протофиламенты* - нитевидные комплексы, в которых *β*-тубулин одного димера связан с *α*-тубулином следующего. Обычно 13 таких протофиламентов, расположенных параллельно и примыкающих друг к другу, образуют цилиндрическую структуру - собственно микротрубочку (рис. 60). Тубулиновые гетеродимеры в соседних протофиламентах несколько смещены относительно друг друга, так что в стенке цилиндра они образуют спираль.

Актиновые филаменты и микротрубочки являются динамическими структурами: они постоянно быстро формируются из пула растворимых субъединиц для выполнения какой-либо функции и быстро распадаются, когда функция выполнена. Поэтому в клетке постоянно существует динамическое равновесие между актиновыми филаментами и пулом мономерного актина и между микротрубочками и пулом мономерного тубулина. Сборка актиновых филаментов и микротрубочек происходит самопроизвольно, и ее легко можно наблюдать *in vitro*. Еще одной общей осо-

бенностью актиновых филаментов и микротрубочек является их структурная полярность, связанная с тем, что асимметричные мономеры располагаются в одинаковой ориентации. Эта полярность проявляется в том, что два противоположных конца наращиваются и разрушаются с разной скоростью: например, один определенный конец наращивается в несколько раз быстрее другого. Такая структурная полярность необходима для упорядоченного движения. Специальные *кэпирующие белки* могут избирательно связываться с тем или другим концом актиновых филаментов или микротрубочек и играют ключевую роль в создании определенной пространственной структуры цитоскелета - обеспечивают прикрепление филаментов и микротрубочек к другим клеточным структурам в нужной ориентации, а также независимую регуляцию наращивания или распада с того или другого конца.

Диаметр промежуточных филаментов составляет от 8 до 10 нм, т.е. по толщине они занимают промежуточное положение между актиновыми филаментами (8 нм) и микротрубочками (28 нм), с чем и связано их название. В отличие от актиновых нитей и микротрубочек, промежуточные филаменты - очень стабильные и труднорастворимые компоненты клетки. Вероятно, это связано с тем, что построены они не из глобулярных, а фибриллярных субъединиц, которые объединены в структуру типа каната, сходную с молекулой коллагена. Существует много различных типов промежуточных филаментов, для каждого из которых характерен определенный набор белковых субъединиц. Как

правило, клетки каждого типа содержат лишь какой-то один тип промежуточных филаментов. В нейронах образуются *нейрофиламенты*, в клетках эпителия - *кератиновые филаменты*, построенные из различных кератинов. Большинство других клеток содержит промежуточные филаменты, состоящие из белка *виментина* (55 кДа), который может сополимеризоваться с другими специфичными для данного типа клеток субъединицами. Регуляция количества и длины промежуточных филаментов в клетке осуществляется с помощью специальных протеолитических ферментов, способных избирательно расщеплять промежуточные филаменты того или иного типа.

Как и промежуточные филаменты, актиновые филаменты могут образовывать и поддерживать стабильные структурные элементы клеток. Яркими примерами являются *микроворсинки* клеток кишечного эпителия, необходимые для увеличения площади активной всасывающей поверхности этих клеток, и выросты поверхности (*стереоцилии*) волосковых клеток

улитки среднего уха, участвующие в рецепции звука. В обоих случаях структурным каркасом служат жесткие пучки поперечно-сшитых актиновых филаментов (рис. 61). В то же время очень многим эукариотическим клеткам свойственно образовывать временные поверхностные выпячивания, которые способны быстро вытягиваться и втягиваться, вероятно, за счет локальной полимеризации и распада актиновых филаментов. Более того, актиновый каркас цитоплазмы может быстро менять свою структуру и вязкость под действием различных сшивающих белков и изменения концентрации ионов  $Ca^{2+}$ . Например, белок *фимбрин* прочно связывает параллельные актиновые филаменты в плотные пучки; *а-актинин* и *филамин* формируют гибкие сшивки - узлы неупорядоченной трехмерной актиновой сети, создавая гелеобразное состояние цитозоля; повышение концентрации  $Ca^{2+}$  активирует актин-фрагментирующие белки, "разрезающие" актиновые филаменты, и, как следствие, понижает вязкость цитоплазмы (рис. 62).

У большинства микротрубочек один конец закреплен: они прикрепляются к особому образованию, лежащему около ядра и называемому *клеточным центром*. Почти во всех животных клетках в середине клеточного центра находится *пара центриолей*. В клетках растений центриоли отсутствуют. Структура центриоли показана на рис. 63. Это цилиндр длиной около 0.3 мкм и диаметром 0.1 мкм. Как правило, в клетке присутствуют две центриоли, располагающиеся рядом под прямым углом друг к другу. Перед делением клетки центриоли расходятся и рядом с каждой из них возникает дочерняя центриоль. Во время деления клетки каждая материнская центриоль вместе со своей дочерней центриолью расходятся к противоположным полюсам клетки и становятся центрами образования микротрубочек веретена деления. После деления микротрубочки веретена деления распадаются, а от материнской центриоли "отрастают" микротрубочки цитоскелета (рис. 64). Предполагают, что центриоли выполняют роль организаторов самосборки микротрубочек. Однако, очевидно, что эта их функция не уникальна, поскольку в клетках растений микротрубочки цитоскелета и веретена деления образуются несмотря на полное отсутствие центриолей.

Очевидно, что различные части цитоскелета - актиновые филаменты, микротрубочки и промежуточные филаменты - взаимосвязаны и их функции скоординированы. Общими организаторами цитоскелета, вероятно, служат микротрубочки. Они определяют структурную полярность клетки и характер расположения остальных филаментов. В свою очередь

построение большинства микротрубочек организуется клеточным центром, который, таким образом, можно рассматривать как "командный пункт" клетки. Самым удивительным оказалось то, что информация о структуре цитоскелета материнской клетки может передаваться непосредственно цитоскелету дочерних клеток и не зависит от клеточного ядра (см. литературу к данной лекции).

Задача 32. Подсчитайте число молекул тубулина в микротрубочке длиной 5 мкм.

## ДВИЖЕНИЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Многие эукариотические клетки могут двигаться с помощью *ресничек* или *жгутиков* или могут совершать *амебоидные* движения. Кроме того, клетки способны активно перемещать органеллы цитоплазмы. Реснички и жгутики эукариот за редким исключением устроены одинаково у всех организмов, начиная от простейших и кончая человеком. Реснички отличаются от жгутиков длиной: длина реснички обычно составляет около 10 мкм, тогда как длина жгутиков может достигать 200 мкм и более. И реснички, и жгутики имеют примерно одинаковый диаметр около 0.25 мкм. Реснички совершают движения, называемые *биения*, и работают подобно маленькому хлысту (рис. 65). Обычно на поверхности клетки (например, инфузории или клеток дыхательных путей) находится много ресничек, циклы соседних ресничек немного сдвинуты во времени, так что на поверхности клетки возникают однонаправленные бегущие волны. Характер движения жгутиков спермиев или многих простейших иной - по ним пробегают квазисинусоидальные волны. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе движения ресничек и жгутиков, одинаковы.

Общее строение реснички (или эукариотического жгутика) показано на рис. 66. Она представляет собой вырост плазматической мембраны, внутри которого находится сложная осевая структура из микротрубочек - *аксонема*. Нижняя часть аксонемы прикреплена к расположенному под ресничкой в цитоплазме *базальному тельцу*, которое по своей структуре совершенно сходно с центриолью. Часто в основании реснички лежит пара базальных телец, располагающихся под прямым углом друг к другу, подобно паре центриолей. Аксонема состоит из девяти дублетов тубулиновых микротрубочек (совершенно таких же, как микротрубочки цитоскелета), образующих внешнюю стенку цилиндра, и пары центральных микротрубочек. В целом систему микротрубочек реснички и жгутика описывают как  $(9 \times 2) + 2$ , в отличие от  $(9 \times 3) + 0$  системы центриолей. В дублетах микротрубочек аксонемы различают А-микротрубочку, состоящую из 13 протофиламентов, и В-микротрубочку, неполную, содержащую 11 протофиламентов. А-микротрубочка несет на себе короткие боковые выступы ("ручки"), направленные к В-микротрубочку соседнего дублета и состоящие из белка *динеина*. Структура аксонемы стабилизирована опорным цилиндром вокруг пары центральных микротрубочек и радиальными "спицами". Центральный цилиндр и "спицы" образованы фибриллярным белком *нексином*. Базальное тельце и аксонема структурно связаны друг с другом: А- и В-микротрубочки аксонемы продолжают в соответствующих микротрубочках базального тельца. Одна из центральных микротрубочек обычно короче другой и заканчивается свободно в цитозоле не доходя до базального аппарата крепления; вторая центральная трубочка завершается в особой шаровидной структуре, расположенной в центре базального аппарата крепления.

Центриоли и базальные тельца представляют собой, вероятно, одну и ту же клеточную органеллу. Об этом свидетельствует их функциональная взаимозаменяемость в клетке. Например, перед началом образования ресничек одна или несколько предварительно удвоившихся центриолей смещаются к поверхности клетки, где становятся базальными тельцами. От таких базальных телец начинается сборка микротрубочек и рост ресничек (рис. 67, б). Часто рост ресничек начинается от одной из центриолей в глубине клетки. При этом около растущего конца микротрубочек появляется вакуоль, в которую как бы врастает образующаяся ресничка. Мембрана этой вакуоли образует наружную мембрану реснички, которая после выхода реснички на поверхность становится частью плазматической мембраны (рис. 67, а). В то же время после инъекций очищенных базальных телец ресничек инфузорий в яйцеклетку лягушки в цитоплазме формировалось веретено деления. Это показывает, что базальные тельца могут выполнять функцию центриолей в клетке, готовящейся к делению.

Амебоидное движение клеток происходит за счет сокращения пучков актиновых филаментов при участии белка *миозина*. Передний конец ползущей клетки сначала вытягивается и закрепляется на поверхности, по которой ползет клетка. Затем

закрепленный передний конец должен подтянуть к себе всю клетку. Это подтягивание осуществляют заякоренные в особых участках плазматической мембраны организованные пучки актиновых филаментов, ассоциированные с миозином и называемые *напряженными нитями* (stress-fibers). Тянущая роль напряженных нитей отчетливо продемонстрирована в экспериментах по перерезке их лазерным лучом. Кроме того, ползущая клетка образует множество волосовидных выростов, называемых *микрошипами*, толщиной около 0.1 мкм и длиной 5 - 10 мкм. Микрошипы быстро стягиваются обратно или перемещаются назад по верхней стороне клетки, перенося в том же направлении различные частицы, прилипшие к ним (рис. 68, А). Вероятно, они образуются за счет быстрой поляризации и разрушения актиновых филаментов и служат чувствительными (*сенсорными*) приспособлениями, с помощью которых клетка исследует свое окружение. Ползущая клетка продвигается вперед со средней скоростью около 40 мкм/ч.

Органеллы, ограниченные мембраной, такие, как митохондрии или лизосомы, нередко самостоятельно перемещаются в цитоплазме весьма характерным образом. Их скачкообразное движение происходит как бы по прямым, но невидимым дорожкам и сопровождается внезапными остановками, часто с последующим возвратом по прежней траектории, а иногда с резким изменением направления. На электронных фотографиях иногда можно различить тонкие нити, тянущиеся от этих органелл к близлежащим элементам цитоскелета. Вероятно, движения органелл, так же, как и циклоз в растительных клетках, вызывается сокращением актин-миозиновых пучков волокон. По-видимому, не только нерастворимые компоненты клетки, такие, как белковые нити, тесно связаны друг с другом в единую систему, но с ними ассоциированы и многие компоненты цитозоля, которые раньше считали растворимыми и свободно диффундирующими элементами.

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДВИЖЕНИЯ

Все разнообразные движения в клетке осуществляются благодаря *тубулин-динеиновой* и *актин-миозиновой* системам движения. В основе обоих этих механизмов движения лежит общий принцип упорядоченных циклических переходов между различными пространственными структурами (*конформациями*) белка. Лучше всего пояснить этот принцип можно с помощью модели фантастического "шагающего" белка. Предположим, что белку надо "пройти" вдоль тонкой нити, например, вдоль микротрубочки. Принимая различные конформации, белок мог бы выполнить эту задачу. Однако если ничто не упорядочивает конформационные изменения, то белок будет перемещаться случайно и в среднем останется на том же месте (рис. 69, А). Поскольку при направленном движении белка

совершается работа, то по законам термодинамики на направленное движение должна быть затрачена какая-либо энергия (в противном случае это движение можно было бы использовать для создания вечного двигателя). Можно создать направленную последовательность изменений конформации белка, если снабдить его источником энергии и сделать какой-либо из конформационных переходов необратимым. Реально в клетках для этой цели используется энергия гидролиза молекулы АТФ (рис. 69, Б).

Изгибание ресничек и жгутиков вызывается взаимным скольжением микротрубочек относительно друг друга (рис. 70). За скольжение ответствен динеин, представляющий собой АТФазу, преобразующую химическую энергию АТФ в механическую энергию конформационных изменений, так же, как это делал описанный выше "шагающий" белок. Сила прикладывается к соседнему дублету микротрубочек, с которым контактируют динеиновые "ручки", и стремится сдвинуть его по направлению к кончику реснички. Вспомогательные белки, такие, как нексин, связывают дублеты микротрубочек в единый пучок и ограничивают свободу их скольжения, вызывая изгибание ресничек и жгутиков. Если бы все динеиновые "ручки" проявили активность одновременно, аксонема попросту

закрутилась бы в тугую спираль. Для того чтобы возник локальный распространяющийся изгиб, необходимы специальные регуляторные механизмы. Вероятно, какие-то вспомогательные белки, действуя совместно с центральной парой микротрубочек, управляют скольжением периферических дублетов микротрубочек, обеспечивая циклический характер движения ресничек.

Еще один механизм движения - это скольжение актиновых филаментов под действием миозина, лежащее в основе амебоидного движения клеток и активного перемещения внутриклеточных органелл. Молекулы миозина имеют мол. массу около 500 кДа и на электронных фотографиях выглядят как длинные палочковидные структуры с двумя глобулярными головками (рис. 71). Каждая молекула состоит из двух одинаковых тяжелых цепей (200 кДа) и двух пар легких цепей (16 и 20 кДа). В молекуле есть гибкие шарнирные участки, которые позволяют головкам свободно двигаться (рис. 72). Молекулы миозина легко ассоциируют друг с другом при помощи своих палочковидных "хвостов". Так же, как и динеин, миозин является АТФазой и тоже преобразует химическую энергию АТФ в механическую энергию конформационных изменений. Механизм движения за счет актин-миозиновой системы показан на рис. 73:

при совершении работы миозиновая головка изменяет свою конформацию, и в результате этот молекулярный рычаг развивает тянущее усилие по отношению к актиновому филаменту. Такой же механизм лежит в основе сокращения мышечных клеток.

#### ВАКУОЛЯРНАЯ СИСТЕМА КЛЕТКИ

Внутренние мембраны клетки, несмотря на различия в морфологическом и функциональном отношении, представляют собой единое целое, поскольку способны переходить друг в друга в процессе функционирования клетки как будет показано ниже. К вакуолярной системе относятся **МЕМБРАНЫ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА, АППАРАТА ГОЛЬДЖИ, МИКРОТЕЛЬЦА, ЛИЗОСОМЫ** и **ВАКУОЛИ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ**.

Мембраны эндоплазматического ретикулума являются крайне сложным и разветвленным продолжением внешней мембраны двухмембранной ядерной оболочки (рис. 74). Мембраны эндоплазматического ретикулума (ЭПР) в типичном случае составляют более половины от общей площади клеточных мембран (таблица 8). Хотя мембрана ЭПР имеет многочисленные складки и изгибы, она образует одну непрерывную поверхность, ограничивающую единый замкнутый мешок, внутреннее пространство которого занимает более 10% общего объема клетки (таблица 7). На электронных микрофотографиях легко различаются две функционально различающиеся области ЭПР: *гранулярный (шероховатый) ЭПР*, усеянный рибосомами, расположенными на обращенной к цитоплазме поверхности мембраны, и *гладкий (агранулярный) ЭПР* (рис. 32). Рибосомы удерживаются на мембранах гранулярного ЭПР благодаря двум трансмембранным гликопротеинам, называемым *рибофоринами*, которые специфически связывают большую субъединицу рибосом и которые отсутствуют в гладком ЭПР. Количество связанных на мембранах рибосом и, следовательно, соотношение гладкого и гранулярного ЭПР может существенно варьировать в клетках (таблица 8).

Аппарат Гольджи состоит из многочисленных групп плоских мембранных мешков (*цистерн*), собранных в структуры, напоминающие стопки тарелок и называемые *диктиосомами* (рис. 75). Одна диктиосома в среднем содержит 5 - 10 цистерн, хотя у низших эукариот их число может быть больше 30. Число диктиосом на клетку сильно варьирует в зависимости от типа клетки - от одной до нескольких сотен. В некоторых специализированных клетках аппарат Гольджи может даже занимать значительную часть объема, хотя в типичном случае его доля невелика (таблицы 7 и 8). Каждая отдельная цистерна диктиосомы имеет переменную толщину: в центре ее мембраны сближены так, что остается

просвет в 25 нм, а на периферии имеет расширения (*ампулы*), ширина которых непостоянна. От ампул отшнуровываются многочисленные мелкие (диаметром около 50 нм) и крупные (диаметром около 1 мкм) пузырьки (рис. 75).

Лизосомы и микротельца представляют собой пузырьки, содержимое которых отделено от цитозоля бислойной липидной мембраной. Диаметр

Таблица 8 Доля различных

клеточных мембран в % от их общей площади поверхности в клетке

Тип мембраны	Гепатоцит печени	Секреторная клетка поджелудочной железы
Плазматическая мембрана	2	5 60
Мембрана гранулярного ЭПР	35	<1 10
Мембрана гладкого ЭПР	16	4 17
Мембрана аппарата Гольджи	7	0.7
Наружная мембрана митохондрий	7	3
Внутренняя мембрана митохондрий	32	-
Внутренняя мембрана ядра	0.2	-
Мембрана секреторных пузырьков	-	-
Мембрана лизосом	0.4	-
Мембрана пероксисом	0.4	-

Эти две клетки сильно различаются по величине: гепатоцит имеет объем около 5000 мкм<sup>3</sup>, а секреторная клетка поджелудочной железы - 1000 мкм<sup>3</sup>; соответственно общие площади их клеточных мембран оцениваются как 110 тыс. и 13 тыс. мкм<sup>2</sup>.

лизосом колеблется от 0.2 до 0.4 мкм, а микротелец - от 0.3 до 1.5 мкм. Число на клетку и тех, и других составляет по несколько десятков. Содержимое лизосом и микротелец весьма разнородно - от гомогенного бесструктурного содержимого до плотного гранулярного материала. Лизосомы и микротельца различают обычно не по морфологическим, а по их биохимическим свойствам.

Растительные клетки, в отличие от животных клеток, содержат

еще одну или несколько вакуолей, содержимое которых, называемое *клеточным соком*, отделено от цитозоля одиночной мембраной - *тонопластом*. Как правило, вакуоли занимают больше 50% всего объема клетки, однако эта величина непостоянна: в зависимости от стадии развития и типа клетки она может составлять от 5 до 95%. Вакуоли в растительной клетке выполняют разнообразные функции, из которых наиболее важными являются поддержание *тургорного* давления в клетке, запасающая и утилизирующая функции. Запасающая и утилизирующая функции означают, что в вакуолях могут накапливаться как запасные вещества (моно- и полисахариды, белки), так и отходы клеточного метаболизма (например, полифенолы), которые таким образом изолируются. В то же время концентрирование веществ внутри вакуоли и полупроницаемые свойства тонопласта способствуют тому, что вакуоль функционирует в качестве осмометра, и придает растительной клетке необходимую прочность и *тургисцентность* (осмотическую напряженность). Ряд веществ, накапливающихся в вакуолях, имеет специальные функции. Например, в вакуолях могут накапливаться пигменты, придающие яркий цвет растению. Окраска лепестков фиалки, герани или примулы вызывается пигментами *антоцианами*, накопившимися в клеточном соке вакуолей их клеток. Другие вещества вакуолей выполняют защитные функции. Некоторые растения синтезируют ядовитые или горькие вещества (*алкалоиды*) и накапливают их в вакуолях. Алкалоиды высвобождаются из ва-

куолей при повреждении клеток, и таким образом растение может защищаться от поедания животными.

ЭПР, аппарат Гольджи, вакуоли, лизосомы и микротельца представляют собой единую вакуолярную систему, поскольку их мембраны, как будет рассказано в следующем разделе, постоянно переходят друг в друга в процессе функционирования этой системы, а компоненты мембран непрерывно совершают круговорот в клетке.

### ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ВАКУОЛЯРНОЙ СИСТЕМЫ

Наличие рибосом на мембранах гранулярного ЭПР однозначно показывает, что это место синтеза белков. Однако в большинстве случаев на рибосомах гранулярного ЭПР синтезируются белки, не участвующие ни в каких процессах внутри данной клетки, "ненужные" ей, а иногда даже вредные для клетки. Например, на рибосомах гранулярного ЭПР клеток молочной железы в большом количестве синтезируется казеин молока, который совсем не нужен клеткам молочной железы, а на рибосомах гранулярного ЭПР клеток пищеварительных желез синтезируются расщепляющие макромолекулы ферменты, попадание которых в цитозоль неминуемо должно привести к самоперевариванию клетки и ее гибели. Однако этого не происходит, потому что синтезируемые белки переносятся через мембрану ЭПР в его полость и тем самым сразу же изолируются от цитозоля и цитоплазматических структур. Таким образом, роль гранулярного ЭПР заключается не просто в синтезе белков на рибосомах его мембран, но и в изоляции этих белков от остальных функционирующих белков клетки.

Белки, синтезируемые на рибосомах мембран ЭПР, проходят через мембрану ЭПР еще в процессе своего синтеза, т.е. одновременно с трансляцией - *ко-трансляционно* (рис. 76). Рибосомы, связанные с мембраной ЭПР, ничем не отличаются от свободных цитоплазматических рибосом. Синтез выводимых (*секреторных*) белков начинается еще в цитоплазме, но растущая полипептидная цепь такого белка является особой *лидерной последовательностью*, или *сигнальным пептидом*, потому что служит "сигналом", направляющим рибосому к гранулярным областям ЭПР, так же, как другие сигнальные последовательности направляют хлоропластные и митохондриальные белки в соответствующие органеллы. Специальный белок, содержащийся в цитозоле, узнает этот сигнал, связывается с рибосомой и останавливает трансляцию до тех пор, пока эта рибосома не подойдет к мембране гранулярного ЭПР и сигнальный пептид не свяжется со специальным мембранным белком-*рецептором*. После того как рибосома дополнительно закрепится на мембране с помощью рибофоринов, трансляция продолжается, но растущий белок теперь "проталкивается" через мембрану. После окончания трансляции сигнальный пептид секреторного белка отрезается специальным ферментом лидер-пептидазой и белок уже не может покинуть полость ЭПР. Таким образом осуществляется *направленное выведение* (vectorial discharge) белков. Однако на рибосомах гранулярного ЭПР синтезируются не только выводимые, секреторные белки, но и мембранные белки и белки цитозоля (рис. 77). Например, клетки человека линии HeLa в культуре ткани синтезируют всего лишь 2% белка от общего их содержания, тогда как с мембраной ЭПР связано 15% всех рибосом.

Большинство белков, синтезированных на мембранах гранулярного ЭПР, представляют собой гликопротеины, тогда как растворимые белки цитозоля не гликозилированы. *Гликозилирование* - это еще одна из основных биосинтетических функций ЭПР. Это гликозилирование оказывает влияние на дальнейшую судьбу белков. Чаще всего к белкам, находящимся в полости гранулярного ЭПР, присоединяется олигосахарид только одного типа (состоящий из N-ацетилглюкозамина, маннозы и глюкозы), который присоединяется к аминокгруппе боковой цепи остатка аспарагина. Присоединение олигосахарида осуществляется специальным

мембранно-связанным ферментом при участии активированного фосфорилированием липида *долихола* (рис. 78).

Гликопротеины, переносимые из гранулярного ЭПР в другие места, "упаковываются" в мелкие *транспортные пузырьки*, которые отщепляются от промежуточной части ЭПР (рис. 79). Стенка этих пузырьков состоит из липидов и белков мембраны ЭПР, а сами пузырьки содержат растворимые гликопротеины, захваченные из полости ЭПР. Большинство из этих пузырьков сливается, образуя плоские цистерны на ближней к ядру стороне аппарата Гольджи так называемой *формирующейся*, или *цис*-стороной. В аппарате Гольджи происходит дальнейшее "созревание" гликозилированных белков, синтезированных в гранулярном ЭПР и перешедших таким образом в аппарат Гольджи. "Созревание" белков включает различные ковалентные модификации, в результате которых белки приобретают свою функционально-активную структуру. Кроме того, очень сильно модифицируются связанные с остатком аспарагина олигосахариды, присоединившиеся ранее к белкам в ЭПР: некоторые остатки сахаров избирательно отщепляются, а некоторые новые добавляются. *Процессинг* олигосахаридов осуществляется с помощью нескольких различных чрезвычайно сложных и точно "запрограммированных" ферментных механизмов. Выбор "программы" модификации определяется каким-то пока неизвестным свойством каждой индивидуальной полипептидной цепи. Ферменты, осуществляющие модификацию белков, как и сами модифицирующиеся белки, тоже, вероятно, попадают в аппарат Гольджи из ЭПР. Предполагают, что после процессинга присоединенный к белку олигосахарид становится "адресом", по которому должен быть доставлен данный белок. "Созревшие" белки снова "упаковываются" в транспортные пузырьки, но уже на *зрелой*, или *транс*-стороне. Каким образом белки перемещаются через аппарат Гольджи из цистерны в цистерну вдоль каждой стопки, неизвестно.

Большинство транспортных пузырьков представляют особый класс внутриклеточных пузырьков, которые на микрофотографиях выглядят окруженными со стороны цитоплазмы щетинообразной каймой и потому называются *окаймленными пузырьками*. Диаметр окаймленных пузырьков варьирует от 50 до 250 нм. В их мембране количественно преобладает консервативный фибриллярный белок *клатрин* (180 кДа), который вместе с меньшим полипептидом (35 кДа) образует характерный многогранный чехол на поверхности окаймленных пузырьков. Основным структурным элементом чехла служит белковый комплекс *трискелион*, состоящий из трех полипептидных цепей клатрина и трех 35 кДа-полипептидов. Трискелионы образуют на поверхности окаймленных пузырьков корзиноподобные сетки из шестиугольников и пятиугольников (рис. 80). Выделенные трискелионы при соответствующих условиях способны к спонтанной агрегации. При этом даже в отсутствие пузырьков формируются типичные многогранные корзинки. Трискелионы связаны со множеством вспомогательных белков. Эти белки, во-первых, в процессе формирования пузырька "вылавливают" из цистерн аппарата Гольджи белки с одинаковыми олигосахаридными "адресами", и, во-вторых, узнают компоненты мембраны, с которой должен слиться данный пузырек. Известно, что содержимое каждого транспортного пузырька доставляется точно по правильному "адресу" к определенной внутриклеточной мембране, поэтому должны существовать различные субпопуляции транспортных пузырьков, имеющих на своей поверхности уникальные вспомогательные белки, так называемые *маркеры стыковки* (*docking markers*), которые опознаются комплементарными акцепторами на мембранах мишеней. Одна из возможных моделей, описывающая этот процесс, представлена на рис. 81. Таким образом, окаймленные пузырьки можно рассматривать как миниатюрные сортировочные машины.

Транспортные пузырьки, сливающиеся с плазматической мембраной и высвобождающие свое содержимое в межклеточное пространство, называются *секреторными*, или *экзоцитозными* пузырьками. Наряду с окаймленными пузырьками в



клетке образуются и *окаймленные ямки*, т.е. эндоцитозные пузырьки, отпочковывающиеся внутрь клетки от окаймленных участков плазматической мембраны. Когда клетке нужно "выловить" из межклеточной жидкости какое-либо вещество, она, как правило, использует механизм *опосредуемого рецепторами эндоцитоза*, или *адсорбционный эндоцитоз*, при котором клетка производит белки-рецепторы для этого вещества, которые встраиваются в состав окаймленных участков плазматической мембраны. Все молекулы, связавшиеся с рецепторами, быстро проникают внутрь клетки, поскольку окаймленные ямки постоянно отщепляются, образуя окаймленные пузырьки. Эти пузырьки быстро теряют свою кайму и сливаются с другими пузырьками, образуя более крупные пузырьки, называемые *эндосомами*. Содержимое эндосом может использоваться клеткой. Хорошо изученный пример использования адсорбционного эндоцитоза - это поглощение животными клетками холестерина из внеклеточной среды.

Некоторые транспортные пузырьки, которые отпочковываются от самой крайней цистерны транс-стороны аппарата Гольджи, становятся *первичными лизосомами*. Гликопротеины, которыми загружены эти пузырьки, имеют олигосахарид с фосфорилированным остатком маннозы. Этот маннозофосфатный маркер и определяет судьбу таких пузырьков. После отщепления маннозофосфатного маркера гликопротеины первичных лизосом становятся активными гидролитическими ферментами (т.е. расщепляющими ферментами, осуществляющими перенос функциональных групп на молекулу воды). Лизосомы расщепляют до мономерных компонентов макромолекулы, захваченные клеткой в процессе эндоцитоза, или отдельные участки цитоплазмы и органоиды, утратившие свое значение в результате старения или использующиеся как материал для поддержания жизнедеятельности клетки в неблагоприятных экстремальных условиях. В первом случае первичная лизосома сливается с эндоцитозным пузырьком. Во втором случае подлежащий "перевариванию" участок цитоплазмы или органоид сначала окружается мембраной, а затем получившийся пузырек сливается с первичной лизосомой. Первичная лизосома, сливаясь с пузырьком, содержащим субстрат для расщепления, называется уже *вторичной лизосомой*. Мономерные продукты расщепления транспортируются из лизосомы в цитоплазму и могут использоваться клеткой.

Сейчас известно около 60 гидролитических ферментов, содержащихся в лизосомах, которые способны разрушать практически все природные полимерные органические соединения. Все они обладают наибольшей активностью при  $\text{pH} \sim 5$ . Именно такое значение  $\text{pH}$  поддерживается внутри лизосомы встроенными в их мембрану протонными АТФазами, использующими энергию АТФ для накачивания ионов  $\text{H}^+$  в полость этих органелл. Хотя в нормальных условиях мембрана лизосомы непроницаема для гидролитических ферментов, необходимость кислой среды для их активной работы защищает цитоплазму клетки от разрушения при возможной "утечке" ферментов.

Кроме лизосом, в эукариотической клетке постоянно присутствуют и другие, похожие на них органеллы - микротельца. Наиболее обычными микротельцами являются *пероксисомы* - пузырьки диаметром около 0.5 мкм, окруженные одиночной мембраной. Пероксисомы отщепляются от гладкого ЭПР и содержат ферменты, осуществляющие окислительные реакции с участием молекулярного кислорода. Основную реакцию, которую осуществляют пероксисомы, можно записать как  $\text{RH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{R} + \text{H}_2\text{O}_2$ , где  $\text{RH}_2$  - окисляемое вещество. Образующаяся перекись водорода либо используется клеткой для окисления других веществ, либо разрушается в пероксисомах ферментом *каталазой*:  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ . Окисление с помощью молекулярного кислорода часто выполняет защитную функцию: таким образом пероксисомы превращают *ксенобиотики* (попавшие в организм чужеродные низкомолекулярные вещества) в безопасные продукты. Например, почти половина выпитого спирта (этанола) окисляется до ацетальдегида в пероксисомах печени. В растительных клетках пероксисомы играют особую роль, осуществляя ферментативные

реакции особого метаболического пути, называемого *фотодыханием*. Кроме того, в клетках прорастающих семян содержатся микротельца особого типа - *глиоксисомы*. Они служат для превращения жирных кислот, запасенных в липидах семян, в сахара, необходимые для протекающих в молодом растении биосинтетических реакций.

### КРУГОВОРОТ МЕМБРАН В КЛЕТКЕ

Рассмотренная выше система вакуолярных структур цитоплазмы является единым целым, отдельные компоненты которого могут переходить друг в друга. При этом происходит закономерный непрерывный поток мембранных компонентов от ЭПР через аппарат Гольджи к плазматической мембране. Тем не менее мембраны каждого из органоидов характеризуются специфичностью, которая проявляется, в частности, в присутствии или отсутствии ферментов, маркерных для данного типа мембран. Такой поток называют "дифференцирующимся потоком мембран" (*membrane flow differentiation*). Встраивающиеся в плазматическую мембрану транспортные пузырьки постоянно наращивали бы ее площадь, если бы не *компенсирующий эндоцитоз* - поток пузырьков отщепляющихся от плазматической мембраны и направляющихся внутрь клетки. В результате осуществляется круговорот мембранных компонент в клетке, и одна и та же молекула фосфолипида может побывать в составе самых разных мембран. Суммарная схема различных путей круговорота мембран в клетке показана на рис. 82.

В случае, когда экзоцитоз не уравнивается компенсирующим эндоцитозом или при быстром росте клетки, необходим дополнительный синтез мембранных компонентов. И фосфолипиды, и холестерол, представляющие собой основные блоки всех липидных бислоев, синтезируются на мембранах гладкого ЭПР. Фактически все образующиеся в клетке липиды, за исключением жирных кислот и двух митохондриальных фосфолипидов, синтезируются на этих мембранах. Синтез осуществляется несколькими мембранными ферментами в несколько этапов (рис. 83). И включение, и модификация новых липидов происходят в монослое, обращенном к цитозолю. Перераспределение вновь синтезированных липидов между двумя бислоями происходит, вероятно, при помощи специального белка-переносчика, поскольку естественное перемещение липидов по механизму *flip-flop*-перескока слишком медленное и не соответствует экспериментально наблюдаемым скоростям перераспределения липидов. Гладкий ЭПР называют фабрикой клеточных мембран. У бактерий отсутствуют внутренние мембраны, и синтез липидов у них происходит в плазматической мембране.

Только два из митохондриальных липидов - фосфатидилглицерол и кардиолипин - синтезируются в митохондриальных мембранах. Остальные доставляются в митохондрии из гладкого ЭПР с помощью специальных водорастворимых белков-переносчиков. Каждый такой белок узнает только определенные типы фосфолипидов и связывает одну молекулу. Белок "выхватывает" молекулу фосфолипида из какой-либо мембраны и удаляется с этим липидом, "спрятанным" в связывающем центре. Когда белок встречает другую мембрану с подходящими свойствами, он отдает связанную молекулу фосфолипида новому липидному бислою. В отличие от митохондрий, все необходимые для построения мембран хлоропластов липиды образуются в самих пластидах.

### ПОВЕРХНОСТНЫЙ АППАРАТ КЛЕТОК

Поверхностный аппарат клеток состоит из 3 субсистем - *плазматической мембраны*, *надмембранного комплекса* (гликокаликс или клеточная стенка) и *субмембранного опорно-сократительного аппарата* - и выполняет три универсальные для всех разновидностей клеток функции: барьерную, транспортную и рецепторную. Кроме того, у отдельных разновидностей клеток наряду с общими функциями он может выполнять и ряд специфических функций, присущих только данному типу клеток (например, механическая тургорная функция клеточной стенки у клеток растений).

В структурном отношении субмембранный опорно-сократительный аппарат является специализированной периферической частью цитоскелета клетки. Он необходим для всех видов изменений рельефа клеточной поверхности. Например, формирование экзоцитозного пузырька и его отшнуровывание происходят с активным участием субмембранного сократимого аппарата. Этот процесс блокируется веществами, разрушающими микрофиламенты и микротрубочки субмембранной системы. Во время экзоцитоза окруженный мембраной пузырек активно перемещается к поверхности клетки тоже за счет деятельности опорно-сократимой системы. В месте соприкосновения транспортного пузырька с внутренней поверхностью клетки происходит разборка опорно-сократимых структур, благодаря чему мембрана, окружающая пузырек, может вступить в непосредственный контакт с плазматической мембраной клетки.

Надмембранный комплекс клеток включает в себя гликокаликс, о котором было подробно рассказано в предыдущей лекции, и для некоторых типов клеток *клеточную стенку*. Общим принципом структурно-биохимической организации клеточных стенок эукариот является наличие сложного каркаса из параллельно расположенных фибрилл и волокон, связанных поперечными перемичками. Вторым компонентом клеточной стенки служит аморфный матрикс, заполняющий промежутки между волокнами каркаса по принципу железобетонных конструкций. Так, например, роль каркаса клеточной стенки высших растений выполняют фибриллы целлюлозы, скрепленные поперечными перемичками из двух пектиновых полисахаридов - *рамногалактуронана* и *арабиногалактана* (рис. 84, В). Фибриллы целлюлозы собираются на поверхности клетки под влиянием специальных ферментов, встроенных в плазматическую мембрану, которые и осуществляют полимеризацию данного полисахарида из моносахаридов. При этом ориентация фибрилл зависит от расположения микротрубочек в периферических слоях цитоплазмы: фибриллы целлюлозы всегда располагаются параллельно микротрубочкам, так как ферментные комплексы, вероятно, перемещаются вдоль микротрубочек под действием актиновых нитей (рис. 84, Б). Полисахаридные компоненты клеточной стенки синтезируются также в аппарате Гольджи и, транспортируясь в виде секреторных пузырьков, выделяются на поверхности клетки путем экзоцитоза (рис. 84, А). В растительной клеточной стенке имеются поры с диаметром от 3.5 до 5.2 нм. Эта величина достаточно мала, чтобы существенно замедлить проникновение макромолекул, молекулярная масса которых превышает 15 - 20 кДа.

Поверхностный аппарат необходим также для формирования постоянных клеточных контактов. Основной тип контактов, механически скрепляющих клетки, - *десмосомы*, которые действуют подобно заклепкам (рис. 85, А). Десмосомы связывают клетки механически либо в отдельных местах контакта ("точечные" десмосомы), либо как непрерывные зоны контакта ("опоясывающие" десмосомы) (spot и belt desmosomes). Десмосомы служат также местами прикрепления промежуточных филаментов, образующих структурный каркас цитоплазмы. Тогда как расстояние между мембранами контактирующих с помощью десмосом клеток остается достаточно большим (22 - 35 нм), то в *плотных контактах* взаимодействующие плазматические мембраны настолько тесно примыкают друг к другу, что между ними не остается межклеточного пространства. Смежные плазматические мембраны в плотном контакте "сшиты" непрерывными цепочками специальных белковых частиц, образующими герметичное соединение (рис. 85, Б). Некоторые вещества с мол. массой менее 1 - 1.5 кДа могут легко переходить из клетки в клетку, не просачиваясь во внеклеточное пространство. Это возможно благодаря *щелевым контактам* (gap junction), которые построены из белков, выступающих из плазматической мембраны и образующих структуры, называемые *коннексами*, которые, по-видимому, соединяют цитозоли двух взаимодействующих клеток непрерывным водным каналом (рис. 85, В).

Все только что сказанное о межклеточных контактах - десмосомах, плотных и щелевых - относится только к животным клеткам. За исключением очень немногих

специализированных видов клеток, все живые клетки у высшего растения соединены со своими соседями при помощи тонких цитоплазматических каналов, называемых *плазмодесмами*, которые пронизывают разделяющие их клеточные стенки. Как показано на рис. 85, Г, в области каждой плазмодесмы плазматическая мембрана одной клетки без перерыва переходит в мембрану соседней клетки. Сама плазмодесма представляет собой цилиндрический выстланный мембраной канал диаметром от 20 до 40 нм. По оси канала из одной клетки в другую тянется цилиндрическая трубочка меньшего диаметра - *десмотубула*, просвет которой, по данным электронной микроскопии, сообщается с полостями ЭПР обеих смежных клеток. Пространство между наружной поверхностью десмотубулы и мембранной выстилкой плазмодесмы заполнено цитозолем. Благодаря плазмодесмам растительный организм оказывается не простой совокупностью отдельных клеток, а сложным сообществом взаимосвязанных живых протопластов. Поэтому все тело растения можно рассматривать как систему, которую образуют два компартмента - внутриклеточный компартмент (*симпласт*) и внеклеточный компартмент (*апопласт*).

### КРАТКИЕ ВЫВОДЫ

В основе всех разнообразных движений эукариотических организмов лежат два универсальных и принципиально одинаковых молекулярных механизма - тубулин-динеиновый и актин-миозиновый.

Быстрое и повсеместное образование и слияние пузырьков - это фундаментальная особенность всех эукариотических клеток. Молекулярные механизмы, обеспечивающие приведение в действие, сортировку и направление этого транспорта по специфическим путям, во многом требуют еще изучения.

Специфическое узнавание-взаимодействие макромолекул - молекулярная основа практически всех биологических процессов. Это хорошо видно на примере сортировки белков с помощью сигнальных последовательностей или транспортных пузырьков.

Рис. 59. Схема строения актинового филамента, показывающая ротрубочки. А - поперечный срез; спиральную укладку молекул глобу- Б - короткий участок микротрубочлярного актина. ки.

Рис. 60. Схема строения мик-

Рис. 61. Схематическое изображение типичной стереоцилии и типичной микроворсинки, показывающее их относительные размеры.

Рис. 62. Упрощенная схема различных изменений в структурном состоянии актина, обусловленных его взаимодействием со специфическими белками. На схеме не показаны заякоривающие белки (такие, как винкулин), которые связывают актиновые нити с другими клеточными компонентами, и различные малоизученных кэпирующие белки.

Рис. 63. Схема строения центриоли. Центриоль состоит из 9 триплетов микротрубочек, причем каждый триплет содержит одну полную микротрубочку (а) и две примыкающие к ней неполные микротрубочки (b и c). Особые белки образуют поперечные сшивки, поддерживающие цилиндрическую структуру (выделены цветом).

Рис. 64. Центриоли клеточного центра. МЦ - материнская центриоль; ДЦ - дочерняя центриоль; МТ - микротрубочки; ФСНТ - фокусы схождения микротрубочек.

Рис. 65. Схема движения реснички на поверхности эукариотической клетки. Каждый цикл длится от 0.1 до 0.2 с.

Рис. 66. Схема организации реснички на поперечном разрезе (А) и объемная модель строения (Б). 1, 2 - В- и А-микротрубочка периферического дублета; 3 - динеиновые "руки"; 4 - нексинные "спицы"; 5

- центральный дублет; 6 - нексинная капсула; 7 - плазматическая мембрана; 8 - сателлитное тельце; 9 - базальное тельце; 10 - триплеты микротрубочек; 11 - корневая нить; 12 - белковые глобулы мембраны; 13, 14 - базальный аппарат крепления; 15 - апикальная "шапочка" - аппарат крепления центрального дублета к плазматической мембране; 16 - фибриллярные структуры, обеспечивающие крепление периферических дуплетов к плазматической мембране.

Рис. 67. Два типа роста ресничек: а - закладка реснички внутри клетки и ее рост; б - рост реснички с поверхности клетки.

Рис. 68. А - ползущий фибробласт. Б - фибробласт не будет переползать на соседнюю грань стеклянной призмы, если угол между двумя гранями слишком острый; это, по-видимому, объясняется тем, что на переднем конце клетки тогда не может сформироваться прямой пучок актиновых филаментов (напряженная нить).

Рис. 69. А - случайное блуждание "шагающего" белка. Б - "шагающий" белок использует энергию гидролиза АТФ для упорядочивания переходов между тремя различными конформациями.

Рис. 70. Модель скольжения соседних дублетов. 1 - пара микротрубочек; 2 - наружный динеиновый выступ трубочки.

Рис. 71. Строение молекулы миозина.

Рис. 72. Шарнирные участки в молекуле миозина.

Рис. 73. Механизм смещения актинового микрофиламента относительно молекулы миозина. Предполагают, что каждая из головок молекулы миозина осуществляет этот цикл независимо от другой.

Рис. 74. Трехмерная модель, иллюстрирующая взаимосвязь эндоплазматического ретикулума и ядерных мембран.

Рис. 75. Трехмерное изображение аппарата Гольджи.

Рис. 76. Синтез секретируемого белка на рибосомах ЭПР.

Рис. 77. Схема синтеза различных клеточных белков на рибосомах ЭПР.

Рис. 78. Упрощенная схема гликозилирования белков в ЭПР.

Рис. 79. Схема транспорта пузырьков, отщепляющихся от гранулярного ЭПР.

Рис. 80. Электронная микрофотография окаймленных пузырьков.

Рис. 81. Схема доставки белков по "адресу" с помощью транспортных пузырьков.

Рис. 82. Суммарная схема различных путей круговорота мембран в клетке: 1 - 4 - варианты формирования транспортных пузырьков; 5 - формирование первичных лизосом; 6 - цикл функционирования лизосом; 7 - 9 - стадии подготовки для "переваривания" в лизосомах отдельных органоидов цитоплазмы; 13, 19 - экзоцитоз; 14, 15 - пиноцитоз и фагоцитоз; 18 - отпочковывание; 20, 21 - компенсаторный эндоцитоз без разборки и с разборкой мембран пиноцитозных пузырьков.

Рис. 83. Синтез фосфатидилхолина в мембране гладкого ЭПР.

Рис. 84. Клеточная стенка растений. А - участок растительной клетки; Б - участок поверхности растительной клетки; В - схема организации надмолекулярного комплекса целлюлозы с полисахаридами и гликопротеинами матрикса клеточной стенки растений. 1 - сформированные структуры клеточной стенки; 2 - периплазматическое пространство; 3, 4 - секреторные пузырьки, содержимое которых встраивается в клеточную стенку при экзоцитозе; 5 - плазматическая мембрана; 6 - белковый синтезатный комплекс, катализирующий сборку фибрилл целлюлозы (7), ориентирующихся параллельно

микротрубочкам (8) цитоплазмы; 9 - ранее сформированные целлюлозные фибриллы; 10 - актиновые филаменты (стрелкой показано перемещение синтетического комплекса); 11 - фибриллы целлюлозы; 12 - рамногалактуронан; 13 - арабиногалактан; 14 - ксилоглюкан.

Рис. 85. Схематическое строение межклеточных контактов: А - точечная десмосома, Б - плотный контакт между эпителиальными клетками тонкого кишечника, В - щелевой контакт, Г - плазмодесма растительной клетки.

## Лекция 7. ОБЩИЙ ОБЗОР МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТКИ

*Общий обзор метаболизма клетки - энергетическая "валюта" клеток - другие универсальные молекулы метаболических реакций - гликолиз - дыхание - фотосинтез - краткие выводы*

### ОБЩИЙ ОБЗОР МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТКИ

Вся совокупность химических реакций в клетке называется МЕТАБОЛИЗМ. Метаболизм представляет собой высококоординированную и целенаправленную клеточную активность, обеспечиваемую участием многих мультиферментных систем. Он выполняет четыре основные функции:

- 1) снабжение клетки химической энергией, которая добывается путем расщепления богатых энергией пищевых веществ, поступающих в организм из среды у *гетеротрофных организмов*, или путем преобразования улавливаемой энергии солнечного света у *автотрофных организмов*;
- 2) превращение молекул пищевых веществ в строительные блоки, которые затем используются клеткой для построения новых макромолекул;
- 3) сборка белков, нуклеиновых кислот, липидов, полисахаридов и прочих клеточных компонентов из этих блоков; 4) синтез и разрушение тех биомолекул, которые необходимы для выполнения каких-либо специфических функций данной клетки.

Хотя метаболизм складывается из нескольких тысяч различных ферментативных реакций, центральные метаболические пути, которые ответственны за выполнение с 1 по 3 из перечисленных функций метаболизма, немногочисленны и почти у всех живых форм в принципе едины. На рис. 88 показан "лабиринт" метаболических путей в клетке: каждая точка соответствует какому-либо соединению, а линия, соединяющая две точки, - ферментативной реакции превращения одного соединения в другое. При этом в разных клетках и у разных организмах основные "столбовые дороги" метаболических путей одинаковы (например, выделенный на рис. 88 толстыми линиями гликолиз и цикл трикарбоновых кислот), а различается в основном "периферия".

Метаболизм складывается из двух процессов, одновременно протекающих в клетке, - КАТАБОЛИЗМА и АНАБОЛИЗМА. Катаболизм, или *диссимиляция*, или *энергетический обмен* - совокупность реакций, в которых происходит расщепление сложных органических молекул до более простых конечных продуктов; при этом высвобождающаяся во время расщепления химическая энергия запасается в доступной для использования клеткой форме. Анаболизм, или *ассимиляция*, или *пластический обмен* - это совокупность реакций, в которых из малых молекул-предшествен-

ников или мономерных "строительных блоков" синтезируются белки, нуклеиновые кислоты, липиды, полисахариды и прочие клеточные компоненты; эти реакции требуют затраты энергии для своего осуществления.

Тысячи различных биохимических реакций, одновременно осуществляемых клеткой, тесно скоординированы между собой, так что клеткой осуществляется режим *максимальной экономии* энергетических и материальных ресурсов. Механизмы такой регуляции будут рассмотрены в одной из последующих лекций, тогда как здесь будут описаны основные

универсальные составляющие метаболизма эукариотической клетки - гликолиз, дыхание, фотосинтез,

### ЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ "ВАЛЮТА" КЛЕТОК

Закон сохранения энергии выполняется в живых системах так же, как и во всех других. В технических системах возможны любые взаимопревращения между световой, тепловой, механической, электрической и химической разновидностями энергии. Живые организмы тоже используют все эти виды энергии, однако в живых системах только химическая энергия способна превращаться во все другие виды энергии. Поэтому химическая энергия играет в биологических системах центральную роль. Специальным носителем химической энергии в живых организмах служит *аденозинтрифосфат* (АТФ).

АТФ - это нуклеотид, состоящий из остатков аденина, рибозы и трифосфата (рис. 87). В клетке АТФ находится в комплексе с  $Mg^{2+}$  или  $Mn^{2+}$  за счет отрицательных зарядов фосфатных групп. АТФ - молекула, богатая энергией: ее трифосфатный компонент содержит две фосфорноангидридные связи, называемые также *высокоэнергетическими* фосфатными связями. При гидролизе АТФ до *аденозиндифосфата* (АДФ) и неорганического фосфата ( $HPO_4^{2-}$ ):  $ATP^{4-} + H_2O \rightarrow ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+$  или до *аденозинмонофосфата* (АМФ) и неорганического *пирофосфата* ( $P_2O_7^{4-}$ ):  $ATP^{4-} + H_2O \rightarrow AMP^{2-} + P_2O_7^{4-} + 2H^+$  высвобождается много энергии. Величина энергии, высвобождающейся при гидролизе АТФ в клетке, может значительно (в 1.5 раза) меняться в зависимости от метаболизма клетки, определяющего в ней концентрации АТФ, АДФ и фосфата, а также от рН клеточного содержимого в каждый данный момент. Для оценочных расчетов принято использовать *стандартную* величину энергии гидролиза АТФ, когда концентрации АТФ, АДФ, АМФ, пирофосфата и фосфата равны 1.0 М, а рН = 7.0. Для гидролиза АТФ до АДФ

и до АМФ стандартная величина энергии составляет 30.5 и 32.2

кДж/моль соответственно. АТФ, АДФ и АМФ могут также превращаться друг в друга под действием фермента *аденилаткиназы*, катализирующей реакцию  $ATP + AMP \rightleftharpoons ADP + ADP$ . Для обозначения АТФ, АДФ, АМФ, неорганического фосфата и неорганического пирофосфата на рисунках будут также использоваться сокращения АТР (adenosine triphosphate), АДР (adenosine diphosphate) и АМР (adenosine monophosphate),  $P_i$  (inorganic phosphate) и  $PP_i$  (inorganic pyrophosphate).

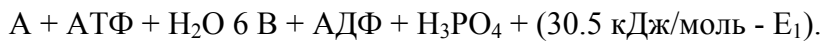
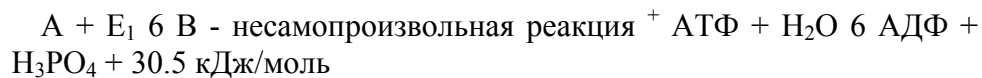
Энергия, выделяющаяся при гидролизе АТФ, используется клеткой для осуществления энергозависимых процессов в клетке, АТФ в свою очередь образуется в процессах, идущих с выделением энергии. Таким образом, АТФ - главный химический посредник клетки, связывающий между собой процессы, идущие с выделением и потреблением энергии. Энергию АТФ клетки используют в четырех основных целях: 1) для синтеза биомолекул из молекул-предшественников небольшого размера;

2) для выполнения механической работы, например, осуществления движения, как мы уже видели, на примере тубулин-динеиновой и актин-миозиновой систем (раздел "МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДВИЖЕНИЯ" предыдущей лекции); 3) для переноса веществ через мембраны против градиента концентрации, например мембранные транспортные АТФазы, осуществляющие активный транспорт; 4) для обеспечения точной и надежной передачи информации в генетических клеточных процессах.

Молекулы АТФ используются всеми без исключений живыми организмами как прокариотическими, так и эукариотическими, и поэтому АТФ называют энергетической "валютой" живых организмов.

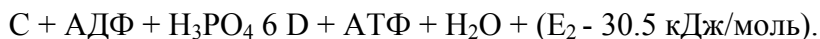
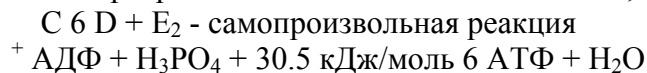
Химические реакции бывают *самопроизвольные* и *несамопроизвольные*. Энергия конечных продуктов самопроизвольной реакции ниже энергии вступающих в эту реакцию веществ, поэтому в ходе самопроизвольной реакции энергия выделяется. Напротив, энергия продуктов несамопроизвольной реакции выше энергии исходных веществ и для осуществления таких реакций необходим источник энергии. Несамопроизвольная реакция может

быть осуществлена ферментом только за счет *энергетического сопряжения* этой реакции с реакцией гидролиза АТФ. Предположим, для превращения вещества А в вещество В требуется затратить энергию  $E_1$ . Для получения этой энергии фермент 1, осуществляющий эту реакцию  $A \rightarrow B$ , должен одновременно осуществить реакцию гидролиза АТФ. Суммарная реакция тогда может быть записана в следующем виде:



Для самопроизвольного протекания суммарной реакции необходимо, чтобы величина  $(30.5 \text{ кДж/моль} - E_1)$  была положительной, т.е. чтобы  $E_1 < 30.5 \text{ кДж/моль}$ .

Энергия, выделяющаяся при расщеплении химических связей, может быть запасена при сопряжении этих реакций с синтезом АТФ. Рассмотрим, например, самопроизвольную реакцию превращения вещества С в вещество D, во время которой выделяется энергия  $E_2$ :



Для самопроизвольного протекания суммарной реакции необходимо, чтобы величина  $(E_2 - 30.5 \text{ кДж/моль})$  была положительной, т.е. чтобы  $E_2 > 30.5 \text{ кДж/моль}$ . Следовательно, если энергия, выделяющаяся в самопроизвольной химической реакции, больше, чем энергия макроэргической фосфатной связи, то она может быть запасена в молекуле АТФ. Хотя фосфорноангидридные связи молекулы АТФ традиционно называют "высокоэнергетическими" по энергии гидролиза они занимают промежуточное положение в ряду других химических связей. Именно эта особенность АТФ наряду с другими его свойствами позволяет АТФ служить переносчиком энергии от сверхвысокоэнергетических соединений, т.е. от таких, которые при расщеплении выделяют больше энергии, чем АТФ, к тем, которые при гидролизе выделяют меньше энергии, чем АТФ.

Цикл АТФ-АДФ представляет собой основной механизм обмена энергии в биологических системах. При этом *оборот* АТФ очень высок, что видно из следующего расчета. Взрослый человек массой 70 кг затрачивает в среднем 10 тыс. кДж энергии в сутки. Эта энергия получается при расщеплении  $10000 \text{ кДж} : 30.5 \text{ кДж/моль} \sim 328 \text{ моль АТФ}$ . Мол. масса АТФ составляет 507.2 Да. Следовательно, в организме человека за сутки расщепляется 166 кг АТФ, что в 2.5 раза превосходит массу самого человека. На самом деле в организме содержится только  $\sim 50 \text{ г АТФ}$ , и поэтому каждая молекула АТФ должна гидролизироваться и вновь синтезироваться  $166 \text{ кг} : 50 \text{ г} \sim 3320$  раз в сутки. Обобщающая концепция АТФ-цикла в клетках была создана в 1941 г. Фрицем Липманом (F. Lipmann, Нобелевская премия 1953 г.).

Многие процессы в клетке зависят от ее *энергетического статуса*. Показателем энергетического статуса служит *энергетический заряд*, вычисляемый по формуле:

$$\text{энергетический заряд} = ([\text{АТФ}] + 1/2[\text{АДФ}])/([\text{АТФ}] + [\text{АДФ}] + [\text{АМФ}]).$$

Метаболические пути, ведущие к синтезу АТФ, ингибируются высоким энергетическим зарядом, тогда как пути использования АТФ стимулируются высоким энергетическим зарядом (рис. 88). Очевидно, что регуляция этих путей метаболизма направлена на поддержание энергетического заряда в сравнительно узких пределах. Другими словами, энергетический заряд так же, как и рН клетки, буферен. Его значение в большинстве клеток находится в диапазоне 0.80 - 0.95. Другой показатель энергетического статуса - это *потенциал фосфорилирования*, который определяется уравнением:

$$\text{потенциал фосфорилирования} = [\text{АТФ}]/([\text{АДФ}] + [\text{фосфат}]).$$

Потенциал фосфорилирования, в отличие от энергетического заряда, зависит от концентрации



доступного фосфата в клетке и прямо связан с энергией, высвобождаемой при расщеплении АТФ.

## ДРУГИЕ УНИВЕРСАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Помимо АТФ, в переносе энергии могут участвовать и некоторые другие соединения. Одно из них *креатинфосфат*, или *фосфокреатин*, служит хранилищем высокоэнергетических фосфатных групп в мышечной ткани (рис. 89). При участии фермента *креатинкиназы* креатинфосфат быстро передает свою фосфатную группу молекулам АДФ: креатинфосфат + АДФ → креатин + АТФ. Содержание креатинфосфата в мышцах в 3 - 4 раза превышает содержание АТФ, поэтому в форме креатинфосфата может храниться достаточное количество фосфатных групп, полностью обеспечивающее поддержание постоянного уровня АТФ в короткие периоды усиленной мышечной активности. Благодаря обратимости креатинкиназной реакции накопившийся креатин в период восстановления вновь фосфорилируется за счет АТФ до креатинфосфата. В мышцах многих беспозвоночных роль носителя резервной формы энергии выполняет не креатинфосфат, а *аргининфосфат*.

Для окислительно-восстановительных реакций используются специализированные молекулы *никотинамидадениндинуклеотид* (НАДН) и *никотинамидадениндинуклеотидфосфат* (НАДФН) - носители "восстановительной силы" (рис. 90, А). НАД<sup>+</sup> (окисленная форма НАДН) - главный акцептор электронов при окислении топливных молекул в клетке: окисляя молекулу субстрата, НАД<sup>+</sup> присоединяет ион водорода и два электрона и превращается в НАДН. НАДФН отличается от НАДН только наличием фосфатной группы, связанной эфирной связью с 2'-гидроксильной группой аденозина. НАДФН - главный донор электронов в восстановительном биосинтезе. Реакционной частью молекул НАДН и НАДФН является никотинамидное кольцо (рис. 90, Б). Функцию, аналогичную функции НАД<sup>+</sup>, выполняет и другой переносчик электронов - *флавинадениндинуклеотид* (ФАД), изображенный на рис. 91, А. Реакционноспособная часть ФАД - это его изоаллоксазиновое кольцо (рис. 91, Б). ФАД подобно НАД<sup>+</sup> присоединяет 2 электрона и, в отличие от НАД<sup>+</sup>, не один, а оба протона. Для обозначения окисленной и восстановленной форм НАДН, ФАД и НАДФН на рисунках будут также использоваться обозначения NAD<sup>+</sup> и NADH (nicotinamide adenine dinucleotide), FAD и FADH<sub>2</sub> (flavin adenine dinucleotide) и NADP<sup>+</sup> и NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate).

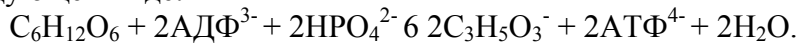
Еще одной универсальной молекулой у разных организмов и в разных метаболических процессах служит универсальный переносчик *ацильных групп* (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-, C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>- и т.д.) - *кофермент А* (CoA). Буква А означает ацетилирование. Реакционной частью молекулы CoA является концевая SH-группа (рис. 92). Ацильные группы присоединяются к CoA при помощи ковалентной *тиоэфирной* связи и в результате получается *ацил-CoA*. Если ацильная группа представлена *ацетильной группой* (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-), то ацил-CoA называют *ацетил-CoA* (рис. 92).

Некоторые биосинтетические реакции запускаются высокоэнергетическими нуклеотид-5'-трифосфатами - аналогами АТФ, а именно: *гуанозинтрифосфатом* (GTP), *уридинтрифосфатом* (UTP), *цитидинтрифосфатом* (CTP), *2'-дезоксиаденозин-5'-трифосфатом* (dATP), *2'-дезоксигуанозин-5'-трифосфатом* (dGTP), *2'-дезоксцитидин-5'-трифосфатом* (dCTP) и *2'-дезокситимидин-5'-трифосфатом* (dTTP). Все они выполняют специализированные функции, обслуживая только строго определенные биосинтетические пути (рис. 93), и свои фосфатные группы они получают от АТФ в реакциях, катализируемых Mg<sup>2+</sup>-зависимыми ферментами *нуклеозиддифосфокиназами*.

## ГЛИКОЛИЗ

Гликолиз почти универсален как один из центральных путей катаболизма углеводов: он есть не только во всех растительных и животных клетках, но и у микроорганизмов. Расщепление в процессе глико-

лиза шестиуглеродной молекулы глюкозы на две трехуглеродные молекулы осуществляется десятью последовательными ферментативными реакциями. Гликолиз проходит в два этапа (рис. 94): первые 5 реакций составляют *подготовительный этап* гликолиза, в ходе которого глюкоза активируется для последующего расщепления при помощи фосфорилирования; на втором этапе гликолиза, также состоящем из 5 реакций, химическая энергия запасается в результате сопряженного синтеза 4 молекул АТФ. Общий выход АТФ в процессе гликолиза равен, однако, не 4, а только двум молекулам АТФ в расчете на одну расщепленную молекулу глюкозы, поскольку 2 молекулы АТФ были уже израсходованы на подготовительном этапе гликолиза. Конечным продуктом гликолиза является *молочная кислота*, или *лактат* ( $C_3H_5O_3^-$ ), а суммарное уравнение можно записать в следующем виде:



Весь процесс гликолиза осуществляется в цитоплазме: все 10 ферментов гликолиза присутствуют в растворимой форме в цитозоле. Они были выделены в чистом виде из разных видов организмов и тщательно изучены. Помимо глюкозы, на разных стадиях подготовительного этапа в гликолиз могут вовлекаться и другие моносахариды.

При гликолизе высвобождается только небольшая часть той энергии, которая могла бы быть извлечена при химическом расщеплении молекулы глюкозы. Однако у гликолиза есть важное достоинство: *ни одна из его реакций не использует в качестве окислителя молекулярный кислород*. Поэтому гликолиз используется, например, при интенсивной работе мышц, когда циркуляция крови не успевает доставлять в мышцы кислород, необходимый для более полного расщепления глюкозы. В этих условиях клетки мышечной ткани получают необходимый для их сокращения АТФ в процессе гликолиза, и, следовательно, в них накапливается лактат. С накоплением лактата связано мышечное утомление. Этот лактат диффундирует из мышечной ткани в кровь и в период восстановления медленно превращается в печени обратно в глюкозу. Вообще говоря, у мелких животных кислород доставляется циркуляторными системами достаточно быстро, тогда как крупные животные должны прибегать к гликолизу во время усиленной мышечной активности и затем им требуется долгий период восстановления для нейтрализации лактата и восполнения запасов АТФ и гликогена. У динозавров и других гигантских доисторических животных источником энергии для работы мышц служил, вероятно, гликолиз, и, значит, им тоже были необходимы длительные периоды восстановления сил, во время которых эти животные легко становились добычей более мелких хищников, способных лучше использовать кислород, а потому и лучше приспособленных к длительной мышечной активности. Существование обитателей больших глубин тоже возможно лишь благодаря гликолизу, поскольку содержание кислорода там близко к нулю.

Задача 33. Запас АТФ в мышечной ткани. Концентрация АТФ в мышечной ткани (в которой около 70% приходится на долю воды) равна приблизительно 8.0 мМ. В периоды усиленной мышечной активности АТФ расходуется для мышечного сокращения со скоростью 300 мкмоль/мин на 1 г мышечной ткани. На какое время хватит этого запаса АТФ спринтеру, бегущему 100-метровую дистанцию? Концентрация креатинфосфата в мышечной ткани составляет примерно 40.0 мМ. На какое время позволит креатинфосфат растянуть запас мышечного АТФ?

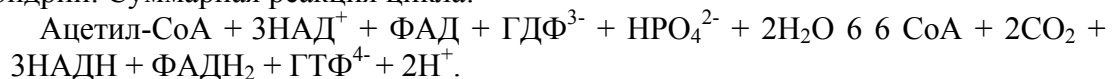
## ДЫХАНИЕ

Последней реакцией гликолиза является восстановление молекулы *пировиноградной кислоты*, или *пирувата* ( $C_3H_3O_3^-$ ) до лактата (рис. 94). Однако в присутствии молекулярного кислорода пируват не превращается в лактат, а расщепляется до  $CO_2$  и  $H_2O$  в аэробном процессе катаболизма, называемом *дыханием*. Говоря о дыхании, мы обычно имеем в виду его физиологический или макроскопический аспект (процесс поглощения  $O_2$  и выделения  $CO_2$  в легких). Но сейчас мы рассмотрим

дыхание на микроскопическом уровне, т.е. как молекулярные механизмы потребления  $O_2$  и образования  $CO_2$  в клетках.

Процесс клеточного дыхания состоит из трех стадий (рис. 95). Первая стадия служит для вовлечения органических молекул в процесс дыхания. В случае вовлечения пирувата на этой стадии он окисляется до ацетил-СоА и  $CO_2$  в реакции:  $C_3H_3O_3^- + НАД^+ + СоА \rightarrow$  ацетил-СоА + НАДН +  $CO_2$ . Эту довольно сложную реакцию осуществляет *пируватдегидрогеназный комплекс*, находящийся у эукариотических клеток в митохондриях, а у прокариотических - в цитоплазме. Пируватдегидрогеназный комплекс, выделенный из *E. coli*, представляет собой частицу диаметром около 45 нм, т.е. больше, чем рибосома. Его мол. масса превышает 6 млн. Да. Этот комплекс является мультиферментной системой, "ядро" которой составляют три крупных фермента, осуществляющие пируватдегидрогеназную реакцию, а к ним присоединены еще два фермента, выполняющие только регуляторные функции.

Вторая стадия дыхания - это циклическая последовательность из 9 реакций, осуществляемых 8 ферментами (рис. 95). Этот цикл называется *цикл лимонной кислоты* (по названию первого из образующихся в нем соединений) и известен также как *цикл трикарбоновых кислот*, или *цикл Кребса* (по имени открывшего его в 1937 г. Ганса Кребса (H. Krebs), Нобелевская премия 1953 г.). Все реакции этого цикла протекают в матриксе митохондрий. Суммарная реакция цикла:



Таким образом, в цикл вступает ацетильная группа, содержащая 2 атома углерода, которые освобождаются по завершении цикла в виде углекислого газа. От разных промежуточных продуктов цикла отделяются 4 пары атомов водорода, которые используются для восстановления 3 молекул  $НАД^+$  и 1 молекулы ФАД. В качестве побочного продукта цикла образуется также 1 молекула ГТФ, которая может быть использована для синтеза АТФ:  $\text{ГТФ} + \text{АДФ} \rightarrow \text{ГДФ} + \text{АТФ}$ . Однако главным выигрышем цикла служат восстановленные НАДН и  $\text{ФАДН}_2$ , которые передают 4 пары электронов в *цепь переноса электронов* на следующей (третьей) стадии дыхания (рис. 95).

Цепь переноса электронов представляет собой последовательность окислительно-восстановительных реакций, осуществляемых белками-переносчиками, несущими специальные химические группы, способные присоединять и отдавать электроны. Тогда как реакции цикла лимонной кислоты осуществляются в матриксе, белки-переносчики электрон-транспортной цепи являются мембранными белками и включены во внутреннюю мембрану митохондрий. Цепь переноса электронов состоит из четырех различных комплексов (рис. 96). Электроны от НАДН поступают на комплекс I, называемый также *НАДН-КоQ-редуктаза*. Этот комплекс насчитывает до 26 полипептидов, а его общая масса оказывается порядка 700 - 900 кДа. Этот комплекс содержит 6 реакционных центров - *флавиномононуклеотид* и 5 так называемых *негемовых железо-серных кластеров*: последовательно восстанавливаясь и окисляясь, эти центры переносят электрон и передают его на следующий переносчик в дыхательной цепи - *убихинон*, или *кофермент Q* (рис. 97). Комплекс II (*сукцинат:убихинон-оксидоредуктаза*), тоже содержащий *негемовые железо-серные центры*, принимает электроны от  $\text{ФАДН}_2$ , образовавшегося при окислении сукцината в цикле лимонной кислоты. Кофермент Q - это подвижная растворимая в мембране молекула. Он собирает электроны от комплексов I и II и передает их на следующий комплекс III, называемый также *КоQH<sub>2</sub>-цитохром с-редуктаза*. Комплекс III имеет массу около 250 кДа, содержит примерно 11 полипептидов и несет 4 реакционных центра - два *гема цитохрома b*, *негемовый железо-серный кластер* и *гем цитохрома с*. Переносчиком электронов между комплексами III и IV служит небольшой растворимый белок, локализованный в межмембранном пространстве оболочки митохондрии, - *цитохром с*. Комплекс IV называется *цитохромоксидазой*.

Интересно, что в процессе эволюции шло усложнение этого комплекса: цитохромоксидазы различных бактерий содержат от 2 до 3 субъединиц, в митохондриях дрожжей их - 7 - 8, а в митохондриях высших животных - 12 - 13 субъединиц. Активные центры цитохромоксидазы высших животных содержат два *гема типа а* и два иона Cu. В этом комплексе осуществляется заключительная окислительно-восстановительная реакция электрон-транспортной цепи, при этом конечным акцептором электрона, получающим его с атома Cu, является молекулярный кислород. В результате происходит реакция:  $O_2 + 4e^- + H^+ \rightarrow 2H_2O$ . Последовательность окислительно-восстановительных реакций, осуществляемых комплексами I, III и IV, показана на рис. 98.

Перенос электронов между комплексами осуществляется в ходе случайных столкновений между донорами и акцепторами электронов, свободно перемещающимися в липидном бислое. В среднем за 5 мс они перемещаются примерно на 40 нм; это расстояние примерно в 6 раз больше их собственного диаметра. Кофермент Q и цитохром с перемещаются на порядок быстрее, чем массивные мембранные комплексы: их коэффициент диффузии  $10^{-8}$  см<sup>2</sup>/с приближается к величине, характерной для мембранных фосфолипидов. Подсчитано, что случайных столкновений между такими переносчиками и мембранными комплексами вполне достаточно для обеспечения наблюдаемой скорости переноса электрона по дыхательной цепи (комплексы отдают и получают по одному электрону каждые 5 - 20 мс). Поскольку переносчики не образуют структурно-выраженных электрон-транспортных цепей, они присутствуют в митохондриях не в эквимоллярных количествах. Обычно соотношение комплекс I : комплекс III : комплекс IV : цитохром с : кофермент Q составляет 1:3:7:9:50. Это соотношение может изменяться, и таким образом клетка может регулировать скорость переноса электронов по дыхательной цепи.

Электроны, поступающие в эту цепь переносчиков, богаты энергией, но по мере их продвижения по цепи, от одного переносчика к дру-

гому, они постепенно теряют часть своей энергии. Некоторая часть этой энергии необратимо рассеивается в виде тепла, однако большая ее часть используется мембранными комплексами дыхательной цепи для переноса протонов из матрикса через внутреннюю мембрану в межмембранное пространство оболочки. В митохондриях в результате направленного переноса ионов водорода матрикс защелачивается, а межмембранное пространство закисляется, при этом на поверхности внутренней мембраны митохондрии со стороны межмембранного пространства накапливаются избыточные положительные заряды, а со стороны матрикса возникает равный недостаток положительных зарядов, т.е. накапливаются отрицательные заряды (рис. 96). Липидный бислой непроницаем для протонов, поэтому ионы водорода не могут диффундировать из межмембранного пространства обратно в матрикс, чтобы выровнять различие своих концентраций. Кроме того, липидный бислой хороший изолятор, поэтому внутренняя мембрана превращается в конденсатор, удерживающий трансмембранную разность электрических зарядов. Таким образом, энергия электронов преобразуется в энергию *электрохимического градиента протонов*, или *разности электрохимических потенциалов протонов* (DmH). DmH состоит из двух компонентов - *химического* (разность концентраций ионов водорода) и *электрического* (трансмембранная разность электрических потенциалов, Dj) - и может быть рассчитан из уравнения:

$$DmH = F Dj + RT \ln([H^+]_p/[H^+]_n),$$

где  $F$  - число Фарадея,  $R$  - газовая постоянная,  $T$  - абсолютная температура, а  $[H^+]_p$  и  $[H^+]_n$  - молярные концентрации протонов в положительно заряженном (более кислом) и в отрицательно заряженном (более щелочном) отсеках соответственно (для митохондрий - в межмембранном пространстве и в матриксе соответственно). При окислении 1 молекулы НАДН в дыхательной цепи через мембрану переносится 10  $H^+$ . В типичной клетке DmH на митохондриальной мембране в процессе дыхания складывается из  $Dj = 160$  мВ и градиента рН величиной в 1 единицу рН.

Энергия DmH используется затем для синтеза АТФ. Для этого во внутренней мембране митохондрий присутствует ферментный комплекс, называемый *АТФ-синтетаза*. АТФ-синтетаза имеет очень похожую структуру и в клетках бактерий, и в митохондриях разных организмов. Она состоит из двух частей: водорастворимой каталитической части F<sub>1</sub> и части F<sub>0</sub>, локализованной внутри мембраны и представляющей собой протонный канал (рис. 96). F<sub>0</sub> содержит 3 типа субъединиц (a, b и c) со стехиометрией ab<sub>2</sub>c<sub>6-15</sub>, при этом b-субъединица пересекает мембрану один раз, c-субъединица - два раза, а a-субъединица образует 6 a-спиралей, пронизывающих мембрану. F<sub>1</sub> в митохондриях присоединяется к F<sub>0</sub> всегда со стороны матрикса и представляет собой эллипсоид с осями 12×9×7 нм. F состоит из 5 типов субъединиц (a, b, g, d и e) со стехиометрией a<sub>3</sub>b<sub>3</sub>gde. Кроме того, митохондриальная АТФ-синтетаза содержит несколько дополнительных полипептидов, отсутствующих у бактерий. Суммарная мол. масса АТФ-синтетазы превышает 500 кДа и весь комплекс настолько велик, что отчетливо виден на электронно-микроскопических фотографиях в виде грибовидных образований, торчащих из мембраны. Ионы Н<sup>+</sup>, накапливающиеся в межмембранном пространстве митохондрий, устремляются под действием своего электрохимического градиента по каналу F<sub>0</sub>, но на выходе в матрикс они попадают в F<sub>1</sub>, который использует "протонодвижущую силу" для синтеза АТФ из АДФ. Энергетическим преобразователем, синтезирующим АТФ, служит комплекс a<sub>3</sub>b<sub>3</sub>, а комплекс gde действует как "ворота", открывающие или запирающие протонный канал F<sub>0</sub>.

Процесс транспорта электронов вдоль мембраны оказывается таким образом сопряжен с переносом протонов через мембрану, "заряженная" разностью электрохимических потенциалов мембрана затем разряжается через АТФ-синтетазу, что приводит к образованию АТФ. Этот механизм, называемый *хемиосмотическим*, является достаточно универсальным и, как мы увидим в дальнейшем, встречается не только в митохондриальных, но и в других клеточных мембранах. Мембраны, способные "заряжаться" и использовать разность электрохимических потенциалов для синтеза АТФ, называются *сопрягающими* мембранами. Хемиосмотический механизм был открыт в 1961 г. Питером Митчелом (P. Mitchell, Нобелевская премия 1979 г.).

На каждую пару электронов, перенесенных по дыхательной цепи от НАДН к кислороду, синтезируются 3 молекулы АТФ. Электроны, отщепляемые от ФАДН<sub>2</sub>, поступают в дыхательную цепь с комплекса II (сукцинат:убихинон-оксидоредуктазы), который в отличие от комплекса I (НАДН-КоQ-редуктазы), не участвует в перекачивании протонов через мембрану. Поэтому при переносе пары e<sup>-</sup> от ФАДН<sub>2</sub> образуется только 2 молекулы АТФ. Еще 1 молекула АТФ синтезируется из молекулы ГТФ, получившегося в цикле лимонной кислоты. В результате при окислении 1 молекулы пирувата в митохондрии образуется 4×3+2+1=15 молекул АТФ.

Если же мы рассмотрим окисление молекулы глюкозы, начинающееся с гликолиза, и учтем, что при гликолитическом расщеплении глюкозы образуются 2 молекулы пирувата, а получающиеся при этом 2 молекулы НАДН (рис. 94) тоже могут быть вовлечены в перенос электронов по дыхательной цепи, то общее количество АТФ, получающееся при двухстадийном расщеплении молекулы глюкозы (гликолиз + дыхание), составит 2×15+2×3+2=38 молекул. Суммарное уравнение такого расщепления можно записать в следующем виде:

$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 + 38ADP^{3-} + 38HPO_4^{2-} + 38H^+ \rightarrow 6CO_2 + 38ATP^{4-} + 44H_2O$ . При сжигании глюкозы до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O выделяется 2870 кДж/моль. Следовательно при биологическом расщеплении глюкозы до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O теоретический КПД составляет  $(38 \times 30.2 / 2870) \times 100\% \sim 40.4\%$  в стандартных условиях (1.0 М). В живых клетках эффективность этого превращения, вероятно, превышает 70%, поскольку внутриклеточные концентрации O<sub>2</sub>, АДФ, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> и АТФ не одинаковы и значительно ниже 1 М. Остальная энергия химических

связей глюкозы, не запасенная в АТФ, рассеивается в виде тепла. Кислород, который мы поглощаем из атмосферы при помощи легких, необходим клеткам нашего тела как конечный акцептор электронов в электрон-транспортной цепи, а углекислый газ высвобождается как побочный продукт в реакциях цикла Кальвина, диффундирует из митохондрий в цитоплазму, затем в межклеточную среду и удаляется из организма высших животных через легкие.

Некоторые вещества способны действовать как *разобщители* электронного транспорта и фосфорилирования. Они либо являются переносчиками  $H^+$  через мембрану, либо делают в мембране протонный канал - "дырку". В результате для ионов  $H^+$  открывается альтернативный путь для выравнивания концентраций, минуя АТФ-синтазу. Возникает как бы "короткое замыкание", протонодвижущая сила полностью исчезает, и АТФ больше не синтезируется. В этих условиях вся энергия поступающих в дыхательную цепь электронов рассеивается в виде тепла и поэтому такое разобщение процессов переноса электрона и фосфорилирования специально используется организмами для выработки тепла. У многих млекопитающих и у человека имеется особый тип жировой ткани, называемый *бурым жиром*. Цвет бурого жира обусловлен присутствием в его клетках большого количества митохондрий. Митохондрии бурого жира необычны тем, что в их внутренней мембране содержится небольшой (33.2 кДа) белок *термогенин*, способный проводить протоны через мембрану. Через термогенин происходит утечка протонов, накачиваемых

в межмембранное пространство митохондрий во время транспорта электронов. В итоге наблюдается "холостая" циркуляция ионов  $H^+$  и вместо образования АТФ происходит выделение энергии в виде тепла. Бурый жир составляет не более 1 - 2% массы тела. Тем не менее стимуляция этой ткани при охлаждении животных повышает ее теплопродукцию до 400 Вт на 1 кг массы, что намного больше обычной термогенной способности тканей млекопитающих (человек в состоянии покоя образует около 1 Вт теплоты на 1 кг массы). Если организм не нуждается в тепле, то протонные каналы, образованные термогеном, закрываются и митохондрии бурой жировой ткани начинают синтезировать АТФ. В организме человека бурый жир сосредоточен в верхней части спины, ближе к шее. Он окружает кровеносные сосуды, питающие мозг кровью, поэтому теплопродукция в буром жире имеет огромное значение для выживания организма на холоде.

Помимо углеводов, и другие органические вещества могут окисляться и отдавать свою химическую энергию в митохондриях. Это могут быть жирные кислоты, отщепившиеся от липидных молекул. Специальные ферменты-переносчики осуществляют перенос жирных кислот в матрикс митохондрии. Там жирнокислотная цепь "нарезается" на двухуглеродные фрагменты, каждый из которых образует ацетил-СоА, готовый вступить в реакции цикла лимонной кислоты. Аминокислоты, образовавшиеся при расщеплении белков, тоже могут служить "сырьем" для митохондрий, если не используются в новых белковых синтезах. Сначала аминокислоты "отдают" свою аминогруппу молекулам *а-кетоглутарата* в реакциях *трансаминирования*, а затем 10 из них расщепляются до ацетил-СоА, а другие 10 могут поступать непосредственно в цикл Кребса. Общая схема использования различных веществ для извлечения энергии в процессе дыхания показана на рис. 99.

Задача 34. Рассчитайте, сколько протонов должны пройти через АТФ-синтазу, чтобы в стандартных условиях синтезировалась 1 молекула АТФ, если на мембране поддерживается разность потенциалов, равная 160 мВ?

Задача 35. На чашку весов сажают белую мышь, накрывают ее металлической сеткой и уравнивают весы. Животное бежит по чашке, карабкается по сетке и затрачивает на это много энергии. Через 2 ч чашка с мышью стала на 1.2 г легче. Полагая, что мышь не

потела, рассчитайте, какое количество глюкозы расщепилось за это время в мышцах животного.

Задача 36. С подвергаемых дыхательному расщеплению молекул на кислород каждую минуту во всех митохондриях тела человека переходит количество электронов, равное силе тока в 76 А. Оцените общую энергетическую мощность человеческого тела, если перепад значений окислительно-восстановительных потенциалов в дыхательной цепи составляет 1.13 В.

### ФОТОСИНТЕЗ

Процесс фотосинтеза, осуществляемый хлоропластами растительной клетки, происходит по тому же хемиосмотическому механизму, который осуществляется в митохондриях, и в основе организации тех и других органелл лежат одни и те же принципы. Однако источник энергии, которая запасается в виде АТФ, различен: в процессе дыхания - это энергия химических связей органических веществ, а в процессе фотосинтеза - энергия света.

Фотосинтез осуществляется в три стадии. На первой стадии происходит поглощение кванта света, осуществляемое молекулами *хлорофилла*. Известно несколько различных форм хлорофилла. Основными хлорофиллами высших растений являются хлорофиллы а и b (рис. 100), у различных водорослей встречаются также хлорофиллы с, d и е. 4 пиррольных кольца образуют в молекуле цикл из чередующихся двойных и одинарных связей (рис. 100), в центре которого находится атом магния. Эта часть молекулы является хромофором, хорошо поглощающим свет в синей и красной областях спектра (рис. 101). Длинный гидрофобный "хвост", присоединенный сложноэфирной связью к тетрапиррольному кольцу, является остатком спирта *фитола* и служит для прикрепления к белкам тилакоидной мембраны хлоропластов. Очень близки по строению к хлорофиллам растений фотосинтетические пигменты бактерий, называемые *бактериохлорофиллами*. Для более полного улавливания света хлорофиллы собраны в группы по несколько сотен молекул - так называемые *антенные комплексы*. Помимо хлорофилла, каждый антенный комплекс содержит дополнительные пигменты - *каротиноиды* (рис. 102). Тогда как хлорофиллы слабо поглощают свет в области спектра от 500 до 600 нм, каротиноиды интенсивно поглощают свет в желто-зеленой области и способны передавать энергию поглощенных фотонов молекулам хлорофилла. Таким образом, каротиноиды служат дополнительными фотосинтетическими пигментами. Еще одной функцией каротиноидов является защита молекул хлорофилла от окисления активными формами кислорода.

После поглощения фотона молекула хлорофилла переходит в одно из возбужденных состояний (рис. 103). В возбужденном состоянии молекула находится только короткое время, после чего происходит один из трех процессов. Во-первых, молекула может вернуться в невозбужденное состояние с выделением энергии в виде тепла (*тепловая диссипация возбуждения*). Во-вторых, молекула может перейти в невозбужденное состояние, "сбросив" избыточную энергию в виде высвечивания фотона. Этот процесс называется *флуоресценция*, если высвечивание происходит из короткоживущего синглетного состояния, и *фосфорисценция*, если из долгоживущего триплетного состояния. Третий и наиболее важный процесс перехода молекулы хлорофилла в исходное невозбужденное состояние заключается в передаче энергии возбуждения соседней (находящейся на расстоянии 1 - 2 нм) молекуле хлорофилла по *индуктивно-резонансному механизму*. У этой получившей возбуждение молекулы хлорофилла тоже есть те же три возможности вернуться в невозбужденное состояние. Таким образом, энергия возбуждения, если не диссипирует в тепло и не высвечивается в виде фотона, мигрирует в антенном комплексе от молекулы к молекуле, пока не попадет на молекулу *хлорофилла реакционного центра* (рис. 104). При этом молекулы антенного комплекса слегка отличаются по своим энергетическим уровням и расположены таким образом, что энергия возбуждения не блуждает случайным образом, а направляется прямо к реакционному центру. В результате

антенный комплекс служит как бы "воронкой", собирающей световую энергию и направляющей ее к единому центру.

Молекула хлорофилла реакционного центра тоже может высветить или диссипировать энергию своего возбуждения, но отличается от других молекул хлорофилла тем, что может передать не энергию возбуждения электронных орбиталей, а сам высокоэнергетический электрон, т.е. вступить в окислительно-восстановительную реакцию, что эта молекула и делает с высокой степенью вероятности.

Конкретное место действия уже описанных и последующих процессов показано на рис. 105. Хлорофиллы реакционных центров, способные отдавать электрон, расположены на двух разных больших пигмент-белковых комплексах, называемых *фотосистема I* (ФС I) и *фотосистема II* (ФС II). Хлорофилл реакционного центра ФС I обозначается P680 (по длине волны главного максимума поглощения), расположен на большом полипептиде (47 кДа) и отдает свой электрон ( $e^-$ ) молекуле *феофитина*, расположенной рядом на том же полипептиде:  $\text{Хл}^* + \text{Фео} \rightarrow \text{Хл}^+ +$

$\text{Фео}^-$ , где \* означает возбужденное состояние. После этого в молекуле хлорофилла остается положительно заряженная "дырка", которую необходимо заполнить электроном. Электрон берется из молекулы воды, но поскольку "оторвать" электрон из устойчивой молекулы  $\text{H}_2\text{O}$  довольно тяжело, это делает специальный *водорасщепляющий комплекс*, состоящий из нескольких полипептидов (33, 18 и 24 кДа), содержащий катализирующие этот процесс атомы Mn и Cl и присоединяющийся к комплексу ФС II со стороны просвета (*люмена*) тилакоида (рис. 105). Всего от молекул воды в 4 этапа отрывается 4 электрона, после чего выделяется молекула кислорода:  $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4e^-$ . Этот кислород является побочным продуктом фотосинтеза; он далее не используется в хлоропласте, а диффундирует из хлоропластов в цитоплазму, из цитоплазмы в межклеточное пространство листа и через устьица выходит в атмосферу.

Электрон, полученный феофитином, передается далее по электрон-транспортной цепи, аналогичной дыхательной цепи митохондрий. Сначала происходит последовательность окислительно-восстановительных реакций между молекулами, связанными с полипептидами ФС II, затем электроны поступают в пул растворимых в липидном бислое подвижных переносчиков *пластохинонов*, очень похожих на молекулы кофермента Q электрон-транспортной цепи митохондрий. Пластохиноны переносят электроны на *цитохромный комплекс*, или *пластохинол-пластоцианин-оксидоредуктазу*, а с цитохромного комплекса электроны поступают на маленький (10.5 кДа) растворимый белок *пластоцианин* (ПЦ), локализованный в люмене тилакоидов (рис. 105). Еще одним реакционным центром в хлоропластах служит хлорофилл P700, находящийся в комплексе ФС I. Возбуждаясь под действием энергии, переносимой к нему от антенного комплекса, P700 отдает свой электрон следующему участнику электрон-транспортной цепи ( $A_0$ ) и восполняет потерю электрона от пластоцианина, восстановленного цитохромным комплексом. После серии окислительно-восстановительных реакций в пределах комплекса ФС I электроны попадают на еще один небольшой (11 кДа) растворимый белок-переносчик - *ферредоксин*, локализованный в строме хлоропластов. И, наконец, окончательным звеном фотосинтетической электрон-транспортной цепи является ассоциированный с мембраной фермент *ферредоксин:НАДФ-оксидоредуктаза*, принимающий электроны от восстановленного ферредоксина и восстанавливающий  $\text{НАДФ}^+$  до  $\text{НАДФН}$ . Последовательность окислительно-восстановительных реакций, осуществляемых фотосистемами и цитохромным комплексом, показана на рис. 106.

Процесс переноса электронов через цитохромный комплекс сопряжен с переносом протонов из стромы хлоропласта внутрь люмена тилакоида. Кроме того, протоны образуются в люмене тилакоида при расщеплении воды водорасщепляющим комплексом ФС II. Таким образом, так же, как и в дыхательной цепи перенос электрона вдоль тилакоидной мембраны вызывает образование на ней разности электрохимических по-

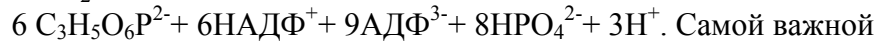
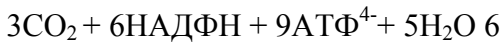


тенциалов ионов  $H^+$ . И так же, как в митохондриях, тилакоидная мембрана "разряжается" через хлоропластную АТФ-синтетазу, устроенную почти точно так же как и митохондриальная (рис. 105). Однако особенностью тилакоидных мембран является выход ионов  $Mg^{2+}$  в строму в ответ на закачку протонов в тилакоиды. Поэтому разность электрохимических потенциалов на мембране почти целиком обуславливается градиентом рН, составляющим 3 - 3.5 единицы, а не разницей зарядов. Еще одна особенность фотосинтетической электрон-транспортной цепи - это возможность зацикливания переноса электронов. Восстановленный ферредоксин, перемещаясь вдоль стромальной поверхности тилакоидной мембраны, может отдавать электроны не только ферредоксин:НАДФ-оксидоредуктазе, но и цитохромному комплексу. В результате образования НАДФН не происходит, но накачка протонов внутрь тилакоида, осуществляемая цитохромным комплексом, идет, и АТФ синтезируется. Регуляция соотношения путей линейного переноса  $e^-$  от воды к НАДФ<sup>+</sup> и циклического переноса  $e^-$  вокруг ФС I служит одним из способов адаптации функционирования фотосинтетического аппарата хлоропластов в разных условиях.

Последовательное соединение двух фотосистем в переносе электрона вдоль мембраны позволяет создать большой перепад окислительно-восстановительных потенциалов на концах электрон-транспортной цепи (от +0.82 В до -0.32 В) (рис. 107). Схема путей переноса электрона на энергетической диаграмме похожа на зигзаг и поэтому называется Z-схемой (от англ. zigzag). Так же, как и митохондриальные мембранные комплексы, белковые комплексы фотосинтетической электрон-транспортной цепи способны перемещаться вдоль тилакоидной мембраны. В нормальных условиях они обычно присутствуют почти в эквимольных количествах, однако наблюдается неоднородность в пространственном распределении фотосистем: ФС II расположена в области гран (в зоне стэкинга соседних тилакоидов граны), тогда как ФС I локализована в тилакоидах стромы. Там же находятся комплексы АТФ-синтетазы с экспонированными в строму  $F_1$ .

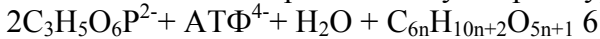
Каждая из фотосистем имеет собственный антенный комплекс, собирающий световую энергию и направляющий ее на хлорофилл реакционного центра. Кроме того, есть еще один отдельный светособирающий пигмент-белковый комплекс (непоказанный на рис. 105). Обычно этот светособирающий комплекс локализован в гранах, где принимает участие в стэкинге тилакоидов и передает энергию на ФС II. Но в условиях избыточного возбуждения ФС II, когда начинает накапливаться большой пул восстановленных пластохинонов, этот комплекс фосфорилируется специальным ферментом-киназой и приобретает дополнительный отрицательный заряд из-за фосфатных групп. Электростатические силы выталкивают светособирающий комплекс из гранальных областей тилакоидной мембраны в тилакоиды стромы, где он начинает взаимодействовать с комплексами ФС I, передавая энергию их реакционным центрам и стимулируя циклический транспорт электронов вокруг ФС I. При отщеплении фосфатных групп другим специфическим ферментом-фосфоорилазой светособирающий комплекс возвращается в гранальные области тилакоидов к ФС II. Таким образом, регулируется перераспределение энергии между двумя фотосистемами.

Однако образованием АТФ и восстановлением НАДФ<sup>+</sup> процесс фотосинтеза не заканчивается. АТФ и НАДФН используются далее в циклической последовательности ферментативных реакций, осуществляющихся в строме хлоропласта и называемых *циклом Кальвина* (Melvin Calvin, Нобелевская премия 1961 г.), или *циклом Бенсона-Кальвина*, или *восстановительным пентозофосфатным циклом* (ВПФ-цикл). Цикл начинается присоединением молекулы  $CO_2$  к пятиуглеродному моносахариду *рибулозо-1,5-бисфосфату* (реакция *карбоксилирования*) и включает еще 12 ферментативных реакций (рис. 108). Цикл завершается регенерацией молекул *рибулозо-1,5-бисфосфата*, готовых опять присоединить к себе новые молекулы  $CO_2$ , а конечным продуктом цикла является трехуглеродный моносахарид *глицеральдегид-3-фосфат* ( $C_3H_5O_6P^{2-}$ ). Суммарное уравнение ВПФ-цикла:



Самой важной реакцией ВПФ-цикла является реакция карбоксилирования, осуществляемая ферментом *рибулозобисфосфат-карбоксилазой* (РБФК). Скорость этой реакции, как правило, определяет интенсивность всего процесса фотосинтеза, поэтому концентрация РБФК в стромах хлоропласта очень велика: этот фермент составляет около 50% всего белка хлоропластов и является самым многочисленным ферментом растений и самым распространенным ферментом в биосфере. РБФК имеет мол. массу 550 кДа и состоит из 8 больших субъединиц (55 кДа) и 8 малых (15 кДа), но работает довольно медленно по сравнению с другими ферментами, "пришивая"  $\text{CO}_2$  к молекулам рибулозо-1,5-бисфосфата примерно 3 раза в с.

Синтезированный в ВПФ-цикле глицеральдегид-3-фосфат может либо экспортироваться из хлоропласта в цитоплазму, либо использоваться в стромах хлоропласта для синтеза крахмала. Процесс наращивания полисахаридных цепей крахмала за счет молекул глицеральдегид-3-фосфата осуществляется в несколько стадий и требует дополнительных затрат АТФ. Суммарное уравнение этого процесса:

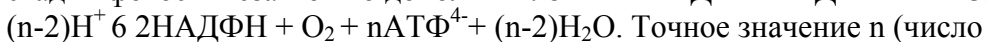


$6\text{C}_{6(n+1)}\text{H}_{10n+12}\text{O}_{5n+6} + \text{АДФ}^{3+} + \text{НРО}_4^{2-} + \text{H}^+ + \text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ . В цитоплазму глицеральдегид-3-фосфат переносится в обмен на пиродифосфат специальным белком-*транслокатором*, находящимся во внутренней мембране оболочки хлоропласта и работающим по принципу антипорта. Там же, во внутренней мембране оболочки, расположены и другие белки-переносчики, облегчающие обмен веществами между стромахой и цитозолем. В цитоплазме глицеральдегид-3-фосфат может либо вступать в процесс синтеза сахарозы, описываемый суммарным уравнением



либо служить материалом для наращивания полисахаридов (например, целлюлозы) в соответствии с таким же суммарным уравнением, как и для синтеза крахмала. Во всех этих синтезах из глицеральдегид-3-фосфата сначала образуется фосфорилированная глюкоза (*глюкозо-6-фосфат*), а затем конъюгат глюкозы с различными нуклеозиддифосфатами (рис. 109).

Как видно из Z-схемы (рис. 107), для переноса одного электрона от воды к НАДФ<sup>+</sup> должно быть поглощено 2 кванта света, по одному на каждую фотосистему. Образование одной молекулы кислорода сопряжено с переносом четырех электронов, т.е. требует поглощения восьми квантов, а для восстановления одной молекулы НАДФ<sup>+</sup> требуется только два электрона. В результате уравнение суммарной окислительно-восстановительной реакции, осуществляемой тилакоидной мембраной, можно записать как  $8\text{h}\nu + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{НАДФ}^+ \rightarrow 6\text{НАДФН} + \text{O}_2 + 2\text{H}^+$ . Энергия света расходуется не только на транспорт электронов, но и на сопряжение с ним переноса протонов и синтеза АТФ. Поэтому уравнение световой



Точное значение n (число молекул АТФ, синтезируемых в расчете на 4 переносимых по цепи e<sup>-</sup>)

может меняться в зависимости от условий и путей транспорта электрона. Однако обычно принимают, что n=3, и тогда, просуммировав уравнения световой фазы и ВПФ-цикла, мы получаем суммарное уравнение фотосинтеза:  $24\text{h}\nu + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{НРО}_4^{2-} \rightarrow 6\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_6\text{P}^{2-} + 3\text{O}_2$  или в пересчете на молекулу глюкозы:  $48\text{h}\nu + 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 6\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$ .

Энергия света разной длины волны находится в пределах от 169.9 кДж/моль фотонов с  $\lambda = 700$  нм до 300.4 кДж/моль фотонов с  $\lambda = 400$  нм. Поскольку, как мы уже видели при расчете КПД дыхания, химическая энергия связей молекулы глюкозы составляет 2870 кДж/моль, то эффективность использования энергии красного света для синтеза углеводов в процессе фотосинтеза составляет  $2870 \cdot 100 / (48 \cdot 169.9) \sim$

35.2%. Суммарное уравнение фотосинтеза является обратным суммарному уравнению дыхания. В растительной клетке сосуществуют и хлоропласты, и митохондрии, однако фотосинтез на порядок превышает по интенсивности газообмена дыхание, и поэтому растения нуждаются в поглощении  $\text{CO}_2$  из атмосферы, наращивая за счет ассимиляции атомов углерода свою биомассу, и выделяют  $\text{O}_2$ , который является побочным продуктом расщепления воды и не используется полностью в процессе митохондриального дыхания. Помимо фотосинтеза углеводов, в хлоропластах осуществляется много других биосинтетических процессов, нужных растительной клетке. Например, за счет энергии электронов, активированных светом, в хлоропластах происходит восстановление нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) до аммиака ( $\text{NH}_3$ ), который затем служит источником азота при синтезе аминокислот и нуклеотидов.

Задача 37. Растение кукурузы накапливает 18 г крахмала за 18 ч световой день (будем считать, что это единственный продукт фотосинтеза). Пренебрегая дыханием, рассчитайте скорость фотосинтеза в мл углекислого газа на растение в час.

### КРАТКИЕ ВЫВОДЫ

Специфические молекулы, универсальные для разных организмов и разных метаболических процессов, служат переносчиками определенных видов функциональных групп, легко присоединяя и легко отдавая их в химических реакциях: АТФ и креатинфосфат - переносчики фосфатных групп; НАД, ФАД и НАДФ - переносчики электронов и протонов; кофермент А - переносчик ацильных групп.

Разность электрохимических потенциалов на мембране в клетке - это еще одна (не менее универсальная, чем АТФ) форма энергии. Она может обратимо превращаться в энергию АТФ или прямо использоваться в разнообразных клеточных процессах (рис. 110).

Универсальным механизмом создания разности электрохимических потенциалов на сопрягающей мембране является хемиосмотический механизм. Мембранные АТФ-синтетазы устроены принципиально одинаково у всех организмов от бактерий до человека.

Гликолиз, дыхание и фотосинтез - это фундаментальные энергетические клеточные процессы. Гликолиз можно рассматривать как первый подготовительный этап дыхания в кислородных условиях, но он не заменяет для получения энергии при недостатке кислорода. У фотосинтеза и дыхания есть много общего, поскольку в основе организации этих процессов лежат одинаковые принципы.

Рис. 86. "Лабиринт" метаболических путей, иллюстрирующий взаимопревращения малых молекул в клетке.

Рис. 87. Строение молекулы АТФ.

Рис. 88. Влияние энергетического заряда на относительную скорость типичных катаболического и анаболического путей.

Рис. 89. Строение и функционирование креатинфосфата.

Рис. 90. А - строение окисленной формы никотинамидадениндинуклеотида ( $\text{НАД}^+$ ) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата ( $\text{НАДФ}^+$ ):  $\text{НАДФ}^+$ , изображенный на рисунке, отличается от  $\text{НАД}^+$  только фосфатной группой, присоединенной к нижнему пентозному кольцу; Б - функционирование никотинамидного кольца

Рис. 91. А - строение окисленной формы флавинадениндинуклеотида (ФАД); Б - функционирование изоаллоксалинового кольца.

Рис. 92. Строение кофермента А и ацил-кофермента А.

Рис. 93. Различные нуклеозид- и дезоксинуклеозидтрифосфаты служат специфическими "каналами", по которым энергия АТФ направляется на тот или иной внутриклеточный процесс.

Рис. 94. Две стадии гликолиза. Цифры в скобках означают число молекул, вступающих в данную реакцию.

Рис. 95. Три стадии клеточного дыхания. Стадия 1: мобилизация ацетил-СоА из глюкозы, жирных кислот и некоторых аминокислот. Стадия 2: цикл лимонной кислоты. Стадия 3: перенос электронов и окислительное фосфорилирование - на каждую пару атомов водорода, поступающую в цепь переноса электронов в виде  $\text{NADH}$ , образуются 3 молекулы АТФ.

Рис. 96. Электрон-транспортная цепь митохондрий.

Рис. 97. Реакция восстановления убихинона (кофермента Q).

Рис. 98. Окислительно-восстановительные реакции митохондриальной цепи переноса электронов.

НАДН-КоQ-редуктаза      КоQH<sub>2</sub>-цитохром с-редуктаза  
цитохромоксидоредуктаза

Рис. 99. Схема использования различных веществ для извлечения энергии в процессе дыхания.

Рис. 100. Структура хлорофиллов а и в. R означает группу  $\text{CH}_3$ - в молекуле хлорофилла а и группу  $\text{CHO}$ - в хлорофилле в. Выделена система сопряжен-

Рис. 101. Спектры поглощения хлорофиллов а и в.

ных двойных связей.

Рис. 102. Структурные формулы некоторых распространенных растительных каротиноидов.

Рис. 103. Энергетические переходы в молекуле хлорофилла. t - среднее время жизни данного энергетического состояния.

Рис. 104. Миграция энергии возбуждения в антенном комплексе.

Рис. 105. Расположение и функционирование 4 основных белковых комплексов в тилакоидной мембране хлоропластов.

Рис. 106. Окислительно-восстановительные реакции, осуществляемые основными пигмент-белковыми комплексами фотосинтетической электрон-транспортной цепи.

Рис. 107. Схема путей переноса электрона в тилакоидной мембране (Z-схема).

Рис. 108. Фотосинтетический ВПФ-цикл.

Рис. 109. Пути синтеза типичных растительных углеводов.

Рис. 90. А - строение окисленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАД<sup>+</sup>) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ<sup>+</sup>); Б - функционирование никотинамидного кольца.

Рис. 95.

Три стадии клеточного дыхания. Стадия 1: мобилизация ацетил-СоА из глюкозы, жирных кислот и некоторых аминокислот. Стадия 2: цикл лимонной кислоты. Стадия 3: перенос электронов и окислительное фосфорилирование - на каждую пару атомов водорода, поступающую в цепь переноса электронов в виде NADH, образуются 3 молекулы АТФ

## Лекция 8. ЯДЕРНЫЙ АППАРАТ КЛЕТКИ

*Ядерный аппарат клетки - упаковка ДНК в прокариотической клетке - упаковка ДНК в ядре - прокариотический геном - геном эукариот - геномы эукариотических органелл - краткие выводы*

### ЯДЕРНЫЙ АППАРАТ КЛЕТКИ

Почти вся клеточная ДНК (исключение составляет ДНК митохондрий и хлоропластов) сосредоточена в ядре, которое отделено от остальной цитоплазмы двойной мембраной - *ядерной оболочкой*. В прокариотической клетке ДНК локализована в довольно неупорядоченной, не окруженной мембраной области цитоплазмы, называемой *нуклеоидом*. Какие преимущества дает клетке выделение ядерной зоны и отделение ее от остальной цитоплазмы мембранами? Очевидно, что это преимущество - возможность *процессинга* РНК, т.е. пост-транскрипционной модификации этих молекул. В клетках прокариот транскрипция и белковый синтез протекают почти одновременно: рибосомы уже транслируют 5'-конец молекулы РНК, в то время как ее 3'-конец еще только синтезируется. Напротив, в ядре эукариотической клетки новосинтезированные РНК-транскрипты подвергаются существенной переделке перед тем как выйти из ядра и связаться с цитоплазматическими рибосомами.

Средний диаметр клеточного ядра составляет 10 мкм. По форме ядро достаточно изменчиво: может быть шаровидным, овальным, лопастным, линзовидным и др. Большинство клеток содержит одно ядро, но иногда встречаются двуядерные (некоторые грибы) и многоядерные (некоторые водоросли, поперечно-полосатые мышечные волокна и др.). Форма и структура ядер изменяются в зависимости от функционального состояния клеток, оно четко реагирует на изменение внешних условий. Ядро может двигаться по клетке пассивно с движением цитоплазмы, а иногда способно к самостоятельному движению амебоидного типа.

Ядерная оболочка образована двойной мембраной, представляющей собой два липидных бислоя, которые разделены полостью шириной от 20 до 40 нм, называемой *перинуклеарным пространством*. Наружная ядерная мембрана составляет единое целое с мембранной системой ЭПР (часть 1, рис. 74). Поскольку полость ЭПР сообщается с перинуклеарным пространством, последнее вместе с наружной ядерной мембраной можно рассматривать как небольшой специализированный отдел ЭПР.

Внутреннее содержимое ядра составляет *нуклеоплазма*. В нуклеоплазме находится ХРОМАТИН - диффузный материал, представляющий собой сложный ДНК-белковый комплекс, из которого во время деления клеток формируются ХРОМОСОМЫ. В составе хроматина обнаруживается также РНК и в количественном отношении ДНК, белок и РНК в хроматине находятся

как 1:1.3:0.2. Кроме того, в ядре практически всегда хорошо заметна благодаря способности сильно преломлять свет и сильно связываться с красителями область, называемая **ЯДРЫШКОМ**. Как уже было рассказано в разделе **РИБОСОМЫ**, ядрышко представляет собой место синтеза и сборки цитоплазматических рибосом. Размер ядрышка отражает степень его функциональной активности, которая широко варьирует в различных клетках и может изменяться в зависимости от состояния клетки. Так, в некоторых покоящихся клетках растений ядрышко очень мало, тогда как в клетках, продуцирующих большое количество белков, оно может занимать до 25% всего объема ядра. Во время деления клетки ядрышко исчезает, а затем появляется снова.

В составе ядрышка выявляются большие петли ДНК, содержащие много раз повторяющиеся гены рРНК, которые постоянно с высокой скоростью транскрибируются. Эти петли носят название *ядрышковые организаторы*. В клетках человека примерно 200 генов рРНК локализованы на концах 5 пар хромосом, т.е. на 10 хромосомах из имеющихся 46. Поэтому сразу после деления клетки образуется 10 маленьких ядрышек, которые быстро растут и сливаются друг с другом в одно большое ядрышко (рис. 111). У другого хорошо изученного объекта - лягушки *Xenopus* - ядрышковые организаторы располагаются только на одной паре хромосом, но содержат около 600 генов рРНК.

К внутренней мембране ядерной оболочки со стороны нуклеоплазмы примыкает густая сеть белковых филаментов, которая называется *ядерная ламина*. Ядерная ламина способствует поддержанию формы ядра и выполняет функцию структурного организатора хромосом. В клетках позвоночных ядерная ламина формируется в основном за счет спонтанной ассоциации трех главных полипептидов, которые присоединяются к специфическим интегральным белкам липидного бислоя ядерной мембраны. Некоторые другие компоненты, входящие в состав ядерной ламины, связываются с определенными участками хроматина, обеспечивая его взаимодействие с ядерной оболочкой. Упрощенная схема строения ядерной ламины показана на рис. 112. Полипептиды, образующие ядерную ламину, по-видимому, ответственны за дезинтеграцию и реорганизацию ядерной оболочки в процессе митоза. Предполагают, что причиной разрушения ядерной оболочки во время митоза является фосфорилирование этих полипептидов.

В определенных местах ядерной оболочки наружная и внутренняя

мембраны смыкаются, образуя *ядерные поры*. Поры окружены большими кольцевыми структурами с внутренним диаметром около 80 нм, называемыми *ядерными поровыми комплексами*. По обе стороны ядерной оболочки каждый поровый комплекс представлен 8 белковыми гранулами, симметрично расположенными по окружности поры (рис. 113). Часто на микрофотографиях в центре поры видна крупная частица - "центральная гранула порового комплекса". Однако предполагают, что они представляют собой какие-то частицы, зафиксированные на данных препаратах в момент их продвижения по поровому каналу. Ядерная оболочка типичной животной клетки содержит от 3000 до 4000 поровых комплексов (примерно 11 пор на 1 мкм<sup>2</sup> поверхности ядерной мембраны).

Введенные в клетку небольшие молекулы с мол. массой до 5 кДа столь быстро проникают в ядро, что ядерную оболочку следует считать для них полностью проницаемой. Для белков с мол. массой 17 кДа выравнивание концентраций между цитоплазмой и ядром происходит за 2 мин, для белков с мол. массой 44 кДа - за 30 мин. Введенные в клетку глобулярные белки с мол. массой более 60 кДа оказались практически неспособными проникнуть в ядро. Количественный анализ результатов этих экспериментов позволил рассчитать, что поровые комплексы формируют заполненные водой цилиндрические каналы диаметром 9 нм и длиной 15 нм. Эти размеры хорошо согласуются с данными электронно-микроскопических исследований. Однако возникает проблема при объяснении, каким образом транспортируются в цитоплазму новосинтезированные в ядрышке рибосомные

субъединицы, диаметр которых около 15 нм, и как в ядро импортируются синтезированные в цитоплазме ферменты ДНК- и РНК-полимеразы с мол. массами от 100 до 200 кДа. Общепринятой считается точка зрения, согласно которой они транспортируются через ядерные поры с помощью системы *избирательного активного переноса*: гранулы порового комплекса специфически взаимодействуют с переносимой частицей и обратимо меняют ее конформацию во время переноса, например "заставляют" принять палочкообразную форму. Альтернативная возможность состоит в том, что транспортируемая частица, специфически взаимодействуя с белками порового комплекса, увеличивает диаметр порового канала на время ее переноса.

### УПАКОВКА ДНК В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКЕ

Длина вытянутой молекулы ДНК во много раз превышает размеры содержащего ее компартмента (таблица 9). Если бы молекулы ДНК были свернуты беспорядочно, то и в этом случае их не удалось бы разместить в отведенном им пространстве (задача 38). Молекулы ДНК в клетке упакованы специальным образом, при этом упаковка ДНК в прокариотической и эукариотической клетке принципиально различна.

Таблица 9 Сравнение длины

ДНК с размерами компартмента, в котором она упакована.

	Размер, мкм		Общая длина ДНК
Бактериофаг Т4	0.065&0.10	1 молекула ДНК	55 мкм (170 т.п.н. *)
Бактерия <i>E.coli</i>	1.7&0.65	1 молекула ДНК	1.3 мм (4.2710 <sup>3</sup> т.п.н.)
Митохондрия человека	3.0&0.5	10 идентичных молекул ДНК	50 мкм (5 мкм = 16 т.п.н. каждая)
Ядро клетки человека	диаметр 6.0	46 хромосом * т.п.н.	1.8 м (6710 <sup>6</sup> т.п.н.) тысяч пар нуклеотидов

Нуклеоид прокариотической клетки содержит примерно 80% ДНК, остальное приходится, главным образом, на белки. Геном прокариот представляет собой кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК, концы которой ковалентно замкнуты друг на друга. Кроме того, кольцевые молекулы ДНК прокариот являются *отрицательно сверхспиральными*, или сверхскрученными. Это результат того, что двойная спираль, прежде чем концы ее цепей соединились в кольцо, была частично раскручена. Обратное скручивание сообщает кольцевой молекуле ДНК вращающий момент, вследствие чего она закручивается сама на себя (рис. 114). Если такую сверхспиральную ДНК, в которой запасена дополнительная энергия, подвергнуть действию *эндонуклеазы* (фермента, делающего однонитевый разрыв в ДНК), то скрученность, вызванная обратным вращением, снимается, и ДНК переходит в свое обычное низкоэнергетическое *релаксированное* состояние. Энергия напряжения сверхспиральной ДНК (*энергия суперспирализации*) примерно пропорциональна квадрату числа сверхспиральных витков. Сверхспиральная ДНК намного более компактна, чем релаксированное кольцо. Сверхспиральность важна также для регуляции генетических процессов у прокариот, поскольку некоторые регуляторные белки и ферменты не связываются с ДНК, если она находится не в сверхспиральной форме. Специальные ферменты, называемые *топоизомеразами*, регулируют степень сверхспиральности ДНК, увеличивая или уменьшая число сверхвитков.

Еще одной особенностью структурной организации прокариотической ДНК является образование множества петель, образованных и закрепленных с помощью белков (рис. 115). Каждая из этих петель сверхспирализована, причем степень сверхспиральности петли не зависит от степени сверхспиральности соседних петель. В молекуле ДНК *E. coli* насчитывается около 100 таких петель, каждая в среднем состоит из 40 тыс. пар нуклеотидов

(п.н.), а средняя степень сверхспиральности *in vivo* соответствует 1 отрицательному супервитку на каждые 200 п.н. Образование петель и сверхспиральность обеспечивают у прокариот упаковку очень больших кольцевых молекул ДНК в малых объемах, не ограниченных мембранами. Кроме того, ДНК бактериальной клетки прикреплена в одной или нескольких точках к внутренней поверхности клеточной мембраны.

Задача 38. Представьте, что молекулы ДНК, перечисленные в Табл. 9, представляют собой статистические клубки. Рассчитайте характерный объем таких клубков и сравните его с объемом компартментов, в которых упакованы эти молекулы. Длина статистического сегмента двухцепочечной молекулы ДНК составляет 100 нм.

### УПАКОВКА ДНК В ЯДРЕ

В неделящихся эукариотических клетках ДНК входит в состав *хроматина*, который выглядит как аморфный беспорядочно распределенный по клеточному ядру материал. Он состоит из очень тонких волокон, которые содержат ~60% белка, ~35% ДНК и ~5% РНК. В структуре хроматиновых волокон выделяют 4 уровня структурной организации. Первый **НУКЛЕОСОМНЫЙ** уровень образуется за счет специфического взаимодействия двойной спирали ДНК с белками, называемыми *гистонами*. Гистоны

- это небольшие белки с очень высоким содержанием (20 - 35%) положительно заряженных аминокислот (лизина и аргинина). Суммарный положительный заряд позволяет гистонам прочно связываться с ДНК независимо от ее нуклеотидного состава. В ядре любой эукариотической клетки всегда присутствуют 5 разных гистонов. Гистоны Н2А (14 кДа), Н2В (13.7 кДа), Н3 (15.3 кДа) и Н4 (11.3 кДа), объединяясь по 2 молекулы каждого вида, формируют плотную белковую 8-ми субъединичную структуру, на которую, как на катушку, наматывается молекула двух-

цепочечной ДНК (рис. 116). Такая структура из белковой сердцевины ("кора") с намотанной на него ДНК называется **НУКЛЕОСОМОЙ**. Нуклеосомы регулярно повторяются вдоль молекулы ДНК, разделенные лишь короткими *линкерными участками* (в среднем 54 п.н.), и является основной структурной единицей хроматина. Пятый вид гистонов - гистон Н1 (23 кДа) - соединяет соседние нуклеосомы. Его молекула имеет центральную глобулярную часть и вытянутые N- и C-концевые участки (рис.

116). Центральная глобула Н1 присоединяется к специфическому участку на поверхности нуклеосомы, а вытянутые "плечи" примыкают, с одной стороны, к линкерной ДНК в области ее контакта с нуклеосомной частицей, а с другой стороны, к белковой сердцевине соседней нуклеосомы. Таким образом, гистон Н1 как бы стягивает соседние нуклеосомы друг с другом. Так же, как и расплетание-"плавления" двухцепочечной ДНК, присоединение гистона Н1 к нуклеосомной нити является кооперативным процессом, т.е. каждая индивидуальная молекула Н1 более охотно связывается с ДНК в непосредственной близости от другой, уже присоединившейся молекулы Н1, и, следовательно, соединение и разъединение нуклеосом происходит кластерами.

Белковая сердцевина каждой нуклеосомы представляет собой уплощенную частицу размером 11×10×5.5 нм. ДНК, намотанная на сердцевину, имеет длину в 146 п.н. и образует 1.75 оборота левозакрученной суперспирали с шагом примерно 2.8 нм. Гистоны способны самопроизвольно формировать белковый кор и связывать ДНК *in vitro*, однако сборка нуклеосом значительно ускоряется в ядре под действием дополнительных белков негистоновой природы и контролируется белком *нуклеоплазмином*. Четыре гистона, формирующие нуклеосому, являются самыми эволюционно консервативными из известных белков (например, первичные структуры гистонов Н4 у столь эволюционно далеких организмов как горох и корова различаются всего лишь двумя заменами аминокислотных остатков). Такая эволюционная стабильность предполагает, что эти гистоны играют очень ответственную роль, и что они наилучшим образом приспособлены к выполнению своих функций. Гистон Н1 в каждой клетке представлен несколькими очень похожими разновидностями. За исключением центрального участка молекулы, аминокислотная



последовательность H1 в значительно большей степени подверглась изменениям в процессе эволюции, чем первичная структура нуклеосомных гистонов.

С нуклеосомной организацией хроматина связано несколько не ре-

шенных пока вопросов. Например, не ясно, как расположены нуклеосомы в одном и том же гене в клетках разных тканей одного организма - в одних и тех же местах гена или нет? Эта проблема называется проблемой *фазирования* нуклеосом. Другой вопрос связан с биологическим значением ковалентных модификаций гистонов. Например, ацетилирование некоторых остатков лизина и фосфорилирование определенных остатков серина уменьшает суммарный положительный заряд гистонов. Такие ковалентные модификации гистонов легко обратимы: ацетильные группы постоянно присоединяются к остаткам лизина ферментом *гистонацетилазой*, а затем отщепляются другим ферментом - *гистондеацетилазой*, так что средняя продолжительность пребывания в молекуле гистона каждой ацильной группы составляет около 10 мин, и картина ацетилирования нуклеосом в ядре постоянно меняется. Другим примером обратимой модификации гистонов в ядре служит ковалентное связывание примерно 10% всех молекул гистона H2A с маленьким (74 а.о.) белком *убикитином*. Кроме того, с нуклеосомами могут нековалентно связываться и другие белки, например, так называемые HMG-белки, всегда присутствующие в большом количестве в ядрах. Предполагают, что все эти обратимые ковалентные и ковалентные модификации каким-то образом участвуют в регуляции активности генов. Между тем известны и необратимые модификации нуклеосомных гистонов: многие клетки в небольшом количестве синтезируют одну или несколько вариаций гистонов, которые слегка отличаются по аминокислотной последовательности от своих основных аналогов, и биологическое значение которых пока неизвестно.

Первый структурный уровень хроматина - нуклеосомная нить - имеет диаметр 11 нм и наблюдается в условиях низкой ионной силы при отсутствии гистона H1. Рассеяние нейтронов и электрический дихроизм показали, что нуклеосомы в таких нитях ориентированы бок о бок

друг к другу, а их торцы не сильно отклоняются от оси нити. При этом линейная молекула ДНК, упакованная таким образом, становится короче всего лишь в  $(200 \text{ п.н.} \cdot 0.34 \text{ нм}) / (10 \text{ нм} + 54 \text{ п.н.} \cdot 0.34) \sim 2.4$  раза. В условиях высокой ионной силы и в присутствии гистона H1 формируются нити с диаметром 30 нм. Это следующий структурный уровень хроматина, называемый **ХРОМАТИНОВЫЕ ФИБРИЛЛЫ**. Как уложены нуклеосомы в составе такой фибриллы, неизвестно. На рис. 117 показаны два варианта такой укладки, спиральный вариант считается более вероятным. В обоих случаях молекула ДНК становится еще в 16.7

раза короче. Третий уровень организации хроматина - это формирование петель, которые формируются из хроматиновых фибрилл и поддерживаются с помощью ДНК-связывающих белков, которые узнают специфические нуклеотидные последовательности двух отдаленных друг от друга участков хроматиновой фибриллы и сближают их (рис. 118). Длина собранной в петлю ДНК может варьировать от 20 до 80 тыс. п.н. даже в ядре одной клетки, однако средняя длина петли у разных организмов обычно составляет около 0.4 мкм. Собранная в петли ДНК укорачивается еще примерно в 12.5 раз.

Во время деления клетки хроматин *конденсируется*, образуя строго определенное свойственное данному виду число **ХРОМОСОМ** (таблица

10). Каждая эукариотическая хромосома содержит одну единственную линейную молекулу ДНК. Типичная *митотическая* (т.е. наблюдаемая во время митоза) хромосома (рис. 119) состоит из двух *хроматид*, соединенных между собой с помощью специального образования - *центромеры*, или *кинетохора*. Детальная картина укладки ДНК в составе хроматид пока не совсем ясна, но представляется вероятным, что хроматиновые петли прикрепляются в хроматиде к центральному остову и укладываются в компактную плотную спираль (рис.

120), при этом молекула ДНК становится короче еще примерно в 20 раз, так что длина хромосомы человека, например, не превышает 5 мкм. При столь плотной упаковке информация с ДНК считываться не может, поэтому после деления клетки происходит *деконденсация* хромосом. Однако вероятно в активном хроматине сохраняется петельная организация хроматиновых фибрилл.

Таблица 10 Нормальное число

хромосом у разных организмов			
Аскарида 2	Гидра	30	Еж 48
Дрозофила 8	Лиса	34	Курица 78
Клевер 14	Тополь	38	Утка 80
Горох 14	Кошка	38	Береза 84
Пчела 16	Мышь	40	Карп 104
Кукуруза 20	Крыса	42	Минога 174
Ель 24	Кролик	44	Хвощ 216
Лягушка 26	Человек	46	Ужовник 480

Задача 39. Используя данные табл. 9, оцените число нуклеосом в ядре человеческой клетки.

### ПРОКАРИОТИЧЕСКИЙ ГЕНОМ

ДНК бактерий содержит от  $1.6710^5$  п.н. (самая маленькая прокариотическая клетка - микоплазма) до  $10^7$  п.н. Двухцепочечная кольцевая молекула ДНК *E. coli* состоит примерно из 4.2 млн. п.н. Если принять, что полипептидная цепь белка содержит в среднем 350 азотистых оснований (а.о.), то ей соответствует средний ген, состоящий из 1050 п.н. Размера ДНК *E. coli* достаточно для кодирования  $4.2710^6/1050 \sim 4000$  генов. Того же порядка число полипептидов обнаруживают в клетке *E. coli*. Большинство из этих генов кишечной палочки изучено и картировано. Упрощенная карта ДНК *E. coli* показана на рис. 121. Кроме очень большой кольцевой молекулы ДНК, находящейся в нуклеоиде, большинство бактерий содержат дополнительные маленькие кольцевые молекулы ДНК, которые находятся в свободном состоянии в цитоплазме клетки и называются *плазмидами*. Это автономные элементы прокариотического генома, которые способны самостоятельно реплицироваться независимо от главной молекулы ДНК, и число копий, характерное для данной плазмиды, поддерживается постоянным в бактериальной клетке. При делении бактерии плазмиды реплицируются и переходят в дочерние клетки. В большинстве случаев плазмиды очень малы и содержат всего лишь несколько генов, однако, как правило, это весьма полезные для бактериальной клетки гены. Некоторые плазмиды несут гены, кодирующие синтез *бактериоцинов* - веществ, позволяющих одним бактериям победить других в борьбе за существование, другие защищают клетку от различных неблагоприятных воздействий извне и прежде всего помогают противостоять действию *антибиотиков*.

Иногда плазмиды могут встраиваться в главную молекулу ДНК и находиться в ней, как ее часть, подобно любой другой последовательности. Встроенные плазмиды называют *эписомами*. Эписома может также выщепляться из главной молекулы ДНК и опять становиться свободной плазмидой. Кроме плазмид у бактерий есть еще *мобильные генетические элементы*, способные вырезаться в одном месте генома и встраиваться в другом благодаря имеющимся у них на концах последовательностям нуклеотидов (прямым или инвертированным повторам). Наиболее простые мобильные генетические элементы - это *вставочные последовательности*, или *IS-элементы* (от англ. insertion sequences). IS-элементы имеют длину от нескольких сотен до 1.5 тыс. п.н. и часто входят в состав более сложных мобильных генетических элементов, называемых *транспозонами* (от лат. transpositio - перемещение) или *Tn-элементами*. В состав транспозонов часто входят различные структурные гены,

кодирующие устойчивость к разным антибиотикам, солям металлов или синтез токсинов. Мобильные генетические элементы во время своих перемещений по геному могут внедряться в различные гены, нарушая их работу. Частота транспозиции варьирует для различных элементов в пределах, сравнимых с частотой спонтанных мутаций (от  $10^{-5}$  до  $10^{-7}$  на поколение).

## ГЕНОМ ЭУКАРИОТ

В ходе эволюции у эукариот сформировался геном, который существенно отличается от генома прокариот. Геном высших организмов в первую очередь характеризуется таким свойством как *избыточность*. Содержание ДНК у эукариот в расчете на 1 клетку в среднем на 2-3 порядка выше, чем у прокариот, и для разных организмов оно колеблется в интервале от  $10^{10}$  до  $10^{13}$  Да. Хотя такой размер генома теоретически позволяет кодировать свыше  $10^6$  различных белков, оценки числа функционирующих генов у эукариот колеблются в интервале от  $10^4$  до  $2710^5$ . Возможно существуют "молчащие" гены, необходимые клетке для реализации редко встречающихся программ. Однако это не является единственной причиной большого количества ДНК в клетках эукариот. Повышение количества ДНК у эукариот связано прежде всего с усложнением регуляторных процессов в клетках. Это усложнение выражается в том, что размеры единиц транскрипции у эукариот, как правило, на порядок превышают размеры зрелых молекул мРНК, а также в том, что значительную часть генома у эукариот составляют последовательности, служащие исключительно для целей регуляции. Однако общее количество ДНК в клетке нельзя рассматривать как простой показатель функциональной и структурной сложности организма (рис. 122). Например, у некоторых рыб количество ДНК на ядро в 10 раз больше, чем у человека. Содержание ДНК может сильно варьировать даже у отдельных организмов одного рода. Все это говорит о реальной избыточности ДНК в клетках высших организмов.

Другая структурная особенность генома эукариот - это *блочный характер организации*. Блочность строения проявляется на разных уровнях. Это и длинные блоки с разным GC-содержанием, и многочисленные короткие участки, сильно обогащенные определенными (пуриновыми или пиримидиновыми) нуклеотидами, и гомополимерные последовательности. Блочность строения проявляется и в структуре индивидуальных генов, которые часто состоят из отделенных друг от друга зон (*экзонов*), соответствующих, по-видимому, отдельным доменам кодируемых ими белков, разделенных некодируемыми последовательностями (*интронами*). Наличие генов с интронами характерно для эукариот, тогда как в геноме прокариот интронов не обнаружено. Геному эукариот свойственна также способность к перестройкам. Ярким примером геномных перестроек являются процессы перемещения отдельных участков генов, происходящие при формировании генов иммуноглобулинов. Другим примером может служить массовое увеличение числа копий (*амплификация*) некоторых структурных генов. Примером амплификации могут служить многочисленные повторы генов рРНК в петлях ядрышковых организаторов. Однако геномные перестройки, по-видимому, все-таки носят ограниченный характер, вследствие чего общий план организации генома отдельных организмов сохраняется на протяжении многих поколений.

*Уникальные (неповторяющиеся) последовательности* - наиболее сложный и, как правило, основной по массе компонент генома эукариот. Однако доля их у разных организмов может составлять от 15 до 98%. В целом процентное содержание уникальных последовательностей у низших эукариот заметно выше, чем у высших. Особенно мало уникальной ДНК у растений. Во фракции уникальной ДНК находится большинство структурных генов эукариот. Однако далеко не все уникальные последовательности представляют собой участки, кодирующие белки. Доля таких участков, как правило, не превышает 1 - 2%. Большая часть транскрибирующихся уникальных последовательностей не кодирует мРНК цитоплазмы, а выполняет какие-то специальные

функции в ядре. Более половины уникальной ДНК вообще не транскрибируется в клетках, хотя и сохраняется в эволюции. Возможно она служит чисто структурным целям, возможно является средством борьбы с мутациями. Назначение информационной избыточности уникальной ДНК, как и избыточности ДНК вообще, - проблема, которая еще ждет своего решения.

В ДНК эукариот содержатся последовательности, повторяющиеся от нескольких десятков до миллиона раз на геном. Хорошо изученным компонентом часто повторяющихся последовательностей является *сателлитная* ДНК, которая обычно обнаруживается в виде отдельного (сателлитного) пика при центрифугировании молекул ДНК в градиентах плотности CsCl. Сателлитные ДНК состоят из коротких (2 - 20 пар нуклеотидов) повторяющихся последовательностей, образующих длинные блоки. Количество таких сателлитных ДНК в ДНК разных организмов варьирует от 1 до 80%, а число отличающихся по плавучей плотности сателлитных ДНК в одном организме может достигать 10 - 12. Одной из интересных общих черт строения сателлитной ДНК является присутствие в каждой цепи лишь 2 - 3 из 4 возможных нуклеотидов. В хромосомах они локализуются преимущественно в центромерных районах, поэтому предполагаемые функции сателлитной ДНК связывают с ролью этих последовательностей в поддержании структурной целостности хромосом, в стабилизации центромер, с участием в узнавании гомологичных хромосом при мейозе, а также с участием в контроле за размерами ядра и клеточным ростом. Другой компонент часто повторяющихся последовательностей - это *обращенные повторы (палиндромы)*. Значительная часть обращенных повторов транскрибируется в составе РНК и образуют структуры, называемые *шпильки*. Предполагается, что такие шпильки служат сигналами для ферментов, осуществляющих процессинг и сплайсинг РНК, ДНК-полимеразы и участвуют в терминации транскрипции для РНК-полимераз.

Наряду с частыми повторами в ДНК высших организмов присутствуют последовательности, повторяющиеся с меньшей частотой (от 10 до  $10^4$  копий на гаплоидный геном) - *умеренно повторяющиеся последовательности*. Это полифункциональный класс последовательностей, в который входят транскрибируемые структурные гены и контролирующие (регуляторные) элементы генома. Кроме того, предполагают, что в геноме млекопитающих некоторые семейства умеренных повторов имеют вирусную природу. В геноме эукариот находят также мобильные генетические элементы, аналогичные прокариотическим IS- и Tn-элементам. Большая часть изученных к настоящему времени генов у эукариот не являются уникальными, а представлены или множеством сходных копий, или ограниченным набором дублированных и дивергировавших в разной мере последовательностей, называемыми *мультигенными семействами*. Повторяемость генов в мультигенных семействах необходима или для усиления дозы генов (*дозовая повторяемость*), или для обеспечения синтеза различных вариантов родственных полипептидов (*вариантная повторяемость*). Дозовая повторяемость характерна для генов, кодирующих тРНК и рРНК, а также гистоновых генов. Варибельная повторяемость свойственна таким генам, как глобиновые, актиновые, иммуноглобулиновые и многим другим. Наряду с нормально функционирующими генами в мультигенных семействах у эукариот встречаются *псевдогены (j-гены)*, гомологичные функционирующим, но по разным причинам не способные функционировать. Играл ли они какую-либо специальную роль или просто являются "поломанными" генами, не известно, хотя есть косвенные указания на то, что их присутствие нужно для нормального функционирования соседних генов.

## ГЕНОМЫ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ОРГАНЕЛЛ

Геномы органелл представляют собой кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК. Исключение составляют инфузории, у которых митохондриальная ДНК представлена линейной молекулой. Структура генома органелл скорее напоминает структуру

бактериального генома, чем хроматин эукариот. В организации хлоропластной ДНК обнаружены гистоноподобные белки, однако по аминокислотному составу они отличаются от типичных гистонов высших растений и более сходны с ДНК-связывающими HU-белками клеток *E. coli* и гистоноподобными белками цианобактерий. Возможно, что гистоноподобные белки хлоропластных нуклеоидов являются эволюционными предшественниками гистонов эукариотических клеток, однако нуклеосомы в хлоропластной ДНК так же, как и в ДНК митохондрий, отсутствуют. Часть белков, необходимых для функционирования этих органелл, кодируются их собственной ДНК и синтезируются на рибосомах внутри органеллы, тогда как остальные белки кодируются ядерной ДНК, синтезируются рибосомами цитоплазмы и поступают в органеллы благодаря их лидерным последовательностям. Каждый из мембранных комплексов электрон-транспортной цепи, а также АТФ-синтетаза, имеют смешанное кодирование: одни субъединицы синтезируются внутри органеллы, а другие приходят из цитоплазмы. Сборка таких комплексов происходит затем при участии специальных вспомогательных белков чаперонов (от англ. *chaperon*). Транспорт белков между цитоплазмой и органеллами идет только в одном направлении: определенные белки "импортируются" митохондриями и хлоропластами, но не известно ни одного белка, который бы эти органеллы "экспортировали". Между органеллами и остальной клеткой не происходит также обмена молекулами РНК и ДНК. Функционирование двух генетических систем эукариотической клетки (органелльной и ядерной) тесно координированы в процессе построения органеллы с помощью не известных пока механизмов обратной связи.

Хлоропластная ДНК так же, как и в бактериальной клетке, находится в составе компактных структур *нуклеоидов*. Хлоропласт содержит обычно несколько нуклеоидов и в каждом нуклеоиде имеется обычно несколько копий хлоропластной ДНК. Хлоропласты высших растений содержат в среднем  $3 - 8710^{-15}$  г ДНК на 1 пластиду. У водорослей содержание ДНК колеблется в более широких пределах -  $4 - 17710^{-15}$  г/хлоропласт. Геном состоит из нескольких копий кольцевой двухцепочечной ДНК, размеры которой варьируют в зависимости от вида у высших растений в пределах 120 - 190 тыс. п.н. (контурная длина - 40 - 46 мкм), а у водорослей от 86 тыс. п.н. (27.3 мкм) у рода *Codium* до 600 тыс. п.н. (62 мкм) у родов *Acetobularia* и *Chlamidomonas*. Хлоропластный геном довольно консервативен в эволюционном отношении, и разница в размерах хлоропластной ДНК определяется, как правило, числом дублированных генов. По мере развития хлоропласта увеличивается количество нуклеоидов в пластидах и кол-во хлоропластной ДНК на хлоропласт. Число и форма нуклеоидов зависят также от интенсивности и спектрального состава света. У всех высших растений хлоропластная ДНК содержит  $37.8 + 1\%$  (Г+Ц), а плавучая плотность в CsCl равна  $1.7 \text{ г/см}^3$ , что близко к параметрам ядерной ДНК. Однако ядерная ДНК растений всегда содержит 5-метилцитозин, тогда как в хлоропластной ДНК это модифицированное основание отсутствует. Необычность хлоропластной ДНК проявляется также в том, что она содержит удаленные друг от друга встроенные рибонуклеотиды: обычно 9 в одной цепи кольцевой молекулы и 10 - в другой. Митохондриальные ДНК животных тоже содержат рибонуклеотиды. У разных растений, за редким исключением, структура генома примерно одинакова. Она состоит из большого и малого однокопийных участков, разделенных *инвертированными повторами*, которые содержат гены хлоропластных рРНК. В некоторых хлоропластных генах обнаружены интроны, однако возможно, что это остатки каких-то мобильных генетических элементов. Для некоторых растений, например, печеночного мха *Marchantia polymorpha*, риса и табака была определена полная нуклеотидная последовательность хлоропластной ДНК. Типичный для покрытосемянных растений набор генов хлоропластной ДНК табака включает 4 гена рРНК, 30 генов тРНК и 79 генов, кодирующих белки.

В то время как геном хлоропластов примерно одинаков по величине у всех организмов, митохондриальные геномы у растений намного больше, чем у животных. В митохондриях

животных геном представлен одной кольцевой молекулой ДНК длиной 16.2 - 18.4 тыс. п.н., представленной 5 - 10 копиями, а у растений геном в 30 - 100 раз больше и составлен из нескольких, вероятно, слегка различных кольцевых ДНК, каждая из которых представлена несколькими копиями. Большие размеры (~ 84 тыс. п.н.) митохондриальной ДНК имеют дрожжи, но оказалось, что у них значительная часть ДНК не выполняет кодирующей функции, причем длинные некодирующие области включены внутрь некоторых генов, т.е. представляют собой интроны. Митохондриальная ДНК дрожжей содержит 2 гена рРНК, примерно 30 генов тРНК и 8 генов, кодирующих белки. Нуклеотидные последовательности ДНК митохондрий человека, мыши и коровы были полностью определены. Геном митохондрий позвоночных мал, потому что имеет чрезвычайно компактную структуру генов, в которых нет интронов. Например, в кодировании 2 генов рРНК, 22 генов тРНК и 13 генов, кодирующих белки, задействована почти вся нуклеотидная последовательность ДНК из митохондрий человека. У печеночного мха *Marchantia polymorpha*, как, вероятно, и у других растений в митохондриальной ДНК содержится больше генов: 3 гена рРНК, 27 генов тРНК и примерно 60 генов, кодирующих белки.

### КРАТКИЕ ВЫВОДЫ

Компактизация ДНК важна для организмов по двум причинам: 1) позволяет упорядоченно расположить очень длинные молекулы ДНК в небольшом объеме без потери доступности для считывания информации; 2) это один из способов дифференциальной регуляции активности разных участков генома, т.к. активность генов зависит от характера упаковки ДНК. У прокариот компактизация ДНК достигается сверхспирализацией и петельной организацией. У эукариот прослеживается иерархия из 4 уровней упаковки ДНК от нуклеосомной нити до структуры хромосомы. В обоих случаях организация структуры генетического материала осуществляется при помощи специальных ДНК-связывающих белков.

Геном эукариот устроен намного сложнее, чем прокариотический геном, что связано прежде всего с повышением уровня сложности регуляции генетических процессов, а не за счет увеличения количества структурных белков и ферментов в клетке. Блочный характер строения генома эукариот является еще одной реализацией принципа комбинаторного увеличения разнообразия: например, за счет объединения "мини"-генов (экзонов) в один "супер"-ген могут возникать функционально новые белки. В эволюции генома, вероятно, активную роль играют мобильные генетические элементы.

Рис.111. Упрощенная схема участия 10 ядрышковых организаторов в образовании ядрышка в ядре человеческой клетки.

Рис. 112. Упрощенная схема строения ядерной ламины.

Рис. 113. Схема строения и расположения ядерных поровых комплексов ядерной оболочки.

Рис. 114. Сверхспирализация в кольцевой ДНК.

Рис. 116. Организация нуклеосомной нити.

Рис. 120. Иерархия уровней упаковки ДНК в составе хроматина.

Рис. 118. Петельная организация хроматина.

Рис. 121. Упрощенная карта ДНК *E. coli*.

Рис. 122. Размеры генома разных организмов.

Рис. 115. Петельная организация генома бактерий.

Рис. 117. Две модели, предложенные для объяснения упаковки нуклеосомной нити в составе 30 нм-хроматиновой фибриллы.

Рис. 119. Строение митотической хромосомы.

## Лекция 9. ТРАНСКРИПЦИЯ И ТРАНСЛЯЦИЯ

*Транскрипция - инициация транскрипции - элонгация и терминация транскрипции - модификация и процессинг эукариотических РНК-транскриптов - генетический код - биосинтез белка - трансляция у прокариот - трансляция у эукариот - краткие выводы*

Геном, т.е. молекула ДНК, содержит в себе скрытый план или схему развития организма. Реализация этого плана осуществляется белками, которые закодированы в ДНК. Свойства и признаки организма, его индивидуальные особенности - все это определяется белковым набором. Поэтому синтез белка является фундаментальным генетическим процессом. Интенсивность синтеза белка, кодируемого каким-либо геном, называется *экспрессией*, т.е. самовыражением, этого гена. Экспрессия гена состоит из двух этапов - ТРАНСКРИПЦИИ и ТРАНСЛЯЦИИ.

### ТРАНСКРИПЦИЯ

Транскрипция происходит в три стадии: 1) *инициация*, 2) *элонгация* и 3) *терминация*. Основным ферментом, осуществляющим транскрипцию, является *РНК-полимераза*. Так же, как и рибосомы, РНК-полимеразы бывают двух типов - прокариотические и эукариотические. РНК-полимераза прокариотического типа состоит из 5 субъединиц четырех видов (a, b, b' и s) и имеет состав  $a_2bb's$ . Лучше всего изучена РНК-полимераза из *Escherichia coli*: мол. масса ее субъединиц составляет 40 кДа (a), 155 кДа (b), 160 кДа (b') и 85 кДа (s), фермент имеет несколько вытянутую форму и его максимальные размеры достигают 15 нм. a-, b- и b'-субъединицы разных видов бактерий имеют довольно близкую мол. массу, тогда как мол. масса s-субъединицы варьирует в значительных пределах - от 44 до 92 кДа. Полный фермент (*голофермент*) состава  $a_2bb's$  нужен только для инициации транскрипции, а затем s-субъединица (*s-фактор*) освобождается из комплекса и элонгация осуществляется *минимальным ферментом* состава  $a_2bb'$ . У многих бактерий один и тот же минимальный фермент может взаимодействовать с разными s-факторами, одновременно присутствующими в клетке, и тогда происходит инициация транскрипции только определенной группы генов, "обслуживаемых" данным s-фактором. В некоторых случаях, например, при переходе бактерии к споруляции, блокируется синтез "обычного" и активируется синтез нового s-фактора. Это приводит к прекращению транскрипции одной группы генов и инициации транскрипции новой группы генов, т.е. к смене генетических программ в клетке. Общее количество РНК-полимераз, присутствующих в клетке *Escherichia coli*, оценивается как 7 тыс., в зависимости от условий роста в синтезе РНК может быть занято одновременно от 2 до 5 тыс. молекул фермента. РНК-полимеразы, кодируемые геномом размножающихся в бактериальных клетках *бактериофагов*, устроены гораздо проще прокариотических РНК-полимераз и состоят всего лишь из одной полипептидной цепи, но могут инициировать транскрипцию только определенных генов. Следовательно, сложность прокариотической

РНК-полимеразы, по крайней мере частично, отражает наличие множества сигналов контроля, на которые она должна отвечать.

В ядре эукариот одновременно присутствуют три разные РНК-полимеразы эукариотического типа. РНК-полимераза I локализована в ядрышках и ответственна за транскрипцию генов рРНК, на ее долю приходится 50 - 70% клеточного синтеза РНК. В остальной части ядра локализованы РНК-полимераза II, обеспечивающая синтез гетерогенной ядерной РНК (предшественников мРНК), и РНК-полимераза III, обеспечивающая синтез многих малых РНК и тРНК. На их долю приходится 20 - 40% и 10% общего клеточного синтеза РНК соответственно. Каждая из эукариотических РНК-полимераз представляет собой крупный белковый агрегат, состоящий из двух больших субъединиц (примерно 200 и 140 кДа) и из порядка 10 маленьких субъединиц, варьирующих по мол. массе от 10 до 90 кДа. Ядра высших эукариот содержат около 40000 молекул РНК-полимеразы II, примерно такое же число молекул РНК-полимеразы I и вдвое меньше молекул РНК-полимеразы III, причем точное количество этих ферментов варьирует в зависимости от скорости роста клетки. Кроме ядерных РНК-полимераз в эукариотической клетке есть свои собственные РНК-полимеразы в митохондриях и хлоропластах, относящиеся к прокариотическому типу. Хлоропласты имеют две разные РНК-полимеразы, одна из которых кодируется ядерным геномом, а другая - пластидным геномом: для транскрипции гена внутрипластидной РНК-полимеразы необходимо поступление в хлоропласт синтезированной в цитоплазме пластидной РНК-полимеразы ядерного кодирования.

### ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ

Для инициации транскрипции необходим определенный участок молекулы ДНК, называемый ПРОМОТОРОМ. Он отличается от *стартовой точки*, которой служит пара оснований в ДНК соответствующая нуклеотиду, который первым включается в транскрипт, синтезируемый РНК-полимеразой. Промотор необходим для специфического связывания РНК-полимера-

зы с молекулой ДНК. ДНК, предшествующая стартовой точке, называется последовательностью, расположенной *против хода транскрипции*; ДНК после стартовой точки называется последовательностью, расположенной *по ходу транскрипции*. Последовательность ДНК принято записывать так, что транскрипция происходит слева направо (это соответствует обычному написанию мРНК в направлении от 5'-конца к 3'-концу). Положения оснований нумеруются в обоих направлениях, начиная от стартовой точки, которую обозначают как +1. По ходу транскрипции происходит нарастание порядковых номеров оснований. Позиции оснований, расположенных против хода транскрипции, обозначаются со знаком минус, и значения номеров возрастают по мере удаления от стартовой точки.

Исследование большого числа промоторов показало, что последовательности нуклеотидов, способные создавать сигнал для связывания РНК-полимеразы, сильно варьируют, хотя и обладают рядом общих структурных особенностей. У *E. coli* против хода транскрипции от стартовой точки располагается область из 6 п.н., которая может быть обнаружена почти во всех промоторах. Эта последовательность может быть разной, но всегда похожа на последовательность ТАТААТ, которая называется *блоком Прибнова* (Pribnow). Сам блок Прибнова встречается достаточно редко, но он является *среднестатистической* или *канонической последовательностью*, составленной из оснований, наиболее часто встречающихся в каждой позиции. Каноническая последовательность может также быть представлена в виде  $T_{80}A_{95}T_{45}A_{60}A_{50}T_{96}$ , где цифрами показана частота (процент) встречаемости основания в данном положении. Центр блока Прибнова обычно располагается примерно на расстоянии 10 п.н. от стартовой точки против хода транскрипции. Поэтому иногда этот блок обозначают просто как *положение -10*. В действительности положение гексануклеотидного участка варьирует от -11 до -5 или



от -14 до -8, причем последний интервал встречается чаще. Сходная последовательность обнаруживается в другом положении с центром около нуклеотидного остатка -35. Этот участок называется *последовательностью* -35 и имеет структуру T<sub>82</sub>T<sub>84</sub>G<sub>78</sub>A<sub>65</sub>C<sub>54</sub>A<sub>45</sub>. Тогда как участок -10 входит непосредственно в область связывания ДНК с РНК-полимеразой, участок -35 лежит за пределами области прочного связывания, но, вероятно, важен на первом этапе взаимодействия РНК-полимеразы и ДНК и называется также *областью узнавания*. Расстояние между положениями -10 и -35 варьирует от 16 до 19 п.н. Хотя типичный промотор *E. coli* содержит оба участка -35 и -10, имеется ряд промоторов, не содержащих последовательности -35. Однако такие промоторы содержат расположенный рядом участок, который узнается дополнительным регуляторным белком, способствующим инициации. Обнаружено также очень небольшое число промоторов, лишенных последовательности -10. Поскольку участки -35 и -10 могут отсутствовать, можно предполагать существование других способов специфического узнавания РНК-полимеразой участка начала транскрипции, однако сколько существует таких механизмов и как они реализуются, пока не известно. Кроме того, для разных бактериальных  $\sigma$ -факторов может существовать своя собственная консервативная последовательность -35 и -10.

В случае эукариотической РНК-полимеразы II тоже находят две промоторные последовательности, аналогичные участкам -10 и -35 *E. coli* (рис. 123). Во-первых, почти повсеместно встречается последовательность из 7 н.п., отделенная от стартовой точки расстоянием от 19 до 27 п.н. (предпочтительно в положении -25). Каноническая последовательность имеет вид A<sub>63</sub> A<sub>50</sub>

T82A97T93A85 A83

T37 T33

и называется *TATA* или *блоком Хогнесса*. Эта семичленная последова-

тельность обнаружена у самых разных эукариотических организмов -

млекопитающих, птиц, амфибий и насекомых. Во-вторых, далее против

хода транскрипции имеется другая последовательность, которая у некоторых промоторов консервативна, хотя в ряде других случаев она отсутствует. Эта последовательность, обозначаемая как *CAAT-блок*, располагается между положениями -70 и -80, и ее канонический состав имеет вид С

G G C A A T C T

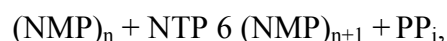
T

Промоторы РНК-полимеразы III расположены по ходу транскрипции внутри самих транскрибируемых генов. Например, промотор для транскрипции 5S-РНК находится внутри этого гена между положениями +55 и +80. РНК-полимераза III, вероятно, способна узнавать широкий диапазон промоторных последовательностей. Поскольку РНК-полимераза I транскрибирует только гены, кодирующие идентичные рРНК, то для нее не удается вычлнить последовательность промотора.

Промоторные области чрезвычайно богаты парами А-Т. Это связано с тем, что их функционирование связано с плавлением и образованием одноцепочечных участков, необходимых, чтобы РНК-полимераза начала работать. Для разрыва двух водородных связей в каждой паре А-Т требуется меньше энергии, чем для разрыва трех водородных связей в паре Г-Ц, поэтому для расхождения цепей в промоторном участке требуется минимальное кол-во энергии.

### ЭЛОНГАЦИЯ И ТЕРМИНАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ

После связывания с ДНК РНК-полимераза начинает синтезировать цепь РНК, используя в качестве материала рибонуклеозид-5'-трифосфаты (АТФ, ГТФ, УТФ и ЦТФ) и высвобождая пирофосфат:



где N обозначает произвольное основание. Для активации РНК-полимераз нужны также ионы  $Mg^{2+}$ . Новые цепи РНК имеют строго определенную структуру 5'-конца: молекулы начинаются либо с rppA, либо с rppG, чья 5'-трифосфатная группировка (обозначаемая rpp) не расщепляется до пиррофосфата и остается без изменений на протяжении всего процесса транскрипции. В отличие от синтеза ДНК затравка для синтеза РНК не нужна, и новые цепи РНК образуются *de novo*.

РНК-полимераза движется вдоль транскрибируемой цепи ДНК в направлении 3' к 5', при этом строящаяся молекула РНК растет в длину в направлении 5' к 3' со скоростью 30 нуклеотидов/с. Максимальная скорость элонгации составляет 50 нуклеотидов/с. В процессе транскрипции нуклеосомная структура хроматина эукариот локально разрушается, но после прохождения РНК-полимеразы, вероятно, быстро восстанавливается.

У прокариот существуют два типа последовательностей ДНК, необходимые для остановки транскрипции, - *г-зависимые* и *г-независимые терминаторы*. Процесс терминации у первых зависит от наличия небольшого (55 кДа) белка, называемого *фактор г*. Оба типа терминаторов представляют собой *инвертируемые повторы*, или *палиндромы*, т.е. последовательности которых прочитываются одинаково как в прямом, так и в обратном направлении, а у *г-независимых* терминаторов на конце РНК всегда имеется небольшой отрезок из остатков У. Наличие палиндромов приводит к формированию вторичных структур типа "*крест*" в двухцепочечной ДНК и типа "*шпилька*" в одноцепочечной РНК (рис. 124). Шпилька, возникающая в синтезируемой РНК в месте палиндрома, заставляет РНК-полимеразу двигаться медленнее или останавливаться (продолжительность паузы сильно варьирует, но в среднем на обычном терминаторе фермент останавливается на 1 мин). На *г-независимых* терминаторах остановка РНК-полимеразы создает благоприятные условия для отделения РНК-транскрипта из комплекса с ДНК-матрицей, поскольку гибридная пара У-А характеризуется очень слабыми комплементарными взаимодействиями. В случае *г-зависимого* терминатора фактор *г* связывается с 5'-концом синтезирующейся РНК, а затем продвигается вдоль нее, используя для этого энергию гидролиза любых трифосфатрибонуклеотидов (Рис. 125). Остановка РНК-полимеразы на терминаторе позволяет *г-фактору* догнать ее. Затем фактор *г* взаимодействует с РНК-полимеразой, вызывая освобождение РНК и отделение полимеразы и самого фактора от матрицы. Максимальная активность *г-фактора* достигается уже при его концентрации, составляющей 10% от кол-ва РНК-полимеразы. Различная эффективность терминаторов объясняется разной величиной шпильки, которую они формируют, и, следовательно, разной длительностью остановки РНК-полимеразы. Пока мало что известно о сигналах терминации эукариот. Для эукариотической терминации не нужно образование шпильки. Эукариотические терминаторы практически всегда содержат короткую (4 - 5 нуклеотидов) последовательность из У, расположенную в Г-Ц богатом районе. Механизм терминации на столь коротком сигнале неизвестен.

В растущей клетке в среднем 200 млн. нуклеотидов полимеризуются каждую минуту с образованием РНК. Это примерно в 20 раз превышает среднюю скорость синтеза ДНК перед началом деления.

#### МОДИФИКАЦИЯ И ПРОЦЕССИНГ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ РНК-ТРАНСКРИПТОВ

Тогда как у прокариот процесс транскрипции сопряжен с трансляцией, у эукариот отделение внутреннего пространства ядра, где идет транскрипция, от цитоплазмы, где идет трансляция, оболочкой из мембран позволяет существенно изменять строение РНК-транскриптов до того, как они станут матрицами для синтеза белка. Вся совокупность ядерных транскриптов РНК-полимеразы II называется *гетерогенной ядерной РНК* (гяРНК), поскольку входящие в нее РНК-транскрипты очень сильно различаются по длине. Многие из этих транскриптов в конце концов покидают ядро, превращаясь в молекулы *информационной* или *матричной РНК* (мРНК). Однако прежде чем выйти из ядра, молекулы мРНК претерпевают серию ковалентных модификаций, которые отличают их от

транскриптов, синтезированных другими РНК-полимеразами. 5'-конец молекулы РНК *кэпируется* (от англ. cap - шапочка), т.е.

фермент *гуанилтрансфераза* присоединяет к нему посредством необычной трифосфатной связи остаток гуанозина, так что он оказывается в обратной ориентации по отношению к другим нуклеотидам. Кэпирование происходит еще до того, как будет завершена транскрипция, но дальнейшая модификация кэпа продолжается уже только в цитоплазме после выхода транскрипта из ядра.

После терминации транскрипции специальный фермент *poly(A)-полимераза* присоединяет к 3'-концу каждого РНК-транскрипта, который станет молекулой мРНК, 100 - 200 остатков адениловой кислоты [*poly(A)*], осуществляя реакцию  $nATP \rightarrow (AMF)_n + nPP_i$ , что завершает процесс образования *первичного РНК-транскрипта*. Присоединение *poly(A)* (*полиаденилирование*) происходит либо непосредственно после терминации транскрипции, либо после специфического расщепления растущей цепи РНК. Предполагается, что такой "хвост" способствует последующему *процессингу* и экспорту зрелых молекул мРНК из ядра. Когда мРНК только поступает в цитоплазму, ее *poly(A)*-конец имеет примерно ту же самую длину, что и в ядре, но затем начинает постоянно укорачиваться. Таким образом, клеточная популяция мРНК содержит как "новые", так и "старые" молекулы, имеющие относительно длинные и более короткие *poly(A)*-участки. Однако длина *poly(A)*-конца в данной молекуле, по-видимому, не влияет ни на ее способность к трансляции, ни на ее стабильность в цитоплазме. Примерно треть зрелых клеточных мРНК не имеет *poly(A)*-хвоста. Основной компонент этой *poly(A)*-фракции представлен молекулами гистоновых мРНК, кодирующих гистоновые белки хромосом. Эти мРНК имеют небольшие размеры и активно синтезируются только в периоды репликации клеточной ДНК. Остальная часть *poly(A)*-фракции (примерно 2/3) идентична фракции *poly(A)*<sup>+</sup>-молекул, так что некоторые гены представлены транскриптами, часть которых полиаденилирована, а часть - нет.

Средняя длина новообразованной молекулы РНК, синтезированной РНК-полимеразой II, составляет около 8000 нуклеотидов, и часто встречаются молекулы РНК, насчитывающие 10 - 20 тыс. нуклеотидов, что намного превышает величину 1200 нуклеотидов, которая достаточна для синтеза средней белковой молекулы из 400 аминокислотных остатков. Длина новосинтезированных молекул РНК быстро уменьшается, достигая размеров цитоплазматической мРНК по прошествии уже примерно 30 мин после завершения своего синтеза. Этот процесс называется *процессингом* РНК. Укороченные мРНК начинают покидать ядро, превращаясь в мРНК. Однако цитоплазма достигает не более 5% общей массы гРНК. Остальные последовательности рибонуклеотидов деградируют в ядре с образованием множества мелких фрагментов, что занимает около 1 ч.

Большинство эукариотических генов содержат в своей нуклеотидной последовательности протяженные нетранслируемые вставки, которые прерывают соответствие между нуклеотидной последовательностью остальных участков гена и аминокислотной последовательностью полипептида, кодируемого этим геном (рис. 126). Такие нетранслируемые участки ДНК в генах называют ИНТРОНАМИ, тогда как участки гена, кодирующие аминокислотную последовательность полипептида, называют ЭКЗОНАМИ. Интронные последовательности РНК специфически выщепляются из каждого РНК-транскрипта в ходе его превращения в "зрелую" молекулу мРНК, способную участвовать в синтезе белка. Поскольку экзоны после вырезания интронов соединяются друг с другом в стык и образуют единое целое, процессинг РНК, протекающий по такой схеме (рис.

127), получил название СПЛАЙСИНГ (от англ. splice - сращивать). В ядре типичной эукариотической клетки транскрибируется с образованием РНК 7 - 10% геномной ДНК, тогда как цитоплазматические мРНК представляют лишь 1 - 2% нуклеотидных

последовательностей генома. Разница, по-видимому, обусловлена главным образом деградацией интронных участков молекул гРНК.

Размер интронов варьирует от 0.1 до 10 тыс. нуклеотидов, а отношение длины всего гена к его кодирующей части у животных лежит в пределах от 1.2 до 26.2 и в среднем составляет 5.5. Число интронов может быть от 1 до > 50 как в случае коллагеновых генов. Большую часть нуклеотидной последовательности интрона можно искусственно изменять без всякого вреда для функционирования гена. Поэтому в ходе эволюции в интронах быстро накапливаются мутации. Однако на концах интрона находится по несколько нуклеотидов, которые нельзя изменить без риска нарушить всю работу гена:

экзон . AG GTAAGT . интрон .6Py NCA G. экзон,  
% %

левая граница

правая граница

где 6Py - 6 пиримидинов подряд, а N - любой нуклеотид. Эти короткие

пограничные последовательности есть почти у всех исследованных интронов и служат сигналами для сплайсинга РНК. Эти пограничные участки интронов оказались комплементарны определенным участкам молекул

РНК, присутствующих в многочисленных *малых ядерных рибонуклеопротеиновых частицах* (мяРНП), средняя мол. масса которых составляет 250 кДа. Предполагаемый механизм участия мяРНП в сплайсинге РНК показан на рис. 127. Другие разновидности мяРНП нужны для сборки рибосом в ядрышке и, вероятно, участвуют в транспортировке различных молекул РНК из ядра в цитоплазму. мяРНК служат примером того, что не только белки могут обладать ферментативной активностью. Кроме того, в некоторых случаях способность к сплайсингу оказывается внутренним свойством самой РНК. В этом случае образование молекулой РНК специфической вторичной (или третичной) структуры делает возможным *автокатализ*.

В тех случаях, когда ген содержит несколько интронов, важно, чтобы экзоны соединялись в правильной последовательности, а не случайным образом. Как осуществляется такой контроль, неизвестно, однако нет какого-либо обязательного порядка сплайсинга (поскольку находят промежуточные продукты, у которых интроны удалены в разных комбинациях), но есть предпочтительный порядок протекания сплайсинга. В некоторых случаях в клетке осуществляются несколько детерминированных *альтернативных сплайсингов*, что приводит к образованию из одного и того же РНК-транскрипта нескольких отличающихся друг от друга молекул мРНК, кодирующих различные белки. Примером может служить формирование многообразия антител в лимфоцитах. Возможно также, что альтернативный сплайсинг происходит в процессе клеточной дифференцировки. Таким образом, само существование сплайсинга придает клетке дополнительную генетическую гибкость. Известны случаи, когда интрон одного гена может быть экзоном другого гена, или когда интрон самостоятельно кодирует небольшой регуляторный белок. Одно из предположений связывает происхождение интронов у эукариот с появлением возможности комбинирования экзонов ("мини-генов"), каждый из которых кодирует функционально значимый белковый домен, что приводит к возникновению в ходе эволюции новых генов, кодирующих белки с новыми полезными свойствами.

Только около 5% общей массы РНК-транскриптов покидает клеточное ядро. Специфические сигналы, служащие "пропуском" на выход из ядра различных РНК, пока не идентифицированы. Вероятно они возникают во время сплайсинга РНК, поскольку при введении в ядро гена, из которого генно-инженерными методами были искусственно удалены интроны, его РНК-транскрипты остаются в ядре. В то же время должны существовать и какие-то другие пути возникновения сигналов экспорта в молекулах мРНК, потому что не все эукариотические гены содержат интроны.

После выхода мРНК из ядра цитоплазматический фермент *гуа-*

нил-7-метил-трансфераза, используя в качестве кофактора S-аденозилметионин, присоединяет метильную группу к 5'-концевому гуанину, "пришитому" в ядре гуанилтрансферазой. Получившаяся структура называется *кэп 0* и встречается у всех одноклеточных эукариот (рис.

128). У многоклеточных эукариот другой фермент (*2'-0-метил-трансфераза*) добавляет еще одну метильную группу к следующему (т.е. первому до кэпирования) нуклеотиду мРНК. Такой кэп называется *кэпом 1*. У некоторых видов метильная группа может добавляться к следующему (второму до кэпирования) нуклеотиду и получается трижды метилированный *кэп 2*. Обычно кэпы типа 2 составляют только 10 - 15% от суммарной кэпированной популяции молекул. Кэпы играют основную роль в процессе присоединения мРНК к малой субчастице рибосомы перед началом трансляции, а дополнительные акты метилирования, вероятно, повышают эффективность связывания с рибосомой.

Новообразованные эукариотические мРНК видимо всегда ассоциирована с белками, образуя рибонуклеопротеиновые частицы (*мРНП*). В мРНП клеток млекопитающих обнаруживаются два основных белка 52 и 78 кДа, остальные белки являются минорными компонентами. 78 кДа белок связан с poly(A)-хвостом мРНК. Функциональное значение этих белков неизвестно, хотя они могут принимать участие в транспорте мРНК из ядра в цитоплазму или оказывать влияние на их трансляцию. Возможно также, что некоторые мРНП (*информосомы*) содержат мРНК неактивные в данный момент, которые будут вовлечены в трансляцию на более поздних стадиях или при изменившихся условиях.

Хотя синтез РНК в митохондриях и хлоропластах мало чем отличается от транскрипции у прокариот, в митохондриях есть свои особенные разновидности процессинга. Например, в клетках человека обе цепи митохондриальной ДНК транскрибируются с одинаковой скоростью от единственного промотора каждой цепи. При этом образуются две гигантские молекулы РНК, каждая из которых представляет собой полную копию одной цепи ДНК. После этого РНК-транскрипты нарезаются нуклеазами: из одной цепи получают 2 молекулы рРНК, 14 тРНК и 12 мРНК, а из другой - только 8 тРНК и 1 мРНК (90% последовательности этого транскрипта не несет полезной информации и расщепляется). За-

тем митохондриальная poly(A)-полимераза присоединяет к 3'-концу молекул мРНК poly(A)-хвост из примерно 55 нуклеотидов, однако они остаются некэпированными. У дрожжей, в отличие от человека, митохондриальные гены содержат интроны, которые удаляются из сплайсингом. Все гены, кроме одного, синтезируются у дрожжей с одной цепи ДНК, причем существует несколько промоторов для разных генов.

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

Соответствие между последовательностью нуклеотидов в гене и последовательностью аминокислот в белке устанавливается с помощью ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА. В нуклеотидной последовательности должно быть достаточно кодирующих единиц, чтобы закодировать 20 аминокислот. Но

в ДНК содержится только 4 разных основания, и это означает, что аминокислота должна быть закодирована более чем одним основанием.

Если бы два основания определяли одну аминокислоту, то в ДНК могло бы быть закодировано только  $4^2 = 16$  видов аминокислот. Поскольку этого недостаточно, генетический код должен быть *триплетен*, т.е. каждой аминокислоте должны соответствовать три расположенных последовательно основания. Поскольку число возможных триплетных комбинаций составляет  $4^3 = 64$ , то существование триплетного кода предполагает, что либо не все триплеты участвуют в кодировании аминокислот, либо некоторые аминокислоты кодируются более чем одним триплетом. В генетических экспериментах была доказана триплетная природа генетического кода и показано, что почти все аминокислоты кодируются более чем одним триплетом.

Генетический код представлен в таблице 11. Последовательность из трех нуклеотидов, соответствующая одной аминокислоте, называется КОДОНОМ. Последовательность кодонов читается непрерывно, начиная с фиксированной стартовой точки на одном конце гена, и заканчивается в точке *терминации* на другом конце гена. Последовательность нуклеотидов прочитывается в направлении от 5'-конца к 3'-концу и соответствует аминокислотной последовательности, записанной в направлении от N-конца к C-концу.

Важнейшими свойствами генетического кода являются его *универсальность* и *вырожденность*. Генетический код универсален для всех живых организмов как прокариотических, так и эукариотических. Это подтверждается существованием *гетерологических систем трансляции*, т.е. когда мРНК одного организма правильно прочитывается *in vivo*

или *in vitro* белок-синтезирующим аппаратом организма совсем другого вида, типа или царства. Исключения из универсальности генетического кода были обнаружены в митохондриях некоторых видов. У них было обнаружено одно общее изменение: кодон UGA читается так же, как UGG, и кодирует триптофан. У дрожжей кодон CUA и, возможно, все семейство кодонов, начинающиеся с дуплета CU, кодируют треонин вместо лейцина. У млекопитающих AUA имеет то же значение, что AUG, и означает метионин вместо изолейцина, а кодоны AGA и AGG вызывают терминацию цепи, а не кодируют аргинин. Однако это - редкие исключения и, игнорируя их, можно предполагать, что универсальность кода свидетельствует о том, что он сложился очень рано в процессе эволюции.

Таблица 11 Генетический код.

Первое положение (5'-конец)	2	У	2	Второе положение		Г	2	Третье положение (3'-конец)
				Ц	А			
У	2	Фен Фен Лей Лей	2	Ц	А	Цис Цис Стоп Три	2	У Ц А Г
	2							
	2							
	2							
Ц	2	Лей Лей Лей Лей	2	Ц	А	Арг Арг Арг Арг	2	У Ц А Г
	2							
	2							
	2							
А	2	Иле Иле Иле Мет	2	Ц	А	Сер Сер Арг Арг	2	У Ц А Г
	2							
	2							
	2							
Г	2	Вал Вал Вал Вал	2	Ц	А	Гли Гли Гли Гли	2	У Ц А Г
	2							
	2							
	2							

То, что 20 аминокислот представлены 61 кодоном, означает, что генетический код вырожденный. Почти каждой аминокислоте соответствует несколько *кодонов-синонимов*. Число кодонов для одной аминокислоты достаточно хорошо отражает частоту встречаемости данной аминокислоты в белках. Как видно на рис. 129, такая корреляция наблюдается для всех аминокислот, за исключением аргинина, поскольку в

эукариотической ДНК дуплет CG встречается редко. Поэтому четыре кодона, соответствующие аргинину, которые начинаются с этого дуплета, встречаются реже, чем следовало бы ожидать. Другой особенностью кода является тенденция к группировке кодонов, соответствующих одной аминокислоте. Часто основание в третьем положении кодона оказывается несущественным для его специфичности. Одна аминокислота может быть представлена четырьмя кодонами, различающимися только по третьему основанию. Иногда различие состоит лишь в предпочтении пуринового основания пиримидиновому в этом положении. Меньшую специфичность этого положения в кодоне называют *вырожденностью третьего основания*. Эта особенность, а также тенденция к сходству кодонов у аминокислот одного типа (т.е. полярных, гидрофобных и т.д.) сводят до минимума эффект мутаций. При такой организации кода случайно возникшая замена основания с большей вероятностью (чем при случайном подборе кодонов) приведет к замене на сходную по свойствам аминокислоту или же замены не произойдет вовсе.

Задача 40. На планете UX-153 живые существа состоят из белков, содержащих 40 аминокислот, а их ДНК содержит только три вида нуклеотидов. Какие предположения можно сделать о генетическом коде, используемом этими организмами?

Задача 41. На планете ZJ-578 все живые организмы можно разбить на две группы по набору аминокислот, которые используются ими для построения белков. Часть аминокислот в этих наборах одинакова для обеих групп, а остальные строго специфичны для каждой группы. Какие предположения можно сделать о генетическом коде, используемом этими организмами, если нуклеотидный состав ДНК в обеих группах одинаков?

#### БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

Процесс белкового синтеза протекает в пять основных этапов, каждый из которых требует множества компонентов: 1) активация аминокислот; 2) инициация синтеза полипептидной цепи; 3) элонгация полипептидной цепи; 4) терминация и высвобождение; 5) сворачивание полипептидной цепи и процессинг.

Активация аминокислот протекает в цитозоле. Каждая из 20 аминокислот ковалентной эфирной связью присоединяется к определенной транспортной РНК (тРНК), и для этого используется энергия АТФ:

Аминокислота + тРНК + АТФ → Аминоацил-тРНК + АМФ + пирофосфат. Эти реакции катализируются группой из 20 ферментов, называемых *аминоацил-тРНК-синтетазами*, каждый из которых является специфическим по отношению к одной из аминокислот и к соответствующей этой аминокислоте тРНК. Аминоацил-тРНК-синтетазы очень специфичны как в отношении тРНК, так и соответствующей ей аминокислоты. Например, R-группы валина и изолейцина структурно очень похожи друг на друга, однако ошибочное встраивание в полипептидную цепь валина вместо изолейцина происходит не чаще, чем ошибки встраивания других аминокислот (примерно 1 ошибка на 3 - 4 тыс. а.о.). Это объясняется тем, что изолейцил-тРНК-синтетаза распознает ошибочно присоединенный валин, когда валил-тРНК находится еще в реакционном центре фермента и гидролизует его, исправляя допущенную ошибку.

тРНК представляют собой сравнительно небольшие одноцепочечные молекулы РНК, состоящие из 73 - 93 нуклеотидов, что соответствует мол. массе 24 - 31 кДа. Каждой аминокислоте соответствует хотя бы одна тРНК, некоторым аминокислотам соответствуют две или большее число специфических тРНК. Чтобы распознать все аминокислотные кодоны, требуется по меньшей мере 32 тРНК (таблица 11), однако в некоторых клетках присутствует намного больше разных вариантов тРНК. Все тРНК имеют много общих черт строения (рис. 130). Во всех тРНК не менее 8 нуклеотидов содержат необычные, модифицированные основания, многие из которых представляют собой метилированные производные главных оснований. В большинстве тРНК на 5'-конце находится остаток

гуаниловой кислоты (pG), а на 3'-конце всех тРНК присутствует тринуклеотидная последовательность -С-С-А. В молекуле тРНК выделяют 4 ветви и иногда пятую дополнительную. *Акцепторная ветвь* присоединяет специфическую аминокислоту в рассмотренной выше реакции. Обобщенная структура образующейся при этом молекулы аминоацил-тРНК показана на рис. 131. *Антикодоновая ветвь* содержит АНТИКОДОН, т.е. специфический триплет нуклеотидов, который комплементарен в антипараллельном направлении соответствующему триплету (кодону) мРНК и может образовывать с ним пары оснований. Каждая тРНК имеет свой особый антикодон. *Дигидроуридиновая ветвь* содержит необычный нуклеозид дигидроуридин. ТЭС-ветвь содержит необычные нуклеозиды риботимидин (Т) и нуклеозид псевдоуридин (J), в котором основание и пентоза соединены необычной углерод-углеродной связью. Трехмерная структура дрожжевой фенилаланиновой (т.е. имеющей антикодон для аминокислоты фенилаланина) тРНК была получена с помощью рентгеноструктурного анализа (часть 1, рис. 14). Вероятно, другие тРНК имеют похожую третичную структуру.

На второй стадии - при *инициации* - происходят события, предшествующие образованию пептидной связи между первыми двумя аминокислотами белка. Для инициации необходимо, чтобы рибосома связалась с информационной или матричной РНК (мРНК), образовав иницирующий комплекс совместно с первой аминоацил-тРНК. Это относительно медленная стадия в синтезе белка. мРНК взаимодействует с малой субъединицей рибосомы. Хотя в рибосоме оказывается связан участок длиной в 30 оснований, только две молекулы тРНК могут разместиться в рибосоме одновременно. Поэтому в синтезе белка в каждый момент времени принимают участие только 2 из 10 кодонов, находящихся в рибосоме. Соответственно этим двум кодонам в рибосоме выделяют 2 участка: *акцепторный* участок (*А-участок*), который может быть занят очередной (новопоступающей) аминоацил-тРНК, и *донорный* участок (*Р-участок*), занятый комплексом *пептидил-тРНК*, представляющим собой тРНК, несущую полипептидную цепь, синтезированную к данному моменту (рис. 132).

Задача 42. Напишите, какие антикодоны может иметь тРНК, переносящая лейцин.

Задача 43. Сколько разных мРНК может кодировать аминокислотную последовательность Val-Glu-Ala-Cys-Val-Tyr-Gly-Thr-Leu?

#### ТРАНСЛЯЦИЯ У ПРОКАРИОТ

Прокариотические мРНК значительно различаются по кол-ву кодируемых ими белков. Некоторые молекулы соответствуют только одному гену - это *моноцистронные* мРНК. Другие (и таких большинство) состоят из последовательностей, кодирующих несколько белков, - это *полицистронные* мРНК. В этом случае единая мРНК транскрибируется с группы генов, расположенных рядом. Такая единая транскрипционная единица называется *оперон*. В составе прокариотической мРНК выделяют *лидерную последовательность, кодирующий участок и концевую последовательность (трейлер)*. Лидерная последовательность, расположенная с 5'-конца от инициаторного кодона, содержит последовательность

5'.AGGAGG.3',

которая называется *последовательность Шайна-Дальгарно* и располагается на расстоянии 4 - 7 оснований перед инициаторным кодоном. Последовательность Шайна-Дальгарно комплементарна участку в 3'-концевой области 16S-рРНК 30S-субъединицы рибосомы. Эта комплементарность, вероятно, существенна для связывания мРНК малой рибосомной субчастицей во время формирования инициаторного комплекса. Кодирующий участок состоит из одного или нескольких цистронов и межцистронных областей, которые могут иметь размеры от 1 до 30 нуклеотидов. Каждый цистрон начинается инициаторным кодоном и заканчивается терминирующим кодоном.



Для инициации трансляции мРНК должна иметь участок, предшествующий началу кодирующей области, который служит сигналом для связывания с рибосомой (вероятно, эту роль выполняет последовательность Шайна-Дальгарно) и иницирующей кодон АУГ, который является стартовой точкой и определяет "рамку считывания" (у бактерий вместо АУГ иногда используется кодон ГУГ). Кроме того, для инициации необходимы специальные иницирующие тРНК и белковые факторы.

У прокариот известны 3 фактора инициации, белки с мол. массами 9.5, 73 и 23 кДа, обозначаемые IF1, IF2 и IF3 соответственно. Пул свободных (не занятых трансляцией) рибосом находится постоянно в динамическом равновесии с пулами свободных больших и малых субчастиц: 70S = 30S + 50S. IF3 связывается со свободными 30S-субчастицами, и они уже не могут ассоциировать с 50S-субчастицами, но зато могут присоединиться к мРНК, т.к. для того чтобы 30S-субчастица связалась с мРНК, необходимо присутствие IF3, хотя специфичность узнавания участков инициации на мРНК всецело определяется рибосомной субчастицей. В клетке кол-во IF3 лимитировано, и поэтому с ним связано только 5% 30S-субчастиц (или около 25% 30S-субчастиц, не участвующих в синтезе белка).

У *E. coli* существует специальная инициаторная тРНК - *N*-формилметионил-тРНК (тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>), - которая так же, как и обычная тРНК<sup>Met</sup>, присоединяет к себе метионин. Однако фермент *трансформилаза* переносит *формильную группу* от молекулы *N*-формилтетрагидрофолата к аминогруппе метионинового остатка, связанного с инициаторной тРНК.

Блокированная формилом аминогруппа, вероятно, необходима для специфичного связывания с тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> белка IF2. Когда 30S-субчастица рибосомы садится на мРНК, только тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>, связанная с IF2, обладает уникальным свойством непосредственно входить в Р-участок недостроенной рибосомы, связываясь с находящимся там АУГ (или ГУГ) кодоном. Далее к комплексу [мРНК730S7IF37тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>7IF2] присоединяется молекула ГТФ. Соединение двух рибосомальных субчастиц, вероятно, осуществляется за счет частичной комплементарности между участком 23S-рРНК большой субчастицы и 3'-областью 16S-рРНК малой субчастицы. Именно с этой 3'-областью 16S-рРНК связывается IF3, и поэтому присоединение большой 50S-субчастицы возможно только после высвобождения IF3 из инициаторного комплекса. И, наконец, после гидролиза ГТФ до ГДФ, который, вероятно, осуществляется IF2 и сопряжен с конформационными изменениями в формирующейся рибосоме, образуется полная 70S-рибосома, в которой тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> располагается в Р-участке. После того, как образовалась полная рибосома, другие (внутренние) АУГ и ГУГ кодоны будут прочитываться как метиониновый и валиновый соответственно и связываться с обычными тРНК<sup>Met</sup> и тРНК<sup>Val</sup>. Роль белка IF1 пока не выяснена, по-видимому, он принимает участие в стабилизации иницирующего комплекса или способствует высвобождению IF2 из комплекса.

Присоединение каждого аминокислотного остатка к растущей полипептидной цепи на прокариотических рибосомах происходит в три стадии. Этот цикл повторяется столько раз, сколько остатков следует присоединить. В процессе элонгации у прокариот используются еще три белковых фактора - EF-Tu (43.2 кДа), EF-Ts (74 кДа) и EF-G (77.5 кДа). На первой стадии цикла элонгации сначала происходит связывание следующей аминоацил-тРНК с комплексом, состоящим из EF-Tu и молекулы ГТФ. Образующийся тройной комплекс соединяется с 70S-иницирующим комплексом. Одновременно происходит гидролиз ГТФ, и комплекс EF-Tu7ГДФ покидает рибосому, после чего с помощью ГТФ и EF-Ts комплекс EF-Tu7ГДФ восстанавливается до EF-Tu7ГТФ и снова может принимать участие в трансляции. Белок EF-Tu - это один из основных белков у прокариот: в одной клетке насчитывается около 70 тыс. его молекул, что составляет 5% от общего клеточного белка. Этого достаточно для связывания всего клеточного пула аминоацил-тРНК, количество которых примерно на порядок превышает число рибосом. Содержание EF-Ts составляет около 10 тыс. молекул на клетку, что пример-

но соответствует числу рибосом. Следовательно, большинство EF-Tu в клетке входит в состав комплексов [EF-Tu7ГТФ] и [EF-Tu7ГТФ7аминоацил-тРНК]. Далее новая аминоксил-тРНК связывается с А-участком рибосомы за счет комплементарного взаимодействия между антикодоном этой аминоксил-тРНК и кодоном мРНК, находящимся в А-участке (рис. 133, А). Однако кодон-антикодонового взаимодействия недостаточно, чтобы обеспечить связывание правильной аминоксил-тРНК. Точность ее соответствия кодону мРНК проверяется с помощью еще одного специфического контакта внутри А-участка между другой частью молекулы тРНК и рРНК. Следующая стадия элонгации наступает только если оба контакта оказываются правильными. тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> - это единственная аминоксил-тРНК, которая не может присоединиться к комплексу [EF-Tu7ГТФ], и поэтому она не может попасть в А-участок рибосомы и проконтактировать с внутренними кодонами АУГ и ГУГ.

На второй стадии цикла элонгации образуется новая пептидная связь между аминокислотами, чьи тРНК расположены в А- и Р-участках рибосомы. Этот процесс осуществляется у прокариот в результате переноса иницирующего N-формилметионинового остатка от несущей его тРНК к аминокислоте новой аминокислоты, которая только что попала в А-участок. Этот перенос катализируется *пептидилтрансферазой*, которая входит в состав малой субчастицы. В результате этой реакции в А-участке образуется дипептидил-тРНК, а в Р-участке остается "пустая", незагруженная тРНК<sub>f</sub><sup>Me</sup>.

На третьей стадии цикла элонгации рибосома перемещается вдоль мРНК по направлению к ее 3'-концу на расстояние в один кодон. Поскольку дипептидил-тРНК по-прежнему остается связанной со вторым кодоном мРНК, движение рибосомы приводит к перемещению дипептидил-тРНК из А-участка в Р-участок, в результате чего предыдущая, уже свободная тРНК, отделяется от Р-участка и уходит обратно в цитозоль. Теперь в А-участке находится третий кодон мРНК, а второй кодон оказывается в Р-участке. Передвижение рибосомы вдоль мРНК называется *транслокацией*. На этой стадии необходим белок EF-G, называемый также *транслоказой*, и гидролиз еще одной молекулы ГТФ (рис. 133, Б). На этой стадии происходит изменение конформации всей рибосомы, способствующее ее продвижению по мРНК на три нуклеотида в направлении к 3'-концу матрицы. Процесс транслокации обеспечивается энергией за счет гидролиза ГТФ: EF-G связывается с рибосомой только будучи в присутствии ГТФ, а затем после гидролиза ГТФ он высвобождается из рибосомы.

Теперь рибосома с прикрепленными к ней дипептидил-тРНК и мРНК готова к следующему циклу элонгации, т.е. к присоединению третьего аминокислотного остатка. Осуществляется это точно так же, как и присоединение второго остатка. На присоединение каждой аминокислоты затрачивается 2 молекулы ГТФ, которые гидролизуются до ГДФ и фосфата. Кол-во транслоказы сравнимо с кол-вом рибосом (около 20 тыс. молекул/клетку) и на ее долю приходится 2% растворимого клеточного белка.

По мере движения рибосомы от кодона к кодону вдоль мРНК к ее 3'-концу аминокислотные остатки один за другим добавляются к растущей полипептидной цепи, которая все это время остается связанной с тРНК, соответствующей последней включенной аминокислоте. Синтез полипептидной цепи всегда начинается с N-конца и полипептидная цепь растет в направлении к С-концу. У бактерий при 37°C скорость элонгации варьирует от 12 до 17 а.о./с. Конкретная величина скорости зависит от условий роста клеток. В синтезе белка одновременно участвуют 80% бактериальных рибосом.

Об окончании нуклеотидной последовательности, соответствующей полипептиду, сигнализирует один из трех *терминирующих кодонов* мРНК, расположенный непосредственно за кодоном последней аминокислоты. Терминирующие триплеты УАА (охра-кодон), УАГ (амбер-кодон) и УГА (опал-кодон), называемые так по названию мутантов *E. coli*, с помощью которых они были впервые определены, не кодируют никакую аминокислоту, поэтому их еще называют *бессмысленными триплетами* (нонсенс-

*триплетами*). Как только рибосома достигает терминирующего кодона, начинают действовать три терминирующих белка (*релизинг-факторы*) - RF1 (узнает УАА и УАГ), RF2 (узнает УГА и УАА) и RF3. Они вызывают гидролитическое отщепление полипептида от конечной тРНК и его высвобождение и отделение от Р-участка рибосомы последней, уже "пустой" тРНК. Формильная группа метионина синтезированного белка удаляется специальным деформирующим ферментом. В том случае, если в белке N-концевой аминокислотой является метионин, то достаточно только этой модификации. Если же белок должен начинаться с другой аминокислоты, то с помощью аминопептидазы удаляется метионин и вторая аминокислота превращается в N-концевую.

Для обеспечения точности белкового синтеза необходима энергия. На ферментативное образование каждой аминоацил-тРНК из свободной аминокислоты затрачиваются 2 высокоэнергетические фосфатные группы.

Для исправления ошибок аминоацил-тРНК-синтетазой могут потребоваться добавочные молекулы АТФ. 1 молекула ГТФ расщепляется на стадии инициации, 1 молекула ГТФ расщепляется на первой стадии каждого цикла элонгации и еще 1 молекула ГТФ требуется для транслокации рибосомы. Молекулы ГТФ, участвующие в работе рибосомы, вероятно, выполняют 2 функции: 1) они поддерживают в соответствующей конформации белковые факторы трансляции, чтобы они могли присоединиться к рибосомному комплексу, и 2) гидролизуясь, обеспечивают энергией соответствующие этапы синтеза белка, в каждом случае вызывая конформационные изменения в рибосоме.

У прокариотических организмов транскрипция и трансляция сопряжены: рибосомы прикрепляются к 5'-концу растущей мРНК и начинают синтез белка раньше, чем заканчивается синтез самой мРНК. При этом прокариотические мРНК "живут" очень недолго: время, за которое разрушается половина вновь синтезированных мРНК (*функциональное время полужизни*), составляет в среднем 2 мин. При этом деградация 5'-конца мРНК может начаться раньше, чем закончится синтез или трансляция 3'-конца той же молекулы (рис. 134). Скорости транскрипции (2500 нуклеотидов/мин) и трансляции (15 а.о./с) примерно равны, тогда как деградация мРНК происходит примерно вдвое медленнее. В результате 3'-концевая часть мРНК существует дольше, чем 5'-концевая область. Число рибосом, принимающих участие в трансляции определенной мРНК в какой-либо момент времени, зависит от эффективности узнавания иницирующих последовательностей. С момента транскрипции до момента деградации каждую мРНК, вероятно, успевают протранслировать около 30 рибосом.

Когда межцистронные области велики, инициаторный комплекс каждый раз заново строится вокруг инициаторного кодона цистрона. Однако при малых межцистронных расстояниях 30S-субчастица терминирующей рибосомы может не отделяться от мРНК. С большой вероятностью она остается прикрепленной к матрице, так как фактически ее присоединение к следующему инициаторному сайту уже произошло (находясь на мРНК рибосома экранирует около 35 оснований). При этом 50S-субчастица и синтезированная полипептидная цепь освобождаются, а затем к связанной с мРНК 30S-субчастице присоединяется новая 50S-субчастица. Такой облегченный способ инициации транскрипции следующего цистрона называется *реинициация транскрипции*.

Задача 44. Функциональное время полужизни трехцистронной мРНК длиной 2800 нуклеотидов составляет 2 мин. Каждую минуту происходит 5 актов иницирования транскрипции, а элонгация транскрипции идет со скоростью 2500 нуклеотидов/мин. Каждую минуту происходит 10 актов инициации трансляции первого цистрона и всегда происходит реинициация транскрипции второго и третьего цистронов. Элонгация полипептидной цепи идет со скоростью 15 а.о./с. Сколько полипептидных цепей в мин. синтезируется с этой транскрипционной единицы?

## ТРАНСЛЯЦИЯ У ЭУКАРИОТ

Процесс трансляции у эукариот только в общих чертах аналогичен процессу трансляции у прокариот. Хотя 3'-концевая последовательность 18S-рРНК эукариот гомологична 3'-концу 16S-рРНК прокариот, в ней отсутствует участок комплементарный последовательности Шайна-Дальгарно. Лидерная последовательность эукариотических мРНК обычно короткая (не более 100 нуклеотидов), а для связывания с 40S-субчастицей при формировании инициаторного комплекса служит ее кэп. В эукариотических клетках обнаружено по крайней мере 9 факторов инициации: eIF1 (15 кДа, мономер), eIF2 (тример), eIF3 (>500 кДа, мультимер), eIF4A, eIF4B, eIF4C, eIF4D, eIF5 (150 кДа, мономер) и eIF6 (23 кДа, мономер). Эукариоты содержат также специальную инициаторную тРНК<sup>Met</sup>, но метионин, который к ней присоединяется, не формируется. Инициация у эукариот начинается с формирования тройного комплекса [тРНК<sub>i</sub><sup>Met</sup>7eIF27ГТФ] в результате присоединения eIF27ГТФ к тРНК<sub>i</sub><sup>Met</sup>. Затем тройной комплекс взаимодействует с 40S-субчастицей, и этот новый комплекс стабилизируется присоединяющимися белками eIF3 и eIF4C. eIF3 (вероятно, совместно с eIF6) играет ту же роль, что и прокариотический IF3, поддерживая малую субчастицу в свободном состоянии. eIF3 необходим и для последующего присоединения малой субчастицы к мРНК, для этого взаимодействия нужны также дополнительные белки eIF1, eIF4A и eIF4B и гидролиз АТФ. Присоединение 60S-субчастицы требует присутствия eIF5 и сопряжено с гидролизом ГТФ, который уже находится в инициаторном комплексе в составе [тРНК<sub>i</sub><sup>Met</sup>7eIF27ГТФ]. Вероятно, когда субчастицы соединяются образуя полную рибосому, все эукариотические факторы инициации освобождаются.

Есть два принципиальных отличия эукариотического механизма инициации трансляции от прокариотического. Во-первых, образование комплекса [тРНК<sub>i</sub><sup>Met</sup>7eIF27ГТФ7eIF3740S] у эукариот всегда происходит до связывания с мРНК, тогда как у прокариот обычно сначала [IF3730S] связывается с мРНК и лишь потом может присоединиться [тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>7IF2]. Вероятно, что у прокариот присоединение мРНК к 30S-субчастице возможно за счет комплементарного взаимодействия 16S-рРНК с последовательностью Шайна-Дальгарно, тогда как у эукариот, у которых эта последовательность отсутствует, связывание мРНК в инициаторном комплексе может произойти только за счет комплементарности инициаторного кодона и антикодона тРНК<sub>i</sub><sup>Met</sup>. Во-вторых, инициаторный комплекс у прокариот строится непосредственно на инициаторном кодоне, тогда как [тРНК<sub>i</sub><sup>Met</sup>7eIF27ГТФ7eIF3740S] садится на 5'-конец мРНК, а затем двигается вдоль мРНК к ее 3'-концу, используя энергию гидролиза АТФ до тех пор, пока не достигнет инициаторного кодона. Поэтому у прокариот возможна инициация транскрипции с любого цистрона в их полицистронной мРНК, а у эукариот мРНК всегда моноцистронные, а в полицистронной мРНК эукариотическая система трансляции может транслировать только первый цистрон. Пример эукариотического гена и соответствующей ему мРНК показан на рис. 135.

У эукариот есть два фактора элонгации - eEF1 и eEF2, которые соответствуют прокариотическим EF-T и EF-G. Роль eEF1 заключается в доставке аминоацил-тРНК в рибосому, при этом тоже осуществляется гидролиз ГТФ. Как происходит регенерация комплекса eEF1 с ГТФ, неизвестно, возможно, что этот фактор так же, как и EF-T, состоит из двух компонентов, аналогичных EF-Tu и EF-Ts. В количественном отношении eEF1 - один из наиболее многочисленных белков клетки. Белок eEF2 (100 кДа) тоже достаточно многочисленный белок и на его долю приходится около 1% растворимого белка клетки. Скорость элонгации у эукариот ниже, чем у прокариот, и составляет примерно 2 а.о./с. У эукариотических организмов был обнаружен только один релизинг-фактор - eRF. Для его связывания с рибосомой, по-видимому, требуется ГТФ, тогда как в прокариотических системах этого не нужно. Скорее всего гидролиз ГТФ нужен для отсоединения eRF от рибосомы после терминации.

В отличие от прокариотической мРНК информационная РНК в цитоплазме эукариот относительно стабильна. Обычно около половины мРНК имеет период полужизни около 6 ч, тогда как остальная мРНК - примерно 24 ч. В дифференцированных клетках, специализированных на синтезе определенных белков, некоторые мРНК могут быть еще более

стабильными. В цитоплазме активно синтезирующих белок клеток обычны скопления рибосом одновременно транслирующих молекулу мРНК, называемые *полисомами*. Полисомы всегда закреплены либо на мембране гранулярного эндоплазматического ретикулума, либо на филаментах цитоскелета и имеют тенденцию располагаться цепочкой поблизости от ядра в тех местах, где мРНК входит в цитоплазму. В противоположность полисомам мономерные рибосомы находятся в клетке в свободном состоянии.

Митохондрии и хлоропласты содержат свои собственные рибосомы, и тРНК прокариотического типа. Некоторые митохондрии грибов и млекопитающих содержат не более чем 23 - 24 различных тРНК. Такая "экономия" достигается у них за счет упрощения кодон-антикодонного взаимодействия, в результате которого одна тРНК становится способной узнавать всех представителей кодонового семейства и за счет небольших "поправок" их генетического кода, описанных выше. Поэтому 23 митохондриальных гена для тРНК кодируют инициаторную тРНК, 14 тРНК, узнающих пары кодонов, и 8 тРНК, узнающих семейства кодонов. Хлоропластные тРНК похожи на прокариотические настолько, что рибосомы хлоропластов способны использовать при синтезе белка бактериальные тРНК. Синтез белка в хлоропластах и в митохондриях начинается с N-формилметионина, как и у бактерий, а не с метионина, как в цитоплазме их клеток, и инициация транскрипции происходит у них по прокариотическому типу. Предполагают, что митохондрии и пластиды имеют свои собственные факторы элонгации, но они еще не охарактеризованы. Однако можно создать функционирующую гибридную рибосому, соединив малую субчастицу рибосомы из хлоропласта с большой из *E. coli*, а мРНК хлоропластов успешно транслируется в белоксинтезирующей системе *E. coli*.

Задача 45. Нуклеотидная последовательность ДНК:

5' Ц Ц Г Т Ц Т А Г А Т Г А А А Г Г А Г 3' Напишите соответствующую ей последовательность аминокислот.

#### КРАТКИЕ ВЫВОДЫ

Тогда как сам процесс транскрипции или трансляции осуществляется с высокой точностью с затратой энергии молекул АТФ или энергетически эквивалентных им ГТФ, начальные этапы инициации, включающие в себя стадии молекулярного узнавания и определяющие интенсивность экспрессии гена, зависят от энергетически слабых и сложно-

пространственно организованных взаимодействий между макромолекулами. Такая низкоэнергетическая (сигнальная) природа инициации представляет значительную трудность для изучения функционирования генетической системы клетки.

Сами генетические процессы одномерны: в них информация, заключенная в линейной последовательности нуклеотидов, используется для образования либо для изменения другой последовательности нуклеотидов или линейной последовательности аминокислот. Одномерность генетических процессов делает их проще для понимания, чем большинство других клеточных процессов, связанных с выражением информации, которую несут в себе трехмерные поверхности макромолекул и трехмерная архитектура взаимодействий макромолекул.

Несмотря на универсальность самих генетических процессов для разных организмов, механизмы их осуществления у эукариот сложнее, чем у прокариот. Это отражает большую сложность эукариотического генома по сравнению с прокариотическим и более тонкую регуляцию экспрессии эукариотических генов.

Рис. 123. Промоторы РНК-полимеразы II.

Рис. 124. Роль инвертированных повторов в организации вторичной структуры ДНК и РНК.

Рис. 125. Механизм г-зависимой терминации транскрипции.

Рис. 126. Примеры генов с интронами (обозначены буквами). Рис. 127. Предполагаемый механизм участия мРНК в сплайсинге РНК.

Рис. 128. Кэп 0 эукариотической мРНК.

Рис. 129. Число кодонов для каждой аминокислоты коррелирует с частотой встречаемости данной аминокислоты в белках.

Рис. 130. Обобщенная вторичная структура, характерная тура аминоксил-тРНК. Рамкой обдла всех тРНК. веден остаток аминокислоты. Рис. 131. Обобщенная структура, характерная тура аминоксил-тРНК. Рамкой обдла всех тРНК. веден остаток аминокислоты.

Рис. 132. Функционирование двух участков связывания тРНК на рибосоме.

Рис. 133. А - первая стадия элонгации трансляции. Б - стадия транслокации элонгации трансляции.

Рис. 134. Сопряжение транскрипции ДНК, трансляции и деградации мРНК у прокариот.

Рис. 135. Последовательность нуклеотидов фибробластного интерферонового гена человека. Указаны кодирующие триплеты и кодируемые ими аминокислоты. Иницирующий и терминирующий кодоны обведены рамками. Стрелками показаны участки, соответствующие 5'- и 3'-концам мРНК.

## Лекция 9. ТРАНСКРИПЦИЯ И ТРАНСЛЯЦИЯ

*Транскрипция - инициация транскрипции - элонгация и терминация транскрипции - модификация и процессинг эукариотических РНК-транскриптов - генетический код - биосинтез белка - трансляция у прокариот - трансляция у эукариот - краткие выводы*

Геном, т.е. молекула ДНК, содержит в себе скрытый план или схему развития организма. Реализация этого плана осуществляется белками, которые закодированы в ДНК. Свойства и признаки организма, его индивидуальные особенности - все это определяется белковым набором. Поэтому синтез белка является фундаментальным генетическим процессом. Интенсивность синтеза белка, кодируемого каким-либо геном, называется *экспрессией*, т.е. самовыражением, этого гена. Экспрессия гена состоит из двух этапов - ТРАНСКРИПЦИИ и ТРАНСЛЯЦИИ.

### ТРАНСКРИПЦИЯ

Транскрипция происходит в три стадии: 1) *инициация*, 2) *элонгация* и 3) *терминация*. Основным ферментом, осуществляющим транскрипцию, является *РНК-полимераза*. Так же, как и рибосомы, РНК-полимеразы бывают двух типов - прокариотические и эукариотические. РНК-полимераза прокариотического типа состоит из 5 субъединиц четырех видов (α, β, β' и σ) и имеет состав α<sub>2</sub>ββ'σ. Лучшее всего изучена РНК-полимераза из *Escherichia coli*: мол. масса ее субъединиц составляет 40 кДа (α), 155 кДа (β), 160 кДа (β') и 85 кДа (σ), фермент имеет несколько вытянутую форму и его максимальные размеры достигают 15 нм. α-, β- и β'-субъединицы разных видов бактерий имеют довольно близкую мол. массу, тогда как мол. масса σ-субъединицы варьирует в значительных пределах - от 44 до 92 кДа. Полный фермент (*голофермент*) состава α<sub>2</sub>ββ'σ нужен только для инициации транскрипции, а затем σ-субъединица (*σ-фактор*) освобождается из комплекса и элонгация осуществляется *минимальным ферментом* состава α<sub>2</sub>ββ'. У многих бактерий один и тот же минимальный фермент может взаимодействовать с разными σ-факторами, одновременно присутствующими в клетке, и тогда происходит инициация транскрипции только

определенной группы генов, "обслуживаемых" данным s-фактором. В некоторых случаях, например, при переходе бактерии к споруляции, блокируется синтез "обычного" и активируется синтез нового s-фактора. Это приводит к прекращению транскрипции одной группы генов и инициации транскрипции новой группы генов, т.е. к смене генетических программ в клетке. Общее количество РНК-полимераз, присутствующих в клетке *Escherichia coli*, оценивается как 7 тыс., в зависимости от условий роста в синтезе РНК может быть занято одновременно от 2 до 5 тыс. молекул фермента. РНК-полимеразы, кодируемые геномом размножающихся в бактериальных клетках *бактериофагов*, устроены гораздо проще прокариотических РНК-полимераз и состоят всего лишь из одной полипептидной цепи, но могут иницировать транскрипцию только определенных генов. Следовательно, сложность прокариотической РНК-полимеразы, по крайней мере частично, отражает наличие множества сигналов контроля, на которые она должна отвечать.

В ядре эукариот одновременно присутствуют три разные РНК-полимеразы эукариотического типа. РНК-полимераза I локализована в ядрышках и ответственна за транскрипцию генов рРНК, на ее долю приходится 50 - 70% клеточного синтеза РНК. В остальной части ядра локализованы РНК-полимераза II, обеспечивающая синтез гетерогенной ядерной РНК (предшественников мРНК), и РНК-полимераза III, обеспечивающая синтез многих малых РНК и тРНК. На их долю приходится 20 - 40% и 10% общего клеточного синтеза РНК соответственно. Каждая из эукариотических РНК-полимераз представляет собой крупный белковый агрегат, состоящий из двух больших субъединиц (примерно 200 и 140 кДа) и из порядка 10 маленьких субъединиц, варьирующих по мол. массе от 10 до 90 кДа. Ядра высших эукариот содержат около 40000 молекул РНК-полимеразы II, примерно такое же число молекул РНК-полимеразы I и вдвое меньше молекул РНК-полимеразы III, причем точное количество этих ферментов варьирует в зависимости от скорости роста клетки. Кроме ядерных РНК-полимераз в эукариотической клетке есть свои собственные РНК-полимеразы в митохондриях и хлоропластах, относящиеся к прокариотическому типу. Хлоропласты имеют две разные РНК-полимеразы, одна из которых кодируется ядерным геномом, а другая - пластидным геномом: для транскрипции гена внутрипластидной РНК-полимеразы необходимо поступление в хлоропласт синтезированной в цитоплазме пластидной РНК-полимеразы ядерного кодирования.

## ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ

Для инициации транскрипции необходим определенный участок молекулы ДНК, называемый ПРОМОТОРОМ. Он отличается от *стартовой точки*, которой служит пара оснований в ДНК соответствующая нуклеотиду, который первым включается в транскрипт, синтезируемый РНК-полимеразой. Промотор необходим для специфического связывания РНК-полимеразы с молекулой ДНК. ДНК, предшествующая стартовой точке, называется последовательностью, расположенной *против хода транскрипции*; ДНК после стартовой точки называется последовательностью, расположенной *по ходу транскрипции*. Последовательность ДНК принято записывать так, что транскрипция происходит слева направо (это соответствует обычному написанию мРНК в направлении от 5'-конца к 3'-концу). Положения оснований нумеруются в обоих направлениях, начиная от стартовой точки, которую обозначают как +1. По ходу транскрипции происходит нарастание порядковых номеров оснований. Позиции оснований, расположенных против хода транскрипции, обозначаются со знаком минус, и значения номеров возрастают по мере удаления от стартовой точки.

Исследование большого числа промоторов показало, что последовательности нуклеотидов, способные создавать сигнал для связывания РНК-полимеразы, сильно варьируют, хотя и обладают рядом общих структурных особенностей. У *E. coli* против хода

транскрипции от стартовой точки располагается область из 6 п.н., которая может быть обнаружена почти во всех промоторах. Эта последовательность может быть разной, но всегда похожа на последовательность ТАТААТ, которая называется *блоком Прибнова* (Pribnow). Сам блок Прибнова встречается достаточно редко, но он является *среднестатистической* или *канонической последовательностью*, составленной из оснований, наиболее часто встречающихся в каждой позиции. Каноническая последовательность может также быть представлена в виде  $T_{80}A_{95}T_{45}A_{60}A_{50}T_{96}$ , где цифрами показана частота (процент) встречаемости основания в данном положении. Центр блока Прибнова обычно располагается примерно на расстоянии 10 п.н. от стартовой точки против хода транскрипции. Поэтому иногда этот блок обозначают просто как *положение -10*. В действительности положение гексануклеотидного участка варьирует от -11 до -5 или от -14 до -8, причем последний интервал встречается чаще. Сходная последовательность обнаруживается в другом положении с центром около нуклеотидного остатка -35. Этот участок называется *последовательностью -35* и имеет структуру  $T_{82}T_{84}G_{78}A_{65}C_{54}A_{45}$ . Тогда как участок -10 входит непосредственно в область связывания ДНК с РНК-полимеразой, участок -35 лежит за пределами области прочного связывания, но, вероятно, важен на первом этапе взаимодействия РНК-полимеразы и ДНК и называется также *областью узнавания*. Расстояние между положениями -10 и -35 варьирует от 16 до 19 п.н. Хотя типичный промотор *E. coli* содержит оба участка -35 и -10, имеется ряд промоторов, не содержащих последовательности -35. Однако такие промоторы содержат расположенный рядом участок, который узнается дополнительным регуляторным белком, способствующим инициации. Обнаружено также очень небольшое число промоторов, лишенных последовательности -10. Поскольку участки -35 и -10 могут отсутствовать, можно предполагать существование других способов специфического узнавания РНК-полимеразой участка начала транскрипции, однако сколько существует таких механизмов и как они реализуются, пока не известно. Кроме того, для разных бактериальных  $\sigma$ -факторов может существовать своя собственная консервативная последовательность -35 и -10.

В случае эукариотической РНК-полимеразы II тоже находят две промоторные последовательности, аналогичные участкам -10 и -35 *E. coli* (рис. 123). Во-первых, почти повсеместно встречается последовательность из 7 н.п., отделенная от стартовой точки расстоянием от 19 до 27 п.н. (предпочтительно в положении -25). Каноническая последовательность имеет вид  $A_{63} A_{50}$

T82A97T93A85 A83

T37 T33

и называется *ТАТА* или *блоком Хогнесса*. Эта семичленная последова-

тельность обнаружена у самых разных эукариотических организмов - млекопитающих, птиц, амфибий и насекомых. Во-вторых, далее против хода транскрипции имеется другая последовательность, которая у некоторых промоторов консервативна, хотя в ряде других случаев она отсутствует. Эта последовательность, обозначаемая как *СААТ-блок*, располагается между положениями -70 и -80, и ее канонический состав имеет вид С

G G C A A T C T  
T

Промоторы РНК-полимеразы III расположены по ходу транскрипции внутри самих транскрибируемых генов. Например, промотор для транскрипции 5S-РНК находится внутри этого гена между положениями +55 и +80. РНК-полимераза III, вероятно, способна узнавать широкий диапазон промоторных последовательностей. Поскольку РНК-полимераза I транскрибирует только гены, кодирующие идентичные рРНК, то для нее не удастся вычленить последовательность промотора.

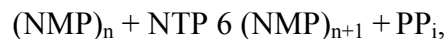
Промоторные области чрезвычайно богаты парами А-Т. Это связано с тем, что их функционирование связано с плавлением и образованием



одноцепочечных участков, необходимых, чтобы РНК-полимераза начала работать. Для разрыва двух водородных связей в каждой паре А-Т требуется меньше энергии, чем для разрыва трех водородных связей в паре Г-Ц, поэтому для расхождения цепей в промоторном участке требуется минимальное кол-во энергии.

### ЭЛОНГАЦИЯ И ТЕРМИНАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ

После связывания с ДНК РНК-полимераза начинает синтезировать цепь РНК, используя в качестве материала рибонуклеозид-5'-трифосфаты (АТФ, ГТФ, УТФ и ЦТФ) и высвобождая пирофосфат:



где N обозначает произвольное основание. Для активации РНК-полимераз нужны также ионы  $Mg^{2+}$ . Новые цепи РНК имеют строго определенную структуру 5'-конца: молекулы начинаются либо с рррА, либо с рррГ, чья 5'-трифосфатная группировка (обозначаемая ррр) не расщепляется до пирофосфата и остается без изменений на протяжении всего процесса транскрипции. В отличие от синтеза ДНК затравка для синтеза РНК не нужна, и новые цепи РНК образуются *de novo*.

РНК-полимераза движется вдоль транскрибируемой цепи ДНК в направлении 3' к 5', при этом строящаяся молекула РНК растет в длину в направлении 5' к 3' со скоростью 30 нуклеотидов/с. Максимальная скорость элонгации составляет 50 нуклеотидов/с. В процессе транскрипции нуклеосомная структура хроматина эукариот локально разрушается, но после прохождения РНК-полимеразы, вероятно, быстро восстанавливается.

У прокариот существуют два типа последовательностей ДНК, необходимые для остановки транскрипции, - *г-зависимые* и *г-независимые терминаторы*. Процесс терминации у первых зависит от наличия небольшого (55 кДа) белка, называемого *фактор г*. Оба типа терминаторов представляют собой *инвертируемые повторы*, или *палиндромы*, т.е. последовательности которых прочитываются одинаково как в прямом, так и в обратном направлении, а у *г-независимых терминаторов* на конце РНК всегда имеется небольшой отрезок из остатков У. Наличие палиндромов приводит к формированию вторичных структур типа "*крест*" в двухцепочечной ДНК и типа "*шпилька*" в одноцепочечной РНК (рис. 124). Шпилька, возникающая в синтезируемой РНК в месте палиндрома, заставляет РНК-полимеразу двигаться медленнее или останавливаться (продолжительность паузы сильно варьирует, но в среднем на обычном терминаторе фермент останавливается на 1 мин). На *г-независимых терминаторах* остановка РНК-полимеразы создает благоприятные условия для отделения РНК-транскрипта из комплекса с ДНК-матрицей, поскольку гибридная пара У-А характеризуется очень слабыми комплементарными взаимодействиями. В случае *г-зависимого терминатора* фактор *г* связывается с 5'-концом синтезирующейся РНК, а затем продвигается вдоль нее, используя для этого энергию гидролиза любых трифосфатрибонуклеотидов (Рис. 125). Остановка РНК-полимеразы на терминаторе позволяет *г-фактору* догнать ее. Затем фактор *г* взаимодействует с РНК-полимеразой, вызывая освобождение РНК и отделение полимеразы и самого фактора от матрицы. Максимальная активность *г-фактора* достигается уже при его концентрации, составляющей 10% от кол-ва РНК-полимеразы. Различная эффективность терминаторов объясняется разной величиной шпильки, которую они формируют, и, следовательно, разной длительностью остановки РНК-полимеразы. Пока мало что известно о сигналах терминации эукариот. Для эукариотической терминации не нужно образование шпильки. Эукариотические терминаторы практически всегда содержат короткую (4 - 5 нуклеотидов) последовательность из У, расположенную в Г-Ц богатом районе. Механизм терминации на столь коротком сигнале неизвестен.

В растущей клетке в среднем 200 млн. нуклеотидов полимеризуются каждую минуту с образованием РНК. Это примерно в 20 раз превышает среднюю скорость синтеза ДНК перед началом деления.

### МОДИФИКАЦИЯ И ПРОЦЕССИНГ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ РНК-ТРАНСКРИПТОВ

Тогда как у прокариот процесс транскрипции сопряжен с трансляцией, у эукариот отделение внутреннего пространства ядра, где идет транскрипция, от цитоплазмы, где идет трансляция, оболочкой из мембран позволяет существенно изменять строение РНК-транскриптов до того, как они станут матрицами для синтеза белка. Вся совокупность ядерных транскриптов РНК-полимеразы II называется *гетерогенной ядерной РНК* (гяРНК), поскольку входящие в нее РНК-транскрипты очень сильно различаются по длине. Многие из этих транскриптов в конце концов покидают ядро, превращаясь в молекулы *информационной* или *матричной РНК* (мРНК). Однако прежде чем выйти из ядра, молекулы мРНК претерпевают серию ковалентных модификаций, которые отличают их от транскриптов, синтезированных другими РНК-полимеразами. 5'-конец молекулы РНК *кэпируется* (от англ. cap - шапочка), т.е.

фермент *гуанилтрансфераза* присоединяет к нему посредством необычной трифосфатной связи остаток гуанозина, так что он оказывается в обратной ориентации по отношению к другим нуклеотидам. Кэпирование происходит еще до того, как будет завершена транскрипция, но дальнейшая модификация кэпа продолжается уже только в цитоплазме после выхода транскрипта из ядра.

После терминации транскрипции специальный фермент *poly(A)-полимераза* присоединяет к 3'-концу каждого РНК-транскрипта, который станет молекулой мРНК, 100 - 200 остатков адениловой кислоты [*poly(A)*], осуществляя реакцию  $nATP \rightarrow (AMP)_n + nPP_i$ , что завершает процесс образования *первичного РНК-транскрипта*. Присоединение poly(A) (*полиаденилирование*) происходит либо непосредственно после терминации транскрипции, либо после специфического расщепления растущей цепи РНК. Предполагается, что такой "хвост" способствует последующему *процессингу* и экспорту зрелых молекул мРНК из ядра. Когда мРНК только поступает в цитоплазму, ее poly(A)-конец имеет примерно ту же самую длину, что и в ядре, но затем начинает постоянно укорачиваться. Таким образом, клеточная популяция мРНК содержит как "новые", так и "старые" молекулы, имеющие относительно длинные и более короткие poly(A)-участки. Однако длина poly(A)-конца в данной молекуле, по-видимому, не влияет ни на ее способность к трансляции, ни на ее стабильность в цитоплазме. Примерно треть зрелых клеточных мРНК не имеет poly(A)-хвоста. Основной компонент этой poly(A)-фракции представлен молекулами гистоновых мРНК, кодирующих гистоновые белки хромосом. Эти мРНК имеют небольшие размеры и активно синтезируются только в периоды репликации клеточной ДНК. Остальная часть poly(A)-фракции (примерно 2/3) идентична фракции poly(A)-молекул, так что некоторые гены представлены транскриптами, часть которых полиаденилирована, а часть - нет.

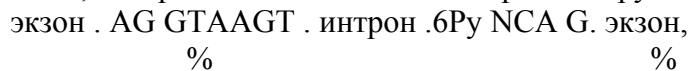
Средняя длина новообразованной молекулы РНК, синтезированной РНК-полимеразой II, составляет около 8000 нуклеотидов, и часто встречаются молекулы РНК, насчитывающие 10 - 20 тыс. нуклеотидов, что намного превышает величину 1200 нуклеотидов, которая достаточна для синтеза средней белковой молекулы из 400 аминокислотных остатков. Длина новосинтезированных молекул РНК быстро уменьшается, достигая размеров цитоплазматической мРНК по прошествии уже примерно 30 мин после завершения своего синтеза. Этот процесс называется *процессингом* РНК. Укороченные мРНК начинают покидать ядро, превращаясь в мРНК. Однако цитоплазмы достигает не более 5% общей массы гяРНК. Остальные последовательности рибонуклеотидов деградируют в ядре с образованием множества мелких фрагментов, что занимает около 1 ч.

Большинство эукариотических генов содержат в своей нуклеотидной последовательности протяженные нетранслируемые вставки, которые прерывают соответствие между нуклеотидной последовательностью остальных участков гена и аминокислотной последовательностью полипептида, кодируемого этим геном (рис. 126). Такие нетранслируемые участки ДНК в генах называют ИНТРОНАМИ, тогда как участки гена, кодирующие аминокислотную последовательность полипептида, называют

**ЭКЗОНАМИ.** Интронные последовательности РНК специфически выщепляются из каждого РНК-транскрипта в ходе его превращения в "зрелую" молекулу мРНК, способную участвовать в синтезе белка. Поскольку экзоны после вырезания интронов соединяются друг с другом в стык и образуют единое целое, процессинг РНК, протекающий по такой схеме (рис.

127), получил название СПЛАЙСИНГ (от англ. splice - сращивать). В ядре типичной эукариотической клетки транскрибируется с образованием РНК 7 - 10% геномной ДНК, тогда как цитоплазматические мРНК представляют лишь 1 - 2% нуклеотидных последовательностей генома. Разница, по-видимому, обусловлена главным образом деградацией интронных участков молекул гяРНК.

Размер интронов варьирует от 0.1 до 10 тыс. нуклеотидов, а отношение длины всего гена к его кодирующей части у животных лежит в пределах от 1.2 до 26.2 и в среднем составляет 5.5. Число интронов может быть от 1 до > 50 как в случае коллагеновых генов. Большую часть нуклеотидной последовательности интрона можно искусственно изменять без всякого вреда для функционирования гена. Поэтому в ходе эволюции в интронах быстро накапливаются мутации. Однако на концах интрона находится по несколько нуклеотидов, которые нельзя изменить без риска нарушить всю работу гена:



%

%

левая граница

правая граница

где 6Pu - 6 пиримидинов подряд, а N - любой нуклеотид. Эти короткие пограничные последовательности есть почти у всех исследованных интронов и служат сигналами для сплайсинга РНК. Эти пограничные участки интронов оказались комплементарны определенным участкам молекул

РНК, присутствующих в многочисленных *малых ядерных рибонуклеопротеиновых частицах* (мяРНП), средняя мол. масса которых составляет 250 кДа. Предполагаемый механизм участия мяРНП в сплайсинге РНК показан на рис. 127. Другие разновидности мяРНП нужны для сборки рибосом в ядрышке и, вероятно, участвуют в транспортировке различных молекул РНК из ядра в цитоплазму. мяРНК служат примером того, что не только белки могут обладать ферментативной активностью. Кроме того, в некоторых случаях способность к сплайсингу оказывается внутренним свойством самой РНК. В этом случае образование молекулой РНК специфической вторичной (или третичной) структуры делает возможным *автокатализ*.

В тех случаях, когда ген содержит несколько интронов, важно, чтобы экзоны соединялись в правильной последовательности, а не случайным образом. Как осуществляется такой контроль, неизвестно, однако нет какого-либо обязательного порядка сплайсинга (поскольку находят промежуточные продукты, у которых интроны удалены в разных комбинациях), но есть предпочтительный порядок протекания сплайсинга. В некоторых случаях в клетке осуществляются несколько детерминированных *альтернативных сплайсингов*, что приводит к образованию из одного и того же РНК-транскрипта нескольких отличающихся друг от друга молекул мРНК, кодирующих различные белки. Примером может служить формирование многообразия антител в лимфоцитах. Возможно также, что альтернативный сплайсинг происходит в процессе клеточной дифференцировки. Таким образом, само существование сплайсинга придает клетке дополнительную генетическую гибкость. Известны случаи, когда интрон одного гена может быть экзоном другого гена, или когда интрон самостоятельно кодирует небольшой регуляторный белок. Одно из предположений связывает происхождение интронов у эукариот с появлением возможности комбинирования экзонов ("мини-генов"), каждый из которых кодирует функционально значимый белковый домен, что приводит к возникновению в ходе эволюции новых генов, кодирующих белки с новыми полезными свойствами.

Только около 5% общей массы РНК-транскриптов покидает клеточное ядро. Специфические сигналы, служащие "пропуском" на выход из ядра различных РНК, пока не идентифицированы. Вероятно они возникают во время сплайсинга РНК, поскольку при введении в ядро гена, из которого генно-инженерными методами были искусственно удалены интроны, его РНК-транскрипты остаются в ядре. В то же время должны существовать и какие-то другие пути возникновения сигналов экспорта в молекулах мРНК, потому что не все эукариотические гены содержат интроны.

После выхода мРНК из ядра цитоплазматический фермент *гуанил-7-метил-трансфераза*, используя в качестве кофактора S-аденозилметионин, присоединяет метильную группу к 5'-концевому гуанину, "пришитому" в ядре гуанилтрансферазой. Получившаяся структура называется *кэп 0* и встречается у всех одноклеточных эукариот (рис.

128). У многоклеточных эукариот другой фермент (*2'-0-метил-трансфераза*) добавляет еще одну метильную группу к следующему (т.е. первому до кэпирования) нуклеотиду мРНК. Такой кэп называется *кэпом 1*. У некоторых видов метильная группа может добавляться к следующему (второму до кэпирования) нуклеотиду и получается трижды метилированный *кэп 2*. Обычно кэпы типа 2 составляют только 10 - 15% от суммарной кэпированной популяции молекул. Кэпы играют основную роль в процессе присоединения мРНК к малой субчастице рибосомы перед началом трансляции, а дополнительные акты метилирования, вероятно, повышают эффективность связывания с рибосомой.

Новообразованные эукариотические мРНК видимо всегда ассоциирована с белками, образуя рибонуклеопротеиновые частицы (*мРНП*). В мРНП клеток млекопитающих обнаруживаются два основных белка 52 и 78 кДа, остальные белки являются минорными компонентами. 78 кДа белок связан с poly(A)-хвостом мРНК. Функциональное значение этих белков неизвестно, хотя они могут принимать участие в транспорте мРНК из ядра в цитоплазму или оказывать влияние на их трансляцию. Возможно также, что некоторые мРНП (*информосомы*) содержат мРНК неактивные в данный момент, которые будут вовлечены в трансляцию на более поздних стадиях или при изменившихся условиях.

Хотя синтез РНК в митохондриях и хлоропластах мало чем отличается от транскрипции у прокариот, в митохондриях есть свои особенные разновидности процессинга. Например, в клетках человека обе цепи митохондриальной ДНК транскрибируются с одинаковой скоростью от единственного промотора каждой цепи. При этом образуются две гигантские молекулы РНК, каждая из которых представляет собой полную копию одной цепи ДНК. После этого РНК-транскрипты нарезаются нуклеазами: из одной цепи получают 2 молекулы рРНК, 14 тРНК и 12 мРНК, а из другой - только 8 тРНК и 1 мРНК (90% последовательности этого транскрипта не несет полезной информации и расщепляется). За-

тем митохондриальная poly(A)-полимераза присоединяет к 3'-концу молекул мРНК poly(A)-хвост из примерно 55 нуклеотидов, однако они остаются некэпированными. У дрожжей, в отличие от человека, митохондриальные гены содержат интроны, которые удаляются из сплайсингом. Все гены, кроме одного, синтезируются у дрожжей с одной цепи ДНК, причем существует несколько промоторов для разных генов.

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

Соответствие между последовательностью нуклеотидов в гене и последовательностью аминокислот в белке устанавливается с помощью ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА. В нуклеотидной последовательности должно быть достаточно кодирующих единиц, чтобы закодировать 20 аминокислот. Но в ДНК содержится только 4 разных основания, и это означает, что аминокислота должна быть закодирована более чем одним основанием.

Если бы два основания определяли одну аминокислоту, то в ДНК могло бы быть закодировано только  $4^2 = 16$  видов аминокислот. Поскольку этого недостаточно, генетический код должен быть *триплетен*, т.е. каждой аминокислоте должны соответствовать три расположенных последовательно основания. Поскольку число возможных триплетных комбинаций составляет  $4^3 = 64$ , то существование триплетного кода предполагает, что либо не все триплеты участвуют в кодировании аминокислот, либо некоторые аминокислоты кодируются более чем одним триплетом. В генетических экспериментах была доказана триплетная природа генетического кода и показано, что почти все аминокислоты кодируются более чем одним триплетом.

Генетический код представлен в таблице 11. Последовательность из трех нуклеотидов, соответствующая одной аминокислоте, называется КОДОНОМ. Последовательность кодонов читается непрерывно, начиная с фиксированной стартовой точки на одном конце гена, и заканчивается в точке *терминации* на другом конце гена. Последовательность нуклеотидов прочитывается в направлении от 5'-конца к 3'-концу и соответствует аминокислотной последовательности, записанной в направлении от N-конца к С-концу.

Важнейшими свойствами генетического кода являются его *универсальность* и *вырожденность*. Генетический код универсален для всех живых организмов как прокариотических, так и эукариотических. Это подтверждается существованием *гетерологических систем трансляции*, т.е. когда мРНК одного организма правильно прочитывается *in vivo*

или *in vitro* белок-синтезирующим аппаратом организма совсем другого вида, типа или царства. Исключения из универсальности генетического кода были обнаружены в митохондриях некоторых видов. У них было обнаружено одно общее изменение: кодон UGA читается так же, как UGG, и кодирует триптофан. У дрожжей кодон CUA и, возможно, все семейство кодонов, начинающиеся с дуплета CU, кодируют треонин вместо лейцина. У млекопитающих AUA имеет то же значение, что AUG, и означает метионин вместо изолейцина, а кодоны AGA и AGG вызывают терминацию цепи, а не кодируют аргинин. Однако это - редкие исключения и, игнорируя их, можно предполагать, что универсальность кода свидетельствует о том, что он сложился очень рано в процессе эволюции.

Таблица 11 Генетический код.

Первое положение (5'-конец)	2		Второе положение	Г	2	Третье положение (3'-конец)
	Ц	А				
У	Фен	Фен	Сер Тир	Цис	У	У
	Фен	Лей	Сер Тир	Цис	Ц	Ц
	Лей	Лей	Сер Стоп	Стоп	А	А
	Лей	Лей	Сер Стоп	Три	Г	Г
Ц	Лей	Лей	Про Гис	Арг	У	У
	Лей	Лей	Про Гис	Арг	Ц	Ц
	Лей	Лей	Про Глн	Арг	А	А
	Лей	Лей	Про Глн	Арг	Г	Г
А	Иле	Иле	Тре Асн	Сер	У	У
	Иле	Иле	Тре Асн	Сер	Ц	Ц
	Иле	Иле	Тре Лиз	Арг	А	А
	Мет	Мет	Тре Лиз	Арг	Г	Г

Г	Вал	Ала Асп	Гли	У Ц А Г
	Вал	Ала Асп	Гли	
	Вал	Ала Глу	Гли	
	Вал	Ала Глу	Гли	

То, что 20 аминокислот представлены 61 кодоном, означает, что генетический код вырожденный. Почти каждой аминокислоте соответствует несколько *кодонов-синонимов*. Число кодонов для одной аминокислоты достаточно хорошо отражает частоту встречаемости данной аминокислоты в белках. Как видно на рис. 129, такая корреляция наблюдается для всех аминокислот, за исключением аргинина, поскольку в эукариотической ДНК дуплет CG встречается редко. Поэтому четыре кодона, соответствующие аргинину, которые начинаются с этого дуплета, встречаются реже, чем следовало бы ожидать. Другой особенностью кода является тенденция к группировке кодонов, соответствующих одной аминокислоте. Часто основание в третьем положении кодона оказывается несущественным для его специфичности. Одна аминокислота может быть представлена четырьмя кодонами, различающимися только по третьему основанию. Иногда различие состоит лишь в предпочтении пуринового основания пиримидиновому в этом положении. Меньшую специфичность этого положения в кодоне называют *вырожденностью третьего основания*. Эта особенность, а также тенденция к сходству кодонов у аминокислот одного типа (т.е. полярных, гидрофобных и т.д.) сводят до минимума эффект мутаций. При такой организации кода случайно возникшая замена основания с большей вероятностью (чем при случайном подборе кодонов) приведет к замене на сходную по свойствам аминокислоту или же замены не произойдет вовсе.

Задача 40. На планете UX-153 живые существа состоят из белков, содержащих 40 аминокислот, а их ДНК содержит только три вида нуклеотидов. Какие предположения можно сделать о генетическом коде, используемом этими организмами?

Задача 41. На планете ZJ-578 все живые организмы можно разбить на две группы по набору аминокислот, которые используются ими для построения белков. Часть аминокислот в этих наборах одинакова для обеих групп, а остальные строго специфичны для каждой группы. Какие предположения можно сделать о генетическом коде, используемом этими организмами, если нуклеотидный состав ДНК в обеих группах одинаков?

#### БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

Процесс белкового синтеза протекает в пять основных этапов, каждый из которых требует множества компонентов: 1) активация аминокислот; 2) инициация синтеза полипептидной цепи; 3) элонгация полипептидной цепи; 4) терминация и высвобождение; 5) сворачивание полипептидной цепи и процессинг.

Активация аминокислот протекает в цитозоле. Каждая из 20 аминокислот ковалентной эфирной связью присоединяется к определенной транспортной РНК (тРНК), и для этого используется энергия АТФ:

Аминокислота + тРНК + АТФ → Аминоацил-тРНК + АМФ + пирофосфат. Эти реакции катализируются группой из 20 ферментов, называемых *аминоацил-тРНК-синтетазами*, каждый из которых является специфическим по отношению к одной из аминокислот и к соответствующей этой аминокислоте тРНК. Аминоацил-тРНК-синтетазы очень специфичны как в отношении тРНК, так и соответствующей ей аминокислоты. Например, R-группы валина и изолейцина структурно очень похожи друг на друга, однако ошибочное встраивание в полипептидную цепь валина вместо изолейцина происходит не чаще, чем ошибки встраивания других аминокислот (примерно 1 ошибка на 3 - 4 тыс. а.о.). Это объясняется тем, что изолейцил-тРНК-синтетаза распознает ошибочно присоединенный ва-

лин, когда валил-тРНК находится еще в реакционном центре фермента и гидролизует его, исправляя допущенную ошибку.

тРНК представляют собой сравнительно небольшие одноцепочечные молекулы РНК, состоящие из 73 - 93 нуклеотидов, что соответствует мол. массе 24 - 31 кДа. Каждой аминокислоте соответствует хотя бы одна тРНК, некоторым аминокислотам соответствуют две или большее число специфических тРНК. Чтобы распознать все аминокислотные кодоны, требуется по меньшей мере 32 тРНК (таблица 11), однако в некоторых клетках присутствует намного больше разных вариантов тРНК. Все тРНК имеют много общих черт строения (рис. 130). Во всех тРНК не менее 8 нуклеотидов содержат необычные, модифицированные основания, многие из которых представляют собой метилированные производные главных оснований. В большинстве тРНК на 5'-конце находится остаток гуаниловой кислоты (pG), а на 3'-конце всех тРНК присутствует тринуклеотидная последовательность -С-С-А. В молекуле тРНК выделяют 4 ветви и иногда пятую дополнительную. *Акцепторная ветвь* присоединяет специфическую аминокислоту в рассмотренной выше реакции. Обобщенная структура образующейся при этом молекулы аминоацил-тРНК показана на рис. 131. *Антикодоновая ветвь* содержит АНТИКОДОН, т.е. специфический триплет нуклеотидов, который комплементарен в антипараллельном направлении соответствующему триплету (кодону) мРНК и может образовывать с ним пары оснований. Каждая тРНК имеет свой особый антикодон. *Дигидроуридиновая ветвь* содержит необычный нуклеозид дигидроуридин. *ТЭС-ветвь* содержит необычные нуклеозид риботимидин (Т) и нуклеозид псевдоуридин (J), в котором основание и пентоза соединены необычной углерод-углеродной связью. Трехмерная структура дрожжевой фенилаланиновой (т.е. имеющей антикодон для аминокислоты фенилаланина) тРНК была получена с помощью рентгеноструктурного анализа (часть 1, рис. 14). Вероятно, другие тРНК имеют похожую третичную структуру.

На второй стадии - при *инициации* - происходят события, предшествующие образованию пептидной связи между первыми двумя аминокислотами белка. Для инициации необходимо, чтобы рибосома связалась с информационной или матричной РНК (мРНК), образовав иницирующий комплекс совместно с первой аминоацил-тРНК. Это относительно медленная стадия в синтезе белка. мРНК взаимодействует с малой субъединицей рибосомы. Хотя в рибосоме оказывается связан участок длиной в 30 оснований, только две молекулы тРНК могут разместиться в рибосоме одновременно. Поэтому в синтезе белка в каждый момент времени принимают участие только 2 из 10 кодонов, находящихся в рибосоме. Соответственно этим двум кодонам в рибосоме выделяют 2 участка: *акцепторный* участок (*А-участок*), который может быть занят очередной (новопоступающей) аминоацил-тРНК, и *донорный* участок (*Р-участок*), занятый комплексом *пептидил-тРНК*, представляющим собой тРНК, несущую полипептидную цепь, синтезированную к данному моменту (рис. 132).

Задача 42. Напишите, какие антикодоны может иметь тРНК, переносящая лейцин.

Задача 43. Сколько разных мРНК может кодировать аминокислотную последовательность Val-Glu-Ala-Cys-Val-Tyr-Gly-Thr-Leu?

#### ТРАНСЛЯЦИЯ У ПРОКАРИОТ

Прокариотические мРНК значительно различаются по кол-ву кодируемых ими белков. Некоторые молекулы соответствуют только одному гену - это *моноцистронные* мРНК. Другие (и таких большинство) состоят из последовательностей, кодирующих несколько белков, - это *полицистронные* мРНК. В этом случае единая мРНК транскрибируется с группы генов, расположенных рядом. Такая единая транскрипционная единица называется *оперон*. В составе прокариотической мРНК выделяют *ли-*

дерную последовательность, кодирующий участок и концевую последовательность (трейлер). Лидерная последовательность, расположенная с 5'-конца от инициаторного кодона, содержит последовательность

5'.AGGAGG.3',

которая называется *последовательность Шайна-Дальгарно* и располагается на расстоянии 4 - 7 оснований перед инициаторным кодоном. Последовательность Шайна-Дальгарно комплементарна участку в 3'-концевой области 16S-рРНК 30S-субъединицы рибосомы. Эта комплементарность, вероятно, существенна для связывания мРНК малой рибосомной субчастицей во время формирования инициаторного комплекса. Кодирующий участок состоит из одного или нескольких цистронов и межцистронных областей, которые могут иметь размеры от 1 до 30 нуклеотидов. Каждый цистрон начинается инициаторным кодоном и заканчивается терминирующим кодоном.

Для инициации трансляции мРНК должна иметь участок, предшествующий началу кодирующей области, который служит сигналом для связывания с рибосомой (вероятно, эту роль выполняет последовательность Шайна-Дальгарно) и иницирующей кодон АУГ, который является стартовой точкой и определяет "рамку считывания" (у бактерий вместо АУГ иногда используется кодон ГУГ). Кроме того, для инициации необходимы специальные иницирующие тРНК и белковые факторы.

У прокариот известны 3 фактора инициации, белки с мол. массами 9.5, 73 и 23 кДа, обозначаемые IF1, IF2 и IF3 соответственно. Пул свободных (не занятых трансляцией) рибосом находится постоянно в динамическом равновесии с пулами свободных больших и малых субчастиц: 70S = 30S + 50S. IF3 связывается со свободными 30S-субчастицами, и они уже не могут ассоциировать с 50S-субчастицами, но зато могут присоединиться к мРНК, т.к. для того чтобы 30S-субчастица связалась с мРНК, необходимо присутствие IF3, хотя специфичность узнавания участков инициации на мРНК всецело определяется рибосомной субчастицей. В клетке кол-во IF3 лимитировано, и поэтому с ним связано только 5% 30S-субчастиц (или около 25% 30S-субчастиц, не участвующих в синтезе белка).

У *E. coli* существует специальная инициаторная тРНК - *N-формилметионил-тРНК* (тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>), - которая так же, как и обычная тРНК<sup>Met</sup>, присоединяет к себе метионин. Однако фермент *трансформилаза* переносит *формильную группу* от молекулы *N-формилтетрагидрофолата* к аминогруппе метионинового остатка, связанного с инициаторной тРНК.

Блокированная формилом аминогруппа, вероятно, необходима для специфичного связывания с тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> белка IF2. Когда 30S-субчастица рибосомы садится на мРНК, только тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>, связанная с IF2, обладает уникальным свойством непосредственно входить в Р-участок недостроенной рибосомы, связываясь с находящимся там АУГ (или ГУГ) кодоном. Далее к комплексу [мРНК730S7IF37тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>7IF2] присоединяется молекула ГТФ. Соединение двух рибосомальных субчастиц, вероятно, осуществляется за счет частичной комплементарности между участком 23S-рРНК большой субчастицы и 3'-областью 16S-рРНК малой субчастицы. Именно с этой 3'-областью 16S-рРНК связывается IF3, и поэтому присоединение большой 50S-субчастицы возможно только после высвобождения IF3 из инициаторного комплекса. И, наконец, после гидролиза ГТФ до ГДФ, который, вероятно, осуществляется IF2 и сопряжен с конформационными изменениями в формирующейся рибосоме, образуется полная 70S-рибосома, в которой тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> располагается в Р-участке. После того, как образовалась полная рибосома, другие (внутренние) АУГ и ГУГ кодоны будут прочитываться как метиониновый и валиновый соответственно и связываться с обычными тРНК<sup>Met</sup> и тРНК<sup>Val</sup>. Роль белка IF1 пока не выяснена, по-видимому, он принимает участие в стабилизации иницирующего комплекса или способствует высвобождению IF2 из комплекса.

Присоединение каждого аминокислотного остатка к растущей полипептидной цепи на прокариотических рибосомах происходит в три стадии. Этот цикл повторяется столько раз,



сколько остатков следует присоединить. В процессе элонгации у прокариот используются еще три белковых фактора - EF-Tu (43.2 кДа), EF-Ts (74 кДа) и EF-G (77.5 кДа). На первой стадии цикла элонгации сначала происходит связывание следующей аминоацил-тРНК с комплексом, состоящим из EF-Tu и молекулы ГТФ. Образующийся тройной комплекс соединяется с 70S-инициирующим комплексом. Одновременно происходит гидролиз ГТФ, и комплекс EF-Tu7ГДФ покидает рибосому, после чего с помощью ГТФ и EF-Ts комплекс EF-Tu7ГДФ восстанавливается до EF-Tu7ГТФ и снова может принимать участие в трансляции. Белок EF-Tu - это один из основных белков у прокариот: в одной клетке насчитывается около 70 тыс. его молекул, что составляет 5% от общего клеточного белка. Этого достаточно для связывания всего клеточного пула аминоацил-тРНК, количество которых примерно на порядок превышает число рибосом. Содержание EF-Ts составляет около 10 тыс. молекул на клетку, что примерно соответствует числу рибосом. Следовательно, большинство EF-Tu в клетке входит в состав комплексов [EF-Tu7ГТФ] и [EF-Tu7ГТФ7аминоацил-тРНК]. Далее новая аминоацил-тРНК связывается с А-участком рибосомы за счет комплементарного взаимодействия между антикодоном этой аминоацил-тРНК и кодоном мРНК, находящимся в А-участке (рис. 133, А). Однако кодон-антикодонное взаимодействие недостаточно, чтобы обеспечить связывание правильной аминоацил-тРНК. Точность ее соответствия кодону мРНК проверяется с помощью еще одного специфического контакта внутри А-участка между другой частью молекулы тРНК и рРНК. Следующая стадия элонгации наступает только если оба контакта оказываются правильными. тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> - это единственная аминоацил-тРНК, которая не может присоединиться к комплексу [EF-Tu7ГТФ], и поэтому она не может попасть в А-участок рибосомы и проконтактировать с внутренними кодонами АУГ и ГУГ.

На второй стадии цикла элонгации образуется новая пептидная связь между аминокислотами, чьи тРНК расположены в А- и Р-участках рибосомы. Этот процесс осуществляется у прокариот в результате переноса иницирующего N-формилметионинового остатка от несущей его тРНК к аминогруппе новой аминокислоты, которая только что попала в А-участок. Этот перенос катализируется *пептидилтрансферазой*, которая входит в состав малой субчастицы. В результате этой реакции в А-участке образуется дипептидил-тРНК, а в Р-участке остается "пустая", незагруженная тРНК<sub>f</sub><sup>Me</sup>.

На третьей стадии цикла элонгации рибосома перемещается вдоль мРНК по направлению к ее 3'-концу на расстояние в один кодон. Поскольку дипептидил-тРНК по-прежнему остается связанной со вторым кодоном мРНК, движение рибосомы приводит к перемещению дипептидил-тРНК из А-участка в Р-участок, в результате чего предыдущая, уже свободная тРНК, отделяется от Р-участка и уходит обратно в цитозоль. Теперь в А-участке находится третий кодон мРНК, а второй кодон оказывается в Р-участке. Передвижение рибосомы вдоль мРНК называется *транслокацией*. На этой стадии необходим белок EF-G, называемый также *транслоказой*, и гидролиз еще одной молекулы ГТФ (рис. 133, Б). На этой стадии происходит изменение конформации всей рибосомы, способствующее ее продвижению по мРНК на три нуклеотида в направлении к 3'-концу матрицы. Процесс транслокации обеспечивается энергией за счет гидролиза ГТФ: EF-G связывается с рибосомой только будучи в присутствии ГТФ, а затем после гидролиза ГТФ он высвобождается из рибосомы. Теперь рибосома с прикрепленными к ней дипептидил-тРНК и мРНК готова к следующему циклу элонгации, т.е. к присоединению третьего аминокислотного остатка. Осуществляется это точно так же, как и присоединение второго остатка. На присоединение каждой аминокислоты затрачивается 2 молекулы ГТФ, которые гидролизуются до ГДФ и фосфата. Кол-во транслоказы сравнимо с кол-вом рибосом (около 20 тыс. молекул/клетку) и на ее долю приходится 2% растворимого клеточного белка.

По мере движения рибосомы от кодона к кодону вдоль мРНК к ее 3'-концу аминокислотные остатки один за другим добавляются к растущей полипептидной цепи, которая все это время остается связанной с тРНК, соответствующей последней включенной аминокислоте. Синтез полипептидной цепи всегда начинается с N-конца и полипептидная цепь растет в направлении к С-концу. У бактерий при 37°C скорость элонгации варьирует от 12 до 17 а.о./с. Конкретная величина скорости зависит от условий роста клеток. В синтезе белка одновременно участвуют 80% бактериальных рибосом.

Об окончании нуклеотидной последовательности, соответствующей полипептиду, сигнализирует один из трех *терминирующих кодонов* мРНК, расположенный непосредственно за кодоном последней аминокислоты. Терминирующие триплеты УАА (охра-кодон), УАГ (амбер-кодон) и УГА (опал-кодон), называемые так по названию мутантов *E. coli*, с помощью которых они были впервые определены, не кодируют никакую аминокислоту, поэтому их еще называют *бессмысленными триплетами (нонсенс-триплетами)*. Как только рибосома достигает терминирующего кодона, начинают действовать три терминирующих белка (*релизинг-факторы*) - RF1 (узнает УАА и УАГ), RF2 (узнает УГА и УАА) и RF3. Они вызывают гидролитическое отщепление полипептида от конечной тРНК и его высвобождение и отделение от Р-участка рибосомы последней, уже "пустой" тРНК. Формильная группа метионина синтезированного белка удаляется специальным деформирующим ферментом. В том случае, если в белке N-концевой аминокислотой является метионин, то достаточно только этой модификации. Если же белок должен начинаться с другой аминокислоты, то с помощью аминокептидазы удаляется метионин и вторая аминокислота превращается в N-концевую.

Для обеспечения точности белкового синтеза необходима энергия. На ферментативное образование каждой аминоацил-тРНК из свободной аминокислоты затрачиваются 2 высокоэнергетические фосфатные группы.

Для исправления ошибок аминоацил-тРНК-синтетазой могут потребоваться добавочные молекулы АТФ. 1 молекула ГТФ расщепляется на стадии инициации, 1 молекула ГТФ расщепляется на первой стадии каждого цикла элонгации и еще 1 молекула ГТФ требуется для транслокации рибосомы. Молекулы ГТФ, участвующие в работе рибосомы, вероятно, выполняют 2 функции: 1) они поддерживают в соответствующей конформации белковые факторы трансляции, чтобы они могли присоединиться к рибосомному комплексу, и 2) гидролизуясь, обеспечивают энергией соответствующие этапы синтеза белка, в каждом случае вызывая конформационные изменения в рибосоме.

У прокариотических организмов транскрипция и трансляция сопряжены: рибосомы прикрепляются к 5'-концу растущей мРНК и начинают синтез белка раньше, чем заканчивается синтез самой мРНК. При этом прокариотические мРНК "живут" очень недолго: время, за которое разрушается половина вновь синтезированных мРНК (*функциональное время полужизни*), составляет в среднем 2 мин. При этом деградация 5'-конца мРНК может начаться раньше, чем закончится синтез или трансляция 3'-конца той же молекулы (рис. 134). Скорости транскрипции (2500 нуклеотидов/мин) и трансляции (15 а.о./с) примерно равны, тогда как деградация мРНК происходит примерно вдвое медленнее. В результате 3'-концевая часть мРНК существует дольше, чем 5'-концевая область. Число рибосом, принимающих участие в трансляции определенной мРНК в какой-либо момент времени, зависит от эффективности узнавания иницирующих последовательностей. С момента транскрипции до момента деградации каждую мРНК, вероятно, успевают протранслировать около 30 рибосом.

Когда межцистронные области велики, инициаторный комплекс каждый раз заново строится вокруг инициаторного кодона цистрона. Однако при малых межцистронных расстояниях 30S-субчастица терминирующей рибосомы может не отделяться от мРНК. С большой вероятностью она остается прикрепленной к матрице, так как фактически ее присоединение к следующему инициаторному сайту уже произошло (находясь на мРНК рибосома экранирует около 35 оснований). При этом 50S-субчастица и синтезированная

полипептидная цепь освобождаются, а затем к связанной с мРНК 30S-субчастице присоединяется новая 50S-субчастица. Такой облегченный способ инициации транскрипции следующего цистрона называется *реинициация транскрипции*.

Задача 44. Функциональное время полужизни трехцистронной мРНК длиной 2800 нуклеотидов составляет 2 мин. Каждую минуту происходит 5 актов иницирования транскрипции, а элонгация транскрипции идет со скоростью 2500 нуклеотидов/мин. Каждую минуту происходит 10 актов инициации трансляции первого цистрона и всегда происходит реинициация транскрипции второго и третьего цистронов. Элонгация полипептидной цепи идет со скоростью 15 а.о./с. Сколько полипептидных цепей в мин. синтезируется с этой транскрипционной единицы?

#### ТРАНСЛЯЦИЯ У ЭУКАРИОТ

Процесс трансляции у эукариот только в общих чертах аналогичен процессу трансляции у прокариот. Хотя 3'-концевая последовательность 18S-рРНК эукариот гомологична 3'-концу 16S-рРНК прокариот, в ней отсутствует участок комплементарный последовательности Шайна-Дальгарно. Лидерная последовательность эукариотических мРНК обычно короткая (не более 100 нуклеотидов), а для связывания с 40S-субчастицей при формировании инициаторного комплекса служит ее кэп. В эукариотических клетках обнаружено по крайней мере 9 *факторов инициации*: eIF1 (15 кДа, мономер), eIF2 (тример), eIF3 (>500 кДа, мультимер), eIF4A, eIF4B, eIF4C, eIF4D, eIF5 (150 кДа, мономер) и eIF6 (23 кДа, мономер). Эукариоты содержат также специальную инициаторную тРНК<sub>i</sub><sup>Met</sup>, но метионин, который к ней присоединяется, не формилируется. Инициация у эукариот начинается с формирования тройного комплекса [тРНК<sub>i</sub><sup>Met</sup>7eIF27ГТФ] в результате присоединения eIF27ГТФ к тРНК<sub>i</sub><sup>Met</sup>. Затем тройной комплекс взаимодействует с 40S-субчастицей, и этот новый комплекс стабилизируется присоединяющимися белками eIF3 и eIF4C. eIF3 (вероятно, совместно с eIF6) играет ту же роль, что и прокариотический IF3, поддерживая малую субчастицу в свободном состоянии. eIF3 необходим и для последующего присоединения малой субчастицы к мРНК, для этого взаимодействия нужны также дополнительные белки eIF1, eIF4A и eIF4B и гидролиз АТФ. Присоединение 60S-субчастицы требует присутствия eIF5 и сопряжено с гидролизом ГТФ, который уже находится в инициаторном комплексе в составе [тРНК<sub>i</sub><sup>Met</sup>7eIF27ГТФ]. Вероятно, когда субчастицы соединяются образуя полную рибосому, все эукариотические факторы инициации освобождаются.

Есть два принципиальных отличия эукариотического механизма инициации трансляции от прокариотического. Во-первых, образование комплекса [тРНК<sub>i</sub><sup>Met</sup>7eIF27ГТФ7eIF3740S] у эукариот всегда происходит до связывания с мРНК, тогда как у прокариот обычно сначала [IF3730S] связывается с мРНК и лишь потом может присоединиться [тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>7IF2]. Вероятно, что у прокариот присоединение мРНК к 30S-субчастице возможно за счет комплементарного взаимодействия 16S-рРНК с последовательностью Шайна-Дальгарно, тогда как у эукариот, у которых эта последовательность отсутствует, связывание мРНК в инициаторном комплексе может произойти только за счет комплементарности инициаторного кодона и антикодона тРНК<sub>i</sub><sup>Met</sup>. Во-вторых, инициаторный комплекс у прокариот строится непосредственно на инициаторном кодоне, тогда как [тРНК<sub>i</sub><sup>Met</sup>7eIF27ГТФ7eIF3740S] садится на 5'-конец мРНК, а затем двигается вдоль мРНК к ее 3'-концу, используя энергию гидролиза АТФ до тех пор, пока не достигнет инициаторного кодона. Поэтому у прокариот возможна инициация транскрипции с любого цистрона в их полицистронной мРНК, а у эукариот мРНК всегда моноцистронные, а в полицистронной мРНК эукариотическая система трансляции может транслировать только первый цистрон. Пример эукариотического гена и соответствующей ему мРНК показан на рис. 135.

У эукариот есть два фактора элонгации - eEF1 и eEF2, которые соответствуют прокариотическим EF-T и EF-G. Роль eEF1 заключается в доставке аминоксил-тРНК в рибосому, при этом тоже осуществляется гидролиз ГТФ. Как происходит регенерация комплекса eEF1 с ГТФ, неизвестно, возможно, что этот фактор так же, как и EF-T, состоит из двух компонентов, аналогичных EF-Tu и EF-Ts. В количественном отношении eEF1 - один из наиболее многочисленных белков клетки. Белок eEF2 (100 кДа) тоже достаточно многочисленный белок и на его долю приходится около 1% растворимого белка клетки. Скорость элонгации у эукариот ниже, чем у прокариот, и составляет примерно 2 а.о./с. У эукариотических организмов был обнаружен только один релизинг-фактор - eRF. Для его связывания с рибосомой, по-видимому, требуется ГТФ, тогда как в прокариотических системах этого не нужно. Скорее всего гидролиз ГТФ нужен для отсоединения eRF от рибосомы после терминации.

В отличие от прокариотической мРНК информационная РНК в цитоплазме эукариот относительно стабильна. Обычно около половины мРНК имеет период полужизни около 6 ч, тогда как остальная мРНК - примерно 24 ч. В дифференцированных клетках, специализированных на синтезе определенных белков, некоторые мРНК могут быть еще более

стабильными. В цитоплазме активно синтезирующих белок клеток обычны скопления рибосом одновременно транслирующих молекулу мРНК, называемые *полисомами*. Полисомы всегда закреплены либо на мембране гранулярного эндоплазматического ретикулума, либо на филаментах цитоскелета и имеют тенденцию располагаться цепочкой поблизости от ядра в тех местах, где мРНК входит в цитоплазму. В противоположность полисомам мономерные рибосомы находятся в клетке в свободном состоянии.

Митохондрии и хлоропласты содержат свои собственные рибосомы, и тРНК прокариотического типа. Некоторые митохондрии грибов и млекопитающих содержат не более чем 23 - 24 различных тРНК. Такая "экономия" достигается у них за счет упрощения кодон-антикодонного взаимодействия, в результате которого одна тРНК становится способной узнавать всех представителей кодонного семейства и за счет небольших "поправок" их генетического кода, описанных выше. Поэтому 23 митохондриальных гена для тРНК кодируют инициаторную тРНК, 14 тРНК, узнающих пары кодонов, и 8 тРНК, узнающих семейства кодонов. Хлоропластные тРНК похожи на прокариотические настолько, что рибосомы хлоропластов способны использовать при синтезе белка бактериальные тРНК. Синтез белка в хлоропластах и в митохондриях начинается с N-формилметионина, как и у бактерий, а не с метионина, как в цитоплазме их клеток, и инициация транскрипции происходит у них по прокариотическому типу. Предполагают, что митохондрии и пластиды имеют свои собственные факторы элонгации, но они еще не охарактеризованы. Однако можно создать функционирующую гибридную рибосому, соединив малую субчастицу рибосомы из хлоропласта с большой из *E. coli*, а мРНК хлоропластов успешно транслируется в белоксинтезирующей системе *E. coli*.

Задача 45. Нуклеотидная последовательность ДНК:

5' Ц Ц Г Т Ц Т А Г А Т Г А А А Г Г А Г 3' Напишите соответствующую ей последовательность аминокислот.

#### КРАТКИЕ ВЫВОДЫ

Тогда как сам процесс транскрипции или трансляции осуществляется с высокой точностью с затратой энергии молекул АТФ или энергетически эквивалентных им ГТФ, начальные этапы инициации, включающие в себя стадии молекулярного узнавания и определяющие интенсивность экспрессии гена, зависят от энергетически слабых и сложно прост-

ранственно организованных взаимодействий между макромолекулами. Такая низкоэнергитическая (сигнальная) природа инициации представляет значительную трудность для изучения функционирования генетической системы клетки.

Сами генетические процессы одномерны: в них информация, заключенная в линейной последовательности нуклеотидов, используется для образования либо для изменения другой последовательности нуклеотидов или линейной последовательности аминокислот. Одномерность генетических процессов делает их проще для понимания, чем большинство других клеточных процессов, связанных с выражением информации, которую несут в себе трехмерные поверхности макромолекул и трехмерная архитектура взаимодействий макромолекул.

Несмотря на универсальность самих генетических процессов для разных организмов, механизмы их осуществления у эукариот сложнее, чем у прокариот. Это отражает большую сложность эукариотического генома по сравнению с прокариотическим и более тонкую регуляцию экспрессии эукариотических генов.

Рис. 123. Промоторы РНК-полимеразы II.

Рис. 124. Роль инвертированных повторов в организации вторичной структуры ДНК и РНК.

Рис. 125. Механизм г-зависимой терминации транскрипции.

Рис. 126. Примеры генов с интронами (обозначены буквами). Рис. 127. Предполагаемый механизм участия мРНК в сплайсинге РНК.

Рис. 128. Кэп 0 эукариотической мРНК.

Рис. 129. Число кодонов для каждой аминокислоты коррелирует с частотой встречаемости данной аминокислоты в белках.

Рис. 130. Обобщенная вторичная структура, характерная для аминокислот-тРНК. Рамкой обведена остаток аминокислоты.

Рис. 131. Обобщенная структура

Рис. 132. Функционирование двух участков связывания тРНК на рибосоме.

Рис. 133. А - первая стадия элонгации трансляции. Б - стадия транслокации элонгации трансляции.

Рис. 134. Сопряжение транскрипции ДНК, трансляции и деградации мРНК у прокариот.

Рис. 135. Последовательность нуклеотидов фибробластного интерферонового гена человека. Указаны кодирующие триплеты и кодируемые ими аминокислоты. Иницирующий и терминирующий кодоны обведены рамками. Стрелками показаны участки, соответствующие 5'- и 3'-концам мРНК.

## Лекция 10. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНФОРМАЦИЯ

*Репликация ДНК - репарация ДНК - пути преобразования генетической информации - клеточный цикл у прокариот и эукариот - деление эукариотической клетки - краткие выводы*

Важнейшим свойством организмов является *наследственность*, т.е. способность передавать особенности строения и другие характерные особенности от поколения к поколению. Такое сохранение признаков в ряду поколений осуществляется хранением информации, описывающей эти признаки, в форме молекулы ДНК. Строение ДНК в виде двойной спирали замечательно подходит для точного копирования последовательности ее нуклеотидов в других таких же молекулах. Сохранение и наследственная передача признаков осуществляются благодаря двум фундаментальным генетическим процессам -

РЕПЛИКАЦИИ ДНК (т.е. процессу построения новой молекулы ДНК, используя предшествующую молекулу ДНК в качестве матрицы) и РЕПАРАЦИИ ДНК (т.е. процессу исправления ошибочных последовательностей нуклеотидов).

### РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

Каждая из цепей двойной спирали ДНК служит матрицей для репликации комплементарных дочерних цепей. При этом образуются две дочерние двухцепочечные молекулы ДНК, причем каждая из них всегда содержит одну старую (родительскую) цепь и одну заново синтезированную цепь. Такой механизм репликации, когда каждая из удвоившихся молекул ДНК содержит только одну вновь синтезированную цепь, называется *полуконсервативным* (рис. 136). Участок, где происходит расплетание родительской ДНК и синтез новой ДНК, называется *репликативной вилкой*.

ДНК бактерий, митохондрий, хлоропластов и некоторых вирусов представляет собой кольцевую двойную спираль. Молекулы ДНК сохраняют во время репликации кольцевую форму, и репликация такого кольца проходит одновременно в двух направлениях, т.е. существуют две репликативные вилки. Обе точки возникают в одной точке и удаляются от нее в обоих направлениях, пока снова не встретятся в точке терминации. У *E. coli* точка терминации репликации была идентифицирована и оказалось, что она не находится точно на полпути по кругу ДНК, и, следовательно, репликативные вилки должны проходить различные расстояния. В точке терминации два полностью синтезированных дочерних двухцепочечных кольца разделяются: каждое из них содержит одну старую и одну новую цепь. Участок начала репликации представляет собой нуклеотидную последовательность длиной 100 - 200 п.н., без которой ДНК не может реплицироваться. Эта последовательность содержит палиндромы, за счет чего формирует сложную вторичную структуру, которая узнается специальными клеточными белками, начинающими в этом месте цикл репликации. Именно процесс инициации репликации находится под контролем клеточной регуляции.

Репликация состоит из большого числа последовательных этапов, которые включают узнавание точки репликации, расплетание родительской двухцепочечной молекулы, удержание ее цепей на достаточном расстоянии друг от друга, инициацию синтеза новых дочерних цепей, их удлинение (элонгацию), закручивание цепей в спираль и терминацию репликации. Все эти этапы процесса репликации протекают с большой скоростью и исключительной точностью. В процессе репликации у *E. coli* участвуют больше 20 различных ферментов и белков, каждый из которых выполняет определенную функцию. Все вместе они формируют комплекс, который называют *ДНК-репликационной системой* или *реплисомой*.

Главными "действующими лицами" репликации являются ферменты *ДНК-полимеразы*. Они синтезируют цепь ДНК в соответствии с уравнением:  $(dNMP)_n + dNTP \rightarrow (dNMP)_{n+1} + PP_i$ . Клетки *E. coli* содержат три различные ДНК-полимеразы, обозначаемые I, II и III и имеющие мол. массы 109, 120 и 550 кДа соответственно. Для репликации бактериальной ДНК необходимы ДНК-полимеразы I и III. Элонгацию растущей цепи осуществляет в основном ДНК-полимераза III, а ДНК-полимераза I выполняет специальную вспомогательную функцию. Так же, как и РНК-полимераза, ДНК-полимераза III состоит из нескольких субъединиц: a (140 кДа), b (40 кДа), g (52 кДа), d (32 кДа), e (25 кДа), q (10 кДа) и t (83 кДа). Различные комбинации субъединиц приводят к образованию разных форм ДНК-полимеразы III. Для работы этого фермента необходима "затравка", т.е. небольшой фрагмент предсуществующей ДНК или РНК, к 3'-концу которого ДНК-полимераза III последовательно присоединяет нуклеотиды. ДНК-полимераза III не в состоянии сама по себе без затравки начать синтез новой ДНК, она способна только удлинять уже существующую цепь, причем это она может делать только в присутствии второй цепи, играющей роль матрицы. Субъединица b, или *кополимераза III*, необходима для узнавания и связывания с цепью-затравкой. Как только фермент присоединяется к правильному месту

инициации, субъединица  $\nu$  отделяется и дальше ДНК-полимераза III работает без этой субъединицы. Кроме полимеразной активности ДНК-полимеразы I и III обладают еще 5'3'- и 3'5'-экзонуклеазными активностями, т.е. они могут отщеплять концевые нуклеотиды с любого конца цепи ДНК. Для чего нужна РНК-полимераза II, неизвестно.

В репликативной вилке находятся 3'-конец одной растущей цепи и 5'-конец другой. Однако ДНК-полимераза III может осуществлять синтез новой цепи ДНК только в направлении 5'  $\rightarrow$  3' и, следовательно, способна удлинять только одну из двух растущих цепей в направлении движения репликативной вилки. Выходом из этого противоречия является то, что вторая цепь синтезируется *прерывисто* с образованием коротких фрагментов, которые наращиваются также за счет присоединения новых мономеров к 3'-концу, т.е. в направлении, противоположном движению репликативной вилки. Таким образом, в движущейся репликативной вилке есть *ведущая цепь*, синтезируемая непрерывно, и *отстающая цепь*, синтезируемая отдельными фрагментами (рис. 137). Фрагменты отстающей цепи называются *фрагменты Оказаки* по имени открывшего их Рейджи Оказаки (Reiji Okazaki) и требуют для своего синтеза в качестве затравок короткие отрезки РНК, комплементарные матричной цепи ДНК. Эти РНК-затравки образуются в направлении 5'  $\rightarrow$  3' из АТФ, ГТФ, ЦТФ и УТФ с помощью фермента *праймазы* (белок *DnaG*, 60 кДа). Затем к 3'-концу такой РНК-затравки, состоящей всего лишь из 15 - 20 нуклеотидов, ДНК-полимераза III присоединяет 1 - 2 тыс. дезоксирибонуклеотидных мономеров, и в результате образуется фрагмент Оказаки (в животных клетках фрагменты Оказаки короче и содержат 150 - 200 нуклеотидов). После завершения синтеза фрагмента Оказаки РНК-затравка удаляется нуклеотид за нуклеотидом с помощью 5'3'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы I. По мере отщепления рибонуклеотидных мономеров каждый из них замещается на соответствующий дезоксирибонуклеотид в ходе полимеразной реакции, осуществляемой самой ДНК-полимеразой I, при этом в качестве затравки используется 3'-конец предыдущего фрагмента Оказаки. Однако ДНК-полимераза I не может совершить последнее ковалентное присоединение фрагмента Оказаки к растущей цепи ДНК. Для этого требуется другой фермент - *ДНК-лигаза* (75 кДа), который катализирует образование фосфорнодиэфирной связи между 3'-гидроксильной группой на конце цепи ДНК, подлежащей удлинению, и 5'-фосфатной группой новосинтезированного фрагмента Оказаки. Образование этой связи требует затраты энергии, которая поставляется в ходе сопряженного гидролиза пирогосфатной связи НАД<sup>+</sup> в бактериальных клетках или АТФ в животных клетках.

Чтобы реплицирующие ДНК ферменты могли "прочитать" нуклеотидную последовательность матрицы, цепи родительской ДНК должны быть разделены хотя бы на коротком участке. Раскручивание двойной спирали и удержание двух цепей на некотором расстоянии друг от друга, чтобы они могли реплицироваться, осуществляется при помощи нескольких специальных белков. Фермент *хеликаза* (от англ. helix - спираль) или белок *rep* расплетает короткие участки ДНК, находящиеся непосредственно перед репликативной вилкой. Для раскручивания ДНК требуется энергия: на разделение каждой пары оснований расходуется энергия гидролиза 2 молекул АТФ до АДФ и фосфата. Как только небольшой участок ДНК оказывается расплетенным, к каждой из разделившихся цепей прочно присоединяются несколько молекул белка, связывающегося с одноцепочечной ДНК (ДСБ на рис. 137), которые препятствуют образованию комплементарных пар и обратному воссоединению цепей. Этот белок называется *белок SSB* (от англ. single-strand binding) и представляет собой тетрамер с мол. массой 74 кДа. Он кооперативно связывается с одноцепочечной ДНК, сохраняя ее в растянутом состоянии. Суть кооперативного способа связывания состоит в том, что связывание одной молекулы белка облегчает связывание другой. В результате однажды начатая реакция связывания на определенной молекуле ДНК быстро распространяется до тех пор, пока вся одноцепочечная ДНК не будет покрыта слоем

SSB. Благодаря этому нуклеотидные последовательности цепей ДНК оказываются доступными для репликативной системы.

Другой ДНК-связывающий белок *DnaB* (300 кДа, гексамер) совместно с белком *DnaC* и, вероятно, с некоторыми дополнительными белками помогает праймазе инициировать синтез РНК-затравок. Вместе эти белки формируют комплекс, называемый *праймосома*. Праймосома собирается из белковых компонентов на специфическом "предзатравочном" участке ДНК, имеющем вид шпильки, образованной последовательностью из 55 оснований. Затем праймосома перемещается вдоль родительской цепи к участку инициации синтеза затравки. Во время движения праймосомы расположенный перед ней белок SSB вытесняется, а само движение требует энергии гидролиза АТФ. Обнаружив участок инициации, праймаза синтезирует РНК-затравку из 15 - 50 нуклеотидов. За это время репликативная вилка продвигается вперед, и со стороны 3'-конца перед праймосомой образуется одноцепочечная область, которая застраивается белком SSB. После каждого события инициации праймосома продвигается к вдоль одноцепочечной области в направлении 5' к 3' к участку инициации синтеза следующего фрагмента Оказаки (рис. 138).

При 37°C новая ДНК *E. coli* синтезируется со скоростью около 50 тыс. нуклеотидов/мин в расчете на одну вилку. Поскольку на каждый полный виток двойной спирали приходится 10 пар оснований, скорость расплетания родительской ДНК в репликативной вилке составляет более 5 тыс. оборотов/мин, что превышает скорость вращения вала в двигателе автомобиля, мчащегося со скоростью 110 км/ч. Вся остальная бактериальная ДНК, расположенная впереди репликативной вилки, должна вращаться с такой же скоростью. Избежать этого клетке позволяет фермент *топоизомераза*, который у прокариот называется *ДНК-гиразой* (от англ. gyration - вращение). Топоизомеразы способны осуществлять кратковременные разрывы в одной из цепей двухцепочечной ДНК и точные сшивки в разорванном месте после одного или нескольких оборотов цепей относительно друг друга. Благодаря гиразе, которая делает кратковременный разрыв в расплетаемой ДНК, вращаться с большой скоростью приходится только короткому участку ДНК. Этот фермент не только позволяет ДНК вращаться, но и активно закручивает ее в направлении, благоприятствующем расплетанию цепей матрицы в районе репликативной вилки. Таким образом, гиразы помогают хеликазе раскручивать ДНК для репликации. Кроме того, закручивание ДНК с помощью гиразы, требующее энергии гидролиза АТФ до АДФ и фосфата, поддерживает все кольцевые ДНК бактериальных клеток в сверхспиральной форме (рис. 114).

По мере того как репликативная система ликвидирует разрывы в отстающей цепи, она движется вдоль реплицирующейся ДНК. Две новые цепи соединяются со своими комплементарными родительскими цепями самопроизвольно. Для образования новых двойных спиралей не требуется ни затрат энергии, ни участия какого-либо фермента.

ДНК некоторых вирусов реплицируется в одном направлении по механизму "катящегося кольца" (рис. 139). Вначале одна из двух цепей кольцевой родительской ДНК разрезается ферментом. Затем к 3'-концу разрезанной цепи присоединяется несколько новых нуклеотидов. Рост новой цепи на кольцевой матрице осуществляется за счет постепенного вытеснения 5'-концевой части расщепленной цепи из катящейся кольцевой матрицы. По мере роста новой цепи вытесненный 5'-хвост становится матрицей для синтеза новой комплементарной цепи. Этот синтез на линейной матрице продолжается до тех пор, пока не образуется до-  
черняя цепь ДНК, комплементарная одному обороту кольцевой матрицы.

Затем с помощью фермента двухцепочечный хвост отщепляется, и на 5'-конце опять может начинаться процесс репликации. Таким путем с кольцевой матрицы может образовываться много раз подряд комплементарная копия кольцевой ДНК. Такой же механизм "катящегося кольца" используется в ядрышковых организаторах ооцитов для наработки большого числа копий последовательно расположенных генов рРНК.



Другой способ репликации кольцевой ДНК используется в митохондриях и хлоропластах. Репликация начинается в специфической точке начала, но первоначально только одна из двух родительских цепей используется в качестве матрицы для синтеза новой цепи. Сначала синтез происходит только на коротком участке и вызывает вытеснение исходной комплементарной цепи, которая остается одноцепочечной (рис. 140). Такой механизм был назван *репликацией с вытеснением* (displacement), а образующаяся при этом структура - *D-петлей*. В митохондриях млекопитающих образуется только одна D-петля, представляющая собой постоянно существующую структуру из 500 - 600 оснований. Короткая новосинтезированная цепь имеет переменный 3'-конец, образующийся, по-видимому, в результате терминации синтеза в любом из 3 - 4 дискретных мест. Эта короткая цепь нестабильна: она часто деградирует и повторно синтезируется для сохранения в D-петле двойной спирали ДНК в открытой форме. После инициации репликации короткая цепь в D-петле начинает удлиняться, и D-петля расширяется. Расширение продолжается до достижения точки, находящейся на расстоянии, составляющем примерно 67% длины окружности кольца ДНК. Репликация этой области раскрывает точку начала репликации вытесняемой цепи, и после этого начинается репликация вытесняемой цепи, происходящая в противоположном направлении от синтеза комплементарной ей цепи. Из-за того, что вытесняемая цепь начинает реплицироваться позже, к моменту завершения репликации комплементарной ей цепи вытесняемая цепь готова только на 30 - 40%. Поэтому после разделения дочерних молекул одна из них оказывается полной (с одноцепочечным разрывом), а другая имеет брешь или пробел одной из цепей (рис. 140). Брешь застраивается нуклеотидами и репликация завершается ковалентной сшивкой концов новосинтезированных цепей. В митохондриальной ДНК других животных бывает от 1 до 6 D-петель. В хлоропластной ДНК высших растений существуют две D-петли.

Репликация эукариотической ДНК, которая упакована в нуклеосомы

и находится в составе хроматиновых волокон, осуществляется гораздо сложнее, чем репликация бактериальной ДНК. Эукариотическая ДНК тоже реплицируется в двух противоположных направлениях, но репликативные вилки двигаются на порядок медленнее, чем у *E. coli*: скорость репликации колеблется в пределах от 1 до 3 тыс. п.н./мин для млекопитающих и не превышает 1 тыс. п.н./мин у растений (возможно из-за их более низкой температуры). Потребовалось бы слишком много времени для репликации эукариотического генома, который намного больше бактериального, если бы в каждой хромосоме была бы только одна точка репликации, поэтому их много (порядка тысячи). Репликация хромосомной ДНК начинается сразу во многих точках начала репликации, и из каждой такой точки одновременно в противоположных направлениях движутся две репликативные вилки (рис. 141). Точки начала репликации расположены группами по 20 - 80, называемыми *репликативными единицами*. Внутри репликативной единицы точки начала репликации отстоят друг от друга на 30 - 300 тыс. п.н., что сравнимо со средним расстоянием между соседними петлями хроматина. Возможно, что в каждой хроматиновой петле имеется лишь один участок начала репликации. Все эукариотические хромосомы реплицируются одновременно, и в ядре эукариотической клетки работает одновременно много тысяч репликативных вилок. В ходе репликации активируются новые репликативные единицы, пока не будет реплицирована вся ДНК. Каждая точка начала репликации должна быть использована только один раз во время репликации хромосомы, поэтому с использованными точками начала связываются белки, предотвращающие повторную инициацию репликации в этом участке.

У эукариот обнаружены три класса ДНК-полимераз, обозначаемые а, b и g и имеющие мол. массы 110 - 220, 45 и 60 кДа соответственно. Для репликации ядерной ДНК необходима только ДНК-полимераза а. ДНК-полимераза b участвует в репарации ДНК в ядре, а ДНК-полимераза g - это митохондриальная ДНК-полимераза и, хотя ее находят также и в ядре, нет данных, что она там функционирует.

Для построения нового хроматина требуется большое кол-во новых гистонов, по массе примерно столько же, сколько синтезировано новой ДНК. Если бы каждый гистон кодировался лишь одним геном, синтез гистонов отставал бы от синтеза ДНК. Этого не происходит благодаря тому, что существуют множественные копии генов для каждого гистона. Клетки позвоночных содержат около 40 повторяющихся наборов таких генов, и в каждый набор входят гены для всех пяти гистонов. Эти копии собраны вместе в одном участке хромосомы. В отличие от большинства белков, которые непрерывно синтезируются между делениями эукариотической клетки, гистоны образуются главным образом в период репликации ДНК: начало синтеза ДНК активирует синтез гистонов, а после прекращения синтеза ДНК гистоновые мРНК становятся чрезвычайно нестабильными. Напротив, сами гистоны - необычайно стабильные белки, и их молекулы могут сохраняться в течение всей жизни клетки. Предполагают, что во время репликации ДНК гистоновые сердцевинные нуклеосомы материнской ДНК непосредственно переходят на дочернюю спираль ДНК, образуемую на ведущей стороне репликативной вилки, тогда как новые нуклеосомы собираются из вновь синтезированных гистонов на отстающей стороне вилки через несколько минут после прохождения репликомы.

Задача 46. Используя данные табл. 9, рассчитайте время, необходимое для репликации генома *E. coli*.

Задача 47. Сравните скорости синтеза гистонов и репликации эукариотической ДНК.

### РЕПАРАЦИЯ ДНК

Частота ошибок при репликации ДНК *E. coli* не превышает 1 на 1-10 млрд. нуклеотидов. Поскольку геном *E. coli* содержит приблизительно 4.5 млн. п.н., то на 10 тыс. поделившихся клеток встраивается только 1 неправильный нуклеотид. Если бы точность репликации определялась бы только энергией уотсон-криковского спаривания комплементарных оснований, то частота ошибок при репликации была бы на 5 порядков выше. Точность репликации повышается благодаря 3'65'-экзонуклеазной активности ДНК-полимераз I и III. Если какая-либо из этих полимераз встраивает неправильный нуклеотид, то фермент сам может распознать неспособность этого нуклеотида образовать правильную пару с соответствующим нуклеотидом матрицы. В этом случае фермент возвращается назад и отщепляет неправильный нуклеотид с 3'-конца, после чего продолжает присоединять правильные нуклеотиды, т.е. возобновляет свое обычное продвижение вдоль матрицы в направлении 5' к 3'. Корректирующее действие ДНК-полимеразы (proofreading) практически обеспечивает наблюдаемую точность репликации, однако это лишь один из путей, обеспечивающих высокую точность репликации. Для исправления различных ошибок и спонтанных повреждений в ДНК клетки содержат специальный набор репарирующих ферментов. Наиболее частое повреждение в ДНК - это *спонтанная апуринизация*, заключающаяся в разрыве гликозидной связи между остатком аденина или гуанина и дезоксирибозой и происходящее, например, в каждой клетке человеческого тела с частотой около 5 тыс. разрывов в сутки. Другое повреждение ДНК - *спонтанное дезаминирование* цитозина, превращающее его в урацил, - происходит в каждой клетке с частотой 100 событий/сут. Помимо спонтанных повреждений в ДНК постоянно возникают *индуцированные*, т.е. вызванные различными факторами повреждения. Повреждающим фактором может быть высокоэнергетическое излучение - ультрафиолетовое (200 - 400 нм) или ионизирующее. На долю этого фактора приходится примерно 10% всех повреждений ДНК, вызываемых небиологическими факторами. Например, под действием ультрафиолетового излучения между двумя соседними пиримидиновыми остатками (чаще всего это два соседних тимина) может возникать ковалентная связь, в результате чего образуется димер, который будет непреодолимым препятствием для ДНК- или РНК-полимеразы. Повреждения в ДНК могут вызываться также активными химическими соединениями окружающей среды, называемыми *мутагенами*. Различают три основных ти-

пов мутагенов: 1) дезаминирующие агенты (например,  $\text{HNO}_2$  и нитриты), приводящие к превращению цитозина в урацил, аденина в гипоксантин, а гуанина в ксантин; 2) алкилирующие агенты (например, диметилсульфат, превращающий гуанин в O-метилгуанин, неспособный спариваться с цитозином) и 3) соединения, которые из-за своего сходства с нормальными основаниями могут подменять их в молекуле ДНК (например, 5-бромурацил или 2-аминопурин).

Неправильные нуклеотиды, как правило, удаляются из ДНК системой *эксцизионной репарации* (от англ. excision - вырезание). На первом этапе поврежденная структура узнается либо ферментом специфической эндонуклеазой, который делает одноцепочечный разрыв с 5'-стороны от повреждения (путь 1 на рис. 142), либо ферментом специфической ДНК-гликозилазой, который катализирует гидролитическое отщепление измененного основания от дезоксирибозы (путь 2 на рис.

142). К специфическим эндонуклеазам относится, например, фермент *УФ-эндонуклеаза*, узнающий тиминный димер. В каждой клетке существует также не менее 20 различных специфических ДНК-гликозилаз, узнающих какой-либо один тип измененных оснований в ДНК. Среди них

имеются ферменты, удаляющие дезаминированный цитозин (*урацил-ДНК-гликозилаза*), дезаминированный аденин, алкилированные основания различных типов, основания с разомкнутым кольцом и основания, в которых двойная углерод-углеродная связь заменена простой. Участок с удаленным ДНК-гликозидазой или спонтанно отщепившимся основанием узнает *АР-эндонуклеаза* (апуриновая или апиримидиновая), которая тоже делает одноцепочечный разрыв в этом месте. Другой разрез производится эндонуклеазой с 3'-стороны примерно на расстоянии 12 - 20 нуклеотидов. Затем у *E. coli* на стадии *вырезания* ДНК-полимераза I за счет своей 5'63'-активности выщипывает нуклеотиды между разрезами, и она же застраивает получившуюся брешь правильными нуклеотидами, после чего ДНК-лигаза "зашивает" одноцепочечный разрыв. Хотя в клетке репарация, по-видимому, осуществляется ДНК-полимеразой I, ДНК-полимеразы II и III способны ее заменить. У эукариот функцию, аналогичную функции ДНК-полимеразы I, выполняет ДНК-полимераза  $\beta$ .

В том случае, когда нарушение структуры ДНК заключается в неправильном спаривании обычных оснований, репарирующая система не может определить, какое из оснований правильное. В этом случае возможен случайный выбор для удаления одного из неспаренных оснований. Но во многих случаях может быть применена *рекомбинационная репарация*, которая использует материал одной молекулы ДНК (из гомологичной хромосомы) для восстановления другой (рис. 143).

## ПУТИ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

Первоначально считалось, что генетическая информация может передаваться только в одном направлении: ДНК  $\rightarrow$  РНК  $\rightarrow$  белок  $\rightarrow$  признак и включает три главных этапа в обработке генетической информации - репликацию, транскрипцию и трансляцию. Этот путь переноса генетической информации получил название *центральной догмы* молекулярной генетики. Однако эта простая схема была вскоре дополнена (рис.

144). Оказалось, что некоторые РНК-содержащие вирусы животных имеют особый фермент - *РНК-зависимую ДНК-полимеразу*, называемую также *обратной транскриптазой* или *ревертазой*. Этот фермент синтезирует цепь ДНК подобно ДНК-зависимой ДНК-полимеразе, но в качестве матрицы использует РНК. Существование такого фермента представляет собой доказательство возможности передачи генетической информации в направлении от РНК к ДНК. Некоторые бактериальные вирусы имеют *РНК-зависимую РНК-полимеразу* или *РНК-репликазу*, которая осуществляет те же реакции, что и ДНК-зависимая РНК-полимераза, но использует в качестве матрицы молекулу РНК.

Кроме того, у бактерий есть фермент *полинуклеотидфосфорилаза*, который катализирует реакцию  $\text{NDP} + (\text{NMФ})_n \rightarrow (\text{NMФ})_{n+1} + \text{HPO}_4^{2-}$  и не требует матрицы, синтезируя РНК-полимер со случайной последовательностью нуклеотидов. Цепь РНК нужна этому ферменту лишь в качестве затравки, которая просто обеспечивает наличие свободного 3'-конца, к которому могут присоединяться дополнительные остатки. Реакция протекает как в присутствии всех четырех исходных мономеров (в этом случае нуклеотидный состав образующегося полимера отражает относительное соотношение мономеров-предшественников), так и в присутствии только одного из них. В клетке полинуклеотидфосфорилаза, вероятно, участвует в деградации РНК.

### КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ У ПРОКАРИОТ И ЭУКАРИОТ

Репликация и клеточный рост у бактерий тесно связаны. Частота инициации циклов репликации определяется скоростью роста клетки, а завершение цикла репликации согласовано с делением клетки на две, в процессе которого дочерние молекулы ДНК разделяются. Клетки *E. coli* способны расти с различными скоростями: время удвоения варьирует от 18 до более чем 180 мин. Скорость синтеза ДНК при постоянной температуре более или менее постоянна. Репликация происходит с одинаковой скоростью до тех пор, пока не наблюдается ограничений в снабжении молекулярными предшественниками. Для репликации всей кольцевой ДНК требуется примерно 40 мин. Еще примерно 20 мин требуется между завершением репликации и клеточным делением, с которым она связана, для наработки компонентов, принимающих участие в делении. Отсюда следует, что при быстром делении бактериальных клеток ДНК дочерних клеток в момент их разделения уже частично реплицирована. Предполагают, чтобы начать репликацию ДНК, прикрепляется своим участком с точкой начала репликации к определенной белковой структуре на мембране бактериальной клетки. ДНК остается прикрепленной к мембране в ходе деления клетки, и за счет роста мембраны между ними дочерние молекулы ДНК распределяются по двум дочерним клеткам (рис. 145).

Рост развивающегося многоклеточного организма связан с делением клеток. В закончившем рост организме клетки продолжают делиться для того чтобы восполнить потерю из-за гибели поврежденных или изношенных клеток. При этом, если темп деления одноклеточных организмов

лимитируется обычно лишь скоростью поступления в клетку питательных веществ и скоростью их внутриклеточного использования, то в многоклеточном организме разные клетки делятся с разной скоростью, регулируемой организмом в целом, и количество клеток каждого типа остается на уровне, оптимальном для организма. У животных некоторые клетки, такие как нейроны, эритроциты и скелетные мышечные волокна, в зрелом состоянии не делятся вовсе. Другие клетки, например, эпителиальные клетки кишечника, легких и кожи делятся быстро и постоянно на протяжении всей жизни организма. Остальные клетки занимают промежуточное положение - они могут делиться, но делают это редко. В результате *длительность клеточного цикла* (частота деления) составляет для разных клеток от 8 ч до 100 дней и более. Такая же картина наблюдается и для многоклеточного растительного организма.

В клеточном цикле выделяют 4 фазы: 1) *фаза S* (от англ. synthesis) - фаза удвоения (репликации) ядерной ДНК; 2) *фаза M* (от англ. mitosis) - фаза деления клетки; 3) *фаза G<sub>1</sub>* (от англ. gap - промежуток) - период между фазой M и началом синтеза ДНК; 4) *фаза G<sub>2</sub>* - период между завершением синтеза ДНК и последующей фазой M. Фазы G<sub>1</sub>, S и G<sub>2</sub> составляют *интерфазу* (фаза между делениями), которая обычно занимает не менее 90% всего клеточного цикла. Различие между быстро и медленно делящимися клетками состоит в продолжительности фазы G<sub>1</sub> клеточного цикла. Некоторые медленно делящиеся клетки могут оставаться в фазе G<sub>1</sub> многие месяцы и даже годы. Напротив, время от начала фазы S до окончания деления практически постоянно и не коррелирует с темпом деления. Специальными обработками (например, ограничивая

поступление питательных веществ или добавляя небольшие кол-ва ингибиторов белкового синтеза) можно искусственно затормозить деление клеток. Во всех этих случаях клетки задерживаются в фазе  $G_1$ . Однако в конце этой фазы есть определенный момент, после которого клетки неизбежно завершают весь цикл, проходя его с обычной скоростью, не зависящей от внешних условий. Этот момент называется *точкой рестрикции* (точка R).

Пока не известно, от чего зависит, пройдет ли клетка через точку R и вступит ли в новый цикл. Предполагают, что для того чтобы клетка прошла точку R, начала синтезировать ДНК и готовиться к делению, в ней должно накопиться пороговое кол-во какого-то нестабильного "триггерного" белка, называемого также *U-белком* (от англ. unstable). Поскольку этот гипотетический белок нестабилен, его концентрация может стать достаточной для запуска клеточного деления только в том случае, если он будет синтезироваться сравнительно быстро. В фазе M, когда синтез белков практически отсутствует, концентрация U-белка резко падает и вновь достигает порогового значения лишь в фазе  $G_1$ .

Для того, чтобы вступить в митоз, клетка должна достичь определенной массы: размеры вновь образованных дочерних клеток вначале варьируют гораздо сильнее, чем на более поздней стадии, когда эти клетки снова вступают в митоз. Так происходит из-за того, что меньшие клетки остаются в фазе  $G_1$ , пока не достигнут примерно той же величины, что и более крупные клетки. По-видимому, существует механизм регулирования массы клеток, вступающих в митоз, хотя он и работает с большими допусками: масса даже генетически идентичных клеток довольно сильно варьирует во время митоза. Однако, когда сравнивают родственные тетраплоидные, диплоидные и гаплоидные клетки, то их средняя относительная масса в митозе составляет 4, 2 и 1 соответственно. Это наблюдение позволило выдвинуть гипотезу, что триггерный U-белок связывается с определенными участками хромосом, а для перехода клетки в фазу S начала следующего цикла деления необходимо какое-то избыточное кол-во этого белка сверх того, которое связано с хромосомами. В этом случае хромосомы служили бы своего рода ингибиторами действия триггерного белка и в то же время измерителями его кол-ва. После прохождения клеткой точки рестрикции начинается репликация ядерной ДНК, т.е. начинается стадия S. Что именно служит пусковым сигналом для синтеза ДНК, не известно, но для начала репликации необходимо удвоение центриолей в клеточном центре. Пусковой механизм репликации ДНК работает по принципу "все или ничего", поскольку начавшееся в S-фазе удвоение ДНК всегда продолжается до полного завершения этого процесса.

Клеточное деление регулируется в организме целым рядом механизмов, о которых еще мало известно. К таким механизмам относятся, в частности, наличие свободного пространства, на котором клетки могут расплываться (*контактное торможение*), и секреция окружающими клетками стимулирующих и ингибирующих агентов (например, *позиционных факторов* и специфических *факторов роста*). Раковые клетки выходят из-под контроля регуляторных факторов организма и начинают неограниченно делиться. Именно это делает их смертельно опасными для организма-хозяина. Раковые клетки способны делиться неограниченно

долго в отличие от нормальных животных клеток, которые погибают после ограниченного числа делений.

### ДЕЛЕНИЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

Слово МИТОЗ происходит от греческого слова митос, что означает нить. Процесс деления ядра назван так из-за нитевидной формы хромосом. В делении эукариотической клетки выделяют 6 стадий (рис. 146):

- 1) профазы; 2) прометафазы; 3) метафазы; 4) анафазы; 5) телофазы и
- б) цитокинез.

На стадии ПРОФАЗЫ (от греч. про - до) хроматин, который в интерфазе выглядел аморфным, постепенно конденсируется в отчетливо видимые хромосомы. Каждая из хромосом разделена в продольном направлении на две части. Эти части называются ХРОМАТИДАМИ. Они связаны между собой на участке, получившем название ЦЕНТРОМЕРА. Хроматиды - это дочерние хромосомы, образовавшиеся во время удвоения генов. Обе хроматиды одной хромосомы обладают одинаковым набором генов. Микротрубочки цитоскелета распадаются, и при этом образуется большой пул свободных молекул тубулина. Из этих молекул в центрах организации микротрубочек, которыми у животных и грибов служат удвоившиеся перед фазой S центриоли, начинают образовываться пучки микротрубочек. Сборка микротрубочек начинается рядом около ядерной мембраны, но затем удлиняющиеся микротрубочки начинают расталкивать клеточные центры к противоположным сторонам клетки.

ПРОМЕТАФАЗА (от греч. про - до, мета - после) начинается с быстрого распада ядерной оболочки на мелкие фрагменты, неотличимые от участков ЭПР. Этот распад вызывается специфическим фосфорилированием белков ядерной ламины. В хромосомах с каждой стороны центромеры образуются особые структуры, называемые *кинетохорами*. Кинетохоры служат еще одним местом сборки микротрубочек. Пучки этих микротрубочек отходят от обеих сторон каждой хромосомы и удлиняются в направлении клеточных центров. Число микротрубочек, связанных с каждым кинетохором, у разных видов различно: у некоторых грибов с кинетохором связана лишь одна микротрубочка, а в клетках человека - от 20 до 40.

Во время МЕТАФАЗЫ пучки микротрубочек цитоплазмы начинают контактировать с микротрубочками хромосом. Эти контакты происходят случайным образом, поэтому видно, как хромосомы энергично вращаются и движутся туда-сюда. Наконец, каждая хромосома оказывается "пойманной" микротрубочками цитоплазмы, идущими с двух противоположных сторон. В результате хромосомы выстраиваются в одной плоскости точно посередине клетки. Каждая из хромосом по-прежнему состоит из двух хроматид. От каждой хромосомы отходят два пучка микротрубочек. Они связывают ее с противоположными областями клетки, называемыми *полюсами деления* (разделившийся бывший клеточный центр). В целом возникающая симметричная фигура из микротрубочек напоминает веретено (рис. 146) и называется *веретеном деления*. В среднем веретено деления содержит около  $10^8$  молекул тубулина, организованных в микротрубочки. Плоскость, в которой выстроились хромосомы, называется *экватором деления*. В метафазе число хромосом легко подсчитать. Число их в каждой клетке данного вида организма строго постоянно (табл. 10). Во время метафазы в веретене уже действуют тянущие силы, направленные к полюсам. Хромосомы, однако, остаются неподвижными, поскольку к ним приложены две равные силы, направленные в противоположные стороны.

АНАФАЗА (от греч. ана - вверх) начинается с внезапного разделения каждой хромосомы на две хроматиды. После этого каждая хроматида движется к тому полюсу клетки, с которым связана микротрубочками веретена деления (рис. 146), со скоростью примерно 1 мкм/мин. Что удерживает хроматиды вместе до начала анафазы, неизвестно, но есть предположение, что последовательность ДНК, входящая в центромеру, должна кодировать специальный сигнал, блокирующий ее собственную репликацию в фазе S. В этом случае нереплицированный участок ДНК не позволяет хроматидам расходиться, а запуск ее репликации в метафазе приводит к разделению хроматид в анафазе.

Расхождение хроматид вызывается двумя силами: раздвижением полюсов клетки в разные стороны и подтягиванием к полюсам связанных с ними хроматид. Микротрубочки, идущие от полюсов, частично перекрываются в области экватора. Как уже было рассказано в разделе, посвященном цитоскелету, микротрубочки обладают структурной полярностью - неравнозначностью концов. Быстро растущий конец микротрубочек обозначают как *плюс-конец*, тогда как распад микротрубочек быстрее идет с противоположного *минус-конца*. Все

полюсные микротрубочки прикреплены своими минус-концами к полюсам, где они закреплены и защищены от деполимеризации. Следовательно, в области перекрывания эти противоположно направленные трубочки контактируют своими плюс-концами, скользят в противоположные стороны и одновременно надстраиваются со свободного плюс-конца, так что экваториальная область перекрывания продолжает существовать. Полюсы расталкиваются благодаря этим двум процессам - скольжению и росту микротрубочек. У микротрубочек, связанных с хроматидами, плюс-концы присоединены к кинетохорам, и поэтому они имеют ту же полярность, что и полюсные микротрубочки, с которыми контактируют. Благодаря этому микротрубочки хроматид скользят вдоль полюсных микротрубочек к полюсам и тянут за собой хроматиды. На движение хроматид клетка затрачивает энергию. При этом механизм движения здесь аналогичен тубулин-динеиновому механизму движения ресничек и жгутиков, хотя роль динеина в веретене деления выполняет другой, но динеин-подобный белок. Для перемещения одной хроматиды в анафазе требуется всего лишь 20 молекул АТФ.

ТЕЛЮФАЗА (от греч. телос - конец) наступает когда дочерние хромосомы достигают полюсов клетки. После этого микротрубочки, связанные с хромосомами, распадаются на отдельные тубулиновые молекулы, тогда как микротрубочки, идущие от полюсов деления, продолжают удлиняться. Вокруг каждой группы хромосом строится оболочка нового ядра. При этом фрагменты ядерной оболочки связываются с поверхностью отдельных хромосом, частично окружают каждую из них и только потом сливаются, образуя замкнутую поверхность. Затем хромосомы набухают и удлиняются и постепенно становятся опять невидны в микроскоп. Возобновляется синтез РНК, и это ведет к появлению нового ядрышка.

ЦИТОКИНЕЗ - это стадия разделения цитоплазмы клетки, которое происходит в результате образования *перетяжки* в животной клетке или формирования *срединной пластинки* у растений. Часто цитокinesis начинается в анафазе и продолжается во время телофазы и в начале следующей интерфазы. Перетяжка в животной клетке происходит под действием кольца, состоящего в основном из актиновых филаментов и затягивающегося, подобно петле, вокруг средней части клетки, формируя *борозду деления* (рис. 146). Этот пучок филаментов, называемый *сократимым кольцом*, образуется в начале анафазы, прикрепляется к внутренней стороне плазматической мембраны и генерирует силу благодаря актин-миозиновому механизму движения. Положение борозды деления определяется расположением полюсных микротрубочек. В растительных клетках, имеющих клеточные стенки, новая поперечная перегородка, или *срединная пластинка*, формируется из мелких пузырьков, которые выстраиваются между вновь образовавшимися ядрами в экваториальной плоскости клетки и сливаются друг с другом. Выстраивание этих пузырьков в экваториальной плоскости, как и выстраивание хромосом, тоже происходит с помощью полюсных микротрубочек. Когда пузырьки сливаются, их стенки-мембраны образуют клеточные мембраны дочерних клеток, а из содержимого пузырьков образуются клеточные стенки, которые отгородят дочерние клетки друг от друга. Срединная пластинка имеет форму диска и постепенно увеличивается от центра к периферии. В конце концов она достигает стенок материнской клетки, тогда образование перегородки и обособление двух дочерних клеток заканчивается (рис. 147). Во время цитокinesis осуществляется также приблизительно равномерное распределение по двум дочерним клеткам пластид и митохондрий. Каждая из дочерних клеток получает примерно половину от их общего числа, затем они самостоятельно делятся и восстанавливают свою нормальную численность в дочерних клетках.

Митоз продолжается 1-2 ч. Построение веретена деления из микротрубочек и вся эта сложная последовательность событий необходимы для точного распределения удвоившихся хромосом между двумя дочерними клетками. Но, хотя и очень редко, ошибки при расхождении дочерних хромосом (хроматид) происходят. Тогда одна из дочерних

клеток недополучает хромосомы, а другая - получает лишние хромосомы. Ошибка при расхождении хромосом происходит 1 раз на 100 тыс. делений. Сложный митотический аппарат деления эволюционировал постепенно в связи с усложнением генома эукариот, увеличением числа и размеров хромосом, повышением точности расхождения хромосом по дочерним клеткам. Сохранились некоторые примитивные организмы, у которых можно видеть промежуточные этапы усложнения митотического аппарата деления (рис. 148).

### КРАТКИЕ ВЫВОДЫ

Хотя механизм матричной репликации ДНК заложен в самой структуре молекулы ДНК, необходимость точного и быстрого копирования больших геномов потребовало от организмов создания специального сложного аппарата репликации, состоящего из многих специализированных белков. В связи с особой важностью процесса репликации его точность поддерживается на более высоком уровне, чем точность транскрипции и точность трансляции, и на это затрачивается дополнительная энергия.

Различные спонтанные и индуцированные нарушения в ДНК происходят столь часто, что хранение генетической информации возможно только благодаря системе репарации, широкий набор ферментов которой осуществляет непрерывный "осмотр" ДНК и удаляет из нее поврежденные нуклеотиды. Дополнительная надежность создается хранением генетической информации в виде двух копий в гомологичных хромосомах у диплоидных организмов.

Еще один процесс, связанный с сохранением генетической информации, - правильное распределение между дочерними клетками реплицировавшихся геномов - тоже потребовал от клетки создания и поддержания специального аппарата митотического деления для осуществления такого распределения с достаточной точностью.

### Лекция 11. ПОЛОВОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

*Половое размножение - мейоз - образование гамет и оплодотворение у животных - образование гамет и оплодотворение у растений - генотипическое определение пола - краткие выводы*

#### ПОЛОВОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

Подавляющее большинство живущих на Земле организмов - бактерий, растений и животных - размножаются половым путем, хотя некоторые из них могут размножаться и бесполом путем. При половом размножении сливаются специальные клетки, называемые ГАМЕТАМИ (от греч. гамео - вступать в брак). Гаметы образуются в особых органах тела. У примитивных организмов гаметы внешне совершенно одинаковые. В ходе совершенствования полового размножения одни гаметы начали накапливать запасы питательных веществ для развития будущего зародыша. Они становились крупными и неподвижными. Другие гаметы не несли в себе питательных веществ и оставались мелкими. Зато они приобрели повышенную подвижность для поиска неподвижных гамет с запасом питательных веществ. Крупные неподвижные гаметы принято называть ЖЕНСКИМИ гаметами или ЯЙЦЕКЛЕТКАМИ, а мелкие подвижные гаметы - МУЖСКИМИ или СПЕРМАТОЗОИДАМИ (от греч. сперма - семя + зоон - животное). Возникновение разнокачественности гамет привело к возникновению в эволюции размножения двух полов - мужского и женского.

Половое размножение - это наиболее совершенный тип размножения организмов. Во время этого процесса происходит перемешивание и рекомбинация геномов, в результате чего появляются особи с новыми наборами генов. Это, в свою очередь, увеличивает шансы организмов на то, что хотя бы некоторые из их потомков выживут в непредсказуемо изменчивой окружающей среде. Кроме того, половое размножение способствует



распространению и закреплению благоприятных мутаций в больших популяциях организмов (*популяция* - это группа организмов одного вида, живущих вместе на более или менее ограниченной территории). Предположим, что у двух особей в некоторой популяции возникли разные благоприятные мутации. При бесполом размножении потомки этих организмов унаследуют такие мутации, но будут конкурировать друг с другом, пока не произойдет вытеснение менее конкурентно способных организмов, а с ними будет потеряна для популяции и одна

из полезных мутаций. Обе мутации одновременно не могут быть полезны для популяции с бесполом размножением, если они не возникнут последовательно у одного организма или в одной линии его потомков. Но поскольку благоприятные мутации редки, пройдет много времени, прежде

чем это случится. Напротив, у вида, размножающегося половым путем, новые полезные мутации, появившиеся у разных особей, могут объединяться в одном геноме в результате скрещивания и рекомбинации и не будут конкурировать друг с другом (рис. 149).

Развитие нового организма при половом размножении начинается со слияния двух гамет от двух разных организмов. В результате такого слияния в потомках объединяются гены от двух родителей. Слияние гамет называется *оплодотворением*. При оплодотворении сливаются цитоплазма и ядра гамет, но хромосомы при этом не сливаются. После оплодотворения образуется клетка, которая называется **ЗИГОТА** (греч. слово, означающее соединение в пару). Зигота содержит вдвое больше хромосом, чем каждая из гамет. Новый организм образуется в результате деления зиготы митозом, и в ходе деления образующиеся клетки получают точно такой же набор хромосом, какой был в клетке, которая разделилась. Поэтому все клетки тела организма имеют такой же набор хромосом, который был в зиготе, из которой этот организм развился. Исключение составляют половые клетки. Когда половые клетки образуются, происходит уменьшение числа их хромосом вдвое. Если бы этого не происходило, то число хромосом в клетках каждого последующего потомка удваивалось бы в результате оплодотворения и очень скоро стало бы слишком большим.

Ядра гамет всегда содержат ровно вдвое меньше хромосом, чем ядра всех остальных клеток тела. Хромосомный набор гаметы называется **ГАПЛОИДНЫМ** (от греч. гаплос - одиночный), а набор хромосом, удвоившийся после оплодотворения, - **ДИПЛОИДНЫМ** (от греч. диплос - двойной). Зигота всегда содержит диплоидный набор хромосом. Поскольку у каждого организма количество хромосом и в мужской, и в женской гаметах одинаково, то диплоидный набор хромосом всегда четный (таблица 10). Таким образом, в диплоидных ядрах содержится по две копии каждой хромосомы. Одна хромосома из каждой пары получена от мужского родителя, а другая - от женского. Парные хромосомы диплоидного набора называются *гомологичными* хромосомами (от греч. гомология - согласие, единодушие). Число хромосом в гаметах оказывается вдвое меньшим, потому что они образуются в результате необычного деления клеток. Оно называется **МЕЙОЗ** (от греч. мейон - меньше).

Половое размножение сохраняет диплоидность у диплоидных видов. Если мы будем рассматривать популяцию диплоидных особей, размножаю-

щихся бесполом способом, то увидим, что в ней на протяжении многих поколений будут накапливаться особи, у которых один из пары генов, расположенных в гомологичных хромосомах, поврежден вредной мутацией. Этот процесс будет происходить до тех пор, пока диплоидность особей популяции не сменится состоянием, в котором общее количество ДНК остается прежним, но сохраняется только одна функционирующая копия каждого из генов. Организмы становятся "функционально гаплоидными". Половое размножение противостоит этому процессу благодаря постоянной *рекомбинации* генетического материала.

МЕЙОЗ

При мейозе происходит не одно деление ядра, как при митозе, а два (рис.150). В каждом из этих двух делений ядра, следующих друг за другом, можно выделить те же стадии (профазу, метафазу, анафазу и телофазу), что и в обычном митозе. Начинается мейоз, так же, как и митоз, с удвоения генетического материала каждой хромосомы. Гаплоидный набор хромосом получился бы за одно деление, если бы этому не предшествовало удвоение хромосом. Почему нужный результат достигается таким, более сложным путем, неизвестно. Предполагают, что рекомбинация совершенно необходима, чтобы запустить любой процесс деления клетки. Профаза первого деления мейоза (Профаза I) - это наиболее длительная и сложная стадия, которая может занимать до 90% всего времени мейоза. Ее подразделяют на 5 последовательных этапов

- *лептотену, зиготену, пахитену, диплотену и диакинез.*

ЛЕПТОТЕНА (стадия тонких нитей) - это стадия, на которой становятся заметны хромосомы в виде длинного, тонкого волокна с белковой осевой нитью. Каждая хромосома обоими концами прикреплена к ядерной мембране с помощью *прикрепительных дисков* (рис.150, А, 1). Хотя каждая хромосома реплицировалась и состоит из двух сестринских хроматид, эти хроматиды очень тесно сближены, и поэтому каждая хромосома кажется одиночной. В ЗИГОТЕНЕ (на стадии сливающихся нитей) начинается *конъюгация* - узнавание и спаривание гомологичных хромосом. Как происходит такое узнавание гомологичными хромосомами друг друга на расстоянии, не известно. Конъюгация часто начинается с того, что гомологичные концы двух хромосом сближаются на ядерной мембране, а затем процесс соединения гомологичных хромосом распространяется вдоль хромосом от обоих концов (рис.150, А, 2). В других случаях конъюгация может начинаться во внутренних участках хромосом и продолжаться к их концам. Между конъюгировавшими хромосомами образуется структура, называемая *синаптонемальным комплексом* и представляющая собой длинное белковое образование, напоминающее застежку "молнию", к противоположным сторонам которой плотно прилегают гомологичные хромосомы. Сестринские хроматиды каждого гомолога остаются тесно сближены, а их ДНК образует многочисленные петли по одну и ту же сторону от белковой "застежки" (рис. 151). Как предполагают, каждый ген приходит в соприкосновение с гомологичным ему геном другой хромосомы. Каждую пару конъюгировавших хромосом называют *бивалентом* или *тетрадой*.

Как только заканчивается образование синаптонемального комплекса между всеми парами гомологичных хромосом, клетки вступают в стадию ПАХИТЕНЫ (стадию толстых нитей). На этой стадии в продольной щели синаптонемального комплекса появляются *рекомбинационные узелки*, необходимые для обмена участками между гомологичными хромосомами - процесса *генетической рекомбинации* или *кроссинговера* (рис. 150, А, 3). При кроссинговере происходит разрыв двойной спирали ДНК в одной из хроматид каждой из гомологичных хромосом, а затем получившиеся отрезки точно соединяются, но "наперекрест" (рис. 152). Рекомбинационные узелки - это крупные (диаметром около 90 нм) мультиферментные комплексы, которые подтягивают друг к другу участки гомологичных хроматид через щель синаптонемального комплекса шириной 100 нм и осуществляют весь процесс кроссинговера. Рекомбинационных узелков бывает примерно столько же, сколько потом выявляется перекрестов хромосом. В пахитене перекресты еще не видны, но на стадии ДИПЛОТЕНЫ (стадии двойных нитей) они проявляются в виде *хиазм* (рис. 153). В диплотене происходит разделение конъюгировавших хромосом, и синаптонемальный комплекс распадается. Это позволяет двум гомологичным хромосомам бивалента несколько отодвинуться друг от друга, но они еще связаны одной или несколькими хиазмами. Часто на стадии диплотены хромосомы деконденсируются и синтезируют РНК (рис. 150, А, 4). В развивающихся яйцеклетках эта стадия может растянуться на месяцы или даже годы.

Рано или поздно диплотена переходит в ДИАКИНЕЗ (стадию обособления двойных нитей). Хромосомы прекращают синтез РНК и снова конденсируются, затем утолщаются и

отделяются от ядерной мембраны. На этой стадии ясно видно, что каждый бивалент содержит 4 отдельные хроматиды, причем каждая пара сестринских хроматид соединена цент-

ромерой, тогда как несестринские гомологичные хроматиды, претерпевшие кроссинговер, связаны хиазмами (рис. 150, А, 5). Когда разрушается ядерная оболочка и начинает формироваться веретено деления, клетка переходит из стадии Профазы I в стадию Метафазы I. Эта Метафаза I отличается от метафазы митоза: гомологичные хромосомы располагаются в экваториальной пластинке не в один слой, как при митозе, а в два (попарно) (рис. 150, Б). При этом заметно, что каждая из гомологичных хромосом состоит из двух сестринских хромосом - хроматид. В Анафазе I гомологичные хромосомы каждой пары расходятся к полюсам клетки без их разъединения на хроматиды. Затем вокруг каждой группы хромосом, разошедшихся к полюсам клетки, образуется ядро - наступила стадия Телофазы I. Но цитокинеза после этой телофазы не наступает, то есть клеточная перегородка между ядрами не образуется, а каждое ядро без перерыва приступает ко второму делению. В ходе этого второго деления происходит разделение хромосом на хроматиды. После второго деления между вновь образовавшимися ядрами возникают клеточные перегородки и получаются 4 гаплоидные дочерние клетки (рис. 150, Б).

### ОБРАЗОВАНИЕ ГАМЕТ И ОПЛОДОТВОРЕНИЕ У ЖИВОТНЫХ

У эмбрионов большинства животных на ранней стадии развития определенные клетки обособляются как предшественники будущих гамет. Такие *первичные половые клетки* мигрируют в развивающиеся *гонады* (яичники у самок и семенники у самцов), где после периода размножения митозом претерпевают мейоз и превращаются в зрелые гаметы (яйцеклетки и спермии или сперматозоиды, если имеют жгутики). Процесс развития яйцеклетки называется *оогенез* и схематически представлен на рис. 154. Особенностью мейоза оогенеза является то, что ооциты первого порядка остаются на стадии диплотены Профазы I многие годы. У человека после наступления половой зрелости ежемесячно стимулируется созревание - переход на следующую стадию мейоза, завершение развития и *овуляция* (освобождение из яичника) - только одной яйцеклетки. Этот процесс находится под контролем полипептидных гормонов (*гонадотропинов*). Другая особенность мейоза оогенеза - неравный цитокенез, в результате которого почти вся цитоплазма достается сначала *ооциту 2-го порядка*, а затем - яйцеклетке. Образующиеся при этом *полярные тельца* постепенно дегенерируют и погибают.

Яйцеклетки представляют собой высокоспециализированные клетки

с уникальными особенностями. Наиболее очевидная черта яйцеклетки - это ее большие размеры. Тогда как типичная клетка тела животного имеет размеры около 20 мкм, диаметр яйцеклетки составляет у млекопитающих от 60 до 150 мкм, у лягушек и рыб - от 1 до 2 мм, а у птиц и рептилий - несколько см (рекорд принадлежит сельдовой акуле - 22 см). Такие большие размеры обеспечивают запас питательных веществ для эмбрионального развития будущего зародыша. Этот запас создается при помощи нескольких специальных механизмов. Во-первых, это *амплификация* (увеличение числа копий) генов, продукты которых требуются в большом количестве, например генов рРНК. Во-вторых, это помощь у беспозвоночных *клеток-кормилиц*, которые закачивают макромолекулы в яйцеклетку через цитоплазматические мостики активным электрофорезом, а у позвоночных - *фолликулярных клеток*, переносящих в яйцеклетку малые молекулы через щелевые контакты. И, наконец, у кур, амфибий и насекомых белковые вещества желтка образуются в клетках печени или других органов, поступают в кровь и захватываются ооцитами из внеклеточной жидкости путем эндоцитоза при участии специфических рецепторов.

Вторая особенность - это наличие наружных специализированных оболочек. Непосредственно прилегающая к плазматической мембране оболочка называется у млекопитающих *zona pellucida*, а у других животных - *вителлиновый слой* и действует как

видоспецифический барьер, не позволяющий оплодотворять яйцеклетку спермиям других видов. После оплодотворения при прохождении по яйцеводу яйцеклетка приобретает дополнительные защитные оболочки, например, студенистой, как у лягушки, или состоящей из "белка" и скорлупы, как у курицы. Оогенез у млекопитающих - процесс удивительно не экономный. У человека в первые месяцы внутриутробного развития в яичники переходит около 1700 первичных половых клеток, на протяжении нескольких месяцев из них митозом образуется около 7 млн. оогоний. Однако большинство из них затем дегенерирует и погибает, так что ко времени полового созревания в яичниках имеется лишь 300 тыс. ооцитов 1-го порядка, а в течение примерно 40-летнего репродуктивного периода у женщины овулируют только 400 - 500 яйцеклеток.

В противоположность яйцеклеткам спермии (или сперматозоиды, если имеют жгутики) меньше всех других клеток. Спермии не имеют ничего "лишнего", например, рибосом, эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, которые не требуются им для выполнения их функции

оплодотворения. Сперматозоид состоит из *головки*, содержащей необычайно сильно уплотненное гаплоидное ядро, и *хвоста*, представляющего собой обычно типичный эукариотический жгутик (рис. 155). У базального тельца жгутика располагаются митохондрии, снабжающие жгутик молекулами АТФ, энергия гидролиза которых необходима для движения сперматозоида. Между оогенезом и процессом образования сперматозоидов - *сперматогенезом* - существует ряд различий. Во-первых, сперматогенез включает в себя дополнительную стадию *дифференцировки* сперматид в сперматозоиды. Во-вторых, митотические и мейотические деления сперматогенеза не сопровождаются полным цитокинезом, так что все дочерние клетки, за исключением самых первых сперматогоний, соединены цитоплазматическими мостиками (рис. 156). Эти цитоплазматические мостики представляют собой механизм, благодаря которому каждый развивающийся гаплоидный спермий, имея со своими соседями общую цитоплазму, может получать весь набор продуктов полного диплоидного генома. У млекопитающих сперматогенез начинается только после полового созревания и затем непрерывно продолжается в эпителиальной выстилке очень длинных, сильно извитых трубочек, называемых *семенными канальцами*, которые находятся в семенниках (рис. 156). У человека мейоз сперматогенеза занимает около 24 дней, а все развитие 4 зрелых сперматозоидов из сперматогонии - около 9 недель.

После своего выхода из гонады как яйцеклетка, так и сперматозоид обречены на гибель в считанные часы, если они не отыщут друг друга и не сольются в процессе *оплодотворения*. Сперматозоид не может оплодотворить любую клетку, так как процесс оплодотворения контролируется несколькими специальными механизмами специфического узнавания. Во-первых, для того чтобы сперматозоид мог оплодотворить яйцеклетку, он должен быть активирован. У млекопитающих активация сперматозоида вызывается выделениями женского полового тракта и называется *капациацией*. Во-вторых, происходит специфическое узнавание белками плазматической мембраны сперматозоида гликопротеинов оболочки *zona pellucida* у млекопитающих или полисахаридов внешней оболочки яйцеклетки у беспозвоночных. Это узнавание вызывает *акросомальную реакцию*: содержимое *акросомы*, находящейся в головке сперматозоида (рис. 155), высвобождается в окружающее пространство, и в результате взрывной полимеризации актина очень быстро "вырастает" *акросомальный отросток* (рис. 157, А). Среди высвобождающихся молекул акросомы имеются гидролитические ферменты, которые облегчают проникновение сперматозоида к плазматической мембране яйцеклетки.

Однако акросомальная реакция закончится оплодотворением только если произойдет еще одно специфическое узнавание: у млекопитающих происходит специфичное связывание белков плазматической мембраны сперматозоида с тем же гликопротеином *zona pellucida*, что вызвал акросомальную реакцию, а у беспозвоночных с гликопротеиновыми рецепторами вителлинового слоя должны связаться молекулы небольшого (30 кДа) белка *байндина* (от англ. binding - связывание), которые содержатся в мембране акросомы и после

акросомальной реакции оказываются на поверхности акросомального отростка (рис. 157, Б). После видоспецифичного связывания сперматозоида с гликопротеиновыми рецепторами оболочки яйцеклетки становится возможным слияние этих клеток.

Для предотвращения оплодотворения более чем одним сперматозоидом сразу после первого слияния со сперматозоидом яйцеклетка должна очень быстро создать препятствие для проникновения дополнительных сперматозоидов. У рыб в оболочках яйцеклеток имеется узкий канал, называемый *микропиле*, через который сперматозоиды могли бы проходить лишь один за другим, и он закрывается сразу же после прохождения первого сперматозоида. Однако у большинства других животных яйцеклетки не имеют микропиле и могут сливаться со спермием в любом участке своей поверхности. У многих яйцеклеток повторное проникновение сперматозоидов предотвращается быстрой *деполяризацией* плазматической мембраны после слияния с первым сперматозоидом. Так же, как в любой другой живой клетке, внутренняя поверхность плазматической мембраны яйцеклетки заряжена отрицательно по отношению к ее наружной поверхности. Проникновение сперматозоида вызывает резкое увеличение проницаемости плазматической мембраны для  $\text{Na}^+$ , и она начинает пропускать ионы натрия из окружающей среды, где их много, внутрь клетки, где их всегда в норме мало. Войдя в клетку, ионы  $\text{Na}^+$  за 2 - 3 с заряжают внутреннюю поверхность мембраны положительно относительно наружной поверхности, и мембранный потенциал меняет знак на противоположный. Этот механизм аналогичен механизму возникновения потенциала действия (нервного импульса) в нервных клетках. Новые сперматозоиды уже не могут слиться с деполяризованной мембраной.

Мембранный потенциал яйцеклетки уже через несколько минут после оплодотворения яйцеклетки возвращается к норме. Однако он вызывает массовое высвобождение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных хранилищ

яйцеклетки, так что их концентрация в цитозоле яйцеклетки возрастает в течение 20 - 30 с после начала деполяризации плазматической мембраны более чем в 100 раз. Концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  тоже повышается лишь на 2 - 3 мин, но запускает *кортикальную реакцию*, которая заключается в том, что *кортикальные гранулы*, находящиеся в цитоплазме вблизи плазматической мембраны (рис. 154), сливаются с ней и высвобождают свое содержимое на внутреннюю сторону оболочки яйцеклетки. Протеолитические ферменты, вышедшие из кортикальных гранул, быстро разрушают гликопротеины, служащие рецепторами при связывании сперматозоидов, и вызывают отделение вителлинового слоя или *zona pellucida*, до этого плотно прилегавших к плазматической мембране, тогда как другие ферменты кортикальных гранул образуют поперечные сшивки между белками оболочки яйцеклетки, что делает ее более жесткой. В результате формируется *оболочка оплодотворения*, непроницаемая для сперматозоидов. Слияние ядер сперматозоида и яйцеклетки происходит примерно через 30 мин после слияния клеток.

Деполяризация плазматической мембраны, которую иногда можно вызвать и неспецифическими воздействиями, например, уколом иглы или осмотическим шоком, не только приводит к формированию оболочки оплодотворения, но и запускает программу развития яйцеклетки. Повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле не только запускает кортикальную реакцию, но и вызывает примерно через 8 мин усиление синтеза белков в цитоплазме, а через 40 - 45 мин начало репликации ДНК (у ряда животных влияние  $\text{Ca}^+$  на эти процессы опосредовано повышением внутриклеточного рН).

Если развитие яйцеклетки было активировано в отсутствие сперматозоида, то первоначально гаплоидные клетки на ранних стадиях развития сливаются и восстанавливают свою диплоидность, после чего развивается нормальный организм - точная копия материнского. Такое развитие без оплодотворения называется *партеногенезом* и встречается в природе у ряда животных. Так размножаются в течение лета дафнии и тли. Осенью появляются самцы дафний и происходит обычное половое размножение. Время от времени половое размножение происходит и у тлей. Не имеют самцов и многие популяции скальных ящериц, встречающиеся на Кавказе. При этом диплоидность у них

обеспечивается слиянием яйцеклетки с полярным тельцем. Искусственный партеногенез используют в шелководстве как метод регулирования пола у тутового шелкопряда. Известны также случаи, когда ядро яйцеклетки разрушается, а сама она сохраняет способность к оплодотворению. При этом ядро сперматозоида занимает центральное положение в яйцеклетке, и она начинает развиваться с этим ядром. Такое явление называется *андрогенез* и приводит к образованию нового организма со всеми признаками отцовского.

## ОБРАЗОВАНИЕ ГАМЕТ И ОПЛОДОТВОРЕНИЕ У РАСТЕНИЙ

Цветок - это генеративный орган растения, то есть орган, который служит для полового размножения. По своему происхождению - это укороченный видоизмененный побег, листья которого превратились в отдельные части цветка и приспособились к опылению и оплодотворению. Тычинки и пестики определяют пол цветка. Мужские гаметы образуются в пыльниках тычинок, а женские гаметы - в семязачатках пестиков. Поэтому цветки, которые содержат только тычинки, называют *мужскими* цветками, а цветки, содержащие только пестики, - *женскими*. Цветки, в которых есть и тычинки, и пестики, называются *обоеполые*. *Бесполое* цветки не содержат ни пестиков, ни тычинок и не принимают прямого участия в размножении, их назначение заключается только в привлечении насекомых-опылителей. Растения, на которых развиваются однополые цветки обоих видов - и мужские, и женские, называются *однодомными*. К однодомным растениям относятся кукуруза, береза, орешник-лещина, дуб, каштан. Если мужские цветки развиваются на одних растениях, а женские - на других, то такие растения называют *двудомными*. Двудомные растения - это крапива, тополь, осина, ива, конопля, щавель.

Сразу после венчика в цветке находится круг *тычинок*. Количество тычинок в цветке может быть разным - от одной тычинки до нескольких сотен, но обычно их 3-10. Тычинка состоит из *тычиночной нити* и *пыльника*. В пыльнике, как правило, содержится 4 полости, в которых созревает пыльца (рис. 158). По сосудам и ситовидным трубкам проводящих пучков, которые проходят внутри тычиночных нитей, к зреющей пыльце подводится питание. Снаружи пыльник покрыт эпидермисом. Под эпидермисом располагается слой клеток механической ткани. Внутри каждой половинки пыльника находится две полости. Сначала они заполнены клетками образовательной ткани. Клетки образовательной ткани делятся мейозом, поэтому получающиеся из них клетки имеют гаплоидный (одинарный) набор хромосом. Каждая вновь возникающая гаплоидная клетка делится еще один раз, но уже митозом (рис. 159). В результате этого деления образуются две дочерние гаплоидные клетки - одна побольше и другая поменьше. Они окружают себя толстой и прочной оболочкой и получается пыльца, или точнее *пыльцевое зерно* (рис. 160). Таким образом, каждое пыльцевое зерно состоит из двух гаплоидных клеток, заключенных в общую оболочку. Та клетка, которая поменьше, называется *генеративной* клеткой, а другая клетка содержит питательные вещества (поэтому она крупнее) и называется *вегетативной* клеткой. Почему они так называются, вам станет ясно чуть позже, когда вы узнаете, что происходит с пыльцевым зерном дальше. Постепенно вся образовательная ткань внутри пыльника заменяется созревшими пыльцевыми зернами. Когда пыльца созревает, слой механической ткани, располагающийся под эпидермисом, начинает подсыхать, и пыльник трескается. Созревшая пыльца готова высыпаться через образовавшуюся трещину.

Количество пыльцевых зерен, созревающих в одном пыльнике, может быть у разных растений от нескольких десятков до нескольких тысяч. Например, у осины их около 1000. Размеры пыльцевых зерен тоже бывают разными - от видимых глазом (0,2 мм, как у тыквы) до мельчайших в 0,008 мм (у фикуса). Форма их - шаровидная, овальная, кубическая или даже нитевидная. Оболочка пыльцы обычно окрашена в желтоватый, бурый, синеватый или

белый цвет и имеет различные неровности на поверхности в виде бугорков, шипиков, сеточки (рис.

160). Форма, окраска и поверхность пыльцы постоянна для каждой разновидности растений. Это свойство пыльцы используется, когда исследуются образцы пород из толщи земли. Пыльцевые зерна прекрасно сохраняются в ископаемом состоянии и по составу пыльцы можно узнать, какая растительность произрастала в древние времена.

В самом центре цветка находится один или несколько *пестиков*. В пестике различают самую нижнюю вздутую часть - *завязь*, отходящий от верхушки завязи *столбик* и самую верхнюю часть - *рыльце* (рис. 161). Из завязи впоследствии формируется плод. Внутри завязи находится полость, в которой находятся один или несколько *семязачатков*. После оплодотворения из них развиваются семена. Поэтому от количества семязачатков в завязи зависит, сколько семян будет внутри плода. Роль рыльца заключается в восприятии пыльцы, а столбик поднимает рыльце вверх, чтобы пыльце было легче попасть на рыльце. В то время, когда в пыльниках тычинок созревает пыльца, в завязи пестиков формируются *зародышевые мешки*, которые содержат женские гаметы - яйцеклетки. В

полости завязи пестика располагаются один или несколько *семязачатков* (рис. 161). Семязачатки прикрепляются к внутренним стенкам завязи посредством *семяножек*. Внутри каждого семязачатка есть зародышевый мешок (рис. 162). Внутри семяножки проходит проводящий пучок. По сосудам и ситовидным трубкам проводящих пучков семяножек к созревающим зародышевым мешкам подводится питание. Снаружи зародышевый мешок покрыт покровами - несколькими слоями покровных тканей. Покровы семязачатка не сплошные, их края образуют узкий канал - *пыльцевход*. Сам зародышевый мешок состоит из 7 клеток. Самая крупная клетка зародышевого мешка расположена в его центре и поэтому так и называется *центральная клетка*. Рядом с пыльцевходом находится самая главная клетка зародышевого мешка - яйцеклетка. По обеим сторонам от нее располагаются две *вспомогательные* клетки, а на противоположной стороне мешка (то есть напротив яйцеклетки) находятся еще три клетки, которые из-за своего расположения называются *антиподами* (рис. 162).

Зародышевый мешок образуется из одной единственной клетки семязачатка в результате нескольких последовательных делений этой клетки (рис. 163). Сначала она делится мейозом и как всегда в ходе мейоза образуются 4 клетки, имеющие гаплоидный (одинарный) набор хромосом. Но из этих четырех гаплоидных клеток три отмирают и остается только одна. Ядро оставшейся клетки делится митозом, но перегородка между получившимися дочерними ядрами не возникает. Эти ядра расходятся к полюсам сильно удлинняющейся клетки, а между ними образуется крупная вакуоль. Затем каждое из этих ядер делится митозом еще дважды, в результате чего возникают по 4 гаплоидных ядра у каждого полюса. В получившейся 8-ядерной клетке от каждого полюса отходит по одному ядру в центр зародышевого мешка. Они сливаются, образуя *центральное ядро*. Между оставшимися у полюсов клетки ядра образуются клеточные перегородки, и ядра вместе с облегающей их цитоплазмой превращаются в клетки, плотно прилегающие друг к другу. На одном полюсе зародышевого мешка - яйцеклетка и две вспомогательные клетки, а на другом - три клетки-антиподы. Центральное ядро вместе с окружающей его цитоплазмой образует центральную клетку. Таким образом, получающийся зародышевый мешок состоит из семи клеток. Из них 6 имеют одинарный набор хромосом (яйцеклетка, две вспомогательные клетки и три клетки-антиподы). В отличие от них цент-

ральное ядро, образовавшееся при слиянии двух гаплоидных ядер, обладает двойным набором хромосом.

После того, как в цветках образуются зрелая пыльца и зрелые зародышевые мешки с яйцеклетками, растения готовы к половому размножению. Половое размножение цветковых растений состоит из двух стадий *опыления* и оплодотворения. Опылением называют попадание пыльцы на рыльце пестика. Рыльце пестика выделяет клейкую жидкость, и попавшие на рыльце пыльцевые зерна прилипают к нему. Закреплению пыльцевых зерен на рыльце пестика способствуют также неровности пыльцевых оболочек в виде бугорков, шипиков, сеточки. Прилипшая на рыльце пестика пыльца начинает прорастать. Но прорастает не любое пыльцевое зерно. Очень часто на пестик одного вида растения попадает пыльца совершенно другого вида. Например, на рыльце пестика цветка крапивы может попасть пыльца цветущей рядом таволги. В этом случае "чужая" пыльца прорастать не будет. Дело в том, что клейкая жидкость, выделяемая пестиком, способствует прорастанию только "своей" пыльцы и тормозит прорастание "чужой" в результате молекулярного узнавания аналогичного узнаванию сперматозоида и яйцеклетки у млекопитающих.

Опыление осуществляется двумя способами: при помощи *самоопыления* и *перекрестного* опыления. Самоопыление происходит внутри одного обоеполого цветка. В нем пыльца с тычинки попадает на рыльце пестика этого же цветка. Перекрестное опыление осуществляется при переносе пыльцы с цветка одного растения на рыльце пестика другого растения. Перекрестное опыление встречается у большинства цветковых растений. Оно гораздо выгоднее, чем самоопыление, потому что в этом случае в потомстве происходит объединение свойств двух разных растений - отцовского и материнского, т.е. как раз то, ради чего и осуществляется половое размножение. При перекрестном опылении получается более разнообразное и вместе с тем более сильное потомство, тогда как при самоопылении происходит ослабление потомства. Для того чтобы произошло перекрестное опыление, в цветках растений выработалось много приспособлений, препятствующих самоопылению. К таким приспособлениям относятся, например, двудомность, то есть когда на одном растении образуются только женские (пестичные), а на другом - только мужские (тычиночные) цветки. У ржи, кукурузы, капусты и некоторых других растений самоопыления не происходит потому, что пыльца попавшая с тычинок на пестик того же самого цветка, никогда

не прорастает. Это приспособление называется *самостерильностью* и вызывается генетическими причинами. У других растений пыльники и пестики в цветках развиваются неодновременно. Поэтому растение, в котором уже созрела пыльца, но рыльце пестиков еще не готовы ее принять, может опылять только другие растения. К тому моменту, когда в его цветках созреют пестики, у него уже не останется собственной пыльцы, и такое растение будет опылено другими растениями.

Если перекрестное опыление по какой-либо причине затруднено, происходит самоопыление. Растение поступает по принципу "лучше самоопыление, чем никакого опыления". Поэтому у растений, которые растут в неблагоприятных климатических условиях (например, высоко в горах, далеко на севере или в пустынных областях, где недостаточно насекомых опылителей), появились специальные приспособления для самоопыления. Например, наряду с обычными цветками у поверхности почвы дополнительно развиваются особые никогда не раскрывающиеся цветки, внутри которых пыльца с тычинок попадает только на пестики того же самого цветка. У других растений, например колокольчиков и грушанок, выработалось приспособление, обеспечивающее самоопыление только в конце цветения. Поэтому оно происходит только в том случае, если не произошло перекрестного опыления. У таких растений пыльца высыпается на столбик пестика и прилипает к нему, когда рыльце пестика еще совсем неразвито. Если после развития рыльца на него не попала пыльца других растений, то оно начинает разрастаться и



закручиваться так, что прикасается к своему столбику. Оставшаяся на нем "своя" пыльца производит опыление.

Перенос пыльцы при перекрестном опылении происходит по-разному: при помощи ветра, насекомых, птиц, летучих мышей и воды. К ветроопыляемым растениям относятся все хвойные деревья, береза, ольха, осина, тополь, дуб, ясень, орешник, все злаки, осоки, конопля, крапива, подорожник. Ветроопыляемые растения отличаются от опыляемых насекомыми растений некоторыми особенностями. Ветер - не слишком надежный посредник опыления. Вероятность переноса пыльцы на рыльце пестика другого цветка ветром невелика, но чем больше образуется пыльцы, тем выше эта вероятность. Поэтому ветроопыляемые растения образуют колоссальное количество пыльцы: одна метелка кукурузы производит около 50 миллионов пыльцевых зерен, одна сережка орешника - 3-4 миллиона, а одна сережка осины - около 6 миллионов. Пыльца у них мелкая, сухая, чтобы хорошо рассыпалась, и легкая, чтобы долго

держалась в воздухе. Пыльца таких растений может переноситься ветром на сотни километров. Цветение многих древесных ветроопыляемых растений происходит или до распускания листьев (осина, ольха, орешник), или одновременно с распусканием листьев (дуб, береза), когда листья еще не могут препятствовать переносу пыльцы ветром. Околоцветник тоже мог бы стать препятствием на пути пыльцы, поэтому он у ветроопыляемых растений слабо развит или совсем отсутствует. Пыльники у них часто прикреплены к тычиночной нити подвижно и, качаясь, лучше рассыпают пыльцу. Рыльца их пестиков сильно развитые, разросшиеся, что тоже увеличивает вероятность попадания пыльцы на рыльце. Наконец, у некоторых растений имеются специальные приспособления для выбрасывания пыльцы из пыльников в воздух. Например, у крапивы тычиночные нити спирально закручены в бутоне. При раскрытии цветка они с силой раскручиваются и выбрасывают пыльцу из лопнувших пыльников.

подавляющее большинство растений опыляется насекомыми. Насекомые - это более надежные посредники при опылении, чем ветер. Но они, совершая перенос пыльцы, должны удовлетворить свои потребности в питании. Поэтому растения выработали целый ряд свойств, привлекающих насекомых на цветок. Вы их уже знаете - это выделение специальной пищи для насекомых (нектара), яркая окраска и запах. Главные насекомые-опылители - это пчелы, шмели, мухи, бабочки и жуки. Насекомоопыляемые растения образуют значительно меньше пыльцы, чем ветроопыляемые. Их пыльца более крупная, клейкая или с шипиками, чтобы лучше удерживаться на поверхности тела насекомого. У некоторых орхидей образуется мало пыльцы, вся она склеена в особый комочек, по форме напоминающий булаву. Она снабжена сложно устроенным прилипальцем, при помощи которого приклеивается к голове крупного насекомого, переносится им на другой цветок, прилипает к рыльцу пестика и производит опыление. Другой замечательный пример приспособления цветков к опылению насекомыми - это подражание окраске и форме насекомого-опылителя. Например, цветки одной из тропических орхидей по окраске и форме похожи на самок одной из разновидности мух. При этом цветение орхидей наступает в то время, когда самцы этих мух летают в поисках самок. Поэтому окраска и форма цветков орхидей привлекает самцов, и они, перелетая с цветка на цветок, производят опыление. Как только самки мух появляются в большом количестве, самцы перестают интересоваться орхидеями.

Цветки бывают крупные и мелкие. Обычно крупные цветки на растении расположены поодиночке. Они хорошо заметны для насекомых-опылителей. Но чаще встречаются мелкие цветки. Они, как правило, расположены на растении большими группами и образуют общее *соцветие*. Выгода образования соцветий для растения совершенно ясна - насекомое-опылитель за одно и то же время посетит гораздо больше мелких цветков, собранных в соцветие, чем крупных, но расположенных далеко друг от друга.

Пыльцевое зерно, попав на рыльце пестика, при отсутствии тормозящих веществ начинает прорастать. Прорастание пыльцы происходит так: все содержимое пыльцевого зерна начинает выпячиваться наружу через пору в оболочке. Это выпячивание в форме трубки так и называется - *пыльцевая трубка*. Затем она внедряется в ткань рыльца пестика. Пыльцевая трубка растет, удлиняясь внутри столбика пестика и раздвигая его клетки. Она растет по направлению к завязи пестика (рис. 164). По пыльцевой трубке вниз спускается все содержимое пыльцы. Рост пыльцевой трубки происходит за счет вегетативной клетки. По мере роста ядро вегетативной клетки постепенно рассасывается, а затем совсем исчезает. Совсем иная задача у генеративной клетки. Находясь внутри пыльцевой трубки, ее гаплоидное ядро еще раз делится митозом, и образуются две мужские половые клетки с гаплоидным набором хромосом, которые называются спермиями. Таким образом, по мере роста пыльцевой трубки по ней спускаются вниз два спермия. Обычно на рыльце пестика попадает большое количество пыльцевых зерен. Многие из них начинают прорастать, но скорость роста их пыльцевых трубок неодинакова. Одни пыльцевые трубки растут быстрее, другие - медленнее. Если завязь имеет только один семязачаток, то для оплодотворения бывает достаточно, чтобы его достигла одна из пыльцевых трубок. Остальные пыльцевые трубки, отставшие в росте, погибают. Если в завязи много семязачатков, то для оплодотворения необходимо, чтобы ко всем семязачаткам по пыльцевым трубкам были доставлены спермии.

Достигнув завязи, пыльцевая трубка проходит через пыльцевход в семязачаток. В семязачатке пыльцевая трубка проникает в зародышевый мешок, ее кончик разрывается, и оба спермия попадают внутрь зародышевого мешка. Внутри зародышевого мешка происходит оплодотворение - ядро одного из спермиев сливается с ядром яйцеклетки, а ядро другого - с центральным ядром. Таким образом, оба спермия принимают участие в оплодотворении. Такой тип оплодотворения - это особенность цветковых растений и называется *двойным оплодотворением* и было открыто русским ботаником С.Г. Навашиным в 1898 году. При оплодотворении гаплоидной яйцеклетки одним из спермиев образуется диплоидная зигота. В дальнейшем из нее развивается зародыш семени. При оплодотворении диплоидного центрального ядра другим спермием возникает клетка с ядром, имеющим триплоидный (тройной) набор хромосом. Из нее впоследствии путем многократного деления митозом развивается питательная ткань семени - *эндосперм* (от гр. эндо - внутри + сперма

- семя). После процесса оплодотворения происходят большие преобразования в зародышевом мешке, во всем семязачатке и во всей завязи пестика в целом. Весь семязачаток после оплодотворения превращается в семя, а завязь пестика превращается в плод.

#### ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА

Пол организмов, размножающихся половым способом, определяется парой особых *половых хромосом*, тогда как остальные хромосомы называют *аутосомами*. Пол, особи которого имеют одинаковые половые хромосомы, называется *гомогаметным*. У особей гомогаметного пола при образовании гамет все они будут одинаковыми по половым хромосомам. Пол, у особей которого половые хромосомы разные, называется *гетерогаметным*. Соответственно и половые клетки этих особей будут двух типов, причем образовываться они будут в равном соотношении. У половых хромосом нет принципиальных отличий от аутосом: они, как и аутосомы, несут гены, которые контролируют развитие тех или иных признаков.

Половые хромосомы принято обозначать буквами. У видов с гетерогаметным мужским полом одинаковые по размеру и форме половые хромосомы обозначают буквой X, а хромосому, имеющуюся только у самцов, - буквой Y. Такой тип наследования пола встречается у многих червей, моллюсков и членистоногих, а из позвоночных - у млекопитающих и человека. В хромосомном комплексе самок этих видов две X-хромосомы, а у самцов - X-хромосома и Y-хромосома. У видов с

гетерогаметным женским полом хромосому, имеющуюся как у самок, так и у самцов обозначают буквой Z, а имеющуюся только у самок - буквой W. Самки этих видов имеют хромосомный комплекс с половыми хромосомами ZW, а самцы - с половыми хромосомами ZZ. Такой тип наследования пола имеет место, в частности, среди растений - у клубники, среди насекомых

- у бабочек, а среди позвоночных - у рыб, пресмыкающихся и птиц. Медоносная пчела

относится к видам, у которых гомогаметным является женский пол, но пчелиная матка откладывает два типа яиц - оплодотворенные и неоплодотворенные. Из оплодотворенных яйцеклеток (генотип XX) развиваются самки (матка и рабочие пчелы), а из неоплодотворенных (одна X-хромосома, генотип XO) - самцы (трутни). В связи с этим организмы, образовавшиеся при обычном половом размножении, - диплоидные, а самцы, развивающиеся в результате партеногенеза, - гаплоидные. В процессе индивидуального развития в клетках тела трутней восстанавливается диплоидный хромосомный набор, тогда как в половых клетках гаплоидное число хромосом сохраняется и при образовании сперматозоидов не уменьшается. Аналогичное явление встречается и у некоторых других насекомых. X-хромосома намного длиннее, чем Y-хромосома, и содержит некоторые гены, которых нет в Y-хромосоме, в том числе и гены, кодирующие не связанные с проявлением пола белки. Однако продукты таких генов не образуются в женском организме в двойном количестве по сравнению с мужским организмом, потому что одна из X-хромосом в каждой клетке женского организма неактивна, причем инактивация происходит на ранних этапах эмбриогенеза. Будет ли в данной отдельной клетке инактивироваться материнская или отцовская X-хромосома - дело случая, но далее во всех поколениях клеток, происходящих от данной клетки, неактивной будет одна и та же хромосома, поэтому женский организм является мозаичным по признакам, определяемым X-хромосомой. Механизм инактивации X-хромосомы неизвестен.

#### КРАТКИЕ ВЫВОДЫ

Половое размножение организмов - это способ повышения способности к адаптации, заключающийся в резком увеличении числа комбинаций генов в потомстве, и является еще одной реализацией комбинаторного принципа увеличения разнообразия. Мейоз свойственен только эукариотам, но преимущества комбинирования генов столь велики, что и у прокариотических организмов развились в ходе эволюции такие процессы, как скрещивание и перегруппировка генов путем генетической рекомбинации.

Конъюгация гомологичных хромосом в мейозе и видоспецифичные барьеры в оплодотворении у организмов основаны так же, как и другие внутри- и межклеточные процессы, на специфическом пространственно-конформационном взаимодействии-узнавании макромолекулами друг друга по принципу "замок - ключ".

Рис. 149. Закрепление полезных мутаций в большой популяции благодаря половому размножению.

Рис. 150. Стадии мейоза. А. Пять стадий Профазы I мейоза: 1 - лептотена, 2 - зиготена, 3 - пахитена, 4 - диплотена, 5 - диакинез.

Б. Остальные стадии мейоза.

Рис. 151. Схема синаптонемального комплекса.

Рис. 152. Кроссинговер Рис. 153. Схематическое изображение трех хиазм - ремосомами. зультата трех кроссинговеров.

Рис. 154. Последовательность стадий оогенеза.

Рис. 155. Строение человеческого сперматозоида.

Рис. 156. Схема сперматогенеза.

Рис. 157. А. Акросомальная реакция у морского ежа. Б. Стадия 3, предшествующая слиянию плазматических мембран сперматозоида и яйцеклетки.

Рис. 158. Пыльник в разрезе.

Рис. 159. Образование пыльцевых зерен: 1 - деление мейозом; 2 - деление митозом; 3 - образование оболочек вокруг пыльцевых зерен.

Рис. 160. Внешний вид пыльцы и строение пыльцевого зерна.

Рис. 161. Строение цветка.

Рис. 162. Строение семязачатка.

Рис. 163. Развитие зародышевого мешка: 1 - мейоз; 2 - 4 - деление ядер митозом; 5 - образование центрального ядра; 6 - цитокинез и образование зрелого зародышевого мешка.

Рис. 164. Оплодотворение в цветке.

## Лекция 12. МУТАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

*Мутационная изменчивость - связь между геном и признаком - законы наследования - количественные признаки - генетика популяций - генетика индивидуальных различий - краткие выводы*

### МУТАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

*Наследственность* - это способность организмов передавать следующему поколению свои признаки и свойства, т.е. воспроизводить себе подобных. При этом, как правило, не происходит точного копирования родительских организмов, а наследственность сопровождается *изменчивостью*. Различают наследственную (*генотипическую*) и ненаследственную (*фенотипическую*, или *модификационную*) изменчивость. Ненаследственная изменчивость - это результат изменений условий среды, в результате чего организм изменяется в пределах, задаваемых генотипом. Ненаследственная изменчивость важна для приспособления организмов к разным условиям среды, в которых они оказываются, для их выживания и сохранения их потомства. Однако для эволюционных процессов нужна наследственная изменчивость, которая служит единственным источником разнообразия, из которого происходит отбор новых наиболее приспособленных форм организмов. Разновидностью наследственной изменчивости является *мутационная изменчивость*.

Несмотря на высокую точность процессов репликации, транскрипции и распределения хромосом во время клеточного деления по дочерним клеткам, с низкой частотой ошибки все же возникают и не всегда устраняются системами репарации. Любое стойкое изменение последовательности нуклеотидов в ДНК называется *мутацией*. Мутацию называют *спонтанной*, когда причины, вызвавшие ее, не контролируются, и *индуцированной*, когда она вызвана контролируруемыми факторами. Такими факторами (*мутагенами*) чаще всего бывают высокоэнергетическое излучение (ультрафиолетовое или ионизирующее) или активные химические вещества (см. раздел "РЕПАРАЦИЯ ДНК"). Частота спонтанных мутаций обычно лежит в пределах 1 на  $10^5$  -  $10^7$  генов и различна для разных генов - есть

консервативные и есть быстро мутирующие гены. Мобильные элементы генома (IS-элементы и транспозоны) способны повышать частоту мутаций в фиксированных участках генома на 2 - 3 порядка.

Мутации могут возникать в любой период жизни организма, затрагивая как клетки тела (*соматические мутации*), так и половые клетки. Соматические мутации проявляются обычно как "мозаичность" организма, поскольку все потомки мутантной клетки имеют измененный признак. Они могут охватить большой или меньший участок организма, но, как правило, не наследуются. Исключение составляют только те соматические мутации, которые охватывают точки роста растений. При формировании из таких мутантных точек роста цветonoсных побегов, цветков, плодов и семян происходит передача мутантного признака следующим поколениям.

В большинстве случаев мутации приводят к значительному снижению жизнеспособности организма, а иногда и к его гибели (*летальные мутации*). Однако другие мутации могут оказаться полезными для организма, придавая ему такие особенности, как повышение продуктивности, стойкость к заболеваниям и т.п. Хотя полезные мутации возникают крайне редко и не являются приспособительными изменениями организма, именно они представляют собой исходный материал для эволюционного процесса. При скрещивании мутантных организмов с другими, нормальными или мутантными по другим генам, возникают новые соединения генов. Разнообразные генетические комбинации, которые возникают при этом, являются материалом для естественного отбора и приводят к эволюции организмов.

В зависимости от того, какие изменения генома приводят к появлению мутаций, выделяют *генные*, или *точечные мутации*, *хромосомные перестройки* и *геномные мутации*. При генных (точечных) мутациях происходят изменения структуры ДНК только в одном месте внутри гена. При этом может произойти замена одного основания другим (мутация *замещения*), в результате чего при синтезе белка на место одной из аминокислот будет включена другая. Классическим примером такой мутации является замена Т на Ц в 6-м триplete нуклеотидной последовательности, кодирующей b-субъединицу молекулы гемоглобина. В результате в белке происходит замена только одной аминокислоты (глутаминовой кислоты на валин), однако это приводит к появлению "липкого" участка на молекуле, благодаря которому молекулы гемоглобина ассоциируют в крупные нерастворимые комплексы, которые деформируют эритроциты, придавая им характерную серповидную форму. Такие "склеенные" молекулы гемоглобина не могут нормально функционировать, а серповидные эритроциты застревают в мелких капиллярах и отличаются повышенной хрупкостью. Все это проявляется как тяжелое наследственное заболевание - *серповидноклеточная анемия*. Мутанты, которые синтезируют измененные, но все же частично функционирующие белки, называются мутантами с неполностью подавленной функцией или *leaky-мутантами*. Но часто замена одной аминокислоты на другую не приводит к

значительным изменениям в свойствах продукта трансляции - белка.

Такие *молчащие* мутации накапливаются в процессе эволюции, и именно подсчет числа молчащих мутаций является основой для сравнительно-молекулярного метода построения эволюционных деревьев, о котором было рассказано в первой лекции. Более существенные изменения в характере синтеза белка вызываются выпадением или вставкой лишнего нуклеотида, вследствие чего изменяется весь порядок считывания генетической информации (*сдвиг рамки считывания*) и образуется совсем иной белок по сравнению с тем, который был запрограммирован в немутантной молекуле ДНК.

Во время деления клеток иногда могут возникать существенные изменения в строении хромосом, которые называются хромосомными перестройками или *абберациями*. *Нехватками* называют такие абберации, при которых хромосома теряет концевой участок. Плечо хромосомы укорачивается, а фрагмент и гены, находящиеся в нем, теряются при делении ядра. *Делеция* - это тоже потеря участка хромосомы, но не концевой фрагмента, а

средней ее части. Делеции хорошо видны в мейозе: в месте делеции вторая гомологичная хромосома при конъюгации образует петлю. Если в хромосоме какой-то участок не выпадает, а наоборот, повторяется несколько раз, то образуется абберрация, называемая *дупликация*. При *инверсии* участок, который оторвался от хромосомы, прикрепляется к ней снова, но в перевернутом на  $180^\circ$  положении. Хромосомы с дупликациями и инверсиями, как и с делециями, можно обнаружить по характерным чертам расположения гомологичных хромосом при конъюгации. *Транслокации* связаны с обменом участками между негомологичными хромосомами или с прикреплением участка хромосомы одной пары к хромосоме другой пары. *Фрагментацией* называется распад хромосомы на части, причем часть, которая несет центромеру, может принимать участие в мейозе, в то время как остальные фрагменты обычно разрушаются.

Если хромосомы, которые разделились в процессе митоза, не разойдутся в анафазе к полюсам и останутся в том же ядре, то количество хромосом в нем удвоится. Такое же удвоение может произойти в результате слияния двух клеток перед началом мейоза. Явление кратного увеличения хромосом в ядре называется *полиплоидия*. У растений полиплоидия довольно широко распространена в естественных условиях, и многие виды имеют полиплоидные числа хромосом, в то время как у животных полиплоидные виды встречаются редко и только в случаях

партеногенетического размножения. Это происходит потому, что механизм полового размножения у полиплоидных животных нарушается, и они, как правило, бесплодны. Полиплоидные растения по качественным признакам обычно мало отличаются от исходных диплоидных форм, но размеры клеток и многих органов у них значительно больше, чем у диплоидов, что является прямым следствием более крупных ядер, заключающих больше хромосом, чем ядра диплоидов, а следовательно, и более интенсивной транскрипции генов и синтеза белков (рис. 165). Эти особенности полиплоидов вполне понятны, т.к. взаимное соотношение различных типов хромосом у них остается неизменным, а изменяется только доза каждого гена. Полиплоиды, кратность увеличения хромосомного набора которых четная, - диплоиды, тетраплоиды, гексаплоиды и т.д. - имеют довольно высокую плодовитость. Полиплоиды, кратность увеличения хромосомного набора которых нечетная, - триплоиды, пентаплоиды, гептаплоиды и т.д. - напротив, отличаются резко пониженной плодовитостью. Объясняется это тем, что у нечетных полиплоидов один из наборов хромосом оказывается лишним в мейозе, т.к. хромосомы этого набора не имеют гомологичных партнеров и образуют униваленты, отходящие в дочерние клетки независимо друг от друга, что приводит к образованию полисомических половых клеток с резко пониженной жизнеспособностью или даже совсем нежизнеспособных.

Четные полиплоиды легче приспосабливаются к неблагоприятным условиям жизни, легче переносят низкие температуры и засуху. Поэтому они очень распространены в северных и высокогорных районах. Например, 80% всех изученных видов, которые произрастают на Шпицбергене ( $76 - 80^\circ$  северной широты), являются полиплоидами, а в резко континентальных условиях высокогорного Памира полиплоидов произрастает до 85%. Большинство культурных растений (пшеница, рожь, гречиха, свекла и многие другие) тоже являются полиплоидами, а триплоидные формы арбуза наряду с высокой урожайностью и высоким качеством мякоти обладают еще одним положительным свойством - они не содержат семян.

Благодаря полиплоидии у растений возможна межвидовая гибридизация. При слиянии двух гамет отдаленно родственных организмов (например, из разных родов одного семейства) образуется зигота, которая может нормально делиться митозом, но когда наступает время образования гамет в мейозе, не все хромосомы могут найти себе гомологичную пару, и отсюда неизбежное бесплодие при отдаленной гибридизации. Например, гибрид лошади и осла - мул - наделен исключительной выносливостью, но мулы обоих полов стерильны, так как в их клетках на 31 хромосому осла приходится 32 лошадиных хромосом. Однако у растений возможно полиплоидное увеличение числа

хромосом объединенного набора из двух хромосомных наборов разных видов, и после этого мейоз проходит нормально и развивается плодовитое потомство. Таким способом был искусственно получен гибрид редьки и капусты, и таким образом могут возникать межвидовые гибриды растений и в природе. Такие гибридные полиплоидные растения называются *аллоплоидами*, в отличие от внутривидовых полиплоидов - *аутополиплоидов*, и предполагается, что аллополиплоиды играют весьма значительную роль в эволюции растений, очень быстро приводя к образованию новых видов.

При неправильном расхождении хромосом во время мейоза возникают организмы с добавлением или недостатком одной или нескольких хромосом, называемые *анеуплоидами*. Для обозначения разных анеуплоидов применяется следующая терминология. Диплоидные организмы, имеющие одну из хромосом в тройном количестве, называются *трисомиками*, имеющие две хромосомы в тройном количестве - *двойными трисомиками*, имеющие одну из хромосом в четверном количестве - *тетрасомиками*. Диплоидные организмы, у которых не хватает одной хромосомы, называются *моносомиками*, если не хватает двух различных хромосом - *двойными моносомиками* и т.д., но если у них отсутствуют две одинаковые хромосомы, то их называют *нулусомиками*, что означает полное отсутствие одной из пар нормального набора хромосом.

Анеуплоидия с примерно одинаковой частотой наблюдается как у растений, так и у животных. Изучение таких анеуплоидных организмов показало, что даже небольшие изменения баланса хромосом всегда приводят к резкому уменьшению жизнеспособности и плодовитости. Так, трисомики обычно значительно слабее, чем исходные диплоиды, причем это ослабление выражено тем сильнее, чем больше размеры хромосомы, находящейся в трисомическом состоянии. Жизнеспособность моносомиков еще ниже, чем у трисомиков, а у нулусомиков она так мала, что их удается получать очень редко. Низкая жизнеспособность анеуплоидов вполне понятна, т.к. у них резко изменяется количественное соотношение между различными хромосомами, что приводит к нарушению оптимальных свойств организма, выработанных естественным отбором и хорошо приспособленных к существованию в привычных для них условиях внешней среды. У нулусомиков полное отсутствие одной из хромосом, а следовательно, и всех генов, расположенных в этой хромосоме, приводит к выпадению биохимических процессов, контролируемых этими генами, и вследствие этого к катастрофическому нарушению нормального обмена веществ. Поэтому нулусомики могут сохраняться и заканчивать развитие только в тех случаях, когда утерянная хромосома очень мала и расположенные в ней гены не имеют существенного значения для обмена веществ и сохранения жизни.

Анеуплоидия хорошо изучена у людей. У мужчин давно известен *синдром Клейнфельтера* - трисомия, заключающаяся в добавлении к паре X- и Y-хромосом лишней X-хромосомы. Мужчины с таким хромосомным набором отличаются общей вялостью, умственной отсталостью, уменьшением семенников и ослаблением сперматогенеза. Частота синдрома Клейнфельтера среди мужчин составляет около 0.1%. Среди женщин также встречаются трисомики, имеющую третью X-хромосому. У них наблюдается ослабленное развитие вторичных половых признаков, недоразвитие яичников и слабоумие. Моносомики, имеющие только одну X-хромосому, являются женщинами, страдающими *синдромом Шерешевского-Тернера*: низкий рост, замедленное половое развитие, недоразвитие яичников, отсутствие вторичных половых признаков, наличие своеобразной складки кожи на шее и т.д. С частотой в среднем у одного из 800 новорожденных у человека встречается *синдром Дауна* - трисомия по 21-й соматической хромосоме, что тоже сопровождается слабоумием. Известны случаи трисомии и по другим соматическим хромосомам.

## СВЯЗЬ МЕЖДУ ГЕНОМ И ПРИЗНАКОМ

Гены определяют признаки организма по схеме: ген 6

белок 6

признак. Однако такая простая связь реализуется редко: обычно признак является интегрированным результатом нескольких процессов или метаболических реакций, и в его реализации принимают участие несколько белков - продуктов разных генов. Кроме того, и экспрессия генов, и активность белков зависят от условий среды, в которой находится организм, и, следовательно, проявление признаков тоже зависит от среды.

Окраска животных - один из примеров, когда путь передачи генетической информации от ДНК к признаку организма расшифрован. Почти все позвоночные обязаны своей окраской *меланинам*. Меланины существуют в двух формах: черные - *эумеланины* и желтые - *феомеланины*. Об-

разуются меланины в организме из аминокислоты фенилаланина в результате длинной линейной цепочки ферментативных реакций. На первом этапе фермент *фенилаланингидроксилаза* превращает фенилаланин в аминокислоту тирозин. Следующий фермент - *тирозиназа* - превращает тирозин в следующий продукт и т.д. Окраска шкуры млекопитающих зависит не только от наличия разных форм меланинов, но и от распределения этих пигментов по длине волоса, которое тоже находится под контролем генов. В типичном волосе окраска распределяется зонами: кончик черный (много эумеланина), далее идет желтая зона (феомеланин), снова черная (эумеланин), а основание белое, лишенное пигментов. Такой тип окраски волоса, чаще всего встречающийся у диких животных, называется *типом агутти* (по имени южноамериканского грызуна, у которого он четче всего выражен). Каждая зона окраски контролируется своим геном, и наследственное смещение и расширение зон приводит к изменению окраски. Сердцевина волоса (мякотный слой) и наружная его часть (корковый слой) окрашиваются под управлением еще одного гена. В тех случаях, когда черная сердцевина волоса просвечивает через неокрашенную оболочку, волос кажется голубым, например, у голубых песцов. Аналогично от количества, распределения и состава меланинов в радужной оболочке зависит цвет глаз.

Фермент тирозиназа кодируется геном *C* (от англ. colour - цвет). Если в этом гене возникает мутация, вызывающая полную инактивацию фермента, то меланины из тирозина не образуются и получают животные *альбиносы*, волосяной и кожный покровы которых неокрашены, а через бесцветную радужную оболочку глаза просвечивают кровеносные сосуды, в результате чего глаза выглядят красными. Напротив, если активность тирозиназы повышена в результате мутации, усиливающей экспрессию гена *C*, то получают животные *меланисты* - темные, практически черные, например, черные пантеры. Мутации, затрагивающие гены, которые контролируют время и место экспрессии гена *C*, приводят к появлению неполных альбиносов - пегих, с окрашенными глазами и полостью рта. Разновидность гена *C*, обозначаемая как  $C^h$ , кодирует тирозиназу с неустойчивой пространственной структурой молекулы: она теряет активность при 37°C. В этом случае меланин образуется только на охлажденных участках тела: у белых горностаевых кроликов на ушах, хвостах и лапах вырастает черная шерсть, то же происходит и у сиамских кошек. Если выбрить у горностаевого кролика участок кожи на боку и прикладывать к нему лед, то шерсть на этом месте вырастет

черная. Термочувствительная тирозиназа определяет сезонную смену окраски меха и перьев у зайцев, горностаев, белых куропаток и других животных. Летом, при повышенной температуре, тирозиназа не работает. Поэтому в клетках, где идет синтез волос или перьев, меланин не накапливается, и осенью, после линьки, отрастают белые мех и перья. Зимой покровы охлаждены, тирозиназа активна, и после весенней линьки отрастают окрашенные шерсть и перья.

Тяжелая наследственная болезнь - *фенилкетонурия* - возникает в результате мутации, которая инактивирует ген, ответственный за синтез фермента фенилаланингидроксилазы, который предшествует тирозиназе в цепи синтеза меланина и превращает фенилаланин в тирозин. Образование из фенилаланина - это не единственный источник тирозина в организме, и тирозиназа находит тирозин для синтеза меланина. Однако больные



фенилкетонурией имеют бледную кожу и обесцвеченные волосы. Такой неполный альбинизм является следствием того, что приток "сырья" для синтеза меланина резко уменьшен, и, кроме того, накапливающийся избыток фенилаланина ингибирует (не полностью подавляет) активность тирозиназы. Избыток фенилаланина приводит также к накоплению его производных - кислот с фенольным ядром, которые поражают центральную нервную систему, что приводит к неизлечимому слабоумию. Такое явление, когда один ген может оказывать влияние на несколько признаков (неполный альбинизм, слабоумие и др.), называется *плеотропией*.

Конечный результат фенотипического проявления гена зависит и от условий среды и от действия других генов. Одни гены почти не проявляют изменчивости в своем фенотипическом выражении, тогда как для проявления других генов характерна высокая степень изменчивости. Изменчивость может быть обусловлена как тем, что не все особи, имеющие данный генотип, имеют соответствующий ему фенотип, так и тем, что степень проявления фенотипа различна у различных особей. *Пенетрантность гена* - это доля особей, у которых проявляется ожидаемый фенотип. *Экспрессивность гена* - это степень выраженности фенотипа у тех особей, у которых он проявился. Многие гены имеют полную пенетрантность и экспрессивность: например, нормальный ген С, ответственный за синтез активной тирозиназы. Однако люди, носители гена некоторых генетических болезней (например *хореи Гентингтона*), заболевают в разном возрасте (варьирующая экспрессивность) или не заболевают вовсе (неполная пенетрантность). Причинами варьирующей экспрессивности и неполной пенетрантности может быть влияние внешней среды (например, богатая питательная среда для микроорганизма с *ауксотрофной* мутацией) и(или) генотипа.

## ЗАКОНЫ НАСЛЕДОВАНИЯ

Законы наследования были впервые экспериментально открыты и сформулированы Г. Менделем. Первый закон Менделя - *правило единообразия первого гибридного поколения* - гласит: при скрещивании гомозиготных родителей, отличающихся друг от друга парой (одной или несколькими) *альтернативных признаков*, все первое поколение единообразно и обладает *доминирующим* признаком. Ген может существовать в альтернативных формах, что проявляется как альтернативные признаки. Альтернативные формы гена называют *аллелями*. Каждый диплоидный организм имеет два аллеля. Если оба аллеля одинаковы, то организм называют *гомозиготным*, если аллели разные - то *гетерозиготным*. Если один аллель *доминантен*, а другой *рецессивен*, то организм по своему внешнему виду (*фенотипу*) будет только доминантного типа (так что гетерозиготы не отличаются от гомозиготного доминантного родителя). Молекулярная основа доминирования заключается в том, что рецессивный ген часто мутантный и не имеет из-за этого активного белкового продукта, так что весь вклад в развитие признака принадлежит нормальному, сохранившему экспрессию аллельному гену. Хотя в опытах Менделя исследованные признаки проявляли полное доминирование, так бывает не всегда. Доминирование аллелей может быть *неполным* или совсем отсутствовать (*кодоминантность*). В случае кодоминантности гетерозиготы отличаются от гомозигот промежуточными свойствами. Например, скрещивание растений львиного зева с красными и белыми цветами дает розовые гибриды. Хотя в этом случае нет доминирования, наблюдается все та же закономерность - гибриды первого поколения ( $F_1$ ) одинаковы.

Второй закон Менделя - *правило расщепления* - гласит: во втором поколении гибридов ( $F_2$ ) происходит расщепление, при котором соотношение между числом особей с доминантным и рецессивным признаком составляет 3:1. Для того чтобы объяснить этот результат, Мендель предложил гипотезу *чистоты гамет*: каждая гамета получает по одному гену из каждой пары аллельных генов и различные гаметы комбинируются

случайным образом. Теперь известны цитологические основы чистоты гамет - это мейоз, при котором гомологичные хромосомы распределяются по гаметам. Соотношение 3:1 является *статистическим*, т.е. выполняется с достаточной точностью только для больших выборок организмов. Для выполнения этого соотношения требуется также хорошее "перемешивание" аллельных генов, которое обеспечивается случайной встречей гамет при оплодотворении.

Скрещивание, при котором организмы отличаются друг от друга двумя парами признаков, называется *дигибридным*, тремя - *тригибридным* и т.д. Третий закон Менделя - *правило независимого комбинирования генов* - гласит: гены различных аллельных пар и соответствующие им признаки передаются потомству независимо друг от друга, комбинируясь во всех возможных сочетаниях. В случае n-гибридного скрещивания получается  $3^n$  разных генотипов, которые распределены по  $2^n$  фенотипическим классам, однако по каждой паре аллельных признаков сохраняется (при полном доминировании) расщепление в соотношении 3:1. Выполнение этого закона обеспечивается тремя перемешивающими гены последовательно происходящими случайными процессами при кроссинговере - случайным обменом участками между гомологичными хромосомами в пахитене Профазы I мейоза, случайным расхождением гомологичных хромосом по дочерним клеткам, случайной встречей гамет при оплодотворении. Из-за одного только случайного распределения гомологичных хромосом каждый человеческий организм способен образовать  $2^{23} \sim 8.6710^6$  генетически различных гамет. Кроссинговер и случайная встреча гамет неизмеримо увеличивают разнообразие генетических комбинаций. Комбинирование родительских генов в потомстве является разновидностью наследственной изменчивости, которая называется *комбинативная изменчивость*.

Однако закон независимого комбинирования генов достаточно хорошо выполняется только для тех пар признаков, гены которых находятся в негомологичных хромосомах или в гомологичных хромосомах, но на большом удалении друг от друга, так что кроссинговер между ними происходит очень часто. Если гены находятся рядом в одной хромосоме, то разделяющий их кроссинговер будет редким явлением, и такие гены будут, как правило, наследоваться совместно. Это явление получило название *сцепленного наследования генов* и подчиняется закону Моргана: гены, локализованные в одной хромосоме, наследуются сцепленно, причем сила сцепления зависит от расстояния между генами. Если в трех парах генов определить частоту кроссинговера в %, то частота кроссинговера между какими-либо двумя из них, например, А и

С, близка к сумме или разности величины кроссинговера в паре А и В и в паре В и С, т.е.  $AC\% = AB\% + BC\%$  или  $AC\% = AB\% - BC\%$ . Эта закономерность находится в полном соответствии с обычной геометрической зависимостью в расстояниях между точками на прямой линии и явилась первым доказательством линейной последовательности расположения генов в хромосоме. Частота кроссинговера может достигать 50%, но никогда не превышает этой величины, т.к. при больших расстояниях между генами происходит дополнительный обмен участками, т.е. двойной, тройной и т.д. кроссинговер. При этом часть первоначальных перекрестов остается неучтенной, что приводит к общему снижению процента кроссинговера. Расстояния между генами, найденные как частоты кроссинговера, послужили основой для составления первых генетических карт организмов.

Х-хромосома намного длиннее, чем Y-хромосома, и содержит некоторые гены, которых нет в Y-хромосоме, в том числе и гены, кодирующие не связанные с проявлением пола белки. Такими генами определяются признаки, сцепленные с полом, и они могут передаваться потомству только с X-хромосомой. Гены, расположенные в половых хромосомах человека, можно разделить на три группы (рис. 166): 1) гены, расположенные в том участке, который является одинаковым у X- и Y-хромосом и проявляющие лишь частичное сцепление с полом (нарушаемое кроссинговером); 2) гены, расположенные в

участке X-хромосомы, для которого нет гомологичного участка в Y-хромосоме; к таким генам относятся рецессивные аллели, вызывающие, в частности, дальтонизм и гемофилию и полностью сцепленные с полом; 3) гены, расположенные в участке Y-хромосомы, для которого нет гомологичного участка в X-хромосоме; такие гены называются *голландрическими* (порожденными Y-хромосомой), их проявление ограничено только мужским полом, и число их у человека очень невелико (всего 5 - рыбка кожа, перепончатые пальцы, повышенное количество волос на ушах и т.д.). Для признаков, полностью сцепленных с полом, не выполняются законы Менделя. Помимо признаков, определяемых генами половых хромосом, т.е. признаков, *определяемых полом*, есть еще признаки, *зависимые от пола*. Они определяются генами аутосом, но экспрессия таких генов зависит от концентрации половых гормонов в организме. Следовательно, проявление зависимых от пола признаков (в отличие от определяемых полом признаков) можно изменить изменяя баланс мужских и женских гормонов в организме.

Правила расщепления признаков нарушаются, если происходит взаимодействие между неаллельными генами. К таким взаимодействиям относятся *эпистаз*, *комплементарность* и *полимерия*.

*Эпистаз* - это взаимодействие неаллельных генов, при котором один из генов подавляет проявление другого локуса. Эпистаз аналогичен доминированию, так как в обоих случаях один ген подавляет проявление другого: в одном локусе при доминировании, в разных локусах при эпистазе. Классическим примером эпистаза является наследование окраски перьев у кур: ген I проявляет эпистаз по отношению к гену окраски C. Особи, несущие доминантный аллель I, будут иметь белое оперение даже в том случае, если они также несут доминантный аллель C. Таким образом, причиной белой окраски оперения может являться наличие либо рецессивного гена окраски c в гомозиготном состоянии (генотип cc), либо доминантного аллеля I (генотип II или Ii) эпистатического локуса. Куры породы Леггорн имеют белое оперение, поскольку их генотип - IIcc. Куры породы Виандот имеют белое оперение, так как их генотип - iicc. Потомки F<sub>1</sub> от скрещивания Леггорн&Виандот имеют генотип IiCc и такое же белое оперение, как куры Виандот. Однако потомство F<sub>2</sub> состоит из белых и цветных особей в соотношении 13:3.

*Комплементарность* - это взаимодействие неаллельных генов, при котором для фенотипического проявления признака необходимо одновременное присутствие доминантных аллелей всех этих локусов. Классическим примером комплементарного действия генов является появление окраски венчика цветка душистого горошка. Пурпурный цвет венчика у него обусловлен действием двух доминантных генов одновременно. Присутствие в генотипе только одного доминантного гена окраски, например AAbb или aaBB, не вызывает синтеза пигмента, и растения с таким генотипом имеют белые цветки. При скрещивании двух таких растений возникает потомство с генотипом AaBb, в котором представлены оба доминантных гена. Совместное действие этих генов вызывает синтез пигмента, и венчик таких растений окрашен в пурпурный цвет. При самоопылении этих растений потомство F<sub>2</sub> состоит из растений с пурпурными и белыми цветками в соотношении 9:7.

*Полимерия* - это взаимодействие нескольких однотипных неаллельных генов, каждый из которых действует на формирование одного и того же признака и вызывает примерно одинаковые изменения в интенсивности проявления этого признака. Чем больше таких (*полимерных*) генов

содержит организм в доминантном состоянии, тем сильнее выражен признак. Простейшим примером полимерии может служить окраска зерна у некоторых сортов пшеницы, контролируемая двумя генами. Наиболее темную окраску зерна будут иметь растения с генотипом A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>, у растений с тремя доминантными генами окраска зерна будет менее интенсивной, еще светлее будет зерно у растений с двумя доминантными генами, совсем слабую окраску зерна

будут иметь растения, у которых имеется только один доминантный ген, и, наконец, растения с генотипом  $a_1a_1a_2a_2$  будут иметь неокрашенные зерна. Таким образом, по интенсивности этого признака генотипы растений можно расположить в ряд  $A_1A_1A_2A_2 > A_1A_1A_2a_2 \sim A_1a_1A_2A_2 > A_1a_1A_2a_2 \sim A_1A_1a_2a_2 \sim a_1a_1A_2A_2 > A_1a_1a_2a_2 \sim a_1a_1A_2a_2 > a_1a_1a_2a_2$ , так что можно выделить 5 фенотипических классов с расщеплением 1:4:6:4:1 или более грубо - окрашенные:неокрашенные = 15:1. У других сортов пшеницы наблюдается расщепление признака окрашенные:неокрашенные зерна в соотношении 63:1. У таких сортов окраска контролируется тремя полимерными генами и у них можно выделить 7 фенотипических классов в соотношении 1:6:15:20:15:6:1. Полимерная наследственность характерна для *количественных признаков*, т.е. признаков, которые определяются обычно в мерах длины, массы и т.п. (например, длина колоса или початка, содержание сахара в свекле или витамина в плодах, масса и размеры организмов, молочность скота, яйценоскость кур и т.п.). В общем случае, когда имеется  $n$  аллелей полимерных генов, наблюдается  $2n+1$  фенотипических классов в *биномиальном соотношении*  $C^0:C^1:C^2:\dots:C^i:\dots:C^{2n}$ , где  $C^i = 2n(2n-1)(2n-i+1)/i!$ , а  $C^0$  считается равным 1.

Гены находятся не только в ядре, но и в пластидном и митохондриальном геномах. При половом размножении пластиды и митохондрии содержатся в яйцеклетке и обычно не переносятся сперматозоидом. Следовательно, организм, начинающий развиваться из зиготы, имеет геномы органелл, полученные только от материнского организма. В результате признаки, которых определяются внеядерными генами, не подчиняются законам расщепления Менделя.

Примером пластидной наследственности может служить наследование пестролистности у декоративного растения ночной красавицы (*Mirabilis jalapa*). У одной из разновидностей этого растения на листьях имеются случайно разбросанные белые пятна. Если эту разновидность используют как мужское растение для скрещивания с разновидностью с зелеными листьями в качестве женского родителя, то все потомство имеет целиком зеленые листья. Но в тех случаях, когда для скрещиваний пестролистная разновидность используется в качестве материнского растения, в потомстве наблюдается расщепление: одни гибридные растения имеют целиком зеленые листья, у других растений листья пестрые и у третьих листья целиком белые. Белые растения - *альбинос* - погибают на ранних стадиях развития. У пестролистных растений часть пластид в результате мутации их генома полностью потеряли способность образовывать хлорофилл и остаются белыми. Так как при делении клеток пластиды распределяются между дочерними клетками независимо друг от друга, то дочерние клетки получают различные количества зеленых и белых пластид. После ряда делений неизбежно появляются клетки, совершенно не имеющие зеленых пластид и остающиеся белыми. При делении белых клеток они дают начало только белым клеткам. Их скопления образуют на листьях белые пятна (мозаичность), причем размер белого пятна зависит от того, сколько клеток образуется из исходной белой клетки. Расщепление в потомстве является следствием того, что при половом размножении пластиды имеются только в яйцеклетке. Яйцеклетки, содержащие только пластиды, способные зеленеть на свету, образуют целиком зеленые растения. Яйцеклетки, содержащие смесь зеленых и белых (мутантных) пластид, дают начало пестролистным растениям, и, наконец, яйцеклетки, содержащие только мутантные пластиды, производят растения-альбиносы.

Задача 48. У леопарда активность тирозиназы контролируется только одним геном, и черная окраска доминирует над пятнистой. Какова вероятность, что в потомстве двух гетерозиготных леопардов из четырех детенышей двое будут черными, а двое пятнистыми?

Задача 49. Частота рекомбинации между генами А и В - 6.3%. В какой последовательности расположены гены А, В и С в хромосоме, если при дальнейших исследованиях выяснилось, что частота рекомбинации между генами А и С - 8.1%, а В и С - 1.8%?

Задача 50. У родителей с нормальным зрением родился сын-дальтоник. Может ли у него родиться сестра-дальтоник? Может ли у матери, страдающей дальтонизмом, и отца с нормальным зрением родиться сын с нормальным зрением? А дочь?

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПРИЗНАКИ

Одной из особенностей количественных признаков является то, что распределение их численных значений представляет собой колоколообразную кривую, называемую *нормальным распределением*, или *кривой Гаусса*:  $f(x) = (2\pi s^2)^{-1/2} \exp(-0.5(x-m)^2/s^2)$ , где  $x$  - величина признака,  $f(x)$  - частота встречаемости особей с величиной признака, равной  $x$ ,  $m$  - средняя величина признака,  $s^2$  - *дисперсия* величины признака, служащая мерой разброса величины признака относительно его среднего значения. Возникновение такой зависимости для количественных признаков продемонстрировано на рис. 167. Она является прямым следствием биномиального распределения при расщеплении по фенотипу и определяется полигенным наследованием и "размывающим" действием окружающей среды (*средовая изменчивость*). Кривая Гаусса является идеальным распределением признака, однако в эксперименте всегда приходится иметь дело лишь со случайной выборкой из этого распределения. Поэтому параметры нормального распределения не могут быть точно определены, но могут быть *оценены* из результатов эксперимента. Оценкой средней величины признака служит *выборочное среднее*, а оценкой дисперсии - *выборочная дисперсия*, определяемые как

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \text{ и } s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}.$$

Вопрос, в какой степени данный признак определяется генотипом, а в какой внешней средой, является некорректным, т. к. развитие любого признака полностью определяется и генотипом, и условиями внешней среды. Вопрос о сравнительной роли наследственности и среды (проблема "природы" и "воспитания") можно правильно сформулировать следующим образом: в какой степени изменчивость между особями по данному количественному признаку обусловлена *генетической изменчивостью* (т.е. генетическими различиями между особями), и в какой степени она обусловлена *средовой изменчивостью* (т.е. различиями во внешней среде)? Часть фенотипической изменчивости признака, обусловленная генетическими различиями, измеряется *наследуемостью* этого признака, которая определяется как  $H = V_G / (V_G + V_E)$ , где  $V_G$  - доля фенотипической изменчивости, обусловленная генетическими различиями между особями, а  $V_E$  - доля фенотипической изменчивости, обусловленная различиями в условиях внешней среды, в которой развивались особи.

Наследуемость можно оценить разными методами. Измеряя величину признака генетически идентичных особей, например, в потомстве  $F_1$  двух чистых линий, можно оценить  $V_E$  как выборочную дисперсию данного признака. Общую же изменчивость ( $V_G + V_E$ ) можно оценить как выборочную дисперсию этого признака в  $F_2$ , когда к действию среды добавляется расщепление по генотипу. Отношение этих двух дисперсий дает оценку наследуемости данного признака. Оценка наследуемости *методом массовой селекции* показана на рис. 168. Взаимодействия между генами оказывают влияние на оценки наследуемости, поскольку эти взаимодействия неаддитивны. Кроме того, оценки наследуемости справедливы только для тех определенных условий среды, в которых они были получены. В других условиях среды они могут быть совершенно иными.

Задача 51. Средний вес 6-недельных мышей в лабораторной популяции составляет 21.5 г. Два типа мышей используются для получения следующего потомства: 1) мыши с большим весом (средний вес - 27.5 г) и 2) мыши с малым весом (средний вес - 15.5 г). Средний вес потомства в возрасте 6 недель равен в опыте 1) 22.7 г, а в опыте 2) - 18.1 г. Рассчитайте наследуемость веса в каждом из экспериментов. Почему наследуемость в двух опытах получается разная?

## ГЕНЕТИКА ПОПУЛЯЦИЙ

*Популяция* - это совокупность свободно скрещивающихся особей

одного вида, которая длительно существует на обособленной территории относительно изолированно от других совокупностей особей того же вида. Совокупность генов популяции в данный период времени называется *генофондом популяции*. В отличие от генома индивидуального диплоидного организма, в котором может быть только два аллельных гена, в генотипе популяции может быть больше чем два аллельных генов. Количество каждого вида генов в популяции описывается величиной, аналогичной концентрации для молекул, называемой *частотой гена*, которая определяется как отношение числа генов данного вида к общему числу всех аллельных для этого вида генов в генофонде популяции. Частоты генов в генофонде постоянно меняются под действием мутаций, естественного отбора, миграции организмов из одной популяции в другую и из-за случайных причин. Однако в достаточно большой популяции (когда случайными изменениями можно пренебречь), при отсутствии мутаций, естественного отбора и миграций, а также при свободном скрещивании особей и отсутствие предпочтений в спаривании

особей при половом размножении частоты генов, а следовательно, и генотипов остаются постоянными из поколения в поколение. Это явление называется *законом генетического равновесия в популяциях Харди-Вайнберга*.

Предположим, что в популяции есть только два вида аллельных генов А и а, и что в данном поколении популяции частоты этих генов в генофонде составляют р и q соответственно ( $p + q = 1$ ). Тогда в соответствии с законом Харди-Вайнберга эти частоты и частоты генотипов AA, Aa и aa, которые равны  $p^2$ ,  $2pq$  и  $q^2$  соответственно, будут оставаться постоянными во всех последующих поколениях. Популяция, подчиняющаяся закону Харди-Вайнберга, является идеализированной подобно модели идеального газа. Однако есть случаи, когда этот закон достаточно хорошо выполняется на практике. Например, при наследовании групп крови системы АВ0, о которой подробно будет рассказано дальше.

Популяция, подчиняющаяся закону Харди-Вайнберга, - это статическая популяция. Рассмотрим теперь динамику популяции, на которую постоянно действуют факторы, изменяющие частоты генов в генофонде. Практически всегда природные популяции испытывают давление естественного отбора, который действует через *приспособленность* организмов. Приспособленность данного генотипа ( $W_G$ ) можно определить как число зигот, продуцируемых в данном поколении к числу зигот предыдущего поколения.  $W_G$  складывается из *жизнеспособности генотипа* ( $v_G$ , вероятность завершения онтогенеза зиготой с генотипом G), *половой активности* ( $r_G$ , вероятность скрещивания особей, имеющих генотип G) и *плодовитости* ( $f_G$ , среднее число зигот, продуцируемое особями с генотипом G):  $W_G = v_G r_G f_G$ . Например, если в данном поколении было 1000 зигот генотипа G, из них 45% прошли ранние эмбриональные фазы, 1/3 от оставшихся достигли половой зрелости, 2/3 от оставшихся вступили в скрещивания и произвели в среднем по 15 зигот, то  $W_G =$

1.5. Поскольку реальные значения приспособленности генотипов найти трудно, то обычно используют относительные величины приспособленности, принимая приспособленность одного из генотипов за 1.

Рассмотрим популяцию с двумя аллельными генами А и а. Примем за 1 приспособленность гетерозигот:  $W_{Aa} = 1$ . Тогда  $W_{AA} = 1-s$  и  $W_{aa} = 1-t$ , где s и t - *относительные коэффициенты отбора* (могут быть как положительными, так и отрицательными). Частоты генотипов AA, Aa и aa, которые в данном поколении были  $p^2$ ,  $2pq$  и  $q^2$  соответственно, в

следующем поколении (после отбора) будут составлять  $p^2 W_{AA}$ ,  $2pq W_{Aa}$  и  $q^2 W_{aa}$ . Величина  $W_M = p^2 W_{AA} + 2pq W_{Aa} + q^2 W_{aa} = 1 - (sp^2 + tq^2)$  называется *средняя приспособленность популяции*. Новые частоты генов А и а выразятся как  $p' = (p^2 W_{AA} + pq W_{Aa}) / W_M$  и  $q' = (pq W_{Aa} + q^2 W_{aa}) / W_M$ , откуда

$$p' = p(1-sp)/(1-(sp^2 + tq^2)).$$

Рекуррентное соотношение  $p' = F(p)$ , связывающее частоту гена в данном поколении с частотой этого гена в предыдущем уравнении, называется *уравнением динамики популяции*. Изменяясь из поколения в поколение, частота  $p$  в конце концов может стабилизироваться и дальше оставаться постоянной. Такая частота ( $p^*$ ) называется *стационарной частотой* и ее можно найти из уравнения  $p^* = F(p^*)$ . Однако найденная таким образом стационарная частота может быть устойчивой и неустойчивой. Устойчивая стационарная частота характеризуется тем, что после небольшого отклонения ее от величины  $p^*$  она возвращается к этой же величине в последующих поколениях. Напротив, в случае неустойчивой стационарной частоты даже незначительное отклонение от  $p^*$  в последующих поколениях продолжает увеличиваться, и частота  $p$  достигает нового стационарного значения. Естественно, что в природе реализуются только устойчивые стационарные частоты. Условие устойчивости находим разложив  $F(p)$  в ряд Тейлора в окрестности точки  $p^*$ :  $F(p) \sim F(p^*) + F'(p^*)(p-p^*) = p^* + F'(p^*)(p-p^*)$ . Частота гена в следующем поколении будет:  $p' = F(p) \sim p^* + F'(p^*)(p-p^*)$ , откуда  $p' - p^* \sim F'(p^*)(p-p^*)$ . Точка будет стационарной, когда отклонение  $p' - p^*$  будет меньше, чем отклонение  $p - p^*$ , т.е. при условии  $2F'(p^*) < 1$ .

Возвращаясь к уравнению динамики популяции с отбором  $p' = p(1-sp)/(1-(sp^2 + tq^2))$ , находим три стационарные частоты: 1)  $p^* = 0$ , т.е. полное вытеснение гена  $A$  геном  $a$ ; этот процесс устойчив при  $t < 0$ , т.е. когда приспособленность генотипа  $aa$  выше приспособленности генотипа  $Aa$ ; 2)  $p^* = 1$ , т.е. полное вытеснение гена  $a$  геном  $A$ ; этот процесс устойчив при  $s < 0$ , т.е. когда приспособленность генотипа  $AA$  выше приспособленности генотипа  $Aa$ ; 3)  $p^* = t/(s+t)$ , случай *сбалансированного полиморфизма*, когда гены  $A$  и  $a$  сосуществуют в постоянном соотношении; этот полиморфизм устойчив, когда  $s > 0$  и  $t > 0$ , т.е. когда приспособленность гетерозигот выше, чем обоих гомозигот.

Если в популяции происходит мутация, например,  $A \rightarrow a$  с частотой  $m$ , то если частота гена  $A$  в данном поколении равна  $p$ , через  $n$  поколений она будет составлять  $p_n = p(1-m)^n$ . Частоты мутаций, как правило, лежат в пределах  $10^{-6}$  -  $10^{-4}$ . Мутации служат материалом для отбора, поэтому представляет интерес рассмотреть уравнение динамики популяции с мутацией и отбором по этой мутации:

$$p' = p(1-m)(1-sp)/(1-(sp^2 + tq^2)).$$

Если мутация летальная:  $W_{AA} = W_{Aa} = 1$  и  $W_{aa} = 0$ , то  $s = 0$  и  $t = 1$ . В этом случае уравнение динамики популяции упрощается:  $p' = p(1-m)/(1-q^2) = (1-m)/(1+q)$  и имеет единственную устойчивую стационарную частоту  $1-p^* = q^* = m^{1/2}$ . Это показывает, что даже такая вредная мутация, как летальная, не может быть полностью вытеснена отбором и продолжает сохраняться в популяции в гетерозиготном состоянии. Если же мутация не летальная, а просто вредная - понижающая приспособленность генотипа  $aa$ :  $W_{AA} = W_{Aa} = 1$ ,  $W_{aa} = 1-t$ ,  $0 < t < 1$ , то  $q^* = (m/t)^{1/2}$ . Аналогичным образом можно получить и исследовать уравнения динамики популяции с миграцией, с предпочтением при спаривании и с другими различными комбинациями факторов, изменяющими частоты генов в генофонде.

Задача 52. Во время отела в стаде коров на ферме родилось 3200 телят и среди них оказалось 2 слепых теленка. Известно, что слепота в этом случае вызвана мутантным рецессивным геном  $a$ . Предполагая, что к стаду применим закон Харди-Вайнберга, найдите число скрытых носителей гена  $a$  среди новорожденных телят.

Задача 53. В популяции домовых мышей особи с разным генотипом различаются по приспособленности:

	AA	Aa	aa
жизнеспособность	90%	100%	70%
половая активность	100%	100%	80%
плодовитость	60%	80%	100%

Рассчитайте стационарные частоты генов  $A$  и  $a$  в такой популяции.



Задача 54. Из большой популяции, частоты генов А и а в которой составляют  $p' = 0.6$  и  $q' = 0.4$  соответственно, идет миграция особей в малую популяцию, численность которой поддерживается постоянной из поколения в поколение на уровне  $N = 100$ . В каждом поколении из большой популяции в малую перебегают в среднем 5 особей. Сколько поколений понадобится, чтобы сравнялись частоты генов А и а в обеих популяциях, если в данный момент частоты генов А и а в малой популяции составляют  $p = 0.4$  и  $q = 0.6$  соответственно?

### ГЕНЕТИКА ИНДИВИДУАЛЬНЫХ РАЗЛИЧИЙ

В гликокаликсе эритроцитов присутствуют гликопротеины, олигосахаридная часть которых различается у одних организмов одного вида и одинакова у других. Эритроциты, несущие разные гликопротеины, по-разному взаимодействуют друг с другом и с другими клетками крови, поэтому на основании этих различий организмы могут быть разделены на группы. У человека известно более 9 систем групп крови, но для переливания крови важны только две из них - АВ0- и Rh-системы.

*АВ0-система* определяется сочетанием трех аллельных генов -  $I^A$ ,  $I^B$  и  $I^0$ . Их сочетание дает 4 фенотипа - 4 группы крови. Люди с фенотипом А (II группа, генотипы  $I^A I^A$  и  $I^A I^0$ ) имеют гликопротеин А на поверхности эритроцитов и белок *агглютинин* b в плазме крови. Люди с фенотипом В (III группа, генотипы  $I^B I^B$  и  $I^B I^0$ ) имеют гликопротеин В на поверхности эритроцитов и белок агглютинин а в плазме крови. Фенотип АВ (IV группа, генотип  $I^A I^B$ ) определяет присутствие в эритроцитах гликопротеинов А и В и отсутствие в плазме крови агглютининов а и b. Фенотип 0 (I группа, генотип  $I^0 I^0$ ) связан с присутствием в плазме крови обоих агглютининов и отсутствием в эритроцитах гликопротеинов А и В. Агглютинины являются *антителами (иммуноглобулинами)*, которые специфически взаимодействуют (связываются) с гликопротеинами на поверхности эритроцитов: агглютинин а с гликопротеином А, а b - с В. Связывание агглютининов с гликопротеинами приводит к склеиванию эритроцитов друг с другом в нерастворимые нефункционирующие сгустки (сворачивание крови). Поэтому при переливании крови нельзя допускать, чтобы эритроциты донора встретились со способными склеивать их агглютинами реципиента. В результате получаем следующую таблицу совместимости групп крови при переливании:

реципиент \ донор	донор			
	I(0)	II(A)	III(B)	IV(A и B)
I (a и b) +	-	-	-	-
II (b)	+	+	-	-
III (a)	+	-	+	-
IV (0)	+	+	+	+

В Европе примерно 40% населения имеет I группу, 40% - II груп-

пу, 15% - III группу и лишь 5% - IV группу. Это соотношение сохраняется на протяжении многих поколений и служит примером выполнения закона Харди-Вайнберга.

Другой важной системой групп крови является *резус-система (Rh-система)*, ответственная за наличие на поверхности эритроцитов резус-фактора (был открыт при введении эритроцитов макак резусов кроликам). Синтез резус-фактора контролируется тремя тесно сцепленными парами генов - С, D и Е. Резусотрицательные люди (не имеющие этого белка) имеют генотип *сde*. Для простоты рассмотрим случай, когда супруги отличаются между собой только по гену D. В случае брака резусотрицательной женщины, обладающей генотипом *dd*, с мужчиной, имеющим генотип *DD*, их ребенок будет иметь генотип *Dd* и будет резусположительным. В конце беременности эритроциты плода, несущие резус-фактор, проникают в кровь матери и вызывают в ней образование антител

против резус-фактора. Так как это происходит в самом конце беременности, то значительных повреждений у ребенка не возникает, и он рождается нормальным. Но при следующей беременности уже накопившиеся во время первой беременности антитела проникают в кровь плода и вызывают разрушение эритроцитов, имеющих резус-фактор. Вследствие этого у второго ребенка развивается гемолитическая анемия. При последующих беременностях количество антител против резус-фактора еще больше увеличивается, и это приводит к выкидышам. Если же такой женщине было сделано переливание резусположительной крови еще до первой беременности, то она окажется совершенно бездетной. Среди населения Европы около 15% людей имеют резусотрицательную кровь и 85% - резусположительную.

Не только кровь, но и все выделения человеческого организма - слезы, слюна, пот, желчь, материнское молоко, сперма - имеют групповые свойства, однако не у всех. У большинства людей выделения имеют групповые свойства (*выделители*), но примерно у 14% людей таких свойств нет (*невыделители*). Выделения каждого человека-выделителя относятся к той же группе, что и его кровь. Однако ткани тела обладают более сложной системой опознавания, чем кровь. При любых пересадках тканей и органов от одного организма к другому всегда возникает иммунологическая реакция отторжения, называемая *тканевой несовместимостью*. Она вызывается присутствием на поверхности всех клеток тела гликопротеинов тканевой несовместимости и у человека называется *HLA-системой* (от англ. human leucocyte antigens). В

систему HLA входят белки тканевой совместимости трех классов: белки 1-го класса кодируются тремя локусами - A, B и C; белки 2-го класса тоже кодируются тремя локусами - DR, DP и DQ; гены тканевой совместимости 3-го класса кодируют белки системы комплемента и некоторые другие биологические продукты. Если иметь в виду только белки HLA 1-го и 2-го класса, то их уже открыто более 100. Это означает, что каждый человек характеризуется своим индивидуальным набором из 12 белков HLA (по 6 локусов на каждой из хромосом 6-й пары), и число возможных наборов значительно превосходит число людей, когда-либо живших на Земле.

Индивидуальный набор белков HLA является причиной того, что любая трансплантируемая ткань узнается иммунной системой как чужеродная, и против нее начинается реакция отторжения. Исключение составляют только однояйцевые близнецы, имеющие идентичный набор HLA белков. Успешнее заканчиваются также пересадки тканей между близкими родственниками, имеющими много общих HLA-белков. Разные ткани имеют разную концентрацию гликопротеинов HLA на поверхности. Мало их на поверхности клеток роговицы, хряща и костей, кроме того в этих тканях клетки окружены толстым слоем межклеточного вещества, которое затрудняет клеткам иммунной системы доступ к гликокаликсу и опознавание чужеродных HLA белков. Поэтому эти ткани приживляются хорошо. "Алфавит" HLA-белков един для всего человечества, но имеются характерные расовые различия, проявляющиеся как разная частота встречаемости разных белков HLA. Благодаря исключительному полиморфизму и неоднородности географического распространения белки HLA-системы очень полезны для антропологических исследований. Благодаря им, например, удалось достоверно установить полинезийское происхождение жителей острова Пасхи. Существуют также надежные корреляции между встречаемостью определенных белков HLA и предрасположенностью или устойчивостью к разным заболеваниям. Это позволяет рассматривать разные гены HLA-системы как *гены риска* и *гены защиты* по отношению к конкретному заболеванию.

Задача 55. Может ли у матери, имеющей II группу крови, и отца, имеющего III группу крови, родиться ребенок с I группой крови?

Задача 56. Проверьте, действительно ли наблюдаемое в Европе соотношение групп крови АВ0-системы соответствует закону Харди-Вайнберга, и найдите стационарные частоты генов этой системы.

## КРАТКИЕ ВЫВОДЫ

Генетические механизмы транскрипции, трансляции, репликации и расхождения хромосом в митозе и мейозе работают с большой точностью и надежностью, но не абсолютной. В результате некоторого "допуска" этих механизмов возникает мутационная изменчивость. Мутационная и комбинативная наследственная изменчивость - это источник разнообразия, которое служит материалом для эволюционного отбора новых, наиболее приспособленных организмов. В результате влияния гена на формирование более чем одного признака (плейотропии) возникает еще коррелятивная наследственная изменчивость, которая выступает как условие ограничения при формировании многообразия организмов с разными признаками (например, длинноногие животные всегда имеют длинную шею и т.д.).

Случайный характер кроссинговера, расхождения хромосом по гаметам, встречи гамет при оплодотворении и влияния среды на экспрессивность и пенетрантность генов предопределяет применение статистических методов при описании генетических процессов. Для описания генетических процессов в популяциях используется частота генов в генофонде, аналогичная концентрации молекул в растворе, но изменения частот генов рассматриваются через дискретные промежутки времени (поколения).

Комбинаторный принцип увеличения многообразия используется также при детерминации генетических различий между организмами - различные сочетания из единого ограниченного набора белков тканевой совместимости делают каждый организм индивидуально опознаваемым на общем фоне одинакового молекулярного строения подобно номерному знаку для автомобилей одной марки.

Рис. 165. Растения и хромосомные наборы паслена черного с 36 (А), 72 (Б), 108 (В) и 144 (Г) хромосомами.

Рис. 166. Расположение генов, ответственных за различные наследственные аномалии и болезни, в X- (слева) и Y-хромосоме (справа) у человека.

Рис. 167. Возникновение нормального распределения величины количественного признака.

Рис. 168. Оценка наследуемости методом массовой селекции. D - селекционный дифференциал, G - селекционный сдвиг.

Лекция 13. РАЗНООБРАЗИЕ ОРГАНИЗМОВ И ЭВОЛЮЦИЯ (часть I) *Эволюция клетки - строение и разнообразие бактерий - строение и разнообразие грибов - эволюция растений - краткие выводы*

### ЭВОЛЮЦИЯ КЛЕТКИ

Считается, что все организмы и все составляющие клетки произошли эволюционным путем от общей предковой клетки. Если через нагретую смесь воды и газов, таких как  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_3$  и  $\text{H}_2$ , пропускать электрический разряд, они реагируют с образованием малых органических молекул, среди которых четыре основных типа биомолекул - аминокислоты, нуклеотиды, углеводы и жирные кислоты. Условия, существовавшие на Земле в первый млрд. лет ее истории, являются предметом спора. С точки зрения наиболее современной теории - *глобальной тектоники плит*, или *неомобилизма* - происхождение первых органических молекул связано с активностью *рифтовых зон* - трещин, через которые недра земной коры и поверхность планеты сообщаются друг с другом. Такие рифтовые зоны являются местом постоянной вулканической активности и предполагают, что через них происходила дегазация мантийного вещества Земли (выделение паров воды,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_3$  и  $\text{H}_2$ ), тогда как в первичной атмосфере планеты водорода и метана было ничтожно мало, а аммиака не было вообще. Частицы вулканического пепла во время извержения постоянно трутся друг о друга, происходит их сильная электризация и отсюда частые вспышки разрядов. Осевший пепел служил защитой от жесткого ультрафиолетового излучения (озоновый слой тогда еще отсутствовал), и под ним могла накапливаться первичная органика. Пеплы в изобилии содержат активные катализаторы: свободные хром, железо, кобальт, никель, свинец, платину. Очень пористый роголит первозданного грунта поглощал значительную часть конденсирующейся из пара воды. Мелкие поры роголита придают ему свойства губки, в которой создавалась высокая концентрация аминокислот, нуклеотидов, жироподобных веществ и других молекул нарождающейся жизни. Таким образом, рифтовые зоны, покрывавшие всю поверхность Земли, могли служить постоянно действующими реакторами по производству первичной органики.

Простые органические молекулы, такие как аминокислоты, или нуклеотиды, могут ассоциировать с образованием больших полимеров. Если полимер образовался, он способен влиять на синтез других полимеров. В особенности это относится к полинуклеотидам, которые способны служить матрицей в реакции полимеризации и, таким образом, направлять свой собственный синтез. Специфическое спаривание элементарных нуклеотидов сыграло, видимо, решающую роль в возникновении жизни. Поскольку и время для синтеза, и химически активные предшественники нуклеотидов имелись в изобилии, вполне возможно, что в пребиотических условиях на Земле возникли медленно реплицирующиеся системы полинуклеотидов. При благоприятных условиях полинуклеотид может размножаться, поскольку каждая исходная молекула используется в качестве матрицы для образования дочерних копий. Однако в процессе копирования, особенно в первобытных условиях, неизбежно происходит много ошибок. Начнут размножаться новые и неточные копии оригинала, так что последовательность нуклеотидов будет изменяться. Поскольку трехмерная укладка полинуклеотида влияет на его стабильность и на способность реплицироваться, то все молекулы в репликативной цепи будут размножаться с разным успехом. Некоторые будут слишком длинны или слишком плотно свернутыми, чтобы служить хорошими матрицами. Другие, напротив, будут нестабильными. Действительно, в лабораторных опытах было показано, что система реплицирующихся молекул подвержена *естественному отбору*, и что в конце концов в зависимости от конкретных условий начнет преобладать та или иная наиболее конкурентноспособная последовательность нуклеотидов.

Возможно, что 3.5 - 4 млрд. лет назад самореплицирующиеся системы полинуклеотидов (вероятно, РНК) положили начало эволюционному процессу. Хотя структура полинуклеотидов хорошо приспособлена для хранения и репликации

информации, эти молекулы недостаточно разнообразны для обеспечения всех структурных и функциональных потребностей клетки. Напротив, белки состоят из многих различных аминокислот, и разнообразие их пространственной структуры делает их весьма подходящими для выполнения широкого круга структурных и функциональных задач. Некоторые случайно возникшие полипептиды могли облегчать репликацию молекул РНК как катализаторы. Для реплицирующихся систем особенно полезными должны были оказаться те из них, которые могли быть воспроизведены на молекулах РНК как на матрицах за счет пространственных соответствий и слабых нековалентных взаимодействий между нуклеотидами и аминокислотами (подобные соответствия действительно существуют). Таким образом, мог возникнуть прототип генетического кода. Получившиеся автокаталитические системы (рис. 169) должны были приобрести большое преимущество в эволюционной борьбе за существование.

Белки, синтезируемые под контролем определенного типа РНК, не

могли бы облегчить репликацию именно этих молекул РНК, если бы не удерживались поблизости от них. Как было рассказано в лекции, посвященной мембранам, фосфолипиды в водном растворе самопроизвольно могут образовывать структуры типа липосомы. Считается, что первая клетка образовалась, когда такая случайно возникшая липосома заключила в себе самореплицирующуюся смесь молекул РНК и белка. Это обеспечило преимущественное использование этих белков только для внутренних нужд (рис. 170). Признаком, по которому теперь начался отбор, стала не только собственная структура РНК, но и свойства кодируемых ей белков. Таким образом, нуклеотидная последовательность молекул РНК стала проявляться в свойствах клетки как целого. На какой-то более поздней стадии эволюционного процесса ДНК, как более устойчивая и более подходящая для хранения генетической информации, заменила РНК для выполнения этой функции.

Дальнейшая эволюция первых клеток - *прогенотов* - заключалась в развитии метаболических реакций. Сначала, когда первичной органики было много, в метаболических реакциях не было нужды. Но по мере истощения этих естественных ресурсов большое преимущество при отборе должны были получать организмы, вырабатывающие ферменты для образования органических молекул. Наличный комплект клеточных ферментов постепенно увеличивался, и в результате возникли метаболические пути современных организмов. Самые ранние стадии метаболизма развились для того, чтобы восполнить недостаток органических молекул, образовавшихся еще в пребиотических условиях. Когда запас таких соединений полностью исчерпался, преимущество при отборе должны были приобрести организмы, способные использовать атомы углерода и азота атмосферы (в виде  $\text{CO}_2$  и  $\text{N}_2$ ). Но углекислый газ и молекулярный азот очень стабильны, хотя и имеются в изобилии. Поэтому для их превращения в метаболически полезную форму требуется большое количество энергии и значительное число сложных химических реакций. Механизмом, развившимся для использования  $\text{CO}_2$ , явился фотосинтез, в процессе которого  $\text{CO}_2$  превращается в органические соединения за счет энергии солнечного излучения. Хлорофилл, используя энергию солнечного света, отбирает электроны у слабых доноров электронов и переносит их на сильные доноры электронов, которые в свою очередь используются для восстановления  $\text{CO}_2$  или  $\text{N}_2$ . Сравнение механизмов фотосинтеза у разных современных бактерий свидетельствует о том, что одним из первых источников электронов был  $\text{H}_2\text{S}$ , метаболическим отходом которого являлась сера. Значительно позже развился куда более сложный, но в конечном счете более полезный процесс получения электронов из  $\text{H}_2\text{O}$ . В результате в качестве метаболического отхода в земной атмосфере стал накапливаться кислород.

Поскольку кислород исключительно реакционноспособен и может реагировать с большинством компонентов цитоплазмы, то для многих ранних организмов он был

токсичен, так же, как для многих современных анаэробных бактерий. Организмам снова потребовалось приспособляться к изменившимся условиям, причем при отборе выиграла те из них, кто сумел не просто нейтрализовать опасное действие кислорода, но и обратить высокую реакционную способность кислорода на пользу. Так появилось клеточное дыхание, которое в 20 раз более эффективнее, чем бескислородный гликолиз. Однако такие полезные метаболические процессы как фотосинтез и дыхание возникли не у всех организмов. Есть основания думать, что эукариотические клетки являются потомками примитивных анаэробных организмов, которые выжили, поглотив фотосинтезирующих и дышащих бактерий. Такое положение оказалось взаимовыгодным - возник *эндосимбиоз*.

Удивительное сходство генетических систем эукариотических органелл (хлоропластов и митохондрий) и прокариот доказывает эндосимбиотическую гипотезу происхождения этих органелл в процессе эволюции. Так как митохондрии животных и растений очень сходны, полагают, что событие, приведшее к возникновению этих органелл, произошло на раннем этапе эволюции эукариотической клетки еще до разделения линий животных и растений. Установлена множественность путей происхождения хлоропластов: у разных групп растений они появились в результате эндосимбиоза с несколько разными типами фотосинтезирующих бактерий. Почему продолжает существовать собственная генетическая система в митохондриях и хлоропластах, непонятно. По каким-то причинам процесс переноса генов эндосимбионтов в ядерный геном хозяина прекратился раньше, чем был полностью завершен. Происхождение трех царств современных эукариотических организмов (растения, грибы и животные) связано с развитием трех разных способов питания: наиболее примитивным *всасывающим способом* питания продолжают питаться грибы, *фотосинтетический способ* питания привел к появлению растений, а *заглатывающий способ* питания - животных. Заглатывающий способ питания - самый сложный, поэтому у животных начали развиваться механизмы движения и органы чувств для поиска пищи и приспособления для ее захвата. Их развитие сопровождалось возникновением и усложнением специальных распределительных, выделительной и дыхательной систем. В результате животные стали наиболее высокоорганизованными организмами на планете.

## СТРОЕНИЕ И РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИЙ

Бактерии находятся везде. Больше всего их в почве - от 200 млн. до 2 млрд. на 1 г почвы. В чистой родниковой воде их 100 - 200 на 1 мл, а в загрязненной стоячей - от 100 тыс. до 300 тыс. на 1 мл. В воздухе от 5 тыс. до 300 тыс. в 1 м<sup>3</sup>. На коже человека насчитывается от 85 млн. до 1 млрд. бактерий, а в ротовой полости - свыше 100 разных видов. Каждый взрослый человек выделяет ежедневно с экскрементами около 18 млрд. бактерий. Свободны от них только органы, не соединяющиеся с внешней средой (мозг, сердце, кровь, печень, мочевого пузырь и др.). В эти органы бактерии попадают только во время болезни.

Бактерии разнообразны по форме - шарообразные (кокки), вытянутые (бациллы), изогнутые (вибрионы), извитые (спириллы) и др. Дополнительные различия выявляются после окраски бактерий специальными красителями. Наиболее распространен метод окраски по Граму, предложенный им еще в 1884 г. Окраска бактерий кристаллическим фиолетовым с последующей обработкой иодом приводит к образованию комплекса красителя с иодом синего цвета. Последующая обработка спиртом смывает этот комплекс с некоторых бактерий (*грамотрицательные*), тогда как другие (*грамположительные*) бактерии удерживают комплекс на поверхности. После обесцвечивания *грамотрицательные* бактерии могут быть дополнительно окрашены фуксином в красный цвет. Дальнейшие исследования показали, что различия в окрашивании связаны с разницей в строении клеточной оболочки бактерий. У *грамположительных* бактерий клеточная стенка представляет собой многослойный пептидогликановый мешок, тогда как у *грамотрицательных* пептидогликановый мешок однослойный, но поверх него есть дополнительные наружные

слои (рис. 171). Помимо клеточной оболочки бактерии могут иметь и дополнительные покровы - капсулы (полисахаридные и полипептидные) и полисахаридные слизи.

Многие бактерии способны двигаться с помощью жгутиков. Однако жгутики бактерий принципиально отличны по строению и механизму движения от жгутиков эукариотических клеток (рис. 172, А). Жгутиковая

нить построена из белка *флагеллина* с мол. массой от 40 до 60 кДа в зависимости от вида бактерии. Глобулярные субъединицы флагеллина полимеризуются в спирально закрученные нити так, что образуется трубчатая структура диаметром 12 - 25 нм, полая изнутри. Так же, как тубулины, флагеллины могут спонтанно полимеризоваться в нити, причем нарастание жгутика происходит на его конце, так что транспорт флагеллинов для надстройки жгутика происходит через его поперечную середину. Остальные части жгутика (крючок, палочка, диски) состоят, по крайней мере, еще из 12 разных белков и служат для закрепления жгутика и приведения его в движение. Движение жгутика осуществляется только благодаря электрохимическому градиенту протонов на плазматической мембране клетки и не зависит от АТФ.

Предполагаемый механизм вращения жгутика показан на рис. 172,

Б. Считают, что М-диск жгутика служит ротором, а плазматическая мембрана - статором. В статоре находятся два протонных "колодца", каждый из которых пересекает часть толщины мембраны. На дне входного "колодца" расположена протон-акцепторная группа X М-диска (например, аминокислота остатка лизина). Появление положительного заряда на X при его протонировании вызывает кулоновское притяжение этой группы к другой протон-акцепторной группе Y<sup>-</sup> (например, ионизированной карбоксильной группе остатка аспарагиновой или глутаминовой кислоты мембранного белка). Притяжение приводит к вращению М-диска и сближению XH<sup>+</sup> и Y<sup>-</sup>. Перенос протона от XH<sup>+</sup> к Y<sup>-</sup> и далее в цитоплазму по выходному "колодцу" завершает цикл. Теперь другой ион H<sup>+</sup> из периплазмы может протонировать следующую группу X, занявшую место на дне входного "колодца". Один оборот ротора требует переноса около 200 протонов через мембрану по градиенту DmH. Скорость вращения жгутика находится в пределах от 5 до 50 оборотов/с, что обеспечивает бактериям скорость движения 20 - 30 мкм/с. Интересная особенность мотора бактериального жгутика - его способность вращать жгутик как по часовой стрелке, так и против нее при неизменной направленности DmH.

Первоначально систематика бактерий строилась на основе морфологических признаков (размеры, цвет и характер поверхности колоний, форма бактерий, окраска по Граму) и биохимических признаков (например, аэробы или анаэробы). Однако более информативным оказался метод сравнительного анализа нуклеиновых кислот, о котором было рассказано во второй лекции. Сравнение последовательности нуклеотидов бактериальных рРНК позволило выделить уникальную и наиболее древнюю группу *археобактерий* и построить следующее филогенетическое дерево бактерий: 6 эукариоты 6 грамположительные бактерии

26 археобактерии 26 грамотрицательные бактерии  
прогеноты --6 эубактерии -----6 цианобактерии

При этом наибольшее разнообразие бактерий наблюдается не по строению, а по метаболическим процессам, лежащим в основе их энергетики. Если у высших эукариотических организмов есть только один анаэробный катаболический процесс - гликолиз, то у бактерий мы видим целый спектр аналогичных анаэробных процессов получения энергии

- брожений, которые так же, как и гликолиз, начинаются с расщепления глюкозы до пирувата, но различаются по конечному продукту, в который превращается на заключительных стадиях пируват. Так, например, различают молочнокислое брожение, пропионовокислое брожение, а клостридии и бактерии группы кишечной палочки

сбраживают сахара до бутандиола, бутанола, пропанола или ацетата. Клеточное дыхание у бактерий тоже отличается большим разнообразием. Наиболее древним считается так называемое *анаэробное дыхание*, при котором конечным акцептором электрона в электрон-транспортной цепи служит не кислород, а другие неорганические соединения -  $\text{NO}_3^-$  (нитратное дыхание),  $\text{SO}_4^{2-}$  (сульфатное дыхание) или  $\text{CO}_2$  (карбонатное дыхание). Вероятно, что такие типы дыхания появились еще в период отсутствия кислорода в земной атмосфере и явились предшественниками кислородного дыхания. Фотосинтез у пурпурных и зеленых растений отличается от обычного фотосинтеза хлоропластов растений тем, что электроны для восполнения электронной дырки в хлорофилле, отдавшем свой электрон в результате фотохимической реакции, берутся не из молекулы воды, а из молекул  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{H}_2$  или даже из органических веществ. Кислород при этом не образуется, и такой, вероятно, наиболее древний тип фотосинтеза называется *аноксигенным фотосинтезом*.

Помимо разнообразных "проб" уже знакомых нам по эукариотической клетке метаболических процессов, у бактерий встречаются и другие оригинальные "разработки". Уже было рассказано про бактериородопсин галобактерий, который является прямым преобразователем энергии света в DmH. Другой принцип получения энергии используют *хемотрофные* бактерии - источником энергии для них служат реакции окисления при помощи кислорода соединений азота (нитрифицирующие бактерии), соединений серы (тиобактерии) и железа (железобактерии) или могут использовать в качестве восстановителя водород (водородные бактерии). Кроме того, многие бактерии используют в качестве сопрягающего иона не  $\text{H}^+$ , а  $\text{Na}^+$ : у бактерий найдены первичные мембранные DmNa-генераторы,  $\text{Na}^+$ -транспортирующие дыхательные цепи и  $\text{Na}^+$ -АТФазы. Предполагают, что первичной была энергетика, базирующаяся на циркуляции протонов, а замена протонов на  $\text{Na}^+$  в качестве сопрягающего иона - более позднее эволюционное приобретение. Такая замена придает клетке устойчивость к средам с низкой концентрацией  $\text{H}^+$  и, кроме того, внутриклеточные ферменты гораздо чувствительней к изменению концентрации  $\text{H}^+$ , чем  $\text{Na}^+$ . Подтверждением такого эволюционного преобразования является факт, что внутриклеточные органеллы эукариотической клетки (митохондрии и хлоропласты) используют протонную энергетiku, тогда как плазматическая мембрана - натриевую ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза).

К бактериальным "изобретениям" относятся и *антибиотики* - вещества, которые выделяются бактериями для подавления других конкурирующих бактерий, и *токсины*, выделяемые болезнетворными бактериями. Антибиотики часто представляют собой очень специфические ингибиторы биологических процессов. *Рифомицин*, образуемый бактериями *Streptomyces*, специфически ингибирует инициацию синтеза только прокариотической РНК, не предотвращая связывания РНК-полимеразы с ДНК-матрицей. Рифомицин препятствует образованию первой фосфорнодифирной связи в цепи РНК, но практически не влияет на элонгацию цепи. Молекула другого антибиотика - *актиномицина D* - имеет плоскую часть, которая проникает в двойную спираль ДНК между соседними парами Г-Ц, деформируя матрицу ДНК. Таким образом, актиномицин D ингибирует элонгацию транскрипции как у прокариот, так и у эукариот, вызывая как бы "заедание молнии". *а-аманитин* (продуцируемый ядовитым грибом *Amanita phalloides*) ингибирует синтез мРНК, осуществляемый только эукариотической полимеразой II, но не влияет на синтез РНК у прокариот. Антибиотик *кирромицин* связывается с EF-Tu. Такой связанный с антибиотиком фактор способен доставлять аминоксил-тРНК в А-участок рибосомы, происходит единичный акт гидролиза ГТФ, после чего EF-Tu не способен покинуть рибосому, и элонгация останавливается. Антибиотик *фузидиевая кислота* препятствует освобождению транслоказы [EF-G7ГДФ] у прокариот и в меньшей степени [eEF27ГДФ] у эукариот, "консервируя" рибосомы в транслоцированном состоянии. Антибиотик *пууромицин* настолько структурно похож на аминокислоту, при-



соединенную к концевому аденозину тРНК, что рибосома воспринимает его как аминоктил-тРНК. Рибосома присоединяет пурамицин к растущему белку пептидной связью, но после этого происходит преждевременное отделение растущего полипептида в форме полипептидпурамицина. *Дифтерийный токсин*, используя НАД в качестве кофактора, присоединяет АДФ-рибозид к eEF2. Модифицированный eEF2 не может осуществлять транслокацию рибосомы, при этом одна молекула токсина способна модифицировать такое кол-во транслоказы, которое вызывает гибель клетки.

Бактерии способны отличить свою собственную ДНК от любой вторгающейся чужеродной ДНК по характерному метилированию оснований (по типу *модификации*). Отличие по типу модификации делает чужеродную ДНК доступной для разрезания *рестрицирующими ферментами*, которые узнают отсутствие метилирующих групп в соответствующих участках ДНК. После репликации ДНК только исходная родительская цепь несет метильные группы, однако дочерняя цепь тоже вскоре метилируется специфическими клеточными *метилазами*. Таким образом, система *рестрикции и модификации* защищает бактериальную клетку от вторжения чужой ДНК. Метилирование у эукариот имеет совсем другую цель: узнать гены, находящиеся в различных функциональных условиях. Этот процесс не связан с рестрикцией неметилированных участков.

## СТРОЕНИЕ И РАЗНООБРАЗИЕ ВОДОРΟΣЛЕЙ

Строение разных растений сильно различается. Есть простейшие растения, у которых не бывает зародышей и проводящих тканей. Их называют *низшими растениями*. К низшим растениям относятся микроскопические одноклеточные растения и многоклеточные растения, тело которых не подразделено на корни, стебли и листья. Тело таких растений называется *слоевище*, или *таллом*. К низшим растениям относятся водоросли. Водорослями называют растения, которые с самого своего возникновения в процессе эволюции приспособлены к жизни в воде. Водоросли - это самые древние растения на Земле. Они очень разнообразны: от одноклеточных форм микроскопических размеров до огромных бурых водорослей, длина которых иногда превышает 100 м. Высшими растениями называют растения, образующие зародыш, имеющие проводящие ткани, тело которых подразделяется на листья, корни и стебель. Высшие растения - это мхи, папоротникообразные и семенные растения. Как низшие, так и высшие растения размножаются не только бесполом, но и половым путем. Слияние гамет и мейоз - это события, которые разделяют жизнь растения на две фазы - диплоидную и гаплоидную. В диплоидной фазе происходит развитие растения с момента слияния гамет до мейоза, а в гаплоидной фазе - развитие растения от мейоза до слияния гамет (рис. 173). Гаплоидная и диплоидная фазы чередуются и сменяют друг друга, образуя *цикл воспроизведения растения*.

У очень многих растений в цикле воспроизведения происходит смена поколений - гаплоидное поколение, образующее гаметы, сменяется диплоидным поколением, дающим споры. Диплоидное поколение, дающее споры, называют *спорофитом* (от греч. спора + фитон - растение), а гаплоидное поколение, образующее гаметы, - *гаметофитом*. В эволюции растений от низших форм к высшим цикл воспроизведения постепенно изменялся. Поэтому, чтобы понять как происходила эволюция растений, надо обратить особое внимание на соотношение гаметофитного и спорофитного поколений в жизненном цикле каждого из типов растений.

Царство растений подразделяют на отделы. Рассмотрим три основных отдела водорослей - *зеленые водоросли*, *бурые водоросли* и *красные водоросли*. Зеленые водоросли живут в пресных водоемах, реже в морской воде и на сырых почвах. Зеленых водорослей известно около 5700 видов. Среди них есть одноклеточные, колониальные и многоклеточные формы. Колониальные формы возникают тогда, когда клетки водоросли после деления не отрываются друг от друга, а остаются скрепленными вместе. Но колониальная

водоросль отличается от многоклеточной тем, что ее клетки сохраняют самостоятельность и часто скреплены друг с другом только слизью. Клетки многоклеточной водоросли потеряли свою самостоятельность и их протопласты обычно соединяются друг с другом через каналы в клеточных стенках.

Всех зеленых водорослей объединяет, как видно из их названия, зеленая окраска. Зеленую окраску им придает хлорофилл. Но в отличие от высших растений, хлорофилл внутри клеток зеленых водорослей находится не в хлоропластах, а внутри телец самой разнообразной формы

- *хроматофоров* (от греч. хромео - крашу + форо - несущий). Хроматофоры зеленых водорослей бывают пластинчатой, звездчатой, ленто-видной формы или формы ребристых цилиндров. Внутри клетки их обычно мало, но зато они, как правило, очень крупные. Так же, как и у хлоропластов, функция хроматофоров - осуществлять фотосинтез. Водоросли, как и наземные растения, получают основное питание за счет фотосинтеза. Для этого они поглощают углекислый газ, растворенный в воде вокруг них. Так же, как и у наземных растений, в процессе фотосинтеза зеленых водорослей выделяется кислород. Он растворяется в окружающей их воде, а затем переходит из воды в атмосферу. Кислород, выделяемый водорослями, используют для своего дыхания разные водные животные. Половина всего количества кислорода, поступающего в земную атмосферу в результате фотосинтеза, образовалась в клетках зеленых водорослей. Органами движения у подвижных водорослей служат жгутики. Размножаются зеленые водоросли вегетативным, бесполом и половым путем. Бесполое размножение происходит при помощи спор. Если споры имеют жгутики и подвижны, то они называются *зооспорами*. Рассмотрим подробнее строение и жизненный цикл некоторых зеленых водорослей.

**ХЛАМИДОМОНАДА.** В переводе с греческого языка "хламидомонада" означает "простейший организм, покрытый одеждой" - оболочкой. Это одноклеточная подвижная водоросль. Она встречается повсюду в канавах, небольших лужах и других мелководных водоемах. Ее можно найти еще на глинистой почве и в сырых местах вдоль дорог. Когда хламидомонада размножается в больших количествах, то вода становится зеленой, особенно в весеннее время. Тогда говорят, что вода "цветет". Хламидомонада - это микроскопически малая клетка овальной формы. Ее передний конец заострен в виде носика, и к нему прикреплены два одинаковых жгутика, с помощью которых водоросль передвигается (рис. 174). Клетка хламидомонады окружена жесткой стенкой, так же, как и клетки высших растений. Внутри клетки в цитоплазме расположено ядро и хроматофор, который имеет чашевидную форму. Кроме того, на переднем конце клетки есть две пульсирующие вакуоли и красный глазок. Хламидомонада живет в пресной воде, и вода стремится все время просочиться внутрь клетки, чтобы разбавить ее содержимое. От этого клетка набухает. Единственный способ бороться с набуханием клетки - это постоянно откачивать лишнюю воду обратно наружу. Такими откачивающими воду насосами у хламидомонады служат пульсирующие вакуоли. Они периодически сокращаются (пульсируют) и выталкивают из клетки накапливающуюся в них воду. Красный глазок - это светочувствительный орган хламидомонады. Чтобы питаться за счет фотосинтеза, нужен свет. При помощи своего красного глазка хламидомонада определяет, достаточно ли света для фотосинтеза. Если света слишком мало, то она, работая жгутиками, плывет туда, где света больше. И, наоборот,

если свет слишком яркий, то он может повредить хроматофор, поэтому хламидомонада отплывает в ту часть водоема, где света меньше.

Размножается хламидомонада двумя способами: бесполом и половым. При бесполом размножении клетка перестает двигаться, и у нее отпадают жгутики. Затем она делится митозом на 2, 4 или 8 клеток (рис. 174). Из них внутри материнской клетки образуются зооспоры. Зооспоры имеют по два жгутика, как и взрослая клетка, но отличаются от нее меньшими размерами. Оболочка материнской клетки разрушается, и зооспоры выплывают наружу. Они быстро вырастают и могут снова размножаться таким же путем. Если наступили плохие для роста и бесполого размножения времена (например, похолодание или пересыхание водоема), то хламидомонада переходит к половому размножению. В результате деления митозом внутри материнской клетки образуются 32, а иногда и 64 клетки-гаметы. У них есть жгутики, и они похожи на зооспоры. Зрелые гаметы после разрыва оболочки материнской клетки выплывают наружу. Внешне гаметы все совершенно одинаковые. В отличие от зооспор гаметы соединяются попарно (рис. 174) и плавают некоторое время в соединенном положении. Затем они останавливаются, сбрасывают жгутики и оболочки, и сливаются. Их ядра тоже сливаются, и хромосомы объединяются. В результате образуется диплоидная зигота. Зигота покрывается толстой оболочкой, и наступает период ее покоя. В ней есть запас питательных веществ. При наступлении благоприятных условий зигота делится мейозом на 4 клетки. Из каждой из них вырастает новая клетка хламидомонады. Таким образом, все клетки хламидомонады - и зрелые, и зооспоры, и гаметы - гаплоидны. Диплоидный набор хромосом имеет только зигота (рис. 174). Следовательно, в цикле воспроизведения хламидомонады преобладает гаплоидная стадия.

**ХЛОРЕЛЛА.** Это одноклеточная шаровидная водоросль (рис. 175), диаметром около 10 мкм. Она встречается на влажной почве и живет в пресных водоемах. В отличие от хламидомонады у хлореллы нет жгутиков и поэтому ее клетки неподвижны. Она очень быстро размножается бесполом путем, образуя неподвижные (т.е. без жгутиков) споры. В благоприятных условиях хлорелла делится каждые 12 часов и быстро растет, так что общая масса водорослей за 1 сутки увеличивается в 7-12 раз. Хлорелла содержит 15 различных витаминов и 50% полноценных белков (тогда как бобы - 25%, а пшеница - только 12%). Из-за полезных веществ и высокой скорости размножения хлорелла может быть использована в качестве пищи. Свежая хлорелла на вкус как трава, но с болотным запахом. Из-за целлюлозной клеточной стенки она, как и трава, без предварительной обработки плохо усваивается людьми. Ее используют как дополнение к пище сельскохозяйственных животных. В Узбекистане работают промышленные установки по выращиванию хлореллы на корм скоту - это мелкие освещаемые солнцем бассейны. Помимо питания за счет фотосинтеза хлорелла активно поглощает из окружающей ее среды органические вещества, поэтому ее добавляют к сточным водам для их очистки. На космических кораблях и подводных лодках хлорелла может не только служить дополнительным источником пищи, но за счет фотосинтеза помогает поддерживать нормальный состав воздуха, поглощая углекислый газ и выделяя кислород.

**ВОЛЬВОКС.** Это пример колониальной водоросли. Он встречается в прудах с чистой водой и других хорошо прогреваемых водоемах со стоячей водой. Вольвокс имеет форму шара, окрашенного в зеленый цвет (рис. 176). Его диаметр - около 2 мм. Колония состоит из 60-75 тысяч клеток. Они расположены в один слой на поверхности шара и соединены между собой нитями цитоплазмы, которые проходят через клеточные стенки. Внутри шара находится слизь. Клетки колонии похожи на клетки хламидомонады по своему строению. Каждая из них имеет по два жгутика, которые направлены наружу. Жгутики постоянно колеблются и заставляют перемещаться всю шарообразную колонию. Вольвокс все время вращается и одновременно движется по направлению к свету.

Не все клетки колонии одинаковые. Разные клетки выполняют разные функции. Большинство клеток выполняют функции питания и движения всего шара, они не способны делиться. Но некоторая часть клеток колонии выполняет функцию размножения. Это крупные клетки, не имеющие жгутиков и обладающие способностью делиться. При бесполом размножении эти крупные клетки многократно делятся митозом в одной плоскости. Благодаря такому делению образуется многоклеточная пластинка, которая начинает заворачиваться своими краями и смыкается в шар с небольшим отверстием. Затем такой шар выворачивается, и у его клеток вырастают жгутики. Внутри большого шара получаются маленькие шары - дочерние колонии (рис. 176). Они свободно двигаются внутри большого шара и растут там. Через некоторое время дочерние колонии, напирая изнутри на стенки материнской колонии, разрывают ее, выходят наружу и начинают самостоятельную жизнь. Остатки материнского шара после этого отмирают.

Для полового размножения вольвокс использует половые клетки двух типов. Яйцеклетки более крупные, темно-зеленого цвета, без жгутиков, с хорошо развитым хроматофором. Сперматозоиды, наоборот, очень мелкие, со жгутиками, утратившие свой орган питания - зеленый хроматофор. И яйцеклетки, и сперматозоиды образуются в результате мейоза и поэтому имеют гаплоидный набор хромосом. Подвижные сперматозоиды плавают и находят неподвижные яйцеклетки и сливаются с ними. Происходит оплодотворение. Получившаяся диплоидная зигота покрывается толстой оболочкой и заполняется запасными веществами. В таком состоянии она хорошо переносит неблагоприятные условия зимы, а весной прорастает и образует путем деления митозом пластинку, сворачивающуюся в шар. У одних видов вольвокса колонии бывают двуполыми - они образуют и яйцеклетки, и сперматозоиды. У других - однополыми, образующими или только яйцеклетки, или только сперматозоиды.

УЛОТРИКС - это многоклеточная водоросль, которая растет в быстро текущих реках, прикрепляясь к подводным предметам - камням, сваям. Она выглядит как ярко-зеленые нити, которые все время колышутся в воде. Клетки улотрикса расположены в один ряд. Такое строение тела называют *нитчатым* (рис. 177). Улотрикс прикрепляется к предметам при помощи бесцветной, вытянутой в длину клетки. Остальные клетки водоросли устроены одинаково. У каждой из них есть целлюлозная клеточная стенка, ядро и хроматофор, который имеет вид широкого незамкнутого кольца. Все клетки тела улотрикса гаплоидны. Нить водоросли растет за счет деления митозом составляющих ее клеток и их вытягивания в длину.

Для бесполого размножения улотрикс образует зооспоры. Протопласт некоторых клеток его тела отстает от оболочки и на нем вырастают четыре жгутика. Потом клеточные стенки разрушаются, и зооспоры выходят наружу (рис. 177). Поплавав некоторое время, зооспора прилипает к какому-нибудь подводному предмету, затем делится митозом и образует новую нить. При половом размножении протопласт некоторых клеток делится митозом, образуя гаметы. Гаметы улотрикса отличаются от его зооспор тем, что у них два, а не четыре жгутика. Все гаметы улотрикса внешне совершенно одинаковые. После выхода из материнских клеток гаметы попарно сливаются и образуют зиготу. Зигота делится мейозом и образует гаплоидные зооспоры, которые образуют новые нити улотрикса (рис. 177). Таким образом, так же, как и в случае хламидомонады, в цикле воспроизведения улотрикса преобладает гаплоидная стадия.

СПИРОГИРА - это многоклеточная зеленая водоросль, которая встречается в прудах, озерах, речках. Она образует большие скопления слизистых на ощупь нитей, которые называют тиной. Водоросль состоит из одного ряда вытянутых в длину клеток, так же, как и у улотрикса гаплоидных. Клетки спирогиры имеют целлюлозные стенки и выделяют слизь, которая сплошным футляром одевает водоросль. В середине каждой клетки расположены ядро и вакуоль, заполненная клеточным соком. В слое цитоплазмы находится хроматофор,

который имеет вид спирально изогнутой ленты (рис. 178). Все клетки спирогиры могут делиться митозом, за счет чего водоросль растет и удлиняется.

Если водоросль случайно разрывается на отдельные куски, то отдельные куски не погибают. Они быстро удлиняются и достигают размеров целой водоросли. Так происходит вегетативное размножение. Половое размножение спирогиры осуществляется путем **КОНЬЮГАЦИИ**. Конъюгация заключается в следующем: две близко расположенные нити водоросли сближаются вплотную. На боковых стенках каждой водоросли образуются выросты, при помощи которых клетки соприкасаются. Клеточные стенки в местах соприкосновения разрушаются и между клетками образуются каналы цитоплазмы (рис. 179). Содержимое одной клетки переливается по образовавшемуся каналу в другую и, соединяясь вместе, они образуют диплоидную зиготу. Этот процесс происходит по всей длине водоросли. Хотя между нитями внешне нет никаких различий, содержимое клеток одной нити, которую условно считают мужской, переливается в клетки другой нити, которая считается женской. Таким образом, зиготы образуются в женской нити. Каждая зигота, вначале зеленая, постепенно утрачивает хлорофилл и одевается толстой оболочкой. В таком виде она переносит неблагоприятные условия зимовки. Весной зигота делится мейозом. Из возникших четырех гаплоидных клеток три погибают, развивается лишь одна клетка, из которой вырастает новая водоросль спирогиры.

**УЛЬВА**, или **МОРСКОЙ САЛАТ**, - это многоклеточная листовидная водоросль, напоминающая смятый лист зеленого целлофана (рис. 180). Она достигает в длину 30 см при толщине "листа" всего в две клетки. Ульва растет на мелководных участках моря. Среди неразличимых на вид водорослей есть как гаплоидные, так и диплоидные. Дело в том, что в определенное время года некоторые клетки диплоидных водорослей делятся мейозом. Образуются гаплоидные зооспоры с четырьмя жгутиками каждая. Если такая зооспора, опускаясь на дно, попадает в благоприятные условия, из нее вырастает гаплоидная водоросль, ничем не отличающаяся от исходной диплоидной водоросли (рис. 180). Со временем гаплоидные водоросли образуют много одинаковых гамет, каждая из которых имеет только два жгутика. Сливаясь попарно между собой, гаметы образуют зиготу. Из зиготы опять вырастает диплоидная водоросль.

**БУРЫЕ И КРАСНЫЕ ВОДРОСЛИ**. В отделе "Бурые водоросли" насчитывается примерно 1000 разных видов. Это крупные многоклеточные водоросли. Например, гигантские ламинарии достигают в длину нескольких сот метров. Большинство бурых водорослей обитает в морях и океанах. Они покрывают скалы в полосе прибоя и спускаются в воду примерно до глубины 15 м. Бурую окраску им придает пигмент **ФУКОКСАНТИН**. Фукоксантин вместе с хлорофиллом в больших количествах содержится в хроматофорах бурых водорослей.

Многолетнее слоевище многих крупных бурых водорослей разделено на части. Эти части напоминают лист, стебель и корень высших растений (рис. 181). Но это только внешнее сходство, потому что внутри эти части не содержат специальных тканей как настоящие листья, корни и стебли. У водорослей эти части называют **ПЛАСТИНКОЙ**, **ЧЕРЕШКОМ** и **РИЗОИДАМИ** (от греч. риза - корень; ризоид - корнеподобный) (рис. 181). Водорослям не нужно добывать минеральные вещества из грунта, потому что все необходимые им вещества содержатся в окружающей их воде. Поэтому ризоиды служат водорослям только для прикрепления ко дну. У некоторых бурых водорослей, например фукуса, в слоевище есть заполненные воздухом пузыри, которые подобно поплавкам поддерживают его в воде в вертикальном положении (рис. 181, 4).

По числу видов отдел "Красные водоросли" крупнее, чем отдел "Бурые водоросли". В нем насчитывается примерно 3000 разных видов. Красные водоросли, как и бурые, встречаются почти исключительно в морях и океанах. Они растут, прикрепляясь ко дну и подводным предметам. Живут они, в основном, в теплых морях. По внешнему виду эти водоросли очень разнообразны. Например, могут иметь вид сильно разветвленных кустиков

(рис. 182). Их сильно разветвленный таллом или слоевище внешне напоминает растение с листьями и стеблями. Таллом красных водорослей обычно имеет размеры от нескольких сантиметров до 0,5 м. Все они окрашены в разные оттенки красного - от розового до пурпурного, потому что содержат, кроме хлорофилла, красный пигмент ФИКОЭРИТРИН. Из красных водорослей добывают очень ценное желеобразное вещество, называемое агар-агар. Агар-агар используется для изготовления пастилы, мармелада, зефира. Некоторые красные водоросли используются людьми в пищу. В Японии красная водоросль порфира считается деликатесом и ее специально выращивают в подводных садах.

Бурые и красные водоросли размножаются вегетативным, бесполом и половым путем. В их цикле воспроизведения четко выражена смена гаплоидного и диплоидного поколений. Диплоидное поколение образует гаплоидные зооспоры, из которых в результате деления и роста возникают гаплоидные растения. Гаплоидные растения в свою очередь дают гаплоидные гаметы, которые сливаются и образуют диплоидную зиготу. Из зиготы после мейоза снова вырастают гаплоидные растения.

Бурые и красные водоросли, так же, как и зеленые, питаются и растут за счет фотосинтеза. Их разная окраска - это приспособление к фотосинтезу. Дело в том, что зеленые, бурые и красные водоросли растут на разной глубине. Зеленые водоросли встречаются на глубине до 6 м, бурые водоросли - до 15 м, а красные водоросли растут на глубине до 100 м. Как вы знаете, солнечный свет состоит из лучей разного цвета с разной энергией. В зависимости от своей энергии разные лучи могут проникнуть на разную глубину. Красные лучи проникают лишь в верхние слои воды, тогда как синие и фиолетовые лучи проникают глубже всего (рис. 183). Хлорофилл хорошо поглощает красный свет. Поэтому растения, обладающие только хлорофиллом, способны к фотосинтезу только на небольших глубинах. Желто-зеленые лучи хорошо поглощаются пигментом бурых водорослей фукоксантином, поэтому бурые водоросли могут жить глубже, чем зеленые. Фикоэритрин хорошо поглощает синие лучи, поэтому содержащие его красные водоросли могут жить очень глубоко (рис. 183).

## ОТДЕЛ МОХООБРАЗНЫЕ

Долгое время водоросли были единственными растениями на Земле. Но постепенно растения сумели приспособиться к жизни на суше. Для этого им пришлось образовать целый ряд новых органов и приспособлений, которые взяли на себя выполнение функций, осуществлявшихся у водорослей водой. Мохообразные - это промежуточная форма между водорослями и настоящими наземными растениями. Они плохо приспособлены к жизни на суше и встречаются

только в сырых местах. Поэтому мохообразных называют еще земноводными растениями.

К мохообразным относится около 23000 видов. Строение всех мхов похоже. Они состоят из нитей ПРОТОНЕМЫ, расположенных на поверхности почвы или в почве, от которых отходит вертикальный стебель с листьями (рис. 184). Листья мхов толщиной всего в одну клетку и расположены на стебле по спирали. От основания стебля тянутся многочисленные бесцветные, похожие на корни выросты, называемые РИЗОИДАМИ (от греч. риза - корень; ризоид - корнеподобный). В отличие от ризоидов водорослей, ризоиды мхов служат не только для укрепления тела мха в почве, но и для всасывания воды и минеральной пищи, хотя делают это еще не так хорошо, как корни. Из-за того, что у мхов нет специальных проводящих и механических тканей, они никогда не вырастают выше 15-30 см. Если бы они выросли выше, то из-за отсутствия проводящих тканей (флоэмы и ксилемы) не смогли бы быстро передавать вещества из одних органов в другие, а из-за отсутствия механических тканей легко сломались бы. В клетках мхов есть хлоропласты, содержащие хлорофилл и осуществляющие фотосинтез.

В цикле воспроизведения мохообразных четко выражена смена двух поколений - гаплоидного гаметофита и диплоидного спорофита (рис.

185). Покрытые листьями зеленые растения - это гаплоидные гаметофиты. Когда рост гаметофита закончен, и он подготовлен к размножению, на верхушке его стебля развиваются половые клетки. У одних видов растения раздельнополы, например у мха кукушкиного льна (рис. 186), а у других на одном и том же растении развиваются и мужские клетки (сперматозоиды), и женские половые клетки (яйцеклетки). Многочисленные мелкие спирально закрученные сперматозоиды мхов имеют по два жгутика и способны самостоятельно плавать. После дождя или сильной росы сперматозоиды по водным пленкам, покрывающим растения, подплывают к яйцеклеткам. Их привлекают химические вещества, выделяемые яйцеклетками. Достигнув яйцеклетки, сперматозоид сливается с ней - происходит оплодотворение. Образуется диплоидная зигота, которая развивается в диплоидный спорофит. Таким образом, мохообразные, так же, как и водоросли, не могут размножаться без воды, потому что сперматозоиды должны подплыть к яйцеклеткам, чтобы произошло оплодотворение.

Гаметофит у мхов - это самостоятельное зеленое растение, а спорофит - это безлистный, бурый стебелек. Он питается за счет гаметофита и без гаметофита жить не может. Спорофит вырастает в ткань гаметофита **НОЖКОЙ**, а на его противоположном конце вырастает **КОРОБОЧКА** (рис. 186). Клетки коробочки содержат хлоропласты и поэтому способны к образованию питательных веществ в процессе фотосинтеза. Внутри коробочки некоторые диплоидные клетки делятся мейозом, и каждая из них образует четыре гаплоидные споры. Когда коробочка созревает, на ее верхнем конце образуется крышечка, которая отпадает, и споры легко разносятся ветром. Если спора попадает в благоприятные условия, то она прорастает и развивается в гаплоидную **ПРОТОНЕМУ**. Протонема - это зеленое разветвленное нитевидное тело, на котором снова вырастает зеленый покрытый листьями гаметофит. Протонема мхов по своему строению сильно напоминает зеленую водоросль. Это доказывает, что мхи произошли от зеленых водорослей. Вегетативное бесполое размножение мха происходит, когда от его протонемы отрываются отдельные части. Новые гаметофиты могут вырастать также из специальных выводковых почек, находящихся на ризоидах (рис. 184).

Общие признаки мохообразных:

- 1) в цикле воспроизведения преобладает стадия гаплоидного гаметофита;
- 2) спорофит прикреплен к гаметофиту, полностью зависит от него и питается за его счет;
- 3) отсутствуют специализированные проводящие и механические ткани;
- 4) для полового размножения необходима вода.

## ОТДЕЛ ПАПОРОТНИКООБРАЗНЫЕ

Папоротникообразные были первыми растениями на Земле, у которых появились специальные проводящие и механические ткани. В результате они могли вырастать больших размеров и около 300 миллионов лет назад образовывали фантастические леса из гигантских древовидных растений высотой до 40 м и с диаметром ствола до 2 м. Отмиравшие части этих растений накапливались громадными массами. Они подвергались медленному разложению под водой при слабом доступе кислорода подобно тому, как накапливается торф. Массы стволов папоротникообразных накапливались миллионы лет, слеживались, покрывались илом морей, возникших на месте бывших лесов, и постепенно превратились в пласты **КАМЕННОГО УГЛЯ**. Таким образом, папоротникообразные растения, жившие много миллионов лет тому назад, накопили колоссальные запасы энергии в виде залежей каменного угля. Каменный уголь используется не только как топливо, но и как сырье для получения горючего газа, анилиновых красок, лаков и пластмасс. Время, когда произрастали леса гигантских папоротникообразных, теперь так и называют - каменноугольный период.

В конце каменноугольного периода произошло резкое похолодание и стало суше. Большинство папоротникообразных, не приспособившись к новым условиям, вымерло. Остались только довольно мелкие папоротникообразные. В настоящее время отдел

Папоротникообразные содержит около 10000 видов. Он подразделяется на три класса - Плауны, Хвощи и Папоротники.

**КЛАСС ПЛАУНЫ.** Плауны по внешнему виду немного напоминают мхи. У них стелющиеся по земле ветвящиеся зеленые побеги, покрытые мелкими тесно сидящими листьями. Но в отличие от мхов зеленое растение плауна представляет собой не гаплоидный гаметофит, а диплоидный спорофит. От нижней части стелющихся побегов отходят тонкие ветвящиеся придаточные корни. На верхушке некоторых стеблей находятся специальные листья, собранные в СПОРОНОСНЫЙ КОЛОСОК, напоминающий еловую шишку (рис. 187). Внутри спороносных колосков образуются споры. У примитивных плаунов все споры одинаковые, а у других более высоко организованных плаунов в спороносных колосках образуются споры двух типов - МАКРОСПОРЫ и МИКРОСПОРЫ. Такие плауны называют разноспоровыми. Познакомимся с циклом воспроизведения разноспорового плауна селлагинеллы (рис. 187).

Селлагинелла встречается в ущельях гор на Кавказе. Это небольшое травянистое растение, стебель которого густо покрыт чешуйчатыми листьями. Макроспоры и микроспоры образуются в одном и том же спороносном колоске. Микроспоры - в верхней его части, а макроспоры - в нижней. Макроспоры и микроспоры образуются в результате деления клеток мейозом и поэтому имеют гаплоидный набор хромосом. Макроспора представляет собой одну громадную клетку, содержащую в верхней части ядро. Из макроспоры развивается гаплоидный женский гаметофит. Женский гаметофит начинает развиваться из макроспоры еще тогда, когда она находится внутри спороносного колоска. Развитие женского гаметофита заключается в том, что ядро макроспоры делится на много мелких ядер, между которыми появляются перегородки (рис. 187). Постепенно клеточная ткань заполняет большую часть внутренности макроспоры. Затем макроспора выпадает из спороносного колоска на землю, ее оболочка лопается и в месте разрыва оболочки женский гаметофит образует женские гаметы - яйцеклетки. В результате деления митозом из микроспоры развивается многоклеточный мужской гаметофит, полностью скрытый в оболочке микроспоры (рис. 187). Часть клеток мужского гаметофита образует сперматозоиды.

Когда микроспора попадает в воду, оболочка микроспоры разрывается, и сперматозоиды выходят в окружающую их воду и плавают при помощи жгутиков. Оказавшись вблизи женского гаметофита, сперматозоид, привлеченный химическими веществами, подплывает и оплодотворяет гаплоидную яйцеклетку. Оплодотворенная яйцеклетка развивается в диплоидный зародыш, который некоторое время питается за счет богатой питательными веществами ткани женского гаметофита. При прорастании зародыш остается некоторое время соединенным с макроспорой и напоминает всходы семенных растений, которые обычно соединены с семенем (рис. 187). Зародыш вырастает и становится диплоидным спорофитом.

**КЛАСС ХВОЩИ.** Хвощи отличаются особым строением стеблей диплоидного спорофита, которые расчленены на чередующиеся узлы и междоузлия (рис. 188). На узлах расположены крошечные листья в виде чешуек. Фотосинтез происходит не в листьях, а в самих зеленых стеблях, клетки которых содержат хлоропласты. Стебли хвощей очень жесткие благодаря кремнезему, которым пропитаны стенки клеток эпидермиса. Надземные части у большинства хвощей ежегодно отмирают, а подземные части (корневище и придаточные корни) многолетние. Весной на вершине некоторых стеблей хвоща образуются спороносные колоски, состоящие из шестиугольных щитков (рис. 188). Внутри спороносных колосков, так же, как и у плаунов, в результате деления клеток мейозом образуются гаплоидные споры. Внешне споры хвоща одинаковые, но из одних из них вырастают мужские, а из других - женские гаплоидные гаметофиты. И те, и другие имеют вид ветвящихся зеленых пластинок, но несколько различаются по внешнему виду. Женские гаметофиты образуют яйцеклетки, а мужские гаметофиты - сперматозоиды. Сперматозоиды хвоща спирально скручены и несут на переднем конце пучок жгутиков. Для оплодотворения необходимо,



чтобы мужские и женские гаметофиты находились недалеко друг от друга. Это достигается тем, что при выпадении из спороносного колоска споры сцепляются друг с другом спирально-завитыми лентовидными выростами и потому рассеиваются группами по несколько штук (рис. 188). После оплодотворения из зиготы вырастает диплоидный спорофит.

**КЛАСС ПАПОРОТНИКИ.** Папоротники отличаются хорошо развитыми крупными листьями до 1 м длиной, которые растут вершиной, и отмирают на зиму (рис. 189). У растущих в наших лесах папоротников нет надземных стеблей - только многолетнее корневище. От корневища отходят многочисленные придаточные корни. На нижней поверхности листьев папоротника в конце лета вырастают СПОРАНГИИ. Спорангии имеют вид буроватых кучек. Внутри каждого спорангия в результате деления клеток мейозом образуется множество одинаковых гаплоидных спор. Созревшие спорангии раскрываются благодаря особому кольцу из клеток с толстыми стенками. При сжатии этих клеток от высыхания спорангии лопаются, и споры с силой выбрасываются в воздух.

Споры папоротника долго сохраняют жизнеспособность, и попав в благоприятные условия, прорастают. В результате многократных делений митозом спора становится гаплоидным гаметофитом. Гаметофит папоротника имеет вид зеленой пластинки в форме сердца и размером около 1 см (рис. 189). По краям пластинка однослойна, а ближе к центру имеет несколько слоев клеток. Гаметофит папоротника прикрепляется к земле с помощью нитевидных выростов на нижней стороне - ризоидов. Кроме ризоидов на нижней стороне гаметофита образуются мужские и женские гаметы. Сперматозоиды папоротника подвижны и имеют вид спирали, оканчивающейся пучком жгутиков. Оплодотворение происходит там же, на нижней поверхности гаметофита, когда после дождя или сильной росы под гаметофитом скапливается вода. Привлекаемые выделяемой яйцеклетками яблочной кислотой сперматозоиды подплывают к ним и сливаются с ними. В результате оплодотворения возникает диплоидная зигота. Из зиготы развивается спороносный папоротник с листьями и корневищем, клетки которого имеют двойной набор хромосом. Некоторые папоротники, как и плауны, бывают разноспоровые и образуют микро- и макроспоры, из которых развиваются мужские и женские гаметофиты соответственно.

Общие признаки папоротникообразных:

- 1) в цикле воспроизведения преобладает стадия диплоидного спорофита;
- 2) гаметофиты существуют отдельно от спорофитов, но сильно уменьшены в размерах и живут недолго;
- 3) имеются специализированные проводящие и механические ткани и, следовательно, появились настоящие листья, стебли и корни;
- 4) для полового размножения по-прежнему необходима вода.

## ОТДЕЛ ГОЛОСЕМЕННЫЕ

У семенных растений, которые пришли на смену папоротникообразным, появились два важных преимущества. Во-первых, появилась ПЫЛЬЦА. Это устранило зависимость полового размножения растений от водной среды, необходимой для передвижения сперматозоидов. Во-вторых, появились СЕМЕНА. Семена, защищенные надежной оболочкой и содержащие запас питательных веществ для зародыша, могли выживать в неблагоприятных условиях (сильная жара, холод или засуха). Первые семенные растения появились около 350 миллионов лет назад. Это были ГОЛОСЕМЕННЫЕ растения. Название "голосеменные" указывает на то, что семена этих растений расположены открыто (голо) на чешуях шишки и ничем не защищены. В настоящее время насчитывается около 700 видов голосеменных растений. К ним относятся саговники (похожие на пальмы тропические деревья) и хвойные (сосны, пихты, ели, лиственницы, кипарисы, секвойи и можжевельники).

Типичное голосеменное растение - это СОСНА. Крупное многолетнее вечнозеленое дерево сосны - это диплоидный спорофит. На верхушках ветвей одного и того же дерева образуются мужские и женские шишки (рис. 190). Мужские шишки желтого цвета и собраны по несколько штук в колоски. Каждая мужская шишка в середине имеет ось, к которой спирально прикрепляются листья-чешуйки. На внутренней стороне чешуек расположены микроспорангии. В микроспорангиях в результате деления клеток мейозом образуются гаплоидные микроспоры. Микроспора делится несколько раз митозом, образуя гаплоидный мужской гаметофит. Он состоит всего лишь из нескольких клеток и представляет собой не что иное, как пыльцевое зерно (рис. 190). Когда произойдет полное созревание пыльцы, микроспорангии в мужских шишках лопаются и пыльца подхватывается ветром. Пыльцевое зерно сосны имеет две оболочки, между которыми образуется два воздушных мешка. Воздушные мешки пыльцы поддерживают ее в воздухе, когда она переносится ветром.

Женские шишки имеют красноватый цвет. Они, как и мужские, имеют ось, к которой спирально прикрепляются листья-чешуйки. На внутренней стороне каждой чешуйки женской шишки расположены два макроспорангия. В каждом макроспорангии в результате деления одной из клеток мейозом, образуются 4 гаплоидные клетки. Из них три отмирают, а четвертая становится макроспорой. В результате деления макроспоры митозом получается гаплоидный женский гаметофит. Образовавшийся женский гаметофит - это не что иное, как зародышевый мешок. Он содержит яйцеклетку и расположен внутри макроспорангия, который теперь становится семязачатком (рис. 190). Много пыльцы гибнет при переносе ветром, и лишь небольшая ее часть попадает на семязачатки женских шишек. После опыления семязачатков чешуи женских шишек смыкаются и склеиваются смолой. Мужской гаметофит - пыльцевое зерно - продолжает развиваться, то есть прорастать, формируя пыльцевую трубку, только весной на следующий год после опыления. Как и в цветке, по пыльцевой трубке к зародышевому мешку спускаются два спермия. Но проникает в зародышевый мешок и осуществляет оплодотворение яйцеклетки только один спермий, а другой спермий погибает. У голосеменных, в отличие от цветка, нет двойного оплодотворения. В результате оплодотворения образуется диплоидная зигота. Из нее формируется диплоидный зародыш семени. Окружающие зародыш клетки становятся гаплоидным эндоспермом. Формирование зародыша и созревание семян у сосны происходит в течение второго лета. В это время шишка зеленеет и усиленно растет. Развитый зародыш сосны состоит из корешка, зачатка стебля и 7-12 семядолей, между которыми находится почечка. Созревшие семена высыпаются из шишек почти через два года после опыления.

Цикл воспроизведения сосны по своей сути похож на цикл воспроизведения разноспорового плауна, но с двумя исключениями. Во-первых, микро- и макроспоры у плауна образовывались в одном спороносном колоске, а у сосны - в разных (мужских и женских) шишках. И, во-вторых, окончательное развитие женского гаметофита и его оплодотворение происходило у плауна уже после отделения гаметофита от спорофита, тогда как у сосны женский гаметофит остается связанным со спорофитом вплоть до образования многоклеточного зародыша. Это выгодно растению, потому что в этом случае развивающийся зародыш дольше остается под защитой спорофита и питается за его счет.

## ОТДЕЛ ЦВЕТКОВЫЕ

Цветковые растения, или как их еще иначе называют, покрытосеменные растения, появились на нашей планете сравнительно недавно, около 130 миллионов лет назад. За короткое время они стали преобладающей формой земной растительности. К отделу цветковых растений

сегодня относится около 200 тысяч видов деревьев, кустарников, вьющихся растений и трав. Они растут на суше практически везде.

Такого успеха цветковые растения добились благодаря трем важным преимуществам. Это, во-первых, образование плодов. Цветковые растения называют еще покрытосеменными, потому что их семена образуются внутри плодов. Плоды служат дополнительной защитой и дополнительным питанием для семян, но самое главное - плоды участвуют в распространении семян. Во-вторых, это двойное оплодотворение. При двойном оплодотворении, кроме диплоидного зародыша, образуется триплоидный эндосперм, очень богатый питательными веществами. И, в-третьих, это приспособления для опыления насекомыми. Опыление насекомыми гораздо надежнее, чем опыление ветром.

Цикл воспроизведения цветковых растений похож на цикл воспроизведения голосеменных. Но гаплоидные гаметофиты цветковых растений становятся еще меньше, чем у голосеменных растений (рис. 191). Гаплоидные микро- и макроспоры у цветковых растений образуются, как правило, в одном и том же спороносном колоске, который мы называем цветком. Микроспорангии находятся на тычиночных нитях, а макроспорангии - в завязях пестиков. Из гаплоидной микроспоры развивается гаплоидный мужской гаметофит - это пыльцевое зерно, состоящее всего лишь из двух клеток. Из гаплоидной макроспоры развивается женский гаметофит - это зародышевый мешок, состоящий всего из 7 клеток, из которых одна - яйцеклетка.

Отдел "Цветковые растения" делится на два класса - "Двудольные", содержащий около 175 тысяч видов, и "Однодольные", объединяющий около 75 тысяч видов. Цветковые растения разделены на два класса по числу семядолей зародыша семени. Кроме этого растения этих двух классов различаются еще и другими признаками. Основные из них:

Двудольные	Однодольные
1. У зародыша семени две семядоли.	1. У зародыша семени одна семядоля.
2. Корневая система стержневая.	2. Корневая система мочковатая.
3. Стебель имеет камбий, за счет Сосу- закрытые и расположены бес- дистые пучки открытые и расположены кольцом.	3. Камбия нет. Сосудистые пучки которого утолщается. порядочно.
4. Листья простые и сложные, час- то с изрезанным краем. Жил- кование сетчатое.	4. Листья простые, цельнокрай- ние. Жилкование параллель- ное и дуговое.
5. Околоцветник чаще двойной.	5. Околоцветник чаще простой.
6. Цветок чаще 5-членного типа, реже 4-членного.	6. Цветок чаще 3-членного типа или имеет число членов, кратное трем.
7. Растения древесные, кустарни- травянистые.	7. Растения, главным образом, ковые и травянистые.

К двудольным растениям относятся горох, морковь, одуванчик, тыква, подсолнечник и почти все кустарники и деревья. К однодольным растениям относятся осоки, лилии, ирисы, тюльпаны, лук, пальмы и некоторые другие растения. Однодольные растения произошли в ходе эволюции от двудольных.

#### КРАТКИЕ ВЫВОДЫ

Эволюция бактерий была прежде всего эволюцией разных метаболических процессов. Современное разнообразие биоэнергетических процессов у бактерий - это отражение эволюционного поиска наиболее эффективной клеточной энергетики. В ходе эволюции клетки были отобраны наиболее эффективные энергетические механизмы, которые стали единственными и универсальными для всех эукариотических организмов.

Возникновение многоклеточности создало новые возможности в эволюции организмов: специализация и кооперация клеток открыли новые пути приспособления к внешним условиям, например, за счет создания и поддержания внутренней среды организма. Разнообразие растений - это результат экономической адаптации к разнообразию внешних условий, в которых обитают растения.

#### Лекция 14. РАЗНООБРАЗИЕ ОРГАНИЗМОВ И ЭВОЛЮЦИЯ (часть II) *Эволюция водорослей - эволюция полового размножения водорослей*

*- эволюция наземных растений - эволюция беспозвоночных животных - эволюция позвоночных животных*

#### ЭВОЛЮЦИЯ ВОДОРΟΣЛЕЙ

Эволюция растений была изучена по ископаемым остаткам древних растений и с помощью тщательного сравнения строения разных современных растений. По-видимому, первыми примитивными растениями были морские одноклеточные зеленые водоросли. Они перемещались с помощью жгутиков. У некоторых из них появилась жесткая клеточная стенка. Она служила для защиты от механических и химических повреждений. Но клеточная стенка у жгутиковых водорослей не могла быть полностью замкнутой, потому что подвижные жгутики - это выросты цитоплазмы, и они должны проходить через отверстия в клеточной стенке. Попав в пресный водоем, такие водоросли должны были погибать из-за проникновения в них пресной воды, стремящейся разбавить содержимое клетки. Приспособиться к жизни в пресных водоемах смогли только такие водоросли, у которых появилась способность откачивать накапливающуюся воду клеток с помощью пульсирующих вакуолей. Так как это делают современные хламидомонады. Но на откачку воды у жгутиковых водорослей тратится очень много энергии. Поэтому растения нашли другой способ избежать избыточного проникновения воды в клетку - клеточная стенка замкнулась. Но при этом клетки потеряли способность к активному передвижению, так как лишились жгутиков. Представителем таких одноклеточных водорослей является, например, ныне живущая хлорелла.

От одноклеточных водорослей произошли многоклеточные. Повысить сложность строения в пределах одной единственной клетки трудно. Некоторые организмы увеличивали свои размеры не делясь на дочерние клетки, а образуя внутри тела многочисленные ядра и другие структуры. Такие организмы могут иметь довольно сложную форму (рис. 192). Например, у водоросли ботридиума тело состоит из грушевидного пузырька величиной с булавочную головку и отходящих от него в почву бесцветных ветвистых ризоидов. Внутри тела нет никаких клеточных перегородок. Еще сложнее устроена морская водоросль каулерпа, достигающая 10-50 см. Ее тело состоит из стелющегося по дну моря горизонтального таллома, похожего на корневище, от которого вверх отходят ответвления, похожие на листья. Однако у каулерпы внутри тела тоже нет никаких клеточных перегородок. Организмы, подобные ботридиуму и каулерпе, получили название НЕКЛЕТОЧНЫХ. Неклеточные организмы не могут образовывать специальных тканей и, кроме того, они очень уязвимы, если их поранить, то страдает живое содержимое всего тела.

Самым удачным стал другой путь повышения сложности строения - это появление многоклеточности. Благодаря многоклеточности появилась специализация. Специализация - это превращение одинаковых частей в неодинаковые для выполнения различных функций. Например, у улотрикса все клетки одинаковые, потому что они выполняют одинаковые функции. У вольвокса одни клетки выполняют функцию питания и движения, а другие - только функцию размножения. Поэтому они различаются по внешнему виду и строению. Значит, у вольвокса появилась специализация клеток. Переход от одноклеточных к многоклеточным водорослям осуществлялся через колониальные формы. Сначала после деления

дочерние клетки не отделялись друг от друга и жили вместе одной колонией, скрепленные только слизью. Затем связи между клетками усилились и образовались многоклеточные организмы.

В густых зарослях или при расселении на глубину водоросли испытывали недостаток света. Поэтому водоросли, которые в погоне за светом могли удлиняться с большей скоростью, имели больше шансов выжить. Сначала такое удлинение происходило только за счет деления клеток. Но потом наряду с этим появился новый, значительно более быстрый способ - удлинение за счет растяжения клеток путем образования крупной центральной вакуоли. Так в растительной клетке появилась крупная вакуоль.

### ЭВОЛЮЦИЯ ПОЛОВОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ВОДОРΟΣЛЕЙ

Зеленые водоросли возникли раньше других растений на Земле. Поэтому у них мы встречаем много разных способов полового размножения. На водорослях природа как бы испытывала его разные варианты. У зеленых водорослей впервые возникли такие удачные черты полового размножения, которые закрепились и используются у более высоко организованных растений.

Половое размножение зеленых водорослей усложнялось по двум направлениям. Первое направление - это появление специальных клеток для полового размножения. У примитивных многоклеточных водорослей, например улотрикса, все клетки тела одинаковы, и каждая может начать образовывать споры или гаметы. У более развитых, например вольвокса, происходит "разделение труда" между клетками - одни клетки выполняют только функции питания и движения, а другие - только размножения. Второе направление - это постепенный переход от образования внешне совершенно одинаковых гамет (таких как у хламидомонады и улотрикса) к образованию гамет двух разных типов - мелких подвижных мужских и крупных неподвижных женских гамет (как у вольвокса). Это дает явные преимущества - многочисленность и подвижность сперматозоидов (мелких мужских гамет) обеспечивают их встречу с яйцеклеткой (крупной неподвижной женской гаметой), а большие размеры и запасы питательных веществ яйцеклетки обеспечивают зиготу питанием до тех пор, пока она не сможет самостоятельно питаться.

### ЭВОЛЮЦИЯ НАЗЕМНЫХ РАСТЕНИЙ

Если водоросли появились примерно 1 миллиард лет назад, то первые наземные растения появились только 420 миллионов лет назад. 580 миллионов лет понадобилось растениям, чтобы перейти от водного к наземному образу жизни! Завоевание суши было длительным и трудным процессом, стоившим многих жертв растениям. Во-первых, водорослям на суше надо было научиться защищаться от высыхания. Растения смогли жить на суше только после того, как у них появился эпидермис - специальная покровная ткань с толстыми клеточными стенками, пропитанными восковидным водонепроницаемым веществом (кутикулой).

Вторая трудность была связана с получением питательных веществ. Все, что требуется для роста растения - вода, углекислый газ, минеральные соли, свет - все это вместе находится в водной среде окружающей водоросли. На суше они разделены в пространстве - углекислый газ и свет находятся наверху, в воздухе, а вода и минеральные соли - внизу, в почве. Те первые наземные растения, которые пытались жить в почве, получали достаточно солей и воды, но они были лишены света и им не хватало углекислого газа. А те, которые пытались жить на поверхности почвы, были обеспечены светом и углекислым газом, но испытывали недостаток в воде и не получали солей. Растениям было необходимо "научиться" расти сразу в две противоположные стороны - вверх к свету и вниз в почву.

В-третьих, вода намного плотнее, чем воздух, и она поддерживает тело водоросли, не давая ему упасть. На суше растениям пришлось самим поддерживать свое тело с помощью

специальных механических тканей. В-четвертых, надо было защищаться от резких перемен температуры и резких перемен других внешних условий, от которых водорослей предохраняет водная среда. В-пятых, и это самое главное, вода служит для встречи гамет при половом размножении и для распространения спор при бесполом. Поэтому надо было как-то решить проблему с размножением на суше.

Поскольку элементы питания равномерно рассеяны в окружающей среде, растения в ходе эволюции постепенно потеряли подвижность и перешли к прикрепленному образу жизни. Они в течение всей жизни остаются на одном месте, а передвижение связано либо с размножением (гаметы, пыльца, споры), либо с постепенным нарастанием органов (например, корней в почве).

Элементы питания, равномерно распределенные во внешней среде, поглощаются через наружную поверхность растения. Чем больше площадь поверхности, тем больше поглощение. Поэтому в ходе эволюции многоклеточные растения стремились к увеличению поверхности соприкосновения со внешней средой. Водоросли переходили от нитчатых форм к все более разветвленным. А наземные растения увеличивали поверхность тела, образуя плоские листья и при помощи многократного обильного ветвления побегов и корней.

Первыми растениями, приспособившимися к жизни на суше, были ныне вымершие *псилофиты* (от греч. псилос - скудный, голый + фитон - растение). Найдены ископаемые остатки некоторых псилофитов, и по ним был воссоздан внешний облик этих древних растений (рис.193). Псилофиты были еще очень похожи на зеленых водорослей, от которых произошли. Их тело еще не было разделено на органы. Оно представляло собой разветвленный таллом. Предполагается, что листья в ходе эволюции растений возникли из отростков таллома путем их расположения в одной плоскости, скручивания и срастания (рис.194). Стебли с их сложной проводящей системой, видимо, тоже возникли из талломов. Корни произошли из талломов, лежащих на поверхности почвы, а затем углубившихся в нее. Таким образом, все вегетативные органы возникли из таллома в связи с приспособлением растений к жизни на суше.

Мохообразные и папоротникообразные независимо друг от друга произошли от псилофитов. И те, и другие нуждаются в воде для своего полового размножения. Но папоротникообразные стали первыми сосудистыми растениями - у них впервые появились специальные проводящие ткани - ксилема и флоэма. Это позволило им широко расселиться по Земле в каменноугольном периоде и вырастать до гигантских размеров. Но резкое похолодание климата и повышение

сухости привело к вымиранию большинства папоротникообразных. На смену папоротникообразным начали развиваться другие растения, произошедшие от семенных папоротников, но лучше них приспособленные к жизни на суше - голосеменные растения. Они сумели преодолеть зависимость от воды за счет возникновения опыления ветром. Когда появились голосеменные растения на Земле еще не было летающих животных. Цветковые растения появились в одно время с летающими насекомыми и птицами. Поэтому только у цветковых растений развились специальные приспособления для опыления животными. Цветковые растения - это вершина эволюции царства растений. Они господствуют ныне на Земле среди растений.

Схематично эволюцию растений можно изобразить так:

цветковые растения  
%  
голосеменные растения  
%  
древние разнospоровые

	папоротники	
	%	
современные	вымершие	
папоротникообразные 5	псилофиты 6	мохообразные
	%	
	зеленые многоклеточные	
	водоросли	
	%	
	колониальные зеленые	
	водоросли	
	%	
	одноклеточные	
	зеленые водоросли	

Если сравнить циклы воспроизведения растений разных отделов - от водорослей до покрытосеменных, то видна четкая закономерность: в процессе эволюции размеры и длительность жизни диплоидного спорофита увеличивались, а размеры и длительность жизни гаплоидного гаметофита уменьшались (рис.195). У некоторых водорослей, например улотрикса, в каждом цикле воспроизведения есть только одна диплоидная клетка - зигота, а остальные клетки гаплоидны. У мхов гаплоидное поколение все еще крупнее и живет дольше, чем диплоидное. Но диплоидное поколение у мхов уже представляет собой сложное многоклеточное растение. У папоротникообразных соотношение гаплоидной и диплоидной фаз развития противоположно - диплоидное поколение - это крупное растение, тогда как гаплоидный гаметофит, являющийся еще самостоятельным растением, гораздо мельче и живет недолго. У голосеменных и покрытосеменных растений уменьшение гаплоидного поколения зашло так далеко, что их гаметофиты состоят только из нескольких клеток. У покрытосеменных мужской гаметофит (пыльцевое зерно) состоит всего из двух клеток, а женский гаметофит (зародышевый мешок) - из семи.

Объяснить эволюцию цикла воспроизведения растений, которая привела к уменьшению гаплоидного гаметофита до небольшой группы клеток, можно несколькими причинами. Во-первых, у диплоидного организма две копии каждого гена. Если испортился или плохо работает один из генов, его "напарник" исправит положение, и диплоидный организм не погибнет. Поэтому диплоидные организмы жизнеспособнее гаплоидных. Во-вторых, уменьшение мужского гаметофита связано с появлением опыления. У мхов и папоротников для переноса сперматозоида к яйцеклетке необходима водная пленка, по которой он мог бы плыть. Опыление устранило зависимость растений от воды, но чтобы переноситься по воздуху ветром или насекомыми-опылителями мужской гаметофит стал очень маленьким. В-третьих, для перехода к наземной жизни растениям были нужны проводящие и механические ткани. Но эти ткани имелись только у спорофитов. Поэтому на суше было больше шансов выжить у растений с продолжительной спорофитной и короткой гаметофитной стадиями цикла воспроизведения.

### ЭВОЛЮЦИЯ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Первые животные появились более 3.3 млрд. лет назад в архейский период архерозойской эры. Такие примитивные животные продолжают существовать и в наше время и их объединяют в тип *простейшие*. Несмотря на примитивность, они за миллиарды лет своего существования очень хорошо приспособились к разным условиям обитания, и это позволяет им сосуществовать наравне с более высокоорганизованными животными.

Простейшие (корненожки, жгутиковые, инфузории и споровики) повсеместно распространены и их насчитывается более 30 тыс. видов.

Роль органов у простейших выполняют клеточные органеллы, например, жгутики и реснички - органы движения, сократительные вакуоли - органы выделения и т.п. Органеллы могут быть высоко специализированы, как, например, *трихоцисты* некоторых инфузорий - короткие палочки в наружном слое клеточной цитоплазмы, которые при раздражении животного выстреливаются наружу, превращаясь в длинную упругую нить, вонзаются в тело врага или добычи и вносят в него ядовитое вещество. Базальные тельца ресничек инфузорий связаны между собой волоконцами, которые обеспечивают согласованную работу ресничек (которых может быть 10 - 15 тыс.), - зачаток нервной системы, а у некоторых инфузорий есть сократительные актин-миозиновые волокна - зачаток мышечной системы движения. Демонстрируя высокую степень специализации различных клеточных органелл, инфузории являются пределом сложности строения одноклеточного организма. Последующее повышение сложности организации могло быть связано только с появлением многоклеточности.

Многоклеточный организм отличается от колонии клеток тем, что клетки, по крайней мере, частично утрачивают самостоятельность и начинают специализироваться для выполнения разных функций. Простейшие многоклеточные животные двуслойные: имеют слой внутренних жгутиковых клеток для пищеварения (*энтодерму*) и слой наружных защитных клеток (*эктодерму*). Общеизвестно, что многоклеточные животные произошли от колонии жгутиковых клеток, однако как произошло такое превращение, остается спорным вопросом. Существует несколько гипотез. Гастрейная гипотеза Геккеля предполагает, что стенка шарообразной колонии втянулась внутрь, и возник двуслойный организм с первичным ртом, ведущим в первичную пищеварительную полость. Такое преобразование (бластулы в гастролу) действительно происходит в онтогенетическом развитии всех многоклеточных животных. Однако эта гипотеза не отвечает на вопрос, почему в эволюции произошло такое впячивание. По гипотезе Бючли предком многоклеточных была не шаровидная колония, а колония в форме двуслойной пластинки: нижний слой клеток - для питания, а верхний - для защиты (такие организмы есть и сейчас - это *трихоплакс*). Пластинка свернулась, и образовалась пищеварительная полость. Наконец, в соответствии с гипотезой Мечникова питание первых многоклеточных и колониальных жгутиковых сходно: насытившиеся отдельные клетки погружались вглубь колонии и там переваривали пищу. Со временем это разделение на внешнее и внутреннее стало постоянным. Но в любом случае эволюционное развитие первых многоклеточных животных, вероятно, происходило так, как показано на рис. 196.

*Губки* - одни из самых примитивных многоклеточных организмов. Они имеют пять типов специализированных клеток (рис. 197), но взаимозависимость между клетками тела еще очень мала. Об этом свидетельствует тот факт, что если губку протереть через сито, образовавшаяся каша, состоящая из отдельных клеток и групп клеток, оказывается способной к восстановлению целого организма. У губок сохраняется самое примитивное внутриклеточное пищеварение, и они способны как к половому, так и вегетативному (почкованием) размножению.

*Кишечнополостные* - это тоже двуслойные животные, но число специализированных клеточных элементов у них возрастает до 6 - 7 (рис. 198), и в дополнение к внутриклеточному пищеварению добавляется пищеварение в пищеварительной полости (кишке). У кишечнополостных появляется диффузная нервная система и первые органы чувств - простые глаза, служащие только для различения света и тьмы, и *статоцисты* (органы равновесия). Они становятся способны к движению благодаря эпителиально-мышечным клеткам с развитой системой актин-миозиновых



волокон. Так же, как губки, кишечнополостные способны как к половому, так и к вегетативному размножению.

Кишечнополостные животные имеют радиальную симметрию из-за прикрепленного или малоподвижного образа жизни, когда пища может появиться с любой стороны. Переход к активному движению сопровождался появлением переднего конца тела, которым животное наталкивается на препятствия и на добычу. На этом конце начинают скапливаться нервные клетки и органы чувств, он становится головным, возникает двусторонняя (билатеральная) симметрия. Такая симметрия тела возникает у *плоских червей*, перешедших от плавания к ползанию по дну. Но у них еще сохраняется черты, оставшиеся от радиальносимметричных кишечнополостных предков: например, рот у планарии расположен все еще в середине живота, а кишечник не имеет анального отверстия и разветвлен как на правую и левую стороны тела, так и по радиусам от глотки во все стороны. Однако строение ресничных плоских червей отличается значительно более высокой организацией по сравнению с кишечнополостными животными (рис. 199).

Плоские черви, как и все эволюционно следующие за ними живот-

ные, трехслойны: в процессе онтогенеза у них формируется не два, как у губок и кишечнополостных, а три зародышевых листка. Между эктодермой, образующей покровы, и энтодермой, из которой построен кишечник, у них еще имеется промежуточный зародышевый листок - *мезодерма*. Важная особенность строения плоских червей - это наличие у них кожно-мышечного мешка. Так называется совокупность эпителия и расположенной непосредственно под ним сложной системы дифференцированных мышечных волокон. Впервые в эволюции у плоских червей возникает выделительная система. *Пламенные клетки*, имеющие внутри бьющиеся реснички, создают ток воды, который выносит собираемые отходы метаболизма в собирательные трубочки, ведущие к мельчайшим порам на поверхности животного (рис. 199). Нервная система состоит из парного мозгового ганглия и идущих от него назад нервных стволов, соединенных кольцевыми перемышками. Тело плоских червей может быть достаточно протяженным, но сплющено в спинно-брюшном направлении, так как дыхательной и кровеносной систем у них нет, и кислород поступает в тело червя путем диффузии через всю поверхность тела. Плоские черви гермафродиты, но некоторые из них способны к бесполому размножению посредством поперечного деления перетяжкой.

Тело плоских червей не имеет полости. Полость тела, отличающаяся от пищеварительной полости тем, что не имеет сообщения с наружной средой появилась впервые у *круглых червей*. Полость тела заполнена жидкостью и выполняет несколько функций: 1) несжимаемая жидкость придает упругость телу червя (гидроскелет); 2) через полость тела происходит транспорт веществ, усвоенных из пищи, от кишечника к мускулатуре и половой системе; 3) через полость тела осуществляется вынос продуктов обмена к органам выделения, которыми служат специальные кожные железы. Таким образом, полость тела играет роль внутренней среды организма. Кроме того, у этого типа червей появилась задняя кишка и анальное отверстие, кишечник стал сквозным (рис. 200). Снаружи круглые черви одеты сложно устроенной многослойной *кутикулой*, которая вместе с гидроскелетом создает опору для мускулатуры. Из-за жесткой кутикулы рост сопровождается линькой. В отличие от плоских червей они раздельнополы и неспособны к регенерации.

Значительное усложнение строения происходит у *кольчатых червей*. Их общей особенностью является сегментированность туловища, составленного из большого количества повторяющихся члеников одина-

кового строения. Наиболее сложно устроены многощетинковые кольчатые черви (рис. 201). Для их туловища характерно присутствие на каждом членике тела парных боковых выростов - *параподий*. Это короткие,

мускулистые и подвижные выросты тела, заканчивающиеся пучком щетинок. Движения параподий однообразны, они загребают спереди назад и, зацепляя щетинками за неровности субстрата, продвигают животное вперед, но это уже первые, хотя и очень примитивные конечности. У многощетинковых кольчатых червей впервые в эволюции появляются кровеносная система и органы дыхания. Органы дыхания представляют собой видоизмененный участок параподии, превратившийся в жабру. Кровеносная система замкнутая. Она состоит из спинного и брюшного сосудов, связанных кольцевыми сосудами, заходящими в жабры параподий. Движение крови осуществляется за счет сокращений стенок сосудов. Кровь содержит гемоглобин, но эритроцитов нет, а гемоглобин растворен прямо в жидкости крови. Выделительная система представляет собой пару трубочек в каждом сегменте тела, открывающихся одним концом в полость тела, а другим - наружу. Нервная система кольчатых червей состоит из окологлоточного нервного кольца и брюшной нервной цепочки.

От древних кольчатых червей ведет начало несколько новых типов животных, в том числе и моллюски. Несмотря на то, что они совсем не похожи на червей, сходство личинок и некоторых черт внутреннего строения указывает на эволюционную родственность этих двух типов животных. Происхождение моллюсков иллюстрирует дополнение А.Н. Северцова к биогенетическому закону Мюллера-Геккеля: в онтогенезе могут закладываться новые пути филогенеза. Предполагают, что личинка каких-то кольчатых червей отклонилась в своем развитии от обычного пути, и это привело к возникновению нового типа животных. Тело моллюсков состоит из трех отделов - головы, туловища и ноги. Туловище

- это внутренностный мешок на спинной стороне, нога - мускулистый вырост брюшной стенки тела, служащий для движения. Основание туловища окружено большой кожной складкой - *мантией*. Между мантией и туловищем - *мантийная полость*. В ней находятся жабры, некоторые органы чувств, открываются отверстия задней кишки, почек и полового аппарата. На спинной стороне, как правило, находится известковая раковина: углекислая известь добывается из заглатываемой моллюсками воды и пищи и затем выделяется специальными железами, расположенными на поверхности мантии. Кровеносная система моллюсков незамкну-

тая, но у них имеется сердце, состоящее из желудочка и 1 - 4 предсердий. Выделительная система представлена почками, нервная система

- разбросанно-узлового типа. Моллюски подразделяются на три непохожих друг на друга класса - *брюхоногие*, *двустворчатые* и *головоногие*.

Брюхоногие моллюски имеют голову с 1 - 2 парами щупалец и пару глаз, нога с широкой ползательной подошвой, а раковина из одного куска (рис. 202). Характерная черта брюхоногих - асимметричность строения: во внутреннем строении у них происходит редукция правых органов (правой половины печени, правого предсердия и правой почки), сопровождающаяся компенсаторным развитием их левых партнеров, а во внешнем строении - закрученность раковины почти всегда по часовой стрелке. Нога может видоизменяться для плавания у плавающих форм (крылоногие моллюски), а раковина иногда может отсутствовать (слизни, плавающие моллюски). Брюхоногие моллюски сумели освоить сушу: у наземных брюхоногих моллюсков вместо жабр развились легкие для дыхания. Некоторые брюхоногие моллюски перешли затем к жизни в пресноводных водоемах, но жабры у них вновь не появились (закон необратимости эволюции) и они дышат атмосферным воздухом, заглатывая его во время всплытия на поверхность.

У двустворчатых моллюсков голова редуцирована, и тело состоит только из туловища и ноги. Узкая нога служит им не столько для ползания, сколько для рытья песка или ила, раковина состоит из двух частей. Края мантийной полости, в которой находятся нога и жабры, обычно срастаются и образуются *вводной* и *выводной сифоны* (рис.

203). Двустворчатые моллюски, так же, как губки, фильтраторы: вода вводится через вводной сифон, приносит кислород к жабрам и пищевые частицы ко рту и выводится через

задний выводной сифон. Головоногие моллюски - активные хищники, раковина у них рудиментарна или отсутствует. Нога у них видоизменяется, образуя 8 - 10 щупалец с присосками для удержания добычи. У кальмара из другой части видоизмененной ноги образуется сифон, через который вода из мантийной полости с силой выталкивается наружу, сообщая животному обратный толчок (рис. 204, А). У головоногих моллюсков хорошо развиты органы чувств, так, например, многие из них обладают сложно устроенными глазами, очень похожими по строению на глаза человека (рис. 204, Б). Однако глаза головоногих обладают аккомодацией, которая совершается не изменением кривизны хрусталика (как у человека), а его приближением и удалением от сетчатки.

Уже у древних кольчатых червей начался процесс дифференциации в строении первоначально одинаковых члеников в зависимости от выполняемой ими функции. Во всех случаях передние параподии изменяли свою специализацию. Для передвижения стали служить параподии следующих сегментов, а передние наклонялись вперед и стали подгрести пищу ко рту, а затем зажимать и измельчать ее. Таким образом из самых передних конечностей параподий образовалось несколько пар челюстей и ногочелюстей *членистоногих* животных (рис. 205). Остальные параподии по всему телу удлинились, расчленились и стали ногами. Однако челюсти и ноги были не единственными эволюционными приобретениями членистоногих, повышение уровня их строения было связано также с появлением прочного хитинового наружного скелета. Такой скелет-оболочка был надежной защитой, в том числе и от обезвоживания, что создало возможность для членистоногих осваивать сушу. В то же время наружный скелет привел к распаду единого кожно-мышечного мешка на группы отдельных мышц-антагонистов. Тем временем специализация первоначально многочисленных конечностей продолжалась, что привело к неравномерному расчленению тела и образованию сначала двух отделов тела - головогруди и брюшка (рис. 205), а затем трех - головы, груди и брюшка (рис. 206). У паукообразных и насекомых членики брюшка потеряли свои конечности. Только на заднем конце они еще сохранились в виде придатков в видоизмененном виде - как яйцеклад или жало у насекомых и как паутинные бородавки у пауков.

Органы дыхания у членистоногих разнообразны. У ракообразных - это жабры, у паукообразных - легочные мешки и трахеи, а у насекомых - трахеи. Легочные мешки образовались как приспособление к жизни на суше в результате углубления жаберных выростов под покровы, где они были защищены от высыхания. Трахеи образовались позже, независимо от легочных мешков, как впячивания наружных покровов. У насекомых трахеи представляют собой разветвленную систему трубочек, доставляющих кислород во все части тела. У насекомых впервые образовались и крылья, но не из конечностей, как у птиц и летучих мышей, а из кожистых боковых складок. Такие складки сначала служили лишь для планирования, а затем приобрели собственную подвижность. Насекомые стали первыми летающими животными на Земле. Все эти усовершенствования позволили членистоногим и прежде всего насекомым широко расселиться, освоив самые разнообразные местообитания.

## ЭВОЛЮЦИЯ ПОЗВОНОЧНЫХ

Предполагают, что предками позвоночных животных были малоподвижные кольчатые черви. Ископаемых остатков их не сохранилось, но среди современных животных есть такие, которые сочетают признаки хордовых и червей. Это *полухордовые* или *кишечнодышащие*, - червеобразные организмы, зарывающиеся в ил или песок. Их кишечник в передней своей части пронизан по сторонам отверстиями, сквозь которые выходит вода, попадающая через рот, и омывает кровеносные сосуды, принося кислород. Такие отверстия, служащие для дыхания, называются *жаберными щелями* (рис. 207, Б, 1). Спинная часть стенки кишечника у кишечнодышащих уплотняется и отходит сначала только в передней его части, подпирая хоботок и помогая рыться в иле. Это уплотнение стало, вероятно, отщепляться от

кишечника все дальше и дальше к заднему концу, пока не отделилось в виде хорды (рис. 207, А). Жаберные щели и хорда обязательно появляются на ранних стадиях развития зародыша всех позвоночных. А позже у одних, например рыб, эти органы сохраняются до старости, а у других заменяются или зарастают, исчезают.

Благодаря хорде животные стали быстрее плавать, так как тело получило упругость, а мышцы - опору. Для прететствования переворачиванию во время плавания вдоль тела появились продольные складки кожи, служащие стабилизаторами (рис. 207, Б, 2). Животные с такими складками сохранились до наших дней - это *ланцетники*. От подобных животных произошли все позвоночные. У них вдоль по хорде стали закладываться хрящевые пластинки в каждом сегменте тела отдельно, сраставшиеся так, что получились хрящевые кольца, сквозь которые проходила хорда и лежавшая над ней спинная нервная трубка - спинной мозг. Колечки эти стали позвонками (наследие сегментированности кольчатых червей), а в головном конце спинной мозг разрастался, образуя головной мозг, вокруг которого для его защиты образовалась хрящевая черепная коробка. Пространства между жаберными щелями тоже укрепились при помощи хрящей - возникли *жаберные дуги*. Плавниковые складки из непрерывных стали прерывчатыми, во внутрь этих складок стали вращать частоколом хрящевые опорные палочки - сформировались плавники (рис. 207, Б, 3).

Передние хрящевые дуги вскоре стали утолщаться и приобрели подвижность, образовав челюсти. Тело по всей поверхности покрылось острыми защитными костными чешуйками в виде сосочков, концами назад. Чешуйки вместе с кожей заходили и в рот, покрывая края челюстей (рис. 208). Здесь они усилились, образуя "терку", помогающую удерживать и измельчать добычу. Так возникли *акуловые рыбы*. От них ведет начало все разнообразие рыб, приспособляющихся к разным условиям. Жаберные щели спрятались под жаберными крышками. Хрящевой скелет стал замещаться костной тканью. У многих рыб стал образовываться плавательный пузырь (у акул его не было) из выпячивания стенки кишечника (рис. 209). К стенкам пузыря подходят кровеносные сосуды с растворами газов. У большинства рыб плавательный пузырь - лишь гидростатический орган, однако иногда он помогает при дыхании. *Двоякодышащие рыбы*, когда водоемы пересыхают, зарываются в ил. Жабры у них при отсутствии влаги перестают функционировать, но воздух свободно проходит через кишечник в плавательный пузырь. Венозные сосуды, оплетающие стенку пузыря, отдают углекислый газ, и кровь насыщается через те же стенки кислородом. Это показывает, что плавательный пузырь мог превратиться у древних рыб в легкое, если кровеносный сосуд, идущий к пузырю, ответвлялся раньше разветвления на жаберные капилляры и нес к пузырю венозную кровь.

Второе важное изменение связано с усилением костей и мускулов грудных плавников, наблюдаемое у *кистеперых рыб* и помогающее им шагать на своих плавниках по дну водоемов (рис. 210). Оба этих новообретения позволили рыбам начать осваивать сушу во время очередного понижения уровня океана, когда оказались заболоченными огромные территории. Сейчас найдены в ископаемом виде все переходные стадии от рыб к *земноводным*. На животе таких переходных форм - *стегоцефалов* - еще сохранялась рыба по происхождению костная чешуя, короткие конечности с 6 - 7 пальцами были малоподвижны, у некоторых сохранились жаберные дуги и боковая линия (рис. 211). У земноводных возникли легкие и второй круг кровообращения, веки для защиты глаз, чешуя заменилась слизистой кожей (дополнительный орган для дыхания), появились ноздри, и появился новый орган кроветворения - красный костный мозг трубчатых костей. Поскольку воздух хуже проводит звук, чем вода, у земноводных образовалось среднее ухо, косточки которого (наковаленка, стремечко и молоточек) - это видоизмененные остатки жаберных дуг.

Однако так же, как современные земноводные, древние земноводные не могли жить вдали от воды, в которую они откладывают икру. Разорвать эту зависимость от водной среды удалось только *пресмыкающимся*, или *рептилиям*. Это произошло благодаря перемещению части стадий развития зародыша внутрь водной среды яйца, защищенного от высыхания плотной кожистой скорлупой (рис. 212). Детеныш у них рождается уже с сформировавшимися легкими. Разнообразные рептилии приспосабливались к разным условиям и дали начало двум новым классам животных - *птицам* и *млекопитающим*. Предполагают, что бегающие на задних конечностях ящеры совершали прыжки и передними конечностями действовали на бегу, как рулями. Роговая чешуя у них стала вытягиваться, образуя гребенки, зачерпывающие при беге больше воздуха. Постепенно они переходили к планированию. Удлинившиеся чешуйки расщеплялись "елочкой", образуя перья, или по радиусам от центра, образуя пух. Постепенно происходило преобразование таких лазающих по деревьям и планирующих ящеров в птиц (рис. 213). Но полет требует больших затрат энергии, поэтому позволить себе такую "роскошь", могли только такие животные, у которых сердце стало четырехкамерным и произошло полное разделение двух кругов кровообращения. За счет полного разделения венозной и артериальной крови у них резко повысился уровень обмена веществ в организме, и они могли регулировать температуру своего тела - стали *теплокровными*.

Млекопитающие возникли из отдельной группы пресмыкающихся - *звероящеров*. Между чешуйками у них начали вырастать волоски в шахматном порядке, пучками по 3 - 5 штук. Из особо длинных и грубых волос на голове образовались усы, необходимые для осязания. Чешуя оттеснялась волосами и дольше всего сохранялась на хвосте (как и у современных нутрий и крыс). Чешуя сохранилась еще на концах пальцев в виде когтей. Волосяной покров в совокупности с четырехкамерным сердцем тоже позволил млекопитающим регулировать температуру тела и стать теплокровными. Самка не покидала вышедших из яиц детенышей, и они слизывали с нее выделения кожных желез, из которых вытекали, вероятно, как соленый пот, так и жировая смазка кожи. Позже железы стали неодинаковыми: одни стали выделять только пот, другие - только жир, а третьи, по краям живота, где детенышам было удобно лизать свою мать, - раствор мелких капелек жира с другими питательными веществами. Эти железы развивались и стали молочными железами.

Первые млекопитающие были яйцекладущими. Однако если яйцо в утробе матери задерживается и покрыто пористой скорлупой, то это позволяет зародышу питаться жидкими питательными веществами из крови матери. При утробном развитии яйца питание зародыша от стенок матки постепенно стало основным, а питание желтком утратило свое значение. Постепенно скорлупа стала только мешать питанию и совсем исчезла. Таким образом возникли живородящие млекопитающие. Дальнейшее приспособление млекопитающих к разным условиям привело к появлению их современного многообразия (рис. 215).

## КРАТКИЕ ВЫВОДЫ

В эволюции растений хорошо прослеживается эволюция полового размножения: во-первых, переход от одинаковых гамет к высокоспециализированным женским яйцеклеткам и мужским спермиям, и, во-вторых, постепенная специализация гаметофитов, максимально выраженная у покрытосеменных растений. Эволюция животных, активно подвижных из-за способа питания захватыванием пищи, связана, главным образом, с совершенствованием управления организмом как единым целым путем развития нервной системы.

Возникновение специализированных частей цветка как результат видоизменения одинаковых частей побега, специализация первоначально одинаковых сегментов тела и

конечностей членистоногих или жаберных дуг у позвоночных - это всего лишь несколько ярких примеров, иллюстрирующих общий эволюционный принцип, легко прослеживающийся на всех уровнях биологической организации: сначала возникает множество копий (размножение) какого-либо элемента (гена, клетки, органа или организма), затем накапливаются изменения и формируется первоначальное разнообразие, потом происходит комбинаторное увеличение этого разнообразия, которое сопровождается отбором оптимальных (в отношении критериев отбора) элементов. Отбор означает преимущественное копирование (воспроизведение) оптимального элемента по сравнению со всеми другими, что и приводит, в конечном итоге, к возникновению новых генов, тканей, органов или видов.

Таким образом, поиск критериев оптимальности, лежащих в основе эволюционного отбора на разных уровнях организации жизни, и выяснение их взаимодействия может послужить полезной методологией для анализа существующего ныне биологического разнообразия.