

Molecular Biology of the Cell

Bruce Alberts, Dennis Bray,
Julian Lewis, Martin Raff,
Keith Roberts, James D. Watson

Garland Publishing, Inc.
New York London

Б.Албертс
Д.Брей
Дж.Льюис
М.Рэфф
К.Робертс
Дж.Уотсон

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

В ПЯТИ ТОМАХ

1

Перевод с английского
канд. биол. наук А. И. Грагера,
канд. биол. наук В. П. Коржа
и Т. Д. Кузьминой
под редакцией чл.-корр. АН СССР
Г. П. Георгиева



Москва

«Мир»

1986

ББК 28.070
М75
УДК 576.3/.7

Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К.,
Уотсон Дж.

М75 **Молекулярная биология клетки: В 5-ти т. Т. 1. Пер.**
с англ. – М.: Мир, 1986. – 223 с., ил.

Энциклопедически полная монография, написанная учеными США и Англии, среди которых лауреат Нобелевской премии Дж. Уотсон, уже известный советским читателям по книге «Молекулярная биология гена» (М.: Мир, 1978). Первый том посвящен эволюции клетки, биосинтезу и энергетике малых молекул, структуре макромолекул и методам изучения клетки.

Предназначена для биологов всех специальностей, преподавателей и студентов университетов, медицинских, педагогических и сельскохозяйственных институтов.

М $\frac{2001040000-174}{041(01)-86}$ подп. изд.

ББК 28.070

Редакция литературы по биологии

© 1983 by Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis,
Martin Raff, Keith Roberts and James D. Watson
© перевод на русский язык, «Мир», 1986

Предисловие редактора перевода

Книга, предлагаемая вниманию советского читателя, несомненно является событием в молекулярно-биологической литературе. В ней впервые осуществлен органичный синтез молекулярной и клеточной биологии, раскрывающий перед читателем стройную и полную картину современной биологии в целом. Книга написана коллективом высококвалифицированных специалистов, среди которых автор книги «Молекулярная биология гена» лауреат Нобелевской премии Дж. Д. Уотсон. По своему стилю «Молекулярная биология клетки» напоминает вышеуказанную монографию Уотсона. Она так же разбита на маленькие главы, в каждой из которых с предельной ясностью и четкостью обосновывается то или иное утверждение. Это способствует хорошему усвоению читателем даже сравнительно сложного материала.

Вместе с тем «Молекулярная биология клетки» отличается от «Молекулярной биологии гена» значительно более полным освещением вопросов клеточной биологии. Большую ценность представляют главы, посвященные развитию и дифференцировке, иммунитету и нейробиологии.

Книга разбита на три части. Первая часть (том 1) служит своего рода введением, в котором описываются общие закономерности метаболизма и подходы к изучению клетки. Вторая часть (тома 2 и 3) посвящена структуре и функциям основных клеточных компонентов. Наконец, третья часть книги (тома 4 и 5) охватывают работу многоклеточных ансамблей у растений и животных: рассматриваются проблемы межклеточных взаимодействий при развитии и дифференцировке, при иммунном ответе и функционировании нервной системы.

Различные главы написаны в одинаковом стиле и уровень изложения довольно равномерный.

По своему содержанию «Молекулярная биология клетки» может служить первоклассным руководством для студентов биологических факультетов университетов. Она может быть полезна также для тех научных сотрудников, которые, начиная работать в новой для себя области биологии, хотят получить общее представление о современном состоянии вопроса и наиболее актуальных проблемах молекулярной и клеточной биологии. Наконец, прочтение книги просто расширит кругозор исследователя, всегда неизбежно замкнутого в своей узкой специальной области.

Заканчивая, хотелось бы отметить, что появление в русском переводе книги «Молекулярная биология клетки» вне всякого сомнения будет способствовать повышению уровня преподавания биологии в университетах, а также в медицинских и педагогических институтах нашей страны.

Книгу переводили: А. И. Грагеров — гл. 1, 3 (том 1), 12 и 13 (том 3); Т. Н. Власик — гл. 6 и 7 (том 2); П. Л. Иванов — гл. 8 (том 2), 10, 11 (том 3) и 19 (том 5); В. П. Корж — гл. 4 (том 1) и 15 (том 4); Г. В. Крюкова — гл. 5 (том 2), 9 (том 3) и 18 (том 5); Т. Д. Кузьмина — гл. 2 (том 1) и 14 (том 4); Н. М. Руткевич — гл. 17 (том 5); Н. В. Сониная — гл. 16 (том 4).

Г. П. Георгиев

Предисловие

«Давно уже стало очевидным, что в конечном счете ключ к решению любой биологической проблемы следует искать именно в клетке, ибо каждый живой организм — это прежде всего клетка или, во всяком случае, был клеткой на каком-то этапе своего развития.»

Эдмунд Б. Уилсон
(Edmund B. Wilson, *The Cell in Development and Heredity*, 3rd edition, Macmillan, Inc., 1925)

Научное познание таит в себе парадокс. Из хаоса фактов, накопленных в стремительном потоке информации, рождается неожиданно простое объяснение ранее загадочных явлений. Так постепенно обнажается сама суть вещей. Современная клеточная биология может служить тому примером. Использование новейших методов молекулярной биологии позволило увидеть изумительное изящество и экономичность процессов, протекающих в живых клетках, и замечательное единство принципов их функционирования. Стремясь донести суть этих принципов до читателя, авторы были далеки от мысли создать энциклопедию научных сведений; напротив, нам хотелось бы предоставить возможность поразмыслить над имеющимися фактами. Безусловно, в биологии клетки все еще остаются неизученными обширные области, и многие известные факты до сих пор не получили объяснения. Но эти нерешенные проблемы как раз и являются наиболее волнующими, и мы старались так их изложить, чтобы побудить читателей включиться в поиски решения неясных вопросов. Поэтому, касаясь малоизученных областей, мы вместо простого изложения фактов часто брали на себя смелость высказывать гипотезы, отдавая их на суд читателя и надеясь на критическое отношение к ним.

В книге «Молекулярная биология клетки» рассматриваются главным образом эукариотические клетки, а не бактерии. Название книги отражает первостепенное значение подходов, определяемых молекулярным уровнем исследования. Именно с позиций молекулярной биологии и рассматриваются клетки в первых двух частях книги, содержание которых в совокупности соответствует традиционным курсам биологии клетки. Но одной молекулярной биологии недостаточно. Эукариотические клетки, из которых состоят многоклеточные животные и растения, — это в высшей степени «социальные» организмы: они живут благодаря кооперированию и специализации. Чтобы понять, как они функционируют, необходимо исследовать роль и место клеток в многоклеточных сообществах, а также узнать, как функционируют изолированные клетки данного типа. Это два совершенно различных, но глубоко взаимосвязанных уровня исследования. Поэтому часть III книги посвящена поведению клеток в организме многоклеточных животных и растений. Таким образом, проблемам биологии развития, гистологии, иммунологии и нейробиологии уделено здесь гораздо больше внимания, чем в других учебниках по биологии клетки. Хотя в основном курсе основ биологии клетки этот материал может рассматриваться как факультативный или дополнительный, он представляет собой важный раздел науки о клетках и должен быть особенно интересен тем, кто решил продолжить изучение биологии или медицины. Широкий охват тем в книге отражает наше убеждение, что в современном биологическом образовании курс биологии клетки должен занимать центральное место.

Книга предназначена в основном для студентов, биологов или медиков, впервые систематически изучающих биологию клетки. Мы предполагаем, что большинство читателей знакомы по крайней мере с вводным курсом биологии, тем не менее мы старались написать книгу так, чтобы даже не знакомый с биологией читатель мог ее понять, при условии что начнет читать книгу

с первых страниц. Наряду с этим мы надеемся, что книга окажется полезной и для научных работников, нуждающихся в руководстве, которое помогло бы им разобраться в обширных областях знаний. Поэтому мы приводим список литературы, значительно более детальный, чем тот, который мог бы понадобиться среднему студенту-дипломнику. В то же время мы старались отобрать лишь те работы, которые можно найти в большинстве библиотек.

Это большая книга, и мы ее долго вышивали – втрое дольше, чем вынашивается слон и в пять раз дольше, чем вынашивается кит. Многие вложили в нее свой труд. Главы книги неоднократно возвращались к автору, написавшему первый черновой вариант, обсуждались и перерабатывались другими авторами, вновь подвергались критике и переписывались, так что каждая глава книги в своем окончательном виде является результатом объединенных усилий. Кроме того, часть материала была предоставлена несколькими специалистами, не входившими в авторский коллектив. Этот материал был переработан нами и приведен в соответствие с остальными разделами книги. Все главы были дополнительно прочтены специалистами, чьи замечания и поправки трудно переоценить. Мы прилагаем полный список благодарностей тем, кто внес непосредственный вклад в эту книгу или критически прочел отдельные главы. Paul Burton (Канзасский университет), Douglas Chandler (Университет штата Аризона), Ursula Goodenough (Вашингтонский университет), Robert E. Pollack (Колумбийский университет), Robert E. Savage (Свартморский колледж) и Charles F. Yocum (Мичиганский университет) прочли рукопись полностью или частично и внесли много полезных предложений. Студенты, читавшие рукопись, помогли выявить неясно написанные и трудные для понимания места.

Советы студентов и специалистов собрала и систематизировала в основном Miranda Robertson. Настояв на том, чтобы каждая страница была ясной и логичной, и переписав страницы, не соответствовавшие этим требованиям, она сыграла главную роль в создании учебника, который студенты прочтут с легкостью. Lydia Malim нарисовала многие рисунки к главам 15 и 16. Целый ряд ученых щедро снабдили нас фотографиями – их фамилии указаны в подписях к соответствующим рисункам. Мы благодарим за снисхождение и понимание наших коллег, которым пришлось взять на себя часть наших обязанностей, а также наши семьи и наших студентов, которым мы в течение ряда лет не уделяли должного внимания. Наконец, наш особенно приятный долг – поблагодарить наших редакторов и издателя. Tony Adams в большой степени способствовал улучшению стиля изложения, а Ruth Adams, чей добрый нрав и высокая работоспособность не раз заставляли авторов краснеть за себя, полностью организовала подготовку издания книги. Gavin Borden взял на себя труд опубликовать книгу, а его неизменные любезность и радушие сделали для нас работу над книгой и приятной, и полезной с познавательной точки зрения.

Благодарности

Главу 1 частично или полностью прочли Tom Cavalier-Smith (Кингс-колледж, Лондон) и Монгое Strickberger (Университет штата Миссури, Сент-Луис).

Главу 2 частично или полностью прочли Charles Gilvarg (Принстонский университет) и Phillips Robbins (Массачусетский технологический институт).

Главу 3 частично или полностью прочли Robert Fletterick (Калифорнийский университет, Сан-Франциско) и Phillips Robbins (Массачусетский технологический институт).

Главу 4 частично или полностью прочли David Sabatini (Рокфеллеровский университет), John Sedat (Калифорнийский университет, Сан-Франциско), Patrick O'Farrell (Калифорнийский университет, Сан-Франциско) и Fred Richards (Йельский университет).

Главу 5 частично или полностью прочли Glen Hegrick (Университет штата Юта), Patrick O'Farrell (Калифорнийский университет, Сан-Франциско) и Brian McCarthy (Калифорнийский университет, Ирвин).

Главу 6 частично или полностью прочли Mark Bretscher (Лаборатория молекулярной биологии Комитета медицинских исследований, Кембридж, Англия), Bastien Gomperts (Медицинская школа Университетского госпиталя, Лондон), Juan Korenbort (Калифорнийский университет, Сан-Франциско) и Dale Oxender (Мичиганский университет).

Глава 7. Основной вклад в написание внес James Rothman (Станфордский университет); частично или полностью прочли George Palade (Йельский университет), Daniel Friend (Калифорнийский университет, Сан-Франциско) и Gary Firestone (Калифорнийский университет, Беркли).

Главу 8 частично или полностью прочли Michael Ashburner (Кембриджский университет), Pierre Chambon (Страсбургский университет), Patrick O'Farrell (Калифорнийский университет, Сан-Франциско), Joseph Gall (Йельский университет), Larry Gerace (Университет Джонса Гопкинса), Glenn Hegrick (Университет штата Юта), E.G. Jordan (Колледж королевы Елизаветы, Лондон), Brian McCarthy (Калифорнийский университет, Ирвин), Robert Regu (Институт раковых исследований, Филадельфия) и Abraham Worcel (Рочестерский университет).

Глава 9. Основной вклад в написание внесли Peter Garland (Университет Данди, Шотландия) и Piet Borst (Институт Яна Сваммердама, Амстердамский университет); частично или полностью прочли Martin Brand (Кембриджский университет), Roderick Capaldi (Орегонский университет), Richard McCarty (Корнельский университет), Allison Smith (Институт Джона Иннеса, Норвич, Англия) и Charles Yocum (Мичиганский университет).

Глава 10. Дополнительный материал предоставили Marc Kirschner (Калифорнийский университет, Сан-Франциско); частично или полностью прочли Roger Cooke (Калифорнийский университет, Сан-Франциско), Graham Dunn (Отделение клеточной биологии Комитета медицинских исследований, Лондон), John Kendrick-Jones (Лаборатория молекулярной биологии Комитета медицинских исследований, Кембридж, Англия), Marc Kirschner (Калифорний-

ский университет, Сан-Франциско) и Klaus Weber (Институт биофизической химии им. Макса Планка, Гёттинген).

Глава 11. Дополнительный материал предоставили J. Michael Bishop (Калифорнийский университет, Сан-Франциско) и Jeremy Pickett-Heaps (Колорадский университет); частично или полностью прочли Leland Hartwell (Вашингтонский университет), J. Murdoch Mitchison (Эдинбургский университет), Zacheus Cande (Калифорнийский университет, Беркли) и John Wyke (Имперский фонд раковых исследований, Лондон).

Глава 12. Дополнительный материал предоставили Günter Gerisch (Институт биохимии им. Макса Планка, Мартинсрид) и Robert Trelstand (Медицинская школа Ратджерса); частично или полностью прочли Stephen Burden (Гарвардская медицинская школа), Max Burger (Базельский университет), Bernie Gilula (Бейлорский университет), Zach Hall (Калифорнийский университет, Сан-Франциско), Richard Hynes (Массачусетский технологический институт), Colin Manoil (Гарвардская медицинская школа), Dagwin Prockop (Медицинская школа Ратджерса), David Rees (Национальный институт медицинских исследований, Милл-Хилл, Лондон), John Scott (Манчестерский университет) и Malcolm Steinberg (Принстонский университет).

Глава 13. Дополнительный материал предоставили Michael Wilcox (Лаборатория молекулярной биологии Комитета медицинских исследований, Кембридж, Англия); частично или полностью прочли Peter Baker (Кингс-колледж, Лондон), Philip Cohen (Университет Данди), Daniel Koshland (Калифорнийский университет, Беркли), Anne Mudge (Университетский колледж, Лондон), Jesse Roth (Национальные институты здоровья, Бетесда) и Charles Stevens (Йельский университет).

Глава 14. Основной вклад в написание внес David Epel (Станфордский университет); частично или полностью прочли Adelaide Carpenter (Калифорнийский университет, Сан-Диего), Jeffrey Hall (Брэндисский университет), Anne McLaren (Университетский колледж, Лондон), Montrose Moses (Университет Дьюка), Duncan O'Dell (Университетский колледж, Лондон), David Phillip (Рокфеллеровский университет) и Lewis Tilney (Пенсильванский университет).

Глава 15. Основной вклад в написание внесла Cheryl Tickle (Медицинская школа Миддлсекского госпиталя, Лондон), дополнительный материал предоставила Judith Kimble (Висконсинский университет); частично или полностью прочли John Gerhart (Калифорнийский университет, Беркли), Peter Lawrence (Лаборатория молекулярной биологии Комитета медицинских исследований, Кембридж, Англия), Anne McLaren (Университетский колледж, Лондон), Norman Wessels (Станфордский университет) и Lewis Wolpert (Медицинская школа Миддлсекского госпиталя, Лондон).

Глава 16. Дополнительный материал предоставил Vernon Thornton (Кингс-колледж, Лондон); частично или полностью прочли Barry Brown (Кингс-колледж, Лондон), Judah Folkman (Гарвардская медицинская школа), Peter Gould (Медицинская школа Миддлсекского госпиталя, Лондон), Jay Lasb (Пенсильванский университет), John Owen (Бирмингемский университет, Англия), Philippe Sengel (Гренобльский университет), Cheryl Tickle (Медицинская школа Миддлсекского госпиталя, Лондон) и Rosalind Zalin (Университетский колледж, Лондон).

Главу 17 частично или полностью прочли Leroy Hood (Калифорнийский технологический институт), Peter Lachman (Центр Комитета медицинских исследований, Кембридж, Англия), Aviron Mitchison (Университетский колледж, Лондон), Alan Munro (Кембриджский университет), Hans Müller-Eberhard (Скриппсовские клиника и институт), William Paul (Национальные институты здоровья, Бетесда), Robert Schreiber (Скриппсовские клиника и институт) и Martin Weigert (Институт раковых исследований, Филадельфия).

Глава 18. Основной вклад в написание внес Charles Stevens (Йельский университет), дополнительный материал предоставил Regis Kelley (Калифорнийский университет, Сан-Франциско); частично или полностью прочли Jonathan Ashmore (Суссекский университет, Англия), Peter Baker (Кингс-колледж, Лон-

дон), Darwin Berg (Калифорнийский университет, Сан-Диего) и Anne Mudge (Университетский колледж, Лондон).

Глава 19. Основной вклад внес Brian Gunning (Австралийский национальный университет, Канберра); частично или полностью прочли Jim Dipwell (Институт Джона Иннеса, Норвич, Англия), Ray Evert (Висконсинский университет, Мэдисон), Larry Fowke (Саскачеванский университет, Саскатун), John Hall (Саутгемптонский университет, Англия), David Hankey (Кембриджский университет, Англия), Andy Johnston (Институт Джона Иннеса, Норвич, Англия), Virginia Walbot (Станфордский университет), Trevor Wang (Институт Джона Иннеса, Норвич, Англия) и John Watts (Институт Джона Иннеса, Норвич, Англия).

Пролог

Нам сейчас слишком легко недооценивать клетки. Мы узнаем о них так рано, что по большей части перестаем осознавать, сколь они замечательны на самом деле. Уже когда мы усваиваем азы науки, нам говорят, что все живое состоит из клеток, что клетки возникают путем роста и деления предсуществующих клеток и что они могут существовать как в одиночку, в виде одноклеточных организмов, так и в качестве составных частей необычайно сложных организмов, которые могут содержать миллиарды взаимодействующих высокоспециализированных единиц. Именно в силу способности клеток широко варьировать по размерам, форме и функции эволюция происходила в столь различных направлениях.

Простое перечисление названий различных клеточных структур и описание уникальных свойств клеток не вызывают интереса. Однако сухие факты, приведенные в учебнике, приобретают новое значение, когда мы впервые смотрим в простенький школьный микроскоп на мельчайшие одноклеточные создания – вроде амебы или парамеции, населяющие капельки прудовой воды. Тогда клетка оживает для нас как удивительное движущееся тельце. Естественно, возникает желание узнать, из каких именно молекул она построена и каким образом она может столь регулярно расти и делиться, производя себе подобных. Однако вплоть до 50-х годов эти вопросы казались далеко выходящими за рамки наших научных возможностей. До этого времени нам не оставалось ничего другого, как сконцентрировать свое внимание на описательном морфологическом подходе, используя все более и более совершенные микроскопы для выявления новых клеточных структур. Им часто давали экстравагантные названия, такие, как «эргастоплазма» или «хондриосомы», не имея ни малейшего представления ни о назначении, ни о функции этих структур. Неудивительно, что многие находили подобный подход неудовлетворительным и перешли от изучения клетки как таковой к анализу химических реакций, лежащих в основе ее жизнедеятельности, поскольку методы такого анализа становились все более доступными.

Эти «биологи, ставшие биохимиками», вскоре обнаружили, что для построения новых биологических молекул клетки используют энергию молекул питательных веществ. Таким образом, было установлено, что клетки могут расти и делиться, не нарушая законов термодинамики, согласно которым спонтанные реакции должны сопровождаться выделением тепла и приводить к возрастанию неупорядоченности. Столь быстрые достижения воодушевили еще большее число ученых, считавших, что сущность клеток исчерпывается их молекулярной организацией и путями ферментативного синтеза и распада молекул. Однако по-прежнему непонятным оставалось место генов в этой химической картине. В частности, было неясно, играют ли они какую-либо роль в правильном связывании между собой сотен аминокислот при образовании типичной молекулы белка. Еще в 40-х годах нельзя было даже представить себе, как это могло бы происходить, и никто не мог предположить, с какой неслыханной скоростью в короткий период между 1953 и 1966 гг. будут раскрыты природа и пути передачи генетической информации. Когда же была установлена доминирующая роль ДНК, возникло ощущение, что, поняв

структуру и функции нуклеиновых кислот, мы поняли сущность живого состояния и что величайшие загадки биологии разрешены.

Мы этого взгляда не разделяем. Сложное переплетение метаболических путей от АТФ до ДНК, сколь бы удивительным оно ни было, еще не есть живая клетка. Даже самые простые клетки значительно сложнее, чем обычно считают, и построены они куда более искусно, чем любой из до сих пор сконструированных компьютеров. В этом можно убедиться путем простого наблюдения за клетками. Нет нужды заглядывать под их оболочку, чтобы оценить исключительную тонкость и гибкость биологической организации, обеспечивающей столь рациональное поведение клеток.

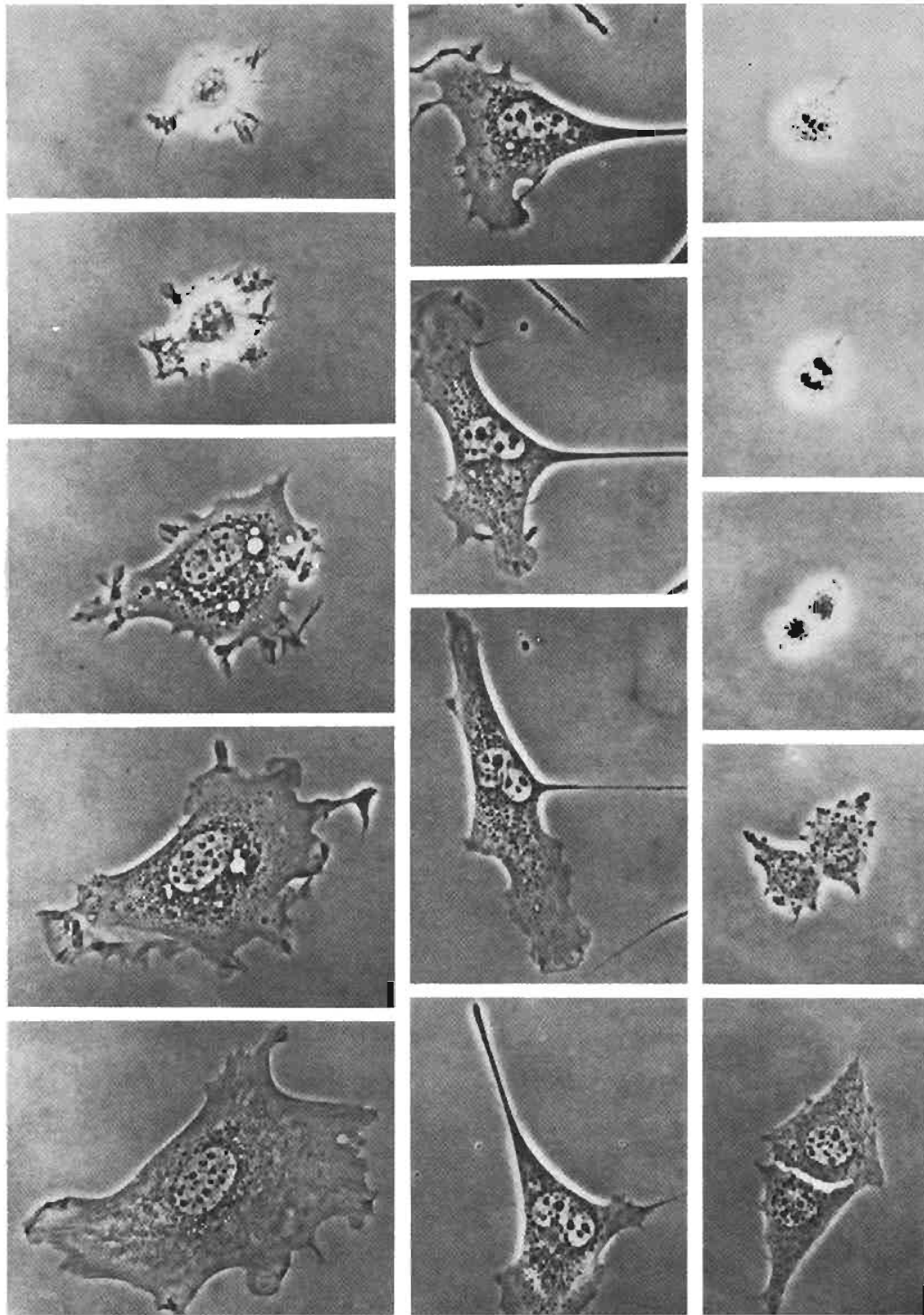
Рассмотрим, например, необычайно сложные изменения формы клетки, происходящие при движении фибробластов. Эти клетки соединительной ткани являются основными производителями межклеточного матрикса, «скрепляющего» ткани многоклеточного организма, и поэтому они всегда должны быть готовы к перемещению в те участки тканей, где происходит новообразование. Поскольку фибробласты, растущие в культуре, можно исследовать под микроскопом, то наличие таких культур дало возможность использовать кино съемку для детального изучения морфологических изменений, происходящих при перемещении фибробластов из одной точки в другую.

Таким путем было установлено, что изолированный сытый фибробласт — неустойчивое, явно неудовлетворенное создание. Он не способен оставаться на месте: он запрограммирован так, что постоянно движется. Он и все его потомство будут продолжать двигаться до тех пор, пока плоская поверхность пластиковой чашки не покроется монослоем плотно упакованных клеток. Движущийся фибробласт напоминает амебу с ее выпячиваемыми псевдоподиями, которую мы впервые увидели на уроках биологии в младших классах школы, однако детали их движений не одинаковы.

Движение фибробласта начинается с быстрого, практически мгновенного выбрасывания нитевидных (микрошипы) и листовидных (ламеллоподии) выростов. Каждый из этих выростов способен прочно присоединиться к поверхности субстрата, находящейся впереди клетки. Прикрепление выроста приводит к тому, что клетка и заключенное в ней ядро перетекают вперед. Лишь очень незначительная часть выброшенных вперед локомоторных выростов прочно присоединяется к подложке, те же, которым это не удалось, откатываются в виде своеобразной «бахромы» с обратным током верхней поверхности, который в конце концов направляет их в заднюю часть клетки. Таким путем клетка может перебрать много потенциальных точек прикрепления и выбрать из них наиболее благоприятные, с которыми и устанавливается прочный контакт.

Присущая фибробластам способность долго и непрерывно путешествовать в одиночку свойственна не всем клеткам. Например, если поместить в культуру единичную эпителиальную клетку из тех, что выстилают наш кишечник или формируют кожу, она не проявит тенденции к движению. Таким образом, локомоторное поведение данного типа клеток оказывается в высокой степени предопределенным и, как практически любые важные клеточные события, никогда не бывает случайным. В результате точное конечное положение данной клетки многоклеточного организма определяется огромным числом строго регулируемых биохимических стадий, которые фактически не оставляют клетке иной возможности, кроме образования конкретной конфигурации, гармонирующей с другими клетками.

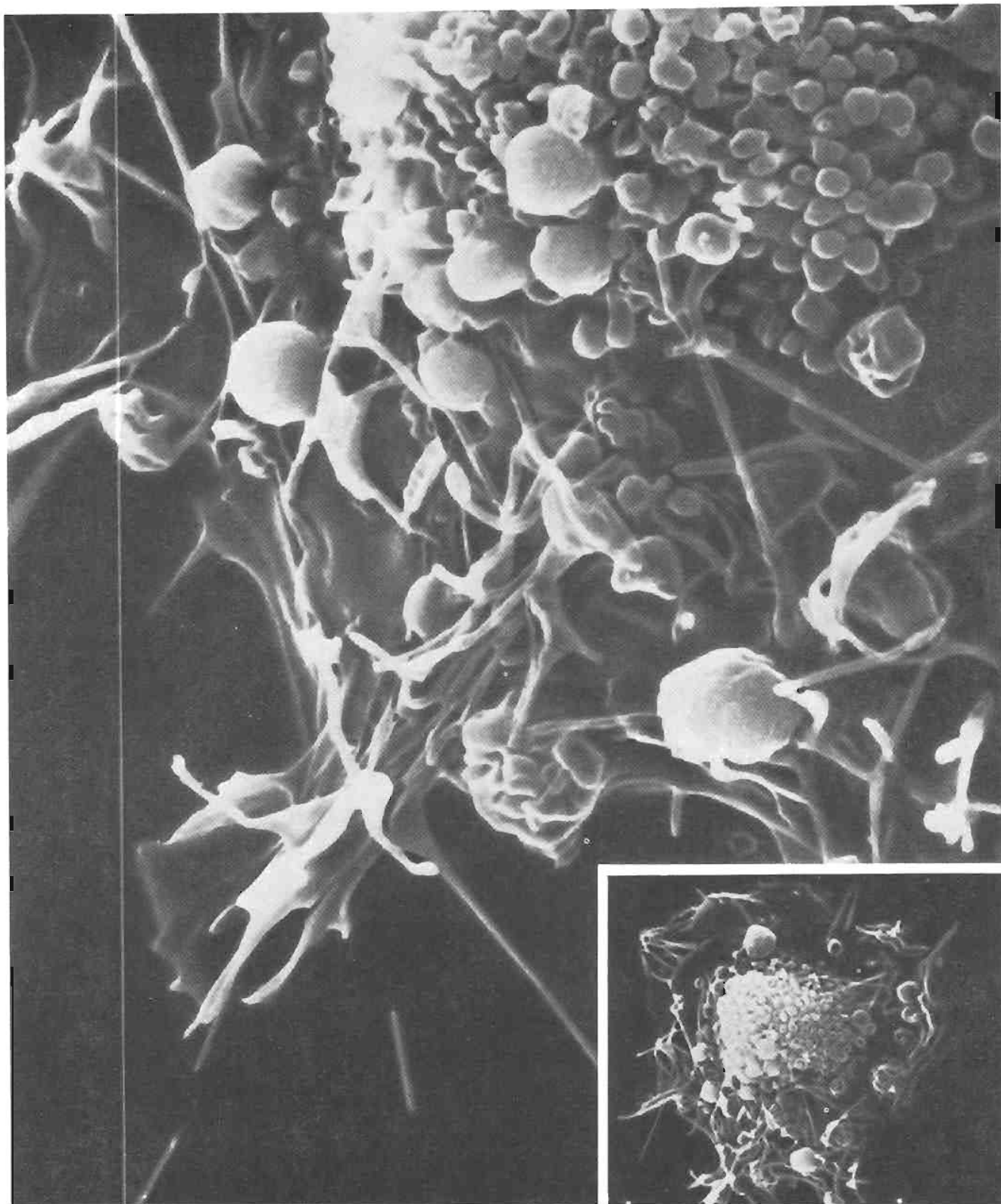
Чтобы понять последовательность этих стадий, нам, очевидно, необходимо заглянуть под поверхность клетки. К счастью, сейчас в нашем распоряжении имеются самые современные микроскопические, биохимические и генноинженерные методы, позволяющие нам почти на равных атаковать ошеломляющую сложность клетки. Мы уже обнаружили, что с виду аморфная цитоплазма содержит переплетающиеся сети агрегатов, образованных фибриллярными белками. Эти нитевидные структуры, построенные в свою очередь из более мелких белковых субъединиц, собираются в сложную арма-



Подвижность мышечных фибробластов (клетки 3Т3) в фазово-контрастном микроскопе.

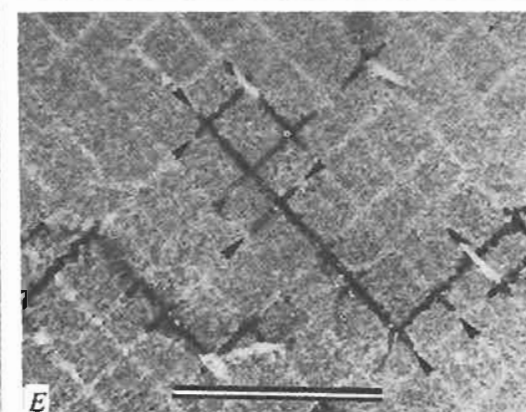
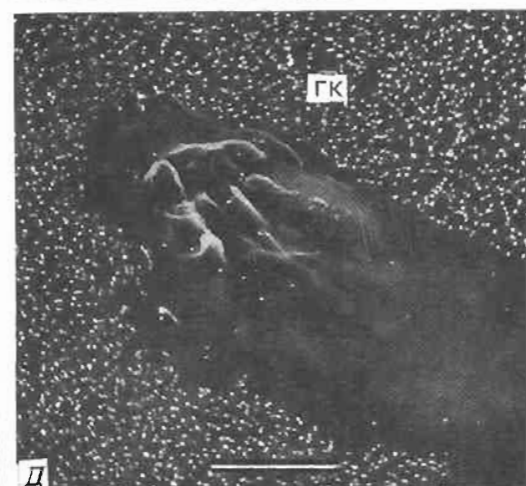
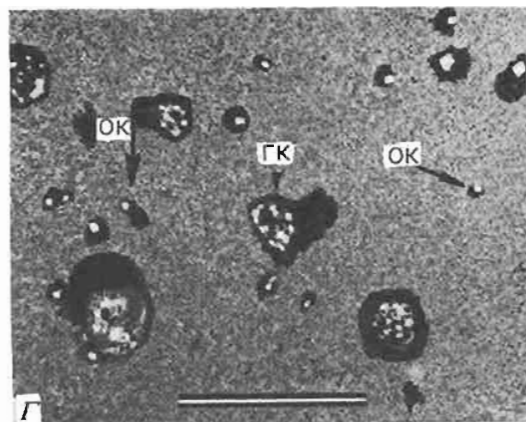
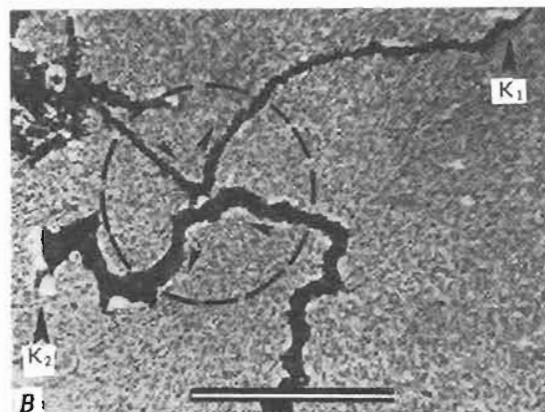
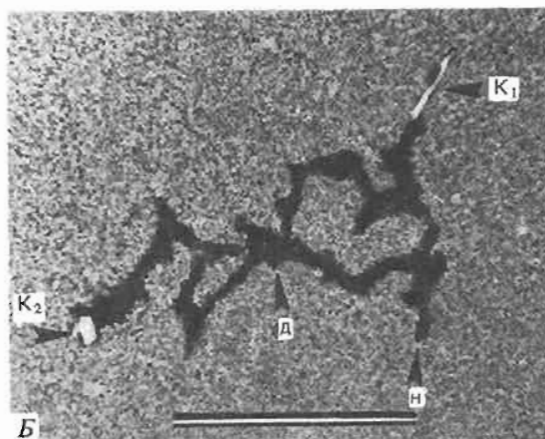
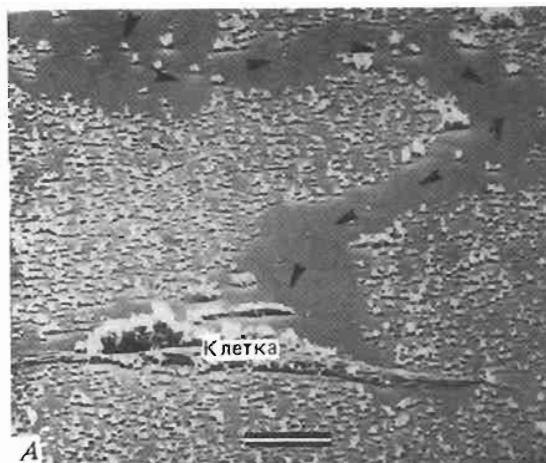
Левый ряд: по мере расплывания клетки на поверхности из нее в поисках подходящих участков прикрепления выпячиваются иглообразные микрошипы и листообразные ламеллоподии. Периодически ламеллоподии заворачиваются обратно («бахрома»), а затем снова выпячиваются вперед. *Средний ряд:* после расплывания фибробласты становятся асимметричными и начинают ползать

по поверхности культуральной чашки ламеллоподией вперед. На данной серии фотографий мы видим резкую смену направления движения. *Правый ряд:* в ходе митоза распластанная клетка округляется, затем образуется митотическое веретено. Две дочерние клетки после деления вновь расплываются на поверхности. Во всех рядах порядок расположения фотографий — сверху вниз — соответствует последовательным моментам времени. (С любезного разрешения Guenther Albrecht-Buchler.)



Так выглядит в сканирующем электронном микроскопе часть поверхности мышечного фибробласта в процессе расплывания. Микрошпиги и ламеллоподии выбрасываются вдоль бахромчатых краев, а по центру клетки над ядром выпячено множество полу-

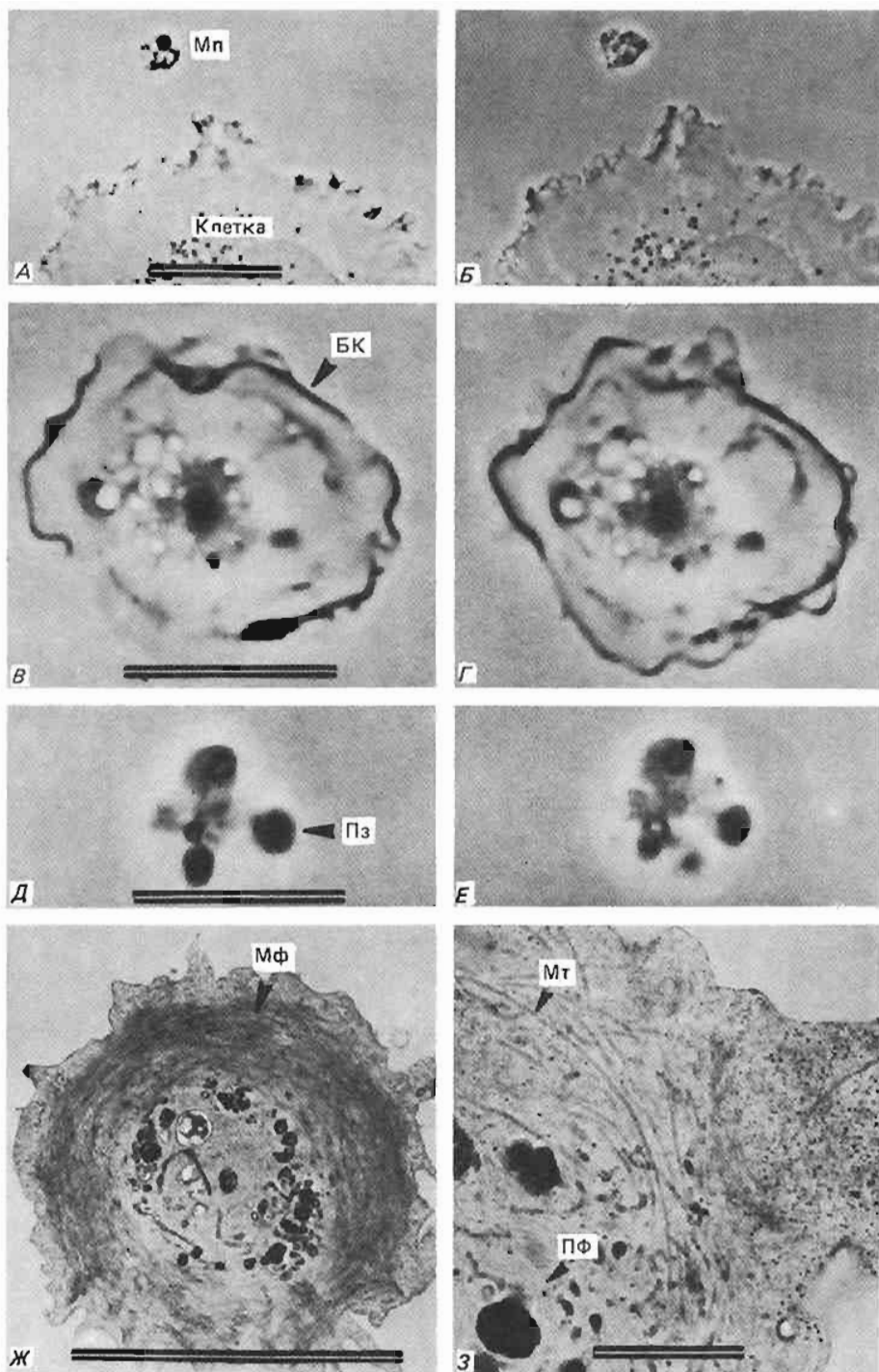
круглых выростов («пузырьков»). На врезке показана при меньшем увеличении вся клетка, диаметр которой составляет около 25 мкм. (С любезного разрешения Guentier Albrecht-Buchler.)



При движении клеток по поверхности, покрытой мельчайшими частицами золота, выявляется их траектория. Микрошпиги и ламеллоподии подбирают свободные частицы золота и переносят их через клетку назад, где они поглощаются (фагоцитируются). В результате в тех участках, через которые проползла клетка, остаются просветы. При наблюдении в темном поле траектории клеток выглядят черными, тогда как наполненные золотыми частицами клеточки ярко освещаются. (С любезного разрешения Gunter Albrecht-Buchler; воспроизведено по J. Natl. Cancer Inst., 60, 1982).

А. Фотография траектории в сканирующем электронном микроскопе. Видны множество мелких частиц золота на субстрате, клетка и остающаяся за ней свободная от частиц траектория (стрелки). Отрезок прямой — 20 мкм. Б. Микрофотография в темном поле разветвленной траектории материнской клетки КТЗ, которая начинается в точке а, а в точке б разветвляется на две траектории

дочерних клеток — К₁ и К₂. Отрезок прямой — 500 мкм. В. Столкновение двух мышинных клеток КТЗ К₁ и К₂. В области, очерченной окружностью, две клетки отскочили друг от друга как столкнувшиеся бильярдные шары. Отрезок прямой — 500 мкм. Г и Д. Фотографии перемещающейся группы клеток (ГК) сумчатой крысы РТК1, полученная в темном поле в световом микроскопе (Г) и в сканирующем электронном микроскопе (Д). Мало сместившиеся одиночные клетки обозначены ОК. Отрезок прямой — 500 мкм (Г) и 50 мкм (Д). Е. Траектория клеток КТЗ (яркие структуры), движущихся по расположенным в шахматном порядке линиям (более светлые участки). Клетки движутся по этим линиям, но в точках пересечения как бы пробуют различные направления, выбирая одно из них, что видно по небольшим ответвлениям «выступам» траектории в этих точках (стрелками показаны некоторые ответвления). Отрезок прямой — 500 мкм.



После обработки клеток ядом, разрушающим цитоскелет (цитохалазином В), часто образуются очень маленькие, автономно перемещающиеся клеточные фрагменты (микропласты). Микропласты, хоть и лишены ядра, способны расплываться и образовывать бахромчатые края и пузырьки, демонстрируя тем самым, что они обладают упорядоченными и функциональными элементами цитоскелета. (С любезного разрешения Guenther Albrecht-Buchler; воспроизведено из J. Natl. Cancer Inst., 60, 1982.)
А и Б. Для сравнения размеров рядом показаны микропласт (Мп) с бахромчатым краем (БК) и расплывающаяся человеческая клетка. Отрезок прямой – 20 мкм. Фотографии сделаны с интервалом 35 с; по разнице между ними заметно движение. В и Г. Две фотографии микропласта, сделанные с интервалом 15 с. Один из бахромчатых краев обозначен БК. Отрезок прямой – 10 мкм. Д и Е. Две фотографии микропласта с «пузырьками», сделанные с интервалом 10 с. Один из пузырьков обозначен Пз. Отрезок прямой – 10 мкм. Ж и З. Электронная микрофотография типичного микропласта. Срез сделан параллельно поверхности, к которой он прикреплен. Видны периферические актинсодержащие микрофиламенты (Мф), микротрубочки (Мт), и промежуточные филаменты (ПФ). Отрезок прямой – 10 мкм (Ж) и 1 мкм (З).

лом 35 с; по разнице между ними заметно движение. В и Г. Две фотографии микропласта, сделанные с интервалом 15 с. Один из бахромчатых краев обозначен БК. Отрезок прямой – 10 мкм. Д и Е. Две фотографии микропласта с «пузырьками», сделанные с интервалом 10 с. Один из пузырьков обозначен Пз. Отрезок прямой – 10 мкм. Ж и З. Электронная микрофотография типичного микропласта. Срез сделан параллельно поверхности, к которой он прикреплен. Видны периферические актинсодержащие микрофиламенты (Мф), микротрубочки (Мт), и промежуточные филаменты (ПФ). Отрезок прямой – 10 мкм (Ж) и 1 мкм (З).

туру и в молекулярные машины, обеспечивающие направленное передвижение клеток.

По ходу этой книги мы познакомимся с тем, как специфические взаимодействия сложных молекул образуют и поддерживают различные структурные элементы клетки. Менее детально мы рассмотрим их роль в процессах роста и деления клеток, а также в тех перестройках клеточной архитектуры, которые позволяют клеткам участвовать в образовании многоклеточных организмов и которые мы называем движением клеток и дифференцировкой. Мы надеемся также, что нам удастся передать читателю ощущение великой тайны, окружающей многие проблемы, к которым мы не можем пока даже найти подхода, а также необычайное воодушевление от больших достижений современной биологии клетки и, наконец, красоту клеток, как внешнюю, так и внутреннюю, логическую.

Примечание для читателей

Главы этой книги можно читать независимо друг от друга. Тем не менее они расположены в логической последовательности. Первые три главы **части I** охватывают элементарные принципы и основы биохимии и могут служить введением для тех, кто не изучал биохимию, и повторением материала для изучавших ее. Часть I завершается главой 4, описывающей принципы основных экспериментальных подходов к исследованию клеток. Чтобы понять последующие главы, эту главу читать не обязательно, однако в ней читатель найдет полезный справочный материал.

Часть II посвящена центральным вопросам биологии клетки; в ней рассматриваются в основном общие свойства большинства эукариотических клеток. Она начинается с описания фундаментальных молекулярных механизмов наследственности – репликации и поддержания целостности ДНК, а также трансляции линейной последовательности ее нуклеотидов в линейные последовательности аминокислот белков (гл. 5). Однако детали структуры хромосом и вопросы, связанные с регуляцией экспрессии генов в эукариотических клетках, обсуждаются лишь в главе 8 «Клеточное ядро». Главы 6 и 7 посвящены различным мембранным системам клетки и связанным с ними функциям. В главе 9 описываются митохондрии и хлоропласты, обеспечивающие энергетические потребности клеток, в главе 10 – цитоскелет и движение клеток, в главе 11 – механизмы роста и деления клеток. Часть II заканчивается двумя главами о том, как клетки взаимодействуют друг с другом. В главе 12 обсуждаются клеточная адгезия и внеклеточный матрикс, а в главе 13 – взаимодействие клеток с помощью химической сигнализации.

В **части III** рассматривается поведение клеток при образовании многоклеточных организмов, начиная с образования яйцеклеток и сперматозоидов, оплодотворения и эмбрионального развития (гл. 14 и 15) и кончая дифференцировкой тканей взрослых животных (гл. 16). Клеткам иммунной и нервной систем посвящены отдельные главы (гл. 17 и 18) – не только потому, что на примере этих систем можно проиллюстрировать выполнение сообществами клеток наиболее сложных задач, но и по той причине, что многие общие принципы поведения клеток были открыты при изучении именно этих систем. Наконец, в главе 19 обсуждаются некоторые весьма интересные особенности растительных клеток.

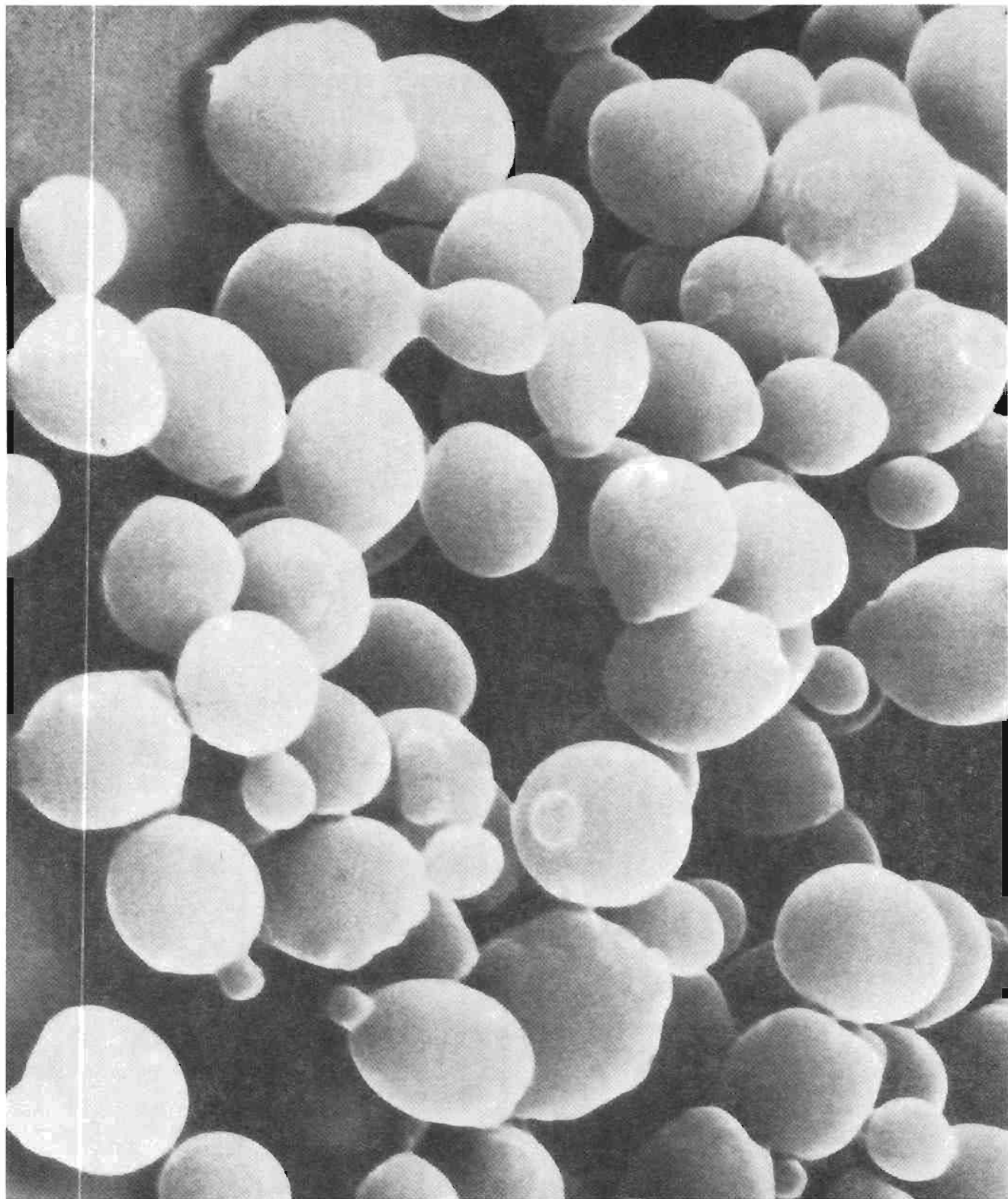
Развитие биологии клетки в значительной степени зависит от успехов в разработке экспериментальных методов. Поэтому в главу 4 включены несколько таблиц с наиболее важными вехами в истории создания принципиально важных методов и с именами причастных к этому ученых. В остальных частях книги мы старались избежать упоминания отдельных ученых, однако авторов основных открытий обычно можно выявить по **списку литературы** в конце каждой главы. Часто даются ссылки на оригинальные работы, в которых впервые сообщалось о важном открытии. Числа в квадратных скобках, стоящие при многих заголовках, соответствуют номерам ссылок в списке литературы, что позволит с легкостью ознакомиться более подробно с частными вопросами.

В книге **жирным шрифтом** набраны ключевые термины, чтобы выделить их в том месте главы, где они в основном обсуждаются, что не всегда совпадает с первым упоминанием термина в тексте. *Курсив* использован для подчеркивания важных терминов.



Введение в биологию клетки

- 1** Эволюция клетки
- 2** Малые молекулы,
энергия и биосинтез
- 3** Макромолекулы:
структура, форма
информационные функции
- 4** Как изучают клетки?



Так выглядят растущие клетки дрожжей в сканирующем электронном микроскопе. Размножаясь, эти одноклеточные сахаристы отпочковывают маленькие дочерние клетки. (С любезного разрешения Ira Herskowitz, Eric Schabatach.)

Все живые существа состоят из клеток – маленьких, окруженных мембраной полостей, заполненных концентрированным водным раствором химических веществ. Простейшие формы жизни – это одиночные клетки, размножающиеся делением. Более высокоразвитые организмы, такие как мы сами, можно сравнить с клеточными городами, в которых специализированные функции осуществляют группы клеток, в свою очередь связанные между собой сложными системами коммуникаций. В известном смысле клетки находятся на полпути между молекулами и человеком. Мы изучаем клетки, чтобы понять, каково их молекулярное строение, с одной стороны, и чтобы выяснить, как они взаимодействуют для образования столь сложного организма, как человек, – с другой.

Считается, что все организмы и все составляющие их клетки произошли эволюционным путем от общей предковой клетки. Два основных процесса эволюции – это 1) случайные вариации генетической информации, передаваемой от организма к его потомкам, и 2) *отбор* генетической информации, способствующий выживанию и размножению своих носителей. Эволюционная теория является центральным принципом биологии, позволяющим нам осмыслить ошеломляющее разнообразие живого мира.

Эта глава, как и книга в целом, посвящена развитию – от молекул до многоклеточных организмов. В ней обсуждается эволюция клетки, сначала как самовоспроизводящейся единицы, состоящей из более мелких частей, а затем как строительного блока более крупных структур. По мере изложения материала мы будем последовательно знакомиться с компонентами и функциями клетки, которые детально рассматриваются в следующих главах в основном в том же порядке. Начиная с происхождения первой клетки на Земле, мы познакомимся с тем, как свойства больших молекул определенного типа обеспечивают передачу потомству и выражение в фенотипе (экспрессию) наследственной информации, обуславливая эволюционный процесс. Эти молекулы, заключенные в мембрану, составляют сущность самореплицирующейся клетки. Затем мы описываем основные этапы эволюции – от небольших, похожих на бактерии клеток до значительно больших и более сложно устроенных клеток, подобных клеткам современных растений и животных. Наконец, мы высказываем предположения о том, каким образом отдельные свободноживущие клетки породили большие многоклеточные организмы, как клетки специализировались и, объединившись, образовали столь сложные органы, как мозг.

Естественно, в эволюционном подходе есть свои опасности: большие пробелы в наших знаниях могут быть заполнены лишь рассуждениями, многие детали которых, вероятно, ошибочны. Тем не менее ископаемые остатки и сравнительные исследования современных организмов и молекул дают нам достаточно много данных, чтобы выдвинуть разумные предположения об основных стадиях эволюции жизни.

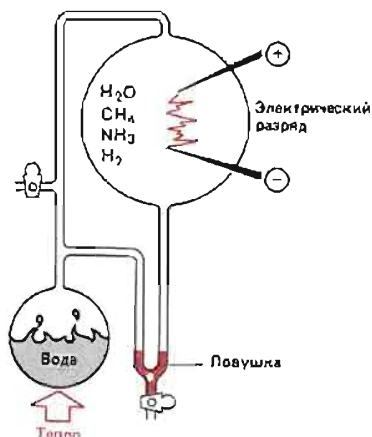


Рис. 1-1. Типичный опыт, имитирующий условия на первозданной Земле. Воду нагревают в герметичном сосуде, содержащем CH_4 , NH_3 и H_2 . Через смесь газов и водяного пара пропускают электрический разряд. Органические соединения накапливаются в U-образной ловушке.

HCHO	Формальдегид
CH_3COOH	Уксусная кислота
$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	Глицин
HCOOH	Муравьиная кислота
$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$	Молочная кислота
$\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$	Аланин
$\text{NH}-\text{CH}_2\text{COOH}$ $ $ CH_3	Саркозин
$\text{H}-\text{C}\equiv\text{N}$	Синильная кислота
$\text{NH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$	Мочевина
$\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{COOH}$	Аспарагиновая кислота

Рис. 1-2. Некоторые из соединений, которые могли образоваться в опыте, описанном на рис. 1-1. Соединения, выделенные цветом, являются важными компонентами современных живых клеток.

1.1. От молекул – к первой клетке [1]

1.1.1. Простые биологические молекулы могут образовываться в пребиотических условиях

Условия, существовавшие на Земле в первый миллиард лет ее истории, все еще являются предметом спора. Была ли поверхность вначале расплавлена? Содержала атмосфера аммиак или же метан? Однако, видимо, все сходится на том, что Земля была весьма неспокойным местом – с постоянными вулканическими извержениями, неистовыми ливнями и сверкающими молниями. Не было совсем или было очень мало кислорода, и отсутствовал озоновый слой, поглощающий жесткое ультрафиолетовое излучение Солнца.

В таких условиях, очевидно, возникали простые органические (т.е. содержащие углерод) молекулы. Лучшее тому доказательство дают лабораторные эксперименты. Если через нагретую смесь воды и газов, таких, как CO_2 , CH_4 , NH_3 и H_2 , пропускать электрический разряд или ультрафиолетовое излучение, они реагируют с образованием малых органических молекул. Обычно набор таких молекул невелик, но каждая образуется в сравнительно больших количествах (рис. 1-1). Среди продуктов есть ряд соединений, таких как цианистый водород ($\text{H}-\text{C}\equiv\text{N}$) и формальдегид $\begin{pmatrix} \text{H} \\ \text{H} \end{pmatrix} \text{C}=\text{O}$, которые в свою

очередь легко реагируют в водном растворе (рис. 1-2). Наиболее важно, что образуются четыре основных класса внутриклеточных малых молекул: *аминокислоты, нуклеотиды, сахара и жирные кислоты*.

Хотя в таких опытах нельзя точно воспроизвести условия, существовавшие ранее на Земле, они показывают, что органические молекулы образуются на удивление легко. Кроме того, развивающаяся Земля имела огромные преимущества перед любым экспериментатором: она была очень велика и располагала широким спектром условий. Но важнее всего то, что у Земли в распоряжении было гораздо больше времени – сотни миллионов лет. В таких условиях кажется вполне вероятным, что в какой-то момент в каком-нибудь месте сконцентрировались многие из простых органических молекул, входящих в состав современных клеток.

1.1.2. Полинуклеотиды способны направлять собственный синтез

Простые органические молекулы, такие как аминокислоты, или нуклеотиды, могут ассоциировать с образованием больших полимеров. Две аминокислоты могут соединиться с помощью пептидной связи, а два нуклеотида могут быть соединены фосфодиэфирной связью. Последовательное повторение этих реакций ведет к образованию линейных полимеров, называемых соответственно полипептидами и полинуклеотидами. У современных организмов полипептиды, называемые белками, и полинуклеотиды в форме *рибонуклеиновой кислоты (РНК)* и *дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)* обычно считаются наиболее важными компонентами. Универсальные «кирпичики» белков – это ограниченный набор из 20 аминокислот, а молекулы ДНК и РНК построены из четырех типов нуклеотидов. Остается лишь гадать, почему именно эти наборы мономеров, а не другие со схожими химическими свойствами были отобраны для биосинтеза.

Самые первые полимеры могли образоваться несколькими путями, например в результате нагревания сухих органических соединений, или под действием каталитической активности неорганических полифосфатов. При проведении аналогичных реакций в пробирке образуются полимеры различной длины со случайной последовательностью, у которых наличие данной аминокислоты или нуклеотида в каждом положении определяется в основном случаем (рис. 1-3). Но если уж полимер образовался, он способен влиять на

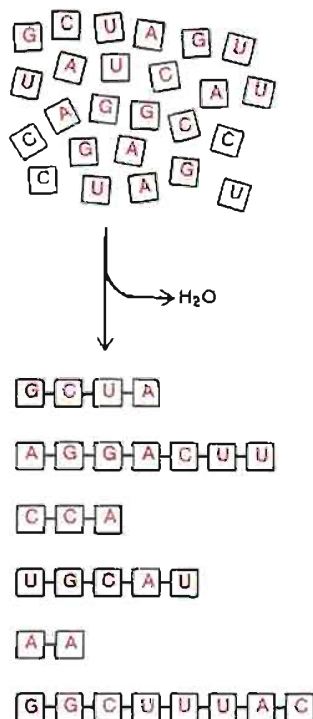


Рис. 1-3. Четыре типа нуклеотидов (показаны буквами А, U, G, С) могут спонтанно полимеризоваться с высвобождением воды. В результате получается смесь олигонуклеотидов случайной длины и случайной последовательности.

образование других полимеров. В особенности это относится к полинуклеотидам, которые способны служить *матрицей* в реакции полимеризации и, таким образом, определять последовательность нуклеотидов в новых полинуклеотидах. Например, полимер, состоящий из одного типа нуклеотидов [полиуридиловой кислоты, poly (U)], может служить матрицей для синтеза другого полимера – полиадениловой кислоты, poly (A). Подобные матричные свойства основаны на специфическом, так называемом комплементарном связывании полинуклеотидов друг с другом. Poly (U) способствуют образованию poly (A), выстраивая вдоль своей цепи необходимые субъединицы (рис. 1-4).

Специфическое спаривание комплементарных нуклеотидов сыграло, видимо, решающую роль в возникновении жизни. Рассмотрим, например, полинуклеотид, подобный РНК и содержащий основания урацил (U), аденин (A), цитозин (C) и гуанин (G). Благодаря комплементарному спариванию оснований – А с U и G с C – при добавлении РНК к смеси активированных нуклеотидов в условиях, благоприятствующих полимеризации, синтезируется новая молекула РНК, последовательность нуклеотидов которой комплементарна последовательности нуклеотидов в исходной РНК. Таким образом, новые молекулы напоминают слепок исходной, каждому А которой соответствует U в копии и т.д. На стадии I информация, содержащаяся в последовательности исходной цепи РНК, в сущности сохраняется в новообразующихся комплементарных цепях. На второй стадии копирование с использованием комплементарной цепи в качестве матрицы восстанавливает исходную последовательность (рис. 1-5).

Механизмы комплементарного матричного копирования изящны и просты; они занимают центральное место в процессах переноса информации в биологических системах. Генетическая информация каждой клетки закодирована в последовательности оснований ее полинуклеотидов, и эта информация передается (наследуется) из поколения в поколение с помощью комплементарного спаривания оснований.

Для быстрого образования полинуклеотидов в пробирке обязательно должны присутствовать специфические белковые катализаторы-ферменты, которых не могло быть в «пребиотическом бульоне». Там, однако, были, очевидно, минералы и ионы металлов, способные служить менее эффективными катализаторами. Кроме того, катализаторы лишь ускоряют реакции, которые происходили бы и без них, но за достаточно долгое время. Поскольку и время, и химически активные предшественники нуклеотидов имелись в изобилии, вполне возможно, что в пребиотических условиях на Земле возникли медленные реплицирующиеся системы полинуклеотидов.

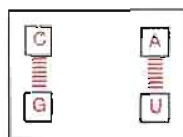


Рис. 1-4. Нуклеотиды способны связываться друг с другом (причем G предпочтительно связывается с C, а А – с U) при помощи сравнительно слабых химических связей (вверху). Такое связывание позволяет одному полинуклеотиду служить матрицей для синтеза другого (справа).

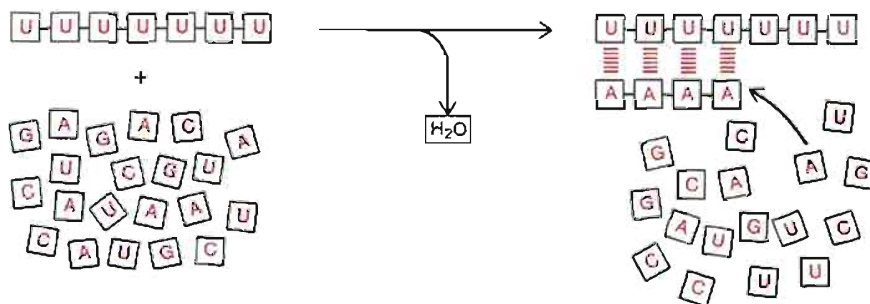


Рис. 1-5. Репликация последовательности полинуклеотида (здесь молекулы РНК). На стадии 1 исходная молекула РНК служит матрицей для образования молекулы РНК с комплементарной последовательностью. На стадии 2 эта комплементарная молекула в свою очередь служит матрицей для образования молекулы РНК с исходной последовательностью. Поскольку каждая матрица способна произвести много комплементарных копий, эти реакции могут привести к «размножению» исходной последовательности.

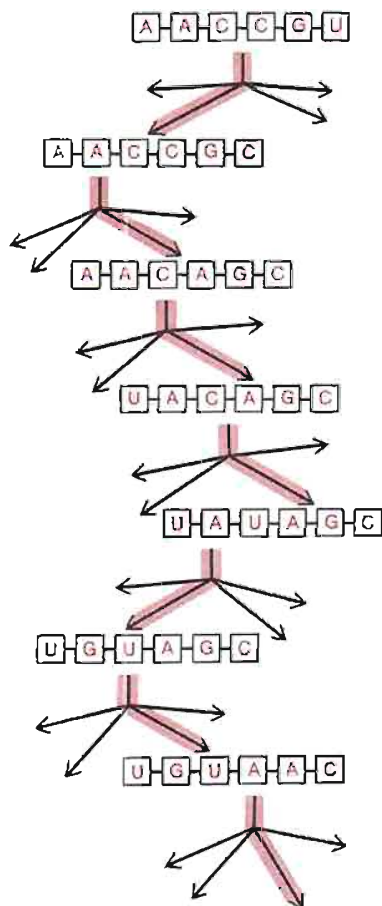
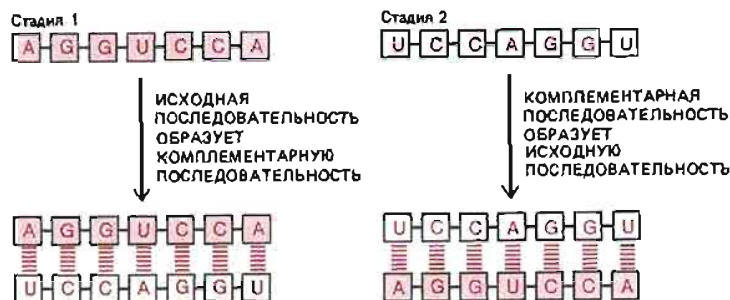


Рис. 1-6. В результате ошибок репликации могут происходить изменения последовательности молекулы РНК. Здесь цветом выделена одна «родословная», показывающая постепенное изменение последовательности AACCUGU в последовательность UGUAAC в результате ошибок копирования. Множество стрелок показывает, что параллельно возникнут многие другие последовательности.

1.1.3. Самореплицирующиеся молекулы подвержены естественному отбору

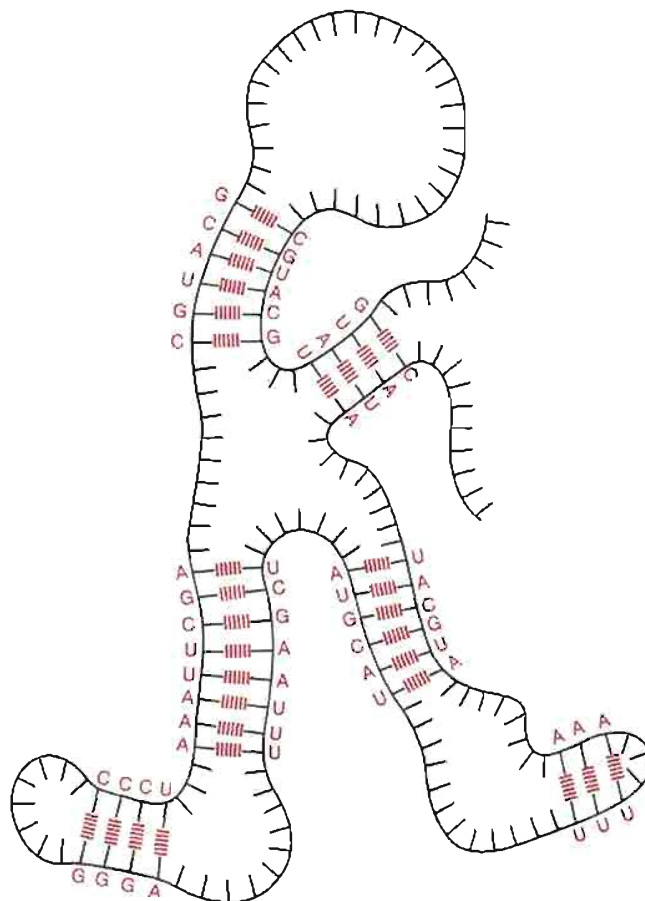
При благоприятных условиях в концентрированном бульоне нуклеотидов полинуклеотид может размножаться; при этом каждая исходная молекула используется в качестве родителя (матрицы) для образования дочерних копий. Однако в процессе копирования, особенно в первобытных условиях, неизбежно происходит много ошибок. Начнут размножаться новые и неточные копии оригинала, так что последовательность нуклеотидов будет изменяться, и со временем произойдет полная утрата информации, содержащейся в исходной молекуле (рис. 1-6).

Но полинуклеотиды – это не просто цепочка символов, неким абстрактным образом несущая информацию. Они обладают химической индивидуальностью, влияющей на их поведение. Конкретная последовательность нуклеотидов определяет свойства молекулы, особенно характер ее свертывания (конформацию) в растворе. Мономеры полинуклеотида могут не только спариваться со свободными комплементарными нуклеотидами среды с образованием нового полимера, но и образовывать пары с комплементарными нуклеотидными остатками того же самого полимера. Последовательность GGGG в одной части полинуклеотидной цепи может сравнительно прочно связаться с CCCC из другого участка молекулы. Из-за подобных взаимодействий возникают различные трехмерные изгибы, и молекула в целом приобретает уникальную форму, полностью определяемую ее нуклеотидной последовательностью (рис. 1-7).

Трехмерная укладка полинуклеотида влияет на его стабильность и на способность реплицироваться, так что не все молекулы в репликативной смеси будут одинаково успешно размножаться. Некоторые будут слишком длинны или слишком плотно свернуты, чтобы служить хорошими матрицами. Другие, напротив, будут нестабильными. Действительно, в лабораторных опытах было показано, что система реплицирующихся молекул РНК подвержена своего рода естественному отбору и что в конце концов в зависимости от конкретных условий начнет преобладать та или иная доминантная последовательность.

Таким образом, РНК-подобный полинуклеотид обладает двумя важными свойствами: во-первых, он содержит информацию, закодированную в последовательности нуклеотидов и передаваемую при репликации, и, во-вторых, он свернут в уникальную пространственную структуру, определяющую его функции и реакцию на внешние условия. Оба эти свойства – информационное и функциональное – являются необходимыми предпосылками эволюционного процесса. Нуклеотидная последовательность молекулы РНК аналогична наследственной информации, или генотипу, организма. Пространственная укладка аналогична *фенотипу* – выражению генетической информации, подверженному действию естественного отбора.

Рис. 1-7. В результате спаривания нуклеотидов из разных участков одной и той же полинуклеотидной цепи (РНК) молекула принимает определенную форму.

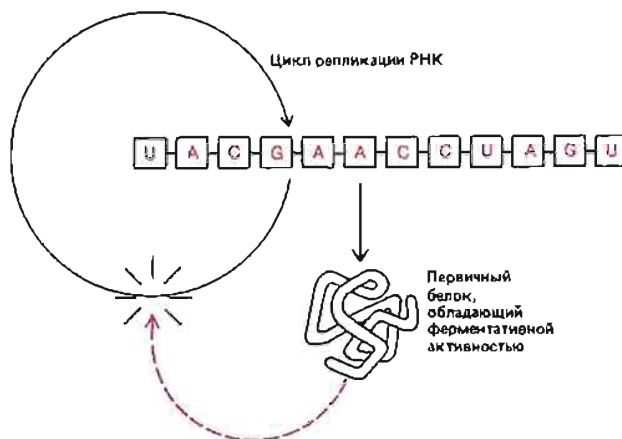


1.1.4. Информация передается от полинуклеотидов полипептидам

Итак, мы предполагаем, что 3,5–4 млрд. лет назад где-то на Земле самореплицирующиеся системы полинуклеотидов положили начало эволюционному процессу. Полимеры с различной последовательностью нуклеотидов по мере построения собственных копий конкурировали за доступные запасы мономеров-предшественников аналогично тому, как сейчас конкурируют организмы. Успех зависел от точности и скорости копирования, а также от стабильности копий.

Хотя структура полинуклеотидов хорошо приспособлена для хранения и передачи (репликации) информации, эти молекулы недостаточно разнообразны для обеспечения всех структурных и функциональных потребностей живой клетки. С другой стороны, белки состоят из многих различных аминокислот, и разнообразие их пространственной структуры, часто буквально насыщенной реакционноспособными участками, делает их, как будет показано в гл. 3, идеально подходящими для выполнения широкого круга структурных и функциональных задач. Даже полипептиды со случайной последовательностью, возникавшие под действием пребиотических синтетических механизмов, видимо, имели каталитические свойства и, в частности, могли облегчать репликацию молекул РНК. Если это так, то некоторые классы полипептидов должны были оказаться особенно полезными для реплицирующихся систем, в особенности те из них, которые при надобности можно было воспроизвести. Полинуклеотиды, способствующие синтезу определенных полипептидов в своем окружении, должны были приобрести большое преимущество в эволюционной борьбе за существование (рис. 1-8).

Рис. 1-8. Белки могут эффективно катализировать химические реакции образования нуклеотидов или их полимеризацию в РНК. Поэтому молекула РНК, способная направлять синтез соответствующего белка, в состоянии ускорить собственную репликацию, как схематически показано на рисунке.



Как же все-таки полинуклеотиды могли бы осуществлять подобный контроль? Как информация, закодированная в их последовательности, могла бы определять последовательность полимеров иного типа? В современных организмах РНК направляет синтез полипептидов, т.е. **биосинтез белка**, но для осуществления этого процесса требуется исключительно сложный биохимический аппарат. Молекулы РНК одного типа содержат генетическую информацию о последовательности определенного полипептида, а ряд других молекул РНК связывает аминокислоты. Оба типа РНК образуют друг с другом комплементарные пары оснований, что позволяет последовательности нуклеотидов информационной РНК направлять включение определенных аминокислот в растущую полипептидную цепь. Сборка новых белков происходит на поверхности рибосом – сложных частиц, состоящих из нескольких больших молекул РНК и более чем из 50 различных белков. Возникновение в процессе эволюции столь сложного механизма по-прежнему остается загадкой, хотя фрагменты этой головоломки уже начали собираться в связанную картину. Одно из наиболее удивительных свидетельств ранней эволюции – это генетический «словарь», или *генетический код*, устанавливающий соответствие между триплетами нуклеотидов и аминокислотами. Поскольку код практически одинаков у всех современных организмов, он должен был закрепиться на очень ранней стадии эволюции и, видимо, содержать указания на то, каким путем была достигнута первобытная трансляция.

Вне зависимости от того, каковы были предварительные этапы эволюции, как только молекулы РНК оказались способными направлять синтез белков, они получили в свое распоряжение целую фабрику разнообразных химических инструментов. Появилась принципиальная возможность синтезировать ферменты, способные катализировать широкий круг химических реакций, в том числе синтез других белков и РНК. Как только эволюция нуклеиновых кислот продвинулась до кодирования ферментов, обеспечивающих их собственное воспроизведение, размножение репликативных систем должно было резко ускориться. Подобный автокаталитический процесс способен носить взрывной характер, что можно видеть на примере жизненного цикла некоторых современных вирусов бактерий: проникнув в бактерию, эти вирусы направляют синтез белков, избирательно катализирующих их собственную репликацию, так что в короткое время они оккупируют всю клетку (рис. 1-9 и 1-10).

1.1.5. Первая клетка окружает себя мембраной

Возникновение белкового синтеза, контролируемого нуклеиновыми кислотами, без сомнения, оказалось одним из критических событий в формировании первой клетки. Другим критическим событием должно было стать образова-

Рис. 1-9. Серия электронных микрофотографий, показывающих развитие вируса внутри бактериальной клетки. Инфицирование начинается с прикрепления вируса к наружной оболочке бактерии (см. также рис. 1-10) и впрыскивания вирусной ДНК в бактериальную клетку. За 5 мин эта ДНК направляет синтез белков, одни из которых разрушают ДНК бактерии-хозяина, а другие катализируют репликацию вирусной ДНК. Плотные частицы, наблюдаемые в клетке через 15 мин после заражения,—это незрелые вирусные частицы, состоящие из вирусной ДНК, упакованной в сферические белковые оболочки. (Оболочки, как показано на врезке, сначала собираются отдельно.) 30-минутный образец показывает, как вирусные частицы продолжают созревать и накапливаться. (С любезного разрешения Е. Kellenberger.)

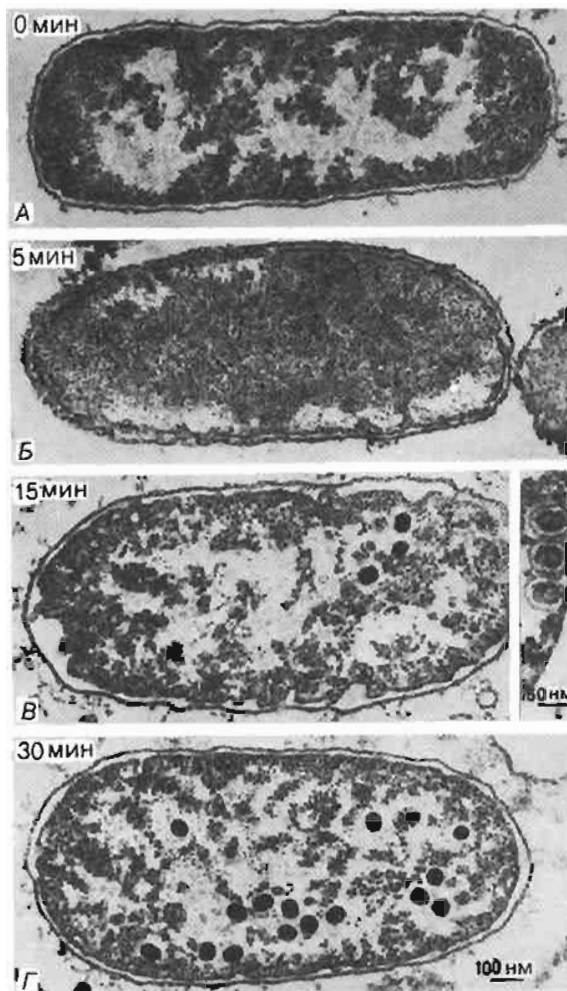
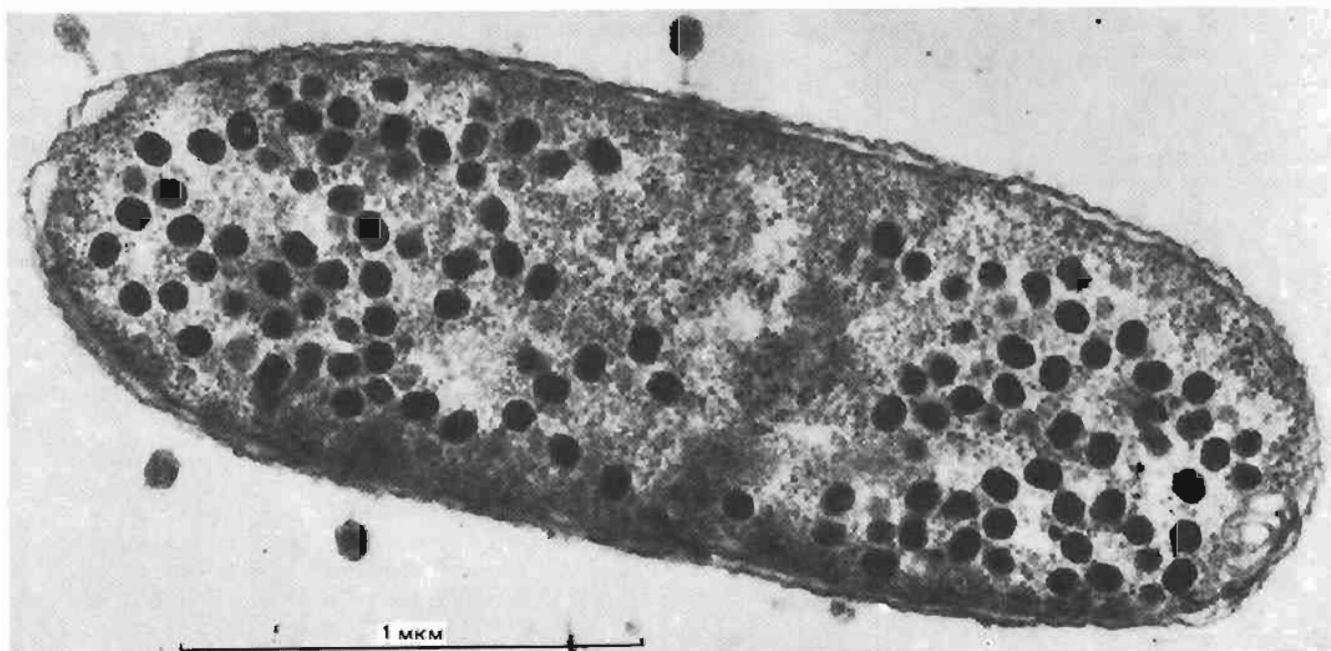


Рис. 1-10. Полученная с большим увеличением микрофотография зараженной вирусом бактериальной клетки. После заражения прошло более часа. Инфекционный цикл почти завершен, и бактериальная клетка вот-вот разорвется, высвободив в окружающую среду несколько сот новых инфекционных вирусных частиц. Вирус, показанный на этой микрофотографии и на микрофотографиях, приведенных на рис. 1-9,—бактериофаг Т4. (С любезного разрешения Е. Kellenberger.)



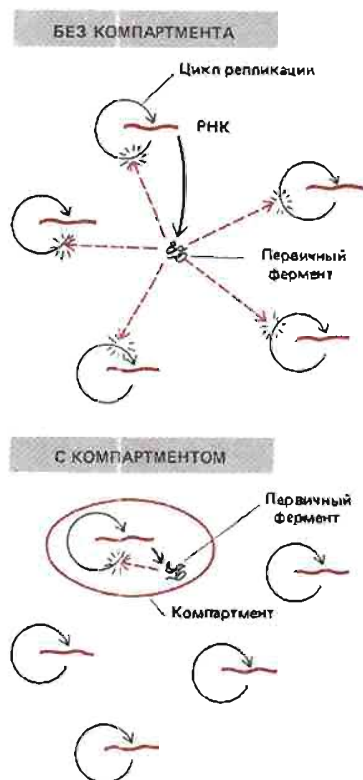


Рис. 1-11. Схема, демонстрирующая эволюционное преимущество напоминающих клетку компартментов. В смешанной популяции самореплицирующихся молекул РНК, способных направлять синтез белка (как показано на рис. 1-8), любой улучшенный вид РНК, производящий более полезный белок, вынужден делиться плодами этого преимущества со всеми своими конкурентами. Но если РНК заключена в каком-либо компартменте, скажем внутри липидной мембраны, то любой производимый ею белок резервируется для ее собственных нужд. Таким образом, появляется возможность отбора РНК по качеству производимого ею белка.

ние наружной мембраны. Белки, синтезируемые под контролем определенного типа РНК, не могли бы облегчить репродукцию именно этих молекул РНК, если бы не удерживались поблизости от них. Более того, до тех пор, пока белки свободно диффундировали бы в популяции реплицирующихся молекул РНК, они в равной степени способствовали бы репликации любого из конкурирующих видов РНК. Если возникала измененная РНК, производящая улучшенный тип фермента, новый фермент не способен был избирательно обеспечить выживание этой измененной РНК в ее конкуренции с себе подобными. Отбор молекул РНК по качеству кодируемых ими белков не мог начаться раньше, чем появился какой-нибудь отсек (компаратмент), заключивший в себе белки и таким образом обеспечивший преимущественное использование этих белков для внутренних нужд (рис. 1-11).

Все современные клетки окружены плазматической мембраной, состоящей из фосфолипидов и белков. В электронном микроскопе мембраны имеют вид листов толщиной около 7 нм с выраженной трехслойной структурой (следствие плотной укладки молекул фосфолипидов хвост к хвосту). Очень похоже по виду искусственные мембраны можно получить в пробирке путем простого смещения фосфолипидов с водой. В подходящих условиях такие искусственные мембраны замыкаются в пузырьки диаметром от 1 до 10 мкм. Легко себе представить, что такие пузырьки, подобные мыльным пузырям, захватив внутрь определенную популяцию молекул, могли бы образовать пространственно изолированную функциональную единицу.

Считается, что первая клетка образовалась, когда молекулы фосфолипидов пребиотического бульона случайно собрались в мембранную структуру, заключившую в себе самореплицирующуюся смесь молекул РНК и белка. Оказавшись в окруженном мембраной замкнутом пространстве, молекулы РНК могли начать эволюционировать, причем признаком, по которому проводился отбор, теперь должна была стать не только собственная структура РНК, но и свойства кодируемых ими белков. Таким образом, нуклеотидная последовательность молекул РНК стала проявляться в свойствах клетки как целого.

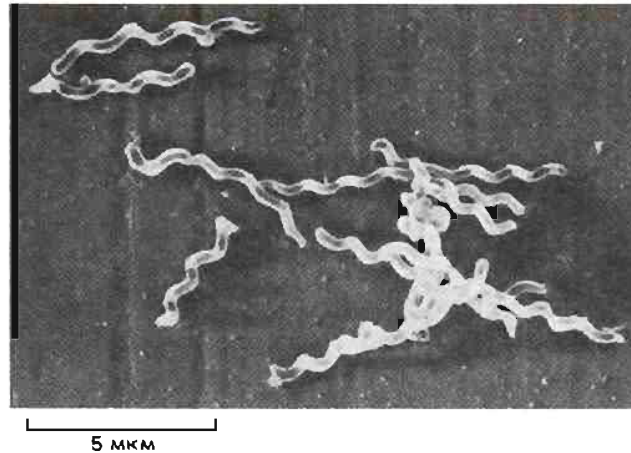
1.1.6. Микоплазмы — простейшие из живых клеток

Нарисованная нами выше картина, конечно, не более чем предположительна. Не существует ископаемых остатков, по которым можно было бы проследить зарождение первой клетки. Тем не менее современные организмы и лабораторные опыты убедительно показывают, что в основных чертах наш эволюционный обзор справедлив. События, обусловившие образование первой клетки (пребиотический синтез малых молекул, самореplikация молекул РНК, трансляция последовательностей РНК в аминокислотные последовательности, возникновение окруженных мембранами компартментов в результате самосборки молекул липидов), очевидно, происходили 3,5–4 млрд. лет назад.

Полезно сравнить нашу гипотетическую первую клетку с простейшими современными клетками, микоплазмами. Микоплазмы — это похожие на бактерий маленькие организмы, обычно ведущие паразитический образ жизни, тесно связанный с какими-либо клетками растений или животных (рис. 1-12). Некоторые из них имеют в диаметре около 0,3 мкм и содержат нуклеиновую кислоту в количестве, достаточном для синтеза приблизительно 750 различных белков. Не исключено, что это — минимальное жизненно необходимое для клетки количество белков.

Существенное отличие первой клетки в нашем описании от микоплазм (и, конечно, от любых других современных клеток) состоит в том, что в последнем случае наследственная информация хранится в ДНК, а не в РНК. В современных клетках есть оба типа полинуклеотидов, но в ходе эволюции они специализировались и работают сообща, выполняя каждый свою функцию. Благодаря небольшим химическим различиям полинуклеотиды этих двух ти-

Рис. 1-12. *Spiroplasma citrii* – микоплазма, размножающаяся в растительных клетках. (С любезного разрешения J. Burgess.)



пов оказываются приспособленными к выполнению разных задач. ДНК служит постоянным хранилищем генетической информации. В отличие от РНК она существует преимущественно в виде двухцепочечных молекул, состоящих из двух комплементарных полинуклеотидных цепей. Двухцепочечное строение обеспечивает не только большую стабильность хранимой генетической информации, но и функционирование механизма репарации: неповрежденная цепь ДНК используется в качестве матрицы при корректировании или починке комплементарной поврежденной цепи. Используя все тот же принцип комплементарности, ДНК направляет синтез отдельных молекул РНК, однако в этом случае комплементарное спаривание происходит между несколько различающимися типами нуклеотидов. Синтезированные таким образом одноцепочечные молекулы РНК выполняют две остальные функции первобытных полинуклеотидов: направляют синтез белков и в некоторых случаях играют структурную роль.

Кроме различных классов полинуклеотидов клетки микоплазм содержат множество ферментов и структурных белков – некоторые из них находятся внутри клетки, а другие встроены в ее мембрану. Белки синтезируют те из необходимых клетке малых молекул, которых нет в окружающей среде, перераспределяют энергию, необходимую для протекания биосинтетических реакций, и поддерживают в клетке необходимые химические условия. Эволюция этих метаболических функций будет рассматриваться в следующих разделах.

Заключение

Живые клетки, видимо, появились на Земле приблизительно 3,5 млрд. лет назад в результате спонтанной агрегации молекул. Наши представления о современных организмах и содержащихся в них молекулах дают основание думать, что появлению первой клетки предшествовали по крайней мере три события: 1) должны были образоваться полимеры (РНК), способные к саморепликации путем спаривания комплементарных оснований; 2) должен был возникнуть механизм, с помощью которого РНК направляла бы синтез белков; 3) должна была сформироваться липидная мембрана, замкнувшая в ограниченном пространстве самореплицирующуюся смесь молекул РНК и белка. На какой-то более поздней стадии эволюционного процесса ДНК заменила РНК в качестве вещества наследственности.

1.2. От прокариот – к эукариотам [2]

Существует предположение, что все нынеживущие организмы произошли из единственной, возникшей несколько миллиардов лет назад первобытной клетки. Пережив своих конкурентов, эта клетка положила начало процессу клеточ-

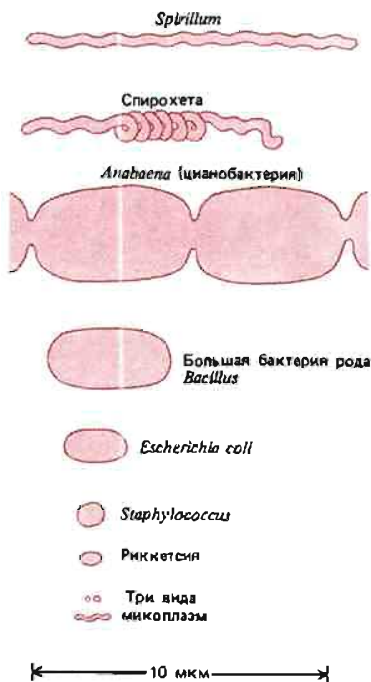


Рис. 1-13. Некоторые прокариотические клетки, изображенные в одинаковом масштабе.

вого деления и эволюции, который в конце концов создал зеленый покров Земли, изменил состав ее атмосферы и сделал ее родиной разумной жизни. Видимо, только так можно объяснить «фамильное сходство» между всеми организмами. На эволюционном пути имеется важная веха. Приблизительно 1,5 млрд. лет назад произошел переход от маленьких клеток со сравнительно простой внутренней структурой (так называемых **прокариот**, к которым относятся различные бактерии) к большим по размеру и значительно более сложно устроенным **эукариотическим** клеткам, подобным клеткам высших животных и растений.

1.2.1. Прокариотические клетки имеют простую структуру, но различаются по биохимическим свойствам

Бактерии – наиболее простые организмы, обнаруженные в большинстве природных сред обитания. Это – сферические или удлинённые клетки обычно размером в несколько микрометров (рис. 1-13). Как правило, у них имеется жесткая защитная оболочка, называемая **клеточной стенкой**, под которой находится плазматическая мембрана, ограничивающая единственный цитоплазматический компартмент, содержащий ДНК, РНК, белки и малые молекулы. В электронном микроскопе содержимое таких клеток имеет вид более или менее однородного матрикса (см. рис. 1-9, А).

Бактерии малы и способны быстро размножаться путем простого **бинарного деления**. При избытке питательных веществ «выживание наиболее приспособленных» обычно означает выживание тех, которые быстрее всех делятся. В оптимальных условиях прокариотическая клетка может делиться каждые 20 мин и, таким образом, образовать 4 млрд. клеток (что приблизительно равно населению земного шара) менее чем за 11 ч. Благодаря способности быстро делиться бактериальные популяции с легкостью адаптируются к изменениям окружающей среды. Например, в лабораторных условиях популяция бактерий, поддерживаемая в большом сосуде, за несколько недель благодаря спонтанным мутациям и естественному отбору приобретает способность использовать в качестве источников углерода новые типы сахаров.

В природе бактерии занимают невообразимое множество экологических ниш, и столь же многообразным оказывается их биохимическое строение, которое и обуславливает способность к приспособлению. Различают две группы бактерий, лишь весьма отдаленно родственные между собой: **эубактерии** – часто встречающиеся формы, населяющие почву, воду и другие организмы, и **архебактерии**, встречающиеся в таких неудобных средах обитания, как болота, океанские глубины, очень соленые воды и горячие кислые источники (рис. 1-14).

Существуют виды бактерий, способные питаться практически любыми органическими молекулами – сахарами, аминокислотами, жирами, углеводами, полипептидами и полисахаридами. Некоторые даже могут получать атомы углерода из CO_2 и атомы азота из N_2 . Несмотря на относительно простое строение, бактерии живут на Земле дольше любых других организмов и превосходят по численности все другие типы клеток.

Рис. 1-14. Родственные связи между современными бактериями (стрелками показаны вероятные пути эволюции). Происхождение эукариотических клеток обсуждается дальше в тексте.



1.2.2. Развитие метаболических реакций

Бактерии, растущей в растворе солей, содержащем в качестве единственного источника углерода глюкозу, необходимо осуществлять множество химических реакций. Она должна не только извлечь из глюкозы химическую энергию, необходимую для многих жизненно важных процессов, но и использовать атомы углерода для синтеза всех необходимых клетке органических молекул. Эти реакции катализируются сотнями ферментов, последовательно работающих в «цепях» химических реакций, так что продукт одной реакции служит субстратом для следующей. Такие цепи ферментативных реакций, называемые *метаболическими путями*, обсуждаются в следующей главе.

В начале, когда жизнь на Земле только зародилась, в метаболических реакциях, видимо, не было большой нужды: клетки могли жить и расти, питаясь окружающими их молекулами — наследием первобытного бульона. По мере истощения этих естественных ресурсов большое преимущество при отборе должны были получить организмы, вырабатывающие ферменты для образования органических молекул. Считается, что таким образом наличный комплект клеточных ферментов постепенно увеличивался, и в результате возникли метаболические пути современных организмов. Два возможных варианта эволюции метаболических путей проиллюстрированы на рис. 1-15.

Если эволюция метаболических путей шла путем последовательного добавления новых ферментативных реакций к существовавшим ранее, то, подобно самым старым годовым кольцам на срезе ствола, наиболее древние реакции должны находиться ближе всего к центру «метаболического дерева» — там, где синтезируются наиболее существенные молекулярные «кирпичики». Такое центральное положение в метаболизме прочно занимают реакции с участием фосфатов сахаров, в самом центре которых, видимо, находится последовательность реакций, называемая *гликолизом* и способная осуществлять расщепление глюкозы в отсутствие кислорода (т. е. *анаэробно*). Самые древние

Рис. 1-15. Схема, иллюстрирующая два возможных механизма возникновения метаболических путей. Клетка слева имеет в своем распоряжении запасы родственных соединений (А, Б, В, Г), возникшие благодаря пребиотическому синтезу. Одно из соединений, а именно Г, метаболически полезно. По мере истощения запасов соединения Г размножающимися клетками преимущество при отборе получают те из них, у которых развивается способность синтезировать новый фермент, катализирующий образование соединения Г из близкородственного соединения В. Последовательное повторение подобных этапов могло бы привести к развитию важных метаболических путей. В клетке, показанной справа, в изобилии имеется метаболически полезное соединение А. В процессе эволюции возникает фермент, который случайно оказывается способным превращать соединение А в соединение Б. Затем клетка претерпевает другие изменения, позволяющие ей использовать это новое вещество. Дальнейшее последовательное появление новых ферментов может в конце концов привести к возникновению длинной цепи реакций.

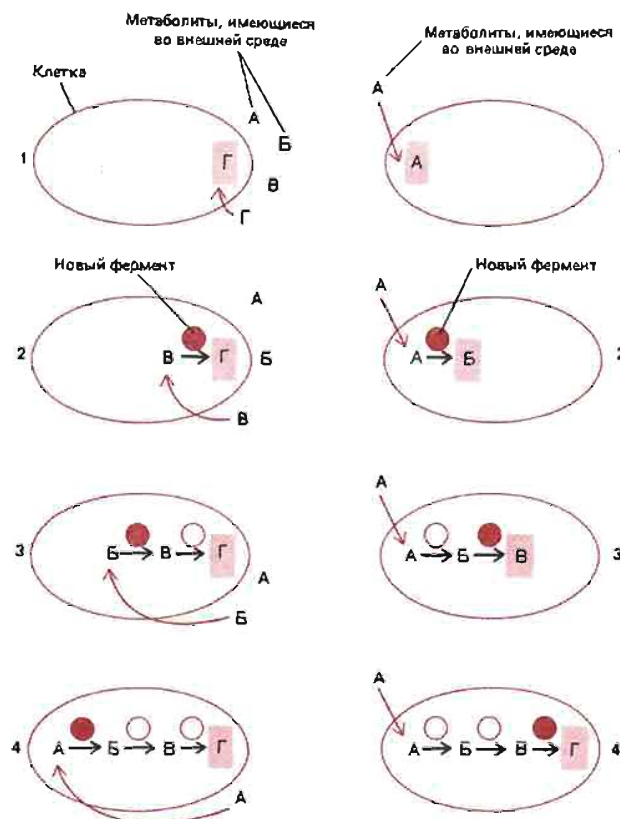
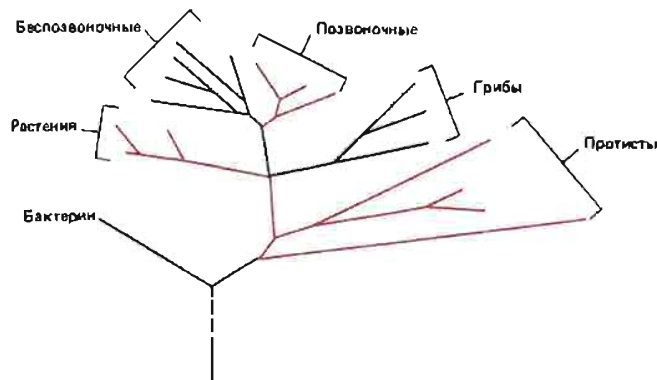


Рис. 1-16. Эволюционное родство организмов по данным сравнения аминокислотных последовательностей их цитохромов с (этот белок участвует в клеточном дыхании). Конец каждой ветви дерева соответствует определенному виду, а суммарная длина ветвей, соединяющих любые два вида, пропорциональна числу аминокислот, по которым отличаются их цитохромы с. Эволюционное дерево, полученное таким путем, весьма сходно с эволюционным деревом, полученным по данным анатомического сравнения и изучения ископаемых остатков. (Dayhoff M. O., Schwartz R. M. Ann. N. Y. Acad. Sci., 361, 92–104, 1981.)



из метаболических путей должны были быть анаэробными, поскольку в атмосфере первобытной Земли кислорода не было. Практически во всех живых клетках протекают реакции гликолиза, сопровождающиеся образованием *аденозинтрифосфата*, или *АТФ*, — соединения, используемого всеми клетками в качестве источника легко доступной химической энергии.

С находящимися в центре обмена веществ превращениями фосфатов сахаров связаны сотни других химических реакций. Некоторые из них ответственны за синтез малых молекул, многие из которых в свою очередь используются в дальнейших реакциях синтеза больших, специфичных для конкретного организма полимеров. Другие реакции используются для расщепления сложных молекул пищи до более простых химических соединений. Одна из наиболее поразительных особенностей всех этих реакций — это, то что они протекают во всех типах организмов. Конечно, существуют и отличия. Например, биосинтетический путь аминокислоты лизина различен у бактерий, дрожжей и зеленых растений, а у высших животных лизин и вовсе не синтезируется; некоторые специализированные продукты метаболизма встречаются только у представителей определенных родов или видов. Тем не менее в широком смысле подавляющее большинство реакций и катализирующих их ферментов характерно для всех живых существ — от бактерий до человека. Поэтому считается, что примитивные исходные клетки, породившие все живое, уже выполняли эти реакции.

Ферменты, катализирующие основные метаболические реакции, по мере дивергенции организмов постепенно модифицировались, не изменяя при этом своей основной функции. Поэтому аминокислотные последовательности ферментов, выполняющих одинаковую функцию в различных современных организмах, содержат исключительно ценную информацию об эволюционном родстве видов (рис. 1-16). Полученные таким путем данные хорошо согласуются с результатами других исследований, например с изучением ископаемых остатков. Еще более богатый источник информации заключен в нуклеотидных последовательностях ДНК современных клеток. Недавно разработанные методы позволяют осуществлять пилюкомасштабное определение и видовое сравнение *последовательностей ДНК*, что, как можно надеяться, позволит с беспрецедентной точностью проследить ход эволюционного процесса.

1.2.3. Цианобактерия способны фиксировать CO_2 и N_2

Самые ранние стадии метаболизма развились для того, чтобы восполнить нехватку органических молекул, образовавшихся еще в пребиотических условиях. Что же произошло, когда запас подобных соединений полностью истощился? В этих условиях значительное преимущество при отборе должны были приобрести организмы, способные использовать атомы углерода и азо-

та атмосферы (в виде CO_2 и 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 CO_2 , явился фотосинтез, в процессе которого CO_2 превращается в органические соединения за счет энергии солнечного излучения. Солнечный свет возбуждает электрон в молекуле пигмента – *хлорофилла*. Энергия, высвобождаемая при обратном переходе электрона на более низкий энергетический уровень, направляется молекулами белка на проведение химических реакций.

По всей видимости, одной из первых реакций с использованием солнечного света было фосфорилирование нуклеотидов с образованием АТФ – богатого энергией соединения. Другой должна была стать реакция по созданию «восстановительной силы» (восстановительных эквивалентов). Дело в том, что атомы азота и углерода в CO_2 и N_2 атмосферы находятся в инертном окисленном состоянии, и один из путей сделать их более реакционноспособными, с тем чтобы они могли участвовать в реакциях биосинтеза, – это восстановить их, т.е. передать им электроны. Восстановление идет следующим образом. 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 CO_2 или N_2 . Сравнение механизмов фотосинтеза у разных современных бактерий свидетельствует о том, что одним из первых источников электронов был H_2S , конечным продуктом обмена (метаболическим отходом) которого должна была быть элементарная сера. Значительно позже развился куда более сложный, но в конечном счете более полезный процесс получения электронов из H_2O . В результате в качестве отхода в земной атмосфере начал накапливаться кислород.

В современном мире основной путь, по которому углерод и азот включаются в органические молекулы и поступают в биосферу, обеспечиваются *цианобактериями* (называемые также сине-зелеными водорослями). К ним относятся наиболее автономные из ныне живущих организмов. Способные «фиксировать» CO_2 и N_2 , они в первом приближении могут питаться только водой и воздухом, причем механизмы, с помощью которых это достигается, в своих общих чертах, по-видимому, не изменились на протяжении более чем 1 млрд. лет.

1.2.4. Бактерии могут осуществлять аэробное окисление молекул пищи

Многие сегодня справедливо обеспокоены влиянием человеческой деятельности на окружающую среду. Однако в прошлом другие организмы, хотя и значительно медленнее, все же вызвали радикальные изменения условий на Земле. Лучше всего это видно на примере состава земной атмосферы, которая с появлением фотосинтеза превратилась из практически лишенной молекулярного кислорода смеси газов в смесь, в которой содержание кислорода составляет 21%.

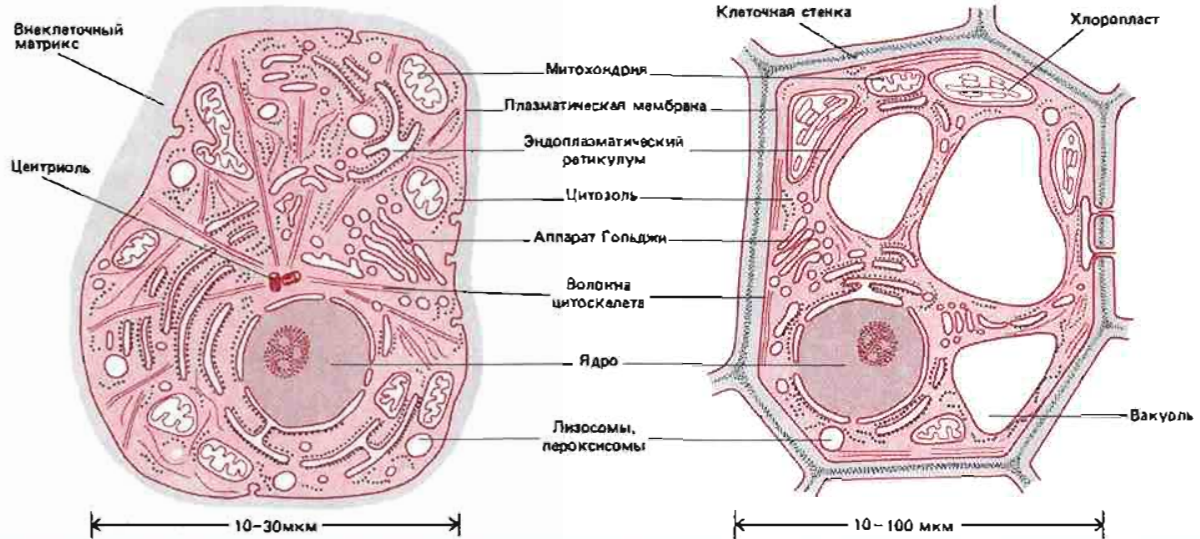
Поскольку кислород исключительно реакционноспособен и может реагировать с большинством компонентов цитоплазмы, то для многих ранних организмов он, видимо, был токсичен, так же как для многих современных анаэробных бактерий. Однако благодаря столь высокой реакционноспособности он является «поставщиком» химической энергии, и не удивительно, что в ходе эволюции организмы использовали это свойство. С помощью кислорода живые существа способны более полно окислять молекулы пищи. Например, глюкоза в присутствии кислорода может быть полностью расщеплена до H_2O и CO_2 , тогда как без кислорода она расщепляется до молочной кислоты или этилового спирта – конечных продуктов анаэробного гликолиза. Таким образом, использование кислорода позволяет получить значительно

ЖИВОТНАЯ КЛЕТКА

Тонкий срез "обобщенной" животной клетки

РАСТИТЕЛЬНАЯ КЛЕТКА

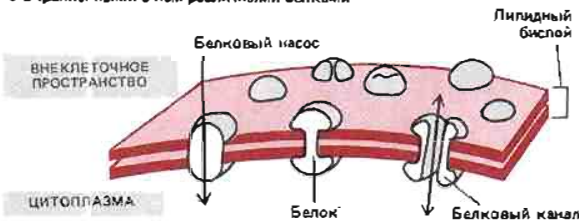
Тонкий срез "обобщенной" клетки высшего растения



СИСТЕМА КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

ПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МЕМБРАНА

Снаружи клетка ограничена плазматической мембраной – непрерывным слоем молекул липидов около 4-5 нм толщиной с вкрапленными в нем различными белками

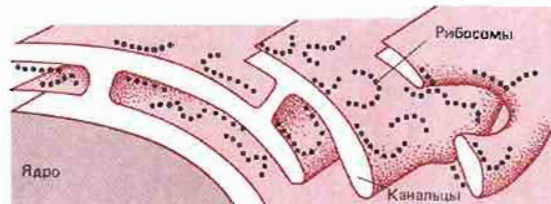


Некоторые из этих белков служат насосами и каналами для транспорта определенных молекул в клетку и из нее

ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ РЕТИКУЛУМ

Цитоплазма эукариотических клеток пронизана мембранными слоями, пузырьками, трубками, ограничивающими в совокупности значительное внутриклеточное пространство. Мембраны эндоплазматического ретикулума (ЭР) образуют непрерывную структуру с наружной ядерной мембраной; они специализируются на синтезе и транспорте липидов и мембранных белков.

Шероховатый эндоплазматический ретикулум обычно выглядит как система плоских слоев, наружная сторона которых покрыта синтезирующими белки рибосомами.

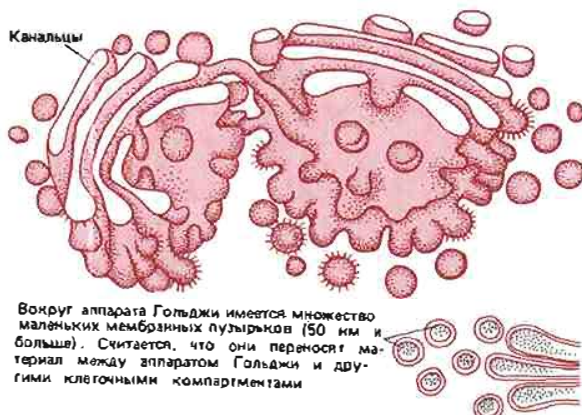


Гладкий эндоплазматический ретикулум обычно имеет более выраженное трубчатое строение и лишен прикрепленных рибосом. Его главная роль – метаболизм липидов



АППАРАТ ГОЛЬДЖИ

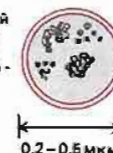
Система из уложенных в стопку окружающих мембранами уплощенных пузырьков, участвующая в модификации, сортировке и упаковке макромолекул для секрети или для доставки в другие органеллы



Вокруг аппарата Гольджи имеется множество маленьких мембранных пузырьков (50 нм и больше). Считается, что они переносят материал между аппаратом Гольджи и другими клеточными компартментами

ЛИЗОСОМЫ

Окруженные мембраной пузырьки, содержащие гидролитические ферменты внутриклеточного пищеварения



0,2–0,5 мкм

ПЕРОКСИСОМЫ

Окруженные мембраной пузырьки, содержащие окислительные ферменты, которые производят и разрушают пероксид водорода



0,2–0,5 мкм

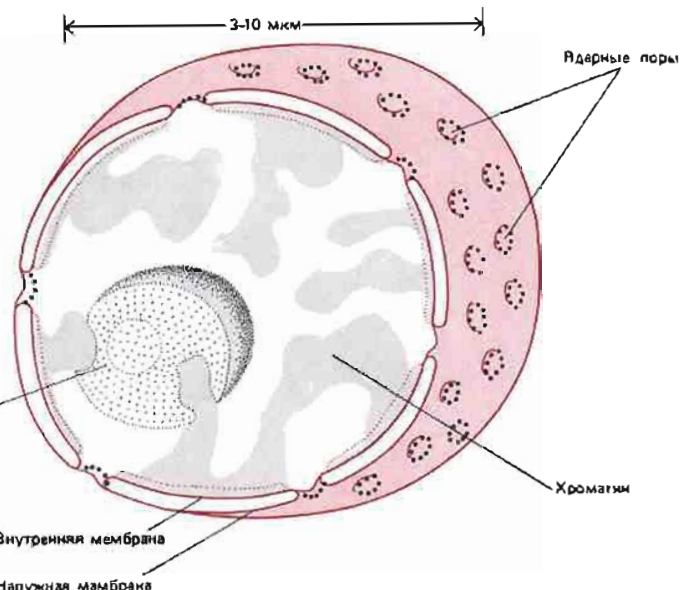
Схема 1. Основные органеллы эукариотических клеток.

ЯДРО

Ядро — самая крупная органелла клетки. Оно отделено от цитоплазмы оболочкой, состоящей из двух мембран. В ядре находится вся хромосомная ДНК, которая уложена в нити хроматина благодаря ассоциации с эквивалентным количеством гистонов. Содержимое ядра сообщается с цитоплазмой через отверстия в ядерной оболочке, называемые ядерными порами.

Ядрышко: внутриядерная фабрика по сборке клеточных рибосом

Оболочка ядра



ЦИТОСКЕЛЕТ

Пучки белковых волокон в цитоплазме образуют сеть, определяющую форму клетки и обеспечивающую клеточные движения. В клетках животных организмов цитоскелета является расположенная рядом с ядром область, содержащая пару центриолей. Три основных вида волокон цитоскелета:

1. Микротрубочки.



Диаметр 25 нм

2. Актиновые нити



Диаметр 7 нм

3. Промежуточные филаменты

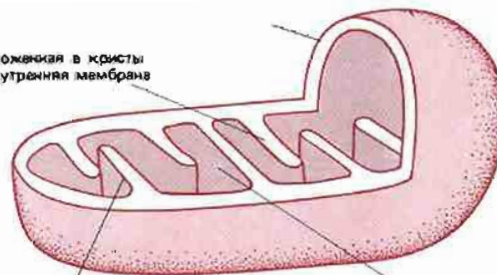


Диаметр 10 нм

МИТОХОНДРИЯ

Митохондрии — органеллы размером с бактерию — являются силовыми станциями эукариотических клеток, мобилизующими энергию окисления молекул пищи кислородом на образование АТФ.

Уложенная в кристы внутренняя мембрана

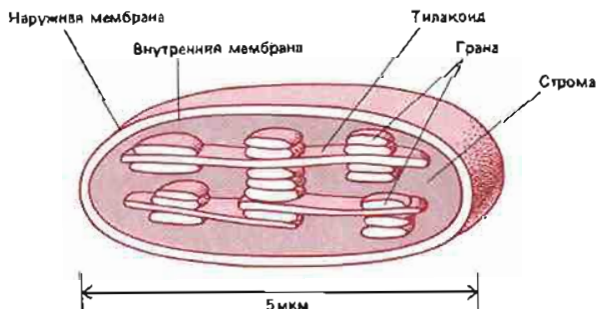


Конечные стадии окисления происходят на внутренней мембране

Матрикс содержит концентрированный раствор различных ферментов

СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ ОРГАНЕЛЛЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Хлоропласты. Эти пластиды, имеющиеся у всех высших растений, содержат хлорофилл и окружены двойной мембраной. В сложной системе их внутренних мембран находится фотосинтетический аппарат.



Вакуоль. Очень большие, окруженные одинарной мембраной везикулы, занимающие до 90 % объема клетки. Они заполняют свободные пространства клетки, а также участвуют в клеточном пищеварении.

Мембрана вакуоли (тонопласт)

Клеточная стенка. Растительные клетки окружены жесткой стенкой, состоящей из прочных молекул целлюлозы, которые распределены в матриксе, образованном другими полисахаридами.

Плазматическая мембрана



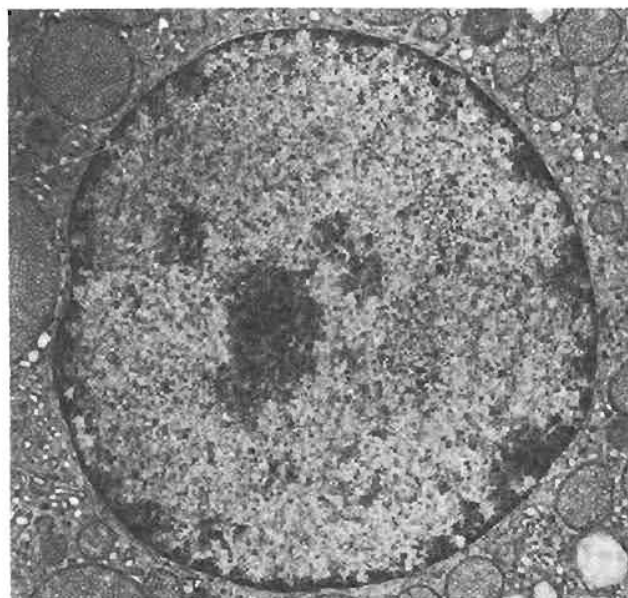
больше энергии из каждого грамма глюкозы. Энергия, высвобождаемая при аэробном окислении молекул пищи, называемом обычно **дыханием**, используется для синтеза АТФ, подобно тому как у фотосинтезирующих организмов АТФ образуется за счет солнечной энергии. В обоих случаях происходит ряд последовательных реакций переноса электронов, которые создают разность концентраций ионов H^+ внутри и снаружи небольших ограниченных мембранами компартментов. Полученный таким образом градиент концентрации H^+ служит источником энергии для синтеза АТФ. На сегодняшний день дыхание используется подавляющим большинством организмов, включая и большинство прокариот.

1.2.5. Клетки эукариот содержат несколько характерных органелл

Как же повлияло накопление молекулярного кислорода в атмосфере на анаэробные организмы, положившие начало жизни на Земле? В мире, богатом кислородом, который не мог быть ими использован, они оказались в невыгодных для отбора условиях. Некоторые, без сомнения, вымерли. Другие либо развили способность к дыханию, либо нашли экологические ниши, практически лишенные кислорода, и продолжали в них анаэробное существование. Однако третий класс организмов, по всей видимости, открыл значительно более хитрую и неизмеримо более богатую отдаленными последствиями стратегию выживания. Считается, что они вступили в *симбиоз* с аэробными клетками, а затем образовали с ними прочную ассоциацию. Это – наиболее привлекательное объяснение возникновения современных клеток эукариотического типа (схема I), о которых в основном и пойдет речь в книге.

Эукариотические клетки по определению и в отличие от прокариотических имеют ядро (по гречески «*карион*»). Ядро, в котором находится большая часть клеточной ДНК, ограничено двойной мембраной (рис. 1-17). Таким образом, компартмент, содержащий ДНК, отделен от остального содержимого клетки – *цитоплазмы*, где протекает большинство метаболических реакций. В самой цитоплазме различают множество характерных *органелл*. Среди них особенно выделяются два типа – *митохондрии* и *хлоропласты* (рис. 1-18 и 1-19). Каждая из этих органелл окружена собственной двойной мембраной,

Рис. 1-17. В ядре содержится большая часть ДНК эукариотической клетки. Ядро отчетливо видно на электронной микрофотографии тонкого среза клетки млекопитающего (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)



5 мкм



1 мкм

Рис. 1-18. Митохондрии осуществляют окислительное расщепление питательных веществ во всех эукариотических клетках. Как видно на этой электронной микрофотографии, их наружная мембрана гладкая, а внутренняя очень извилистая. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

отличающейся по химическим свойствам от мембраны, окружающей ядро. Митохондрии – почти универсальный компонент эукариотических клеток, тогда как хлоропласты встречаются лишь в тех эукариотических клетках, которые способны к фотосинтезу, т.е. в клетках растений, но не животных и грибов. Считается, что обе органеллы имеют симбиотическое происхождение.

1.2.6. Эукариотические клетки зависят от митохондрий, осуществляющих окислительный метаболизм

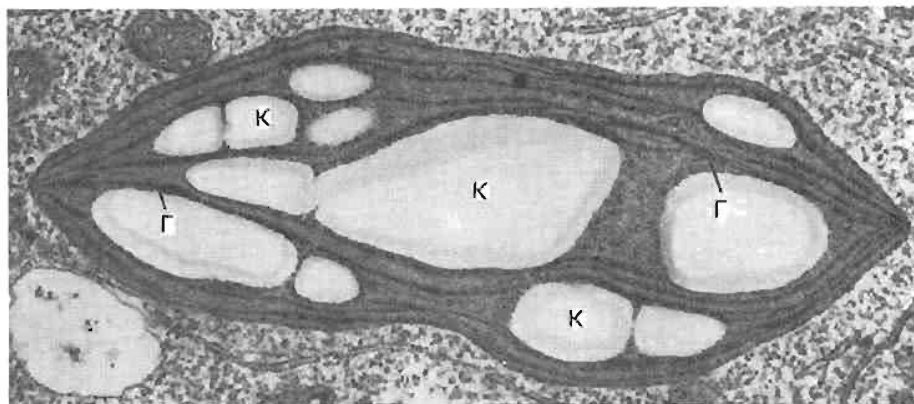
Митохондрии во многом похожи на свободноживущие прокариотические организмы. Они, например, часто напоминают бактерий по форме и размеру; они содержат ДНК и размножаются делением. Разрушив эукариотические клетки и разделив их компоненты, можно показать, что митохондрии ответственны за дыхание и что ни в каких других частях клетки этот процесс не происходит. Без митохондрий клетки животных и грибов были бы анаэробами, зависимыми в своих энергетических потребностях от сравнительно малоэффективного и архаичного процесса гликолиза. Многие современные бактерии могут дышать, причем механизм этого дыхания носит черты явного сходства с дыханием у митохондрий.

Таким образом, есть все основания думать, что эукариотические клетки являются потомками примитивных анаэробных организмов, которые выжили в богатом кислородом мире, поглотив аэробных бактерий. Вместо того чтобы переварить бактерий, эти организмы кормили их и поддерживали в состоянии симбиоза ради присущей им способности потреблять атмосферный кислород и производить энергию, так же как мы содержим коров ради их способности производить молоко, поедая траву. Естественно, мы не можем точно доказать, что все произошло именно так, однако особенности некоторых из современных микроорганизмов свидетельствуют о возможности подобной эволюционной последовательности. Например, амeba *Pelomyxa palustris* составляет исключение среди эукариот и не содержит митохондрий; вместо них она приютила аэробных бактерий и установила с ними прочные симбиотические отношения.

1.2.7. Хлоропласты могут быть потомками прокариотических водорослей

Хлоропласты осуществляют фотосинтез в значительной степени так же, как прокариоты-цианобактерии; они поглощают солнечный свет хлорофиллом, присоединенным к их мембранам. Некоторые из хлоропластов по строению

Рис. 1-19. Электронная микрофотография хлоропласта клетки мха. Видна разветвленная система внутренних мембран. Уплотненные мембранные мешочки, содержащие хлорофилл, организованы в стопки, или *граны* (Г). Этот хлоропласт содержит также большие скопления крахмала (К).



1 мкм

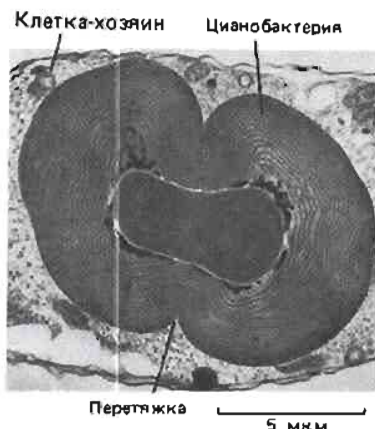


Рис. 1-20. Организм, близкородственный современным цианобактериям, но являющийся облигатным симбионтом другой клетки (вместе эти два организма известны как *Syanotheca paradoxa*). Показан момент деления «цианобактерии». (С любезного разрешения Jeremy D. Pickett-Heaps.)

во многом напоминают цианобактерии, будучи сходными с ними по размерам и способу укладки в слои своих хлорофиллсодержащих мембран (рис. 1-19). Более того, хлоропласты размножаются делением и содержат ДНК. Все это наводит на мысль, что хлоропласты произошли из цианобактерий, поселившихся в свое время в эукариотических клетках и осуществлявших для клеток-хозяев фотосинтез в обмен на предоставляемые последними приют и питание. В самом деле, симбиоз фотосинтезирующих клеток с другими типами клеток – явление достаточно частое, и ряд современных эукариотических клеток содержит истинные цианобактерии (рис. 1-20).

На рис. 1-21 показано эволюционное происхождение эукариот в соответствии с симбиотической теорией. Однако следует отметить, что митохондрии и хлоропласты, проявляя определенное сходство с современными аэробными бактериями и цианобактериями, в то же время во многих отношениях отличаются от них. Например, количество ДНК в этих органеллах очень мало; большинство составляющих их молекул синтезируется вне органелл и лишь затем в них транспортируется. Если считать, что митохондрии и хлоропласты действительно возникли из симбиотических бактерий, то следует признать, что они претерпели значительные эволюционные изменения и стали весьма зависимыми от своих хозяев.

Явилось ли приобретение митохондрий некой примитивной анаэробной клеткой – той критической стадией происхождения эукариот, которая повлекла за собой эволюцию их остальных отличительных черт? У нас нет данных, которые позволили бы ответить на этот вопрос. Для современных эукариот характерно не только наличие митохондрий, но и целый комплекс других особенностей, отличающих их от прокариот (табл. 1-1). Вместе все эти особенности наделяют эукариотические клетки большим количеством различных потенциальных возможностей, и трудно сказать, какая из них возникла раньше других.

Рис. 1-21. Постулированное происхождение эукариот путем симбиоза аэробных и анаэробных прокариот.

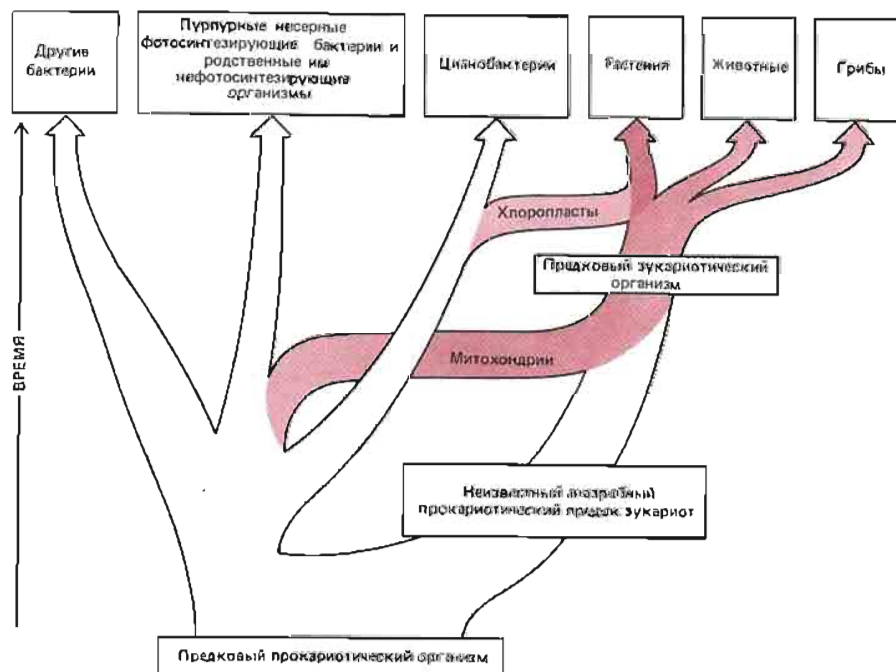


Таблица 1-1. Сравнение прокариотических и эукариотических организмов

	Прокариоты	Эукариоты
Организмы	Бактерии и цианобактерии	Протисты, грибы, растения и животные
Размер клеток	Обычный линейный размер 1–10 мкм	Обычный линейный размер 10–100 мкм
Метаболизм	Анаэробный или аэробный	Аэробный
Органеллы	Немногочисленны или отсутствуют	Ядро, митохондрии, хлоропласты, эндоплазматический ретикулум и др.
ДНК	Кольцевая ДНК в цитоплазме	Очень длинная ДНК с большим количеством некодирующих участков организована в хромосомы и окружена ядерной мембраной
РНК и белки	РНК и белки синтезируются в одном компартменте	Синтез и процессинг РНК происходят в ядре, синтез белков – в цитоплазме
Цитоплазма	Отсутствие цитоскелета, перетекания цитоплазмы, эндо- и экзоцитоза	Имеются цитоскелет из белковых волокон, цитоплазматические течения, эндоцитоз и экзоцитоз
Деление клеток	Бинарное деление	Митоз (или мейоз)
Клеточная организация	Преимущественно одноклеточные	Преимущественно многоклеточные с клеточной дифференцировкой

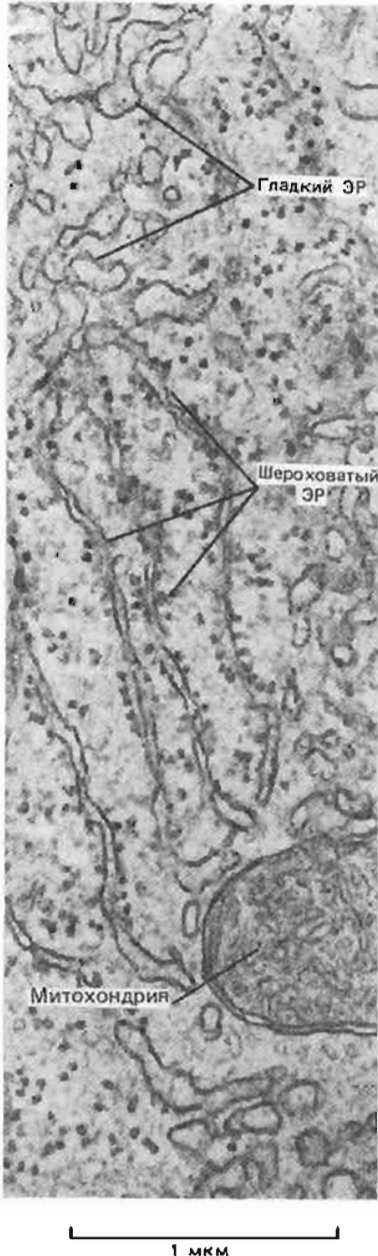


Рис. 1.22 Электронная микрофотография среза клетки млекопитающего, на которой виден гладкий и шероховатый эндоплазматический ретикулум (ЭР). (С любезного разрешения George Palade.)

1.2.8. Эукариотические клетки содержат множество различных внутренних мембран

Объем эукариотических клеток обычно значительно больше, чем прокариотических, – как правило, в 1000 раз или более. Пропорционально больше в эукариотических клетках и количество разнообразного клеточного материала, например в клетках тканей человека в 800 раз больше ДНК, чем в клетках типичных бактерий. Столь большие размеры создают ряд проблем. Поскольку все находящееся в клетке сырье для биосинтетических реакций должно в конечном счете входить внутрь и выходить наружу, проходя через окружающую клетку плазматическую мембрану, и, поскольку именно на мембране протекает ряд важных реакций, увеличение объема клетки требует увеличения поверхности мембраны. Но, как известно из геометрии, при простом увеличении размеров какого-либо предмета его объем возрастает как куб линейного размера, а площадь поверхности – лишь как квадрат. Поэтому для сохранения необходимого соотношения площади поверхности и объема большие эукариотические клетки вынуждены увеличивать свою поверхность различного рода изгибами, складками и другими усложнениями формы мембраны.

Этим, видимо, частично объясняется изобилие и сложность строения **внутренних мембран** – одна из основных особенностей всех эукариотических клеток. Мембраны окружают ядро, митохондрии и (у растений) хлоропласты. Они образуют лабиринт **эндоплазматического ретикула** (рис. 1-22), где синтезируются липиды и мембранные белки, а также материал, предназначенный для экспорта из клетки. Они образуют стопки уплощенных пузырьков, составляющих **аппарат Гольджи** (рис. 1-23), который тоже участвует в синтезе и транспорте различных органических молекул. Мембраны окружают **лизосомы**, содержащие запас ферментов, необходимых для внутриклеточного пищеварения, и таким образом защищают от действия этих ферментов белки и нуклеиновые кислоты самой клетки. Точно так же мембраны окружают **пероксисомы**, в которых образуются и разлагаются не безвредные для организ-

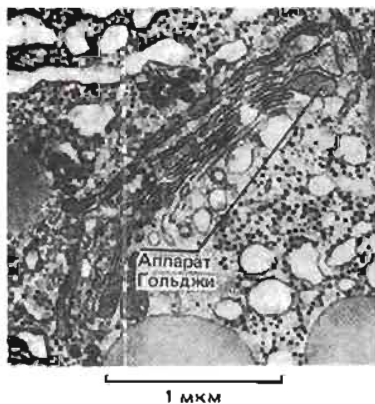


Рис. 1-23. Электронная микрофотография среза клетки млекопитающего. Виден аппарат Гольджи. Эта структура состоит из нескольких слоев уплощенных мембранных пузырьков (см. также схему I, стр. 34). Аппарат Гольджи участвует в синтезе и упаковке материала, предназначенного для секреции из клетки, а также в транспорте новосинтезированных белков в отведенный для них клеточный компартмент. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

ма высокореакционноспособные перекиси (пероксиды). Они образуют также маленькие везикулы и (у растений) большие, заполненные жидкостью *вакуоли*. Все эти окруженные мембранами структуры соответствуют определенным компартментам цитоплазмы. В совокупности они занимают почти половину объема типичной живой клетки. Цитоплазматический компартмент, включающий все, что не относится к окруженным мембранами органеллам, обычно называют **цитозолем**.

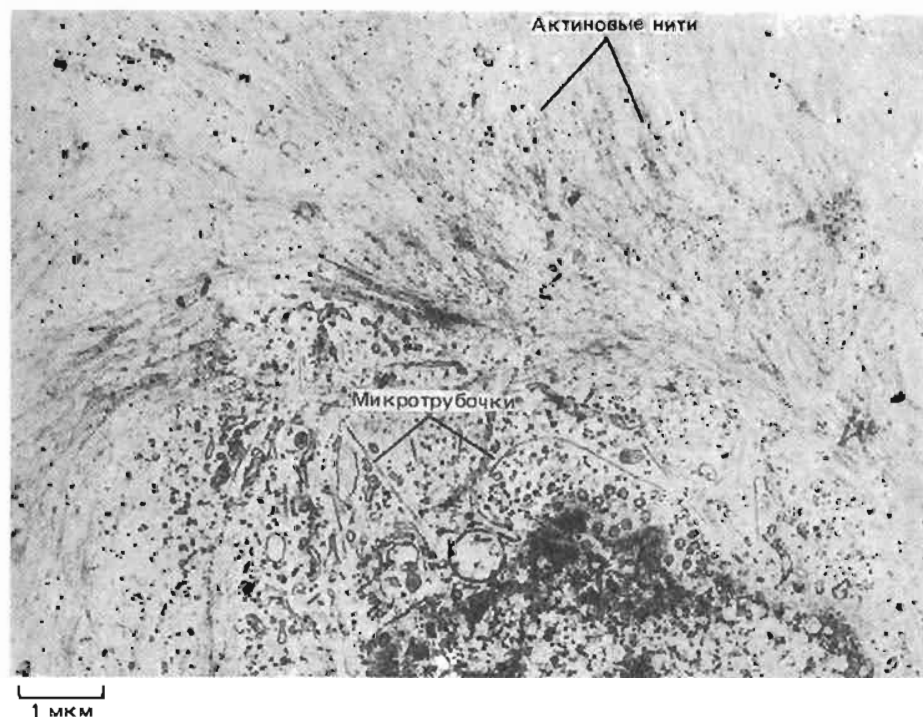
Все перечисленные нами мембранные структуры находятся внутри клетки. Как же в таком случае они могут разрешить выдвинутую нами в начале проблемы и обеспечить клетку такой площадью поверхности, которая соответствовала бы ее большому объему? Ответ заключается в том, что между внутриклеточными, окруженными мембранами структурами и внеклеточной средой происходит обмен. Он осуществляется с помощью двух уникальных для эукариотических клеток процессов: **эндоцитоза** и **экзоцитоза**. При эндоцитозе некоторые участки наружной поверхностной мембраны впячиваются и отрываются, образуя цитоплазматические мембранные пузырьки, содержащие вещества, которые находились во внешней среде или были адсорбированы на поверхности клетки. Экзоцитоз – обратный процесс, при котором внутриклеточные мембранные пузырьки сливаются с плазматической мембраной, высвобождая тем самым свое содержимое во внешнюю среду. Таким путем расположенные глубоко внутри клетки окруженные мембранами компартменты увеличивают эффективную поверхность клетки, участвующую в обмене веществом с внешней средой.

Как мы увидим в дальнейших главах, различные мембраны и окруженные ими компартменты эукариотических клеток стали высокоспециализированными: одни предназначены для секреции, другие – для всасывания, третьи – для специализированных биосинтетических процессов и т.д.

1.2.9. Эукариотические клетки имеют цитоскелет

Чем больше клетка, чем сложнее и специализированнее ее внутренние структуры, тем больше необходимость контролировать положение и пере-

Рис. 1-24. На этой электронной микрофотографии животной клетки видны микротрубочки и актиновые нити (филаменты) – два важных компонента цитоскелета. (Spooner B.S. Bioscience, 25, 440–451, 1975.)



мещение этих структур. Все эукариотические клетки имеют внутренний скелет—**цитоскелет**, определяющий форму клеток, их способность двигаться самим и перемещать органеллы из одной части клетки в другую. Цитоскелет образован сетью белковых волокон. Наиболее важные среди них—это **актиновые нити** и **микротрубочки** (рис. 1-24), которые, очевидно, возникли на очень ранних этапах эволюции, так как встречаются у всех эукариот практически в неизменном виде. И те и другие участвуют в механизмах клеточных движений, например актиновые нити (филаменты) обеспечивают мышечное сокращение, а микротрубочки являются основными структурными и силовыми элементами, обуславливающими передвижение ресничек и жгутиков—длинных выростов на поверхности некоторых клеток, биения которых напоминают удары бича.

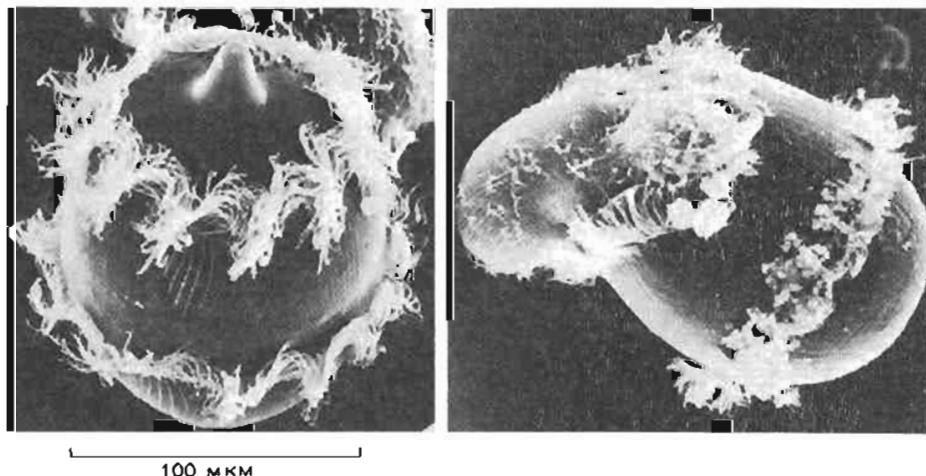
Актиновые нити и микротрубочки существенны также для внутренних движений цитоплазмы эукариотических клеток. Так, микротрубочки в форме **митотического веретена**—важнейшая часть аппарата, обеспечивающего правильное распределение ДНК между дочерними клетками при делении эукариотических клеток. Таким образом, без микротрубочек эукариотические клетки не могли бы воспроизводиться. В этом и в других случаях движение путем простой диффузии было бы либо слишком медленным, либо слишком неупорядоченным. Существует даже предположение, что большинство органелл эукариотических клеток прямо или косвенно прикреплены к цитоскелету и могут перемещаться только вдоль его направляющих элементов с помощью энергозависимого транспортного процесса.

1.2.10. К царству простейших относятся наиболее сложные из известных клеток

Насколько сложно может быть устроена одиночная эукариотическая клетка, легче всего проиллюстрировать на примере **протистов**. Это свободноживущие одноклеточные эукариоты, обнаруживающие озадачивающе большое разнообразие форм и поведения: они бывают фотосинтезирующими и хищными, подвижными и прикрепленными. Часто они имеют сложную анатомию, включающую такие структуры, как чувствительные щетинки, фоторецепторы, жгутики, ногоподобные отростки, ротовой аппарат, жалящие иглы и мышечноподобные пучки сократительных волокон. Все это особенно верно в отношении группы протистов, называемых **простейшими** или «первыми животными».

Didinium—хищное простейшее. Оно имеет округлое тело диаметром около 150 мкм, окаймленное двумя рядами ресничек; передний край уплощен и имеет одиночный рылообразный выступ. (рис. 1-25). *Didinium* быстро пла-

Рис. 1-25 Приведенная электронная микрофотография получена с помощью сканирующего микроскопа. Видно, как простейшее пожирается другим простейшим. Простейшие—это одноклеточные животные, которым присуще поразительное разнообразие форм и поведения. Ресничная инфузория *Didinium* (слева) имеет два периферических кольца подвижных ресничек и рылообразный выступ спереди, с помощью которого оно захватывает добычу. Справа показано, как *Didinium* заглатывает другое простейшее, *Paramecium*. (С любезного разрешения D. Barlow.)



васт в воде благодаря синхронным биениям своих ресничек. Встретив подходящую жертву (обычно другое простейшее, *Paramecium*), хищник выпускает из своего рыльца множество маленьких парализующих жал. Затем *Didinium* прикрепляется к *Paramecium* и пожирает ее, выворачиваясь как полый шар, чтобы проглотить клетку почти такого же размера, как он сам. Большую часть этого сложного поведения – плавание, парализацию и поглощение жертвы – обеспечивают цитоскелетные структуры, подстилающие плазматическую мембрану. Этот *кортикальный слой* включает, например, параллельные пучки микротрубочек, образующие сердцевину каждой реснички и обуславливающие способность к биениям.

Однако простейшие при всей сложности своей организации – это далеко не вершина эволюции эукариот. Более впечатляющие достижения были получены не путем концентрирования всяческих усложнений в одиночной клетке, а путем разделения обязанностей между различными типами клеток. Эволюция создала *многоклеточные организмы*, клетки которых, хотя и имеют одинаковое происхождение, претерпевают дифференцировку, в результате которой разные типы клеток приобретают высокую степень специализации и образуют выполняющие различные функции части одного большого объединенного организма.

1.2.11. Гены можно включать и выключать

Различные специализированные типы клеток одного и того же высшего растения или животного часто выглядят совершенно по-разному (схема II). Это кажется парадоксальным, поскольку все клетки многоклеточного организма близкородственны, являясь потомками одной и той же клетки-предшественницы, а именно оплодотворенной яйцеклетки. Общее происхождение означает наличие одинаковых или сходных генов. Как же возникают различия? В редких случаях клетки при специализации теряют часть генетического материала – крайним примером могут служить эритроциты млекопитающих, у которых в ходе дифференцировки теряется ядро. Однако подавляющее большинство клеток почти всех видов растений и животных сохраняет всю генетическую информацию, содержащуюся в оплодотворенной яйцеклетке. В основе специализации лежат не потеря или приобретение генов, а изменение в *выражении генов (экспрессии)*.

Даже бактерии не синтезируют постоянно все возможные типы белков и способны приводить уровень происходящих в них процессов синтеза в соответствие с условиями внешней среды. Например, белки, необходимые для усваивания (метаболизма) лактозы, производятся некоторыми бактериями только в том случае, если этот сахар имеется в среде в качестве единственного углевода. Другие бактерии, попав в неблагоприятные условия, прекращают большинство нормальных метаболических процессов и образуют *споры*, имеющие плотную непроницаемую наружную стенку и цитоплазму измененного состава.

У эукариотических клеток развились куда более сложные механизмы контроля экспрессии генов, затрагивающие целые системы взаимодействующих генных продуктов. Как внешние, так и внутренние сигналы активируют или подавляют группы генов. При дифференцировке клеток должны координированно измениться и состав мембран, и цитоскелет, и секретируемые продукты, и даже метаболизм. Сравните, например, приспособленную к сокращению клетку скелетной мышцы и *остеобласт* – секретирующий твердый матрикс кости – у одного и того же животного (схема II). Столь радикальные различия в типе клеток обусловлены стабильными изменениями в экспрессии генов. Механизмы, контролирующие такие изменения, развились у эукариот до беспрецедентной для прокариот степени.

1.2.12. Клетки эукариот содержат значительно больше ДНК, чем это необходимо для кодирования белков

В эукариотических клетках очень много ДНК. Как мы уже говорили, в клетках человека ДНК почти в 1000 раз больше, чем в типичной бактериальной клетке. Однако, по-видимому, лишь малая часть этой ДНК – возможно, около 1% в клетках человека – кодирует действительно образующиеся белки. Зачем же нужны остальные 99% ДНК? Одна из гипотез состоит в том, что довольно большая часть этой ДНК просто увеличивает массу ядра. По другой гипотезе эта ДНК в основном паразитическая – собрание бесполезных для клетки последовательностей, веками накапливавшихся в ней в результате использования клеточных механизмов синтеза для собственного размножения. Действительно, в ДНК многих видов были обнаружены так называемые *подвижные (мобильные) элементы* – последовательности, способные внезапно «перепрыгивать» из одного участка ДНК в другой и даже встраивать в новые места свои дополнительные копии. Подвижные элементы могут, таким образом, размножаться подобно медленно развивающейся инфекции, составляя все более увеличивающуюся часть генетического материала.

Но эволюция использует все возможности. Вне зависимости от происхождения некодирующей ДНК сейчас она, наверняка, выполняет какую-нибудь важную функцию. Часть этой ДНК играет структурную роль, позволяя, как описано в следующем разделе, участкам генетического материала конденсироваться или «упаковываться» определенным образом. Другая часть «лишней» ДНК регуляторная и участвует во включении и выключении генов, направляющих синтез белков, играя, таким образом, ключевую роль в сложных механизмах регуляции экспрессии генов эукариотической клетки.

1.2.13. Генетический материал эукариотических клеток упакован очень сложно

ДНК эукариотических клеток имеет столь большую длину, что риск ее запутывания или разрыва очень велик. Вероятно, по этой причине в процессе эволюции возникли *гистоны* – характерные для эукариот белки, связывающиеся с ДНК и скручивающие ее в компактные и более удобные для ряда клеточных процессов *хромосомы* (рис. 1-26). Уплотнение хромосом является существенной частью подготовки эукариотических клеток к делению (рис. 1-27). ДНК всех эукариот (за одним небольшим исключением) связана с гистонами. Об исключительно важном значении этих белков свидетельствует тот факт, что они ведут себя крайне консервативно в процессе эволюции: некоторые из гистонов гороха почти не отличаются (с точностью до аминокислоты) от соответствующих гистонов коровы.

В эукариотических клетках с ДНК кроме гистонов связано множество других белков. Влияя на способность ДНК взаимодействовать с другими молекулами, некоторые из этих ДНК-связывающих белков изменяют набор экспрессирующихся генов, отличающий один тип специализированных клеток от другого. Например, экспрессию генов можно контролировать, изменяя упаковку ДНК, так как в плотноупакованной ДНК гены не выражаются.

Мембраны, окружающие ядро эукариотических клеток, защищают весь связанный с ДНК тонкий механизм контроля, укрывают его от быстрых движений и от многих происходящих в цитоплазме химических изменений. Кроме того, они позволяют пространственно разобщить две ключевые стадии выражения генов: 1) копирование последовательности ДНК в последовательность РНК (*транскрипцию ДНК*) и 2) использование этих последовательностей РНК для синтеза определенных белков (*трансляцию РНК*). В прокариотических клетках нет такой компартментализации и трансляция РНК с образованием белка происходит по мере образования РНК. При транскрипции, начинаясь раньше, чем завершился синтез РНК. У эукариот, напротив, указанные этапы пути от гена к белку строго разобщены: транскрипция про-

ТИПЫ КЛЕТОК

В организме человека имеется более 200 различных типов клеток. Из них построены различные типы тканей, в том числе:

эпителий

соединительная ткань

мышцы

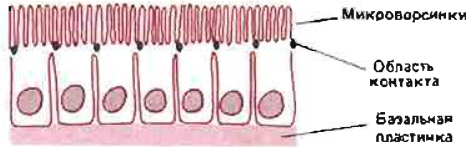
нервная ткань

Большинство тканей состоит из клеток разного типа

ЭПИТЕЛИЙ

Эпителиальные клетки образуют сплошные клеточные пласты, называемые эпителием; они выстилают внутренние и наружные поверхности тела. Существует много специализированных видов эпителия

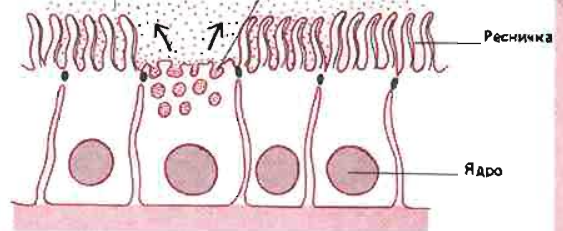
Всасывающие клетки имеют на своей свободной поверхности многочисленные микроворсинки, что увеличивает поверхность всасывания



Соседние эпителиальные клетки образуют друг с другом контакты, которые придают всему пласту механическую прочность и делают его непроницаемым для малых молекул. Этот пласт покрывает базальную мембрану

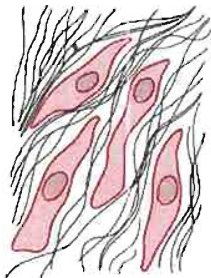
Клетки с ресничками
Реснички на свободной поверхности эпителия путем синхронных биений способствуют перемещению различных веществ (например, слизи) вдоль эпителия

Секреторные клетки
В большинстве видов эпителия имеются клетки, которые выделяют различные вещества (секреты) на его поверхность



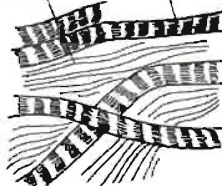
СОЕДИНИТЕЛЬНАЯ ТКАНЬ

Пространства между органами и тканями заполнены соединительной тканью, состоящей в основном из сети прочных волокон, погруженных в полисахаридный гель. Этот **внеклеточный матрикс** секретируют преимущественно **фибробласты**

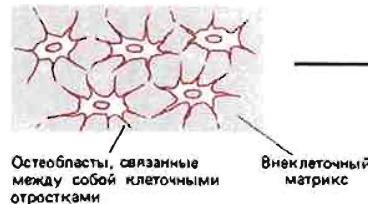


Фибробласты в рыхлой соединительной ткани

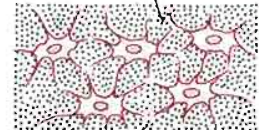
Два основных типа внеклеточных белковых волокон — это **коллаген** и **эластин**



Клетки, образующие **костную ткань**, называются **остеообластами**. Они секретируют матрикс, в котором впоследствии откладываются кристаллы фосфата кальция



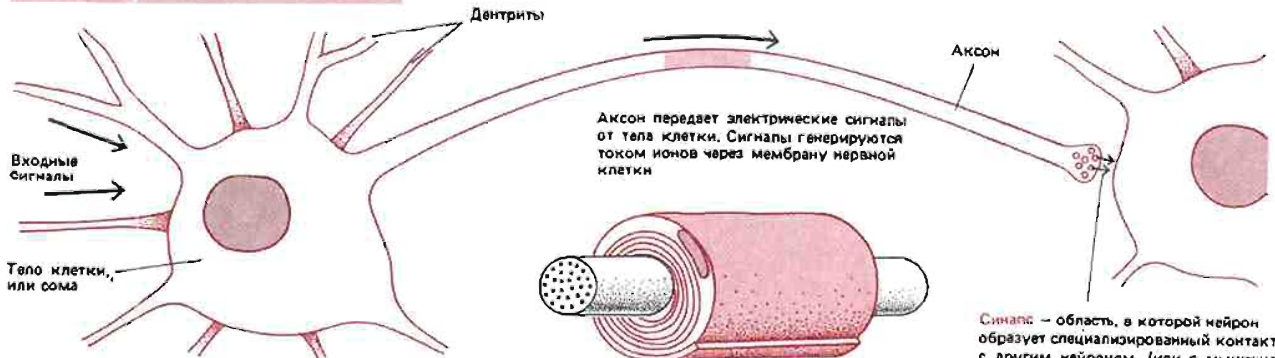
Соли кальция инкрестируют внеклеточный матрикс



Жировые клетки принадлежат к самым большим клеткам тела. В этих клетках образуется и накапливается жир. Ядро и цитоплазма отщелкуются к периферии клетки большой липидной каплей



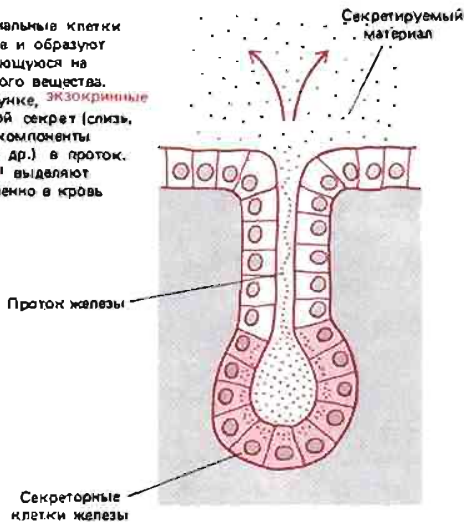
НЕРВНАЯ ТКАНЬ



Нервные клетки, или **нейроны** специализированы для обеспечения коммуникаций. Головной и спинной мозг образованы сетью нейронов, окруженных опорными клетками **глии**

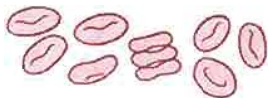
Специализированные клетки, называемые **шванновскими** окутывают аксон, образуя многослойную **миелиновую оболочку**

Секреторные эпителиальные клетки часто собраны вместе и образуют железу, специализирующуюся на секреции определенного вещества. Как показано на рисунке, экзокринные железы выделяют свой секрет (слизь, слезную жидкость, компоненты желудочного сока и др.) в проток. Эндокринные железы выделяют гормоны непосредственно в кровь

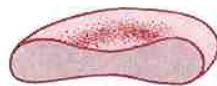


КРОВЬ

Эритроциты (или красные кровяные тельца) — мелкие клетки, лишенные ядра и внутренней мембраны, — набиты до отказа гемоглобином, белком, связывающим кислород



В 1 мм³ крови содержится 6 000 000 эритроцитов



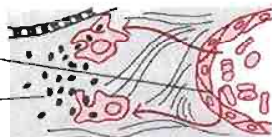
Их обычная форма — двояковогнутый диск

Лейкоциты (белые кровяные тельца).

На каждые 1000 эритроцитов приходится один лейкоцит. Лейкоциты, циркулирующие в крови, при необходимости способны проникать через стенки кровеносных сосудов в окружающие ткани. Имеются несколько различных видов лейкоцитов, в том числе макрофаги и нейтрофилы, которые движутся к очагам инфекции, где захватывают бактерии и остатки поврежденной ткани

Стенка маленького кровеносного сосуда

Бактериальная инфекция в соединительной ткани



Лимфоциты обеспечивают иммунные реакции — образование антител и отторжение пересаженных тканей

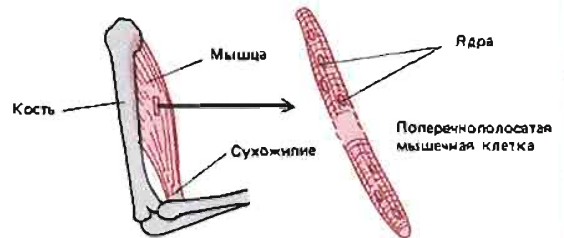
ПОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Сперматозоид самца сливается с яйцеклеткой самки; в результате последовательных делений такой оплодотворенной яйцеклетки образуется новый организм. И сперматозоид, и яйцеклетка гаплоидны, т.е. несут лишь по одному набору хромосом



МЫШЦЫ

Сокращаясь, мышечные клетки создают механическое напряжение "усилие". У позвоночных есть три основных типа мышечных клеток: скелетная мышца сильно и быстро сокращаясь, обеспечивает движение сустава. Любая мышца — это пучок мышечных волокон; каждое такое волокно представляет собой огромную многоядерную клетку



Гладкие мышцы — это мышцы желудочно-кишечного тракта, мочевого пузыря, артерий и вен. Они состоят из тонких удлинённых клеток (не имеющих исчерченности); каждая из таких клеток имеет только одно ядро

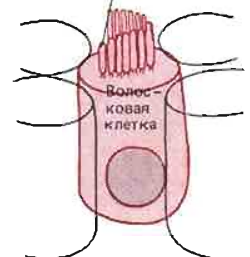


Сердечная мышца по своим свойствам занимает промежуточное положение между гладкими и скелетными мышцами; именно она заставляет сердце сокращаться. Соседние клетки сердечной мышцы связаны между собой контактами, проводящими электрические импульсы, благодаря чему эти клетки сокращаются синхронно

СЕНСОРНЫЕ КЛЕТКИ

Клетки, чувствительные к внешним стимулам, относятся к самым сложным клеткам позвоночных. Волосковые клетки внутреннего уха служат первичными датчиками звука. Будучи модифицированными эпителиальными клетками, они несут на своей поверхности специальные микроворсинки (стереоцилии), движение которых под действием звуковых колебаний посылает электрический сигнал в мозг

Стереоцилии — очень жесткие структуры, так как заполнены актиновыми нитями



Палочки сетчатки глаза — это нагретые клетки, специализированные для восприятия света. Чувствительная к свету область этих клеток содержит множество мембранных дисков, в которых находится светочувствительный пигмент родопсин. Под действием света в мозг направляется электрический сигнал



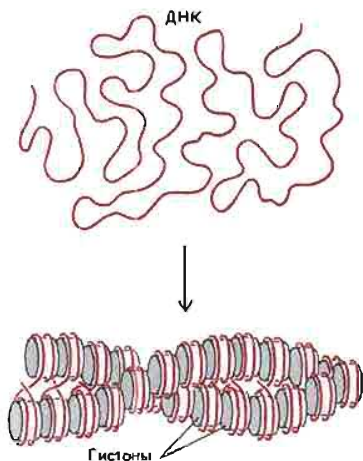


Рис. 1-26. Схема, показывающая, как положительно заряженные белки, называемые гистонами, способствуют скручиванию ДНК в хромосомах.

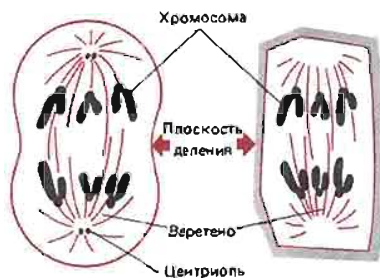


Рис. 1-27. Схематическое изображение эукариотической клетки в митозе. Слева — животная клетка, справа — растительная. Ядерная оболочка распалась, а реплицированная ДНК сконденсировалась в два полных набора хромосом. Митотическое веретено, состоящее в основном из микротрубочек, распределяет по одному набору хромосом в каждую из новообразующихся клеток.

исходит в ядре, трансляция — в цитоплазме. Сказанное не относится к митохондриям и хлоропластам, которые по этому признаку, как и по многим другим, ближе к бактериям. РНК, прежде чем включиться в процессы синтеза белка, должна покинуть ядро. До этого, находясь в ядре, РНК претерпевает сложный процесс созревания (процессинг), в ходе которого одни части молекулы РНК удаляются, а другие модифицируются.

Благодаря подобным сложностям генетический материал эукариотических клеток предоставляет значительно более широкие возможности для различного рода регуляции, чем генетический материал бактерий.

Заключение

Все существующие ныне клетки подразделяются на два типа: на прокариот (бактерии и их близкие родственники) и эукариот. Считается, что прокариотические клетки напоминают самые ранние клетки-прародительницы. Несмотря на сравнительную простоту строения, прокариоты весьма разнообразны в биохимическом отношении: например, все основные метаболические пути, включая три главных процесса получения энергии — гликолиз, дыхание и фотосинтез, — можно обнаружить у бактерий. Эукариотические клетки больше по размеру и имеют более сложную организацию, чем прокариоты. Они содержат больше ДНК и различных компонентов, обеспечивающих ее сложные функции. ДНК эукариотических клеток заключена в окруженное мембраной ядро, а в цитоплазме находится много других окруженных мембранами оргanelл. К ним относятся митохондрии, осуществляющие окончательное окисление молекул пищи, а также (в растительных клетках) хлоропласты, в которых идет фотосинтез. Целый ряд данных свидетельствует о происхождении митохондрий и хлоропластов от ранних прокариотических клеток, ставших внутренними симбионтами большей по размерам анаэробной клетки. Другая отличительная особенность эукариотических клеток — это наличие цитоскелета из белковых волокон, организующего цитоплазму и обеспечивающего механизм движения.

1.3. От клеток — к многоклеточным организмам [3]

Одноклеточные организмы, вроде бактерий и простейших, столь успешно адаптировались к разнообразным условиям среды, что составляют более половины всей биомассы Земли. В отличие от высших животных многие из этих одноклеточных способны синтезировать все необходимые им вещества из нескольких простых соединений, причем некоторые из них делятся чаще чем раз в час. В чем же тогда состоит преимущество при отборе, которое привело к образованию многоклеточных организмов?

Вкратце это можно объяснить тем, что многоклеточные могут использовать ресурсы, недоступные единичной клетке. Например, многоклеточность позволяет дереву достичь больших размеров, иметь корни в земле (где один набор клеток поглощает воду и питательные вещества) и листья в воздухе (где другие клетки могут эффективно улавливать энергию солнечных лучей). Ствол дерева состоит из специализированных клеток, образующих каналы для транспорта воды и питательных веществ между листьями и корнями. Другая группа специализированных клеток образует слой коры, предотвращающий потерю воды и защищающий внутреннюю часть ствола. Дерево как целое не конкурирует с одноклеточными организмами за свою экологическую нишу; его способ выживания и размножения совершенно иной.

По мере появления различных растений и животных изменялась и среда, в которой проходила эволюция. Выживание в джунглях требует совсем иных способностей, чем выживание в открытом море. Возникновение новых спосо-

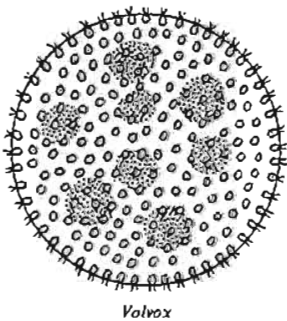
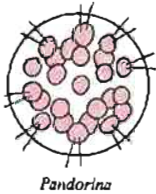
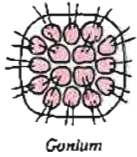


Рис. 1-28. Четыре близких рода зеленых водорослей, иллюстрирующих развитие от одноклеточной к колониальной и далее к многоклеточной организации.

бов движения, сенсорного восприятия, коммуникаций, социальной организации – все это позволило эукариотическим организмам конкурировать, размножаться и выживать все более изощренным образом.

1.3.1. Одноклеточные клетки способны объединяться и образовывать колонии

Вполне вероятно, что ранней стадией эволюции многоклеточных явилось объединение одноклеточных организмов в колонии. Достигнуть этого проще всего, если дочерние клетки не расходятся после каждого клеточного деления. В примитивном виде подобное общественное поведение встречается даже у прокариот. Например, миксобактерии, которые живут в почве и питаются нерастворимыми органическими молекулами, расщепляют их, секретируя специальные ферменты. Они образуют рыхлые колонии, где накапливаются ферменты от индивидуальных клеток, и, таким образом, повышается эффективность питания. Эти клетки представляют собой вершину структурной сложности, достигнутой эволюцией прокариот: когда истощаются запасы питательных веществ, клетки плотно агрегируют и образуют плодовое тело, в котором бактерии дифференцируются в споры, способные выжить даже в исключительно суровых условиях. Когда условия становятся более благоприятными, споры плодового тела прорастают и образуют новое скопление бактерий.

Зеленые водоросли (не путать с прокариотическими сине-зелеными водорослями, или цианобактериями) – это эукариоты, существующие в виде одноклеточных организмов, колоний и многоклеточных форм (рис. 1-28). Различные виды зеленых водорослей можно расположить в порядке возрастания сложности, иллюстрирующем эволюционную последовательность, которую, видимо, прошли высшие растения и животные. Одноклеточные зеленые водоросли, такие как *Chlamydomonas*, напоминают жгутиковых простейших, но в отличие от них имеют хлоропласты и способны к фотосинтезу. У близких родов группы жгутиковых клеток образуют колонии, удерживаемые вместе матриксом из секретируемых самими же клетками молекул. Наиболее просто организованные виды (принадлежащие к роду *Gonium*) имеют форму вогнутого диска, состоящего из 4, 8, 16 или 32 клеток. Биения их жгутиков независимы друг от друга, но, поскольку все они ориентированы в одном направлении, они способны приводить колонию в движение. Каждая клетка такой колонии равноценна любой другой, и деление каждой клетки может дать начало новой колонии. В других родах можно обнаружить большие по размерам колонии. Наиболее примечательный пример – род *Volvox*, некоторые из видов которого содержат до 50 000 клеток и более, образующих полный шарик. У представителей рода *Volvox* индивидуальные клетки колонии соединены тонкими цитоплазматическими мостиками, так что биение жгутиков координированы и вся колония движется подобно катящемуся шарiku (рис. 1-28). В колонии *Volvox* наблюдается некоторое разделение труда – за воспроизведение отвечает небольшое количество клеток, служащих предшественниками новых колоний. Остальные клетки столь зависимы друг от друга, что неспособны к самостоятельному существованию, и разрушенная колония погибает.

1.3.2. Клетки высших организмов становятся специализированными и взаимозависимыми

В определенном смысле *Volvox* больше напоминает многоклеточный организм, чем просто колонию. При движении в воде биения жгутиков синхронизированы, колония структурно и функционально асимметрична. Она способна двигаться по направлению к отдаленному источнику света. Репродуктивные клетки обычно локализируются с одного края колонии; там они делятся и обра-

зуют новые миниатюрные колонии, укрытые вначале внутри родительского шарика. Таким образом, у *Volvox* в примитивной форме проявляются две существенные черты всех многоклеточных организмов: клетки *специализируются* и *кооперируются*. С помощью специализации и кооперации клетки образуют единый координированный организм, обладающий более широкими возможностями, чем любая из составляющих его частей.

Организованные формы дифференцировки клеток встречаются даже у некоторых прокариот; например, многие цианобактерии не расходятся после деления, образуя нитевидные цепочки до метра длиной. Через регулярные интервалы в такой цепочке встречаются изменившиеся клетки, способные включать атмосферный азот в органические молекулы. Эти немногие специализированные клетки осуществляют фиксацию азота не только для себя, но и для соседних клеток, с которыми они обмениваются продуктами метаболизма. Но эукариотические клетки оказались значительно лучше приспособленными к организованному размножению и труду. Именно они, а не прокариоты образуют все более сложные многоклеточные организмы.

1.3.3. В основе многоклеточной организации лежит взаимодействие клеток

Чтобы образовать многоклеточный организм, клетки должны быть как-то связаны друг с другом. Эукариоты развили целый ряд приспособлений для осуществления этой функции. У *Volvox*, как уже отмечалось, клетки не полностью расходятся при делении, а остаются связанными цитоплазматическими мостиками. У высших растений клетки не только связаны цитоплазматическими мостиками — *плазмодесмами* но и заключены в жесткие «соты» со стенками из целлюлозы, которую сами клетки и секретируют (*клеточные стенки*).

Клетки большинства животных не имеют жестких стенок, а цитоплазматические мостики у них редки. Вместо этого клетки объединены сравнительно рыхлой сетью больших внеклеточных органических молекул (называемых *внеклеточным матриксом*) и слипанием (адгезией) их плазматических мембран. Например, организм *губок*, которых обычно считают наиболее примитивными из современных животных, как правило, состоит из пяти типов специализированных клеток, образующих оболочку тела с ее системой пор и каналов для прокачивания воды, из которой клетки отфильтровывают и поглощают частички пищи. Благодаря делению клеток губки неограниченно растут; их размер и структура точно не predeterminedены. Они лишены нервной системы, которая могла бы координировать активность различных частей организма. Их можно описать как «свободную республику клеток» в отличие от более строго организованных клеточных сообществ, характерных для высших животных. Тем не менее даже губки устроены далеко не случайным образом. Если продавить губку через тонкое сито, чтобы механически разделить отдельные клетки, эти клетки могут иногда самопроизвольно собраться в целую губку: сначала клетки агрегируют в большую неупорядоченную массу, а затем перегруппировываются в организованный многоклеточный слой. Такие слои клеток называют *эпителием*.

1.3.4. Эпителиальные слои клеток окружают защищенную от внешних воздействий внутреннюю среду организма

Из всех способов взаимосвязи клеток в тканях многоклеточных животных наиболее фундаментальное значение, видимо, имеет эпителиальная организация. В эволюции сложных многоклеточных организмов эпителиальный слой сыграл столь же большую роль, как и клеточная мембрана в эволюции сложных одиночных клеток.

Значение эпителиальных слоев легко проиллюстрировать на примере дру-

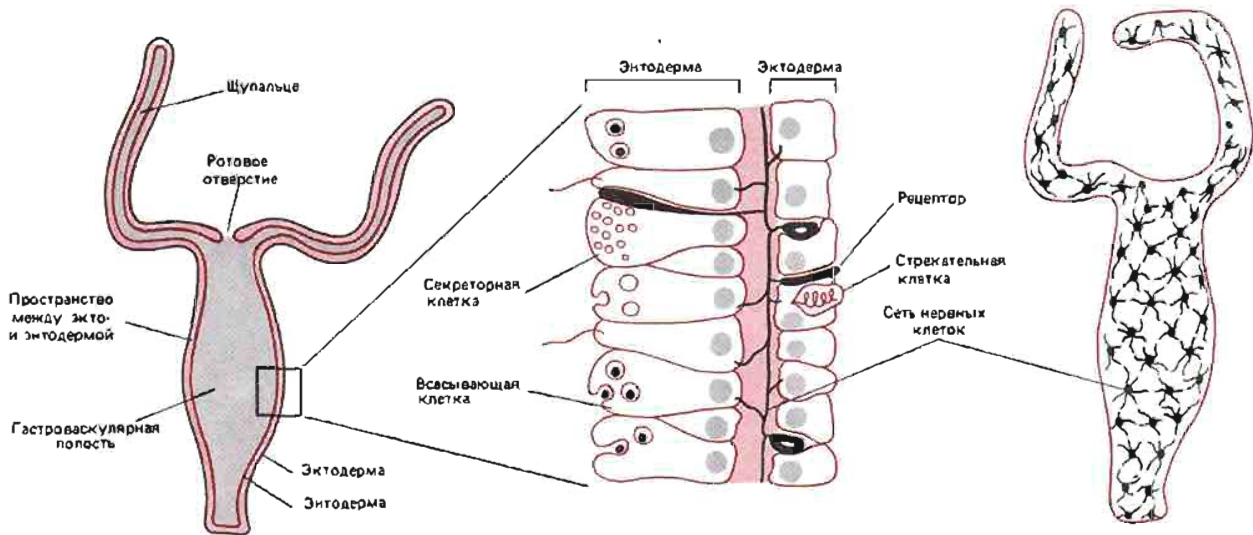


Рис. 1-29. Схематическое изображение строения тела гидры. Наружный слой клеток (эктодерма) играет преимущественно защитную роль, а внутренний слой (энтодерма) в основном участвует в пищеварении. Между этими слоями зажата сеть взаимосвязанных нервных клеток (на правом рисунке нервные клетки изображены непропорционально большими).

гой группы низших животных — кишечнополостных, которые на эволюционной лестнице стоят на ступеньку выше губок, так как имеют что-то вроде нервной системы. Среди животных с нервной системой они, видимо, являются наиболее примитивными. Эта группа животных включает в себя медуз, актиний, коралловые полипы, а также гидру, маленький пресноводный организм. Тело кишечнополостных состоит из двух слоев эпителия: наружного — *эктодермы* и внутреннего — *энтодермы*. Энтодермальный слой окружает *гастроваскулярную* полость, в которой происходит переваривание пищи (рис. 1-29). Клетки связаны между собой таким образом, что обеспечивают не только механическую прочность эпителиальных слоев, но и непроницаемость для молекул. В результате они препятствуют утечке питательных веществ и способствуют созданию необходимых для их переваривания химических условий. Некоторые энтодермальные клетки секретируют пищеварительные ферменты в гастроваскулярную полость, другие осуществляют всасывание и дальнейшее переваривание пищевых молекул, образовавшихся под действием этих ферментов. Образуя плотный эпителиальный слой, клетки энтодермы препятствуют выходу всех этих молекул в окружающую среду. В результате в гастроваскулярной полости создаются условия, необходимые для нормального пищеварения. В то же время обращенные наружу клетки эктодермы сохранили специализацию, полезную при столкновениях с превратностями внешнего мира. В эктодерме, например, есть клетки, содержащие спирально закрученное ядовитое жало, способное парализовать тех мелких животных, которыми гидра питается.

Между эктодермой и энтодермой находится еще одна прослойка, отделенная как от внутренней полости, так и от внешнего мира. Именно в этом узком пространстве преимущественно располагаются нервные клетки; они плотно прижаты к внутренней поверхности эктодермы. Сокращая мышечно-подобные клетки эктодермы и энтодермы, животное способно изменять форму и двигаться. Нервные клетки проводят электрические сигналы, осуществляя контроль и координацию этих сокращений (рис. 1-30 и 1-31). Как мы увидим в дальнейшем, для нормального функционирования нервных клеток критическое значение имеет концентрация простых неорганических ионов в окружающей среде. Большинство нервных клеток, в том числе и наши собственные, приспособлены для работы в растворе, ионный состав которого аналогичен составу морской воды, что, видимо, отражает условия возникновения первой нервной клетки. Большинство кишечнополостных по-прежнему обитает в море, но не все. В частности, гидра живет в пресной воде. Очевидно, что заселение этой новой среды обитания оказалось возможным лишь в силу того, что нервные клетки гидры заключены в замкнутом и изолиро-

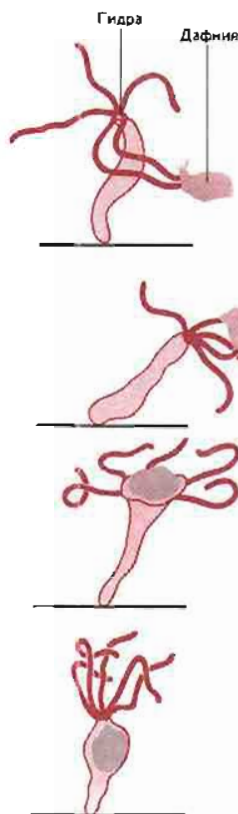


Рис. 1-30. Гидра может проявлять достаточно сложную активность. Здесь показано, как гидра ловит своими щупальцами маленькую дафнию и засовывает свою жертву в гастроваскулярную полость для переваривания.

ванном от внешней среды пространстве, образованном слоями эпителиальных клеток, поддерживающими внутреннюю среду, необходимую для функционирования нервных клеток.

1.3.5. Межклеточные коммуникации определяют пространственное строение многоклеточных организмов

Клетки гидры, будучи связаны между собой механически и с помощью специальных контактов, изолирующих внутреннюю часть организма от внешней среды, сообщаются, кроме того, друг с другом по всей длине тела. Если отрезать один конец гидры, оставшиеся клетки среагируют на отсутствие ампутированной части изменением своих свойств и перестроятся так, чтобы регенерировать целое животное. Очевидно, что от одной части организма к другой передаются сигналы, управляющие развитием формы тела, со щупальцами и ртом на одном конце и стебельком на другом. Более того, эти сигналы независимы от нервной системы. Если развивающуюся гидру обработать колхицином, препятствующим образованию нервных клеток, то животное потеряет способность двигаться, ловить добычу и питаться. Однако его пищеварительные системы будут по-прежнему работать нормально, так что любой человек, достаточно терпеливый, чтобы вкладывать обычную добычу гидры ей в рот, сможет поддерживать ее существование. Форма тела у таких принудительно питаемых животных нормальная, и утраченные части регенерируют точно так же, как у животных с интактной нервной системой.

Из скромных предшественников, похожих на кишечнополостных, развились значительно более сложные высшие животные. При этом сложная организация последних была обусловлена более изощренным использованием тех же основных принципов кооперирования клеток, которые лежат в основе строения гидры. Слои эпителиальных клеток выстилают все внутренние и наружные поверхности тела, создавая защищенные от внешних условий компартменты и контролируемую внутреннюю среду, в которой дифференцированные клетки выполняют специализированные функции. Специализированные клетки взаимодействуют и сообщаются друг с другом с помощью сигналов, управляющих свойствами каждой клетки в зависимости от ее места в общей структуре. Однако, чтобы показать, как может быть создан такой большой многоклеточный организм со сложной и точной организацией, каким является человек, необходимо более подробно рассмотреть последовательность событий при его развитии.

1.3.6. Клеточная память позволяет развиваться сложным формам

Клетки почти всех многоклеточных организмов возникают в результате последовательных делений одной-единственной клетки-предшественника; следовательно, они составляют *клон*. По мере того как деление клеток и рост клона продолжают, некоторые клетки, как мы видели, дифференцируются и начинают отличаться от других по своей структуре, метаболизму и функциям. Изменения эти происходят в ответ на сигналы, поступающие от соседних клеток. Примечательно, что эукариотические клетки и их потомство обычно сохраняют свое специализированное состояние даже после того, как влияние, вызвавшее дифференцировку, исчезает, другими словами, у этих клеток есть *память*. А это значит, что их конечные свойства определяются не только тем окружением, в котором они в конце-концов оказались, а всей совокупностью влияний, которым они подвергались в ходе развития организма. Таким образом, по мере роста и развития определяются все более и более тонкие детали строения организма, сложность которого постепенно возрастает. Окончательное строение взрослого организма отражает длительную историю индивидуального развития.

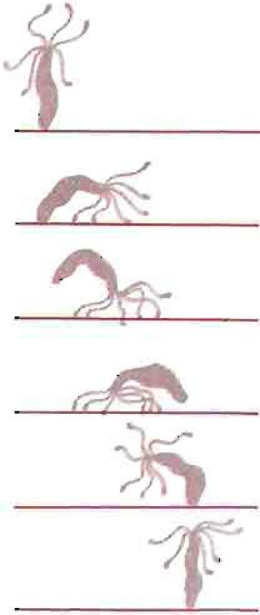


Рис. 1-31. Гидра может плавать, скользить на своей подошве или, как показано здесь, перемещаться, кувыркаясь.

1.3.7. Основные программы развития имеют тенденцию сохраняться в процессе эволюции

Строение животного является также результатом его эволюционной истории, которая, как и история индивидуального развития, представляет собой летопись продвижения от простого к сложному. Каково же взаимоотношение этих двух аспектов развития – эволюционного и индивидуального?

В процессе эволюции многие из приспособлений, использовавшихся при индивидуальном развитии простейших многоклеточных организмов, сохранились в качестве основных принципов строения их более сложных потомков. Мы уже упоминали об эпителиальной организации клеток. Заслуживает внимания и тот факт, что некоторые специализированные типы клеток, такие как нервные клетки, можно найти практически у любого животного – от гидры до человека. Более того, ранние стадии индивидуального развития животных, взрослые формы которых совершенно различны, часто бывают удивительно похожи. Так, например, лишь специалист способен отличить куриный эмбрион от эмбриона человека на ранней стадии развития.

Подобные наблюдения нетрудно объяснить. Рассмотрим процесс возникновения в ходе эволюции новой анатомической особенности, скажем удлиненного клюва. Случайная мутация изменяет аминокислотную последовательность белка и, следовательно, его биологическую активность. Измененный белок может случайно повлиять на клетки, ответственные за образование клюва таким образом, что в результате получится более длинный клюв. Но мутация должна быть совместима с развитием остальных частей организма – лишь в этом случае она будет подхвачена естественным отбором. Преимущество длинного клюва при отборе будет невелико, если в процессе его образования будет утерян язык или не смогут развиваться уши. Такие катастрофические последствия куда более вероятны в случае мутаций, затрагивающих ранние стадии индивидуального развития, чем в случае мутаций, влияющих на его поздние этапы. Ранние эмбриональные клетки подобны картам в основании картонного домика – от них зависит слишком многое, и даже незначительное изменение их свойств скорее всего приведет к печальным последствиям. Ранние стадии индивидуального развития оказались «замороженными» – так же точно, как в биохимической организации клеток «заморожены» генетический код и механизмы биосинтеза белка. В отличие от этого клетки, образующиеся на последних стадиях развития, имеют больше возможностей для изменений. Вероятно, именно по этой причине на ранних стадиях развития эмбрионы разных видов столь часто бывают похожи друг на друга и в процессе индивидуального развития, видимо, нередко повторяют пройденные ими этапы эволюции.

1.3.8. Эукариотические организмы имеют сложный аппарат воспроизведения

У многоклеточных организмов должны быть клетки, служащие предшественниками новых поколений. У высших растений и животных эти клетки весьма специализированы и называются *первичными половыми* или *зародышевыми клетками*. От них зависит размножение вида, и мощное давление отбора приводит структуру организма в целом в соответствие с требованием максимальной вероятности выживания зародышевых клеток. Прочие клетки могут погибнуть, но до тех пор, пока живы зародышевые клетки, будут появляться новые организмы, аналогичные родительскому. В этом смысле наиболее фундаментальное различие в многоклеточном организме существует между клетками зародышевого пути и всеми остальными, т.е. между зародышевыми и *соматическими* клетками.

Не все многоклеточные организмы воспроизводятся с помощью специальных дифференцированных зародышевых клеток. Многие простые животные (среди них губки и кишечнополостные) способны размножаться по-

чкованием. Аналогичным образом размножаются многие растения. Для **полового размножения**, однако, необходимы зародышевые клетки. Процесс полового размножения столь хорошо знаком нам, что мы считаем его само собой разумеющимся, хотя это далеко не самый простой способ размножения – он куда сложнее неполового воспроизведения и требует мобилизации значительных ресурсов. Две особи одного вида, но разного пола обычно производят совершенно различные зародышевые (половые) клетки: одна особь – *яйцеклетки*, другая – *сперматозоиды*. Яйцеклетка сливается со сперматозоидом с образованием *зиготы* – клетки, из которой развивается новый организм, гены которого представляют собой отчасти случайным образом перетасованный набор генов двух родителей. Практически все виды эукариот, как многоклеточные, так и одноклеточные, даже те, которые могут размножаться другими способами, способны к половому размножению. У эукариотических клеток развились сложные механизмы полового размножения, оказывающие большое влияние на всю нашу жизнь. Развитию полового размножения вместо более простых стратегий, основанных на обыкновенном делении клеток, должны были способствовать мощные силы естественного отбора. Хотя очень трудно с уверенностью указать, какие преимущества при отборе имеет половое размножение, ясно по крайней мере, что этот процесс создает новые возможности перетасовывания и комбинирования генов вида. Так, половое размножение могло сыграть ведущую роль в эволюции новых генов во все новых комбинациях и таким образом внести свой вклад в бесконечное разнообразие форм и функций современных растений и животных.

1.3.9. Клетки позвоночных имеют более 200 различных типов специализации

Число различных специализаций, которые можно найти у клеток высших животных, неизмеримо больше, чем у любого прокариотического организма. У позвоночных четко различают более 200 **клеточных типов**, причем многие из этих клеточных типов, видимо, объединяют под общим названием большое количество более тонко различающихся вариантов. На схеме II показана лишь небольшая выборка разных клеточных типов. Подобное разнообразие специализаций позволяет отчетливо увидеть, даже в пределах одного организма, фантастическую универсальность эукариотических клеток. Каждая особенность и каждая органелла обобщенной эукариотической клетки, показанной на схеме I, развиты до необычайно высокой степени или особенно четко выражены у того или другого типа клеток. Многие современные представления об общих свойствах эукариотических клеток основаны на изучении как раз таких специализированных типов клеток, у которых исключительно сильно развито определенное полезное свойство, в той или иной степени присущее всем клеткам. В качестве произвольного примера рассмотрим *нервно-мышечное соединение*, в образовании которого участвуют клетки трех типов: мышечные, нервные и шванновские. Клетки каждого типа играют совершенно различную роль (рис. 1-32).

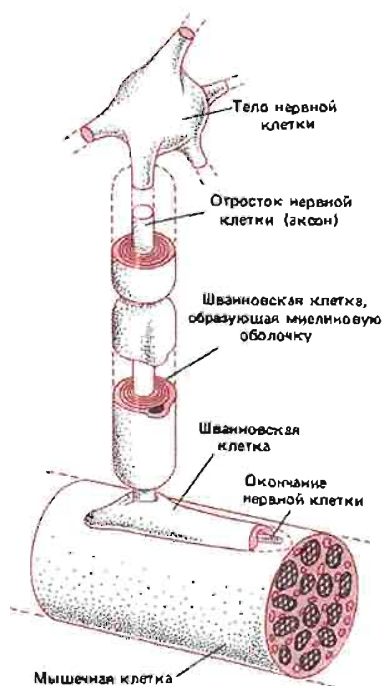


Рис. 1-32. Схематическое изображение нервно-мышечного соединения: отросток нервной клетки, одетый миелиновой оболочкой, контактирует с мышечной клеткой.

1. Специализация мышечной клетки – сокращение. Ее цитоплазма заполнена упорядоченными рядами белковых нитей, в том числе актиновых. В промежутках между ними находится множество митохондрий, поставляющих АТФ – топливо для сократительного аппарата.
2. Нервная клетка стимулирует сокращение мышцы, подводя к ней возбуждающий сигнал от головного или спинного мозга. Поэтому нервная клетка необычайно вытянута: тело клетки, содержащее ядро, может находиться на расстоянии метра или более от места соединения с мышцей. В процессе эволюции у нервных клеток появился хорошо развитый цитоскелет, необходимый для поддержания столь необычной формы этих клеток и эффективного транспорта веществ из одного конца клетки в другой. Однако ключевая специализация нервной клетки связана с ее плазматической мем-

браной, содержащей белки, которые образуют ионные насосы и каналы и вызывают передвижение ионов, эквивалентное электрическому току. Хотя такие насосы и каналы имеются в плазматической мембране всех клеток, только нервная клетка использует их таким образом, чтобы электрический импульс мог распространиться от одного конца клетки до другого за какую-то долю секунды и передать сигнал к действию.

3. Наконец, шванновские клетки специализированы для массового образования плазматической мембраны, которую они слой за слоем, как ленту, навивают на вырост нервной клетки так, что получается служащая изолятором миелиновая оболочка.

1.3.10. Клетки иммунной системы специализируются на химическом узнавании

Из всех имеющихся у высших животных клеточных систем две по сложности и тонкости организации достигли высшей степени развития. Это *иммунная система* позвоночных и *нервная система*. Каждая из них далеко превосходит любой искусственный прибор: иммунная система – по способности к химическому распознаванию, а нервная система – по способности к восприятию и управлению. Каждая система состоит из многих различных типов клеток и основана на взаимодействии между ними.

Защищенная от внешних воздействий и тщательно поддерживаемая внутренняя среда многоклеточного организма благоприятна не только для собственных клеток животного – она притягательна также и для посторонних организмов. Следовательно, животным необходимо защитить себя от вторгающихся извне организмов, в особенности от вирусов и бактерий. Первоочередная задача иммунной системы состоит в уничтожении любых проникнувших в тело животного чужеродных микроорганизмов.

Многие эукариотические клетки способны поглощать извне частицы различных веществ и переваривать их. В тех случаях, когда такие частицы сравнительно велики, этот процесс называют *фагоцитозом*. Среди дифференцированных клеток высших животных есть специалисты по фагоцитированию, например *макрофаги*, способные проглатывать и уничтожать бактерии и другие клетки. Но тут возникает одно осложнение: хорошо, когда фагоциты атакуют вторгнувшиеся извне клетки, но для организма было бы губительным, если бы они стали нападать также на собственных родственников и коллег. Таким образом, иммунная система должна отличать собственные клетки от чужеродных, т.е. уметь распознавать «свое» и «чужое».

Для этой цели у позвоночных развился специальный класс узнающих клеток – *лимфоциты*. Сами по себе лимфоциты не являются фагоцитами, но кооперируются с последними, посылая им сигналы, показывающие, следует ли атаковать данную клетку или оставить ее в живых. В частности, некоторые лимфоциты (В-лимфоциты) вырабатывают специальные белковые молекулы – *антитела*, избирательно связывающиеся с определенными атомными группами на поверхности чужеродных организмов или производимых ими токсичных молекул. Чтобы пометить новый, вторгнувшийся извне организм как чужеродный, должен быть произведен новый класс антител, но, поскольку количество возможных чужеродных организмов очень велико и практически непредсказуемо, В-лимфоциты должны быть способны к синтезу бесконечно-го разнообразия антител. В то же время иммунная система не должна производить антитела, связывающиеся с собственными молекулами и клетками организма.

Огромное разнообразие антител создается с помощью случайных изменений ДНК, кодирующей специфические участки связывания молекул антител. С помощью таких своеобразных специализированных мутаций создаются миллионы генетически различных лимфоцитов, каждый из которых способен размножиться и образовать клон, все клетки которого производят одно и то

же определенное антитело. Те клоны из этого множества, которые вырабатывают антитела, реагирующие с собственными молекулами организма, уничтожаются или подавляются (с помощью все еще не ясных механизмов), а те, в которых образуются антитела против чужеродных молекул, избирательно выживают и размножаются. Таким образом, развитие иммунной системы индивидуального животного, подобно эволюционному процессу, использует стратегию случайных изменений с последующим отбором.

1.3.11. Нервные клетки позволяют организму быстро адаптироваться в изменчивом окружении

Иммунная система позвоночных свидетельствует о том, что они более высокоорганизованы, чем низшие животные, у которых, очевидно, отсутствуют лимфоциты, способные защитить их от вторгающихся микроорганизмов. Нервная система, напротив, имеется практически у всех многоклеточных животных и обеспечивает еще более фундаментальную потребность – потребность в быстром адаптивном ответе на внешние события.

На протяжении многих поколений эволюция совершенствует структуру организма, доводя ее до оптимальной, и приводит ее в соответствие со средой обитания. Однако в подавляющем большинстве экологических ниш наблюдаются изменения, которые происходят слишком быстро для того, чтобы могла выработаться эволюционная адаптация. В этих условиях наиболее приспособленными окажутся организмы, способные к адаптации иного рода, не требующей генетических мутаций, но тем не менее модифицирующей поведение в соответствии с изменившимися обстоятельствами. Если последовательность изменений окружающей среды полностью предсказуема, например смены дня и ночи или зимы и лета, автономные изменения организма по соответствующему расписанию могут быть генетически запрограммированы. Так, фотосинтезирующая активность принадлежащего к динофлагеллятам одноклеточного организма *Gonyaulax* обнаруживает 24-часовую периодичность, поддерживающуюся, даже если организм в течение недель содержать в условиях постоянного освещения. Такие биологические часы есть и у многих других организмов, но механизм их действия все еще представляет загадку.

Однако большинство изменений, происходящих в окружающей среде, далеко не столь предсказуемо. Например, бактерии, обитающие в кишечнике, должны подвергаться нерегулярным колебаниям состава и количества доступного для них питания, и любая бактерия, способная подстраивать свой метаболизм к этим изменениям, должна иметь преимущество над бактерией, не способной к такой реакции. Поэтому бактерии приобрели способность чувствовать концентрации питательных веществ в окружающей среде и соответственно изменять скорость синтеза своих метаболических ферментов. Для сопряжения внешнего стимула с адаптивным ответом служат специальные управляющие молекулы (такие, как *циклический АМР*).

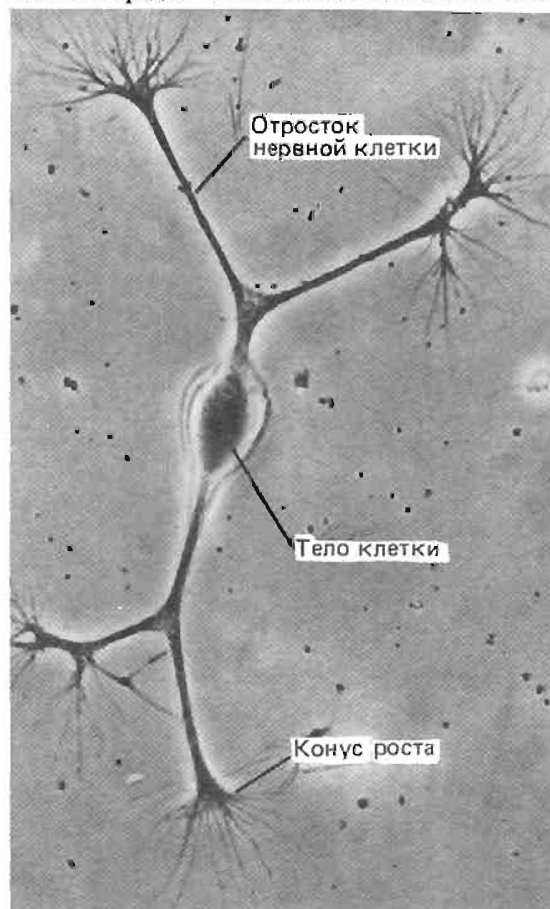
У многоклеточного организма сигнал, связывающий восприятие с действием, должен, как правило, передаваться от одних клеток к другим. Так, подстройка метаболизма часто осуществляется гормонами, которые, будучи секретированы одной группой клеток, путешествуют в тканях и вызывают ответ в других группах клеток. Но гормону требуется много времени, чтобы пройти большое расстояние; кроме того, он при этом диффундирует во все стороны. Чтобы химический сигнал передавался быстро, он должен испускаться вблизи своей мишени; тем же путем достигается точная локализация действия сигнала. Но если химический сигнал должен испускаться вблизи от мишени, то как же можно использовать такой способ связи для сопряжения восприятия с реакцией на него в удаленной части организма? Проблему решают нервные клетки. С одного конца они сами чувствительны к химическим или физическим стимулам, а с другого конца они могут в свою очередь испускать химический сигнал – *нейромедиатор*, действующий на другие клетки.

Стимуляция одного конца клетки вызывает электрическое возбуждение, которое быстро распространяется до другого конца, где вызывает высвобождение нейромедиатора. Такое сигнальное устройство позволяет многоклеточным животным быстро реагировать на изменчивый окружающий мир, а также точно координировать активность далеко отстоящих друг от друга частей тела.

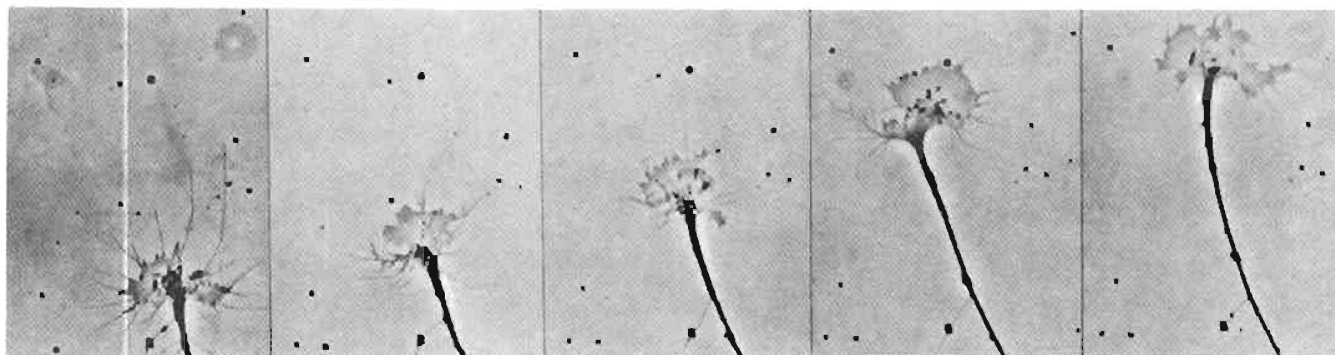
1.3.12. Нервная система собирается из нервных клеток в ходе индивидуального развития

Одиночный нейрон человека не очень отличается от одиночного нейрона червя. Преимущество нервной системы человека основано на огромном количестве входящих в нее клеток и, самое главное, на способе их соединения друг с другом, который и определяет возможности нейронов в передаче, комбинировании и интерпретации сенсорных сигналов и в координации сложных последовательностей действий. Аналогично возможности компьютера зависят не столько от свойств индивидуальных переключателей и элементов памяти, сколько от их количества и способа соединения в единую систему. В случае компьютера внешняя сила—изготовитель—собирает все части в соответствующем порядке. Но у нервной системы, как и у остальных частей тела, нет внешнего изготовителя: клетки должны сами собраться в функциональные системы, следуя инструкциям, заложенным в их ДНК. Окончательная же подгонка происходит в соответствии с конкретными условиями внешней среды. Чтобы понять клеточные основы эволюции нервной системы,

Рис. 1-33. Микрофотография нервной клетки куриного эмбриона, помещенной в культуральную чашку с питательным раствором. Из клетки начали вытягиваться удлиненные выросты. (С любезного разрешения Zoltan Gabor.)



50 мкм



20 мкм

Рис. 1-34. Конеч отростка нервной клетки, вытягивающегося вдоль поверхности культуральной чашки (такой же, как на предыдущем рисунке). Снятые с интервалом приблизительно 5 мин фотографии демонстрируют удлинение отростка нервной клетки и быстрое изменение формы конуса роста. Большая часть клетки находится снизу и на фотографиях не видна; при этом увеличении тело клетки должно находиться на расстоянии 20–30 см от конца отростка. (С любезного разрешения Stephen Clark.)

необходимо рассмотреть механизмы образования фантастически сложной формы нейрона и строго упорядоченного способа соединения нервных клеток.

Вначале нервные клетки, как и все другие, сравнительно малы и компактны. Затем на теле клетки появляются длинные выросты, направленные к мишеням, с которыми они должны соединиться (рис. 1-33). Каждый такой вырост, называемый *аксоном* или *дендритом* в зависимости от того, несет ли он сигнал от тела клетки или к нему, возникает в результате активности *конуса роста* (рис. 1-34). Эта органелла, как и многие другие, возникла в результате специализации свойственного всем эукариотическим клеткам локомоторного аппарата. Но вместо того, чтобы перемещать весь нейрон, конус роста вытягивает аксон или дендрит, оставляя тело клетки позади. Ползущий через ткани конус роста ведет себя как собака на поводке, приносившаяся к следу, который должен привести ее к намеченной цели. В некоторых случаях конус роста направляется, по-видимому, просто механически с помощью существующих каналов или вдоль намеченных во внеклеточном матриксе путей. Создается, однако, впечатление, что эволюция сложной нервной системы в значительной степени зависит от развития химических маркеров, с помощью которых определенная нервная клетка может узнать нужную мишень среди большого количества других.

1.3.13. Связи между нервными клетками определяют тип поведения

С помощью механизмов, подобных только что описанным, строятся невероятно сложные нервные системы. Посмотрите, например, на зрительную систему мухи (рис. 1-35–1-37). Строение всей этой структуры задано генетически, и развитие ее будет происходить нормально даже в отсутствие света. Более того, характер соединения нейронов определяет поведение. Без всякого обучения и опыта самец мухи спаривается с самкой, паук плетет свою паутину, птицы летят на юг. Все эти действия предначертаны в ДНК этих видов, которая контролирует поведение отдельных клеток при построении нервной системы у эмбриона и работу нервной системы у взрослого организма.

Но поведение не полностью генетически детерминировано. Наряду с информацией, заложенной в ДНК, важное значение имеет и собственный опыт животного. Лишение развивающегося млекопитающего сенсорных стимулов может изменить микроструктуру мозга. Взрослые животные почти всех видов – от кишечнорастных до человека – в той или иной степени способны к обучению. По определению обучение – это результат опыта и, следовательно, электрической активности нервных клеток, которая должна приводить к длительным изменениям нейронных связей. Сверх сказанного мы практически

Рис. 1-35. Вид в сканирующем электронном микроскопе головы плодовой мушки (*Drosophila*). С двух сторон головы расположены два больших сложных глаза, состоящих из множества элементов, называемых *омматидиями*. Каждый омматидий имеет свою линзочку, фокусирующую свет на группу находящихся в его основании клеток-фоторецепторов (см. рис. 1-36). (С любезного разрешения Anthony Mahowald.)

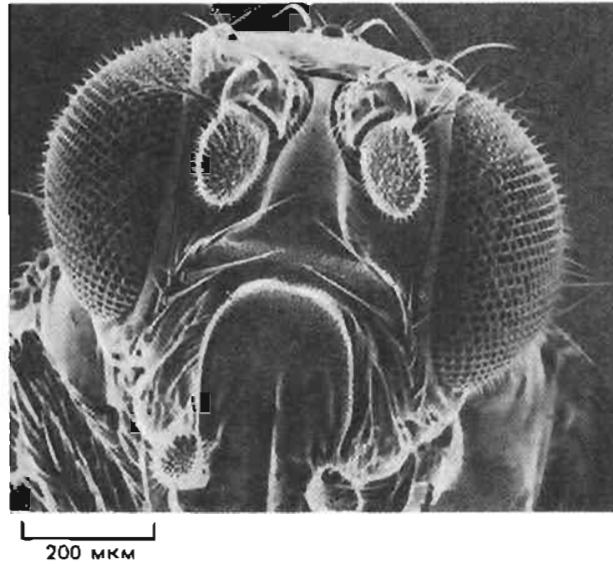
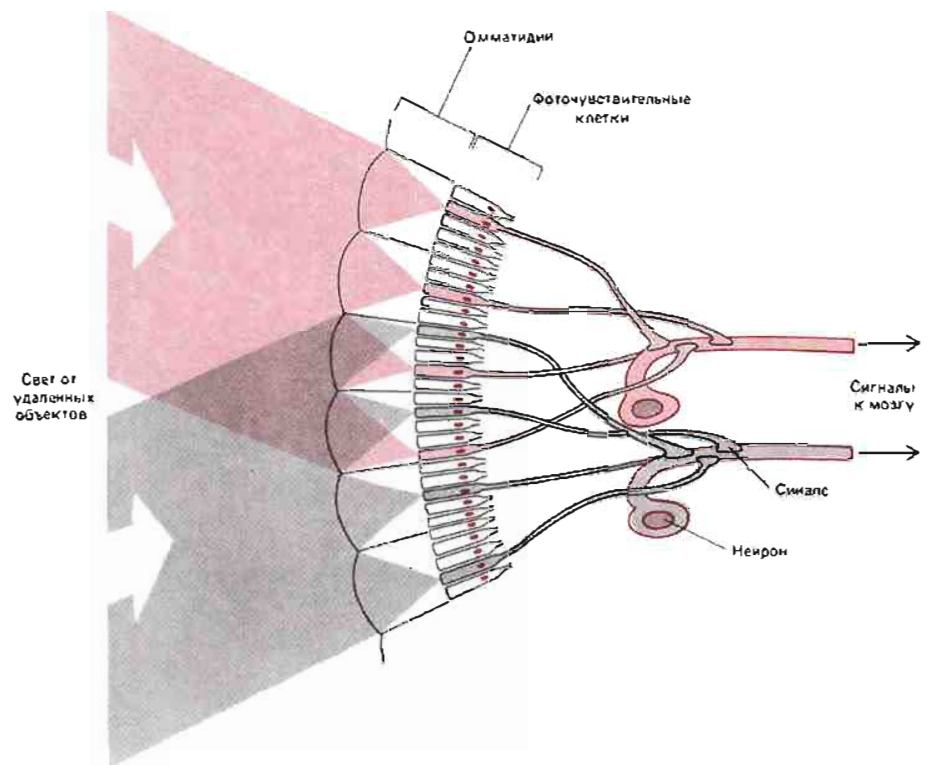


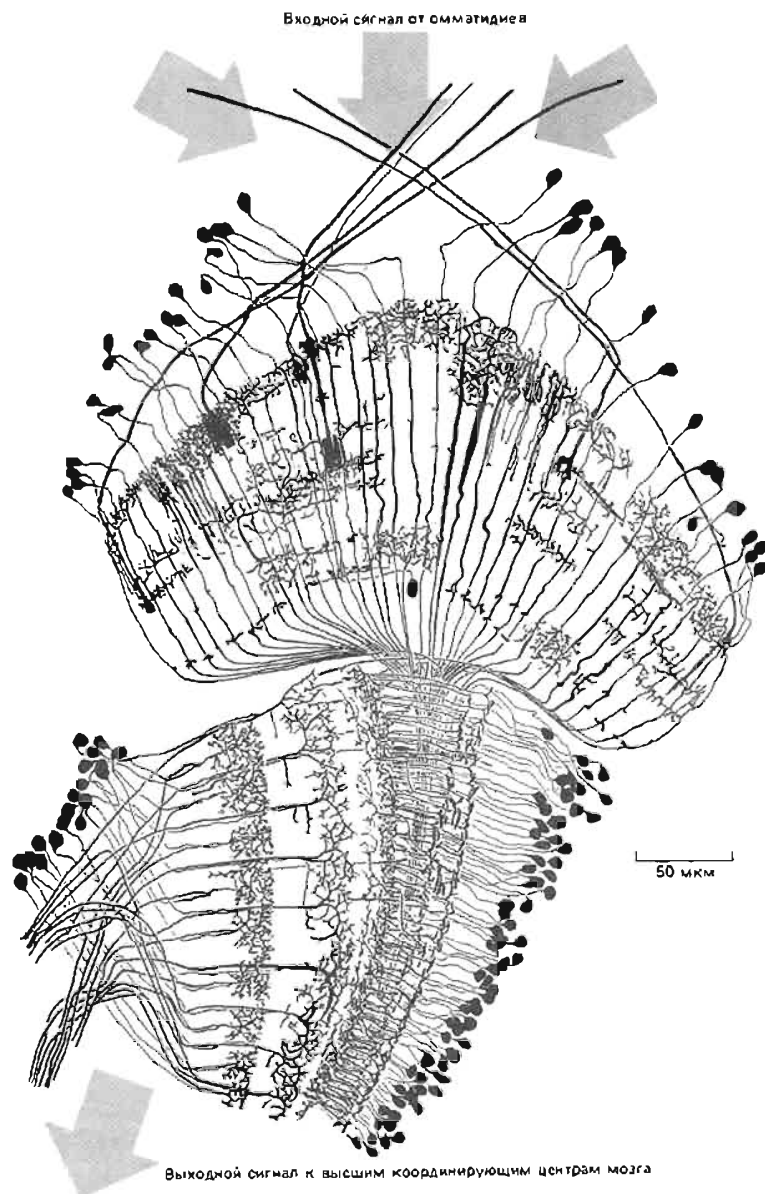
Рис. 1-36 Схематическое изображение нейронных связей в наружном слое глаза мухи. Свет проникает в каждый омматидий сложного глаза (см. рис. 1-35) и фокусируется на одну из восьми находящихся в основании омматидия фоточувствительных клеток-рецепторов (здесь показаны лишь пять из них). Из-за кривизны сложного глаза свет от удаленного точечного источника фокусируется в разных омматидиях на разные фоточувствительные рецепторы. Однако короткие аксоны фоторецепторов, «смотрящих» на одну и ту же точку, переплетены таким образом, что оказываются подсоединенными к одному и тому же идущему в мозг насекомого пучку аксонов. В каждом глазу мухи присутствует более тысячи таких пучков, причем каждый из них в ходе индивидуального развития точно присоединяется к правильному набору фоторецепторов.



ничего не знаем о механизме этого явления. Возможно, это и есть центральная нерешенная проблема нейробиологии.

Нейронные связи нашего мозга, позволяющие нам читать, писать и говорить на родном языке, являются продуктом нашего образования и представляют собой негенетический тип наследственности. Обучение и обмен информацией позволяют многим поколениям человечества получать адаптивные преимущества, достижимые для менее высокоорганизованных видов лишь путем генетической эволюции. Тем не менее ясно, что даже эти очень сложные способности, лежащие в основе нашей культуры и общества, имеют в своей

Рис. 1-37. Участок мозга мухи с сетью нервных клеток, обрабатывающих входной сигнал от омматидиев (см. рис. 1-36). (Strausfeld N. Atlas of an Insect Brain, New York, Springer, 1976.)



основе тонкие особенности поведения клеток – правила, по которым нейроны на долгое время модифицируют свои связи в результате электрической активности.

Конечно, изучая лишь единичные клетки, мы не поймем, как устроены общество или многоклеточный организм, аналогично тому, как мы не поймем устройства клетки, изучая лишь отдельные биологические молекулы. Но все же, не понимая устройства клетки, мы не можем рассчитывать полностью понять строение организма. И мы не можем полностью разобраться в работе клетки, не зная составляющих ее молекул. Таким образом, обсуждение живой клетки, к которому мы переходим в следующей главе, должно начинаться с описания молекул.

Заключение

Эволюция больших многоклеточных организмов связана со способностью эукариотических клеток выражать свою наследственную информацию многими

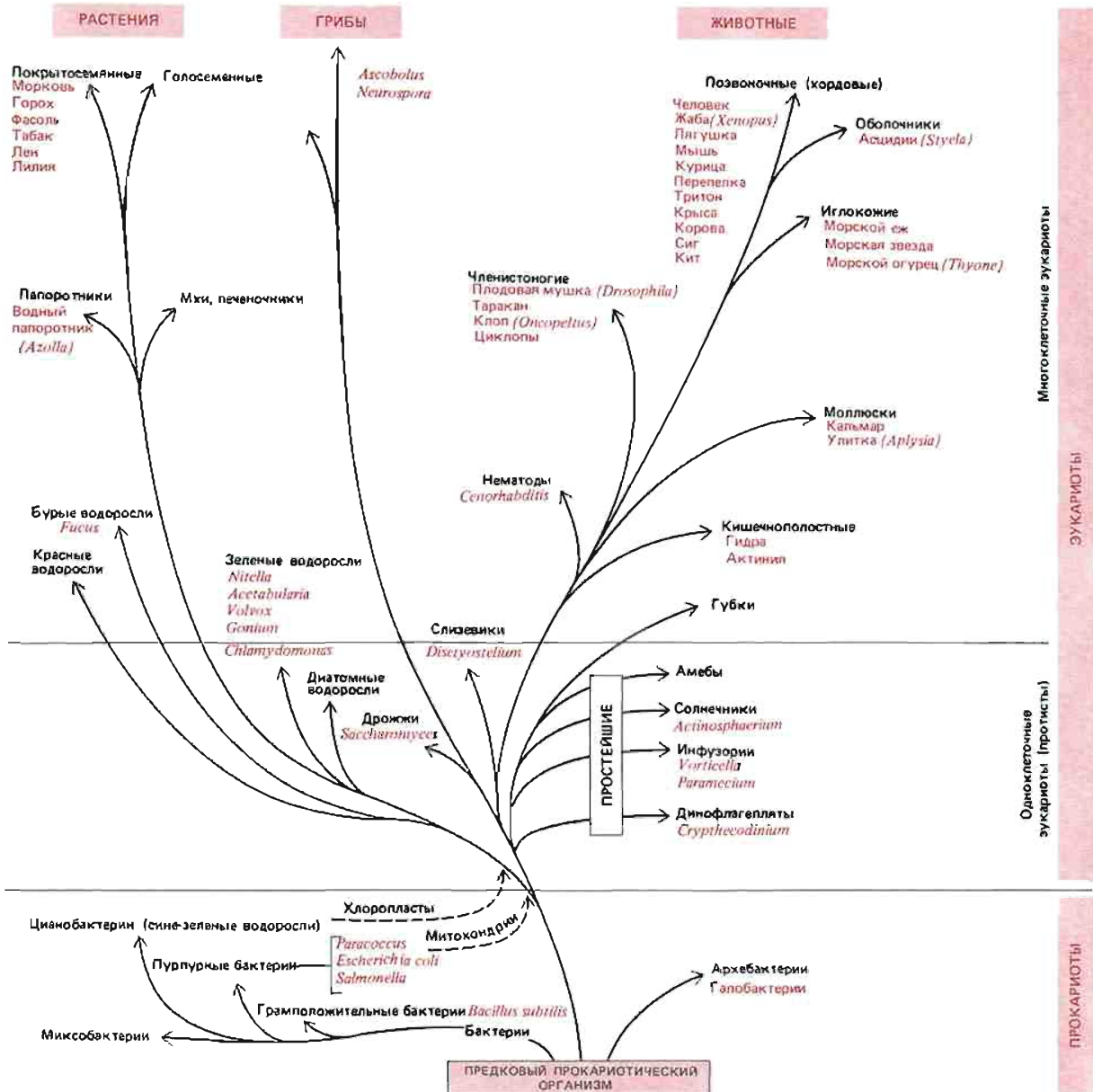


Рис. 1-38. Эволюционное родство между некоторыми упомянутыми в этой книге организмами. Ветви древа показывают пути общего происхождения, но (в отличие от ветвей, показанных на рис. 1-16) их длина не отражает реального временного масштаба. Отметим попутно, что вертикальная ось диаграммы демонстрирует не время, а основные категории организмов.

различными способами и действовать сообща как единый организм. Одним из наиболее ранних достижений на пути к многоклеточности, видимо, было появление эпителия, в котором клетки соединены в слой, отделяющий внутреннюю среду организма от внешнего окружения. Первыми примитивными типами дифференцированных клеток должны были быть наряду с эпителиальными клетками нервные клетки, мышечные клетки и клетки соединительной ткани. Все эти типы клеток можно найти даже у очень простых современных животных.

Те же основные типы стратегии развития были использованы в эволюции высших животных (рис. 1-38) для создания все возрастающего числа специализированных клеточных типов и все более утонченных методов координации их активности. Две системы клеток высших животных представляют каждую в своем роде вершину сложности многоклеточной организации. Одна — это иммунная система позвоночных, клетки которой способны производить

миллионы различных антител. Другая — это нервная система. У низших животных большая часть нейронных связей жестко генетически детерминирована, и программа поведения эволюционирует лишь благодаря мутациям генетического материала. По мере развития высших животных вплоть до человека работа и структура нервной системы становились все более подверженными модификациям (обучению) благодаря способности нервных клеток изменять свои связи в ответ на вызванную внешними стимулами электрическую активность.

Литература

Общая

- Attenborough D.*, Life on Earth, Boston, Little Brown, 1979. (Красиво иллюстрированное эволюционное описание живой природы.)
- Curtis H.*, Biology, 3rd ed., New York, Worth, 1979.
- de Witt W.*, Biology of the Cell: An Evolutionary Approach, Philadelphia, Saunders, 1977.
- Evolution. Scientific American, **239** (3), 1978. (Весь выпуск посвящен проблемам эволюции.)
- Fawcett D. W.*, The Cell, 2nd ed., Philadelphia, Saunders, 1981. (Иллюстрированная книга по структуре эукариотических клеток.)
- Keeton W. T.*, Biological Science, 3rd ed., New York, Norton, 1980.
- Luria S. E., Gould S. J., Singer S.*, A View of Life, Menlo Park, Ca., Benjamin-Cummings, 1981.
- Maynard Smith J.*, The Theory of Evolution, 3rd ed., New York, Penguin, 1975.
- Raven P. H., Evert R. F., Curtis H.*, Biology of Plants, 3rd ed., New York, Worth, 1981.
- Thomas L.* The Lives of a Cell: Notes of a Biology Watcher, New York, Viking Press, 1974. (Сборник коротких очерков.)
- Wilson E. B.*, The Cell in Development and Heredity, 3rd ed., New York, Macmillan, 1928.
- Wolfe S. L.*, Biology of the Cell, 2nd ed., Belmont, Ca., Wadsworth, 1981. (Хорошая заключительная глава по эволюции клетки.)

Цитированная

- Eigen M., Gardiner W., Schuster P., Winkler-Oswatitsch R.*, The origin of genetic information, Scientific American, **244** (4), 88–118 (1981).
Folsome C. E., ed., Life: Origin and Evolution, San Francisco, Freeman, 1979. (Сборник статей из Scientific American.)
Wong J. T.-F., Coevolution of genetic code and amino acid biosynthesis, Trends Biochem. Sci., **6**, 33–36 (1981).
- Dickerson R. E.*, Cytochrome c and the evolution of energy metabolism. Scientific American, **242** (3), 136–153 (1980).
Margulis L., Origin of Eukaryotic Cells, New Haven, Yale University Press, 1970.
Origins and Evolution of Eukaryotic Intracellular Organelles, Ann. N.Y. Acad. Sci., Vol. 361, 1981.
Woese C. R., Archaeobacteria, Scientific American, **244** (6), 98–122 (1981).
- Buchsbaum R.*, Animals Without Backbones, 2nd ed., Chicago, University of Chicago Press, 1976.
Valentine J. W., The evolution of multicellular plants and animals, Scientific American, **239** (3), 140–158 (1978).

«Хочу сообщить, что я научился получать мочевины, не используя для этого изолированную почку или животное, будь то человек или собака». Эти слова, написанные 150 лет назад молодым немецким химиком Вёлером (Wöhler), ознаменовали собой конец веры в особую жизненную силу (vital force), присущую живым организмам и обуславливающую характер их отличительных особенностей и продуктов жизнедеятельности. Однако то, что было откровением во времена Вёлера, сегодня звучит вполне обыденно – живые существа состоят из химических соединений. В современном представлении о жизни нет места ни для витализма, ни для чего бы то ни было, выходящего за рамки законов химии и физики. Из этого отнюдь не следует, что в биологии не осталось тайн: как покажут последующие главы, в ней еще много «белых пятен». Тем не менее следует сразу же подчеркнуть, что объем накопленных знаний поистине колоссален.

Сейчас мы располагаем подробными сведениями о важнейших молекулах клетки, причем не о каком-то небольшом их числе, а почти обо всех. Во многих случаях нам точно известна их химическая структура, так же как и пути их образования и распада. В общих чертах мы представляем себе, как химическая энергия поддерживает процессы биосинтеза в клетке, как на основе законов термодинамики создается молекулярная упорядоченность и как регулируются и координируются мириады непрерывно протекающих внутри клетки химических превращений.

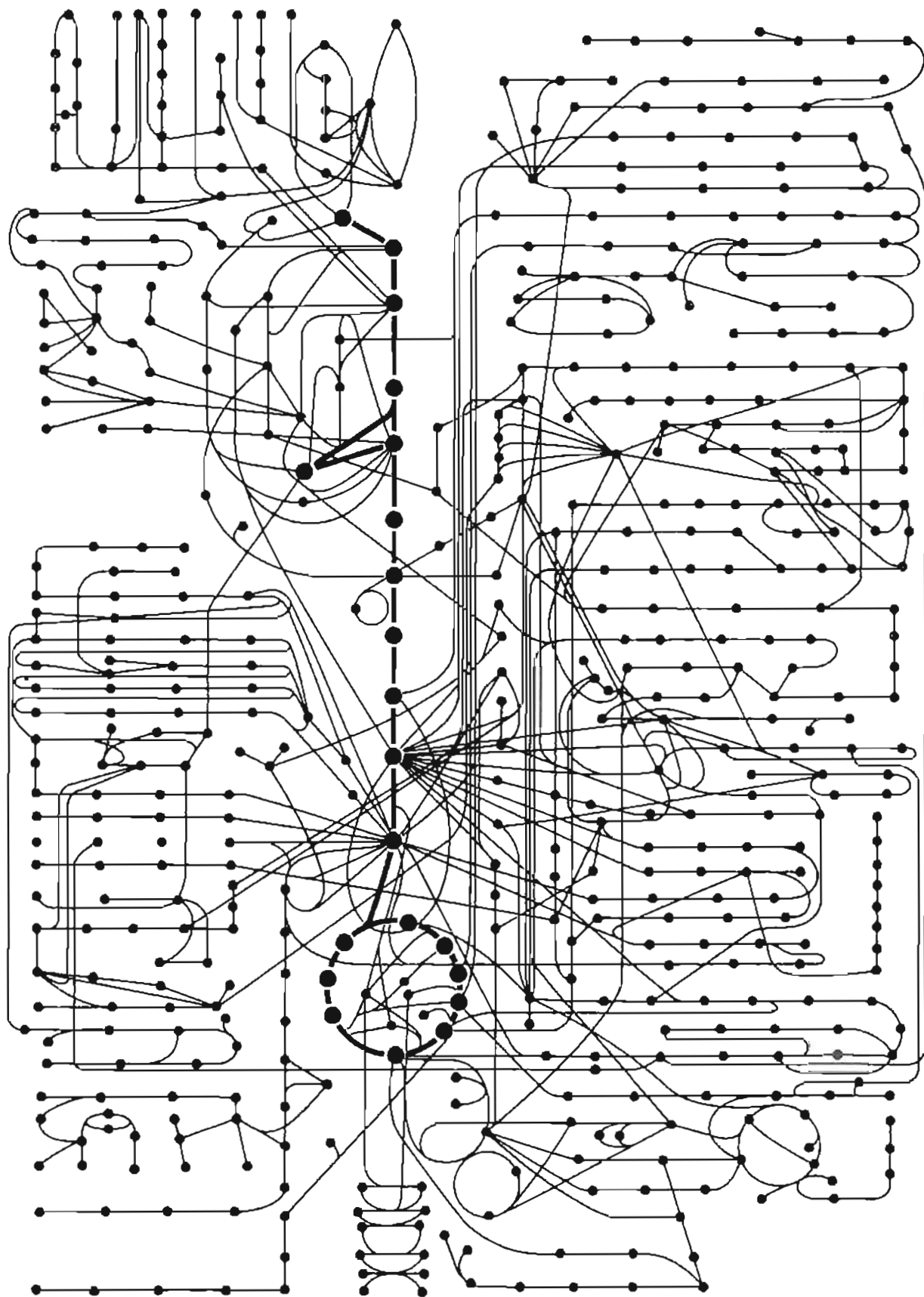
В этой и следующей главах мы познакомимся вкратце с химическими свойствами живой клетки. Здесь будут рассматриваться процессы, протекающие с участием малых молекул: механизмы, с помощью которых клетка синтезирует свои главные химические компоненты и получает необходимую энергию. В гл. 3 речь пойдет о гигантских молекулах (полимерах), чьи свойства определяют специфичность биологических процессов и передачу биологической информации.

2.1. Химические компоненты клетки

2.1.1. Основа клеточной химии – соединения углерода [1]

Живая клетка состоит из ограниченного набора элементов, причем на долю шести из них (C, H, N, O, P, S) приходится более 99% ее общей массы. Такой состав, заметно отличающийся от состава земной коры, свидетельствует о химизме особого типа (рис. 2-1). В чем же своеобразие химии живого и как оно возникло в процессе эволюции?

Соединение, которое клетка содержит в наибольшем количестве, отнюдь не является чем-то особенным, поскольку им покрыта две трети земной поверхности. Около 70% массы клетки составляет вода, и большинство внутриклеточных реакций протекает в водной среде. Жизнь на нашей планете возникла в океане, и условия этой первобытной среды наложили неизгладимый отпечаток на химию живых существ. «Конструкция» всех живых организмов связана с уникальными свойствами воды, такими, как полярный характер ее



Лабиринт метаболических путей, иллюстрирующий взаимопревращения малых молекул в клетке.

Рис. 2-1. Относительное количество химических элементов, обнаруженных в земной коре (внеживой мир), по сравнению с количеством тех же элементов в мягких тканях живых организмов. Относительное количество выражено в процентах к общему количеству имеющихся атомов.

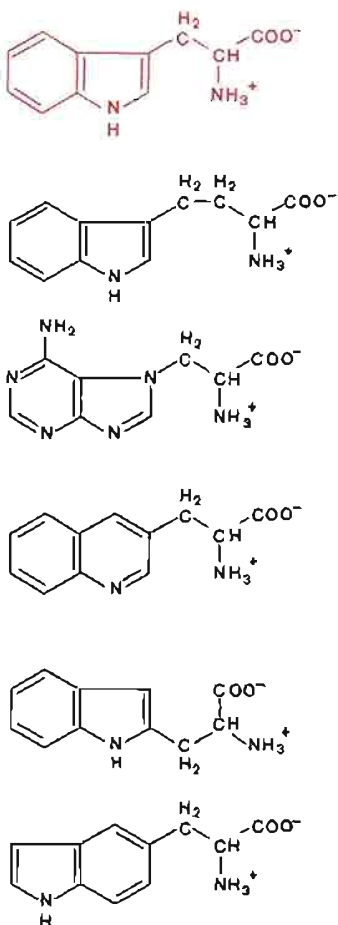
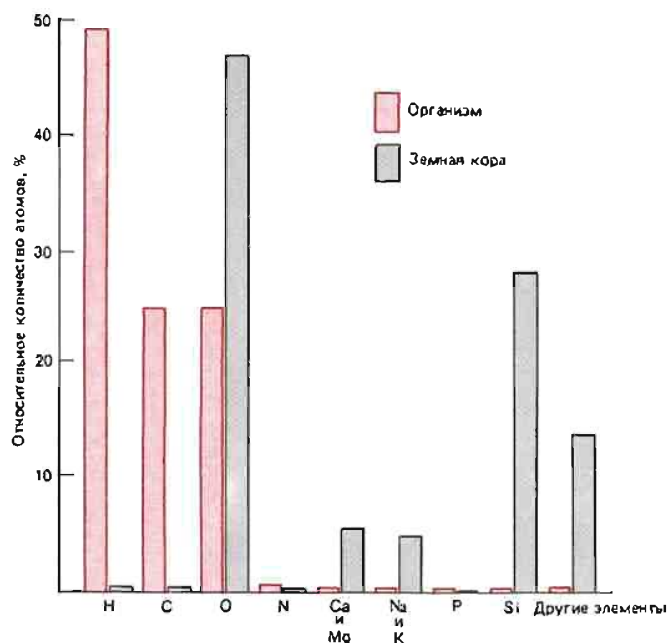


Рис. 2-2. Живые организмы синтезируют лишь небольшую часть органических молекул из всех тех, которые они в принципе могли бы образовать. Из шести изображенных на рисунке аминокислот в клетках синтезируется только самая верхняя – триптофан.

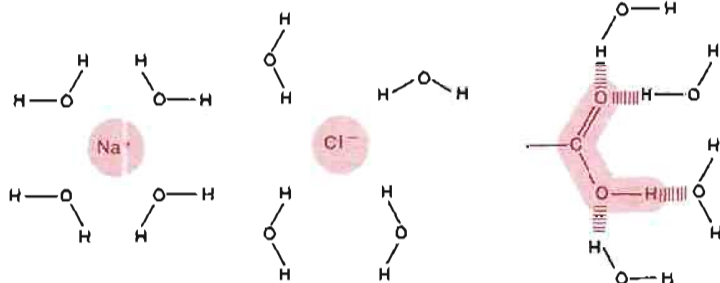
молекул и способность к образованию водородных связей, высокие температуры плавления и кипения, большое поверхностное натяжение (схема III).

Если не считать воды, можно сказать, что почти все молекулы клетки, за небольшим исключением, относятся к соединениям углерода, которые рассматриваются в курсе **органической химии**. Среди всех элементов Земли углерод занимает особое место по способности к образованию больших молекул; до некоторой степени аналогичной способностью обладает кремний, однако он сильно уступает углероду в этом отношении. Благодаря малому размеру и наличию на 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 видимых ограничений. Другие атомы, широко представленные в клетке, имеют, как и углерод, небольшие размеры и способны образовывать очень прочные ковалентные связи (схема IV).

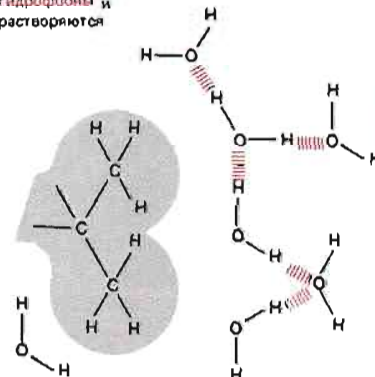
В принципе простые правила образования ковалентной связи между углеродом и другими элементами допускают существование астрономически большого числа соединений. Количество различных углеродных соединений в клетке действительно очень велико, но это лишь крошечная часть теоретически возможного. В некоторых случаях мы можем довольно убедительно обосновать, почему то или иное соединение выполняет именно данную биологическую функцию; однако чаще возникает ощущение, что выбор пал на один из многих приемлемых вариантов и свою роль здесь сыграл случай (рис. 2-2). Определенные типы реакций и химические мотивы, однажды установившись, сохранили (с некоторыми вариациями) свой характер в ходе эволюции. Появление новых классов соединений было, очевидно, необходимым или целесообразным лишь в редких случаях.

ГИДРОФИЛЬНЫЕ И ГИДРОФОБНЫЕ МОЛЕКУЛЫ

Поскольку молекулы воды полярны, они будут группироваться вокруг ионов или других полярных молекул



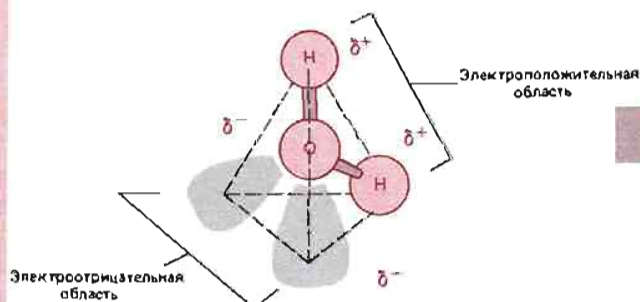
Неполярные молекулы разрушают структуру воды, образованную Н-связями. Эти молекулы, следовательно, гидрофобны и совершенно не растворяются в воде



Поэтому соединения, участвующие в образовании структур, стабилизированных водородными связями воды, гидрофильны и достаточно хорошо растворяются в воде

ВОДА

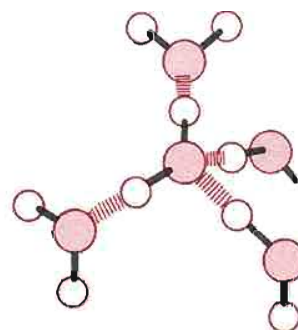
Несмотря на то, что в целом молекула воды электронейтральна (имеет равное число электронов и протонов), электроны распределены несимметрично, что придает молекуле воды полярный характер



Ядро атома кислорода в некоторой степени отталкивает электроны от ядер атомов водорода, оставляя на них небольшой суммарный положительный заряд. Области с небольшим отрицательным зарядом располагаются вблизи атома кислорода в двух других углах воображаемого тетраэдра

СТРУКТУРА ВОДЫ

Молекулы воды объединяются водородными связями в пространственную решетку. Даже при 37°C 15% молекул воды образуют короткоживущие агрегаты, в которых каждая из этих молекул соединена с четырьмя другими; такие группы называются "мерцающими кластерами"

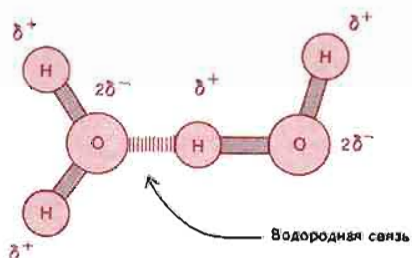


Когезивная природа воды обуславливает многие из ее необычных свойств, например высокое поверхностное натяжение, удельную теплоемкость и теплоту испарения

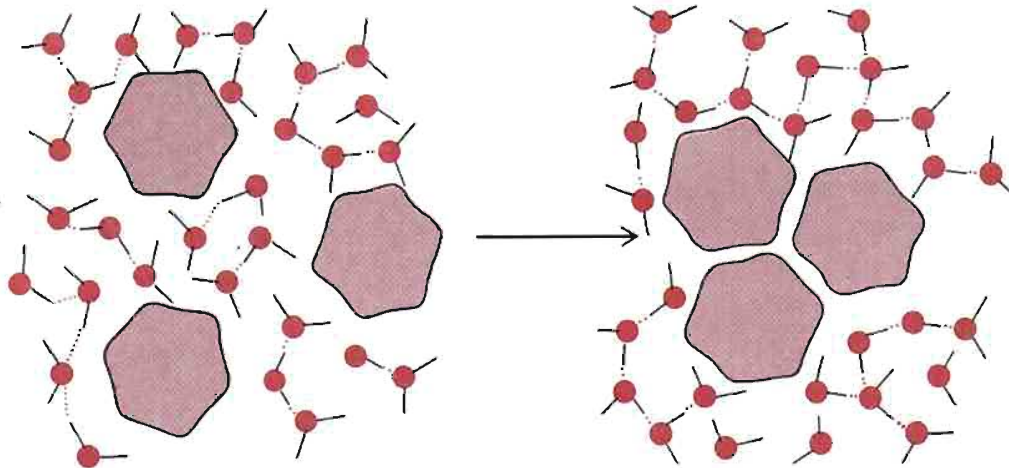
ВОДОРОДНЫЕ СВЯЗИ

Благодаря поляризации две соседние молекулы H_2O могут образовывать так называемую водородную связь. Водородные связи почти в 20 раз слабее ковалентных

Водородные связи имеют наибольшую прочность в том случае, когда 3 атома лежат на одной прямой



ГИДРОФОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОГУТ УДЕРЖИВАТЬ МОЛЕКУЛЫ ВМЕСТЕ

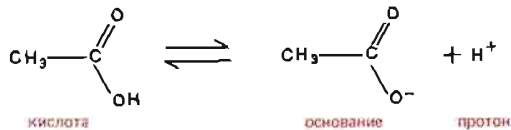


Два (или более) гидрофобные группы, окруженные водой, стремятся сблизиться, поскольку вследствие этого в меньшей степени нарушается структура воды, стабилизируемая водородными связями.

КИСЛОТЫ И ОСНОВАНИЯ

Кислота — это соединение, которое в растворе отдает ион H^+ (протон),

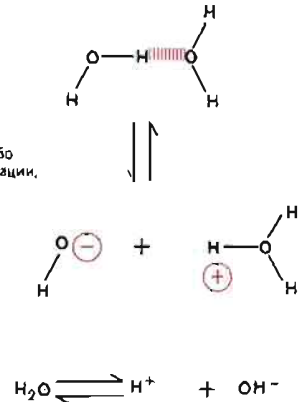
например



Основание — это соединение, которое в растворе присоединяет ион H^+ (протон), например,



Вода сама по себе обладает слабо выраженной тенденцией к ионизации, являясь одновременно и кислотой, и основанием



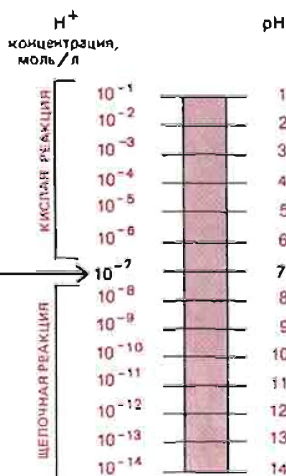
pH

Кислотность раствора определяется концентрацией имеющихся в нем ионов H^+ . Для удобства используется шкала pH, где

$$pH = -\lg [H^+]$$

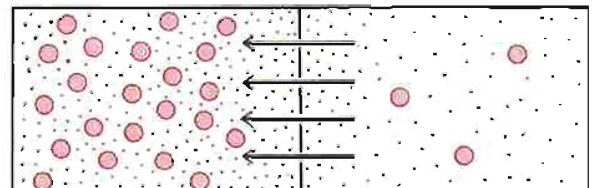
Для чистой воды

$$[H^+] = 10^{-7} \text{ моль / л}$$



ОСМОС

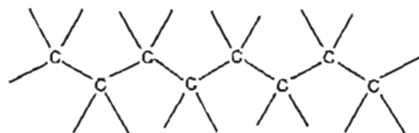
Если два водных раствора разделены мембраной, которая пропускает лишь молекулы воды, вода будет переходить в более концентрированный раствор в результате процесса, называемого **ОСМОСОМ**.



Это движение воды из **гипотонического** в **гипертонический** раствор приводит к повышению гидростатического давления. Два раствора, находящиеся в осмотическом равновесии, называются **изотоническими**.

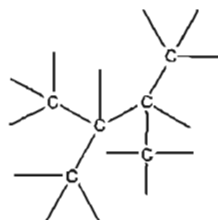
УГЛЕРОДНЫЙ СКЕЛЕТ

Уникальная роль углерода в клетке определяется его способностью к образованию сильных ковалентных связей с другими атомами углерода. Таким образом, атомы углерода могут соединяться друг с другом, образуя **цепи**.



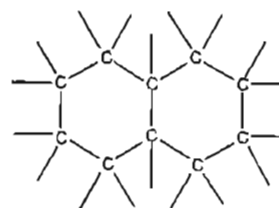
Изображается также в виде

или **разветвленные деревья**



Изображается также в виде

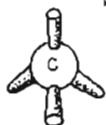
или **кольца**



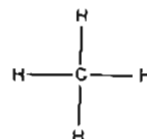
Изображается также в виде

КОВАЛЕНТНЫЕ СВЯЗИ

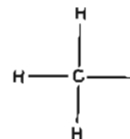
Атомы в биологических молекулах обычно соединены ковалентными связями (образованными поделенной парой электронов). Каждый атом может образовать определенное число таких связей с определенным пространственным расположением.



Существуют двойные связи, которые относительно других связей могут быть распложены по-разному



Метан

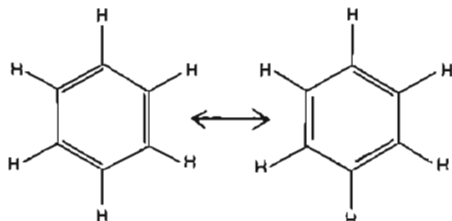


Метильная группа

Часть цепи жирной кислоты

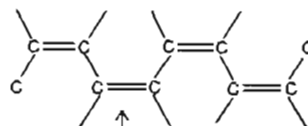
РЕЗОНАНС И АРОМАТИЧНОСТЬ

При резонансе, охватывающем все циклическое соединение, образуется ароматическое кольцо



Часто изображается в виде

Углеродная цепь может содержать двойные связи. В случае чередования двойных и простых связей электроны, участвующие в образовании связей, перемещаются по молекуле, стабилизируя ее структуру – явление, называемое резонансом.



Истина соответствует состоянию гда-то между этими двумя структурами

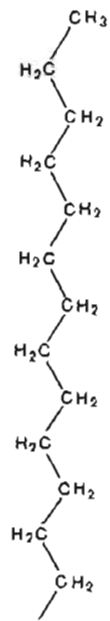
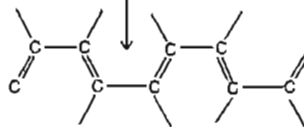
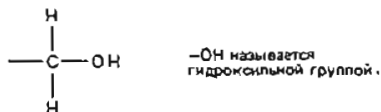


Схема IV. Ковалентные связи и группы, часто встречающиеся в биологических молекулах.

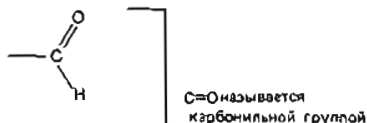
C-O-СОЕДИНЕНИЯ

Многие биологические соединения содержат углерод, связанный с кислородом, например:

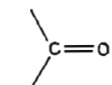
спирт



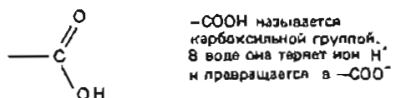
альдегид



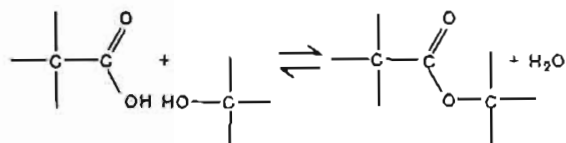
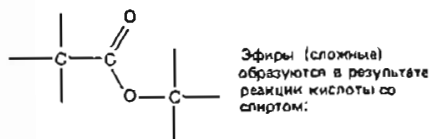
кетон



карбоновая кислота



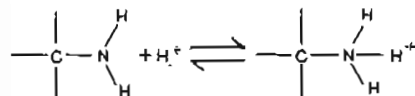
эфиры



C-N-СОЕДИНЕНИЯ

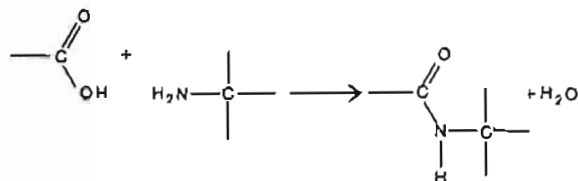
Амины и амиды — два важных примера соединений, содержащих углерод, связанный с атомом азота

Амины: в воде присоединяют ион H⁺ приобретая положительный заряд



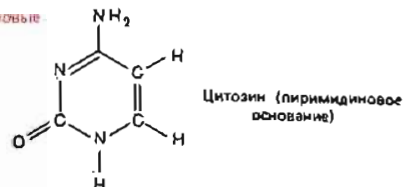
Поэтому они являются основаниями

Амиды образуются в результате реакции кислоты с амином. Они более стабильны, чем эфиры. В отличие от аминов они не несут заряда в воде. Примером служит пептидная связь:



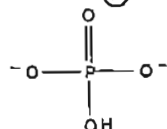
Азот входит также в состав некоторых циклических соединений:

в пуриновые и пиримидиновые основания

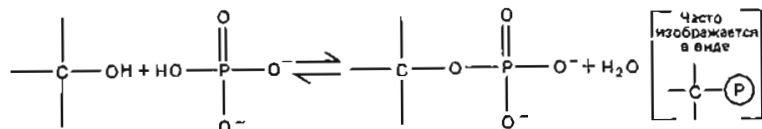


ФОСФАТЫ

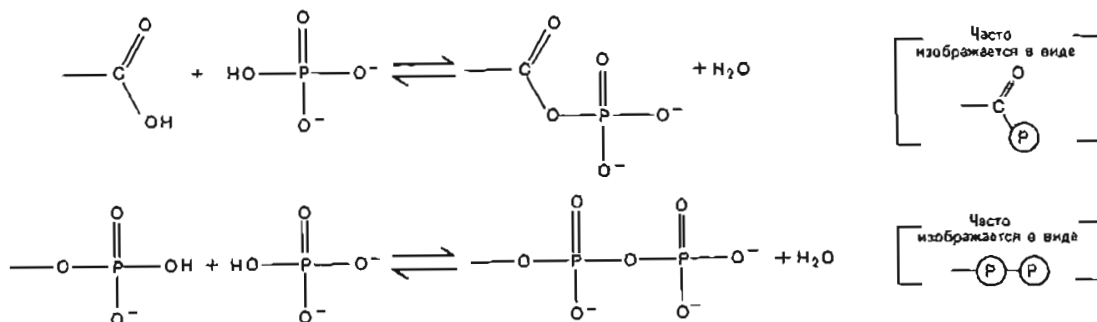
Неорганический фосфат представляет собой стабильный ион, образовавшийся из фосфорной кислоты H₃PO₄. Он часто обозначается в виде **(P)** или P_i



Фосфорные эфиры могут быть образованы соединением фосфата со свободной гидроксильной группой



Реакция соединения фосфата и карбоксильной группы либо двух или более фосфатных групп дает кислый ангидрид



Эти реакции легко обратимы, поскольку гидролиз кислых ангидридов энергетически очень выгоден

2.1.2. Клетки используют четыре основных типа молекул

Определенные простые комбинации атомов, такие, как метильные ($-\text{CH}_3$), гидроксильные ($-\text{OH}$), карбоксильные ($-\text{COOH}$) группы и аминокгруппы ($-\text{NH}_2$), неоднократно повторяются в биологических молекулах. Каждая такая группа обладает определенными химическими и физическими свойствами, которые оказывают влияние на поведение любых молекул, содержащих такие группы. Общие сведения об основных типах химических групп и их отдельных характерных свойствах приведены на схеме IV.

Так называемые **малые органические молекулы** клетки представляют собой соединения углерода с мол. массой от 100 до 1000, содержащие до 30 или около того атомов углерода. Молекулы такого рода обычно находятся в свободном состоянии в цитоплазматическом растворе, образуя пул промежуточных продуктов, дающих начало крупным молекулам, называемым *макромолекулами*. Они служат также важнейшими промежуточными продуктами в химических реакциях, преобразующих извлеченную из пищи энергию в пригодную для использования форму (см. ниже).

Содержание различных видов малых молекул в клетке достигает 1000 (по приближенным оценкам), однако многие из них сходны по химической структуре. Расщепляясь, все биологические молекулы распадаются до тех же простых соединений, из которых они и синтезируются, причем синтез и распад происходят в результате ограниченного количества химических изменений, которые подчиняются определенным правилам. Следовательно, все имеющиеся в клетке соединения можно разбить на небольшое число отдельных семейств. Крупные макромолекулы (они рассматриваются в гл. 3) строятся из малых молекул и относятся, таким образом, к тем же семействам.

Вообще говоря, содержащиеся в клетках малые органические молекулы образуют четыре семейства: простые сахара, жирные кислоты, аминокислоты и нуклеотиды. В состав каждого из этих семейств входит много различных соединений, имеющих общие химические свойства. Хотя некоторые соединения клетки не попадают в эти категории, на упомянутые четыре семейства, включающие как малые молекулы, так и построенные из них макромолекулы, приходится удивительно большая часть клеточной массы (табл. 2-1).

Таблица 2-1. Примерный химический состав бактериальной клетки (По Luria S. E., Gould S. J., Singer S., A view of life, Menlo park, Ca.: Benjamin-Cummings, 1981)

	Доля от общей массы клетки, %	Число типов молекулы
Вода	70	1
Неорганические молекулы	1	20
Сахара и их предшественники	3	200
Аминокислоты и их предшественники	0,4	100
Нуклеотиды и их предшественники	0,4	200
Липиды и их предшественники	2	50
Другие малые молекулы	0,2	~ 200
Макромолекулы (белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды)	22	~ 5000

2.1.3. Сахара как пища для клеток

Сахара простейшего типа — **моносахариды** — представляют собой соединения с общей формулой $(\text{CH}_2\text{O})_n$, где n — любое целое число от трех до семи. Глюкоза, например, имеет формулу $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (рис. 2-3). Все сахара содержат гидроксильные группы и, кроме того, либо альдегидную группу $\text{H}-\text{C}=\text{O}$, либо кетогруппу $>\text{C}=\text{O}$. К гидроксильной группе одного сахара может присое-

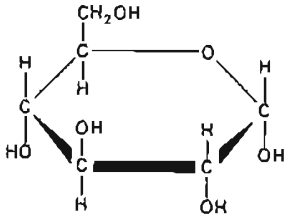


Рис. 2-3. Строение моносахарида глюкозы, простого сахара – гексозы.

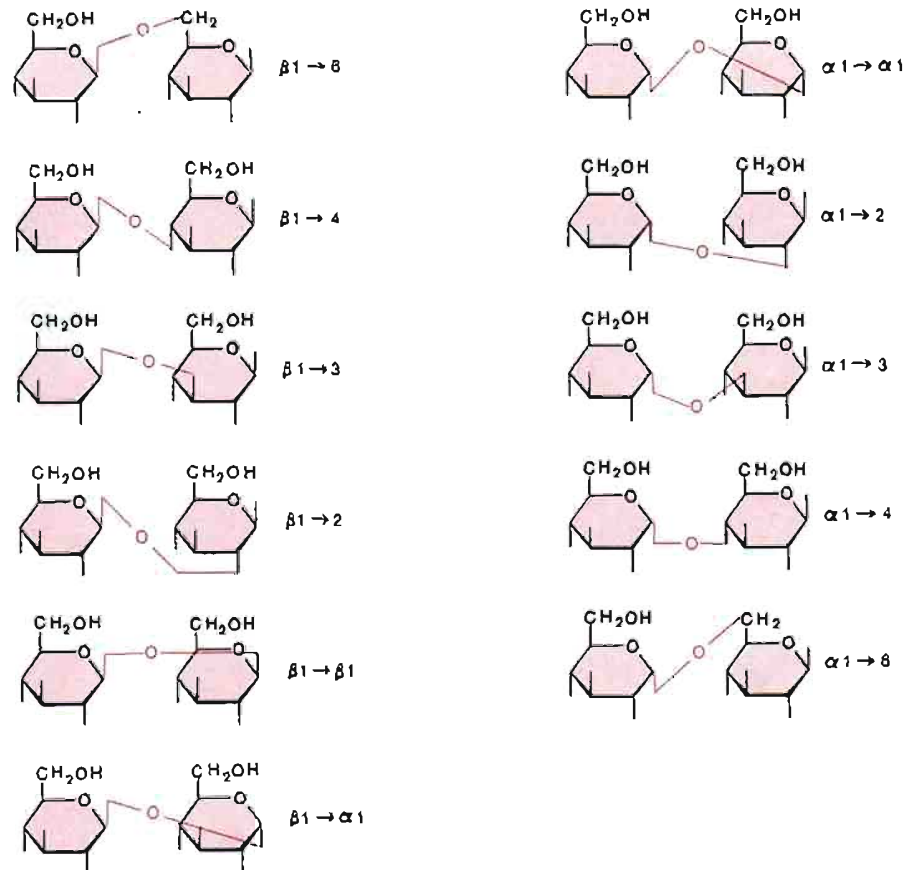
диняться альдегидная группа или кетогруппа другого сахара. При этом выделяется молекула воды, и в результате образуется дисахарид (схема V). При соединении аналогичным путем большего числа моносахаридов приводит к образованию **олигосахаридов** все возрастающей длины (трисахаридов, тетрасахаридов и т. д.) вплоть до очень больших молекул **полисахаридов**, содержащих тысячи моносахаридных остатков. Поскольку у каждого моносахарида имеется несколько свободных гидроксильных групп, способных образовать связь с другим моносахаридом или каким-либо иным соединением, число возможных структур полисахаридов исключительно велико. Даже простой дисахарид, состоящий из двух остатков глюкозы, может существовать в 11 разновидностях (рис. 2-4), а три различные гексозы ($C_6H_{12}O_6$), соединяясь между собой, способны образовать несколько тысяч различных трисахаридов. Поэтому определение структуры любого конкретного полисахарида – дело исключительно сложное; определение имеющимися методами расположения полудюжины связанных сахаров (например, в гликопротеине) занимает больше времени, чем выяснение нуклеотидной последовательности молекулы ДНК, состоящей из многих тысяч нуклеотидов.

Глюкоза служит главным источником энергии во многих клетках. В результате последовательного ряда реакций окисления (разд. 2.3.2) эта гексоза превращается в различные производные сахаров с меньшей длиной цепи и в конечном итоге распадается до CO_2 и H_2O . Суммарное уравнение реакции можно записать следующим образом:



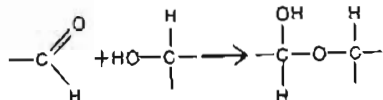
В ходе распада глюкозы высвобождается энергия и генерируется восстановительная способность, без которых невозможно протекание биосинтетиче-

Рис. 2-4. Одинадцать дисахаридов, построенных из двух остатков D-глюкозы. Хотя разница между ними состоит лишь в типе связи между двумя остатками глюкозы, в химическом отношении они различны. Олигосахариды, связанные с белками и липидами, могут включать в себя шесть и более разных видов сахаров, которые могут иметь как линейное, так и разветвленное строение – благодаря связям, подобным тем, которые показаны на этом рисунке. Следовательно, число возможных различных типов олигосахаридов необычайно велико.

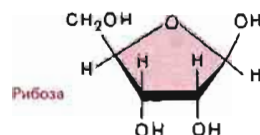
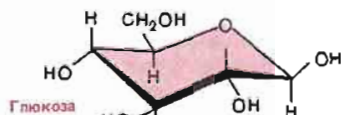


ОБРАЗОВАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Альдегидная группа или кетогруппа сахара может реагировать с гидроксильной группой



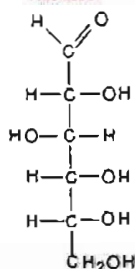
У больших по размеру сахаров ($n > 4$) это может произойти в пределах одной молекулы, что приводит к образованию 5- или 6-членного кольца



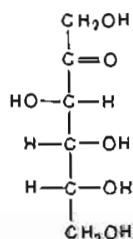
ГЕКСОЗЫ

$n = 6$ Две наиболее распространенные гексозы — это

глюкоза



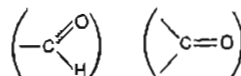
фруктоза



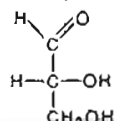
МОНОСАХАРИДЫ

Моносахариды бывают

альдегидами или кетонами



которые имеют еще две или более гидроксильные группы. Их общая формула $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Простейшие моносахариды — это триозы ($n = 3$), например:



Глицеральдегид (альдоза)

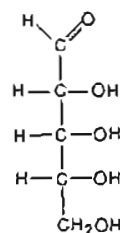


Дигидроксиацетон (кетоза)

ПЕНТОЗЫ

$n = 5$

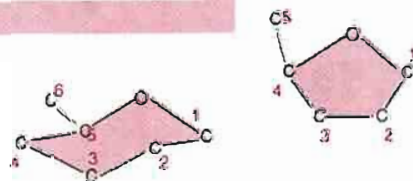
Часто встречающаяся пентоза



Рибоза

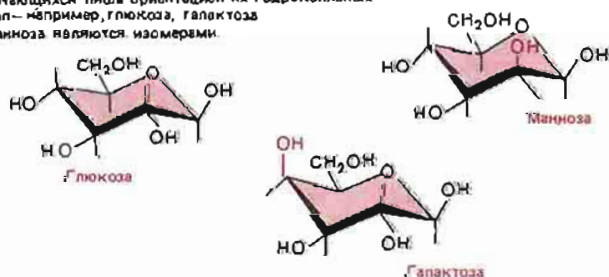
СИСТЕМА НУМЕРАЦИИ

Углеродные атомы сахара нумеруются с ближайшего к альдегидной группе или кетогруппе конца



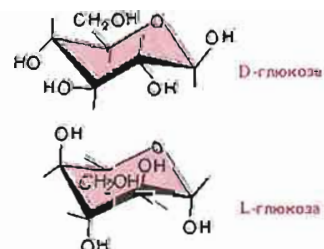
СТЕРЕОИЗОМЕРЫ

Моносахариды имеют большое число изомеров, отличающихся лишь ориентацией их гидроксильных групп — например, глюкоза, галактоза и манноза являются изомерами.



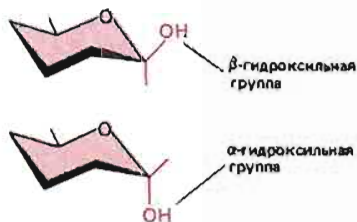
D-и L-ФОРМЫ

Два изомера, являющиеся зеркальным отражением друг друга, обладают одинаковым химическим строением и имеют поэтому одинаковые названия, различающиеся лишь приставкой D или L



α- и β-СВЯЗИ

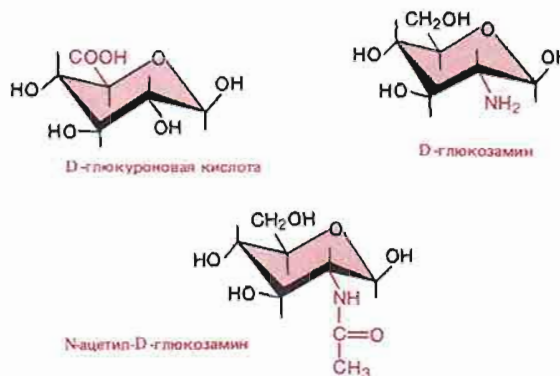
Гидроксильная группа углерода, несущего альдегидную группу или кетогруппу, может легко переходить из одного положения в другое. Эти два положения называются α- и β-положениями



Как только один сахар связывается с другим, α- или β-форма фиксируется

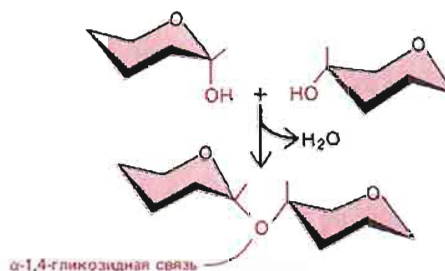
ПРОИЗВОДНЫЕ САХАРОВ

Гидроксильные группы простых моносахаридов могут замещаться другими группами. Например,



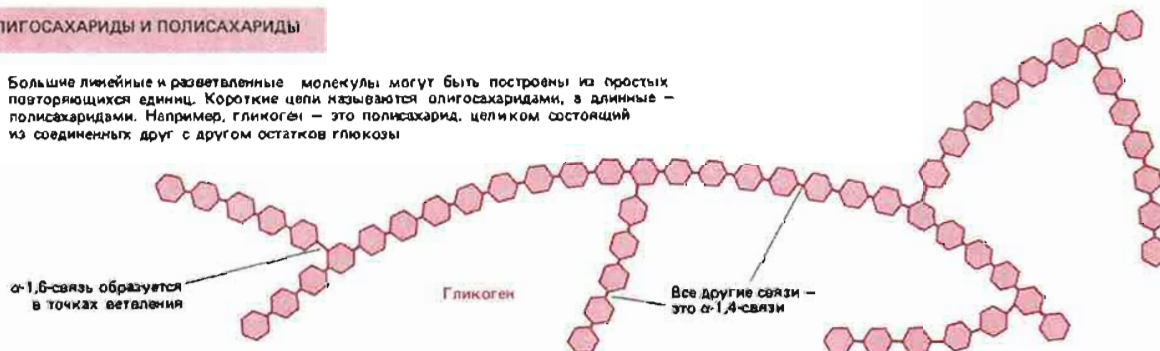
ДИСАХАРИДЫ

Два сахара могут реагировать друг с другом, образуя гликозидную связь. Три часто встречающихся дисахарида — это мальтоза (глюкозо-α-1,4-глюкоза), лактоза (галактозо-β-1,4-глюкоза) и сахароза (глюкозо-α-1,2-фруктоза)



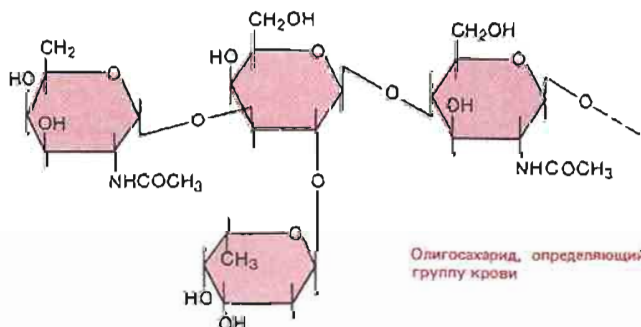
ОЛИГОСАХАРИДЫ И ПОЛИСАХАРИДЫ

Большие линейные и разветвленные молекулы могут быть построены из простых повторяющихся единиц. Короткие цепи называются олигосахаридами, а длинные — полисахаридами. Например, гликоген — это полисахарид, целиком состоящий из соединенных друг с другом остатков глюкозы



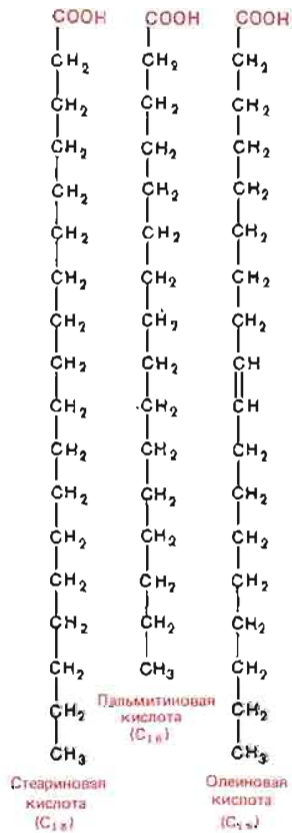
СЛОЖНЫЕ ОЛИГОСАХАРИДЫ

Во многих случаях нет повторяющихся последовательностей сахаров. Может существовать множество различных молекул. Такие сложные олигосахарида обычно связаны с белками или липидами

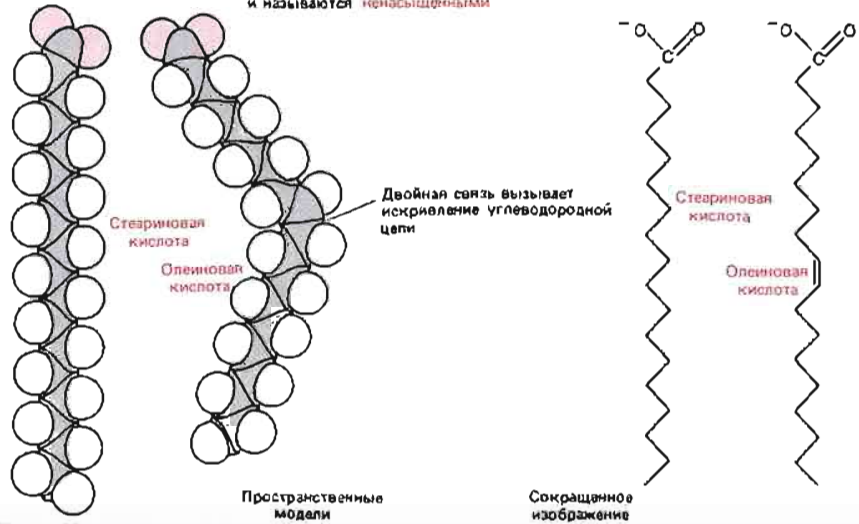


НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ

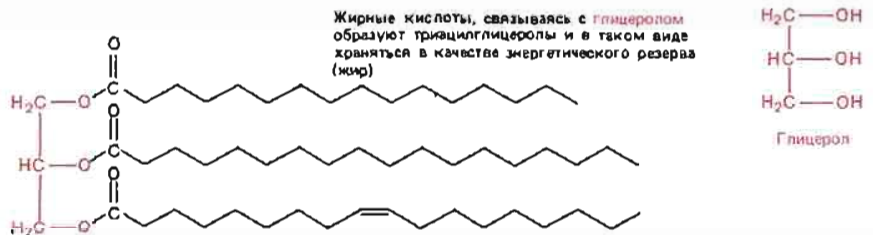
Это карбоновые кислоты с длинными углеводородными хвостами



Имеются сотни различных видов жирных кислот. Некоторые имеют одну или большее число двойных связей и называются **ненасыщенными**

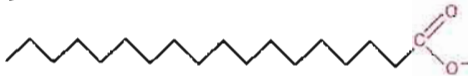


ТРИАЦИЛГЛИЦЕРОЛЫ

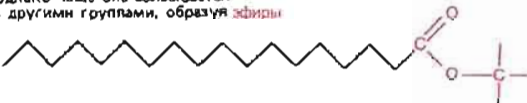


КАРБОКСИЛЬНАЯ ГРУППА

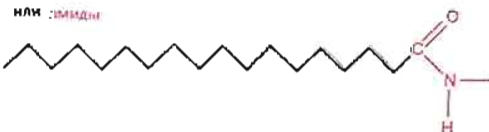
Свободная карбоксильная группа жирной кислоты обычно ионизируется



Однако чаще она связывается с другими группами, образуя **эфиры**



или **амиды**



ФОСФОЛИПИДЫ

Фосфолипиды – главные компоненты клеточных мембран

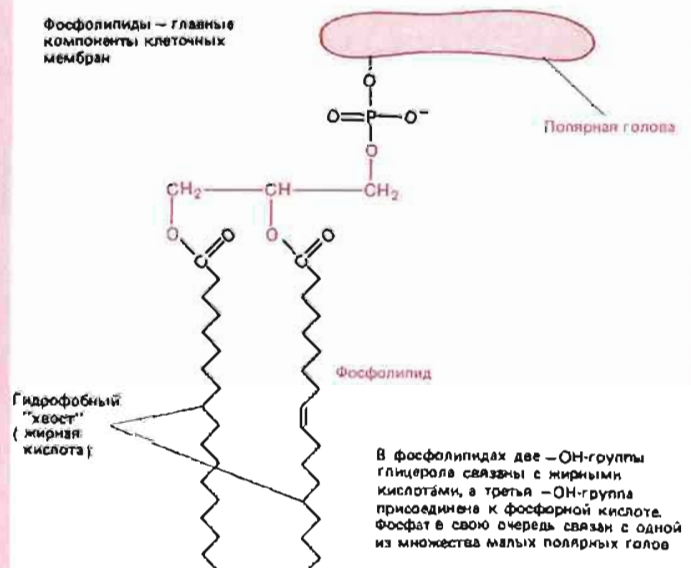


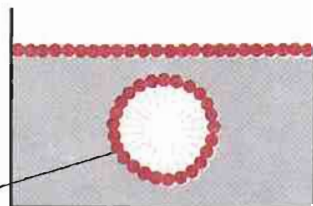
Схема VI. Некоторые типы жирных кислот, часто встречающиеся в клетках, и образованные ими структуры.

ЛИПИДНЫЕ АГРЕГАТЫ

Жирные кислоты имеют гидрофильную голову и гидрофобный хвост

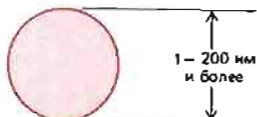
В воде они могут образовывать поверхностную пленку или небольшие мицеллы

Мицелла

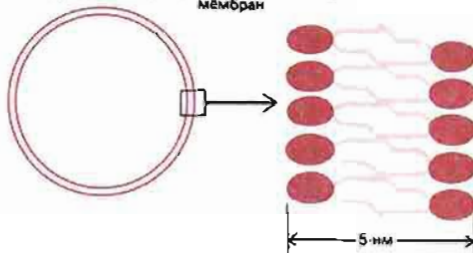


Их производные могут образовывать более крупные агрегаты, в которых жирные кислоты удерживаются вместе благодаря гидрофобным взаимодействиям:

Триацилглицеролы образуют в цитоплазме клетки крупные сферические капли жира

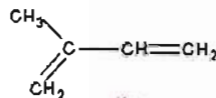


Фосфолипиды и гликолипиды образуют самоорганизующиеся липидные бислои, составляющие основу всех клеточных мембран



ДРУГИЕ ЛИПИДЫ

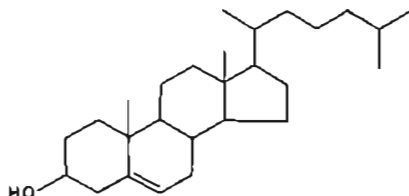
Липиды — это соединения, растворимые в органических растворителях. Два других распространенных типа липидов представлены стероидами и полиизопреноидами. Оба этих соединения образуются из изопреновых единиц



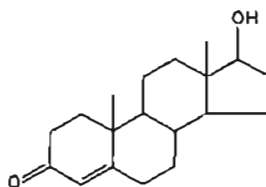
Изопрен

СТЕРОИДЫ

Стероиды имеют общую полициклическую структуру



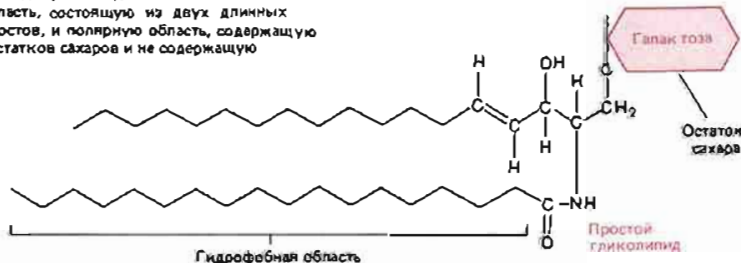
Холестерин имеется во многих мембранах



Тестостерон — мужской стероидный гормон

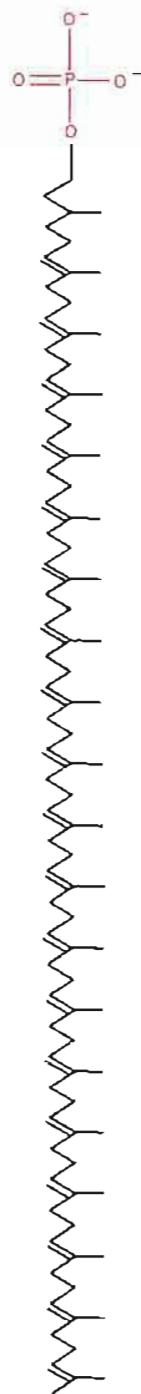
ГЛИКОЛИПИДЫ

Подобно фосфолипидам, эти соединения включают в себя гидрофобную область, состоящую из двух длинных гидрофобных хвостов, и полярную область, содержащую один или более остатков сахаров и не содержащую фосфата



ПОЛИИЗОПРЕНОИДЫ

Длинная цепь изопренового полимера



Долгохвостый фосфолипид используется для переноса активированных сахаров при мембранном синтезе гликопротеинов и некоторых полисахаридов

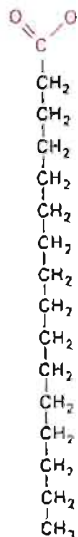


Рис. 2-5. Пальмитиновая кислота. Карбоксильная группа (выделена цветом) изображена в ионизированной форме.

ских реакций. Высвобождающаяся энергия и генерируемая восстановительная способность запасаются в форме двух важнейших соединений – АТФ и NADH (разд. 2.3.1).

Простые полисахариды, построенные из повторяющихся остатков глюкозы (в животных клетках это главным образом *гликоген*, а в растительных — *крахмал*), используются для запасаания энергии впрок. Однако нельзя считать, что сахара служат исключительно для получения и запасаания энергии. Так, из простых полисахаридов состоит важный внеклеточный структурный материал (например, целлюлоза), а цепочки неповторяющихся молекул сахаров часто бывают ковалентно связаны с белками в *гликопротеинах* и с липидами в *гликолипидах*. Предполагается, что огромное разнообразие этих коротких олигосахаридных цепей в гликопротеидах и гликолипидах играет роль в исключительно тонких внутриклеточных и внеклеточных процессах узнавания.

2.1.4. Жирные кислоты – компоненты клеточных мембран

В молекуле жирной кислоты, например в пальмитиновой кислоте (рис. 2-5), имеются две различные части: длинная углеводородная цепь, которая имеет гидрофобный характер (водонерастворима) и химически мало активна, и карбоксильная группа, ионизирующаяся в растворе, крайне гидрофильная (водорастворимая) и легко образующая эфиры и амиды. Действительно, почти во всех случаях молекулы жирных кислот клетки ковалентно связаны с другими молекулами именно своими карбоксильными группами. Многие жирные кислоты, обнаруживаемые в клетках, отличаются друг от друга такими химическими свойствами, как длина углеводородной цепи, число и положение имеющихся в них двойных связей углерод—углерод (схема VI).

Жирные кислоты являются ценным источником энергии, поскольку их расщепление сопровождается образованием такого количества АТФ, которое в два раза превышает образование АТФ при расщеплении такого же количества (по массе) глюкозы. Жирные кислоты запасаются в цитоплазме многих клеток в виде капелек *триацилглицеролов* (*триглицеридов*). Молекулы триацилглицеролов состоят из трех цепей жирных кислот, каждая из которых присоединена к молекуле глицерола (схема VI). При необходимости цепи жирных кислот могут высвобождаться из триацилглицеролов и распадаться до двухуглеродных единиц. Такие двухуглеродные единицы, входящие в виде ацетогруппы в молекулу ацетил-СоА, подвергаются дальнейшему расщеплению в различных экзергонических реакциях, которые рассматриваются в последующих разделах.

Но самая важная функция жирных кислот – участие в построении клеточных мембран. Эти тонкие плотные пленки, которыми одеты все клетки и внутриклеточные органеллы, состоят главным образом из **фосфолипидов** – небольших молекул, сходных с триацилглицеролами наличием таких компонентов, как жирные кислоты, связанные с глицеролом. Однако в фосфолипидах глицерол чаще связан не с тремя, а лишь с двумя цепями жирных кислот. Оставшееся свободное место в молекуле глицерола обычно занимает фосфатная группа, которая в свою очередь соединена с другими небольшими гидрофильными группами – *этанол амином*, *холином* или *серином*.

У каждой фосфолипидной молекулы имеется гидрофобный хвост, состоящий из цепей двух жирных кислот, и гидрофильная полярная голова, в которой располагается фосфатная группа. Такие фосфолипидные молекулы, в сущности, представляют собой детергенты, о чем свидетельствуют их свойства. Небольшое количество фосфолипидов будет распределяться по водной поверхности с образованием фосфолипидного *монослоя*. В таком тонком слое очень тесно облизанные хвосты обращены в сторону воздуха, а головы погружены в воду (схема VI). Два подобных слоя могут соединяться «хвост к хвосту», образуя в результате фосфолипидный «сэндвич», или липидный бислой, служащий структурной основой всех клеточных мембран.

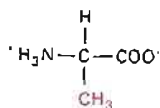


Рис. 2-6. Аминокислота аланин в ионизированной форме, в которой она находится при pH 7. При включении аланина в полипептидную цепь заряды амино- и карбоксильной групп, имеющиеся у свободной аминокислоты, исчезают.

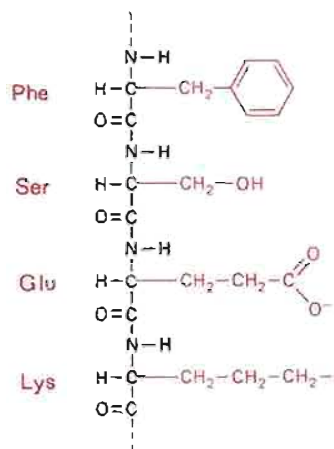


Рис. 2-7. Небольшая часть белковой молекулы. Четыре показанные на рисунке аминокислоты связаны друг с другом ковалентными связями, называемыми пептидными связями. Поэтому белок можно называть полипептидом.

2.1.5. Аминокислоты – субъединицы белков

Аминокислоты, содержащиеся в биологических тканях, различаются по химическому составу. Однако все они имеют ту общую особенность, что содержат карбоксильную группу и аминогруппу, связанные с одним и тем же углеродным атомом (рис. 2-6). Аминокислоты служат строительными блоками при синтезе белков – длинных линейных полимеров аминокислот, соединенных «хвост к голове» при помощи пептидной связи между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой (рис. 2-7). В белках встречается обычно 20 аминокислот с разными боковыми цепями, связанными с α -углеродным атомом (рис. 2-8 и схема VII). Одни и те же 20 аминокислот неоднократно повторяются во всех белках, в том числе в белках бактериального, животного и растительного происхождения. Возможно, тот факт, что именно эти 20 аминокислот были отобраны в ходе эволюции, – один из примеров роли случая, но их химическое разнообразие имеет жизненно важное значение. Как мы увидим, особенности боковых цепей всех аминокислот, входящих в состав данного белка, определяют его свойства и лежат в основе всех сложных и разнообразных функций белковых молекул.

2.1.6. Нуклеотиды – субъединицы ДНК и РНК

В нуклеотидах одно из нескольких азотсодержащих циклических соединений (называемых часто основаниями, поскольку они способны присоединять ион

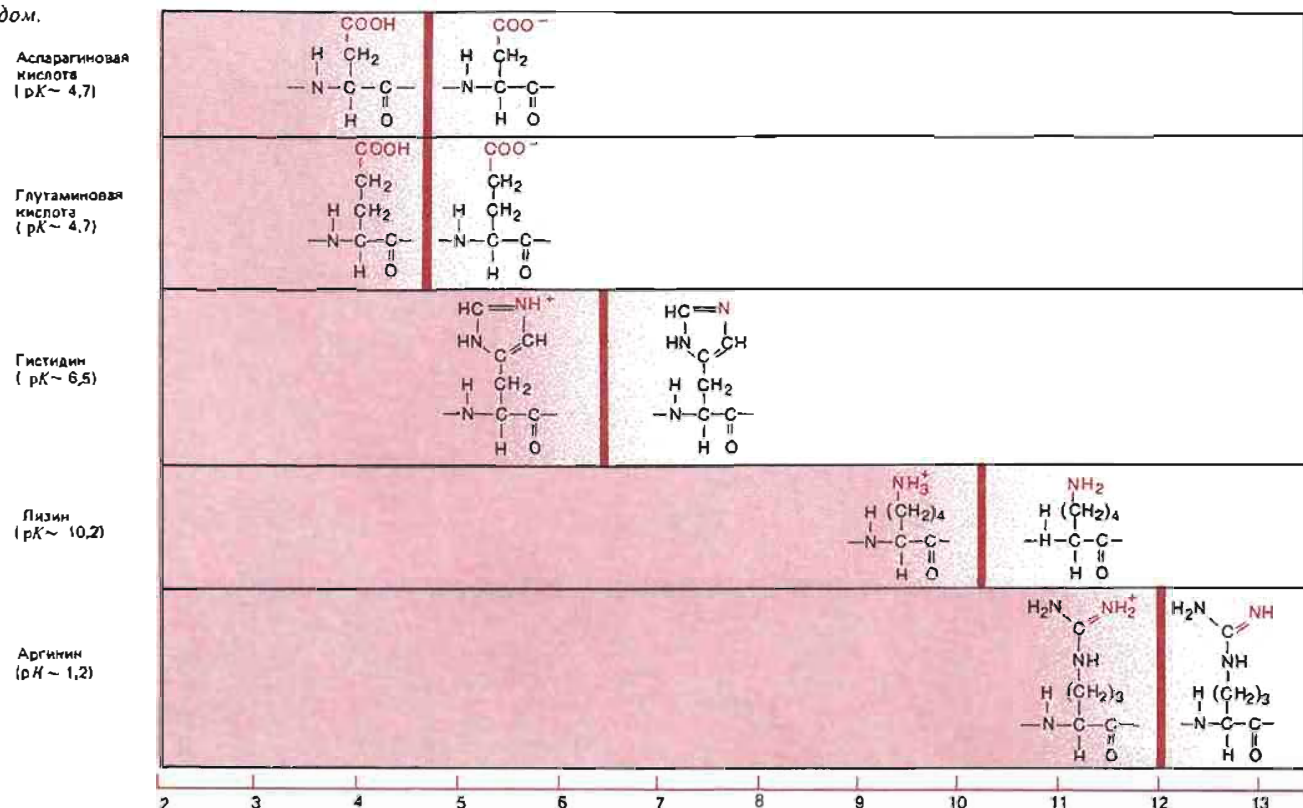
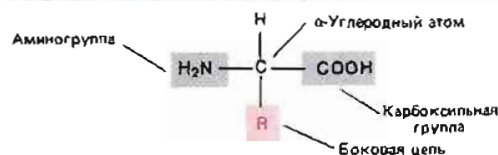


Рис. 2-8. Заряд боковых цепей аминокислот зависит от значения pH. Карбоновые кислоты в водном растворе легко теряют H^+ , образуя отрицательно заряженный ион, обозначаемый с помощью суффикса «ат», например аспарат или глутамат. Сравнимая ситуация имеет место в случае аминов, которые, захватывая в водном растворе ион H^+ , превращаются в положительно заряженный ион (он не имеет специального названия). Эти реакции легко обратимы, и количество двух форм (заряженной и незаряжен-

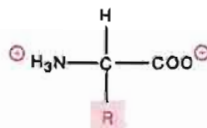
ной) зависит от pH раствора. При высоких значениях pH карбоновые кислоты имеют тенденцию к приобретению заряда, а у аминов заряд отсутствует. При низких значениях pH наблюдается обратная ситуация: карбоновые кислоты не несут заряда, а амины заряжены. pH, при котором равно половина остатков карбоновых кислот яли аминов заряжена, называют pK аминокислоты. В клетке pH близко к 7 и почти все карбоновые кислоты и амины находятся в заряженном состоянии.

АМИНОКИСЛОТА

Общая формула аминокислот выглядит так:

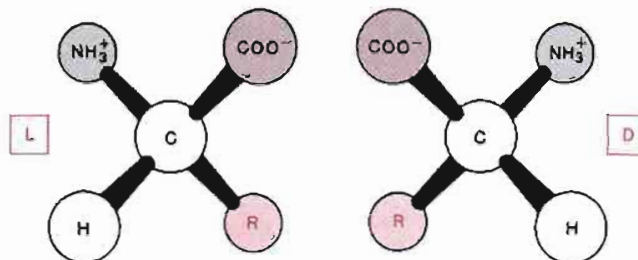


R обычно представлен одной из двадцати различных боковых цепей. При pH 7 аминогруппа и карбоксильная группа ионизованы:



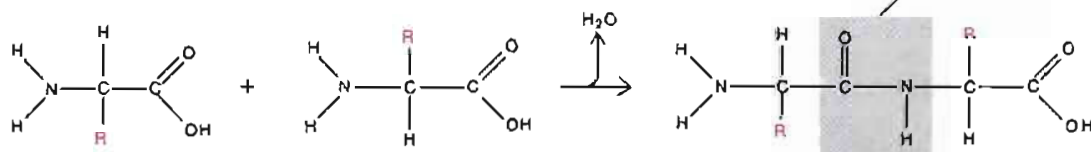
ОПТИЧЕСКИЕ ИЗОМЕРЫ

Поскольку α -углеродный атом асимметричен, возможно существование двух зеркальных отображений (или стереоизомеров), D и L

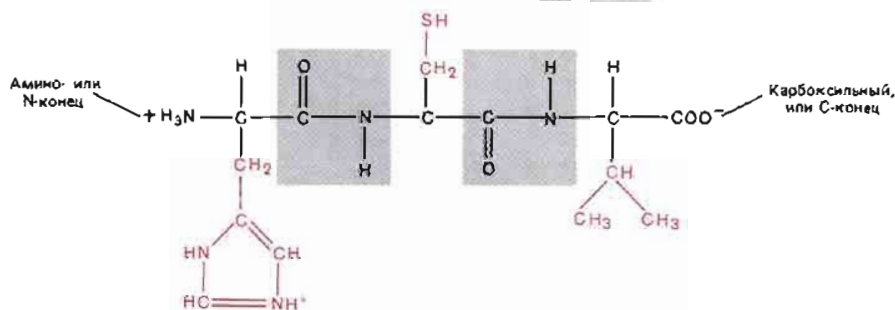


ПЕПТИДНЫЕ СВЯЗИ

Аминокислоты обычно соединяются друг с другом при помощи амидной связи, называемой пептидной связью



Белки — это длинные полимеры, которые состоят из аминокислот, связанных пептидными связями; они обычно изображаются так, что N-конец оказывается слева



СЕМЕЙСТВА АМИНОКИСЛОТ

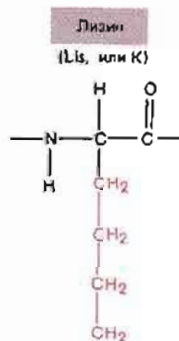
Аминокислоты подразделяются на группы в зависимости от того, являются ли их боковые цепи

кислотными
основными
полярными незаряженными
неполярными

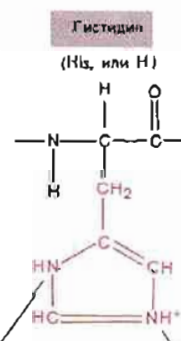
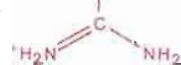
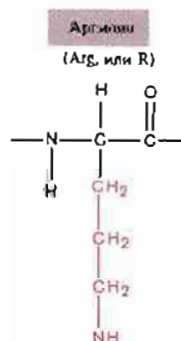
Эти 20 аминокислот обозначаются 3- или 1-буквенными символами

Так например: аланин = Ala = A

ОСНОВНЫЕ БОКОВЫЕ ЦЕПИ

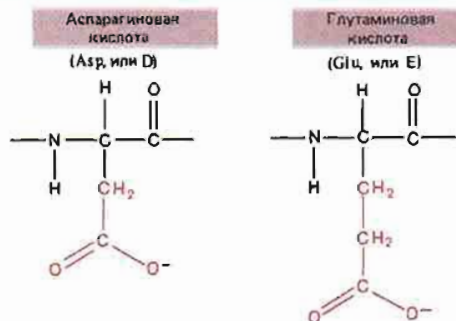


Эта группа проявляет сильные основные свойства, так как ее положительный заряд стабилизируется резонансом

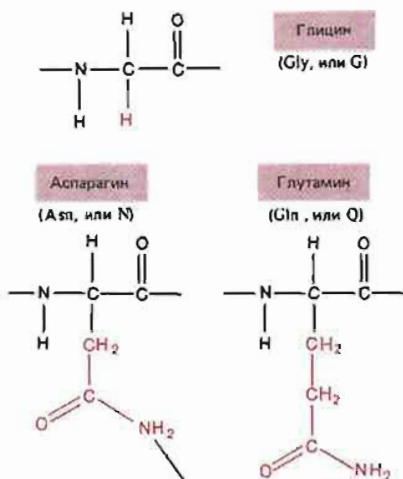


Эти атомы азота обладают относительно слабым сродством к H⁺ и имеют лишь частичный положительный заряд при нейтральных значениях pH

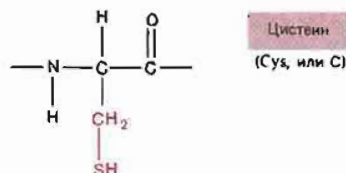
КИСЛОТНЫЕ БОКОВЫЕ ЦЕПИ



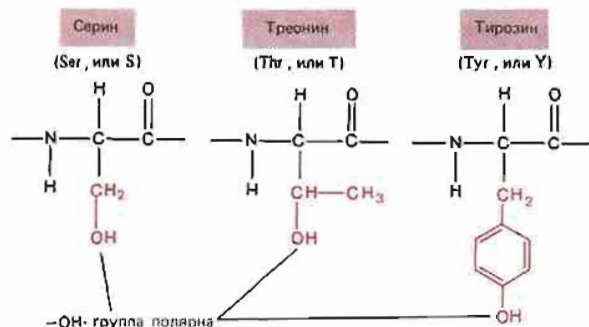
ПОЛЯРНЫЕ НЕЗАРЯЖЕННЫЕ БОКОВЫЕ ЦЕПИ



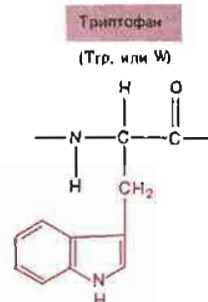
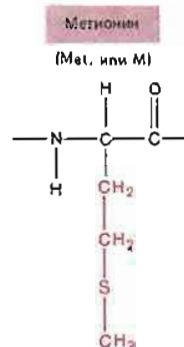
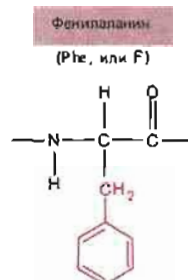
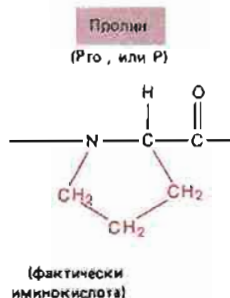
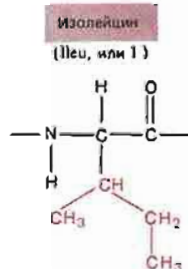
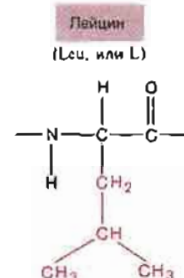
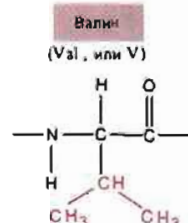
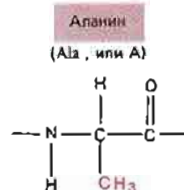
Хотя амидный N не заряжен при нейтральных значениях pH, группа полярна



Наличие свободных остатков цистеина обуславливает образование дисульфидных связей в белках



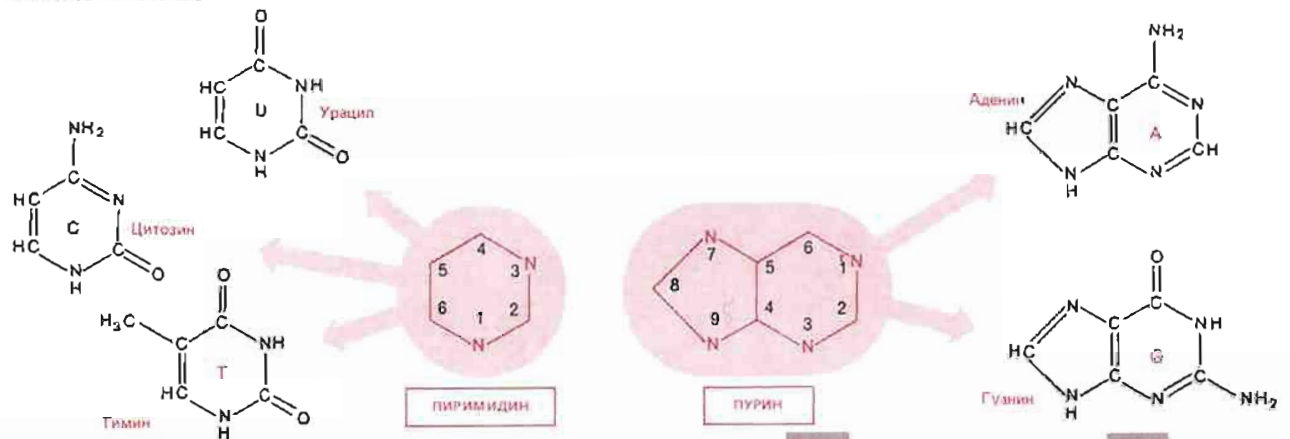
НЕПОЛЯРНЫЕ БОКОВЫЕ ЦЕПИ



Неполярные боковые цепи в белках стремятся сгруппироваться внутри трехмерной структуры молекулы

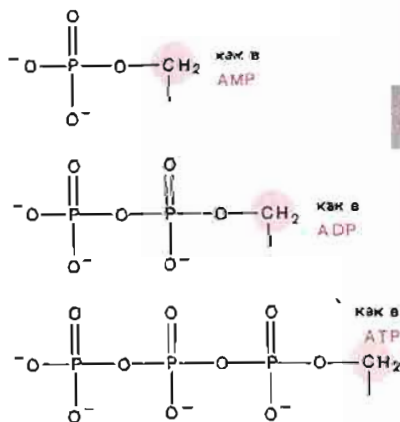
ОСНОВАНИЯ

Основания – это N-содержащие циклические соединения, пурины и пиримидины



ФОСФАТЫ

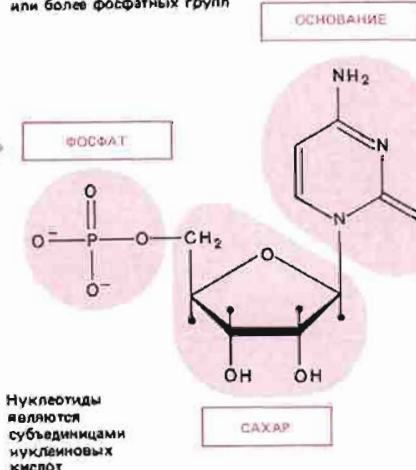
Фосфаты обычно присоединяются к OH-группе при C-5 сахара рибозы или дезоксирибозы. Обычно встречаются моно-, ди- и трифосфаты



Фосфат придает нуклеотиду отрицательный заряд

НУКЛЕОТИДЫ

Нуклеотид состоит из азотсодержащего основания, 5-углеродного сахара и одной или более фосфатных групп

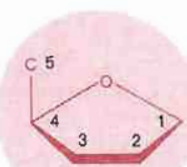


СВЯЗЬ ОСНОВАНИЕ – САХАР

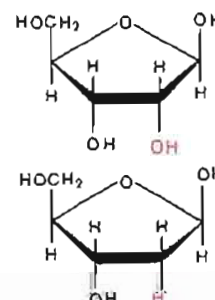


САХАРА

ПЕНТОЗА
5-углеродный сахар



Используются два вида



используется в рибонуклеиновой кислоте

используется в дезоксирибонуклеиновой кислоте

Схема VIII. Основные типы нуклеотидов и их производных, встречающихся в клетке.

НОМЕНКЛАТУРА

Названия можно перепутать, но сокращенные обозначения достаточно ясны

ОСНОВАНИЕ + САХАР = НУКЛЕОЗИД

ОСНОВАНИЕ + САХАР + ФОСФАТ = НУКЛЕОТИД

ОСНОВАНИЕ	НУКЛЕОЗИД	СОКРАЩЕННОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ
Аденин	Аденозин	A
Гуанин	Гуанозин	G
Цитозин	Цитидин	C
Урацил	Уридин	U
Тимин	Тимидин	T

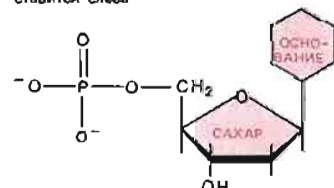
Нуклеотиды сокращенно обозначаются тремя заглавными буквами следующим образом:

AMP — аденозинмонофосфат
dAMP — дезоксиаденозинмонофосфат
UDP — уридиндифосфат
ATP — аденозинтрифосфат
и т. д.

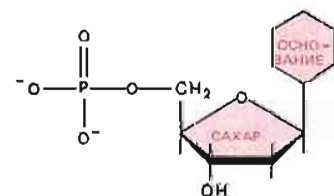
НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нуклеотиды соединяются друг с другом при помощи простой фосфодиэфирной связи, образуя нуклеиновые кислоты

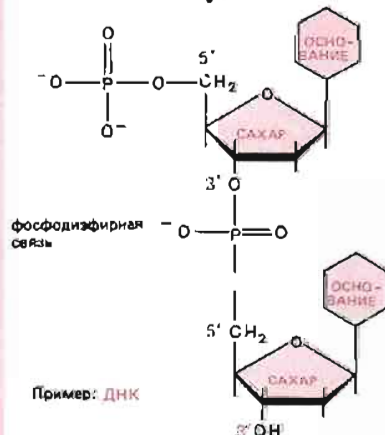
Линейная последовательность нуклеотидов в цепи нуклеиновой кислоты обычно сокращенно записывается с помощью однобуквенного кода, A-G-C-T-У-А-С-А; 5'-конец цепи ставится слева



+

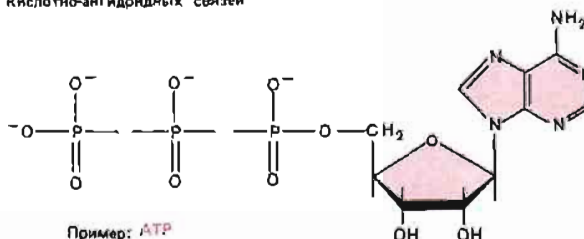


↓

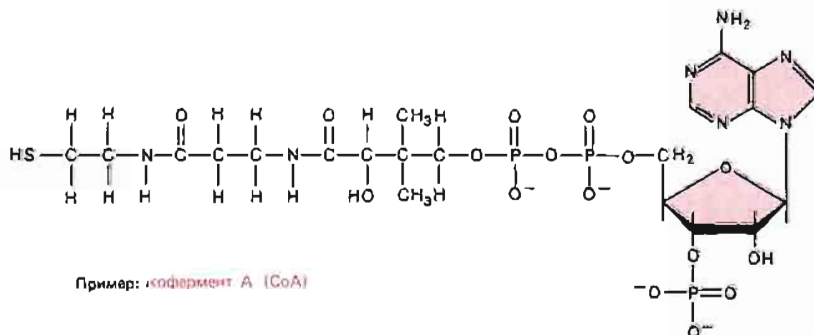


НУКЛЕОТИДЫ ВЫПОЛНЯЮТ МНОГО ДРУГИХ ФУНКЦИЙ

1. Они переносят химическую энергию благодаря наличию легко гидролизующихся кислотно-ангидридных связей



2. Они соединяются с другими группами, образуя коферменты



3. Они используются в клетке в качестве специфических сигнальных молекул

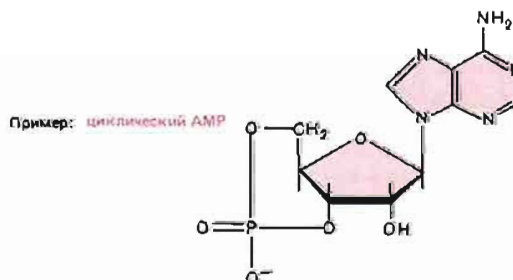
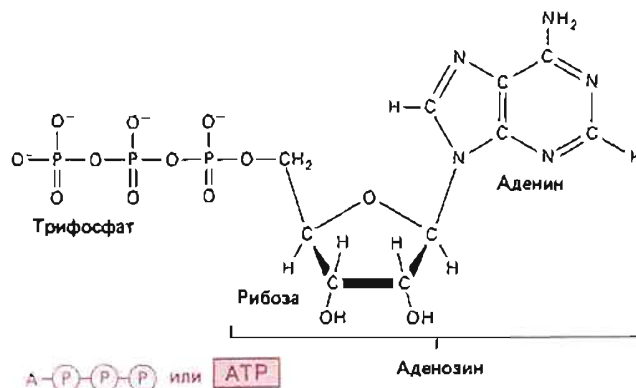


Рис. 2-9. Химическое строение аденозинтрифосфата (АТР). Показаны также два принятых обозначения этого соединения.



H^+) связано с пятиуглеродным сахаром (рибозой или дезоксирибозой), который несет еще и фосфатную группу. Между азотсодержащими кольцами, встречающимися в нуклеотидах, имеется близкая родственная связь. Цитозин (C), тимин (T) и урацил (U) называются **пиримидиновыми основаниями**, так как они представляют собой простые производные шестичленного пиримидинового кольца; гуанин (G) и аденин (A) — **пуриновые основания**, второе пятичленное кольцо которых сконденсировано с шестичленным циклом (схема VIII).

Нуклеотиды могут выступать в качестве переносчиков энергии. При этом трифосфатный эфир аденина АТР (рис. 2-9) гораздо чаще, чем другие нуклеотиды, участвует в переносе энергии между сотнями индивидуальных внутриклеточных реакций. Два реакционноспособных и легко гидролизующихся концевых фосфата АТР образуют ковалентные связи в процессе окисления питательных веществ; энергия, высвобождаемая при гидролизе одной или обеих этих высокоэнергетических фосфатных групп, может использоваться в любом другом месте для осуществления биосинтетических процессов, протекающих с затратой энергии. Другие производные нуклеотидов служат переносчиками отдельных химических групп, таких, как атомы водорода или остатки сахаров, с одной молекулы на другую. Кроме того, циклическое фосфорилированное производное аденина — **циклический АМР** — служит универсальным внутриклеточным сигналом и регулирует скорость множества различных внутриклеточных реакций.

Как уже упоминалось в гл. 1, особенно велика роль нуклеотидов в хранении биологической информации. Нуклеотиды служат строительными блоками для синтеза **нуклеиновых кислот** — длинных полимеров, в которых нуклеотидные субъединицы соединяются между собой ковалентной связью, образуя фосфорный эфир между 3-гидроксильной группой остатка сахара одного нуклеотида и 5'-фосфатной группой следующего (рис. 2-10). Существуют два основных типа нуклеиновых кислот, различающихся видом сахара, который входит в состав их полимерного остова. Нуклеиновые кислоты, сахар которых представлен **рибозой**, называются **рибонуклеиновыми кислотами** или **РНК**; они содержат основания А, U, G и C. Те нуклеиновые кислоты, в состав которых входит **дезоксирибоза** (в ней гидроксильная группа при C-2' рибозы замещена на атом водорода), называются **дезоксирибонуклеиновыми кислотами** или **ДНК**; они содержат основания А, T, G и C. В последовательности оснований в полимерных молекулах ДНК и РНК заключена генетическая информация живой клетки. Способность азотистых оснований молекул различных нуклеиновых кислот «узнавать» друг друга путем нековалентного взаимодействия (называемого **спариванием оснований**) — G с C и A с T или U — лежит в основе механизмов наследственности и эволюции. Этот вопрос рассматривается в следующей главе.

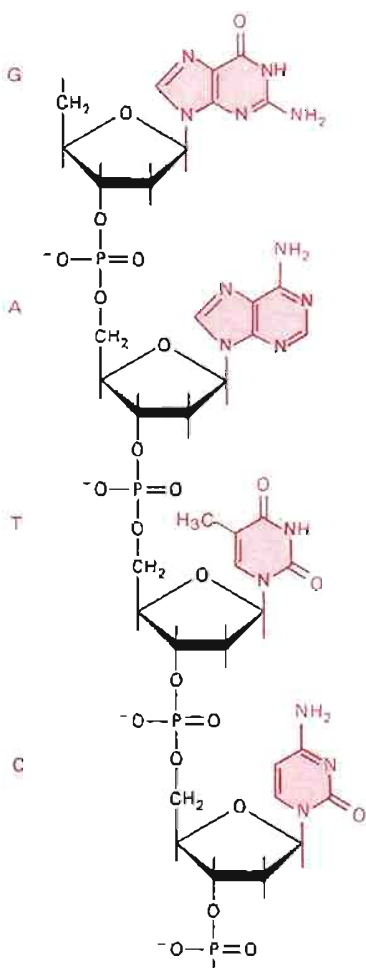


Рис. 2-10. Короткий отрезок дезоксирибонуклеиновой кислоты, или ДНК. ДНК и близкородственная ей РНК — нуклеиновые кислоты клетки.

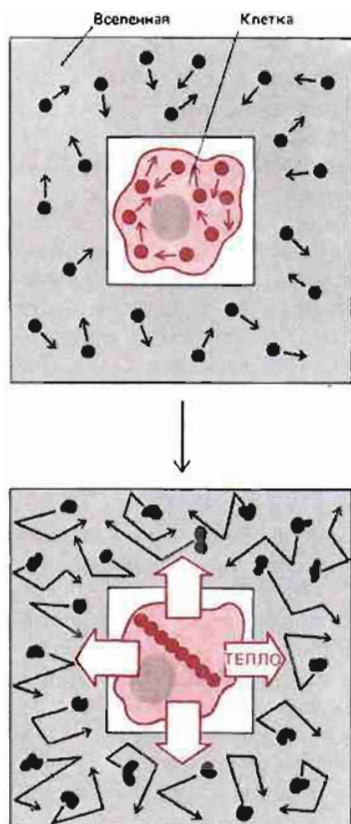


Рис. 2-11. Для простого термодинамического анализа живой клетки можно использовать следующий подход: считается, что клетка и ее ближайшее окружение находятся в запаянном ящике, в котором они могут обмениваться с остальной частью Вселенной теплотой, но при этом не могут обмениваться молекулами. На верхнем рисунке молекулы клетки и остальной части Вселенной изображены в относительно неупорядоченном состоянии. На нижнем рисунке из клетки выделилось тепло в результате реакции, которая привела к упорядочению содержащихся в клетке молекул. Возрастание беспорядочного движения (в том числе деформаций связей) молекул остальной части Вселенной создаст неупорядоченность, которая с избытком компенсирует увеличение упорядоченности в клетке, что находится в соответствии с законами термодинамики для спонтанных процессов. Таким образом, выделение клеткой тепла в окружающее пространство позволяет ей создавать более высокую степень внутренней упорядоченности. В то же время Вселенная в целом становится более неупорядоченной.

Заключение

Живые организмы — это автономные самовоспроизводящиеся химические системы. Они построены из специфического и вместе с тем ограниченного набора углеродсодержащих малых молекул, как правило, одних и тех же для всех видов живых существ. Основные группы этих молекул представлены сахарами, жирными кислотами, аминокислотами и нуклеотидами. Сахара служат важнейшим источником энергии для клеток и запасают ее, образуя резервные полисахариды. Жирные кислоты, как и сахара, имеют важное значение для запасаения энергии, но самая главная их функция — образование клеточных мембран. Полимеры, построенные из аминокислот, представлены удивительно разнообразными и многофункциональными молекулами белков. Нуклеотиды участвуют во внутриклеточной передаче сигналов и играют центральную роль в переносе энергии, однако их уникальное значение состоит в том, что они являются субъединицами информационных молекул РНК и ДНК.

2.2. Упорядоченность биологических систем и энергия

Клетки должны подчиняться законам физики и химии. Принципы механики и закон сохранения и превращения энергии можно применять к клетке точно так же, как и к паровой машине. Однако нельзя не признать, что клеткам присущ ряд особенностей, которые приводят нас в замешательство и на первый взгляд, казалось бы, ставят клетки в особое положение. Как показывает повседневная практика, все, что предоставлено самому себе, в конце концов приходит в неупорядоченное состояние: здания разрушаются, мертвые организмы подвергаются гниению и т.д. Эта общая тенденция выражена во втором законе термодинамики, который гласит, что в любой изолированной системе степень неупорядоченности может только возрастать.

Озадачивает то обстоятельство, что живые системы на всех уровнях организации в высшей степени упорядочены. Порядок с удивительной ясностью виден и в больших структурах, таких, как крыло бабочки или глаз осьминога, и в субклеточных образованиях, например в митохондриях или жгутике, и в форме и расположении составляющих их молекул. Множество атомов, из которых состоит любая молекула белка или нуклеиновой кислоты, собрано в исключительно точные структуры, а ведь в конечном счете все они были извлечены из окружающей среды, где находились в крайне неорганизованном состоянии. Каждый раз, когда из малых молекул образуются большие, как, например, во время роста клетки, из хаоса возникает порядок. Даже неделящимся клеткам для выживания требуется поддержание постоянного порядка или функционирование процессов восстановления, поскольку все организованные структуры клетки подвержены нарушениям и самопроизвольным побочным реакциям. Каким же образом это укладывается в рамки термодинамики? Далее мы увидим, что ответ на этот вопрос заключается в следующем: клетка постоянно выделяет теплоту в окружающую среду и, следовательно, с точки зрения законов термодинамики не является изолированной системой.

2.2.1. Упорядоченность биологических систем обусловлена выделением клеткой тепловой энергии [3]

С позиций термодинамики клетку и ее ближайшее окружение можно рассматривать как закрытый ящик, который находится в однородном море вещества, представляющего собой остальную часть Вселенной (рис. 2-11). Для того чтобы расти и обеспечивать свое существование, клетка должна постоянно поддерживать порядок внутри ящика. Однако, как уже было сказано, второй закон термодинамики гласит, что упорядоченность замкнутой системы (в данном случае ящик плюс «море») должна всегда уменьшаться. Из этого следует, что возрастание упорядоченности внутри ящика всегда должно с избытком компенсироваться даже более интенсивным повышением неупорядочен-

ности остальной части Вселенной. Хотя никакого обмена молекулами между ящиком и «морем» не происходит, они могут обмениваться теплотой – в этом количественно проявляется взаимосвязь между теплотой и порядком. Тепло представляет собой энергию хаотического движения молекул, т.е. энергию в наиболее неупорядоченной ее форме. Клетка, выделяя теплоту в «море», увеличивает интенсивность движения молекул, вследствие чего возрастает хаотичность, или неупорядоченность, этого движения.

Существование количественного соотношения между теплотой и упорядоченностью, открытое в конце XIX столетия, в принципе дает нам возможность рассчитать, какое количество теплоты (в килокалориях) должна выделить клетка, чтобы компенсировать определенную степень упорядоченности внутри нее (такой, как сборка белков из аминокислот), причем суммарный процесс должен увеличивать степень неупорядоченности всей Вселенной. Такое соотношение можно получить, рассмотрев характер изменения движения молекул в результате перехода определенного количества тепловой энергии от горячего тела к холодному. Хотя здесь нет необходимости в представлении детального расчета подобного процесса, следует все же отметить, что химические реакции, которые протекают с выделением тепла, должны быть тесно связаны на молекулярном уровне именно с процессами, приводящими к упорядочению. Такие связанные между собой реакции называются *сопряженными*; мы их рассмотрим позднее.

На рис. 2-11 очень схематично показано, каким образом указанные сопряженные реакции выделяют тепловую энергию, приводящую к разупорядочению внеклеточной среды, вследствие чего компенсируется возрастание упорядоченности внутри клетки, происшедшее в результате этих реакций.

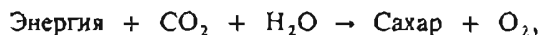
Энергия не может возникать или исчезать в ходе химических реакций, поэтому постоянные потери тепла клеткой, приводящие к биологическому упорядочению, требуют непрерывного ввода энергии в клетку. Энергия может существовать и в форме, отличной от тепловой. Для растений первичным источником энергии служит электромагнитное излучение Солнца, животные же используют энергию ковалентных связей органических молекул, поступающих в организм с пищей. Однако, поскольку эти органические питательные вещества сами производятся фотосинтезирующими организмами, например зелеными растениями, первичным источником энергии для организмов обоих типов служит Солнце.

2.2.2. Фотосинтезирующие организмы используют солнечный свет для синтеза органических соединений [4]

Утилизация солнечной энергии живой природой (биосферой) происходит в результате фотосинтеза, осуществляемого фотосинтезирующими организмами – растениями и бактериями. В процессе фотосинтеза электромагнитная энергия преобразуется в энергию химических связей. Но в то же время часть энергии солнечного света переходит в тепло, и как раз выделение этого тепла в окружающее пространство увеличивает неупорядоченность Вселенной, что и является движущей силой процесса фотосинтеза.

Реакции фотосинтеза подробно описываются в гл. 9; вообще говоря, они осуществляются в ходе двух различных фаз. В первой фазе (*световые реакции*) под действием квантов света молекула пигмента переходит в возбужденное состояние; затем, возвращаясь в более низкое энергетическое состояние, молекула излучает энергию, необходимую для синтеза таких молекул, как АТФ и NADPH. Во второй фазе (*темновые реакции*) АТФ и NADPH используются для поддержания ряда реакций фиксации углерода, в которых из углекислого газа воздуха образуются молекулы сахаров (рис. 2-12).

Суммарный результат фотосинтеза (если речь идет о зеленых растениях) может быть записан в виде уравнения



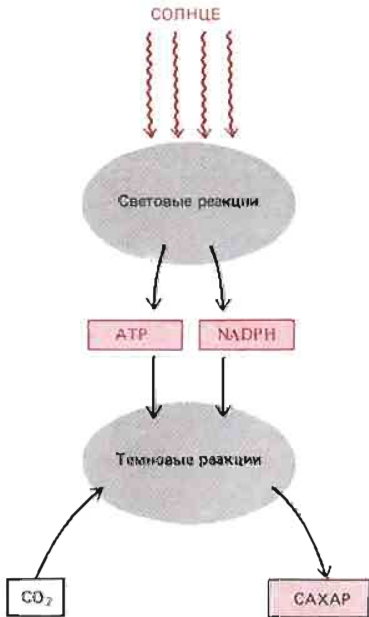


Рис. 2-12. Две стадии фотосинтеза у зеленых растений.

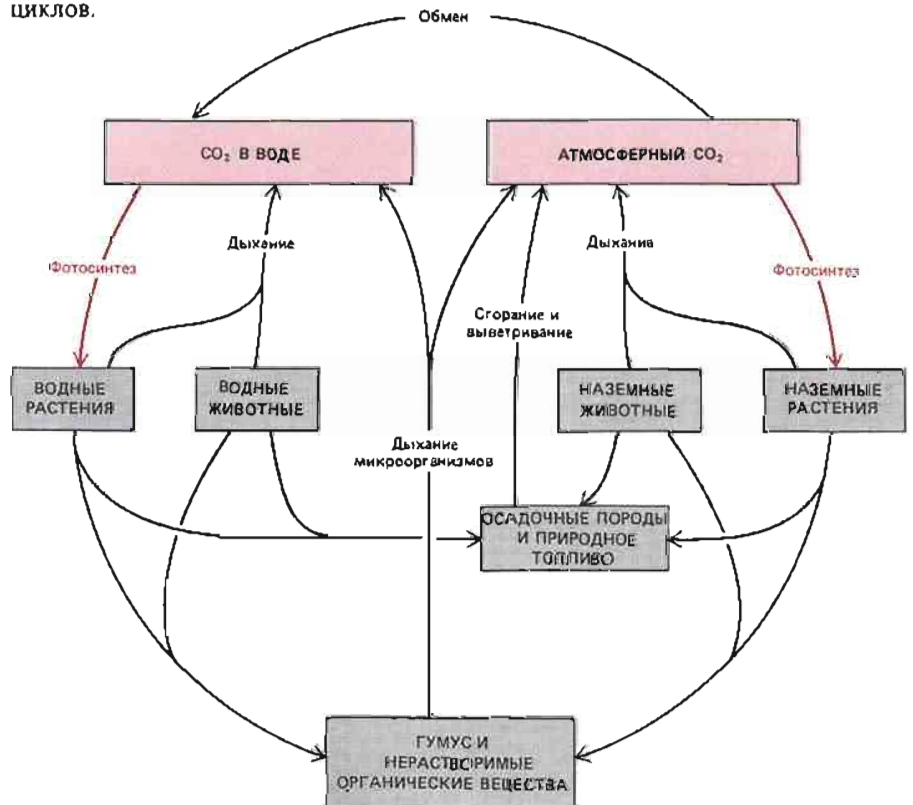
т.е. обратного уравнению окислительного распада сахара. За этим простым выражением скрывается сложная природа темновых реакций, включающих множество взаимосвязанных парциальных реакций. Более того, тогда как первоначальная фиксация CO_2 приводит к образованию сахаров, то последующие метаболические реакции быстро преобразуют эти сахара в другие малые или большие молекулы, необходимые растительной клетке.

2.2.3. Химическая энергия переходит от растений к животным

Животные и другие нефотосинтезирующие организмы не способны непосредственно утилизировать энергию солнечного света, поэтому они вынуждены существовать за счет энергии, получаемой «из вторых рук», т.е. поедая растения. Органические молекулы, синтезируемые растительными клетками, обеспечивают питающиеся этими растениями организмы как строительными белками, так и запасом «топлива». Подобным целям могут служить растительные молекулы всех типов – сахара, белки, полисахариды, липиды и многие другие.

Не все взаимодействия между растениями и животными столь одностороннены. Растения, животные и микроорганизмы так долго сосуществовали на нашей планете, что многие стали для других организмов необходимым элементом окружающей среды. Кислород, выделяющийся при фотосинтезе, потребляется почти всеми организмами для окисления органических молекул; часть молекул CO_2 , которая сегодня фиксируется с образованием более крупных органических молекул в процессе фотосинтеза, осуществляемого в зеленых листьях, еще вчера была выделена в атмосферу при дыхании животного. Таким образом, утилизация углерода – циклический процесс, который охватывает всю биосферу и устанавливает связи между отдельными организмами (рис. 2-13). Подобно этому, атомы азота, фосфора и серы могут переходить от одной биологической молекулы к другой в серии аналогичных циклов.

Рис. 2-13. Круговорот углерода. Отдельные атомы углерода включаются в органические молекулы живой природы в результате фотосинтетической активности растений, бактерий и морских водорослей. Эти атомы поступают в клетки животных и микроорганизмов, а также в органические соединения почвы и океанов по циклическим путям. Когда органические молекулы окисляются клетками или сжигаются людьми в качестве природного топлива, CO_2 возвращается в атмосферу.



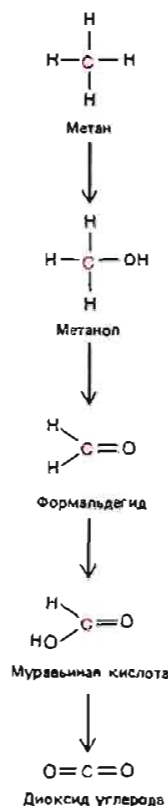


Рис. 2-14. Атом углерода метана включается в диоксид углерода путем последовательного удаления атомов водорода. На каждом этапе электроны все дальше смещаются от атома углерода, по мере того как он переходит в более стабильное энергетическое состояние (иначе говоря, становится все более окисленным).

2.2.4. Клетка получает энергию в результате окисления биологических молекул

Атомы углерода и водорода в клетке находятся далеко не в самом стабильном состоянии. Поскольку земная атмосфера содержит огромное количество кислорода, энергетически наиболее стабильной формой существования углерода является CO_2 , а водорода — H_2O . Следовательно, клетка может получать энергию из молекул белков или глюкозы, создавая подходящие условия для того, чтобы атомы углерода и водорода этих молекул соединялись с кислородом, образуя соответственно CO_2 и H_2O . Однако окисление молекул в клетке осуществляется не в одну стадию, как, например, при горении. Молекулам приходится пройти через большое число реакций, из которых лишь очень немногие включают в себя непосредственное присоединение кислорода. Для того чтобы мы могли рассмотреть все эти реакции и понять, какие движущие силы за ними скрываются, нам необходимо создать себе ясное представление о процессе окисления.

Окисление в вышеописанном значении этого слова не ограничивается лишь присоединением атома кислорода; этот термин носит скорее более общий характер и применим к любой реакции, в которой электроны переходят от одного атома к другому. В таком смысле **окислением** можно назвать удаление электронов, а **восстановлением** (процессом, обратным окислению) — присоединение электронов. Так, Fe^{2+} окисляется, если теряет электрон, и превращается в Fe^{3+} , а атом хлора восстанавливается, если он получает электрон, и переходит в Cl^- . Та же терминология используется, когда речь идет лишь о частичном смещении электронов в случае атомов, связанных ковалентной связью. Например, когда атом углерода ковалентно связывает такой электроотрицательный атом, как кислород, хлор или сера, он как бы в определенной степени уступает им свой электрон, приобретает частичный положительный заряд, и может считаться окисленным. И наоборот, в связи $\text{C}-\text{H}$ электроны в большей степени смещены к атому углерода, поэтому можно считать, что он восстановлен (рис. 2-14).

При «сгорании» питательных веществ в клетке атомы C и H органических молекул (находящиеся в сравнительно богатом электронами, или восстановленном, состоянии) превращаются в CO_2 и H_2O , в которых они отдают свои электроны кислороду и поэтому сильно окислены. Перенос электронов от углерода и водорода к кислороду позволяет всем этим атомам достичь наиболее стабильного состояния и является поэтому энергетически выгодным. Этот переход осуществляется постепенно в сериях промежуточных реакций, которые в большинстве случаев сводятся к переносу фрагментов, содержащих атом водорода, с одной молекулы на другую.

2.2.5. Распад органических молекул осуществляется в результате последовательных ферментативных реакций

Хотя энергетически наиболее выгодной формой существования углерода является CO_2 , а водорода — H_2O , живой организм не обращается в дым по той же причине, по которой книга в вашей руке не вспыхивает пламенем: и организм, и книга суть метастабильные энергетические состояния вещества (рис. 2-15), которое нуждается в *энергии активации* для перехода в более стабильную форму. В случае с книгой энергия активации может быть получена от зажженной спички. Для живой клетки тот же конечный результат может достигаться не столь радикальным и разрушительным способом. Высокоспецифичные белковые катализаторы, или **ферменты**, соединяются с биологическими молекулами таким образом, что снижают энергию активации тех конкретных реакций, в которые могут вступить данные молекулы. Избирательно понижая энергию активации той или иной последовательности реакций (метаболического пути), ферменты определяют, какая из нескольких альтерна-

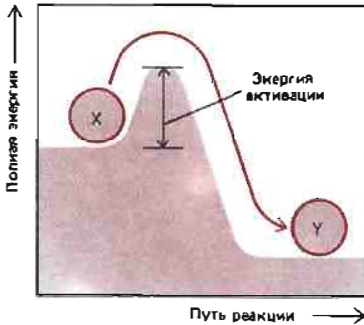


Рис. 2-15. Схема, поясняющая принцип действия энергии активации. Соединение X может достигнуть более низкого, энергетически выгодного состояния путем превращения в соединение Y. Однако такого перехода не произойдет до тех пор, пока X не получит энергии активации, достаточной для того, чтобы это соединение могло вступить в реакцию.

Рис. 2-16. «Модель качающегося ящика», иллюстрирующая, каким образом ферменты направляют молекулы в нужные метаболические пути. В этой модели раскрашенный мяч представляет собой возможный субстрат ферментативной реакции; мяч скачет вверх и вниз благодаря непрерывной бомбардировке сталкивающимися молекулами воды. Четыре стенки ящика изображают энергию активации (энергетический барьер) для четырех различных, энергетически выгодных химических реакций. В ящике слева ни одна из этих реакций не осуществляется, так как энергии, получаемой мячом при столкновениях, недостаточно для преодоления какого-либо из энергетических барьеров. В правом ящике ферментативный катализ понижает энергию активации лишь для реакции 1, поэтому осуществление данной реакции возможно при имеющемся количестве энергии.

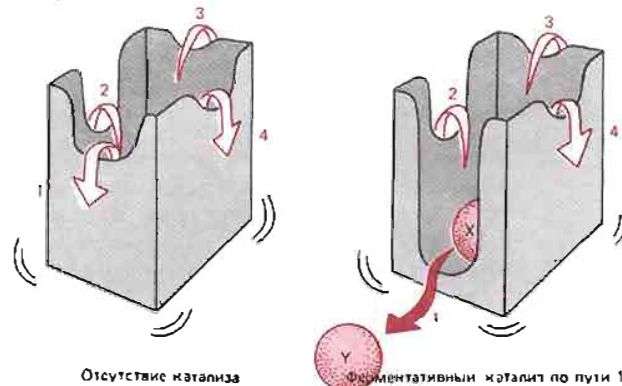
тивных возможностей будет реализована (рис. 2-16). Именно таким путем различные молекулы клетки направляются по специфическим последовательностям реакций.

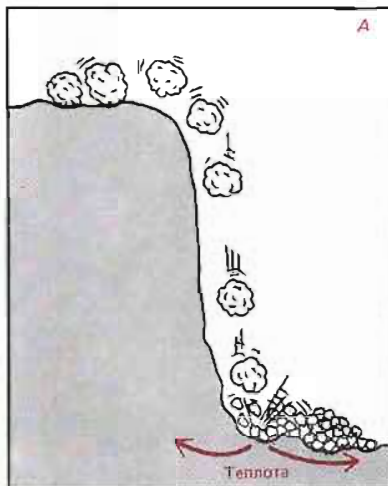
Прощетание различных форм жизни в значительной степени можно приписать способности клеток к образованию большого числа специфических ферментов. Каждый фермент представляет собой белок с уникальной трехмерной структурой (конформацией), формирующей *активный центр*, в котором определенный набор молекул (субстратов) связывается с поверхностью фермента. Связывание субстрата с ферментом приводит к тому, что скорость одной из многих химических реакций, которым может подвергнуться субстрат, возрастает в 1 млн. и более раз. Ни один другой тип катализатора не может сравниться с ферментами по специфичности и эффективности.

2.2.6. Часть энергии, выделенной в реакциях окисления, расходуется на образование АТФ

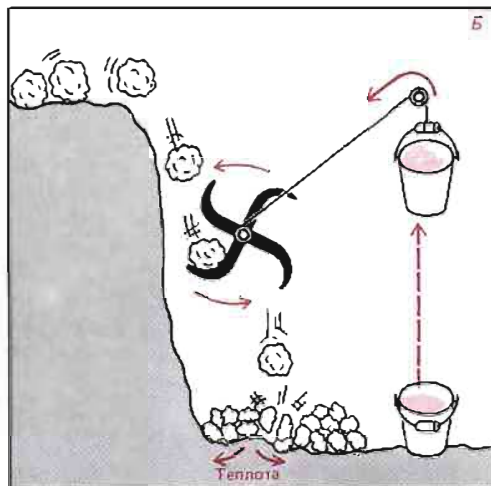
Клетки получают необходимую энергию в результате «сгорания» глюкозы только потому, что они «сжигают» ее в очень сложных и тонко контролируемых процессах. Синтетические, или *анаболические*, химические реакции, обуславливающие упорядоченность биологических систем, тесно связаны с реакциями распада (*катаболическими* реакциями), поставляющими энергию. Принципиальное различие между *сопряженной* и *несопряженной* катаболическими реакциями хорошо иллюстрируется механической аналогией. На рис. 2-17 энергетически выгодная химическая реакция показана на примере падения булыжников с утеса. Кинетическая энергия падающих булыжников, как правило, целиком преобразуется в тепло при ударе их о землю (рис. 2-17, А). Однако при продуманном подходе часть кинетической энергии можно использовать для приведения в движение лопастного колеса, поднимающего ведро с водой (рис. 2-17, Б). Как видно из этого рисунка, булыжники достигают земли, лишь проворачивая колесо. Следовательно, самопроизвольная реакция — падение булыжника — непосредственно связана с *несамопроизвольной* реакцией — подъемом ведра с водой. Поскольку часть энергии теперь расходуется на выполнение работы (Б), булыжники достигают земли с меньшей скоростью, чем в случае А, и, следовательно, меньшая часть энергии теряется в виде тепла.

Ферменты в клетке играют ту же роль, что и лопастное колесо в нашем примере, и связывают самопроизвольное окисление питательных веществ с реакциями, в которых образуется нуклеотидтрифосфат АТФ. Энергию, запасенную в поднятом на некоторую высоту ведре с водой (рис. 2-17), можно небольшими порциями расходовать на приведение в движение самых разнообразных гидравлических машин (рис. 2-17, В); точно так же и энергия, аккумулированная в АТФ — этой универсальной энергетической валюте, — может использоваться для обеспечения множества различных химических реакций, необходимых клетке.

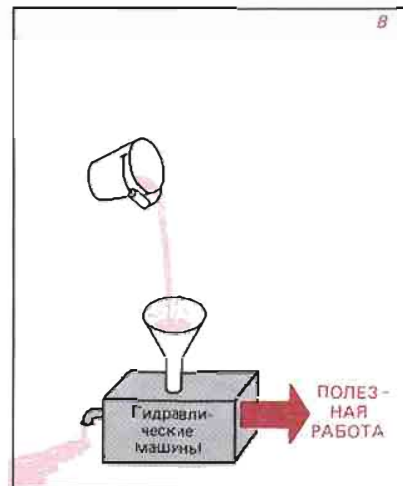




Кинетическая энергия преобразуется только в тепловую



Часть кинетической энергии используется для поднятия ведра с водой, и соответственно меньшее количество энергии выделяется в виде тепла



Потенциальная энергия поднятого ведра с водой может быть использована для приведения в движение гидравлических машин

Рис. 2-17. Схематическое изображение механической модели, иллюстрирующей принцип сопряженных химических реакций.

А. Спонтанная реакция может служить аналогией непосредственного окисления глюкозы до CO_2 и H_2O , сопровождающегося образованием только тепла. **Б.** Та же реакция сопряжена со второй реакцией; эта вторая реакция может служить аналогией синтеза АТФ. Большое многообразие форм энергии, получаемой в случае **Б**, можно использовать для инициирования других клеточных процессов, аналогично тому, как это показано на рис. **В**.

2.2.7. Гидролиз АТФ обеспечивает упорядоченность в клетке

АТФ служит переносчиком химической энергии, поскольку это соединение относительно нестабильно. В условиях, существующих в норме в цитоплазме, гидролиз АТФ с освобождением неорганического фосфата (P_i) осуществляется очень легко и сопровождается выделением большого количества биологически полезной энергии (разд. 2.4.1). Поэтому связи, подвергающиеся в таких реакциях гидролиза разрыву, иногда называют *высокоэнергетическими связями*, хотя они практически ничем не отличаются от обычных ковалентных связей. Прочие реакции могут протекать за счет энергии, выделяющейся при гидролизе АТФ, при условии что они так или иначе сопряжены с этим процессом.

Среди многих сотен реакций, запускаемых гидролизом АТФ, следует отметить реакции синтеза биологических молекул, активный транспорт через клеточные мембраны, а также реакции, обуславливающие генерирование механических сил клеток и способность к движению. Процессы этих трех типов играют решающую роль в упорядоченности биологических систем. Макромолекулы, образующиеся в биосинтетических реакциях, переносят информацию, катализируют специфические реакции и организуются в исключительно упорядоченные структуры как в клетке, так и во внеклеточном пространстве. Связанные с мембраной насосы поддерживают специфический состав внутриклеточной среды и способствуют передаче внутриклеточных и межклеточных сигналов. Наконец, наличие механических сил и способности к движению делает возможным самоорганизацию цитоплазматического содержимого клетки, а также позволяет самим клеткам перемещаться и группироваться с образованием специализированных тканей.

Заключение

Живые клетки в высшей степени упорядочены, причем поддержание упорядоченности необходимо им для роста и выживания. С термодинамической точки зрения это возможно лишь благодаря постоянному вводу энергии, часть которой выделяется клетками в окружающую среду в виде тепла. Вообще говоря, первичным источником энергии является электромагнитное излучение Солнца; в фотосинтезирующих организмах, таких, как зеленые растения, под его воздействием образуются органические молекулы. Животные получают энергию, захватывая эти органические молекулы и окисляя их в ряде ферментативных реакций, сопряженных с образованием АТФ. АТФ представляет со-

бой универсальную энергетическую валюту для всех клеток, и гидролиз этого соединения, сопряженный с другими реакциями, запускает множество энергетически невыгодных процессов, обеспечивая таким образом создание упорядоченности.

2.3. Питательные вещества и источники энергии клетки [2, 5]

2.3.1. Молекулы питательных веществ, расщепляясь в три этапа, образуют АТФ

Белки, липиды и полисахариды, составляющие большую часть нашей пищи, должны расщепиться на меньшие по размеру молекулы, прежде чем наши клетки смогут их использовать. Ферментативный распад, или катаболизм,

Рис. 2-18. Упрощенная схема трех стадий катаболизма, ведущих от молекул пищевых веществ к продуктам распада. В этой серии реакций образуется АТФ, использующийся затем в биосинтетических реакциях и других энергозависимых процессах.

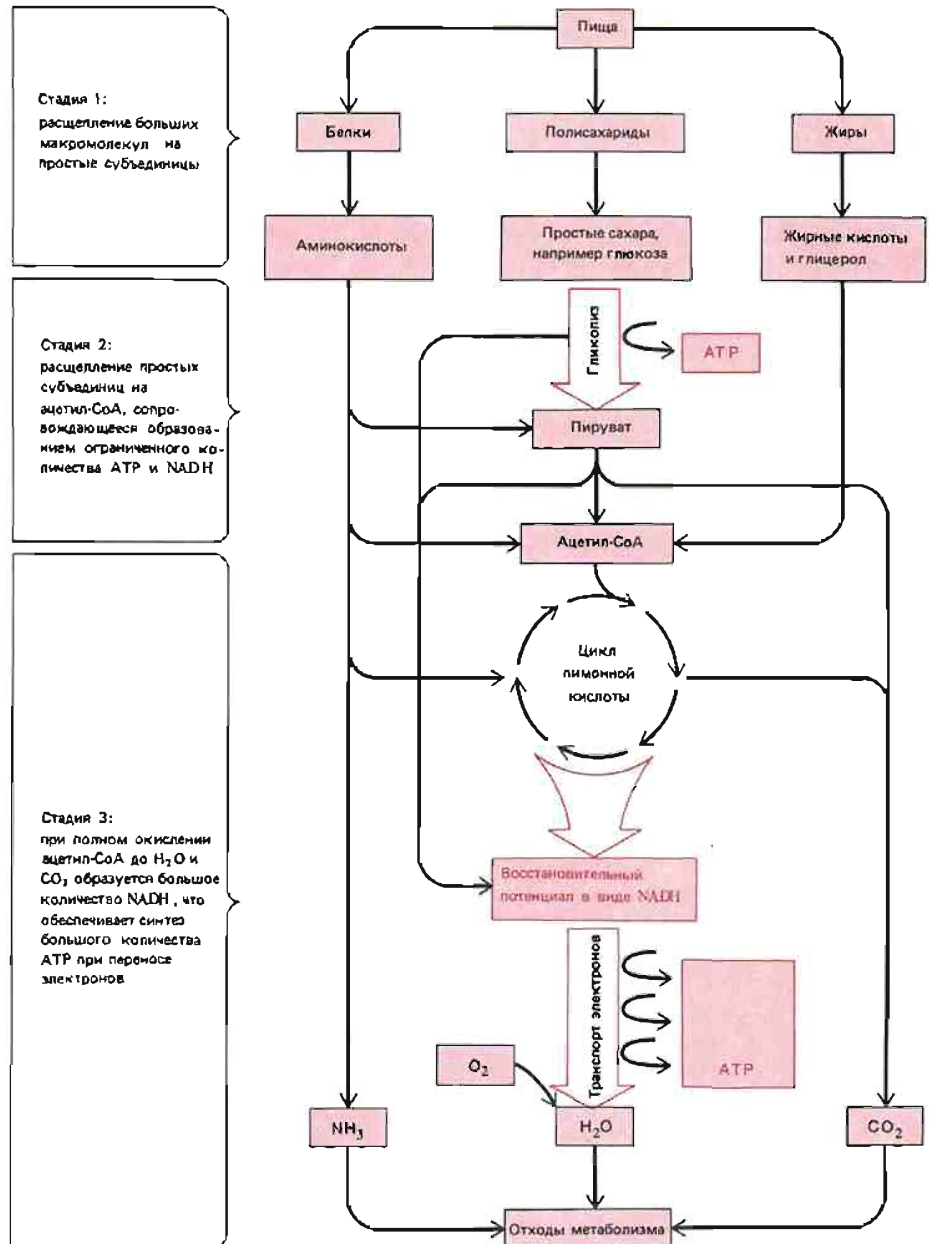
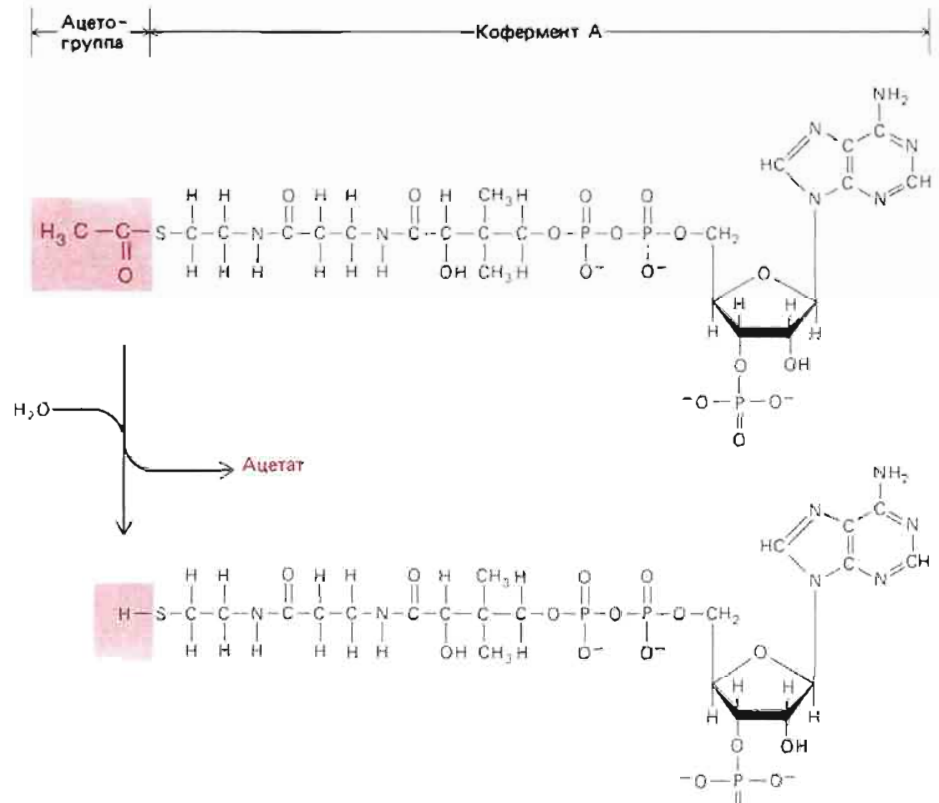


Рис. 2-19. Строение ключевого промежуточного продукта метаболизма – кофермента А (ацетил-СоА). Ацетильные группы, образующиеся на стадии 2 катаболизма (см. рис. 2-18), ковалентно связаны с коферментом А (СоА).



этих молекул можно подразделить на три стадии (рис. 2-18). Сначала мы в общих чертах охарактеризуем все эти стадии, а затем обсудим две из них более подробно.

На стадии 1 крупные молекулы полимеров распадаются на мономерные субъединицы: белки на аминокислоты, полисахариды на сахара, а жиры на жирные кислоты и глицерол. Этот предварительный процесс, называемый пищеварением, осуществляется главным образом вне клеток под действием ферментов, секретируемых в полость пищеварительного тракта. На стадии 2 образовавшиеся небольшие молекулы поступают в клетки и подвергаются дальнейшему расщеплению в цитоплазме. Большая часть углеродных и водородных атомов сахаров превращается в *пируват*, который, проникнув в митохондрии, образует там ацетильную группу *ацетилкофермента А* (*ацетил-СоА*) (рис. 2-19). Ацетил-СоА, как и АТФ, является химически активным соединением, при гидролизе которого выделяется значительная энергия. Большое количество ацетил-СоА образуется также при окислении жирных кислот.

Последняя стадия (стадия 3) катаболизма заключается в полном расщеплении ацетильной группы ацетил-СоА до CO₂ и H₂O. Именно на этой заключительной стадии образуется большая часть АТФ. В серии сопряженных химических реакций больше половины той энергии, которую, согласно теоретическим расчетам, можно извлечь из углеводов и жиров при окислении их до H₂O и CO₂, используется для осуществления энергетически невыгодной реакции P_i + ADP → АТФ. Поскольку оставшая часть энергии, высвобождающейся при окислении, выделяется клеткой в виде тепла, результатом образования АТФ является общее возрастание неупорядоченности Вселенной, что полностью соответствует второму закону термодинамики.

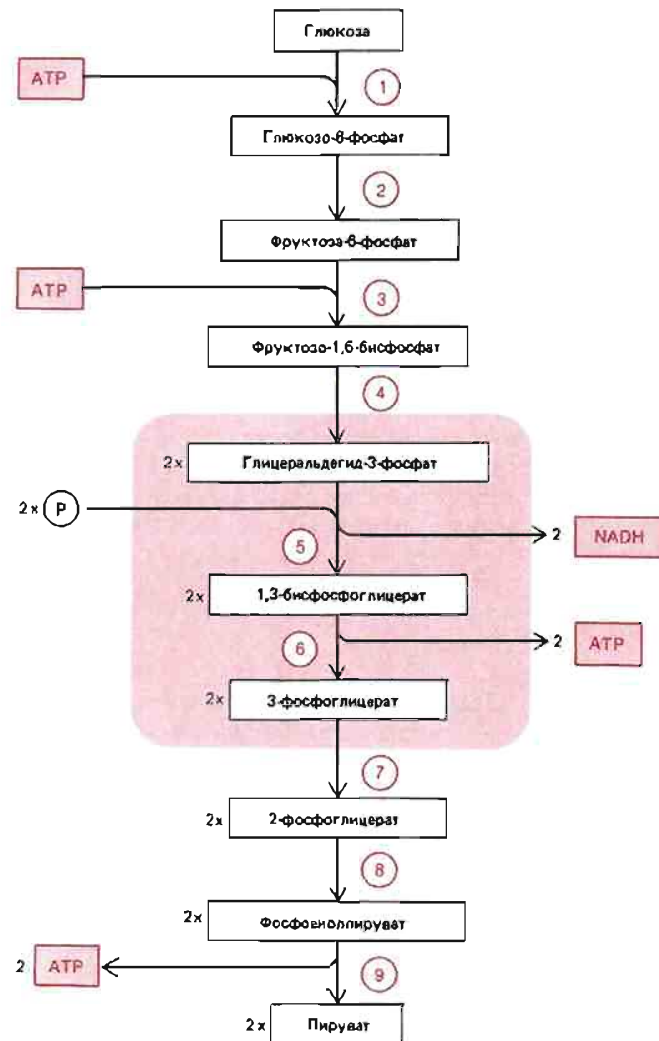
Благодаря образованию АТФ энергия, первоначально извлеченная путем окисления из углеводов и жиров, преобразуется в более удобную концентри-

рованную форму, из которой она может легко высвобождаться. В растворе, находящемся во внутриклеточном пространстве типичной клетки, имеется примерно 1 млрд. молекул АТФ, гидролиз которых до АДФ и фосфата обеспечивает необходимой энергией множество энергетически невыгодных реакций.

2.3.2. При гликолизе АТФ может образовываться даже в отсутствие кислорода

Самым важным этапом стадии 2 катаболизма является **гликолиз** – последовательность реакций, приводящих к расщеплению глюкозы. При гликолизе молекула глюкозы, содержащая шесть атомов углерода, превращается в две молекулы пирувата, содержащие по три атома углерода каждая. Для такого превращения требуется девять последовательных ферментативных реакций, в которых происходит образование ряда промежуточных фосфатсодержащих соединений (рис. 2-20). Логически рассуждая, последовательность реакций гликолиза можно разделить на три этапа: 1) в реакциях 1–4 глюкоза превращается в трехуглеродный альдегид *глицеральдегид-3-фосфат* (при этом превращении потребляется энергия в форме АТФ); 2) в реакциях 5 и 6 альдегидная группа глицеральдегид-3-фосфата окисляется до карбоксильной, и вы-

Рис. 2-20. Промежуточные продукты гликолиза. Каждая из пронумерованных реакций катализируется особым ферментом. На этапе 4 шестиуглеродный сахар расщепляется, давая два трехуглеродных сахара, так что после этой реакции число молекул на каждом этапе удваивается. Реакции 5 и 6 ответственны за суммарный синтез АТФ и NADH (см. текст).



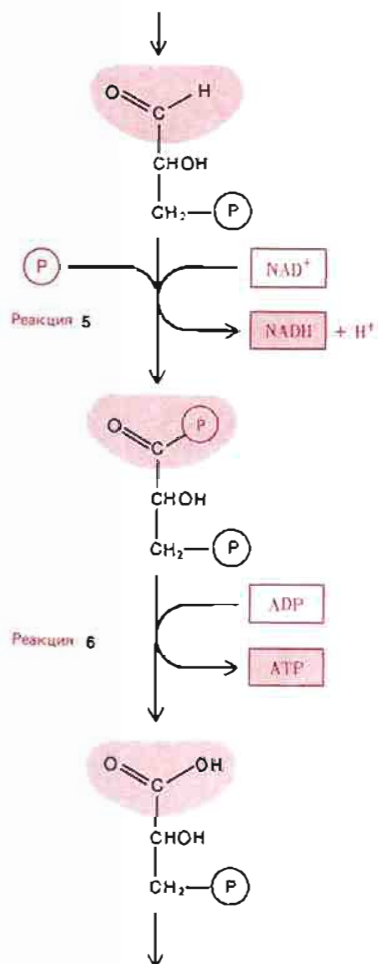


Рис. 2-21. Реакция 5 и 6 гликолиза. Окисление альдегида до карбоновой кислоты сопровождается образованием ATP и NADH (см. рис. 2-20).

деляющаяся при этом энергия расходуется на образование новой высокоэнергетической фосфатной связи ATP; 3) в реакциях 7, 8 и 9 затраты на ATP на этапе 1 гликолиза компенсируются синтезом такого же числа молекул ATP.

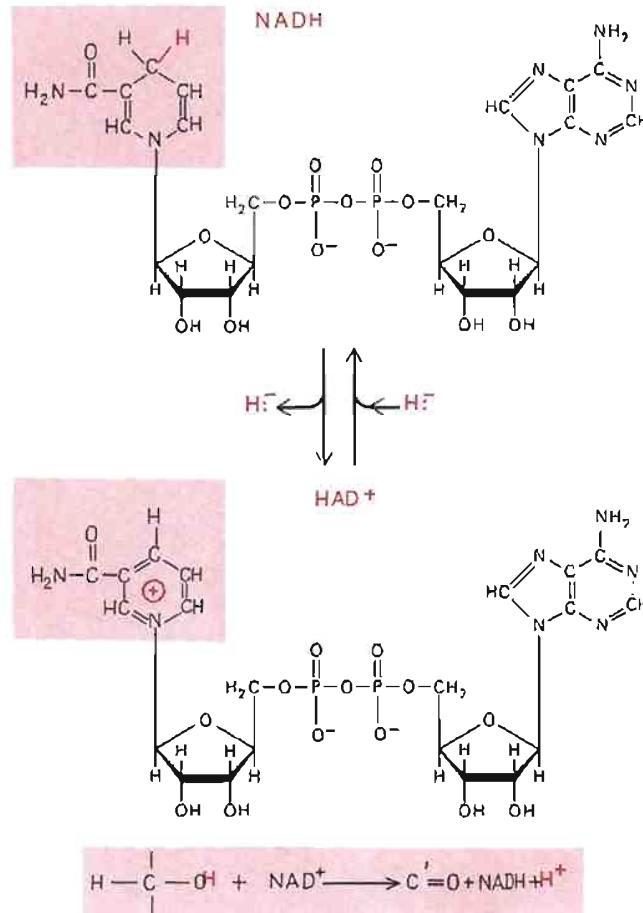
Суммарный выход энергии при гликолизе сводится к синтезу двух молекул ATP (на одну молекулу глюкозы), которые образовались в реакциях 5 и 6. Таким образом, данные реакции имеют решающее значение для гликолиза. Эти две реакции – единственные во всем процессе, в которых из неорганического фосфата формируется высокоэнергетическая фосфатная связь, – иллюстрируют, каким образом может осуществляться взаимосвязь внутрискелетных реакций для реализации выделяющейся при окислении энергии (рис. 2-21). В реакции 5 гликолиза водород (в виде гидрид-иона: протона и двух электронов) отщепляется от альдегидной группы глицеральдегид-3-фосфата и переносится к молекуле – переносчику NAD⁺ (рис. 2-22). Одновременно фосфат-ион из раствора образует лабильную химическую связь с новообразованной карбоксильной группой (рис. 2-21). В реакции 6 гликолиза реакционноспособная фосфатная группа переносится на ADP с образованием ATP и освобождением свободной гидроксильной группы. Следовательно, суммарным результатом этих двух реакций является окисление сахарного альдегида в фосfogлицериновую кислоту, перенос неорганического фосфата на ADP с образованием высокоэнергетической связи ATP и восстановление NAD⁺ до NADH. Возможно, что в процессе эволюции эта изысканная пара сопряженных реакций возникла на самых ранних этапах метаболизма. Кроме того, имея первостепенное значение для метаболизма глюкозы, эти реакции в процессе фотосинтеза протекают в противоположном направлении за счет NADPH и ATP, образующихся в реакциях, активируемых светом. В связи с этим они играют центральную роль в фотосинтетическом процессе фиксации углерода (т. 3, разд. 9.3.4).

Для большинства клеток животных гликолиз служит лишь прелюдией к стадии 3 катаболизма, так как образующаяся при гликолизе молочная кислота быстро поступает в митохондрии, где полностью окисляется до CO₂ и H₂O. Тем не менее в случае анаэробных организмов (т.е. таких, которые не используют молекулярного кислорода) и тканей (например, скелетных мышц), способных работать в анаэробных условиях, гликолиз может стать основным источником клеточного ATP. В этих случаях вместо того, чтобы подвергнуться расщеплению в митохондриях, молекулы пирувата остаются в цитозоле и в зависимости от вида организма могут превращаться либо в этанол плюс CO₂ (в дрожжах), либо в лактат (в мышцах), которые затем выводятся из клеток. Дальнейшее превращение пирувата в этих энергодающих реакциях, называемых брожением, требуется для того, чтобы полностью использовать восстановительный потенциал, полученный в реакции 5 гликолиза, и таким путем регенерировать NAD⁺, необходимый для дальнейшего осуществления гликолиза (т. 3, разд. 9.4.1).

2.3.3. Окислительный катаболизм поставяет значительно большее количество биологически полезной энергии

Анаэробное образование ATP из глюкозы в реакциях гликолиза относительно неэффективно. Конечные продукты анаэробного гликолиза все еще несут в себе очень большое количество химической энергии, которая может выделяться при последующем окислении. Развитие окислительного катаболизма (клеточное дыхание) в аэробных микроорганизмах и митохондриях эукариотических клеток стало возможным лишь после того, как в результате фотосинтеза, осуществляемого цианобактериями, в атмосфере Земли было накоплено достаточное количество молекулярного кислорода. Добавление к катаболическому процессу стадии, требующей присутствия кислорода (стадия 3 на рис. 2-18), обеспечивает клетки значительно более мощным и эффек-

Рис. 2-22. Строение NADH и NAD⁺ – наиболее важных переносчиков водорода в катаболических реакциях. Часть молекулы NAD⁺, называемая никотинамидным кольцом (в цветном прямоугольнике), может присоединять атом водорода с лишним электроном (гидрид-ион, H⁻), восстанавливаясь до NADH. В такой восстановленной форме никотинамидное кольцо менее стабильно, поскольку в этом случае отсутствует стабилизирующее влияние резонанса. В результате присоединившийся гидрид-ион переносится на другие молекулы. При биологическом окислении молекулы субстрата, например спирта (см. нижнюю часть рисунка), субстрат теряет два атома водорода. Один из них в виде гидрид-иона присоединяется к NAD⁺, образуя NADH, тогда как другой выделяется в раствор в виде протона H⁺ (см. также т. 3, рис. 9-16).

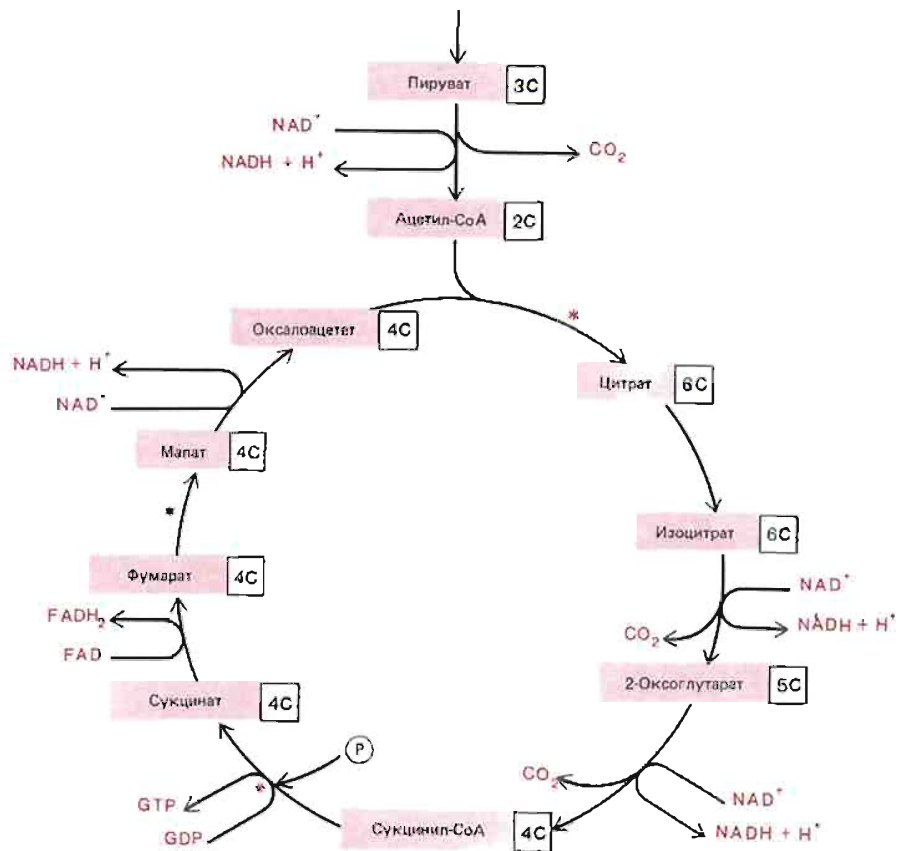


тивным методом извлечения энергии из молекул питательных веществ. Эта стадия (стадия 3) начинается с цикла лимонной кислоты (его называют также циклом трикарбоновых кислот или циклом Кребса) и завершается окислительным фосфорилированием; оба процесса имеют место в аэробных бактериях и митохондриях эукариотических клеток.

2.3.4. Центральным процессом метаболизма является цикл лимонной кислоты [6]

Главная функция цикла лимонной кислоты – окисление ацетогруппы, включающейся в этот цикл в форме молекул ацетил-СоА. Процесс этот носит циклический характер, поскольку ацетогруппа окисляется не сразу, а лишь после того, как она ковалентно присоединится к более крупной молекуле – оксалоацетату, которая регенерируется после каждого оборота цикла. Как показано на рис. 2-23, цикл начинается с реакции ацетил-СоА с оксалоацетатом, приводящей к образованию молекулы трикарбоновой кислоты, называемой лимонной кислотой (или цитратом). Затем следует серия реакций, в которых два из шести атомов углерода цитрата окисляются до CO₂, образуя молекулу оксалоацетата – исходного продукта для нового цикла. (Поскольку два новых атома углерода, присоединяемых в каждом цикле, входят не в ту часть молекулы цитрата, которая окисляется в данном цикле до CO₂, должно пройти несколько циклов, прежде чем подойдет их очередь окислиться.) Молекулы CO₂, образующиеся в подобных реакциях, затем диффундируют из митохондрий и покидают клетку.

Рис. 2-23. Цикл лимонной кислоты. В митохондриях и клетках аэробных бактерий ацетогруппы, образованные из пирувата, подвергаются дальнейшему окислению. Атом углерода ацетильной группы превращается в CO_2 , водородные же атомы переносятся к молекулам-переносчикам NAD^+ и FAD . Дополнительные атомы кислорода и водорода включаются в цикл в виде молекул воды на стадиях, отмеченных звездочками (*). Более детально цикл лимонной кислоты показан на рис. 9-12 (т. 3).



Энергия, высвобождающаяся при окислении связей C—H и C—C цитрата, потребляется несколькими различными способами в цикле лимонной кислоты. В одной из реакций цикла (сукцинил- $\text{CoA} \rightarrow$ сукцинат) высокоэнергетическая фосфатная связь образуется под действием механизма, сходного с тем, который мы уже рассмотрели в случае гликолиза. (Хотя в реакции цикла образуется не ATP , а GTP , все нуклеозидтрифосфаты равноценны в энергетическом отношении благодаря реакциям обмена типа $\text{ADP} + \text{GTP} \rightarrow \text{ATP} + \text{GDP}$.) Оставшаяся часть энергии, полученной при окислении, расходуется на перевод молекул-переносчиков водорода в восстановленную форму; в каждом обороте цикла три молекулы NAD^+ превращаются в NADH , а одна молекула флавинадениннуклеотида (FAD) — в FADH_2 .

Дополнительные атомы кислорода, необходимые для образования CO_2 из включающейся в цикл лимонной кислоты ацетильной группы, поставляются не молекулярным кислородом, а молекулой воды. В каждом цикле расщепляются три молекулы воды, атомы кислорода которых используются для образования CO_2 . Некоторые из атомов водорода молекул воды связываются с молекулами субстрата, переходя в более высокое энергетическое состояние, и затем переносятся (вместе с атомами водорода ацетогруппы) к таким молекулам, как NADH . В другом месте митохондрии энергия, переносимая этими активированными атомами водорода, используется в реакциях, приводящих к образованию ATP ; для осуществления последних (называемых реакциями окислительного фосфорилирования; они будут подробно рассмотрены ниже) необходим молекулярный кислород атмосферы.

Таким образом, митохондрия служит одновременно и силовой станцией клетки, и местом, где происходит окончательное окисление атомов углерода

и водорода молекул питательных веществ. Митохондрия – это центр, к которому ведут все катаболические пути независимо от того, что служит для них первоначальным субстратом – сахара, жиры или белки. Объясняется это тем, что не только пируват, но и жирные кислоты, равно как и некоторые аминокислоты, тоже поступают из цитозоля в митохондрии, где они превращаются в ацетил-СоА или в один из промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты.

Помимо образования АТФ, необходимого для процессов биосинтеза, митохондрия служит еще и отправной точкой биосинтетических реакций, поскольку в ней образуются такие жизненно важные углеродсодержащие промежуточные продукты, как *оксалоацетат* и *2-оксoglутарат*. Эти соединения переносятся из митохондрии обратно в цитозоль, где они используются в качестве предшественников таких важнейших молекул клетки, как, например, аминокислоты.

2.3.5. Перенос электронов к кислороду приводит к образованию АТФ [7]

Окислительное фосфорилирование является последней стадией катаболизма; в ходе этого процесса высвобождается большая часть метаболической энергии. При окислительном фосфорилировании молекулы NADH и FADH₂ переносят электроны, полученные ими от кислорода молекул питательных веществ, к молекулярному кислороду O₂. В этой реакции, которая формально равноценна сгоранию водорода в воздухе с образованием воды, высвобождается значительное количество химической энергии. Часть этой энергии используется для образования АТФ; остальная энергия выделяется в виде тепла.

Хотя при окислении NADH и FADH₂ в конечном счете происходит перенос водорода к кислороду, водород транспортируется не в атомарном состоянии. Объектом переноса в данном случае служат *электроны* атома водорода. Это связано с тем, что атом водорода может легко диссоциировать на свои составные части – электрон и протон (H⁺). Затем электрон может отдельно переноситься к молекуле, акцептирующей лишь электроны, а протоны при этом остаются в водном растворе (рис. 2-24). По той же причине в случае, когда к молекуле с сильным сродством к водороду присоединяется лишь электрон, автоматически образуется атом водорода, так как из раствора сразу же акцептируется протон. В ходе окислительного фосфорилирования электроны от NADH и FADH₂ переносятся по цепи молекул-переносчиков, но при этом форма, в которой они транспортируются (молекула водорода или электрон), зависит от природы переносчика.

Эта последовательность реакций переноса электронов по электронтранспортной цепи локализована во внутренней митохондриальной мембране, в которую встроены все молекулы переносчиков. Перенос электронов сопровождается уменьшением их энергии на каждой ступени вплоть до конечной точки процесса, где электроны переносятся на молекулы кислорода, который диффундирует во внутреннее пространство митохондрии. Поскольку молекулы кислорода обладают наибольшим сродством к электронам, связываясь с кислородом, электроны оказываются на самом нижнем энергетическом уровне. Энергия, выделяющаяся при переходе электронов на более низкие энергетические уровни, используется для перекачивания протонов из внутреннего пространства митохондрии наружу, причем механизм этого процесса до конца еще не выяснен (рис. 2-25). В результате во внутренней митохондриальной мембране создается трансмембранный *электрохимический градиент протонов*. Этот градиент в свою очередь обуславливает обратное перемещение протонов через ферментный комплекс в мембране, катализирующий присоединение фосфатной группы к ADP с образованием в митохондрии АТФ. Вновь синтезированный АТФ переносится из митохондрии в другие части



Рис. 2-24. Перенос электрона с одной молекулы на другую может быть равносителен переносу атома водорода. В данном примере молекула В восстанавливается в результате присоединения атома водорода, но если В:Н представляет собой молекулу кислоты, атом водорода легко диссоциирует, отдавая протон (или ион Н⁺) в раствор. Существенной частью восстановления является перенос электрона, который удерживается молекулой В.

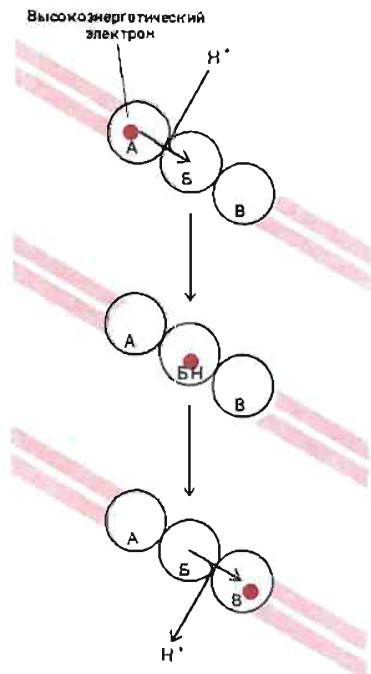


Рис. 2-25. Схематически показано возникновение трансмембранного протонного градиента в результате реакций переноса электронов. Высокоэнергетический электрон (полученный, например, при окислении метаболита) последовательно переводится переносчиками А, Б и В в более низкое энергетическое состояние. На данной схеме переносчик Б располагается в мембране таким образом, что при прохождении электрона он захватывает ион H^+ с одной стороны от мембраны и высвобождает его с другой. Возникающий в результате градиент H^+ представляет собой форму запасания энергии; эта энергия используется другими белками митохондриальной мембраны для инициирования синтеза АТФ (см. также т. 3, рис. 9-34).

НЕЗАМЕНИМЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ

Треонин
Метионин
Лизин
Валин
Лейцин
Изолейцин
Гистидин
Фенилаланин
Триптофан

Рис. 2-26. Девять незаменимых аминокислот, которые не синтезируются в клетках человека и поэтому должны поступать с пищей.

клетки, где он используется для осуществления множества метаболических реакций.

Природа электронтранспортной цепи и механизм синтеза АТФ подробно рассматривается в гл. 9.

2.3.6. Аминокислоты и нуклеотиды принимают участие в круговороте азота

В метаболических процессах, рассмотренных в предыдущих разделах, участвовали всего лишь четыре элемента – углерод, водород, кислород и фосфор. До сих пор мы не обсуждали метаболизма азота или серы. Эти два элемента, на долю которых приходится 2/3 сухой массы клеток, являются важными компонентами белков и нуклеиновых кислот – двух самых необходимых макромолекул клетки. Претерпевая различные превращения в ряде обратимых циклических процессов, атомы азота и серы переходят из одного соединения в другое и из тканей различных организмов во внешнюю среду.

Молекулярный азот в изобилии содержится в земной атмосфере, однако химически он неактивен. Лишь небольшое число видов живых существ способно непосредственно включать азот в органические молекулы с помощью процесса, называемого **азотфиксацией** или **фиксацией азота**. Фиксация азота осуществляется определенными микроорганизмами. Кроме того, она происходит и при некоторых геофизических процессах, таких, как вспышка молнии. Фиксация азота имеет критическое значение для биосферы, так как без этого процесса жизнь на нашей планете была бы невозможна. Тем не менее у современных организмов лишь небольшая часть азотистых соединений образуется в результате непосредственной фиксации азота. Основная масса органического азота циркулирует в течение некоторого времени, переходя от одного организма к другому. Таким образом, можно сказать, что азотфиксирующие реакции обеспечивают пополнение общих запасов азота. Позвоночные, например, получают практически весь азот из содержащихся в их рационе белков и нуклеиновых кислот. В организме эти макромолекулы расщепляются до аминокислот или нуклеотидов, из которых затем образуются другие молекулы.

Аминокислоты, не используемые для биосинтеза, могут окисляться, выделяя метаболическую энергию. Большинство входящих в них атомов углерода и водорода образует в итоге CO_2 и H_2O . Атомы же азота, многократно переходя из одной формы в другую, в конце концов выводятся из организма в виде мочевины. Пути превращений различных аминокислот неодинаковы, и метаболизм этих соединений включает множество разнообразных ферментативных реакций. И наоборот, наличие различных наборов реакций позволяет промежуточным продуктам цикла лимонной кислоты включаться в синтез большого числа аминокислот. Около половины из 20 аминокислот, входящих в состав белков, могут синтезироваться в организме позвоночных; остальные аминокислоты должны обязательно поступать в составе пищи. Поэтому последние называются *незаменимыми аминокислотами* (рис. 2-26). Они образуются в организме других живых существ – обычно в ходе длительных и энергоемких процессов; метаболические пути этих процессов были утеряны позвоночными в ходе эволюции.

Заключение

Считается, что клетки животных извлекают энергию из пищи в три стадии. На первой стадии белки, полисахариды и жиры расщепляются в результате внеклеточных реакций на малые молекулы. На второй стадии эти малые молекулы расщепляются в клетках с образованием ацетил-СоА, а также небольшого количества АТФ и NADH. Такие реакции – единственные, в которых энергия может выделяться и в отсутствие кислорода. На третьей стадии молекулы ацетил-СоА расщепляются в митохондриях, образуя CO_2 и атомы

водорода, которые связываются с молекулами таких переносчиков, как $NADH$. Электроны от атомов водорода переходят по сложной цепи переносчиков, что в конечном счете приводит к восстановлению молекулярного кислорода и образованию воды. Под действием энергии, высвобождающейся на разных стадиях переноса электронов, ионы водорода (H^+) транспортируются из внутреннего пространства митохондрии наружу. Возникающий в результате трансмембранный электрохимический градиент протонов во внутренней митохондриальной мембране поставляет энергию для синтеза основного количества молекул АТФ клетки.

2.4. Биосинтез и создание упорядоченности

В каждый момент времени в клетке протекают тысячи различных химических реакций. Реакции эти связаны между собой и образуют последовательности, в которых продукт одной реакции служит субстратом для следующей. В принципе можно из одного соединения получить любое другое. Однако, как и автомобильное движение по магистралям большого города, транспорт метаболитов имеет тенденцию направляться либо внутрь клетки, либо наружу. Транспорт внутрь клетки представлен катаболическими реакциями, в которых питательные вещества превращаются в сахар или сахарофосфаты, что рассматривалось выше. Транспорт наружу — это реакции биосинтеза, начинающиеся от промежуточных продуктов гликолиза и цикла лимонной кислоты (и родственных им соединений) и приводящие в результате к образованию более крупных и сложных молекул клетки.

2.4.1. Необходимая для биосинтеза энергия высвобождается при гидролизе АТФ

Энергия, высвобождаемая при гидролизе АТФ, прямо или опосредованно используется для осуществления энергетически невыгодных реакций. В этом плане не составляют исключения и все реакции биосинтеза. Выделение большого количества энергии при гидролизе обусловлено несколькими факторами, в том числе высокой стабильностью свободного фосфата (сокращенно P_i или P) и исчезновением энергетически невыгодного электростатического отталкивания двух соседних фосфатных групп молекулы АТФ (рис. 2-27). Суще-

Рис. 2-27. При гидролизе АТФ может отщепляться концевой фосфат, при этом выделяется полезная энергия, количество которой составляет в зависимости от внутриклеточных условий от 11 до 13 ккал/моль.

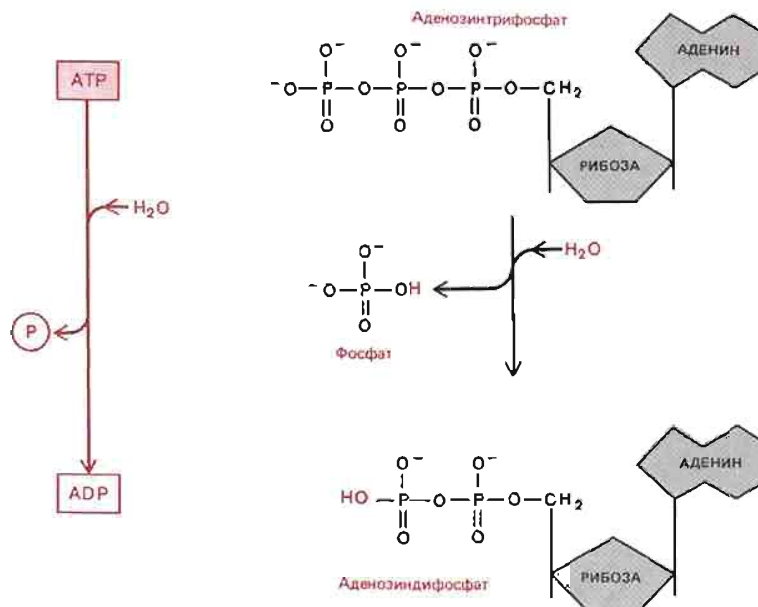
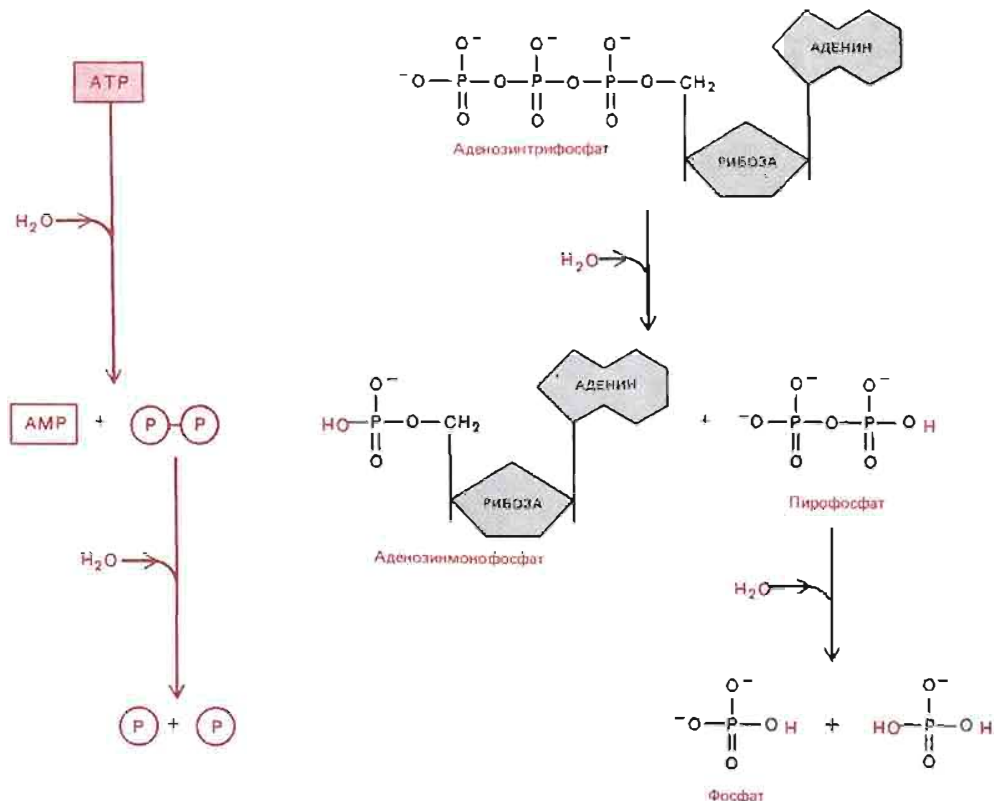


Рис. 2-28. Другой путь гидролиза АТР: сначала образуется пиррофосфат, который затем подвергается гидролизу. На этом пути выделяется почти вдвое больше энергии, чем в реакциях, рассматриваемых на рис. 2-27. На данном и предыдущем рисунках показано, что атомы H, извлеченные из воды, после гидролиза присоединяются к фосфатным группам. Однако при значениях pH, характерных для цитоплазмы, большая часть этих атомов на самом деле диссоциирует, образуя свободный ион водорода (H^+).



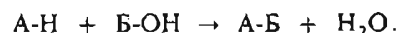
существует и другой путь гидролиза АТР, при котором расщепляются две связи $(P-P)$, что сопровождается высвобождением почти вдвое большего количества энергии: в этом случае АТР гидролизуется до АМР (аденозинмонофосфата) и $(P-P)$ (пиррофосфата) с последующим гидролизом высвобождаемого $(P-P)$ до свободного фосфата (рис. 2-28).

До сих пор мы очень свободно использовали термин «энергия»: на самом же деле фактором, от которого зависит, будет ли реакция протекать, является изменение **свободной энергии**. Как уже указывалось выше, выделение энергии в виде тепла создает неупорядоченность, обусловленную деформацией молекул и нарастанием разрушительных последствий их движения. Согласно второму закону термодинамики, спонтанно могут протекать только те реакции, в результате которых неупорядоченность во Вселенной увеличивается. Изменение свободной энергии в результате реакции, обозначаемое ΔG , по определению устанавливает меру неупорядоченности, возникающей во Вселенной при протекании этой реакции. Реакции, сопровождающиеся высвобождением большого количества энергии, отличаются большой **отрицательной** величиной ΔG и создают высокую степень неупорядоченности. Такие реакции обладают ярко выраженной тенденцией к спонтанному протеканию, хотя скорость этих реакций будет зависеть и от других факторов, в частности от наличия специфических ферментов (см. ниже). И наоборот, реакции, в которых ΔG имеет положительное значение, повышают упорядоченность Вселенной и не могут протекать самопроизвольно. Такие энергетически невыгодные реакции происходят лишь в тех случаях, когда они связаны с другими реакциями, обладающими столь большими отрицательными значениями ΔG , что и ΔG всего процесса становится отрицательным.

2.4.2. Реакции биосинтеза зачастую непосредственно сопряжены с гидролизом АТФ

Хотя ферменты ускоряют энергетически выгодные реакции, они никак не могут индуцировать энергетически невыгодные реакции. Используя аналогию с водой, можно сказать, что сами по себе ферменты не способны заставить воду течь вверх. Но чтобы клетка могла расти и делиться, в ней должны происходить именно такие процессы: клетки обязаны строить большие и сложные молекулы из малых и простых. Мы уже видели, что это происходит главным образом благодаря ферментам, под действием которых высвобождение химической энергии (первоначально полученной от Солнца) сопрягается с завершением энергетически невыгодных реакций. Рассмотрим более подробно, как достигается такое связывание.

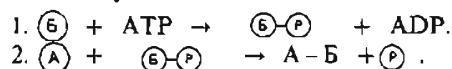
Представим себе биосинтетический процесс, при котором два мономера – А и Б – должны соединиться друг с другом в реакции *дегидратации* (называемой также *конденсацией*), сопровождающейся выделением воды:



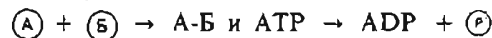
(Для удобства будем обозначать А-Н и Б-ОН символами А и Б в кружочках). Обратная реакция (называемая *гидролизом*), в которой молекула воды разрушает ковалентно связанное соединение А-Б, почти всегда будет энергетически выгодной. Это имеет место, например, при гидролитическом расщеплении белков, нуклеиновых кислот и полисахаридов на субъединицы.

Общая стратегия, обеспечивающая образование клеткой А-Б из (А) и (Б), та же, что и в случае синтеза АТФ при «сгорании» глюкозы: в результате многоступенчатой последовательности реакций происходит сопряжение энергетически невыгодного синтеза требуемых соединений со сбалансированной выгодной реакцией (рис. 2-17). Роль такой энергетически благоприятной реакции часто выполняет гидролиз молекулы АТФ.

На пути от (А) и (Б) к А-Б, сопряженном с гидролизом АТФ, энергия гидролиза сначала переводит (Б) в промежуточное высокоэнергетическое соединение, которое затем непосредственно реагирует с (А), образуя А-Б. Простейший механизм данного процесса включает в себя перенос фосфата от АТФ к (Б) с образованием (Б)-ОРО₃²⁻ (или (Б)-Р), причем в этом случае суммарная реакция осуществляется всего лишь в две стадии:



Поскольку образующееся промежуточное соединение (Б)-Р затем вновь разрушается (вероятно, очень быстро, пока еще не исчезла связь с поверхностью молекулы фермента), суммарные реакции можно описать с помощью следующих уравнений:

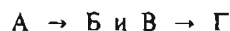


Отметим, что первая реакция оказывается возможной благодаря ее сопряжению со второй.

2.4.3. Выход сопряженных реакций зависит от общего изменения свободной энергии

Ход большинства реакций может быть количественно предсказан. Известно много термодинамических параметров, исходя из которых можно рассчитать изменения свободной энергии ΔG для большинства важных метаболических реакций клетки. Общее изменение свободной энергии при функционировании того или иного метаболического пути будет при этом выражаться как сумма изменений энергии на каждом из этапов этого пути.

Рассмотрим две воображаемые реакции:



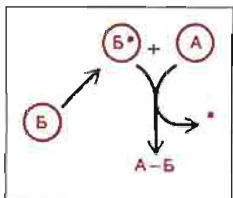


Рис. 2-29. Примеры реакций легитимации типа $A + B \rightarrow A-B$. В прямоугольнике (вверху) приведена схема реакции, применимая ко всем случаям. При гидролизе нуклеотидов соединяется B , как правило, активируется и переходит в B^* . В одном из двух приведенных примеров (см. 1) показан синтез аминокислоты глутамина из глутаминовой кислоты и аммиака; при этом гидролизуется лишь одна фосфатная связь АТФ. В другом примере (см. 2) для присоединения каждого нуклеотида к ДНК или РНК (синтез полинуклеотидов) гидролизуются две фосфатные связи.

значения ΔG которых равны соответственно $+1$ и -9 ккал/моль. В случае, когда эти реакции сопряжены друг с другом, ΔG сопряженной реакции будет равно -8 ккал/моль. (Напомним, что один моль вещества содержит $6 \cdot 10^{23}$ молекул.) Из этого следует, что даже реакция с положительным значением ΔG , которая не может протекать спонтанно, может быть обусловлена другой реакцией. Для этого, однако, необходимо, чтобы последняя имела достаточно большое отрицательное значение ΔG и, кроме того, чтобы существовал механизм, обеспечивающий сопряжение этих двух реакций.

ΔG гидролиза АТФ до АДФ и неорганического фосфата зависит от концентрации всех реагирующих веществ (разд. 9.1.10). Однако в обычных для клетки условиях это значение лежит в пределах от -11 до -13 ккал/моль. Реакция гидролиза АТФ в принципе может быть использована для осуществления термодинамически невыгодной реакции со значением ΔG , равным, скажем, $+10$ ккал/моль, при наличии, конечно, соответствующей последовательности реакций.

Однако для многих реакций биосинтеза (таких, например, как синтез нуклеиновых кислот или активация аминокислот, предшествующая синтезу белков) оказывается недостаточным даже $\Delta G = -13$ ккал/моль. В этих и других случаях путь гидролиза АТФ изменяется таким образом, что сначала образуется АМР и $P-P$ (пирофосфат) (рис. 2-28). На следующей стадии пирофосфат также подвергается гидролизу; это дает еще -13 ккал/моль. Многие биосинтетические пути полностью необратимы лишь потому, что пирофосфат, необходимый для обратных реакций, быстро удаляется из среды (рис. 2-29).

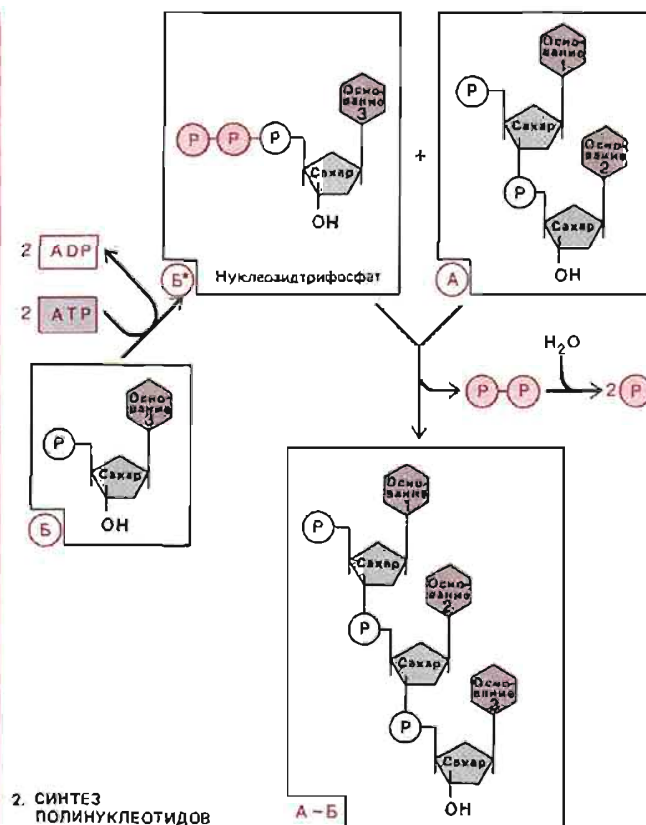
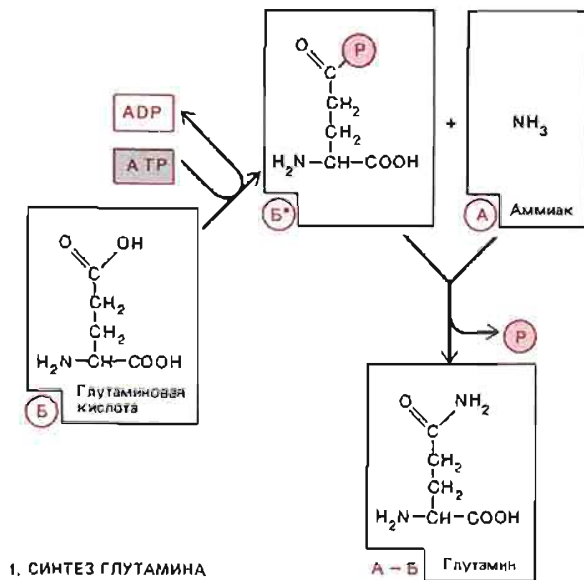


Таблица 2-2. Некоторые коферменты, принимающие участие в реакциях переноса химических групп

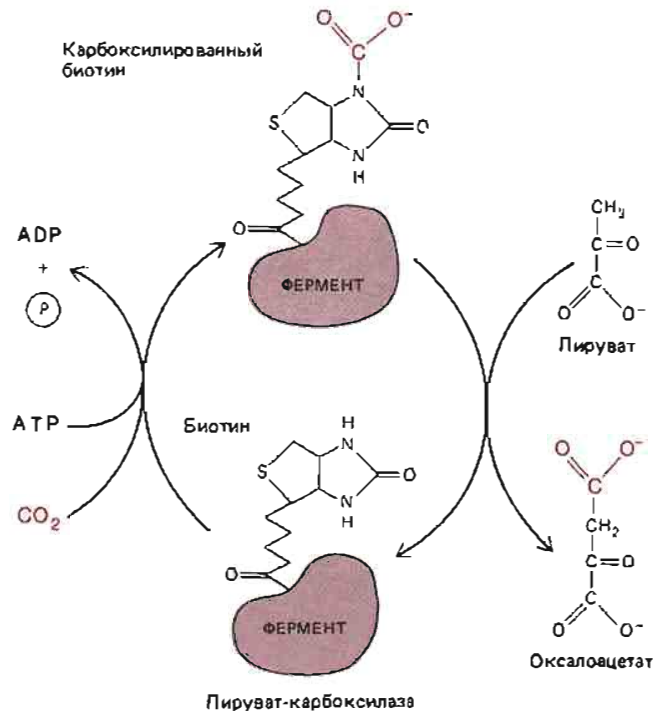
Кофермент ¹⁾	Переносимая группа
АТФ	Фосфатная
NADH, NADPH	Водород + электрон (гидрид-ион)
Кофермент А	Ацетильная
Биотин	Карбоксильная
S-Аденозилметионин	Метильная
UDP-глюкоза	Глюкоза

¹⁾ Коферментами являются малые молекулы, связанные с некоторыми ферментами и необходимые для проявления их активности. Каждый из перечисленных коферментов представляет собой молекулу переносчика для небольшой химической группы и участвует в различных реакциях, в которых эта группа переносится на другую молекулу. Некоторые коферменты присоединяются к ферментам с помощью ковалентных связей; другие связаны с ними менее прочно.

2.4.4. Коферменты участвуют в переносе специфических химических групп

Как мы только что увидели, осуществление реакций биосинтеза в присутствии АТФ возможно благодаря тому, что последний реагирует с другой молекулой, образуя высоко реакционноспособное промежуточное фосфорилированное соединение. Поскольку новая фосфатная связь легко расщепляется с выделением свободной энергии, такая активированная молекула может свободно присоединяться к другим молекулам. Этот общий принцип не ограничивается лишь реакциями с участием АТФ; множество разнообразных, химически лабильных связей ведет себя подобным же образом. Например, специфические молекулы-переносчики участвуют в переносе химических групп, таких, как ацетильная или метильная группа (табл. 2-2). Одна и та же молекула-переносчик нередко принимает участие во многих различных реакциях биосинтеза, для осуществления которых необходимо наличие ее специфической реакционноспособной группы.

Рис. 2-30. Перенос карбоксильной группы коферментом биотином. Биотин играет роль молекулы-переносчика карбоксильной группы ($-\text{COO}^-$). В показанной последовательности реакций биотин ковалентно связан с ферментом пируват-карбоксилазой. Активированная карбоксильная группа, происходящая из бикарбонат-иона (HCO_3^-), связывается с биотином в реакции, протекающей за счет энергии гидролиза АТФ. Затем гидроксильная группа переносится к метильной группе пирувата с образованием оксалоацетата.



Примером такой молекулы-переносчика может служить ацетил-кофермент А (ацетил-СoA), образующийся при расщеплении глюкозы. Он переносит ацетильную группу, присоединенную к СoA лабильной тиозфирной связью (рис. 2-19). Эта ацетильная группа легко переходит на другую молекулу, такую, например, как растущая молекула жирной кислоты. Другой заслуживающий внимания пример — это биотин, осуществляющий во многих реакциях биосинтеза перенос карбоксильной группы (рис. 2-30). Молекулы, подобные ацетил-СoA, биотину и АТФ, называются **коферментами**, так как они тесно связаны с различными ферментами и необходимы для проявления ферментативной активности. Многие малые молекулы, называемые **витаминами**, должны содержаться в следовых количествах в пище. В организме они превращаются в коферменты.

2.4.5. Для биосинтеза необходимы восстановительные эквиваленты

Мы уже видели, что в клетке непрерывно протекают реакции окисления и восстановления. Химическая энергия, заключенная в молекулах питательных веществ, высвобождается в ходе окислительных процессов, представляющих собой своеобразную форму горения, тогда как для построения биологических молекул клетка нуждается, кроме всего прочего, в осуществлении ряда восстановительных реакций, протекающих с затратой химической энергии. При образовании высокоэнергетической связи между водородом и никотинамидным кольцом в молекуле NADH необходимая химическая энергия обеспечивается тем же принципом сопряженных реакций, который действует и при синтезе АТФ. Затем эта высокоэнергетическая связь снабжает энергией другие термодинамически невыгодные ферментативные реакции, в которых водород (в виде гидрид-иона) переносится на другую молекулу. Поэтому NADH и легко образующийся из него NADPH называют носителями «восстановительной силы».

Чтобы понять, как это происходит на деле, рассмотрим лишь одну ступень биосинтеза — последнюю реакцию в синтезе липидной молекулы *холестерола*. В этой реакции два атома водорода присоединяются к полициклическому стероидному кольцу, восстанавливая двойную связь углерод-углерод (рис. 2-31). Как и в большинстве реакций биосинтеза, два атома водорода, необходимые для данной реакции, поставляются в виде гидрид-иона молекулы NADPH и протона (H^+) из раствора ($H^- + H^+ = 2H$). Как и в случае NADH, гидрид-ион, который должен переноситься от NADPH, входит в состав никотинамидного кольца и легко отщепляется от него, поскольку никотинамидное кольцо становится при этом ароматическим, достигая таким образом наиболее стабильного состояния (см. рис. 2-22). Следовательно, как в NADH, так и в NADPH гидрид-ион присоединен высокоэнергетической связью, при разрыве которой он может быть перенесен на другую молекулу

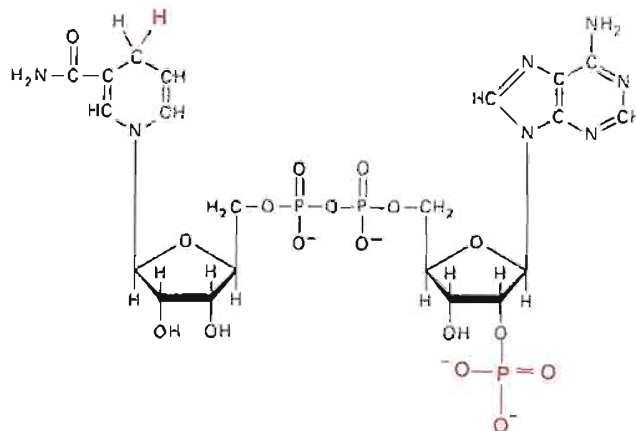


Рис. 2-31. Последний этап одного из путей биосинтеза холестерина. Восстановление связи $C=C$ происходит в результате переноса на нее гидрид-иона с молекулы-переносчика NADPH и протона (H^+) из раствора.

Рис. 2-32. Строение NADPH, отличающегося от NADH (рис. 2-22) только наличием дополнительной фосфатной группы, благодаря которой определенные ферменты (обычно участвующие в процессах биосинтеза) избирательно узнают это соединение.

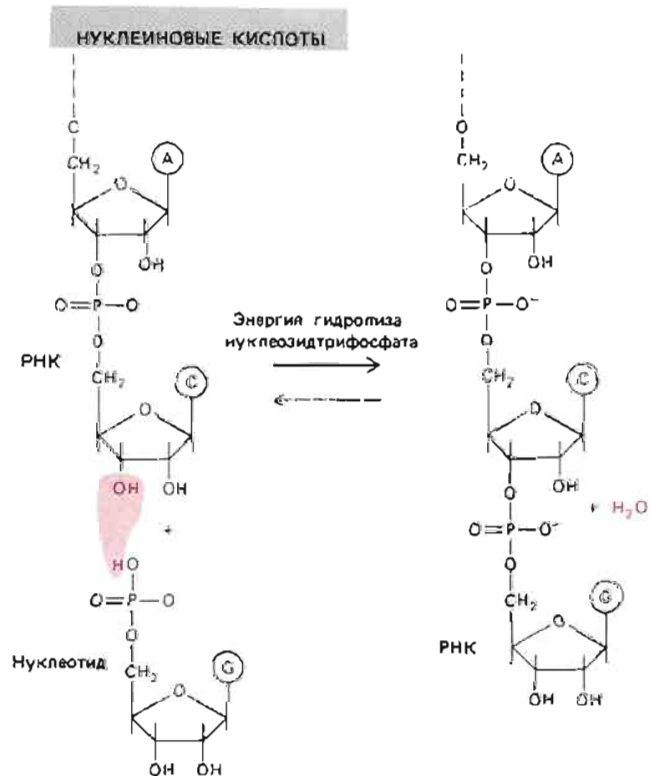
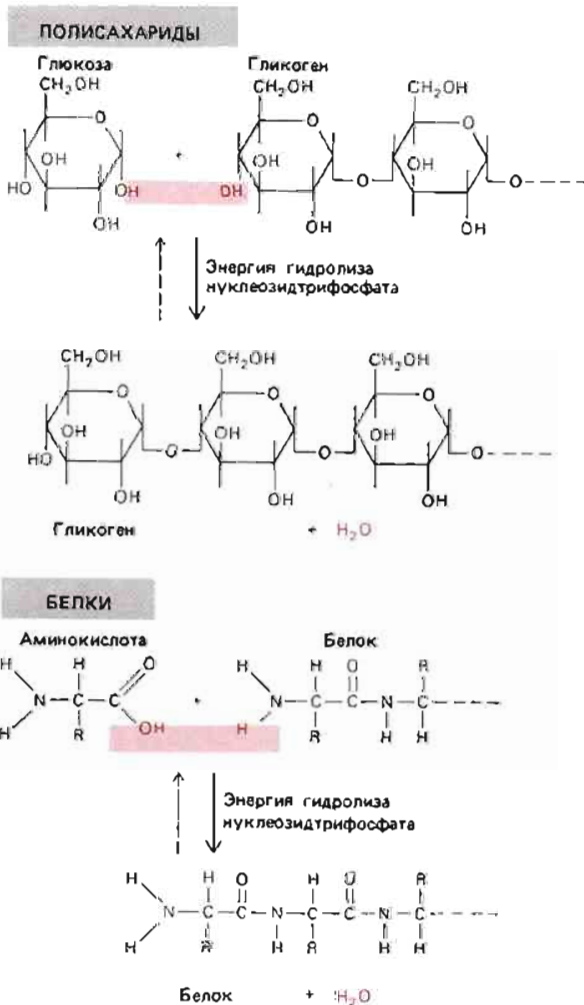
Рис. 2-33. Схематическое изображение реакций полимеризации, приводящих к синтезу биологических полимеров трех видов. Несмотря на то что в каждой реакции принимает участие большое число характерных для нее ферментов и различных промежуточных соединений, в основном эти реакции сходны. В каждом случае при синтезе происходит потеря молекулы воды (дегидратация), потребление высокоэнергетического нуклеозидтрифосфата и образование неорганического пирофосфата. Обратная реакция — распад полимеров всех трех типов — осуществляется путем простого присоединения молекул воды (гидролиз).

при условии, что имеется подходящий фермент, способный катализировать этот переход.

В химическом отношении различие между NADH и NADPH незначительно: NADPH имеет дополнительную фосфатную группу в той части молекулы, которая удалена от ее активной области (рис. 2-32). В самой реакции эта фосфатная группа не участвует. Однако она служит как бы «рукояткой», с помощью которой NADPH в качестве кофермента связывается с соответствующими ферментами. NADH, как правило, работает с ферментами, катализирующими катаболические реакции, тогда как NADPH взаимодействует с ферментами биосинтеза. Следовательно, катаболические и биосинтетические пути могут регулироваться независимо друг от друга путем изменения количества NADH и NADPH соответственно.

2.4.6. Синтез биологических полимеров осуществляется путем повторения элементарных реакций дегидратации

Основными макромолекулами, синтезируемыми клетками, являются полинуклеотиды (ДНК и РНК), полисахариды и белки. Эти макромолекулы необычайно разнообразны по структуре и представляют собой наиболее сложные из известных молекул. Несмотря на это, они синтезируются из относительно небольшого числа малых молекул (называемых *мономерами* или *субъединицами*) с помощью ограниченного набора химических реакций.



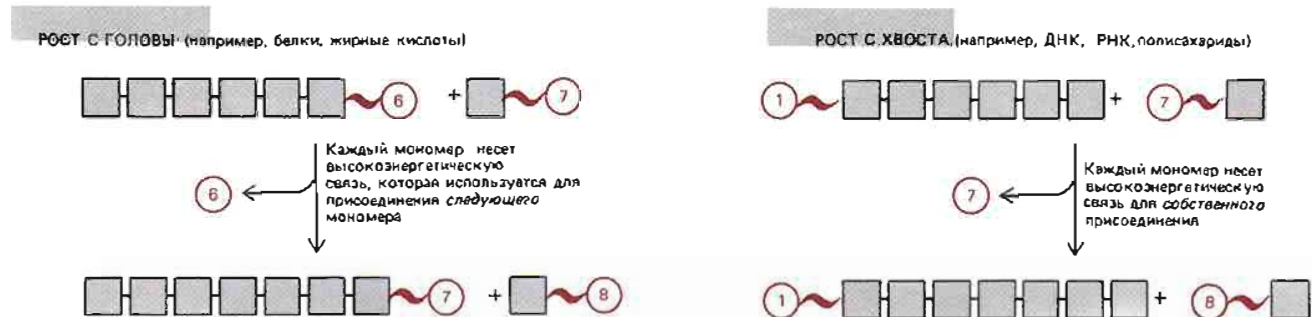


Рис. 2-34. Сравнение роста полимеров с головы и с хвоста.

Присоединение мономеров к белкам, полинуклеотидам и полисахаридам показано на рис. 2-33. Хотя в реакциях синтеза каждого полимера участвуют ковалентные связи разных типов, а также различные ферменты и кофакторы, тем не менее все эти реакции обнаруживают сильное сходство. Присоединение мономеров в каждом случае происходит путем реакции дегидратации – удаления молекулы воды из состава реагирующих соединений.

Как в обсуждавшемся ранее более общем случае (разд. 2.4.2), для образования указанных полимеров требуется химическая энергия, обеспечиваемая в конечном счете обычным путем сопряжения реакций биосинтеза с энергетически выгодной реакцией гидролиза нуклеозидтрифосфата. В каждом случае по крайней мере один из вовлеченных в процесс нуклеозидтрифосфатов расщепляется с образованием пирофосфата, который в дальнейшем в свою очередь гидролизуются, поставляя дополнительное количество необходимой для реакции энергии (рис. 2-28).

Активированные промежуточные продукты реакций полимеризации могут быть ориентированы двояким образом, обуславливая полимеризацию либо «с хвоста», либо «с головы». При полимеризации «с головы» активированная связь находится на конце растущего полимера и, следовательно, должна регенерировать при каждом присоединении мономера. В этом случае каждый мономер приносит с собой активированную группу, которая будет использована в реакции со следующим мономером данной последовательности (рис. 2-34). При полимеризации «с хвоста» активированная связь, которую несет с собой каждый новый мономер, будет использована для присоединения этого мономера. В то время как синтез полинуклеотидов и некоторых простых полисахаридов происходит путем полимеризации «с хвоста», синтез белков осуществляется посредством полимеризации «с головы».

Заключение

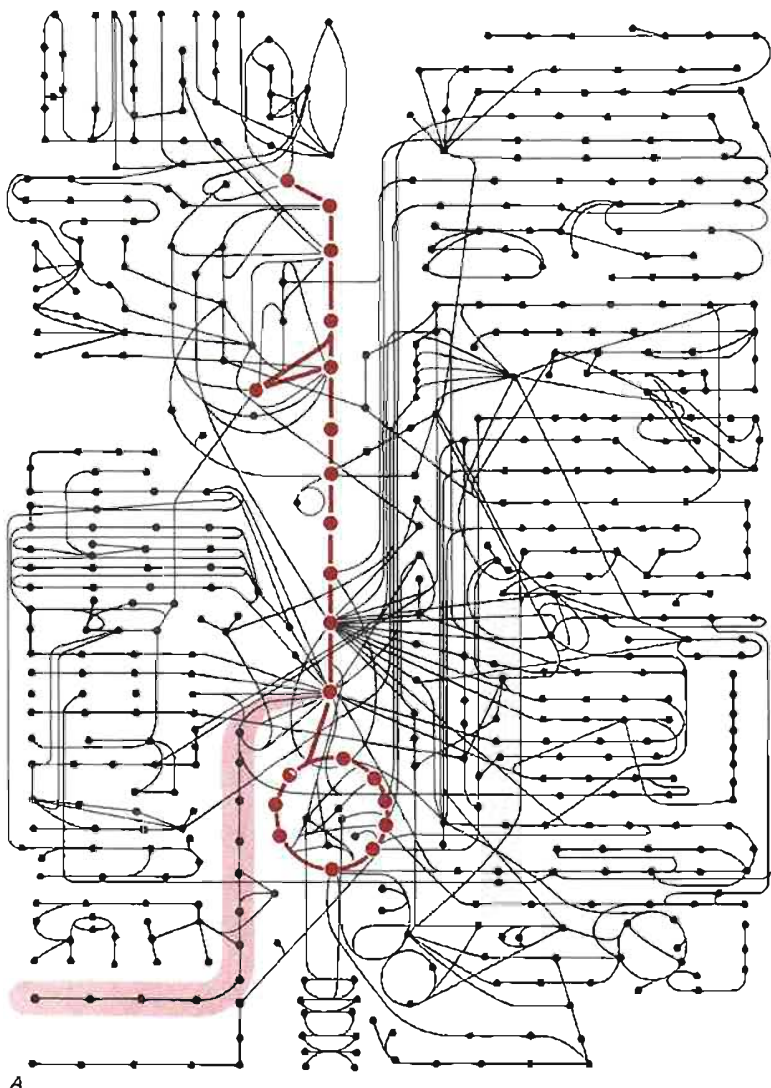
Гидролиз АТФ обычно сопряжен с энергетически невыгодными реакциями, такими, как биосинтез макромолекул, осуществляемый путем образования фосфорилированных промежуточных продуктов. Другие реакционноспособные молекулы-переносчики, называемые коферментами, переносят в ходе биосинтеза иные химические группы; например, NADPH переносит водород – в виде протона и двух электронов (гидрид-ион), а ацетил-СоА переносит ацетильные группы. Молекулы полимеров, такие, как белки и нуклеиновые кислоты, собираются из небольших активированных молекул-предшественников путем многократного повторения реакций дегидратации.

2.5. Координация катаболизма и биосинтеза [8]

2.5.1. Метаболизм – организуемый и регулируемый процесс

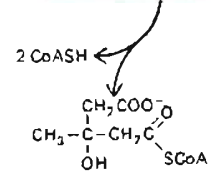
Некоторое представление о том, насколько мудро сконструирована клетка, если рассматривать ее как химическую машину, можно получить из рис. 2-35,

Рис. 2-35. Некоторые из химических реакций, протекающих в клетке. А. Около 500 общих метаболических реакций расходятся в разных направлениях от гликолитического пути и цикла лимонной кислоты (показаны более темной краской). Типичная клетка млекопитающего синтезирует более 10 000 белков, большая часть которых – ферменты. На произвольно выбранном участке (выделен более светлой краской) этого сложного переплетения метаболических путей происходит синтез холестерина из ацетил-СоА. Справа и внизу от «лабиринта» этот участок показан более детально в увеличенном масштабе (Б).

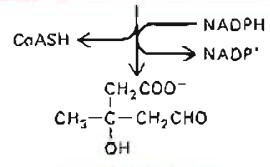


A

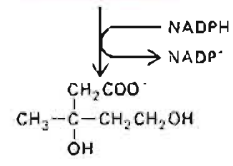
3 молекулы ацетил-CoA



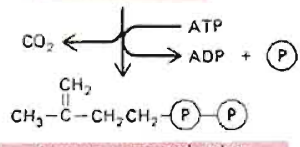
Гидроксииметилглутарил-CoA



Мевалдат

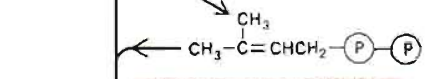


Мевалонат

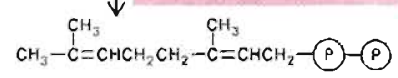


Изопентенилпирофосфат

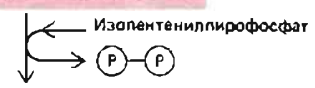
ИЗОМЕРИЗАЦИЯ



Диметилаллилпирофосфат



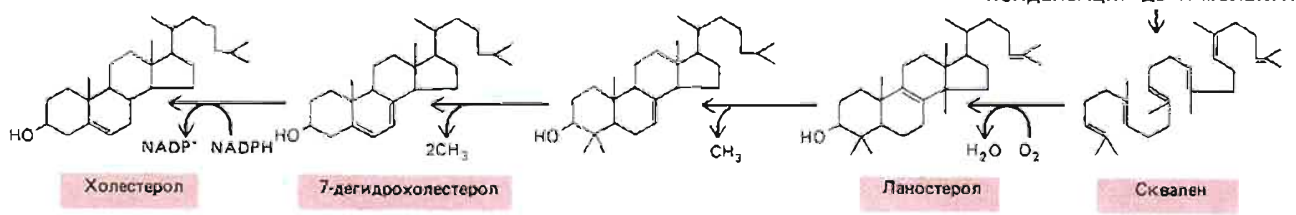
Геранилпирофосфат



Фарнезилпирофосфат



КОНДЕНСАЦИЯ ДВУХ МОЛЕКУЛ



Холестерол

7-дегидрохолестерол

Ланостерол

Сквален

где приведена карта метаболических путей. Все эти многочисленные реакции происходят в клетке, диаметр которой не превышает 0,1 мм, а ведь многие ферменты на данной карте не показаны (в особенности ферменты, связанные с цитоскелетом и клеточными мембранами). Более того, для каждой реакции требуются различные ферменты, которые сами являются продуктами целого ряда реакций переноса информации и синтеза белка.

Система в целом настолько сложна, что производит впечатление метаболических джунглей. Возьмем любую малую молекулу, например аминокислоту *серин*; найдется с полдюжины или более ферментов, способных химически видоизменять ее различными путями. Серин может связываться с АМР (аденилирование) на стадии, предшествующей его включению в синтез белков, или расщепляться до глицина, или превращаться в пируват, прежде чем быть окисленным; он может быть ацетилирован с помощью ацетил-СоА или перенесен на жирную кислоту с образованием фосфатидилсерина. Все эти различные пути конкурируют за одну и ту же молекулу серина, причем в это же время идет аналогичная конкурентная борьба за тысячи других малых молекул. Можно подумать, что система в целом нуждается в столь тонкой балансировке, что любое незначительное нарушение, например временное изменение рациона, приведет к ее гибели.

На самом же деле клетке присуща поразительная стабильность. Она может приспосабливаться и продолжать координированно функционировать во время голода или болезни. Мутации многих типов могут привести к элиминированию отдельных последовательностей реакций, и тем не менее клетка выживает при условии, что удовлетворяются определенные минимальные требования. Это возможно благодаря наличию сложной системы механизмов, регулирующих химические реакции в клетках. Некоторые из более высоких уровней контроля рассматриваются в следующих главах. Здесь мы касаемся лишь простейших механизмов, которые регулируют поток малых молекул в различных метаболических путях клетки.

2.5.2. Метаболические пути регулируются изменениями ферментативной активности

Концентрации различных малых молекул в клетке довольно устойчивы, что достигается **регуляцией по принципу обратной связи**. Регуляторные молекулы такого типа корректируют поток метаболитов по определенному метаболическому пути посредством временного увеличения или уменьшения активности ключевых ферментов. Например, первый фермент в той или иной последовательности реакций обычно ингибируется конечным продуктом этого метаболического пути; таким образом, если накапливается слишком много конечного продукта, дальнейшее поступление предшественников в данный метаболический путь автоматически ингибируется (рис. 2-36). В случае ветвления или пересечения метаболических путей, что происходит довольно часто, как правило, имеется несколько точек, в которых осуществляется контроль различными конечными продуктами. Насколько сложны такие процессы регуляции по принципу обратной связи, видно из рис. 2-37, где показана регуляция ферментативной активности в последовательностях реакций, ведущих к синтезу аминокислот.

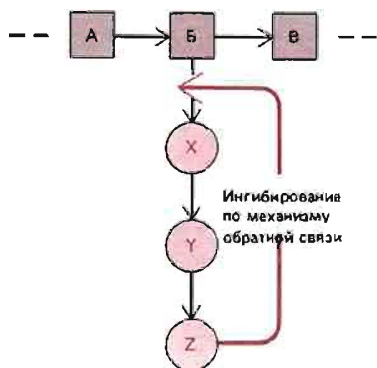
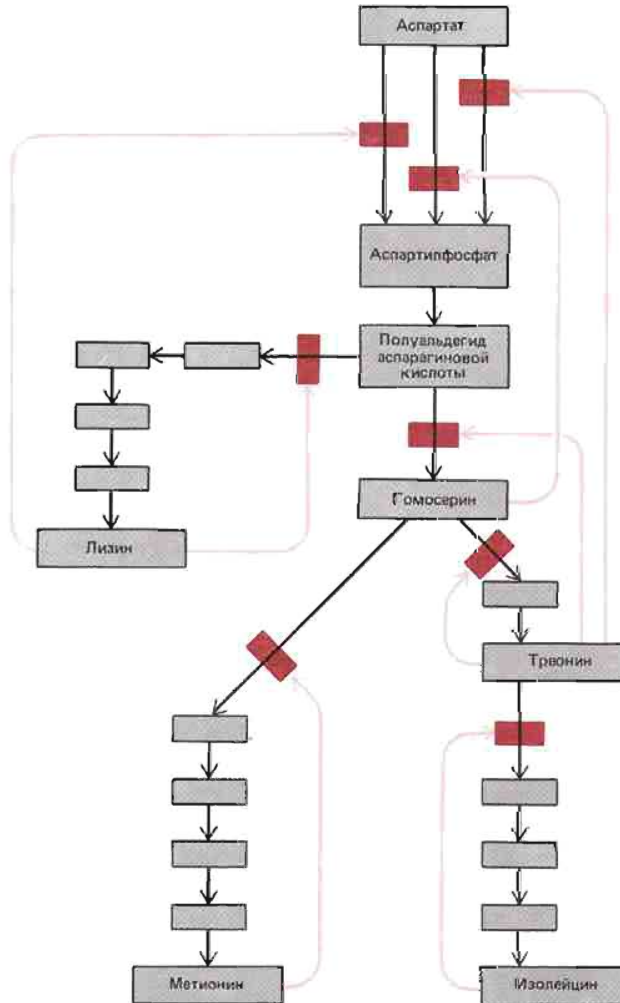


Рис. 2-36. Ингибирование по принципу обратной связи на одном биосинтетическом пути. Конечный продукт Z ингибирует первый фермент, необходимый для синтеза этого продукта, регулируя таким образом собственное содержание в клетке.

Регуляция по принципу обратной связи может срабатывать почти мгновенно, причем в ней могут принимать участие не только ингибиторы, но и активаторы ферментов. Молекулярная основа такого типа контроля в клетках хорошо изучена, однако здесь мы данного вопроса касаться не будем, поскольку для этого необходимо иметь представление о структуре белка. Поэтому мы отложим этот вопрос до гл. 3.

Рис. 2-37. Ингибирование по принципу обратной связи при синтезе аминокислот лизина, метионина, треонина и изолейцина у бактерий. Цветными стрелками показаны участки, в которых происходит ингибирование ферментов продуктами реакций. Отметим, что начальную реакцию катализируют три различных фермента (называемые изоферментами), каждый из которых ингибируется своим конечным продуктом.

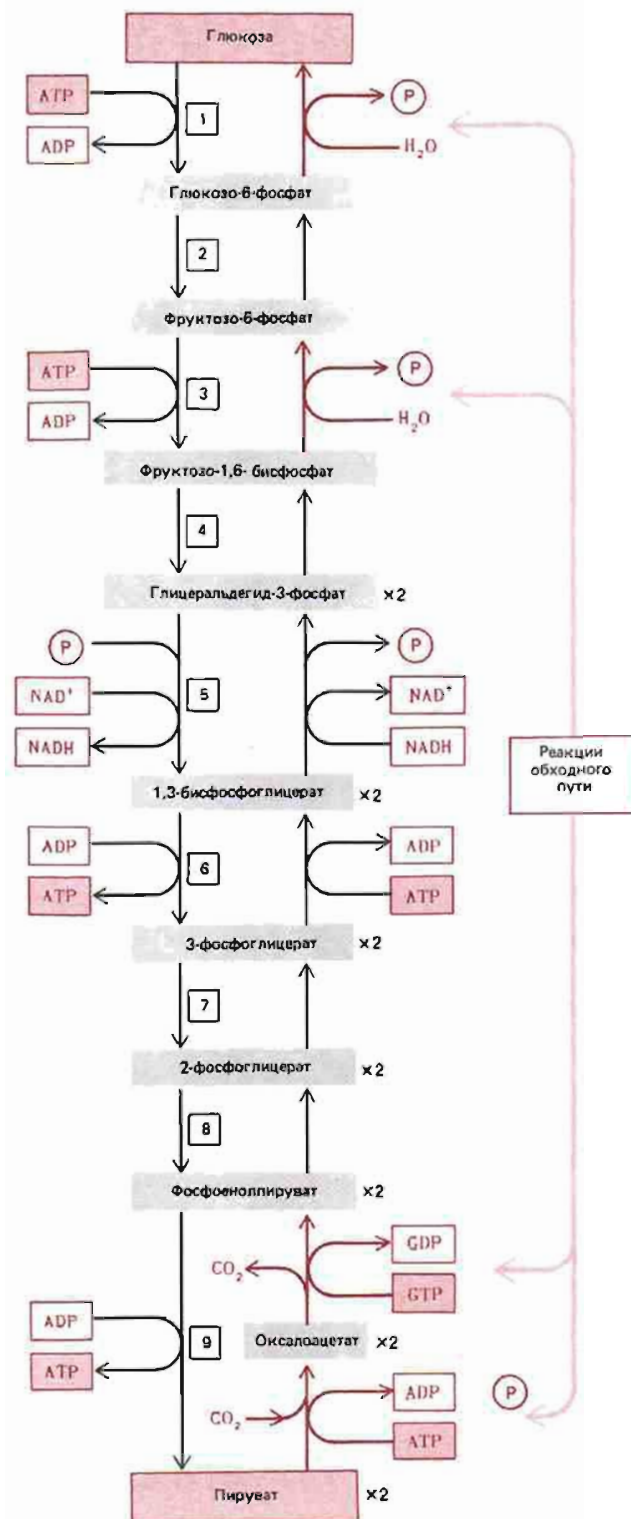


2.5.3. Катаболические реакции могут обращаться при поглощении энергии [9]

Крупномасштабные изменения, влияющие на метаболизм всей клетки, могут быть достигнуты также регуляцией нескольких ферментов. Например, особая схема регуляции по принципу обратной связи позволяет клетке переключаться с расщепления глюкозы на ее биосинтез, или *глюконеогенез*. Потребность в таком обращении метаболического пути бывает особенно острой как в периоды напряженных тренировок, когда необходимая для мышечного сокращения глюкоза синтезируется в клетках печени, так и во время голодания, при котором глюкоза для выживания организма должна образовываться из жирных кислот и аминокислот.

Обычный распад глюкозы до пирувата в процессе гликолиза катализируется девятью различными, последовательно действующими ферментами. Большинство реакций, катализируемых этими ферментами, легко обращается, однако три из них (стадии 1, 3 и 9 на рис. 2-20) фактически необратимы. На самом деле процесс расщепления глюкозы направляется обычно большим отрицательным изменением свободной энергии указанных реакций. Чтобы этот процесс протекал в противоположном направлении и происходило образование глюкозы из пирувата, вокруг каждой из этих реакций должен существовать обходной путь (шунт), причем реакции обходного пути должны идти

Рис. 2-38. Сравнение реакций, ведущих к синтезу глюкозы в процессе глюконеогенеза, с реакциями расщепления глюкозы (гликолитическими реакциями) энергетически выгодно (изменения свободной энергии меньше нуля), тогда как реакция синтеза протекают с затратой энергии. Для синтеза глюкозы необходимы различные ферменты обходного пути, шунтирующие реакции 1, 3 и 9 гликолиза. Общее направление протекания реакций определяется контрольными механизмами, действующими по принципу обратной связи на указанных ключевых этапах.



«вверх» – процесс, происходящий с потреблением энергии (рис. 2-38). Таким образом, если при расщеплении одной молекулы глюкозы до двух молекул пирувата образуются две молекулы АТФ, то для обращения реакции в процессе глюконеогенеза необходим гидролиз четырех молекул АТФ и двух мо-

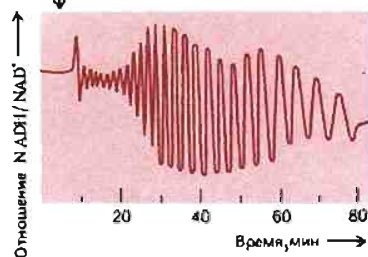


Рис. 2-39. Внезапное добавление глюкозы к экстракту, содержащему ферменты и коферменты гликолиза, может вызвать сильные периодические флюктуации содержания определенных промежуточных продуктов, например NADH. Такие метаболические колебания могут быть, в частности, обусловлены регуляцией гликолитического фермента фосфофруктокиназы по принципу положительной обратной связи.

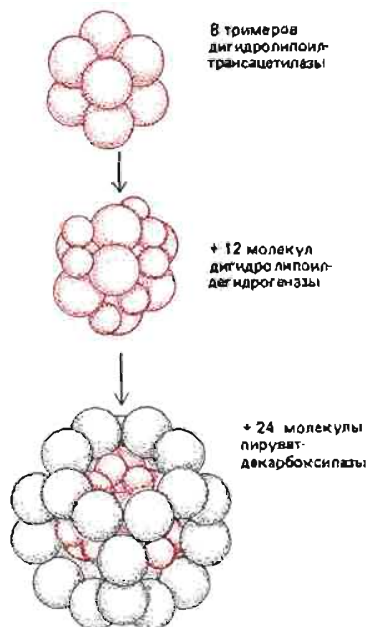


Рис. 2-40. Строение пируват-дегидрогеназы — пример крупного мультиферментного комплекса, в котором промежуточные продукты реакции переходят непосредственно от одного фермента к другому. Этот ферментный комплекс катализирует превращение пирувата в ацетил-Sa.

лекул GTP. Это эквивалентно гидролизу шести молекул АТФ на каждую вновь синтезированную молекулу глюкозы.

Реакции обходного пути (рис. 2-38) должны жестко контролироваться, так чтобы глюкоза расщеплялась только в случае «энергетического голода», а синтезировалась лишь тогда, когда клетка насыщена питательными веществами. Если бы прямые и обратные реакции могли протекать без ограничений, они впустую гоняли бы метаболиты туда и обратно через бесполезные (холостые) циклы, потребляющие огромные количества АТФ.

Известство подобных механизмов контроля можно проиллюстрировать на одном примере. Этап 3 гликолиза представляет собой одну из реакций, которая должна быть шунтирована при образовании глюкозы. Обычно на этом этапе происходит присоединение к фруктозо-6-фосфату фосфатной группы из АТФ; реакция катализируется ферментом *фосфофруктокиназой*. Этот фермент активируется АМР и АДР и ингибируется АТФ, цитратом и жирными кислотами. Иначе говоря, этот фермент активируется, когда запасы энергии малы и накапливаются АМР и АДР; инактивируется же он в том случае, когда имеются обильные запасы энергии (в форме АТФ) либо питательных веществ в виде жирных кислот или цитрата (извлекаемого из аминокислот). Ферментом, катализирующим обратную (обходную) реакцию, которая приводит к образованию глюкозы, является *фруктозо-бисфосфатаза*. Активность этого фермента регулируется по принципу обратной связи теми же молекулами, которые регулируют действие *фосфофруктокиназы*, но с противоположным эффектом, так что фруктозо-бисфосфатаза активна, когда неактивна фосфофруктокиназа.

Отметим, что фосфофруктокиназа активируется АДР, представляющим собой продукт катализируемой данным ферментом реакции ($\text{АТФ} + \text{фруктозо-6-фосфат} \rightarrow \text{АДР} + \text{фруктозо-1,6-бисфосфат}$), и ингибируется АТФ — одним из субстратов этой реакции. В результате этот фермент становится объектом сложного контроля по принципу положительной обратной связи. При определенных условиях такой контроль по принципу обратной связи вызывает необычные колебания активности данного фермента, что приводит к соответствующим колебаниям концентрации различных промежуточных продуктов гликолиза (рис. 2-39). Физиологическое значение таких специфических колебаний неясно. Однако на их примере можно видеть, как благодаря нескольким ферментам может быть создан биологический осциллятор. Такие осцилляции в принципе могут служить своеобразными «внутренними часами», позволяющими клетке «отсчитывать время» и, к примеру, выполнять конкретные функции в определенные периоды.

2.5.4. Ферменты могут переходить в активное или неактивное состояние путем ковалентных модификаций [10]

Рассмотренные выше типы контроля по принципу обратной связи позволяют осуществлять непрерывную автоматическую регуляцию скоростей протекания метаболических последовательностей в ответ на ежесекундные флюктуации метаболизма. Кроме того, клетки обладают специальными регуляторными механизмами для ситуаций, в которых требуется продолжительное (от нескольких минут до нескольких часов) изменение активности ферментов. Такие механизмы включают в себя обратимые ковалентные модификации ферментов, которые часто (хотя и не всегда) достигаются присоединением фосфатной группы к специфическому (серин, треонин или тирозин) аминокислотному остатку фермента. Фосфат поступает от АТФ, а его перенос катализируется ферментами, называемыми *протеинкиназами*.

В следующей главе мы рассмотрим вопрос о том, каким образом изменение формы фермента при фосфорилировании усиливает или подавляет его активность. Последующее удаление фосфатной группы, сводящее к нулю эффект фосфорилирования, достигается при помощи другого фермента, называемого *фосфопроtein-фосфатазой*. Ковалентная модификация фермен-

тов – это регуляция в новом измерении, поскольку она делает возможной регуляцию специфических последовательностей реакции такими сигналами (например, гормонами), которые не являются промежуточными продуктами метаболизма.

2.5.5. Реакции компартментализованы как на уровне клеток, так и на уровне всего организма [11]

Не все метаболические реакции клетки протекают в одних и тех же субклеточных компартментах (обособленных субклеточных структурах). Поскольку различные ферменты находятся в разных компартментах клетки, поток химических компонентов направляется не только химическим, но и физическим путем.

Простейшая форма такого пространственного разобщения наблюдается, когда два фермента, катализирующие две последовательные реакции, образуют единый ферментный комплекс, и, следовательно, продукту первой ферментативной реакции не нужно диффундировать через цитоплазму, чтобы встретиться со вторым ферментом. Как только заканчивается первая реакция, сразу же начинается вторая. Некоторые крупные агрегаты ферментов осуществляют всю последовательность реакций, оставаясь в контакте с субстратом. Например, превращение пирувата в ацетил-S_oA происходит в три этапа, каждый из которых протекает на одном и том же ферментном комплексе (рис. 2-40), а при синтезе жирной кислоты даже еще более длинная последовательность реакций катализируется единым ферментным ансамблем. Неудивительно, что некоторые из наиболее крупных ферментных комплексов ответственны за синтез макромолекул такого типа, как белки и ДНК.

На следующем уровне пространственного разобщения в клетке происходит концентрирование функционально связанных ферментов в одной и той же мембране или в ограниченных мембранами водных компартментах органелл. Проиллюстрировать это можно на примере метаболизма глюкозы (рис. 2-41). Образовавшийся в результате гликолиза пируват активно захватывается из цитозоля во внутреннее пространство митохондрий, где имеются все ферменты и метаболиты цикла лимонной кислоты. Более того, сама внутренняя митохондриальная мембрана содержит все ферменты, катализирующие последовательные реакции окислительного фосфорилирования, включая реакции переноса электронов от NADH к O₂ и реакции синтеза АТФ. Следовательно, всю митохондрию можно считать небольшим заводом, производящим АТФ. Аналогичным образом другие клеточные органеллы, такие, например, как ядро, аппарат Гольджи и лизосомы, можно рассматривать как специализированные компартменты, в которые заключены функционально связанные ферменты для выполнения специальных задач. В определенном смысле живая клетка подобна современному городу со множеством специализированных служб, концентрирующихся в разных районах и связанных друг с другом при помощи обширной сети различных коммуникаций.

В многоклеточных организмах пространственная организация выходит далеко за пределы отдельной клетки. Различные ткани тела обладают разнообразным набором ферментов и по-разному способствуют выживанию всего организма. Кроме различий в специализированных продуктах, таких, как гормоны или антитела, между разными типами клеток одного и того же организма имеются еще и существенные различия в общих для всех клеток метаболических путях. Хотя фактически во всех клетках имеются ферменты гликолиза, цикла лимонной кислоты, синтеза и распада липидов и метаболизма аминокислот, уровни всех этих процессов четко корректируются в ответ на изменение потребностей организма. Нервные клетки, возможно, наиболее «привередливые» клетки организма, содержат крайне малые запасы гликогена или жирных кислот, почти полностью «полагаясь» на глюкозу, поставляемую с кровью. Клетки печени снабжают глюкозой клетки активно работающих мышц. Кроме того, они используют молочную кислоту, образованную

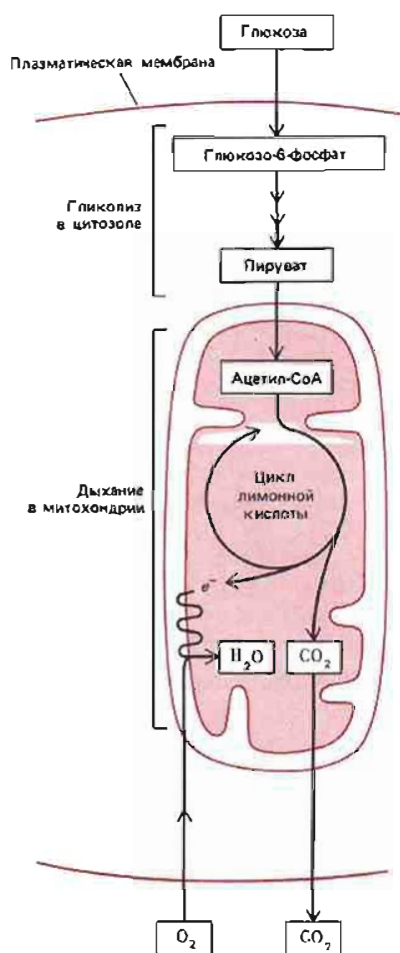
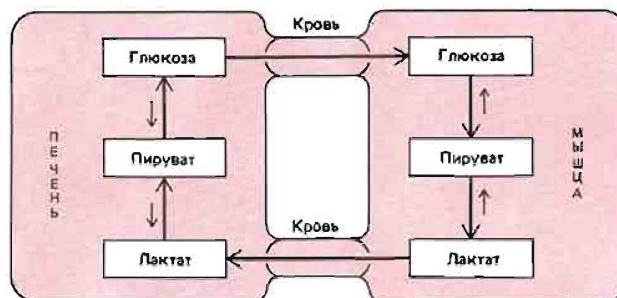


Рис. 2-41. Пространственное разобщение трех стадий расщепления глюкозы в эукариотической клетке. Гликолиз осуществляется в цитозоле, тогда как реакции цикла лимонной кислоты и окислительного фосфорилирования – только в митохондриях.

Рис. 2-42. Схематическое изображение метаболического взаимодействия между клетками печени и мышц. Основным «топливом» для клеток активно работающих мышц служит глюкоза, значительная часть которой поставляется клетками печени. Молочная кислота – конечный продукт анаэробного распада глюкозы в мышцах – вновь превращается в глюкозу в печени.



в мышцах, для синтеза глюкозы (рис. 2-42). Клетки каждого типа обладают специфическими для них особенностями метаболизма и широко сотрудничают как в нормальном состоянии, так и при тренировках, стрессе или голодании.

Заключение

Тысячи и тысячи различных биохимических реакций, одновременно осуществляемых клеткой, тесно скоординированы между собой. Разнообразные механизмы контроля регулируют активность клеточных ферментов при изменении существующих в клетке условий. Наиболее общая форма регуляции – это легко обратимое ингибирование по принципу обратной связи, когда на первый фермент метаболического пути оказывает влияние конечный продукт этого пути. Более длительная форма регуляции включает в себя химическую модификацию одного фермента под действием другого, что часто происходит в результате фосфорилирования. Комбинации регуляторных механизмов могут вызывать сильные и длительные изменения в метаболизме клетки. Не все клеточные реакции происходят в одних и тех же внутриклеточных компартментах, и пространственное разграничение клетки внутренними мембранами позволяет органеллам осуществлять специализацию своих биохимических функций.

Литература

Основная

- * Lehninger A. L., Principles of Biochemistry, New York, Worth, 1982.
- ** Stryer L., Biochemistry, 2nd ed., San Francisco, Freeman, 1981. Wood W. B., Wilson J. H., Hood L. E., Biochemistry, A Problems Approach, 2nd ed., Menlo Park, Ca., Benjamin-Cummings, 1981.

Цитируемая

1. Henderson L. J., The Fitness of the Environment, Boston, Beacon, 1927, reprinted 1958. (Классический анализ в доступном изложении.)
Masterton W. L., Slowinski E. J., Chemical Principles, 4th ed., New York, Holt, Rinehart and Winston, 1977.
2. Lehninger A. L., Bioenergetics, The Molecular Basis of Biological Energy Transformations, 2nd ed., Menlo Park, Ca., Benjamin-Cummings, 1971. (Краткое изложение.)
3. Klotz I. M., Energy Changes in Biochemical Reactions, New York, Academic Press, 1967. (Основы термодинамики.)
Shrödinger E., What is Life? Mind and Matter, Cambridge, Eng. Cambridge University Press, 1969. (Порядок и неупорядоченность в биологических системах с точки зрения физики; впервые опубликовано в 1944 г.)
4. Raven P. H., Evert R. F., Curtis H., Biology of Plants, 3rd ed. New York, Worth, 1981. (Гл. 6 – фотосинтез.)
5. McGilvery R. W., Biochemistry, A functional Approach, 2nd ed., Philadelphia, Saunders, 1979. (Особый интерес представляет для изучения метаболических путей:

- в гл. 23 и 26 рассматриваются гликолиз и цикл лимонной кислоты.)
- Racker E.*, A New Look at Mechanisms in Bioenergetics, New York, Academic Press, 1976. (Ретроспективная и личная точка зрения пионера в этой области.)
6. *Krebs H. A.*, The history of the tricarboxylic acid cycle, *Perspect. Biol. Med.*, **14**, 154–170 (1970).
 7. *Racker E.*, From Pasteur to Mitchell: a hundred years of bioenergetics, *Fed. Proc.*, **39**, 210–215 (1980).
 - Hinkle P. C.*, *McCarty R. E.*, How cells make ATP, *Sci. Am.*, **238** (3), 104–123 (1978).
 - ***8. *Newsholme E. A.*, *Start C.*, Regulation in Metabolism, New York, Wiley, 1973.
 9. *Hess B.*, Oscillating reactions, *Trends Biochem. Sci.*, **2**, 193–195 (1977).
 10. *Cohen P.*, Control of Enzyme Activity, London, Chapman and Hall, 1976.
 11. *Banks P.*, *Bartley W.*, *Birt L. M.*, The Biochemistry of the Tissues, 2nd ed., New York, Wiley, 1976.

В русском переводе имеются следующие издания:

- * *Ленинджер А.* Основы биохимии. В 3-х томах. – М.: Мир, 1985.
- ** *Страйер Л.* Биохимия. В 3-х томах. М.: Мир, 1984–1985.
- *** *Ньюсхолм Э.*, *Старт К.* Регуляция метаболизма. М.: Мир, 1977.

Макромолекулы: структура, форма и информационные функции

Основные клеточные макромолекулы – белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды – это полимеры аминокислот, нуклеотидов и сахаров, синтезируемые из соответствующих малых молекул, описанных в предыдущей главе. Обладая сложной и точно детерминированной структурой, макромолекулы имеют уникальные свойства, позволяющие им осуществлять большинство характернейших функций клетки. Макромолекулы отвечают за сборку клеточных компонентов, за катализ химических превращений, за осуществление движений клетки и (самое важное) за наследственность. Выполнение всех этих жизненно важных функций обеспечивается информационным содержанием биологических макромолекул. В структуре молекулы белка или ДНК записано биологическое «сообщение», которое может быть «прочитано» благодаря взаимодействию с другими макромолекулами. В данной главе рассматриваются принципы хранения, передачи и использования этой информации.

3.1. Процессы молекулярного узнавания [1]

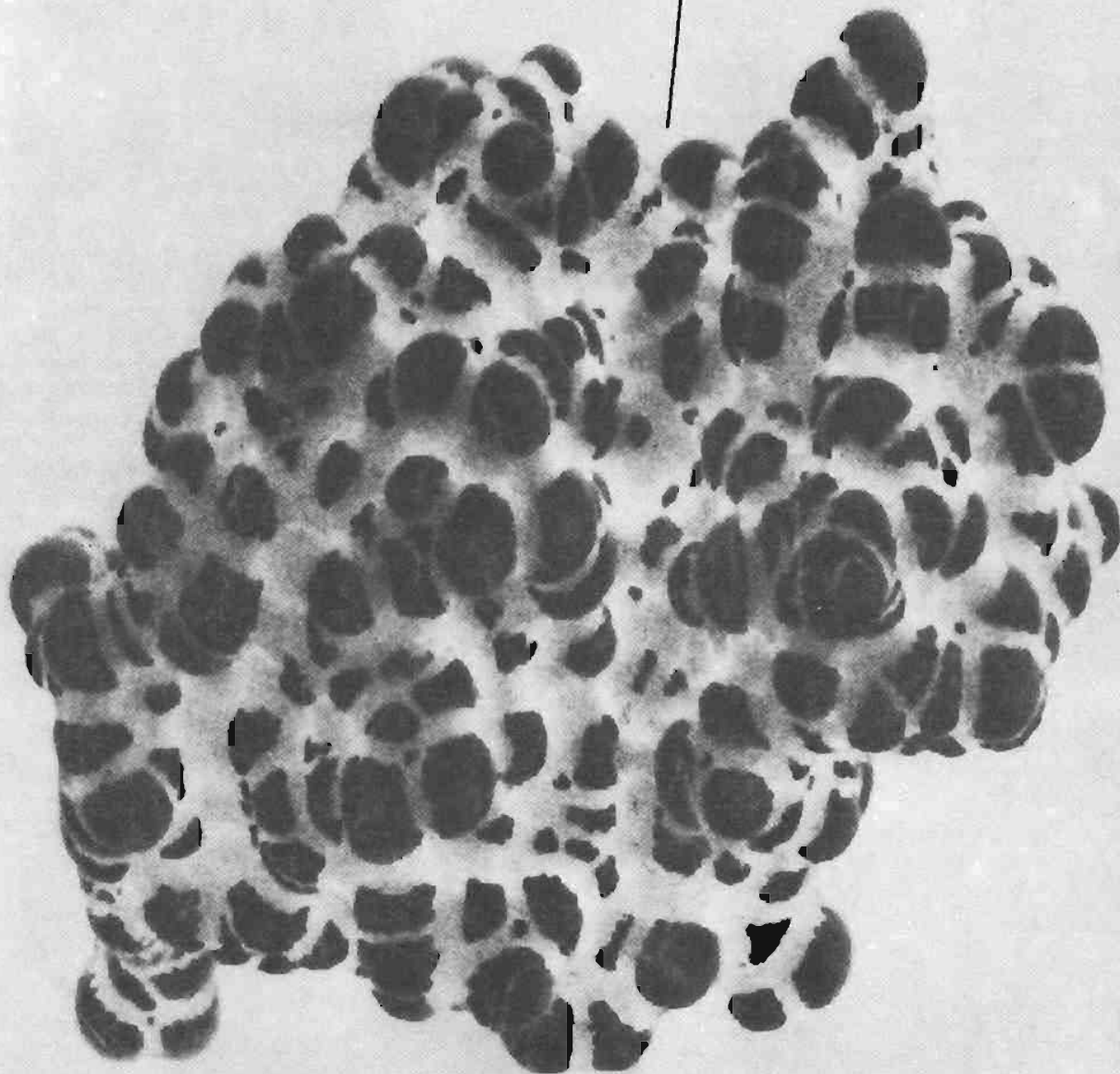
На долю макромолекул приходится большая часть сухого вещества клетки (табл. 3-1). Их молекулярные массы обычно составляют от 10 тыс. до 1 млн., т.е. по размеру такие молекулы занимают промежуточное положение между

Таблица 3-1. Примерный химический состав типичной бактерии и типичной клетки млекопитающего

Компонент ¹⁾	Доля от общей массы клетки, %	
	бактерия	клетка млекопитающего
H ₂ O	70	70
Неорганические ионы (Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ и т.п.)	1	1
Разнообразные низкомолекулярные метаболиты	3	3
Белки	15	18
РНК	6	1,1
ДНК	1	0,25
Фосфолипиды	2	3
Другие липиды	—	2
Полисахариды	2	2
Общий объем клетки	$2 \cdot 10^{-12} \text{ см}^3$	$4 \cdot 10^{-9} \text{ см}^3$
Относительный объем клетки	1	2000

¹⁾ Белки, полисахариды, ДНК и РНК – это макромолекулы. Липиды обычно не считают макромолекулами, хотя они и обладают некоторыми свойствами последних; например, большинство липидов синтезируется в виде линейных полимеров из молекул меньшего размера (ацетильной группы ацетилхофермента А) и путем самосборки образует более крупные структуры (мембраны).

Углубление, в котором находится активный центр фермента

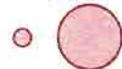


Нарисованная компьютером модель лизоцима яичного белка – полипептида, состоящего из 129 аминокислот. (С любезного разрешения Michael Connally.)

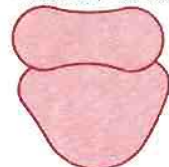
Сахара, аминокислоты
и нуклеотиды (~ 0,5 – 1 нм)



Глобулярные белки (~ 2 – 10 нм)



Рибосома (~ 30 нм)



Бактериальная клетка (~ 1000 нм)

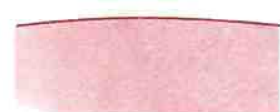


Рис. 3-1. Сопоставление размеров белков с размерами других компонентов клетки.

описанными в гл. 2 органическими молекулами клетки и такими надмолекулярными структурами, как рибосомы или вирусы (рис. 3-1).

Как описано в гл. 2, макромолекулы собираются из низкомолекулярных субъединиц, которые, присоединяясь одна за другой, образуют длинную полимерную цепь (рис. 2-33). Обычно в построении каждой цепи участвуют лишь субъединицы одного семейства. Так, аминокислоты, связываясь с другими аминокислотами, образуют белки; нуклеотиды, связываясь с другими нуклеотидами, образуют нуклеиновые кислоты, а сахара, связываясь с другими сахарами, образуют полисахариды. Поскольку для нормального функционирования макромолекулы решающее значение имеет точная последовательность субъединиц (мономеров), при биосинтезе макромолекул должны действовать механизмы, точно определяющие положение каждого мономера в цепи полимера.

3.1.1. Заключение в макромолекуле информация выражается с помощью слабых нековалентных связей

Макромолекулярные цепи образуются с помощью *ковалентных* связей, которые достаточно прочны, чтобы поддерживать последовательность субъединиц макромолекулы в течение длительного времени. Но заключенная в этой последовательности информация выражается с помощью значительно более слабых *нековалентных* связей. Такие слабые связи возникают между разными частями одной и той же макромолекулы и между разными макромолекулами. В совокупности эти связи определяют и пространственную структуру макромолекулярных цепей, и их взаимодействие.

Нековалентные связи в биологических молекулах обычно подразделяют на три типа: **ионные взаимодействия**, **водородные связи** и **вандерваальсовы взаимодействия**. Еще одно важное слабое взаимодействие создается пространственной структурой воды, которая стремится вытеснить гидрофобные группы, нарушающие сеть из связанных водородными связями молекул воды, и таким образом объединяет эти гидрофобные группы и сводит к минимуму их влияние. Такое выталкивание из водного раствора иногда считают четвертым типом слабой нековалентной связи и обычно называют **гидрофобным взаимодействием**. Все четыре типа слабых связей более детально рассматриваются на схеме IX (стр. 114).

В водном растворе нековалентные связи примерно в 100 раз слабее ковалентных (табл. 3-2)—их энергия лишь ненамного превышает среднюю энергию столкновений молекул, обусловленную тепловым движением, при 37°C.

Таблица 3-2. Ковалентные и нековалентные химические связи

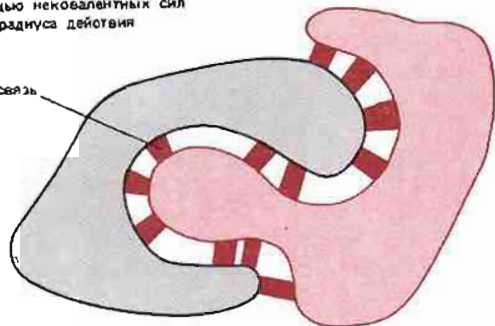
Тип связи	Длина, нм	Энергия связи, ккал/моль ¹⁾	
		в вакууме	в воде
Ковалентная	0,15	90	90
Ионная	0,25	80	1
Водородная	0,30	4	1
Вандерваальсова	0,20	1	1

¹⁾ Энергию связи можно представить как энергию, необходимую для ее разрыва. Здесь она дана в килокалориях на моль (ккал/моль). (Одна килокалория — это количество энергии, необходимое для повышения температуры 1000 г воды на 1°C. Широко используется и другая единица измерения — килоджоуль (кДж), равный 0,24 ккал.) Индивидуальные связи значительно варьируют по силе в зависимости от конкретных участвующих атомов и микроокружения, так что приведенные величины могут служить лишь для грубой ориентировки. Обратите внимание на то, что водная среда клетки существенно ослабляет ионные и водородные связи между неводными молекулами (схема IX, стр. 114).

СЛАБЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ СВЯЗИ

Органические молекулы способны взаимодействовать с другими молекулами с помощью нековалентных сил малого радиуса действия

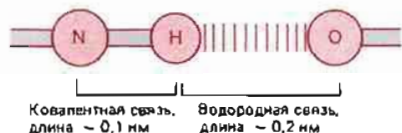
Слабая связь



Энергия слабых химических связей обычно составляет менее 1/20 энергии ковалентной связи. Прочное взаимодействие может быть обеспечено лишь одновременным образованием многих слабых связей.

ВОДОРОДНЫЕ СВЯЗИ

Водородную связь образует атом водорода, "поделенный" между двумя электроотрицательными атомами (например O и N)

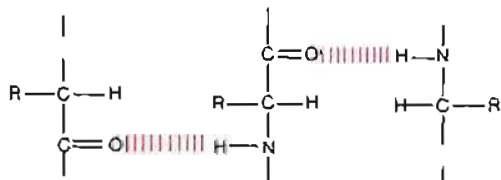


Водородные связи наиболее сильные, если три атома находятся на одной прямой

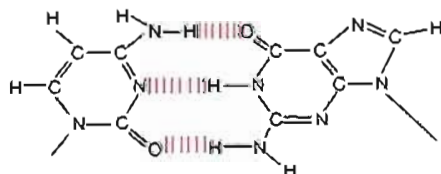


Примеры в макромолекулах:

две полипептидные цепи, связанные водородными связями

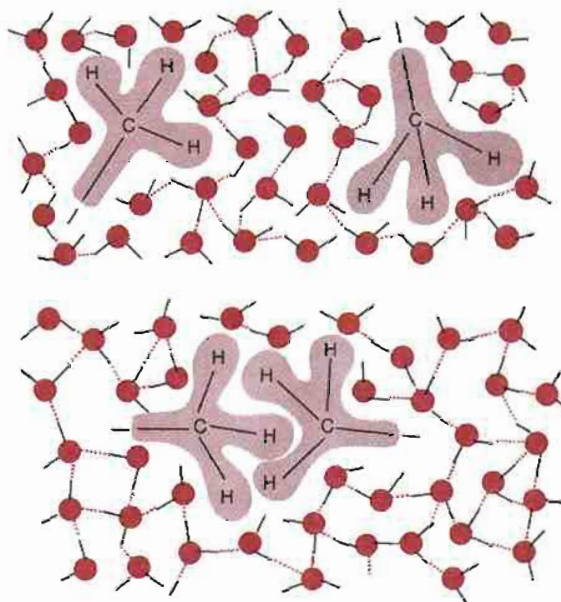


два основания (G и C), связанные водородными связями в ДНК или РНК



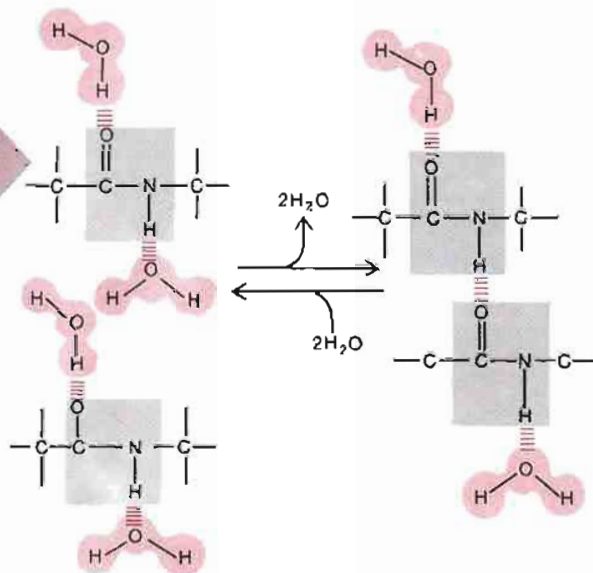
ГИДРОФОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Гидрофобные группы нарушают структуру образованной водородными связями сети молекул воды. Чтобы уменьшить этот эффект, вода стремится объединить гидрофобные группы, про которые в таком случае говорят, что они связаны "гидрофобными взаимодействиями"



ВОДОРОДНЫЕ СВЯЗИ В ВОДЕ

Поскольку образование водородной связи между любыми двумя молекулами в растворе приводит к разрыву существовавших водородных связей с водой, водородные связи в водном растворе сравнительно слабы



ИОННЫЕ СВЯЗИ

Ионные взаимодействия возникают между полностью заряженными группами (ионные связи) или между частично заряженными группами



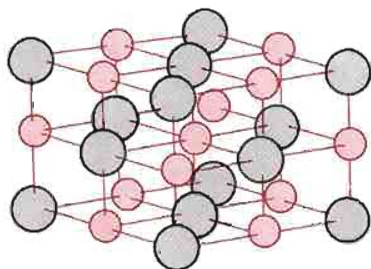
Сила притяжения между двумя зарядами δ^+ и δ^- :

$$\text{Сила} = \frac{\delta^+ \delta^-}{r^2 D} \quad (\text{закон Кулона}),$$

где D — диэлектрическая постоянная (1 для вакуума, 80 для воды)

r — расстояние между зарядами.

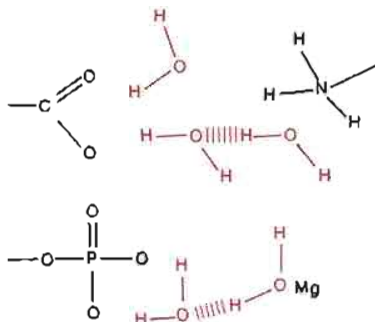
В отсутствие воды ионные силы очень велики. Они обуславливают прочность многих минералов, например мрамора и агата



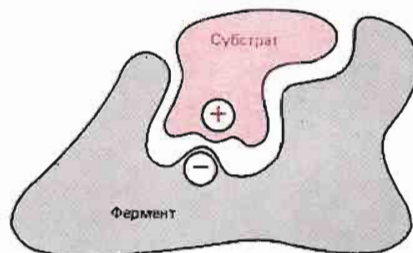
Кристалл
NaCl

ИОННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ВОДЕ

В результате взаимодействия с молекулами воды заряженные группы экранируются; поэтому в водном растворе ионные взаимодействия сравнительно слабы (энергия равна примерно энергии водородной связи)

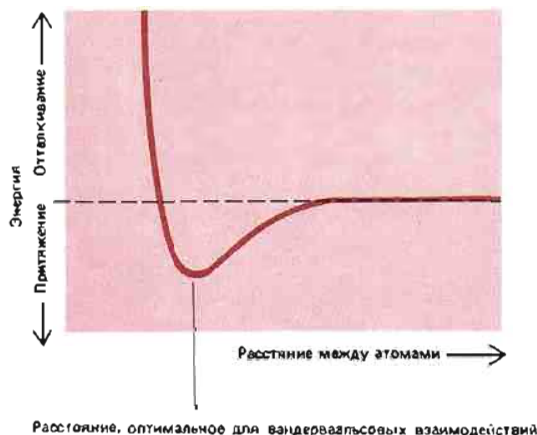


Тем не менее ионные связи в биологических системах играют очень важную роль; фермент, связывающий положительно заряженный субстрат, как правило, имеет в нужном месте отрицательно заряженную аминокислоту



ВАНДЕРВААЛЬСОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

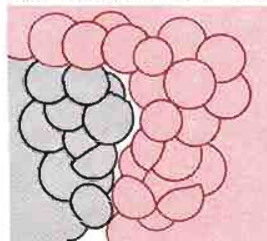
Из-за флуктуаций электрического поля любые два атома на очень близких расстояниях слабо притягиваются. Это взаимодействие называется вандерваальсовым притяжением.



Каждый атом имеет характерный вандерваальсов радиус

H	C	N	O
1,2 Å (0,12 нм)	2,0 Å (0,2 нм)	1,5 Å (0,15 нм)	1,4 Å (0,14 нм)

Индивидуальные вандерваальсовы взаимодействия весьма слабы, но могут оказаться существенными при очень тесном сближении поверхностей двух макромолекул



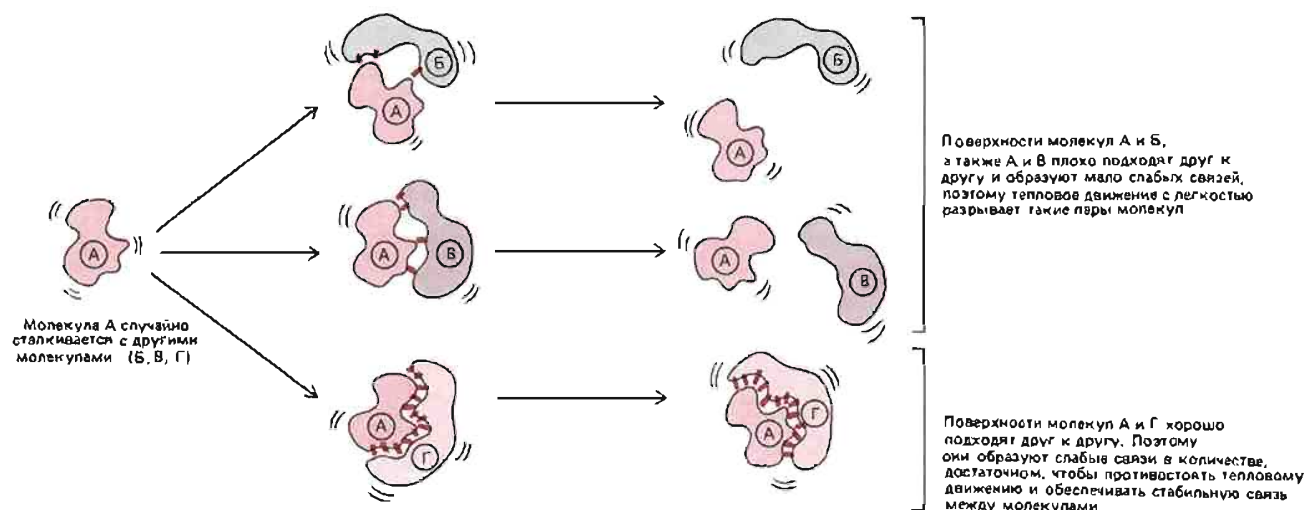


Рис. 3-2. Схема, иллюстрирующая, как макромолекулы узнают друг друга с помощью слабых взаимодействий.

Поэтому одна нековалентная связь в отличие от одной ковалентной слишком слаба, чтобы противостоять тепловому движению, стремящемуся разбросать молекулы в разные стороны. Чтобы скрепить поверхности двух молекул, требуется большое количество нековалентных связей. Поскольку это требование может реализоваться лишь при точном соответствии двух поверхностей друг другу (рис. 3-2), именно нековалентные связи обуславливают специфичность биологического узнавания, например узнавание ферментом своего субстрата.

Аналогичным образом слабые нековалентные взаимодействия определяют, соответствуют ли друг другу разные участки *одной и той же* молекулы. Длинная подвижная цепь, такая, как молекула белка, в принципе может складываться огромным числом способов, образуя самые различные конформации, каждая из которых характеризуется совершенно различным набором слабых взаимодействий. Но на деле большинство клеточных белков стабильно складывается только в одну конформацию; в ходе эволюции была отобрана такая последовательность аминокислот, у которой при одном из пространственных расположений атомов (или *конформации*) образуется значительно больше слабых связей, чем при всех других.

3.1.2. Диффузия – первая стадия молекулярного узнавания

Прежде чем узнать друг друга и, следовательно, проявить записанную на их поверхности информацию, две молекулы должны прийти в соприкосновение. Это достигается путем теплового движения, вызывающего случайные блуждания, или *диффузию* молекул. Поскольку, находясь в жидкости, молекулы быстро сталкиваются и отскакивают друг от друга, индивидуальная молекула движется сначала в одну сторону, затем в другую, описывая «беспорядочную траекторию» (рис. 3-3). Среднее расстояние, пройденное такой молекулой, пропорционально квадратному корню времени. Иными словами, если перемещение некой молекулы на 1 мкм занимает в среднем 1 с, то перемещение на 2 мкм в среднем займет 4 с, перемещение на 3 мкм – 9 с и т.д. Таким образом, диффузия – это эффективный способ перемещения молекул на ограниченные расстояния.

В опытах с введением в клетки флюоресцентных красителей и других меченых молекул было установлено, что в цитоплазме малые молекулы диффундируют почти так же быстро, как в воде. Молекуле такого размера, как АТФ, потребуется лишь 0,2 с для диффузии в среднем на расстояние 10 мкм, что составляет диаметр небольшой клетки животного. Однако макромолекулы движутся значительно медленнее. Объясняется это не только тем, что

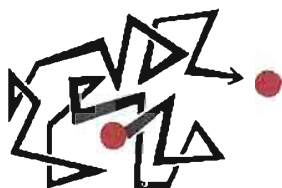
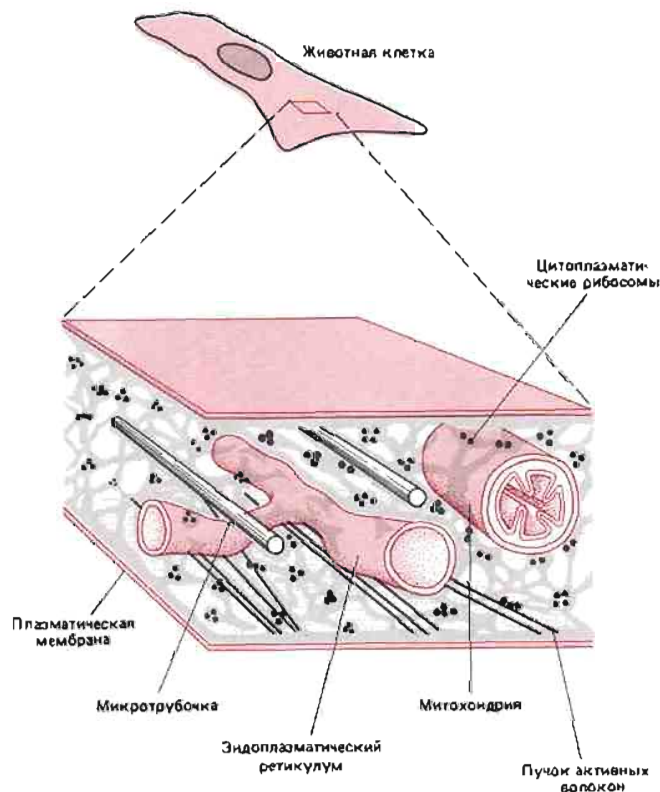


Рис. 3-3. Случайное блуждание. Молекулы в растворе из-за постоянных столкновений с другими молекулами непрерывно совершают случайные движения. Благодаря этому движению молекулы за удивительно короткое время диффундируют на расстояние, равное приблизительно размерам клетки.

Рис. 3-4. Схема небольшого участка животной клетки, показывающая, как много в клетке белковых нитей и окруженных мембранами органелл. Из-за взаимодействия с этими структурами и другими макромолекулами диффузия макромолекул затруднена, тогда как малые молекулы диффундируют почти так же быстро, как в воде. Показана клетка, распластавшаяся в результате присоединения к поверхности.



им присуща меньшая скорость диффузии, но и тем, что их движение тормозится частыми столкновениями с многими другими макромолекулами, положение которых в цитоплазме фиксированно (рис. 3-4).

3.1.3. Тепловое движение не только приводит молекулы в соприкосновение, но и отбрасывает их друг от друга

Две макромолекулы или одна макромолекула и одна малая молекула, сталкиваясь в результате простой диффузии, образуют комплекс. Образование комплекса может произойти либо немедленно (в этом случае говорят, что скорость образования комплекса *лимитируется диффузией*), либо с некоторой задержкой, если взаимодействующие поверхности оказываются подогнанными друг к другу только после некоторой «подстройки» структуры одной или обеих молекул. В любом случае, если две взаимодействующие молекулы достаточно сблизилась, они образуют множественные слабые связи, которые сохраняются до тех пор, пока случайное тепловое движение не вызовет снова диссоциацию молекул.

В общем случае, чем сильнее связывание молекул в комплексе, тем меньше скорость диссоциации. В предельном случае, когда энергия образовавшихся связей пренебрежимо мала по сравнению с энергией теплового движения, две молекулы диссоциируют сразу же после столкновения. В другом предельном случае энергия связей столь велика, что диссоциации практически не происходит. Таким образом, величина энергии взаимодействия – полезный показатель специфичности процесса узнавания.

Чтобы разобраться, как измеряют энергию взаимодействия, рассмотрим реакцию связывания молекулы А с молекулой Б. Эта реакция будет протекать до тех пор, пока не достигнет положения равновесия, при котором количество образующихся комплексов АБ равно количеству диссоциирующих комплексов. Используя равновесные концентрации молекул А, Б и комплекса



Рис. 3-5. Принцип равновесия. Равновесие между молекулами А и В и комплексом АВ поддерживается двумя показанными на схемах 1 и 2, противоположно направленными реакциями. Отношение констант скоростей ассоциации и диссоциации равно константе равновесия реакции К. Поскольку для того, чтобы прореагировать, молекулы А и В в реакции 2 должны столкнуться, скорость этой реакции пропорциональна произведению концентраций А и В. В результате в конечном выражении для К появляется произведение $[А] \cdot [В]$. Приведенную форму константы К мы будем называть константой сродства. Значение ее тем больше, чем сильнее связывание между А и В. Эту константу называют также константой ассоциации (и измеряют в литрах на моль). Константу равновесия можно определить иначе – как величину, обратную приведенной здесь константе. В этом случае ее называют равновесной константой диссоциации и измеряют в молях на литр.

АВ, можно определить константу равновесия К реакции (рис. 3-5). Эту константу иногда называют константой сродства и обычно используют в качестве меры силы связывания между двумя молекулами: чем сильнее связывание, тем выше значение константы сродства.

Константа равновесия реакции соединения двух молекул непосредственно связана с изменением в этой реакции стандартной свободной энергии ΔG^0 . Используя соответствующее уравнение (табл. 3-3), можно вычислить ΔG^0 для ряда значений К. Константы сродства реакций простого связывания в биологических системах обычно находятся в диапазоне от 10^3 до 10^{10} л/моль, что соответствует энергиям связывания от 4 до 14 ккал/моль.

В качестве примера более сложного взаимодействия рассмотрим митоз, при котором каждая хромосома должна оставаться постоянно связанной с нитями веретена на протяжении приблизительно 30 мин (период от метафазы до телофазы). При условии что нормальное расхождение хромосом по дочерним клеткам нарушается не чаще чем 1 раз на 1000 митозов, хромосома должна быть способна оставаться связанной с веретеном в течение по крайней мере 30 мин × 1000 митозов = $3 \cdot 10^4$ мин. Поскольку нарушение расхождения – процесс случайный, то для того, чтобы все 46 хромосом человека безошибочно разошлись в 1000 митозах, их связь с веретеном должна длиться в 46 раз дольше, т.е. $1,4 \cdot 10^6$ мин. Это максимально допустимое значение скорости диссоциации хромосом. Более того, по скорости диффузии хромосом мы можем оценить максимальную скорость ассоциации и, таким образом, вычислить минимальное значение константы сродства К (как описано на рис. 3-5). Полученная величина (не менее 10^{16} л/моль) соответствует минимальному изменению свободной энергии, равному по меньшей мере – 23 ккал/моль; такой вклад в среднем способны обеспечить 23 водородные связи.

3.1.4. Процесс молекулярного узнавания не может быть совершенно безошибочным

Энергия молекул не исчерпывается их быстрым движением при диффузии в растворе. При обычной температуре все атомы, включая те, из которых построена клетка, обладают также энергией электронного возбуждения и совершают колебательные и вращательные движения. Благодаря молекулярным столкновениям эта энергия случайно распределяется по разным атомам, так что, хотя уровень энергии большинства атомов близок к среднему, небольшая часть атомов будет обладать очень маленькой или очень большой энергией. Зная температуру и разницу в энергии между двумя энергетическими состояниями, можно рассчитать относительную вероятность существования молекулы в одном из двух этих состояний. Вероятность состояния с высокой энергией, так же как и вероятность отрыва хромосомы от веретена, по мере увеличения разницы энергий двух состояний становится все меньше и меньше. Однако вероятность состояния с высокой энергией обращается в нуль

Таблица 3-3. Соотношение между изменением свободной энергии и константой равновесия реакции

$\frac{[AB]}{[A][B]} = K$	(Свободная энергия AB) – (Свободная энергия A + B), ккал/моль
10^5	–7,1
10^4	–5,7
10^3	–4,3
10^2	–2,8
10	–1,4
1	0
10^{-1}	1,4
10^{-2}	2,8
10^{-3}	4,3
10^{-4}	5,7
10^{-5}	7,1

Если реакция $A + B \rightleftharpoons AB$ достигла равновесия, то относительные количества компонентов A, B и AB будут зависеть от разницы в их свободной энергии, ΔG^0 . Приведенные выше значения рассчитаны для 37°C с помощью уравнения

$$\Delta G^0 = -RT \ln \frac{[AB]}{[A] \cdot [B]}$$

или

$$\frac{[AB]}{[A] \cdot [B]} = e^{-\Delta G^0/RT} = e^{-\Delta G^0/(1,673)}$$

где ΔG^0 выражена в килокалориях на моль и представляет собой изменение свободной энергии данной реакции в стандартных условиях (концентрация всех компонентов составляет 1,0 моль/л).

лишь при бесконечно большой разнице в значениях энергии (табл. 3-3).

Из-за этого элемента случайности молекулярные взаимодействия никогда не могут быть абсолютно надежными. Поэтому клетка постоянно ошибается. Время от времени происходят даже энергетически невыгодные реакции. Например, молекула, состоящая из двух атомов, связанных ковалентной связью, в конце концов распадется. Аналогичным образом специфичность фермента в отношении субстрата не может быть абсолютной, так как способность отличить одну молекулу от другой не может быть совершенной. Ошибки могли бы быть полностью устранены лишь в том случае, если бы в клетке развились механизмы с бесконечно большой разницей энергий альтернативных состояний. Поскольку в распоряжении клеток имеется лишь ограниченный запас энергии, они вынуждены мириться с определенным уровнем ошибок и использовать для исправления многих из них специальные репарирующие реакции (т. 2, разд. 5.2 и 7.2.9).

С другой стороны, ошибки играют важную роль. Если бы не случайные ошибки при синтезе ДНК, то, как будет кратко описано дальше, вряд ли эволюция была возможной.

Заключение

В последовательности субъединиц макромолекул заключена информация, определяющая пространственную конфигурацию их поверхности. Эта конфигурация в свою очередь с помощью слабых нековалентных взаимодействий управляет процессами взаимного узнавания разных молекул или разных участков одной и той же молекулы. В ходе узнавания молекулы сначала соударяются в результате случайной диффузии, а затем связываются между собой с силой, которую можно выразить с помощью константы равновесия. Поскольку узнавание может быть безошибочным лишь при увеличении энергии взаимодействия до бесконечно большой величины, живые клетки постоянно допускают ошибки. При необходимости ошибки исправляются с помощью специальных механизмов репарации.

3.2. Нуклеиновые кислоты [2]

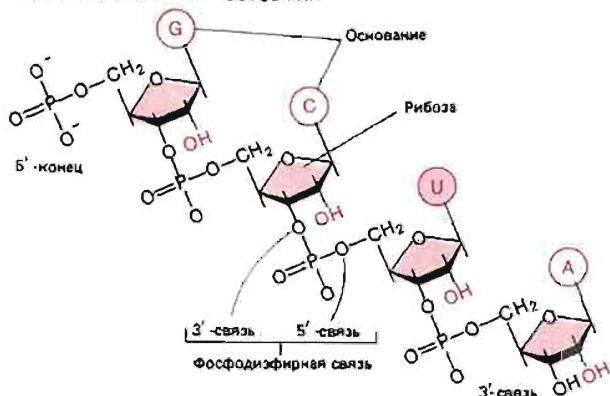
3.2.1. Гены состоят из ДНК

Еще в те времена, когда человек начал сеять культурные растения и разводить домашних животных, было очевидно, что каждое зернышко или оплодотворенная яйцеклетка должна содержать скрытый план или схему развития организма. Значительно позднее, уже в наше время, возникла генетика – наука, в основу которой легли представления о генах – невидимых содержащих информацию элементах, равномерно распределяемых между двумя дочерними клетками при каждом клеточном делении. Гены спермий и яйцеклетки передают наследственную информацию от поколения к поколению.

Хотя наследование биологических свойств и кажется таинственным, логика подсказывает, что в этот процесс должны быть вовлечены построенные из атомов структуры, подчиняющиеся законам физики и химии. Другими словами, гены должны состоять из молекул. Вначале трудно было представить себе природу этих молекул. Что это за молекула, которая могла бы храниться в клетке, направлять процесс развития организма и быть в то же время способной к точной и практически неограниченной репликации?

К концу XIX столетия биологи обнаружили, что *хромосомы* (которые становятся различимыми в ядре в начале деления) являются носителями наследственной информации. Но данные о том, что веществом, из которого состоят гены, является дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) хромосом, были получены значительно позже при изучении бактерий. В 1944 г. было установлено,

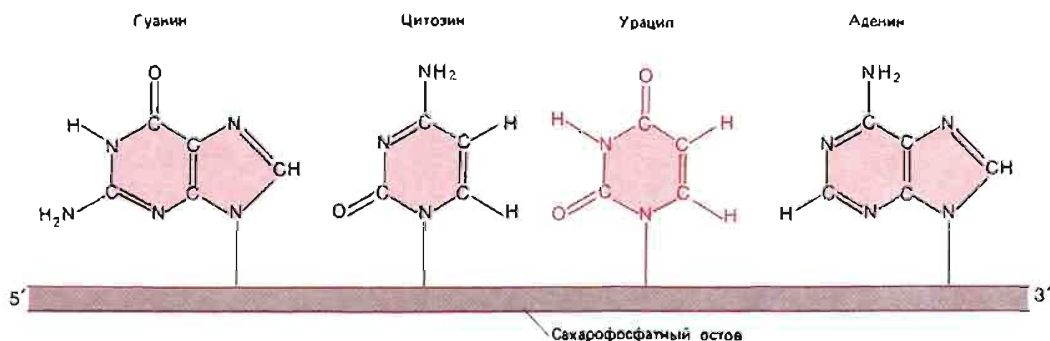
САХАРОФОСФАТНЫЙ ОСТОВ РНК



ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОФОТОГРАФИЯ РНК

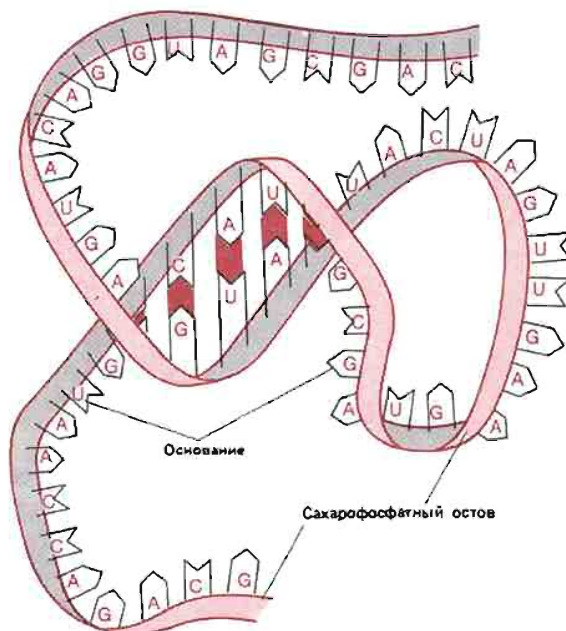


ЧЕТЫРЕ ОСНОВАНИЯ РНК

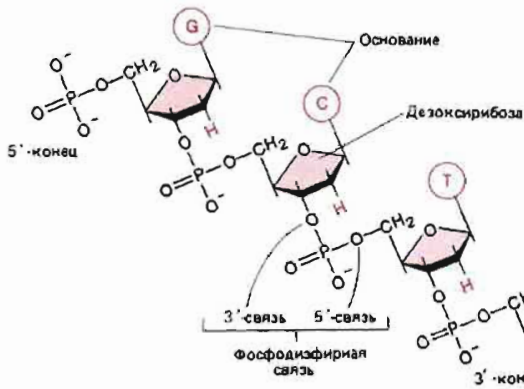


ОДИНОЧНАЯ ЦЕПЬ РНК

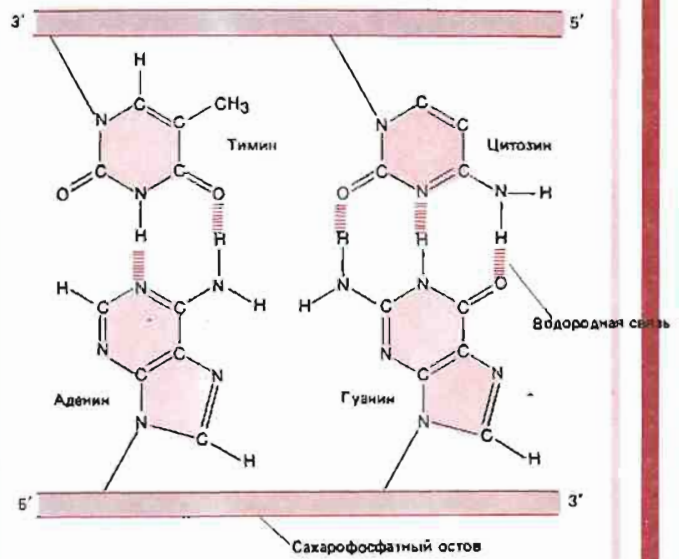
Рис. 3-6. Структура ДНК и РНК. И ДНК, и РНК являются линейными полимерами, состоящими из нуклеотидов (схема VIII). ДНК отличается от РНК тем, что 1) сахарофосфатный остов содержит дезоксирибозу вместо рибозы и 2) вместо азотистого основания урацила (U) в ней находится тимин (T). Специфически связанные водородными связями G и C, а также A и T (в РНК A и U) образуют пары комплементарных оснований. Молекулы ДНК состоят из двух спаренных антипараллельных цепей с комплементарной последовательностью нуклеотидов. Цепи завиты одна вокруг другой в правую спираль так, что на виток спирали приходится около 10 пар оснований. Молекулы РНК одноцепочечные, но содержат короткие спаренные области, образованные разными участками одной молекулы, случайно оказавшимися комплементарными. Конформация двухцепочечных участков РНК показана на рис. 3-7. (Микрофотографии печатаются с любезного разрешения Mei Lie Wong (ДНК) и Peter Wellauer (РНК).)



САХАРОФОСФАТНЫЙ ОСТОВ ДНК

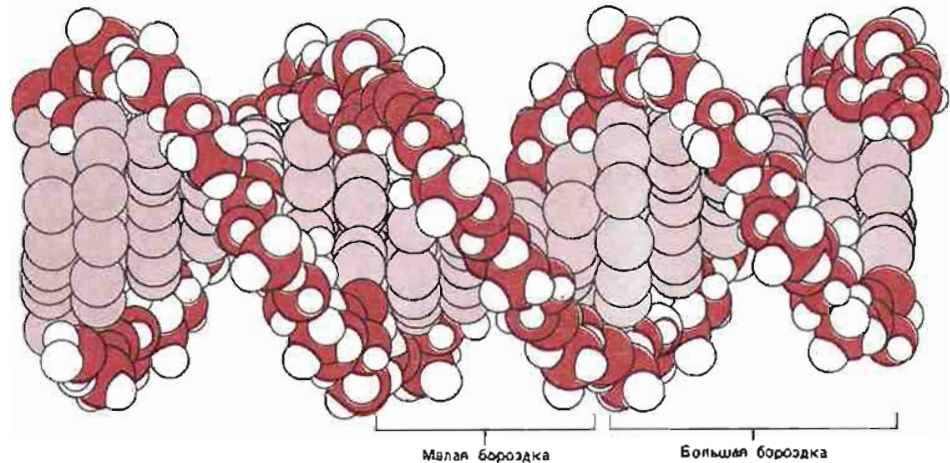
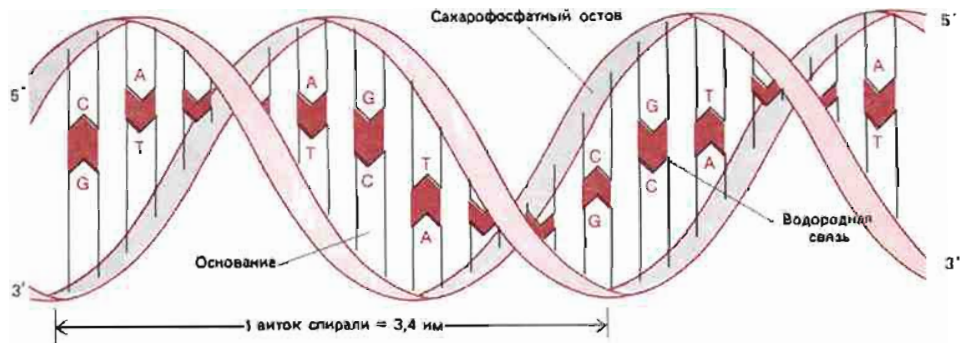


ЧЕТЫРЕ ОСНОВАНИЯ ДНК, ОБРАЗОВАВШИЕ КОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ ПАРЫ



ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОФОТОГРАФИЯ ДНК

ДВОЙНАЯ СПИРАЛЬ ДНК



что очищенная ДНК одного бактериального штамма способна передавать наследственные свойства этого штамма другому штамму, несколько отличному от первого. Это открытие оказалось слишком неожиданным и не получало широкого признания до начала 50-х годов, так как считалось, что лишь белки обладают достаточно сложной конформацией, чтобы быть носителями заключенной в генах информации. Сегодня представление о том, что именно ДНК является носителем генетической информации (хранящейся в ее длинных полинуклеотидных цепях), столь прочно вошло в биологическое мышление, что порой трудно осознать, какой огромный пробел в наших знаниях заполнило это представление.

3.2.2. Молекулы ДНК состоят из двух длинных комплементарных цепей, удерживаемых вместе благодаря спариванию оснований [3]

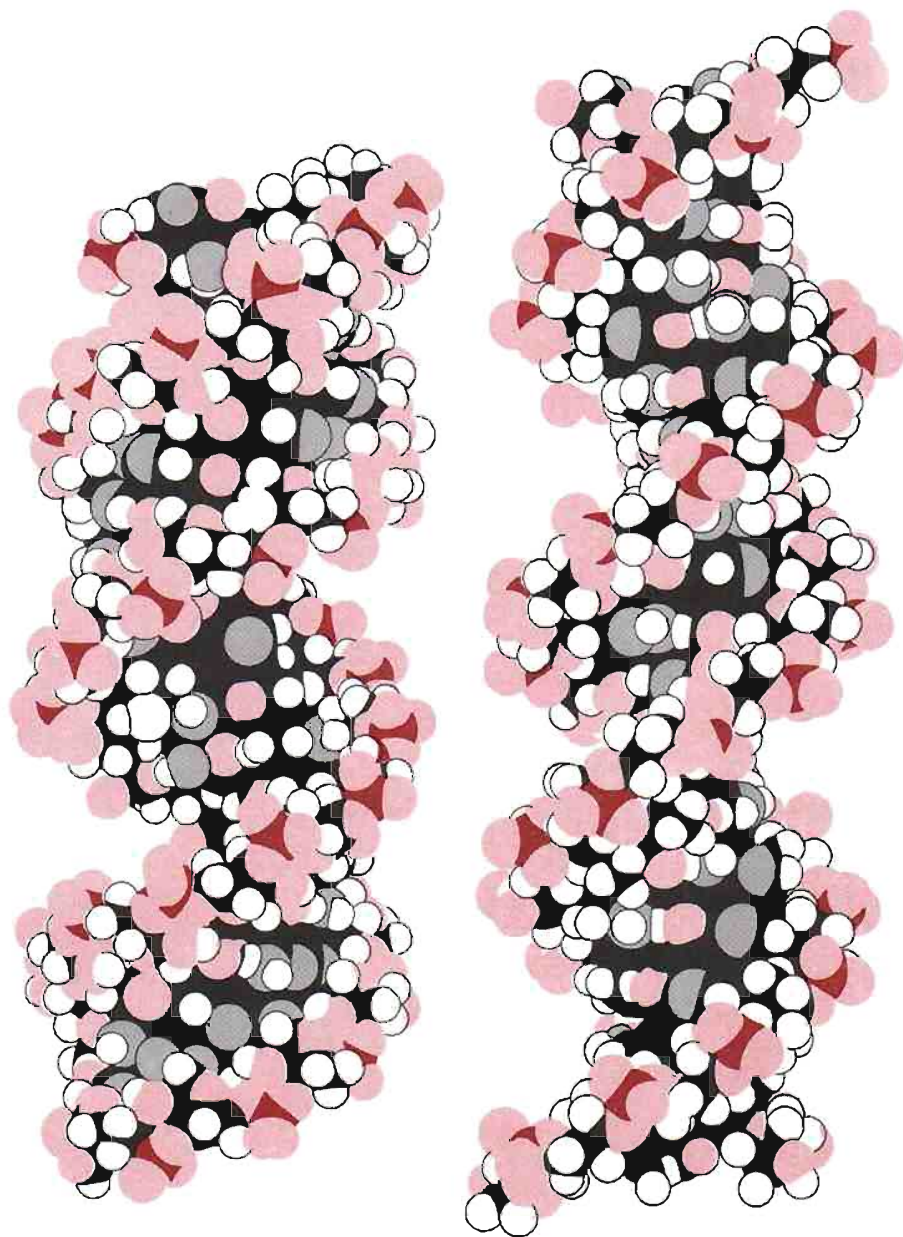
Учитывая простое химическое строение ДНК, легко понять, почему генетики с таким трудом признали в ней вещество генов. ДНК представляет собой длинный неразветвленный полимер, состоящий всего из четырех субъединиц – дезоксирибонуклеотидов, азотистые основания которых представлены аденином (А), цитозином (С), гуанином (G) и тиминном (Т). Нуклеотиды связаны между собой ковалентными фосфодиэфирными связями, соединяющими 5'-атом углерода одного остатка дезоксирибозы с 3'-атомом углерода следующего остатка (схема VIII). Четыре основания присоединены к этой мономерной сахарофосфатной цепи наподобие четырех разных типов бусинок, нанизанных на одну нить (рис. 3-6).

Как же может длинная полинуклеотидная цепь кодировать программу развития целого организма или даже одной клетки? И как эта программа передается от одного поколения клеток другому? Ответ заключен в пространственной структуре молекулы ДНК.

Полученные в начале 50-х годов данные рентгеноструктурного анализа ДНК указывали на то, что молекула ДНК имеет форму спирали, состоящей из двух цепей. Спиральное строение ДНК не вызвало удивления, так как в случае регулярной ориентации соседних субъединиц полимера спирали образуются часто, но тот факт, что ДНК состоит из двух цепей, сыграл решающую роль. На его основе в 1953 г. была построена модель структуры ДНК, удовлетворяющая рентгеноструктурным данным.

Основная особенность этой модели заключается в том, что все основания ДНК расположены *внутри* двойной спирали, а сахарофосфатный остов – *снаружи* (рис. 3-6 и 3-7). Отсюда следует, что основания одной цепи должны быть очень сильно сближены с основаниями другой цепи. В предложенной модели этот контакт столь тесен, что требует специфического нековалентного связывания каждого основания одной цепи с комплементарным основанием другой. Согласно этой модели, оптимальное соответствие цепей достигается в том случае, если при **комплементарном спаривании** одно большое пуриновое основание (А или G – каждое с двойным гетероциклом) связывается с меньшим по размеру пиримидиновым основанием (Т или С – с одинарным гетероциклом). Более того, построение моделей показало, что между G и С или между А и Т образуется больше эффективных водородных связей, чем между любыми другими комбинациями нуклеотидов. Комплементарное спаривание А с Т и G с С в двойной спирали ДНК объяснило результаты проведенного ранее биохимического анализа ДНК разных видов. Анализ этот показывал, что, хотя нуклеотидный состав ДНК широко варьирует (например, содержание А у разных бактерий колеблется от 13 до 39%), наблюдается общая закономерность: количество G всегда равно количеству С и количество А – количеству Т.

Рис. 3-7. Объемные модели двойной спирали ДНК (*справа*) и спирального двухцепочечного участка РНК (*слева*). Обе структуры образованы двумя антипараллельными полинуклеотидными цепями, которые удерживаются спариванием комплементарных оснований. Структуры слегка отличаются друг от друга шагом спирали и ориентацией пар оснований. На данном рисунке ДНК показана в *B-форме спирали*, а РНК – в *A-форме спирали*. Это все единственно возможные двухспиральные формы ДНК и РНК (т. 2, разд. 8.1.7), но наиболее стабильные. (Печатается с любезного разрешения Sung-Hou Kim.)



3.2.3. Структура ДНК дает ключ к пониманию механизмов наследственности [4]

Биологическая информация, записанная в генах, должна точно копироваться и передаваться клеткам-потомкам. Огромное значение открытия двухцепочечной структуры ДНК состоит в том, что предсказанная структура сразу же позволила предложить общие принципы осуществления этого важнейшего процесса передачи информации. Поскольку каждая цепь содержит последовательность нуклеотидов, в точности *комплементарную* последовательности цепи-партнера, то на деле обе цепи несут одну и ту же генетическую информацию. Если обозначить две цепи А и А', то цепь А служит шаблоном, или *матрицей*, для образования новой цепи А', а цепь А' может играть ту же роль в образовании новой цепи А. Таким образом, генетическая информация может копи-

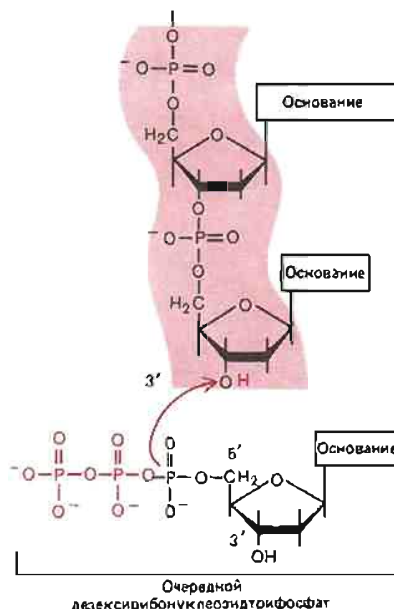


Рис. 3-9. Основная реакция при синтезе новых молекул ДНК—это добавление дезоксирибонуклеотида к 3'-концу растущей цепи.

роваться при разделении цепей А и А', что позволяет каждой из них служить матрицей для образования нового комплементарного партнера.

Уже сам по себе механизм комплементарного копирования указывает, что наследственная информация ДНК записана в линейной последовательности нуклеотидов. Каждый нуклеотид—А, G, T или C—можно рассматривать как букву в простом четырехбуквенном алфавите, который используется для написания биологических инструкций в виде линейной «телеграфной ленты». Животные разных видов отличаются друг от друга потому, что молекулы ДНК их клеток имеют различную последовательность нуклеотидов и, следовательно, различное информационное содержание.

Число различных последовательностей ДНК, которые могут быть составлены из n нуклеотидов, равно 4^n . Поэтому ДНК даже умеренной длины способна обеспечить колоссальное биологическое разнообразие, не говоря уже о ДНК типичной животной клетки, достигающей в длину 1 м ($3 \cdot 10^9$ нуклеотидов). Наследственная информация, мелкого бактериального вируса, записанная в виде линейной последовательности четырех букв, занимает целую страницу текста (рис. 3-8), а записанная в таком виде генетическая информация клетки животного заняла бы книгу толщиной более 500 000 страниц!

Хотя принцип репликации генов прост и элегантен, реальный клеточный аппарат копирования сложен и включает в себя много различных белков. Основная реакция показана на рис. 3-9. Фермент ДНК-полимераза катализирует присоединение дезоксирибонуклеотида к 3'-концу цепи ДНК. Каждый нуклеотид вступает в реакцию в форме дезоксирибонуклеозидтрифосфата; высвобождение из этой активированной формы пиродифосфата и его последующий ги-

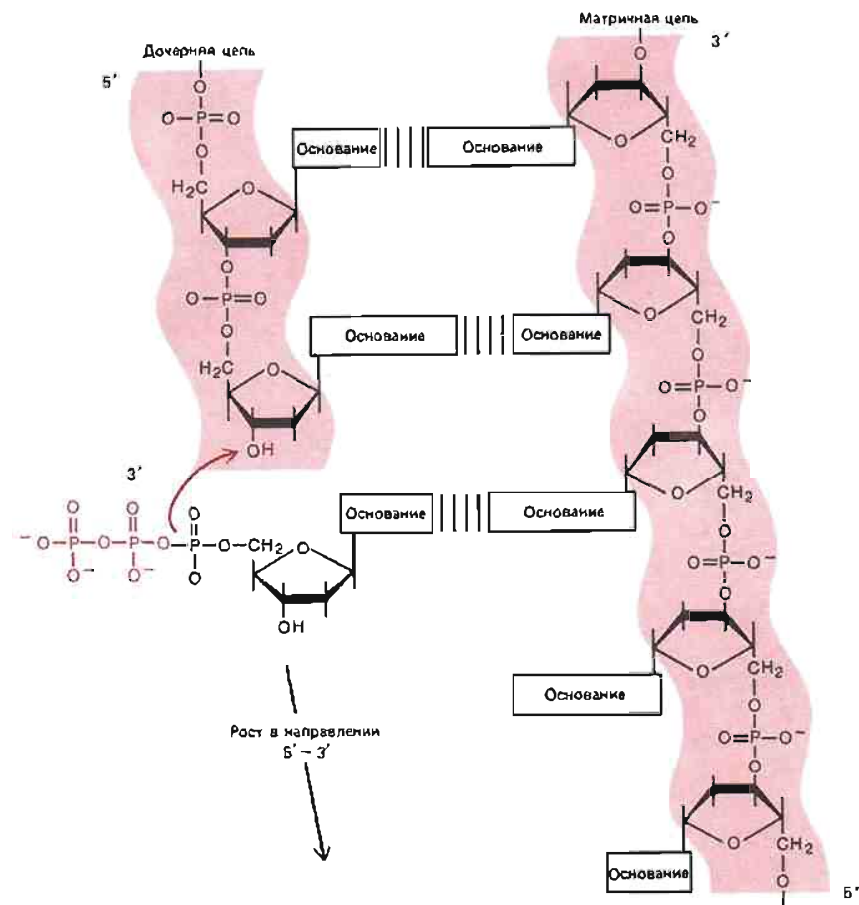
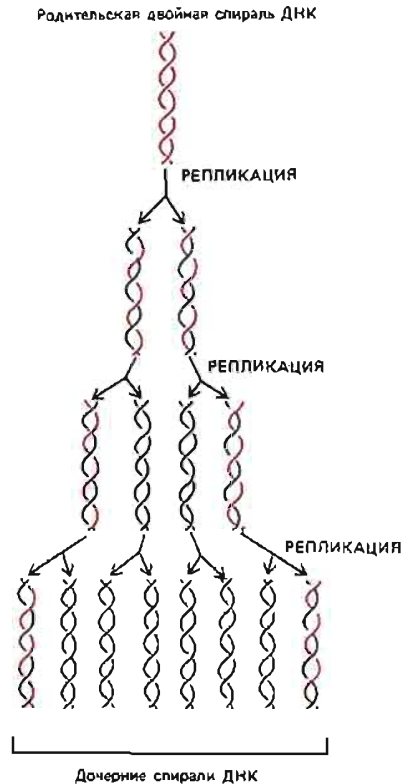


Рис. 3-10. Спаривание оснований поступающих дезоксирибонуклеотидов и исходной (матричной) цепи ДНК направляет образование дочерней цепи ДНК с комплементарной последовательностью оснований.

Рис. 3-11. Полуконсервативная репликация ДНК. В каждом цикле репликации каждая из двух цепей ДНК используется в качестве матрицы для образования новой комплементарной цепи. Поэтому на протяжении многих клеточных поколений индивидуальные цепи сохраняют свою целостность.



дроллиз обеспечивают энергией реакцию репликации ДНК и делают ее фактически необратимой (разд. 2.4.3).

Репликация ДНК начинается с локального разделения двух комплементарных цепей. Затем каждая цепь используется в качестве матрицы для образования новой молекулы ДНК путем последовательного присоединения дезоксирибонуклеотидов (рис. 3-10). Выбор каждого следующего нуклеотида происходит на основе его способности образовывать комплементарную пару с очередным нуклеотидом родительской матричной цепи. Так возникает новая дочерняя цепь, комплементарная по последовательности матричной цепи. В результате генетическая информация полностью удваивается – в конце концов образуются две полные двойные спирали ДНК, каждая из которых идентична родительской молекуле ДНК по последовательности нуклеотидов. Поскольку две цепи родительской молекулы в конце концов оказываются в разных дочерних молекулах ДНК, механизм репликации называют «полу-консервативным» (рис. 3-11).

3.2.4. Ошибки репликации ДНК приводят к мутациям [5]

Наиболее впечатляющая особенность репликации ДНК – ее высокая точность, которая обеспечивается наличием специального комплекса белков – «репликативной машины». Эта «машина» выполняет три функции: 1) выбирает правильный, способный к комплементарному спариванию с матрицей нуклеотид; 2) катализирует образование ковалентной связи между каждым новым нуклеотидом и концом растущей цепи; 3) корректирует цепь, удаляя неправильно включившиеся нуклеотиды. Точность репликативной машины столь высока, что число ошибок составляет менее 1 на 10^9 нуклеотидов.

Но иногда, хоть и очень редко, репликативная машина пропускает несколько оснований или вставляет несколько лишних, включает Т вместо С или А вместо G. Каждое такое изменение последовательности ДНК – гене-

тическая ошибка, называемая **мутацией**. Такие ошибки будут воспроизводиться во всех последующих поколениях клеток, так как «плохие» последовательности ДНК копируются столь же успешно, как и «хорошие». Окажет ли такая мутация существенное влияние на клетку, будет зависеть от ее локализации в хромосоме.

В начале 40-х годов генетики окончательно доказали, что единицы наследственности, называемые генами, определяют структуру индивидуальных белков. Поэтому мутация гена, вызванная изменением последовательности его ДНК, может инактивировать ключевой белок, и клетка тогда погибнет. В результате измененная последовательность ДНК потеряется. Во многих случаях, однако, мутация может затронуть несущественный участок гена и, следовательно, не приведет к заметным последствиям; такие мутации называют *нейтральными* или *молчащими*. Очень редко ошибка комплементарного копирования может привести к «улучшению» гена: образующийся белок будет обладать улучшенными ферментативными свойствами или более эффективной структурой. В этих редких случаях несущий мутацию организм будет иметь преимущества и мутантный ген может в конце концов путем естественного отбора заменить исходный ген в большей части популяции.

3.2.5. Последовательность нуклеотидов в гене определяет последовательность аминокислот в белке [6]

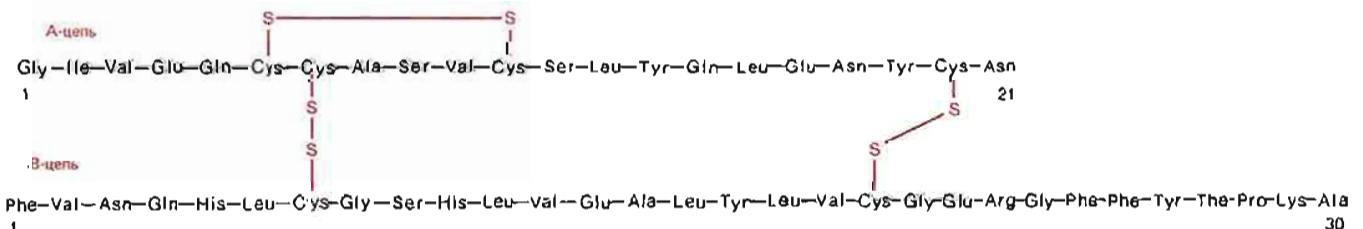
Содержащаяся в ДНК информация непосредственного влияния на клетку не оказывает. Лишь использование этой информации для синтеза белков определяет физические и химические свойства клеток.

Примерно в то же время, когда биофизики с помощью дифракции рентгеновских лучей исследовали пространственную структуру ДНК, биохимики интенсивно изучали химическое строение белков. Уже было известно, что белки — это цепи аминокислот, последовательно соединенных пептидными связями, но еще не было уверенности в том, что последовательность каждого конкретного белка уникальна. Сомнения рассеялись лишь в начале 50-х годов, когда была определена последовательность аминокислот маленького белка *инсулина*. Было установлено, что молекула инсулина образована полипептидной цепью со строго определенной последовательностью аминокислот (рис. 3-12).

Подобно тому как для выяснения молекулярных основ генетики и наследственности решающую роль сыграла расшифровка структуры ДНК, определение последовательности инсулина имело основополагающее значение для выяснения структуры и функций белков. Если инсулин имеет определенную генетически детерминированную последовательность, то, видимо, то же относится и ко всем другим белкам. Более того, можно предположить, что свойства того или иного белка должны зависеть от той конкретной последовательности, в которой расположены в этом белке аминокислоты.

И ДНК, и белки образованы линейной последовательностью мономеров. В результате биохимического анализа белков — продуктов мутантных генов — в конце концов было показано, что последовательность двух этих полимеров коллинеарна: последовательность нуклеотидов в участке ДНК, кодирующем

Рис. 3-12. Последовательность аминокислот инсулина крупного рогатого скота. Инсулин состоит из двух полипептидных цепей с уникальной, генетически запрограммированной последовательностью аминокислот. Для обозначения аминокислот использованы трехбуквенные символы, приведенные на схеме VII (стр. 76). Показаны дисульфидные ($-S-S-$) связи между остатками цистеина.



белок, соответствует последовательности аминокислот в этом белке. Когда это было установлено, центральной проблемой молекулярной биологии стал вопрос о том, как же клетка осуществляет такое биохимически сложное превращение, как перевод последовательности нуклеотидов ДНК в последовательность аминокислот белка (трансляцию).

3.2.6. С последовательностью ДНК снимаются РНК-копии для синтеза белка [7]

При синтезе белка определенные участки ДНК (называемые *кодирующими участками* или *генами*) копируются в виде другого полинуклеотида – рибонуклеиновой кислоты, или РНК, – отличающегося от ДНК как по химическому составу, так и по выполняемой функции. Подобно ДНК, РНК образована линейной последовательностью нуклеотидов, но имеет два небольших химических отличия: 1) вместо дезоксирибозы сахарофосфатный остов содержит сахар рибозу и 2) вместо основания тимина (Т) в РНК содержится близкородственное основание урацил (U) (рис. 3-6).

РНК сохраняет все информационное содержание той ДНК, копией которой она является. Она сохраняет также способность к спариванию комплементарных оснований, поскольку U спаривается с А таким же образом, как и Т (рис. 3-6). Синтез молекул РНК называется **транскрипцией ДНК**; во многих отношениях он аналогичен репликации ДНК. Одна из цепей ДНК служит матрицей, на которой испытывается способность очередных нуклеотидов к комплементарному спариванию. При хорошем соответствии с ДНК-матрицей рибонуклеотид включается в растущую цепь РНК как ковалентно связанная составная часть.

Транскрипция отличается от репликации ДНК рядом важных особенностей. Во-первых, РНК-продукт не остается комплементарно связанным с ДНК-матрицей. Как только синтез копии РНК завершен, исходная двойная спираль ДНК восстанавливается, а молекула РНК освобождается. Таким образом, молекулы РНК одноцепочечные. Более того, молекулы РНК короче ДНК, так как являются копиями участков ДНК ограниченной длины – достаточной для кодирования одного или нескольких белков. Количество молекул РНК, копируемых с конкретного участка ДНК, может контролироваться так, что некоторые гены используются для синтеза очень больших количеств РНК, тогда как другие не транскрибируются совсем. В значительной степени контроль активности генов возможен благодаря наличию *регуляторных белков*, определяющих подлежащие копированию участки ДНК (т. 2, разд. 8.4.4).

В каждом клеточном поколении один и тот же участок ДНК может транскрибироваться тысячи раз. В клетках эукариот многие из образующихся при этом РНК-транскриптов, прежде чем покинуть ядро и превратиться в **информационные РНК** (матричные РНК, мРНК), направляющие синтез белка в цитоплазме, претерпевают существенные химические изменения. Поскольку на каждой молекуле мРНК могут быть синтезированы тысячи копий данной полипептидной цепи, информация, заключенная в небольшом участке ДНК, способна направлять синтез большого количества определенного белка. Рассмотрим, например, белок *фибруин* – основной компонент шелка: один ген фиброина в каждой клетке шелкоотделительной железы производит 10^4 молекул мРНК, на каждой из которых синтезируется 10^5 молекул фиброина, что за 4 сут даст 10^9 молекул фиброина на клетку.

3.2.7. Последовательность мРНК «считывается» группами по три нуклеотида и переводится в последовательность аминокислот [8]

Правила перевода последовательности полинуклеотидов в аминокислотную последовательность белков – так называемый **генетический код** – были расшифрованы в начале 60-х годов. Оказалось, что последовательность нуклеоти-

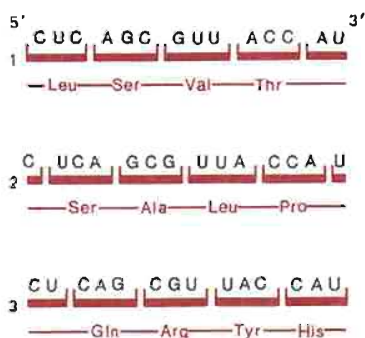


Рис. 3-13. Три рамки считывания, возможные при синтезе белка. Последовательность нуклеотидов РНК считывается по порядку от 5'-к 3'-концу по три нуклеотида и таким образом переводится в последовательность аминокислот. Поэтому одна и та же последовательность РНК может в принципе в зависимости от «рамки считывания» кодировать три совершенно различные последовательности аминокислот.

Рис. 3-14 Генетический код. При синтезе белка триплеты нуклеотидов РНК (кодона) транслируются в соответствующие им аминокислоты. Например, кодоны GUG и GAG направляют включение в белок соответственно валина и глутаминовой кислоты. Обратите внимание, что кодоны с U или C во втором положении обычно кодируют более гидрофобные аминокислоты (схема VII, стр. 76).

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

дов молекулы мРНК – посредника при передаче информации от ДНК к белку – считывается по порядку группами из трех нуклеотидов. Каждый триплет нуклеотидов, или **кодон**, определяет включение одной аминокислоты, и в принципе каждая молекула РНК может быть прочитана в любой из трех *рамок считывания* в зависимости от того, с какого именно нуклеотида молекулы начался процесс декодирования (рис. 3-13). Почти всегда лишь одна из трех рамок считывания дает функциональный белок. Поскольку, за исключением начала и конца кодирующего участка, информация записана в РНК без знаков препинания, рамка считывания устанавливается при инициации трансляции и сохраняется на протяжении всего процесса.

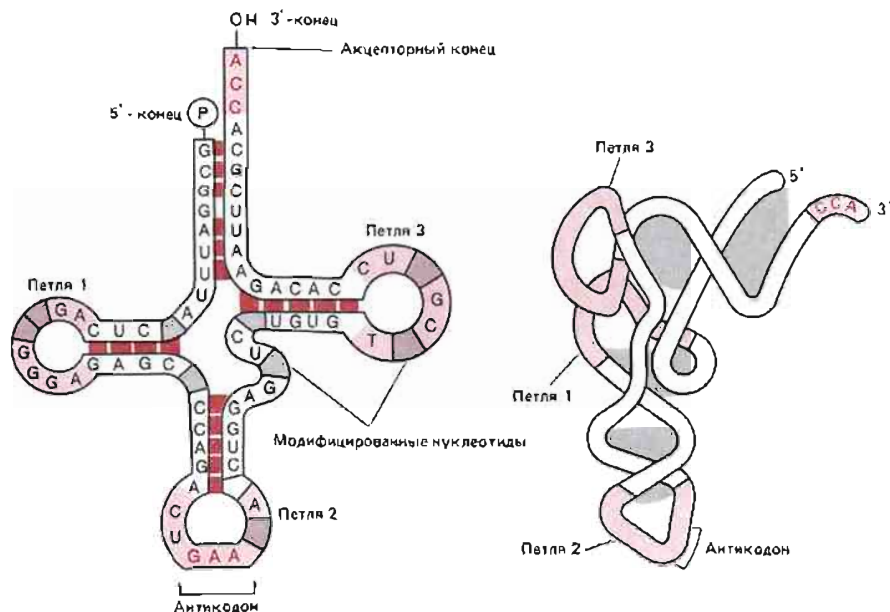
Поскольку РНК является линейным полимером, состоящим из нуклеотидов четырех типов, то всего имеется $4^3 = 64$ возможных триплета (напомним, что важное значение имеет *последовательность* нуклеотидов триплета). Учитывая, что в белках находят всего 20 различных аминокислот, можно сделать вывод, что большинство аминокислот должно кодироваться несколькими триплетами; другими словами, генетический код *вырожден*. Генетический код приведен на рис. 3-14. Код чрезвычайно консервативен и одинаков у столь далеких организмов, как бактерии, растения и человек.

3.2.8. Соответствие между аминокислотами и триплетами нуклеотидов устанавливают молекулы тРНК [9]

Кодоны мРНК узнают соответствующие аминокислоты не прямым путем – не так, как фермент узнает субстрат. При трансляции используются «адапторы» – молекулы, узнающие и аминокислоту, и триплет нуклеотидных оснований. Роль адапторов выполняет набор маленьких (длиной всего 70–90 нуклеотидов каждая) молекул РНК, называемых **транспортными РНК** (или тРНК).

Каждая молекула тРНК имеет характерную пространственную структуру, поддерживаемую теми же нековалентными взаимодействиями, которые удерживают вместе две цепи в двойной спирали ДНК. Как отмечалось выше, двойная спираль ДНК стабилизируется суммарной энергией многих комплементарных пар оснований. В одноцепочечном полинуклеотиде вроде тРНК аналогичное комплементарное взаимодействие осуществляется между нуклео-

Рис. 3-15. Фенилаланиновая тРНК дрожжей. На рисунке слева последовательность нуклеотидов изображена так, чтобы были видны взаимно комплементарные участки, образующие спиральные участки молекулы. Справа приведено схематическое изображение реальной формы молекулы тРНК, основанное на данных рентгеноструктурного анализа. Участки, в которых пары оснований удерживают вместе сегменты цепи, выделены серым цветом.



тидами *одной и той же* цепи. Эти-то взаимодействия и заставляют молекулу тРНК принять определенную конформацию, существенную для выполнения функций адаптора. Четыре коротких участка молекулы имеют двухспиральную структуру, подобную той, которая показана на рис. 3-7. Но особенно важную роль играют три неспаренных нуклеотидных остатка, расположенных на противоположных концах молекулы: один такой триплет с варьирующей последовательностью оснований образует *антикодон*, способный спариваться с комплементарным триплетом молекулы мРНК, а триплет на 3'-конце молекулы тРНК (*ССА-последовательность*) ковалентно связывается со специфической аминокислотой (рис. 3-15).

Имеющиеся экспериментальные данные указывают на то, что другие типы молекул РНК, в том числе мРНК и **рибосомная РНК (рРНК)**, образующая структурное ядро *рибосом* (см. ниже), также содержат участки с определенной пространственной конформацией, хотя эти молекулы значительно больше тРНК и не столь компактно уложены.

3.2.9. Считывание мРНК от одного конца до другого осуществляют рибосомы [10]

Перенос информации от мРНК к белку основан на том же принципе спаривания комплементарных оснований, что и перенос генетической информации от ДНК к ДНК и от ДНК к РНК (рис. 3-16). Однако процесс правильного расположения молекул тРНК на мРНК сложен и осуществляется **рибосомами** — комплексами, образованными почти сотней различных белков, связанных с несколькими молекулами РНК (рРНК), выполняющими структурную роль. Каждая рибосома работает как большая биохимическая машина, на которой молекулы тРНК выстроены так, чтобы считывать закодированные в мРНК генетические инструкции. Сначала рибосома связывается со специальным участком молекулы мРНК и таким образом определяет рамку считывания и аминоконцевую аминокислоту белка. Затем рибосома по мере передвижения по молекуле мРНК транслирует кодон за кодоном, используя молекулы тРНК для последовательного присоединения аминокислот к растущему концу полипептидной цепи (рис. 3-17). Достигнув конца кодирующей части матрицы, рибосома и новосинтезированный карбоксильный конец белка отсоеди-

Рис. 3-16. Поток информации при синтезе белка. С участка одной из цепей ДНК снимается комплементарная копия – матричная РНК. Затем нуклеотиды матричной РНК последовательно – триплет за триплетом – связывают комплементарные нуклеотиды антикодоновой петли определенных молекул тРНК. С противоположного конца молекул тРНК с помощью богатой энергией связи присоединена аминокислота. Эта аминокислота присоединяется к концу растущей белковой цепи при взаимодействии антикодона тРНК с кодоном мРНК. Таким образом, перевод последовательности нуклеотидов мРНК в последовательность аминокислот белка основан на комплементарном спаривании кодонов мРНК с антикодонами соответствующих молекул тРНК. Молекулярные основы переноса информации при трансляции оказываются аналогичными таковым при репликации и транскрипции ДНК.

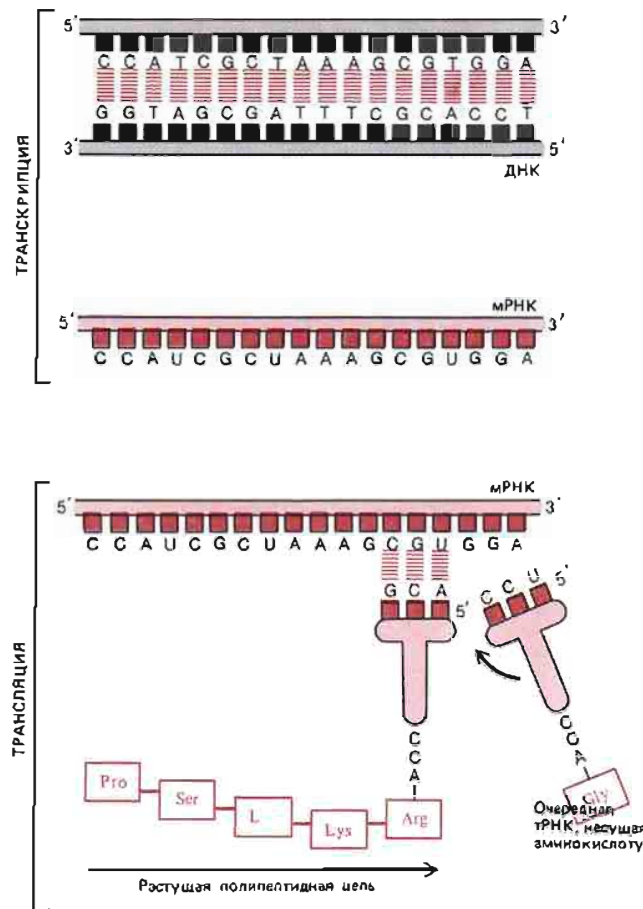
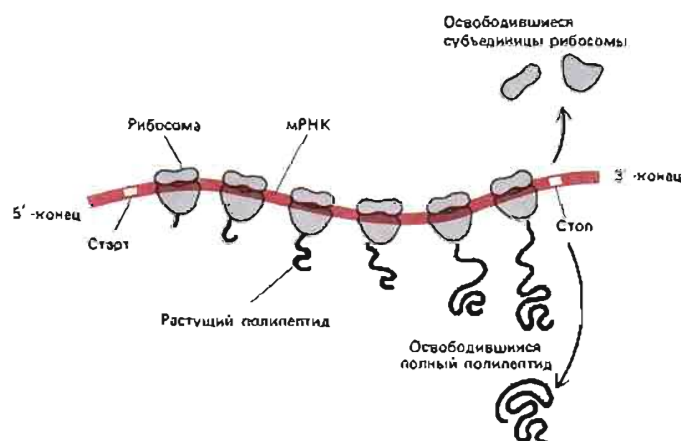


Рис. 3-17. Схема синтеза белка на рибосомах. Рибосомы присоединяются к стартовому сигналу вблизи 5'-конца молекулы мРНК и передвигаются к 3'-концу, синтезируя по пути белок. Часто по одной молекуле мРНК движется сразу несколько рибосом, такая структура называется полирибосомой.



наются от 3'-конца мРНК и переходят в цитоплазму клетки. Подробнее структура рибосом и механизм синтеза белка описаны в гл. 5.

Рибосомы работают очень эффективно: в 1 с одна бактериальная рибосома присоединяет к растущей полипептидной цепи 20 аминокислот, а человеческий организм за 1 с производит $5 \cdot 10^{14}$ молекул гемоглобина – белка с уникальной последовательностью 574 аминокислот.

Заключение

Генетическая информация записана в линейной последовательности нуклеотидов ДНК. Каждая молекула ДНК состоит из двух комплементарных полинуклеотидных цепей, удерживаемых вместе водородными связями, образующими GC- и AT-пары оснований. Репликация ДНК, обеспечивающая удвоение генетической информации, происходит путем образования новой комплементарной цепи на каждой из исходных цепей.

Экспрессия генетической информации осуществляется путем трансляции линейной последовательности нуклеотидов ДНК в коллинеарную последовательность аминокислот новосинтезированной полипептидной цепи белка. Сначала с ограниченного участка ДНК снимается комплементарная мРНК-копия, которая затем с помощью молекулярной «машины», называемой рибосомой, транслируется с образованием белка. Используемые в синтезе белка аминокислоты присоединяются к небольшим молекулам тРНК, каждая из которых путем комплементарного спаривания оснований узнает набор из трех нуклеотидов мРНК. Последовательность нуклеотидов мРНК считывается от одного конца к другому триплетами нуклеотидов в соответствии с универсальным генетическим кодом.

3.3. Структура белка [11]

Клетки в значительной степени состоят из белков, на долю которых приходится более половины их сухого вещества (табл. 3-1). Белки определяют структуру и форму клетки; кроме того, они служат инструментами молекулярного узнавания и катализа. ДНК, хотя и содержит всю необходимую для построения клетки информацию, хранит ее в «академической» манере, не участвуя непосредственно в клеточных процессах. Например, перенос кислорода – характерное свойство гемоглобина, а не гена, кодирующего этот белок. Используя компьютерную терминологию, можно сказать, что нуклеиновые кислоты представляют собой «программное обеспечение» – инструкции, полученные клеткой от родительской клетки. Белки составляют «аппаратное обеспечение» – физические механизмы, осуществляющие хранящуюся в памяти программу.

Подобное различие функций нуклеиновых кислот и белков находит свое отражение в химической природе составляющих их субъединиц. Молекулы ДНК и РНК состоят из химически очень похожих нуклеотидов, образующих гигантские молекулы, свойства которых практически не зависят от последовательности. В отличие от этого белки собраны из 20 совершенно различных аминокислот, каждая из которых имеет ярко выраженную химическую индивидуальность (схема VII, стр. 76).

Это разнообразие лежит в основе необычайной универсальности химических свойств различных белков.

3.3.1. Конформация белковой молекулы определяется ее аминокислотной последовательностью [12]

В полипептидной цепи возможно свободное вращение вокруг многих связей, поэтому любая молекула белка способна в принципе принимать огромное количество различных форм, или **конформаций**. Но в биологических условиях большинство полипептидных цепей существует лишь в одной из этих конформаций. Обусловлено это слабыми нековалентными взаимодействиями боковых групп разных аминокислот друг с другом и с водой (схема IX, стр. 114). Одна определенная конформация оказывается необычайно стабильной, какая именно – зависит от конкретного расположения аминокислот в полипептидной цепи.

Полипептидная цепь большинства белков самопроизвольно сворачивается

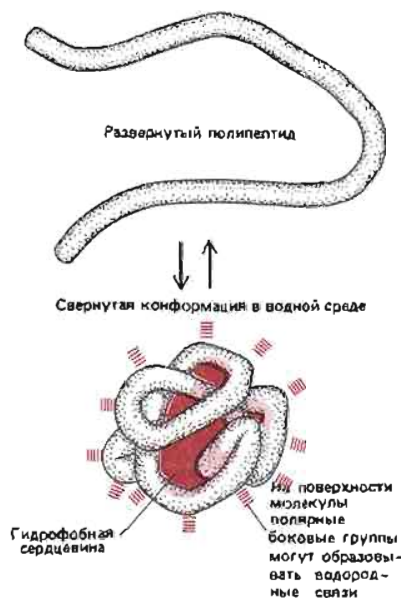


Рис. 3-18. Схематически показано, как белок свертывается в глобулу. Полярные боковые группы аминокислот стремятся расположиться на наружной поверхности белка. Неполярные боковые группы аминокислот расположены внутри, где образуют «спрятанное» от воды гидрофобное «ядро».

с образованием правильной конформации. Например, белок можно развернуть, или *денатурировать*, до потерявшей исходную конформацию гибкой полипептидной цепи. Но при достаточно мягком денатурирующем воздействии денатурация обычно обратима, и развернутая полипептидная цепь сама может свернуться в исходную конформацию. Такое поведение свидетельствует о том, что вся информация, определяющая конформацию белковой молекулы, должна содержаться в самой последовательности аминокислот.

Одним из важнейших факторов, направляющих свертывание полипептидной цепи, является расположение полярных и неполярных боковых групп. По мере синтеза белка его многочисленные гидрофобные боковые группы стремятся собраться внутри белковой глобулы, что позволяет им избежать контакта с водным окружением (точно так же сливаются механически диспергированные в воде капельки масла). В то же время все полярные группы стремятся расположиться на поверхности молекулы белка, где они могут взаимодействовать с водой и другими полярными группами (рис. 3-18). Пептидные группы белков сами достаточно полярны, поэтому они стремятся образовать водородные связи друг с другом и с полярными боковыми группами (рис. 3-19). Именно таким путем происходит спаривание почти всех полярных групп, оказывающихся внутри белковой глобулы. Таким образом, водородные связи играют главную роль во взаимодействии разных участков одной полипептидной цепи в свернутой молекуле белка; кроме того, они имеют исключительно важное значение для многих взаимодействий, происходящих на поверхности белковых молекул.

Белки, оказавшиеся вне цитоплазмы (секретируемые белки или белки клеточной поверхности), часто образуют дополнительные ковалентные связи между разными участками одной и той же полипептидной цепи. Например, образование **дисульфидных связей** (называемых также —S—S-мостиками) между двумя SH-группами цистеина, оказавшимися по соседству в свернутой полипептидной цепи, стабилизирует пространственную структуру внеклеточных белков (рис. 3-20); для правильного свертывания образования дисульфидных связей не требуется. —S—S-мостики редко образуются в белках ци-

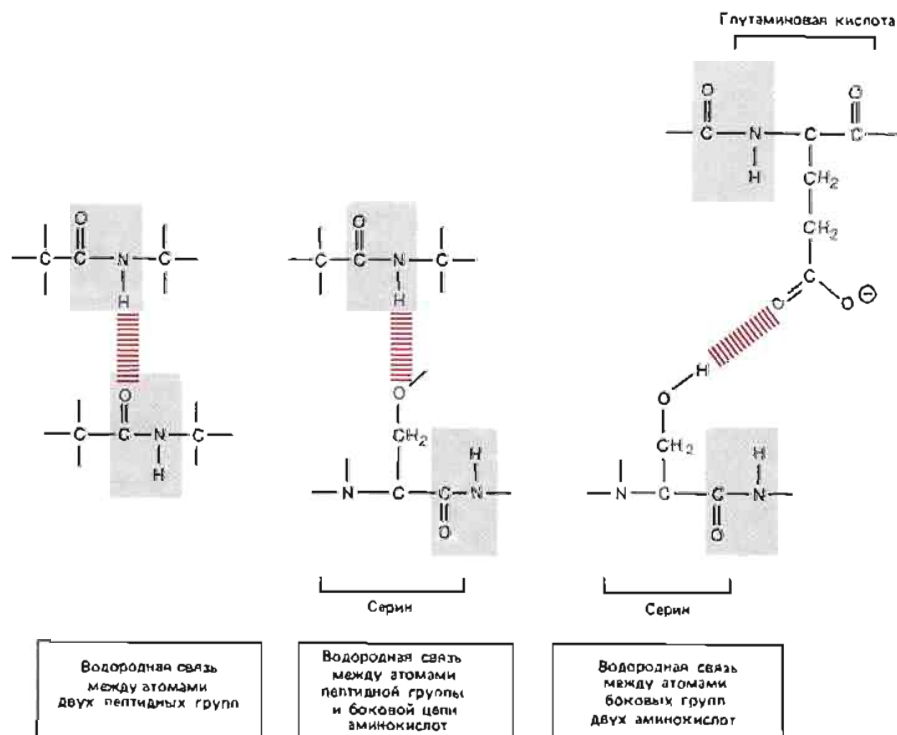
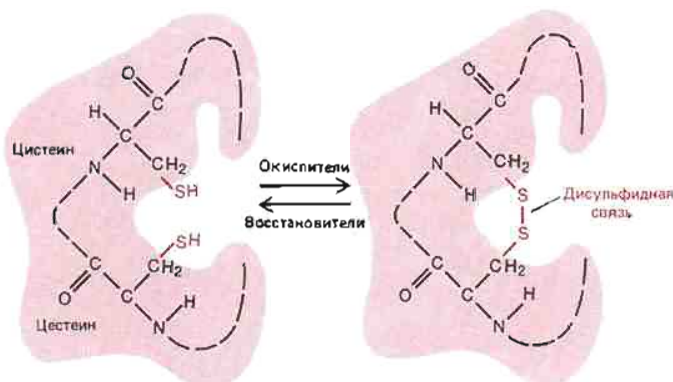


Рис. 3-19. Некоторые из водородных связей, которые могут образовываться между аминокислотами в белках (показаны широкими прерывистыми линиями).

Рис. 3-20. Образование ковалентной дисульфидной связи между соседними остатками цистеина белка.



тозоля, что объясняется высокой внутриклеточной концентрацией глутатиона-соединения, восстанавливающего SH-группы.

Общий результат всех индивидуальных взаимодействий аминокислот состоит в том, что большинство молекул белка спонтанно принимает характерную для них конформацию: обычно компактную глобулярную, но изредка и вытянутую фибриллярную. Сердцевина глобулы образована плотно упакованными, почти как в кристалле, гидрофобными боковыми группами, а полярные боковые группы формируют сложную и нерегулярную наружную поверхность. Специфичность связывания белка с малыми молекулами и с другими макромолекулярными поверхностями определяется расположением и химическими свойствами различных атомов на этой сложной поверхности (см. ниже). С химической точки зрения белки – наиболее сложные из известных молекул.

3.3.2. Одни и те же способы укладки цепи постоянно повторяются в разных белках [13]

Хотя аминокислотная последовательность полипептидной цепи и содержит всю необходимую для ее свертывания информацию, мы до сих пор не знаем, как эту информацию прочесть, чтобы по последовательности детально предсказать пространственную структуру белка. В результате нативную конформацию белка можно определить лишь с помощью очень трудоемкого метода рентгеноструктурного анализа белковых кристаллов. Этим методом к настоящему времени полностью проанализировано более 200 белков. Специфическая конформация каждого из них столь сложна, что для ее детального описания потребовалась бы целая глава.

На рис. 3-21, А и Б на примере белка лизоцима показано, как можно представить полную структуру белка с помощью объемной или скелетной модели. Поскольку за множеством деталей, заметных в моделях этого типа, можно не различить хода полипептидной цепи, конформацию белка легче изображать с помощью более схематических моделей (рис. 3-21, В и Г). В этих моделях не показаны боковые цепи аминокислот и реальные атомы, поэтому легче проследить за ходом полипептидной цепи.

При сравнении пространственной структуры различных белков выяснилось, что, хотя конформация каждого белка уникальна, несколько способов укладки цепи постоянно повторяются в отдельных частях макромолекул. Особенно часто встречаются два способа укладки, поскольку они обусловлены правильным образованием водородных связей между самими пептидными группами, а не уникальными взаимодействиями боковых цепей. Оба способа были правильно предсказаны в 1951 г. с помощью моделей, основанных на результатах рентгеноструктурного анализа шелка и волос. Сейчас эти периодические структуры называют β -складчатым слоем и α -спиралью. В β -складчатой конформации находится белок шелка фиброин, α -спираль об-

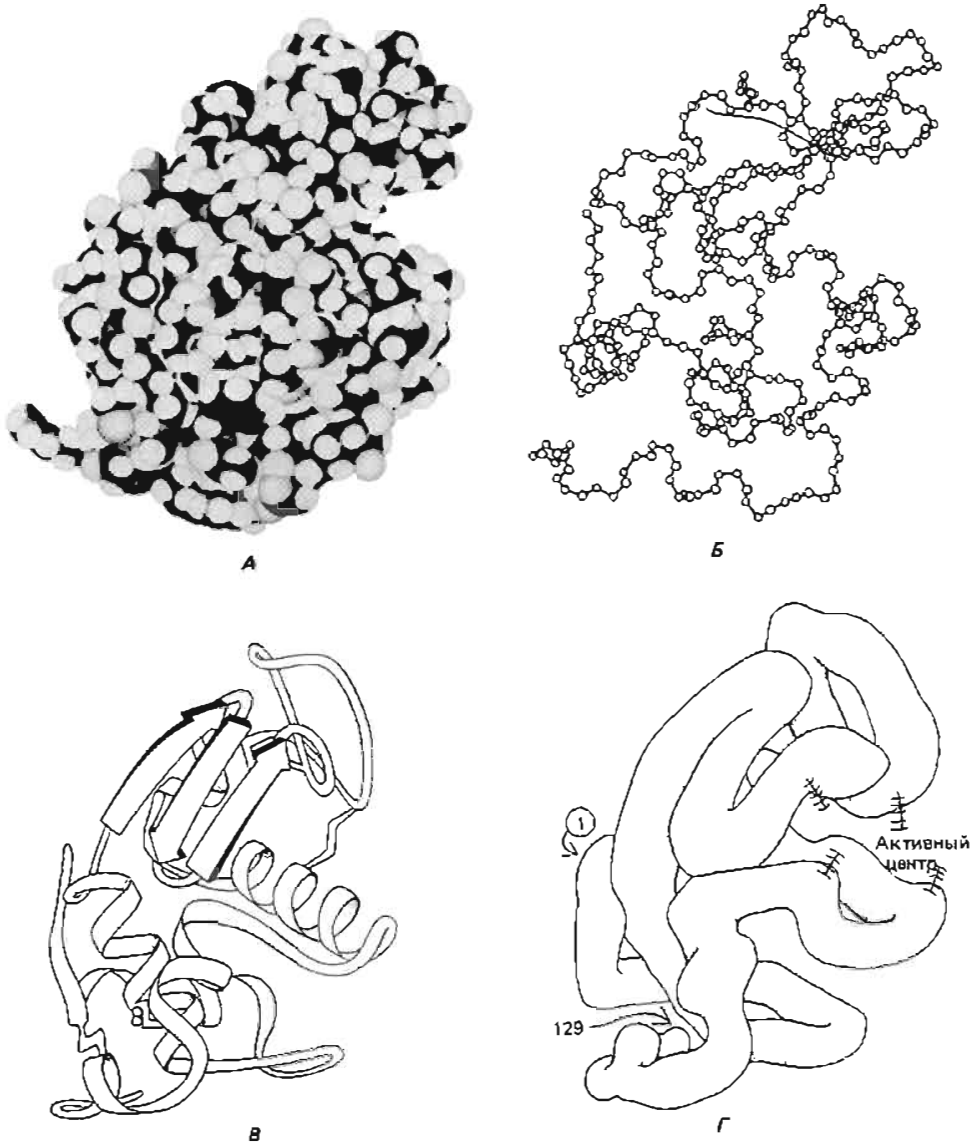


Рис. 3-21. Пространственная конформация лизоцима яичного белка, представленная четырьмя обычно используемыми способами. *А.* Объемная модель, показывающая радиусы всех атомов. *Б.* Скелетная модель; видны линии, соединяющие атомы полипептидного остова. *В.* «Лентовидная» модель полипептидной цепи; показаны все участки, в которых образуются регулярные водородные связи: спирали изображены α -спирали, а несколькими стрелками — β -

слои. *Г.* В «сосисочной» модели опущены все детали и показан лишь ход полипептидной цепи. Следует иметь в виду, что сердцевина всех глобулярных белков плотно заполнена атомами. Поэтому впечатление ажурной структуры, создаваемое моделями *Б*, *В* и *Г*, неверно. (Рис. *А* и *Б* любезно предоставлены Richard J. Feldman, рис. *В* — Jane Richardson.)

Рис. 3-22. β -Слой – это обычная структура участков глобулярных белков. Сверху показан состоящий из 115 аминокислот домен молекулы иммуноглобулина; один из β -структурных участков выделен цветом. Внизу более детально показан совершенный антипараллельный β -слой. Обратите внимание на то, что каждая пептидная группа образует водородные связи с соседними пептидными группами. β -Слои, встречающиеся в глобулярных белках, обычно несколько менее регулярны, чем показанная здесь структура; часто β -слои оказываются слегка скрученными.

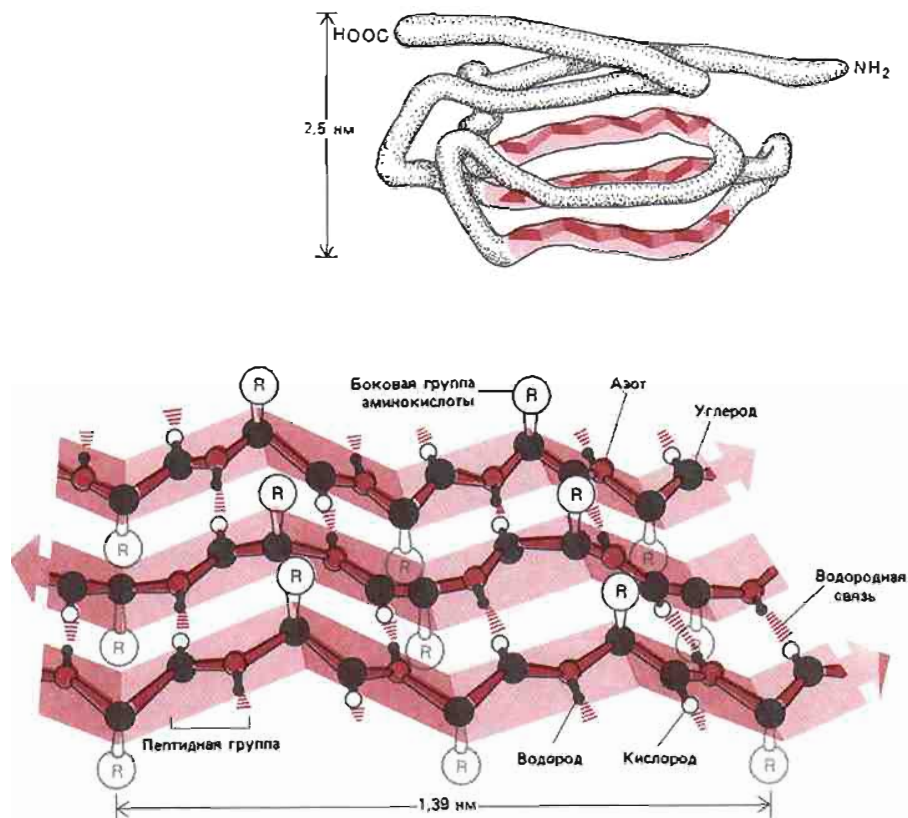
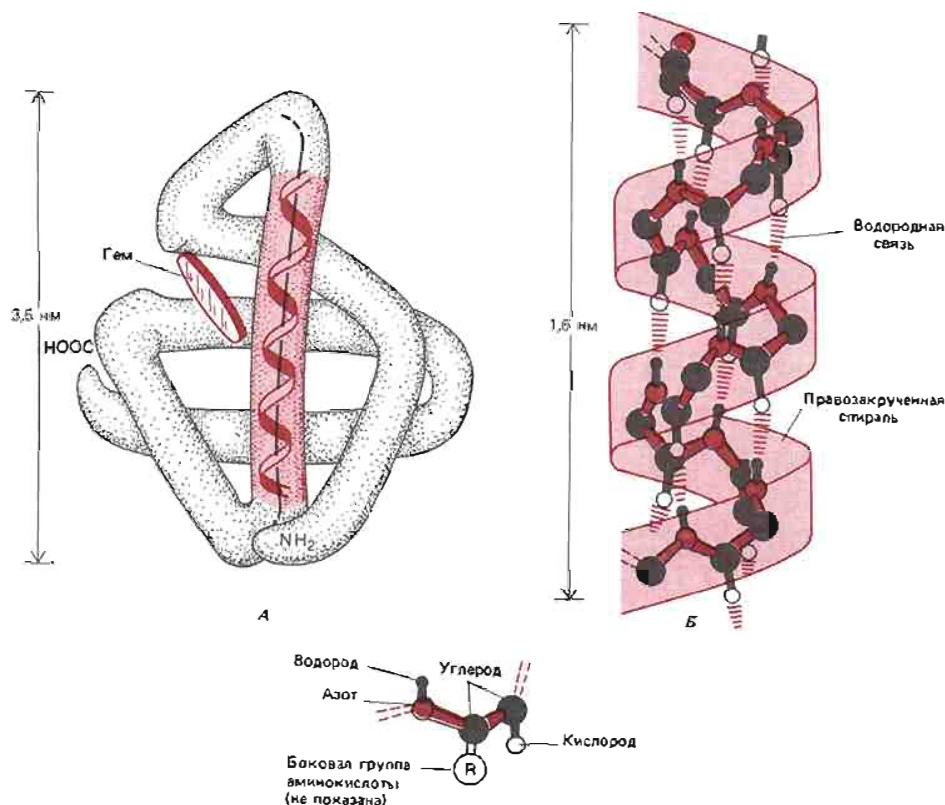


Рис. 3-23. α -Спирали, как и β -слои, обычно образуются в отдельных участках глобулярных белков. А. Показана переносящая кислород молекула миоглобина (длиной 153 аминокислоты); один из α -спиральных участков выделен цветом. Б. Детально показана совершенная α -спираль. Как и в β -слое, каждая пептидная группа связана с соседними пептидными группами водородными связями. Боковые группы аминокислот для упрощения опущены (см. нижнюю часть рисунка); они расположены на наружной поверхности спирали.



наружена в α -кератине—белке кожи и ее производных (волосах, ногтях и перьях).

Структура β -складчатого слоя составляет существенную часть сердцевины (core) большинства (хотя и не всех) глобулярных белков. На рис. 3-22 для примера показана часть молекулы антитела; *антипараллельный* β -слой этой молекулы образован в результате многократного изгибания полипептидной цепи на 180° так, что направление каждого прямого участка цепи противоположно направлению ближайших соседних участков. Такая структура обладает высокой прочностью, обусловленной образованием водородных связей между пептидными группами соседних участков цепи. Поэтому антипараллельный β -слой часто служит каркасом, на котором собирается глобулярный белок. Близкородственный антипараллельному *параллельный* β -складчатый слой часто бывает накрыт с двух сторон α -спиралями. Такое слоистое образование тоже служит основой структурной организации многих глобулярных белков.

α -Спираль образуется при таком закручивании полипептидной цепи, при котором каждая пептидная группа связывается водородными связями с другими пептидными группами цепи. Короткие участки таких α -спиралей встречаются во многих глобулярных белках (рис. 3-23), тогда как многие структурные белки, такие, как повышающие прочность кожи волокна внутриклеточного α -кератина, содержат длинные цилиндрические участки α -спирали. На рис. 3-24 показаны пространственные модели α -спирали и β -слоя с боковыми группами аминокислот и без них.

Рис. 3-24. Пространственные модели α -спирали и β -слоя. Слева структуры показаны без боковых групп аминокислот, справа—с боковыми группами. А. α -Спираль, входящая в состав миоглобина. Б. Участок β -слоя, входящего в состав конканавалина А. (С любезного разрешения Richard J. Feldman.)

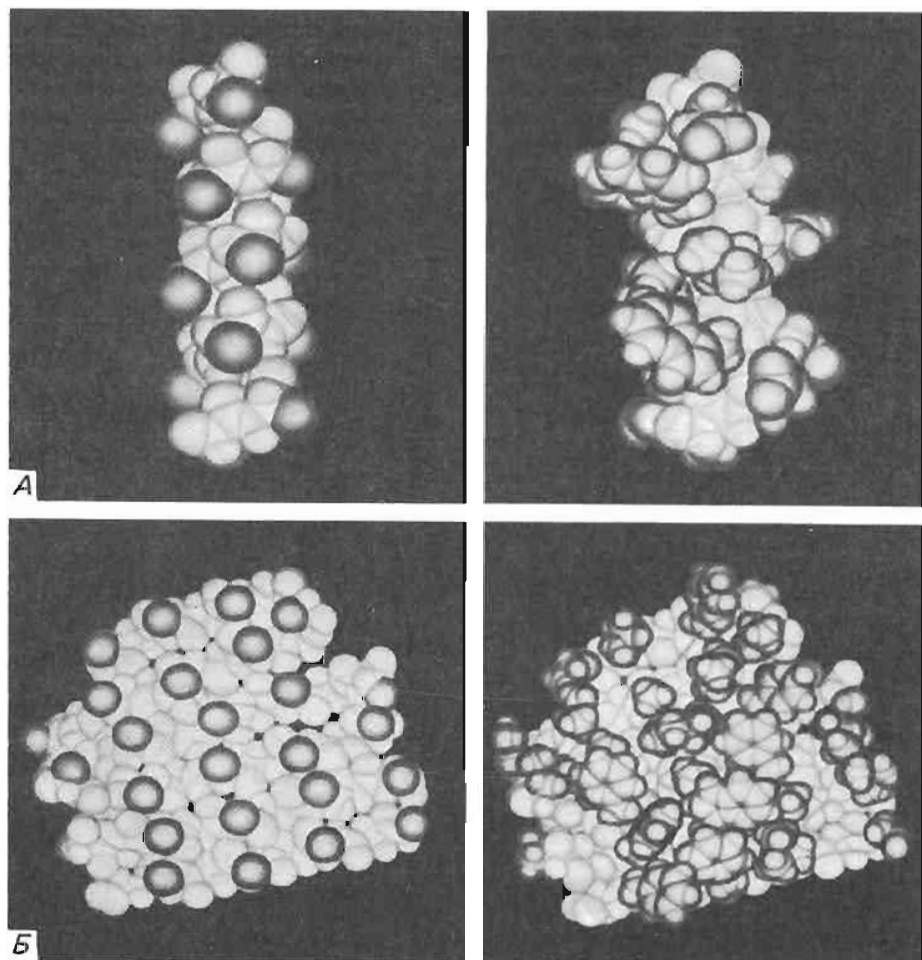
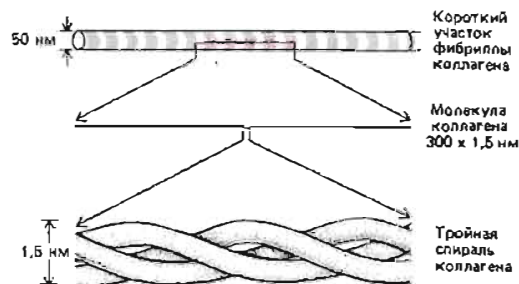


Рис. 3-25. Молекула коллагена – это тройная спираль из трех вытянутых белковых цепей. Множество сшитых вместе стержнеобразных молекул коллагена образует прочные нерастяжимые коллагеновые фибриллы и волокна.



3.3.3. Структура белков характеризуется чрезвычайным разнообразием

Различия в природе боковых групп аминокислот обуславливают замечательное разнообразие возможных типов пространственной структуры белков. Рассмотрим, например, два крайних случая. Один – это семейство белков внеклеточного матрикса **коллагены**. В коллагене три отдельные полипептидные цепи, богатые пролином и содержащие в каждом третьем положении глицин, закручены одна вокруг другой и образуют тройную спираль. В результате дальнейшей регулярной упаковки таких молекул образуется соединительная ткань, например сухожилия, в которых лизиновые остатки соседних молекул коллагена связаны ковалентными сшивками. В результате формируются волокна, способные выдерживать исключительно большую нагрузку (рис. 3-25).

Другой предельный случай – внеклеточный белок **эластин**, в котором относительно неструктурированные полипептидные цепи образуют благодаря ковалентным сшивкам резиноподобный материал. Как показано на рис. 3-26, эластичность обусловлена способностью индивидуальных молекул обратимо разворачиваться под действием растягивающего усилия. Подобно коллагену, эластин секретируется во внеклеточное пространство, что позволяет таким тканям, как артерии или легкие, деформироваться и растягиваться, не причиняя себе вреда (т. 3, гл. 12).

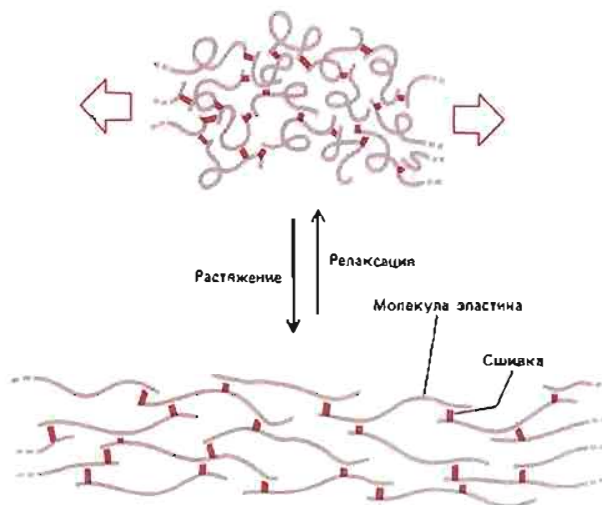


Рис. 3-26. Эластин состоит из гибких полипептидных цепей, образующих благодаря поперечным сшивкам резиноподобную структуру. При растяжении этой сети каждая молекула разворачивается. Разительный контраст между физическими свойствами эластина и коллагена обусловлен большими различиями в их аминокислотной последовательности.

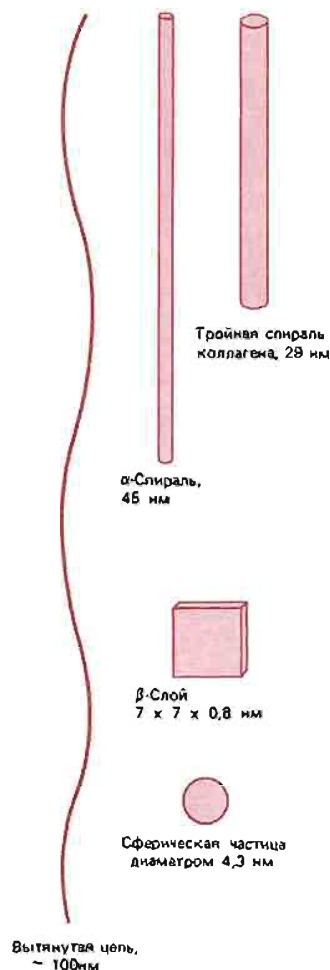


Рис. 3-27. Возможные размеры и форма молекулы белка из 300 аминокислот. Конкретная образующаяся структура определяется последовательностью аминокислот. (Metzler D.E. Biochemistry, New York, Academic Press; печатается с изменениями.)

Примечательно, что одна и та же химическая структура – аминокислотная цепь – может приобретать самую различную конформацию. Назовем, например, резиноподобный эластин, похожий на стальной тросс коллаген, разнообразие глобулярные белки – ферменты, очень различающиеся по форме своей каталитической поверхности. На рис. 3-27 показано, сколь различную форму может в принципе принимать полипептидная цепь длиной в 300 аминокислот. Реальная конформация, как мы уже отметили, полностью зависит от последовательности аминокислот.

3.3.4. Уровни структурной организации белков

Хотя даже маленький белок может складываться астрономически большим числом способов, в действительности свертывание полипептидной цепи следует определенной логике. На первой стадии свертывания образуются водородные связи между смежными участками полипептидной цепи, что приводит к образованию α -спиралей и β -слоев, т.е. *вторичной структуры белка*. Кроме того, некоторые комбинации α -спиралей и β -слоев оказываются особенно стабильными и часто возникают во многих различных белках. Такие «структурные стереотипы» обычно лежат в основе более высокого уровня структурной организации, называемого белковым *доменом*. Домены – это сравнительно небольшие глобулярные образования, состоящие из участков полипептидной цепи длиной 150 аминокислот или менее. Домены являются модулями, из которых собраны глобулярные белки (см. ниже). Обычно глобулярные белки состоят из нескольких различных доменов, связанных сравнительно открытыми участками полипептидной цепи. Наконец, отдельные глобулярные белки часто собираются в *белковые агрегаты*.

Таким образом, в структуре крупного белка можно выделить несколько уровней, каждый из которых иерархическим образом строится на предыдущих (рис. 3-28). Не исключено, что эти уровни организации соответствуют стадиям свертывания новосинтезированного белка в нативную структуру.

3.3.5. Сравнительно немногие потенциально возможные полипептидные цепи могут оказаться полезными

Поскольку все 20 аминокислот химически различны и каждая может в принципе занимать в полипептидной цепи любое положение, то для пептида из четырех аминокислот возможны $20 \cdot 20 \cdot 20 \cdot 20 = 160\,000$ различных цепей, а для полипептида из n аминокислот – 20^n цепей. Таким образом, может существовать более 10^{390} различных белков со средней длиной около 300 аминокислот.

Мы, однако, знаем, что лишь очень небольшая часть всех возможных белков примет полезную пространственную конформацию. Все остальные должны иметь множество различных конформаций с разными химическими свойствами и приблизительно одинаковой энергией. Такие белки должны устраняться в ходе эволюции, поскольку подобная нестабильность несовместима с высокой степенью упорядоченности, необходимой для поддержания жизнедеятельности клетки.

Удивительно точная пригнанность структуры современных белков к выполняемой ими функцией обеспечивается их способностью свертываться уникальным образом. Последовательность аминокислот не только обеспечивает исключительную стабильность одной из конформаций, но и определяет необходимые для выполнения каталитической или структурной функции особенности этой конформации и ее химические свойства. Белки строятся настолько точно, что замена даже нескольких атомов одной аминокислоты может нарушить структуру и привести к катастрофическим последствиям. Следует, однако, помнить, что все современные белки прошли очень долгий эволюционный путь, на котором естественный отбор отбросил все остальные белки, менее полезные или обладавшие более случайной конформацией.

Последовательность аминокислот

— Glu — Asp — Val — Ser — Lys — Gly — Pro —

1. Вторичная структура

 α -Спираль β -Слой

2. Домен

3. Белок

4. Белковый агрегат

Рис. 3-28. Уровни структурной организации белка. В пространственной структуре белка можно выделить четыре различных уровня складывания полипептидной цепи. Эти уровни образуют иерархический ряд: каждый следующий уровень складывания включает в себя предыдущие. Согласно принятой терминологии, саму аминокислотную последовательность называют *первичной структурой* белка, первый уровень складывания полипептидной цепи — *вторичной структурой*, комбинацию второго и третьего уровней складывания — *третьей структурой*, а четвертый уровень — *четвертичной структурой* белка.

3.3.6. Новые белки часто возникают в результате незначительных изменений старых [14]

У клетки есть генетические механизмы, обеспечивающие дупликацию и модификацию генов в процессе эволюции (т. 2, разд. 8.6.4). Следовательно, если уже какой-нибудь белок с уникальной трехмерной конформацией полипептидной цепи и другими полезными поверхностными свойствами раз возникнет, то его основная структура может затем войти в состав многих других белков. В современных организмах различные белки с родственными функциями часто имеют схожую последовательность аминокислот. Считается, что такие семейства белков возникли путем дупликации единственного предкового гена и последующего накопления в эволюции мутаций, постепенно обусловивших изменение функции.

Известный пример такого рода — семейство протеолитических (расщепляющих белки) ферментов, называемых **сериновыми протеиназами**. Семейство это включает в себя пищеварительные ферменты — химотрипсин, трипсин и эластазу, а также многие из факторов свертывания — протеиназ, контролирующих процесс свертывания крови, например тромбин. При сравнении любых двух ферментов этого семейства оказывается, что примерно 40% положений в полипептидной цепи занимают одни и те же аминокислоты. Еще более поразительное сходство выявляется при сравнении их конформаций, определенных методом рентгеноструктурного анализа: большинство поворотов и изгибов полипептидных цепей длиной в несколько сот аминокислот оказываются идентичными (рис. 3-29).

Тем не менее разные сериновые протеиназы имеют совершенно различные функции. Некоторые из аминокислотных замен, обусловивших различия ферментов этой группы, по-видимому, были отобраны в процессе эволюции, потому что привели к изменениям субстратной специфичности и регуляторных свойств белков, что в свою очередь породило все многообразие современных функциональных свойств. Другие аминокислотные замены могли быть «нейтральными», т. е. сохранились потому, что не повлияли ни на структуру, ни на функцию белка. Поскольку мутирование — процесс случайный, должны были происходить и вредные замены, изменяющие пространственную структуру фермента достаточно сильно, чтобы его инактивировать. Эти измененные варианты были потеряны в процессе эволюции, так как производившие их индивидуальные организмы должны были оказаться в невыгодных условиях и исчезнуть в результате естественного отбора.

Поэтому совершенно неудивительно, что клетки содержат целый набор структурно родственных полипептидных цепей, имеющих общих предков, но выполняющих разные функции.

3.3.7. Новые белки часто возникают в результате объединения разных полипептидных доменов [15]

При возникновении в клетке ряда стабильных белковых поверхностей новые поверхности с иной специфичностью связывания могут создаваться в результате объединения двух или более индивидуальных белков путем нековалентных взаимодействий. На рис. 3-30 схематически показано, как в результате взаимодействия разных частей одного белка с другими белками возникают три различных участка связывания. Для клеток характерно такое объединение глобулярных белков в более крупные функциональные белковые агрегаты: молекулярная масса многих белковых агрегатов достигает 1 млн. и более, хотя молекулярная масса типичной полипептидной цепи составляет всего лишь 40 000–50 000 (приблизительно 300–400 аминокислот); размер лишь немногих полипептидов вдвое превышает эту среднюю величину.

Сходный, но другой способ образования новых белков из существующих полипептидных цепей — это слияние соответствующих последовательностей



Рис. 3-29. Сравнение пространственных конформаций эластазы (А) и химотрипсина (Б). У этих эволюционно родственных протеиназ одинаковы лишь те аминокислоты, которые расположены в выделенных цветом участках полипептидной цепи. Тем не менее конформации белков очень похожи. Обведены активные центры ферментов; оба активных центра содержат активированный остаток серина (см. рис. 3-46).

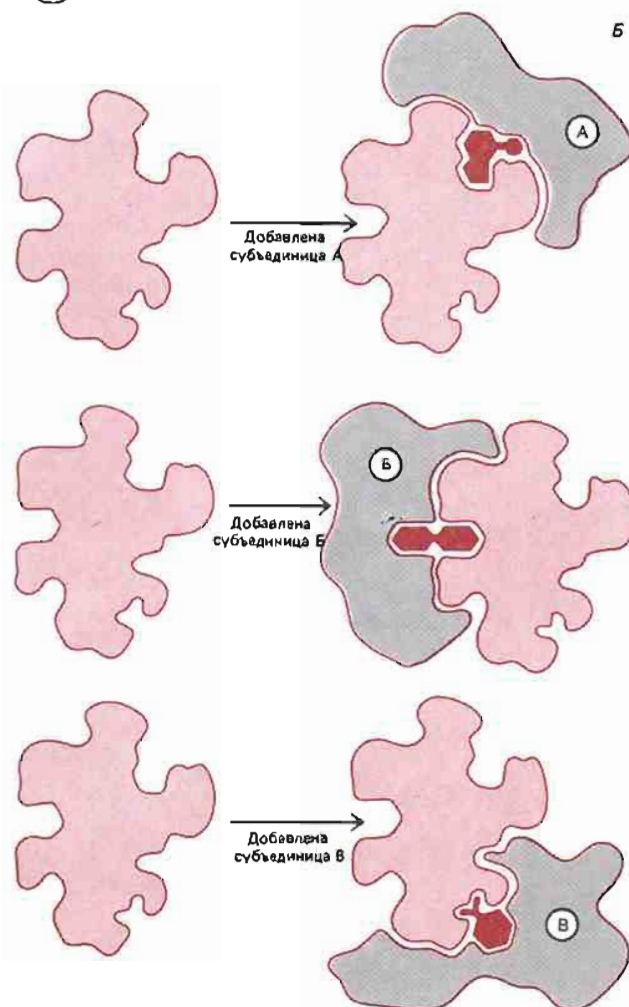


Рис. 3-30. Объединение белковых доменов. Схематическое изображение общего принципа возникновения в процессе эволюции нового центра связывания малой молекулы (лиганда) путем совмещения отдельных белковых поверхностей.

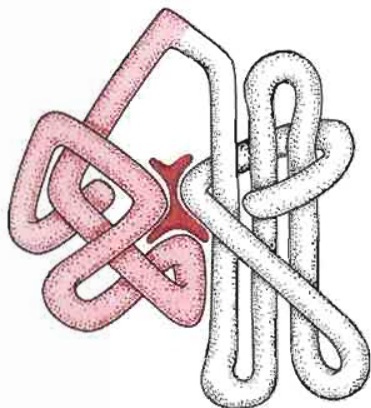


Рис. 3-31. Схематическое изображение белка, состоящего из двух отдельных доменов. Центр связывания лиганда, как здесь показано, часто расположен между доменами.

ДНК таким образом, что получается единая полипептидная цепь (т. 2, разд. 8.6.5). Белки, эволюция которых шла, судя по всему, по этому пути, имеют ту особенность, что разные части их полипептидной цепи свертываются в независимые глобулярные домены. Такая «мультидоменная» структура характерна для многих белков, и, как и следовало ожидать, исходя из рассмотренных выше эволюционных предпосылок, функционально важные центры связывания часто оказываются расположенными на границе разных доменов (рис. 3-31). На рис. 3-32 показана структура конкретного мультидоменного белка.

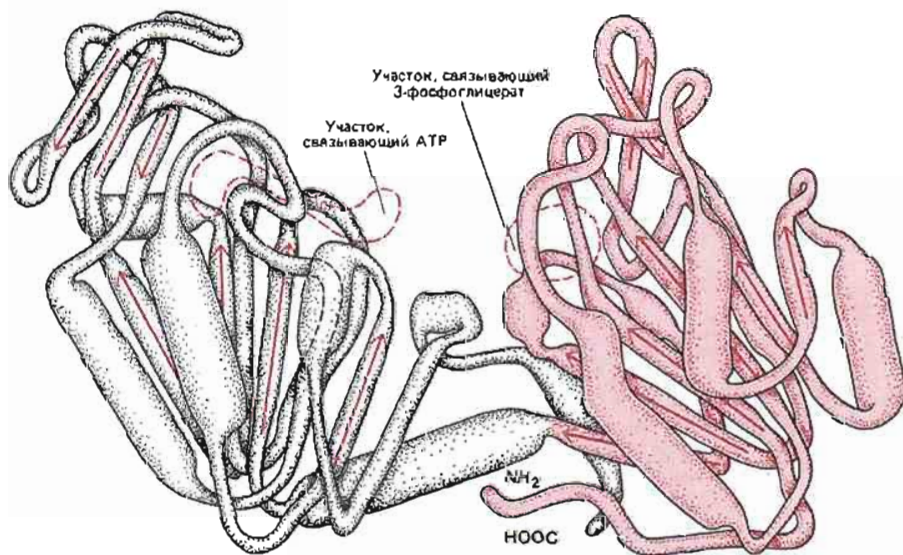
Очевидно, что образование новых белков путем слияния предсуществующих (рис. 3-30 и 3-31) — значительно более эффективная эволюционная стратегия, чем постепенное «выведение» новой последовательности в результате отбора случайных точковых мутаций. Полипептиды, возникшие благодаря случайной мутации, как правило, не могут иметь стабильной конформации и поэтому не могут быть полезными. Напротив, слияние фрагментов белков или доменов со стабильной структурой должно как минимум образовывать новую уникальную комбинацию поверхностей. И в самом деле, геном эукариот организован, по-видимому, так, чтобы облегчить перестройки ДНК, изредка создающие новые гены, кодирующие новые комбинации белковых доменов (гл. 8).

3.3.8. Белковые субъединицы способны к самосборке в большие клеточные структуры [16]

Принцип, позволяющий белковым доменам ассоциировать с образованием новых центров связывания, «работает» и при сборке значительно более крупных клеточных структур. Надмолекулярные структуры, такие, как ферментные комплексы, рибосомы, белковые волокна, вирусы и мембраны, не синтезируются в виде единых гигантских молекул, связанных ковалентными взаимодействиями, а собираются в результате нековалентной агрегации макромолекулярных субъединиц.

Использование субъединиц для построения больших структур имеет несколько преимуществ: 1) для построения большой структуры из многократно повторенных субъединиц меньшего размера требуется меньше генетической информации; 2) поскольку субъединицы связаны между собой многими сравнительно слабыми связями, их сборка и диссоциация легко поддаются кон-

Рис. 3-32. Структура белка, состоящего из двух доменов. В этой «сосисочной» модели α -спиральные участки изображены в виде утолщенных цилиндров, а β -складчатые области показаны цветными стрелками. Здесь изображен фермент длиной 416 аминокислот — фосфоглицераткиназа. Показаны предположительные центры связывания двух субстратов этого фермента. При связывании обоих субстратов домены сближаются и образуют активный центр.



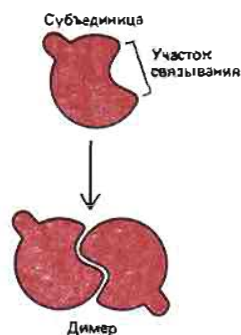


Рис. 3-33. Схема образования димера из идентичных белковых субъединиц. Если центр связывания узнает сам себя, димеры будут симметричными.

тролю; 3) сборка структуры из субъединиц позволяет сводить к минимуму количество ошибок, так как функционирование специального механизма корректирования в процессе сборки может устранить испорченные субъединицы.

3.3.9. Одинаковые белковые субъединицы могут взаимодействовать с образованием геометрически регулярных агрегатов [17]

При наличии в белке центра связывания, комплементарного какому-либо участку на его собственной поверхности, белок будет самопроизвольно агрегировать. В простейшем случае центр связывания узнает сам себя, и в результате образуется симметричный димер. Многие ферменты и другие белки образуют такие димеры, которые часто в свою очередь служат субъединицами для образования более крупных агрегатов (рис. 3-33 и 3-34).

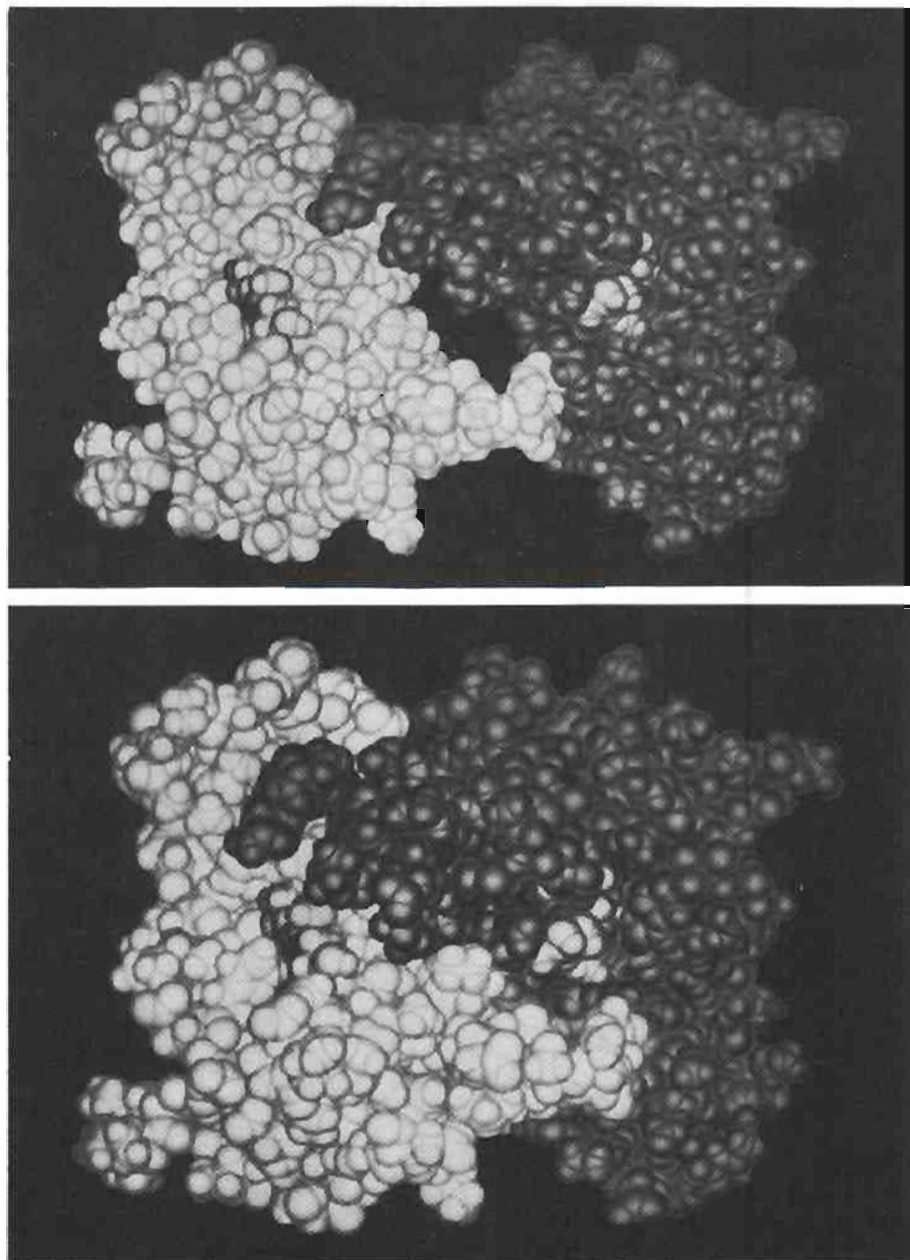


Рис. 3-34. Объемная модель образования димера из двух идентичных белковых субъединиц. Здесь показан цитохром *c'*. (С любезного разрешения Richard J. Feldmann.)

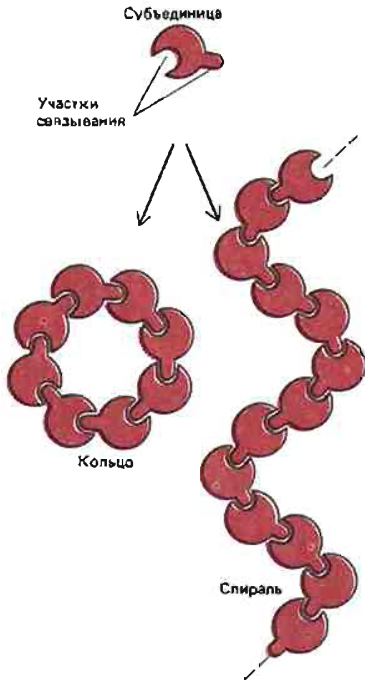


Рис. 3-35. Одинаковые субъединицы, которые взаимодействуют друг с другом, как здесь показано, могут образовывать кольца или спирали.

Если центр связывания белка комплементарен другому участку на своей поверхности, то образуется цепь субъединиц. При некоторых взаимных ориентациях двух участков связывания цепь замкнется сама на себя и рост прекратится. В результате образуется кольцо из двух, трех, четырех или большего числа субъединиц (рис. 3-35). В более общем случае получится бесконечно длинный полимер из белковых субъединиц. При условии что все субъединицы связаны друг с другом идентичным образом, субъединицы в такой цепи расположатся по **спирали** (рис. 3-35). Иными словами, спираль – это структура, которая формируется очень легко.

Примером обычной для клеток спиральной структуры может служить **актиновая нить**, которая состоит из двух обвитых одна вокруг другой спиральных цепей, собранных из одного глобулярного белка – **актина**. Наличие двух спиральных цепей усиливает стабилизацию и прочность структуры, так как каждая субъединица может взаимодействовать не только с соседями по цепи, но и с субъединицами другой цепи. Молекулы, для функционирования которых особенно важное значение имеет механическая прочность, обычно состоят не из глобулярных, а из фибриллярных субъединиц, что еще больше увеличивает поверхность белок-белкового взаимодействия (рис. 3-36).

Гексагонально упакованные белковые субъединицы могут образовывать плоские слои. Иногда так агрегируют в липидных бислоях специализированные мембранные транспортные белки, например белки межклеточных щелевых контактов у позвоночных. При небольшом изменении геометрии субъединиц гексагональный слой превращается в полую трубку (рис. 3-37). Такие цилиндрические трубки участвуют в образовании белковых оболочек некоторых удлинённых вирусов.

Образование замкнутых структур – колец, трубок или сферических частиц – дополнительно стабилизирует весь агрегат; общее число связей между белковыми субъединицами в этом случае увеличивается. Особенно ярко это можно проиллюстрировать на примере белковых оболочек многих простых вирусов, имеющих форму полого шара. Такие оболочки часто собраны из сотен идентичных белковых субъединиц, окружающих и защищающих вирусную нуклеиновую кислоту (рис. 3-38 и 3-39). Структура белков оболочки дол-

Рис. 3-36. Два примера образующихся в клетках простых белковых спиралей. Спираль актина состоит из двойной цепи глобулярных белковых субъединиц, причем каждая субъединица находится в контакте с четырьмя другими субъединицами. Спираль коллагена образована тремя вытянутыми взаимопереплетенными белковыми цепями, что дает очень прочную стержнеобразную структуру. (Обратите внимание на различие масштабов в двух схемах.)

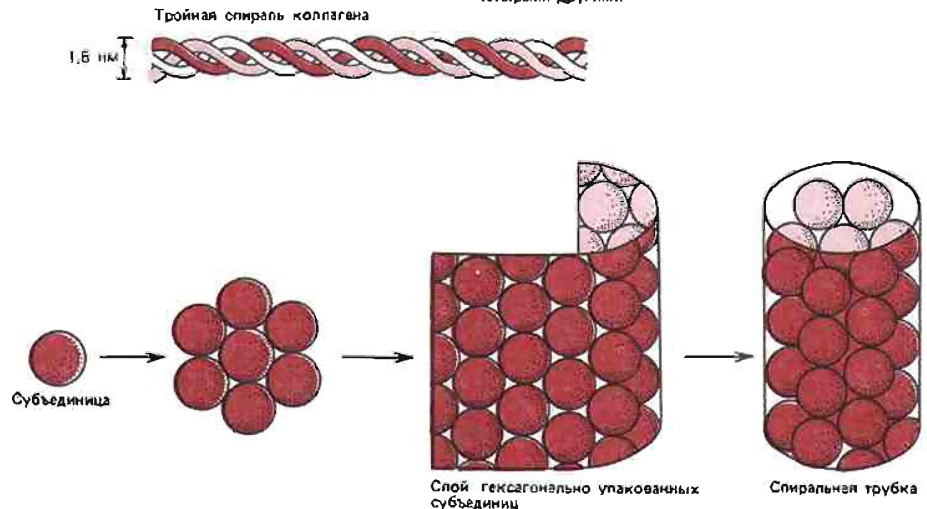
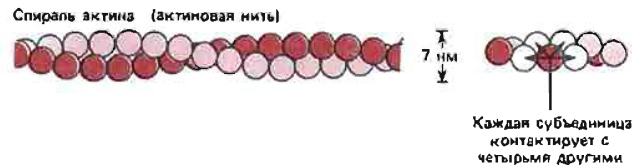


Рис. 3-37. Гексагонально упакованные субъединицы могут образовывать плоские слои или трубки.

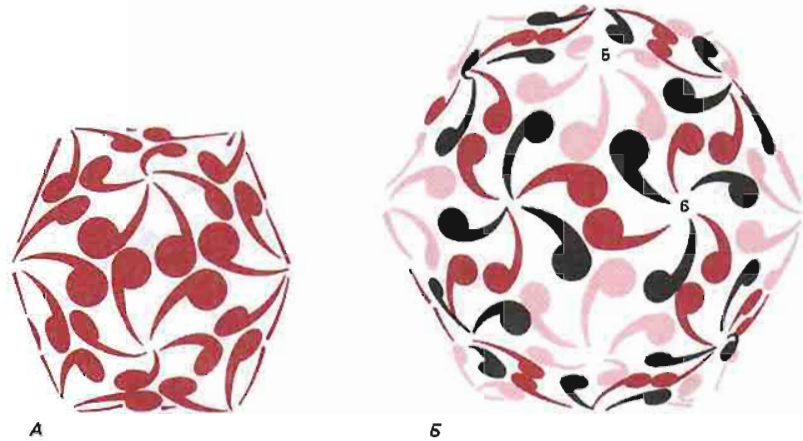


Рис. 3-38. У некоторых вирусов нуклеиновая кислота (ДНК или РНК) окружена сферической оболочкой из большого числа идентичных белковых субъединиц. По геометрическим соображениям строго симметрично можно расположить не более 60 субъединиц, что ограничивает количество нуклеиновой кислоты вируса. Соответствующее расположение субъединиц показано слева (А). Оболочка может состоять из большего числа идентичных субъединиц, но в этом случае они занимают не точно эквивалентные положения. Справа (Б) показана оболочка, состоящая из 180 идентичных субъединиц, каждая из которых занимает одно из трех «квазизэквивалентных» положений. Видно, что субъединицы одного цвета составляют пятиугольник, а чередующиеся субъединицы двух других цветов — шестиугольник. Для образования такой оболочки белковые субъединицы должны быть достаточно гибкими, чтобы соответствовать каждому из трех (показанных здесь разными цветами) геометрически слегка различных положений структуры. (Нарисовано по фотографиям, любезно предоставленным Arthur J. Olson.)

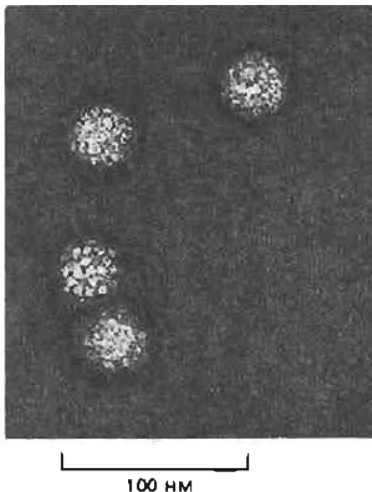


Рис. 3-39. Электронная микрофотография вируса карликовой кустистости томата. Оболочка вируса построена в соответствии с показанной на рис. 3-38, Б схемой квазизэквивалентной упаковки и состоит из 180 копий одного белка с мол. массой 41 000. (С любезного разрешения Robley Williams.)

жна быть особенно гибкой, так как она должна допускать различные типы межсубъединичных контактов, а также обеспечивать изменение упаковки субъединиц при выходе нуклеиновой кислоты в начале цикла размножения вируса.

3.3.10. Самособирающиеся структуры могут состоять из различных белковых субъединиц и нуклеиновых кислот [18]

Многие большие клеточные структуры построены из разных белков. В некоторых случаях (например, в вирусных частицах и рибосомах) в состав этих структур входит также ДНК или РНК. Как и в случае описанных выше более простых структур, информация о сборке многих из этих сложных агрегатов заключена в строении самих макромолекулярных субъединиц. В пользу последнего утверждения свидетельствует следующий факт: в соответствующих условиях изолированные субъединицы могут самопроизвольно собираться в пробирке в конечную структуру.

Впервые возможность самосборки большого макромолекулярного агрегата из отдельных компонентов была обнаружена у *вируса табачной мозаики*. Этот вирус представляет собой длинный стержень, в котором белковый цилиндр окружает спиральную сердцевину из РНК (рис. 3-40 и 3-41). Если очищенную вирусную РНК и белковые субъединицы смешать в растворе, они агрегируют с образованием полностью активных вирусных частиц. Процесс

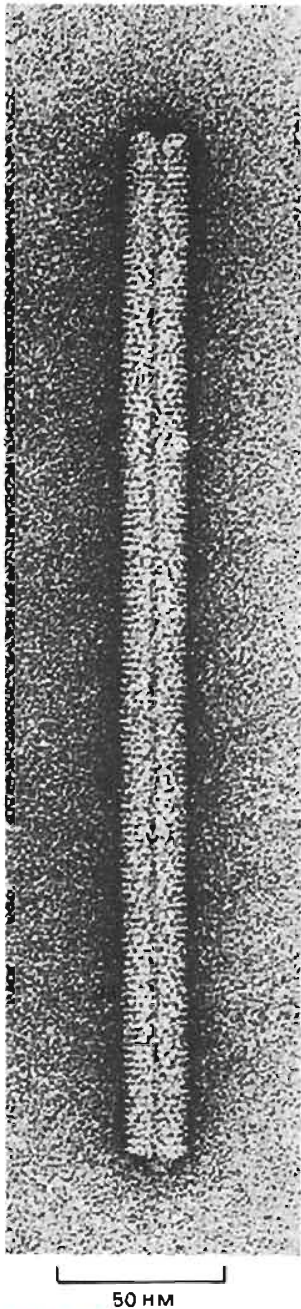


Рис. 3-40. Электронная микрофотография вируса табачной мозаики (ВТМ). Вирус состоит из одной длинной молекулы РНК, окруженной плотной спиралью из идентичных белковых субъединиц, образующих цилиндрическую оболочку. Очищенная РНК и белок оболочки при смешивании в пробирке самопроизвольно образуют полностью инфекционные вирусные частицы нормального вида. (Печатается с любезного разрешения Robley Williams.)

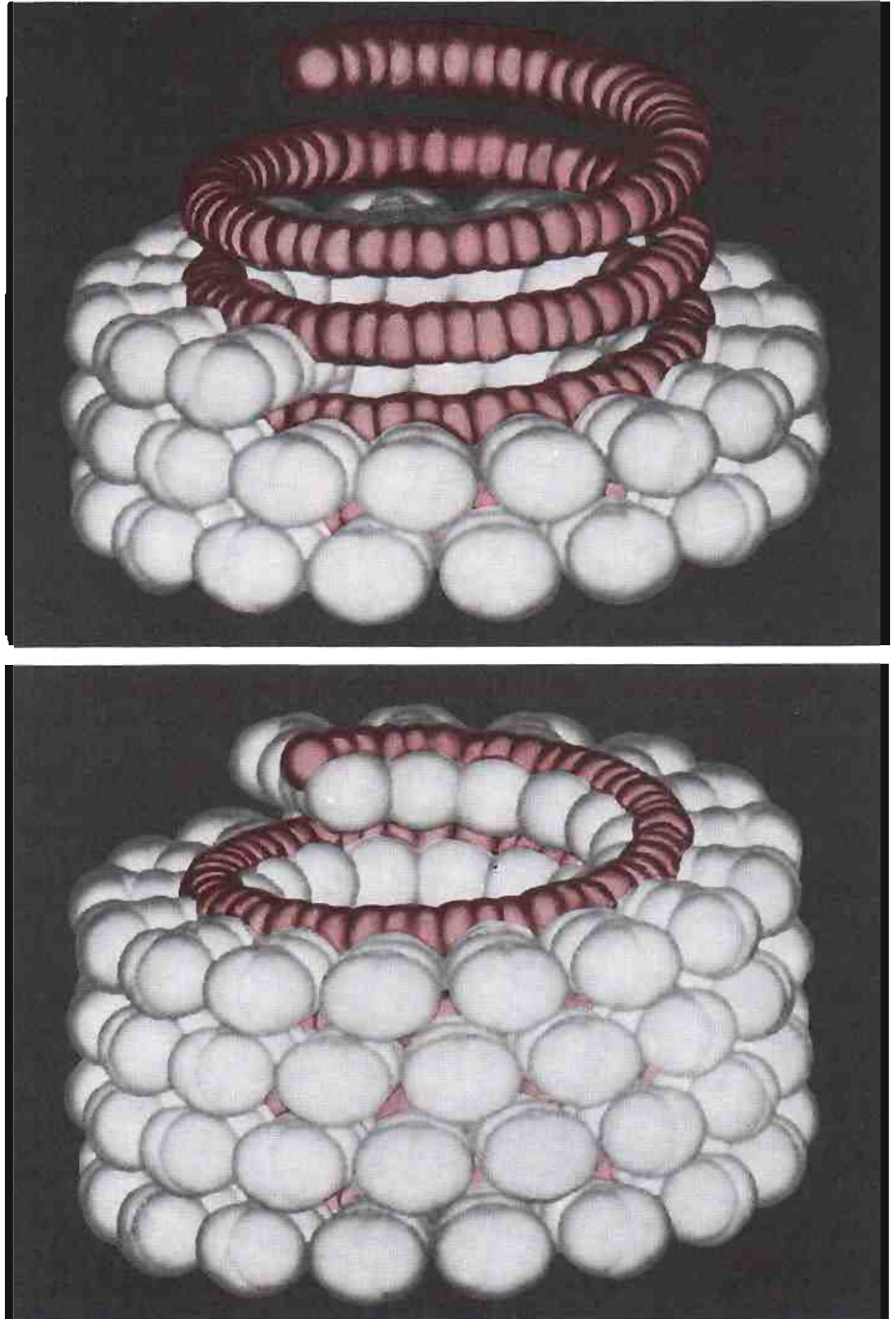
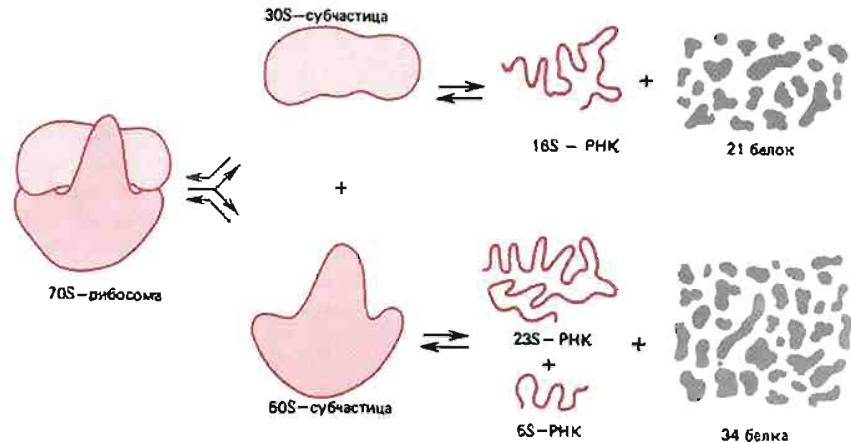


Рис. 3-41. Объемные модели двух стадий самосборки вируса табачной мозаики. Белки оболочки образуют спиральный комплекс с одноцепочечной РНК (выделена цветом). (С любезного разрешения Richard J. Feldmann.)

Рис. 3-42. Самосборка бактериальных рибосом. 5S разных белков и 3 разных вида молекул РНК при совместной инкубации в соответствующих условиях образуют функциональную рибосому.



самосборки оказался неожиданно сложным: он сопряжен с образованием особых *промежуточных структур*—двойных белковых колец, присоединяющихся к растущей оболочке вируса.

Другой пример макромолекулярного агрегата, структура которого после диссоциации на отдельные компоненты восстанавливается,—это рибосома бактерий. Бактериальные рибосомы состоят приблизительно из 55 различных белковых молекул и 3 различных молекул рРНК. Если инкубировать в пробирке в соответствующих условиях все 58 индивидуальных компонентов, они самопроизвольно соберутся в исходную структуру (рис. 3-42). Важнее всего то, что такие реконструированные рибосомы способны осуществлять биосинтез белков. Реконструкция рибосом, как и предполагалось, происходит упорядоченно: сначала к РНК присоединяются определенные белки, затем другие белки узнают образовавшийся комплекс и т. д., пока не завершится формирование полной структуры.

До сих пор неясно, каким образом осуществляется регуляция некоторых более сложных процессов самосборки. Оказалось, например, что многие клеточные структуры имеют точно определенную длину, во много раз превышающую длину всех составляющих их макромолекул. Как достигается столь точное ограничение длины, остается загадкой, но был предложен гипотетический механизм, основанный на «принципе нониуса» (рис. 3-43). Согласно этой гипотезе, два типа палочковидных субъединиц образуют комплекс со сдвигом, обусловленным разной длиной субъединиц. На некотором расстоянии от начала структуры концы субъединиц точно совпадут. В этот момент дальнейший рост прекратится.

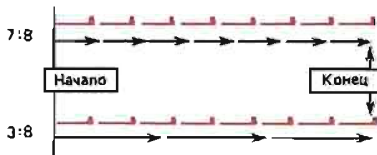


Рис. 3-43. «Принцип нониуса»—гипотетический механизм, с помощью которого задается длина белкового агрегата. Черные и цветные выпянутые молекулы образуют ступенчатый комплекс, который растет до тех пор, пока концы двух типов субъединиц не совпадут. В верхнем примере этот момент наступает после взаимодействия семи черных и восьми цветных молекул, а в нижнем примере—после взаимодействия трех черных и восьми цветных молекул.

3.3.11. Не все клеточные структуры образуются путем самосборки [19]

Возникает вопрос: все ли поддерживаемые нековалентными связями клеточные структуры способны к самосборке? Неужели митохондрии, реснички, миофибриллы и даже клетки могут самопроизвольно собираться из раствора, содержащего все составляющие их макромолекулы? Конечно, нет. В случае больших и сложных структур необходимая для сборки информация заложена в специальных ферментах и других клеточных белках, выполняющих функции шаблонов или матриц и не входящих в состав окончательной структуры. Порой даже маленькие структуры лишены некоторых необходимых для сборки компонентов. Например, при образовании одного небольшого бактериофага головка, состоящая из одинаковых белковых субъединиц, собирается на каркасе, построенном из другого белка. Поскольку в зрелой вирусной частице нет этого второго белка, реконструкция диссоциированной на субъединицы головки невозможна. Известны другие примеры, когда существенной и необратимой стадией процесса сборки является протеолитическое расщепление. Именно так формируются оболочки некоторых бактериальных вирусов и да-

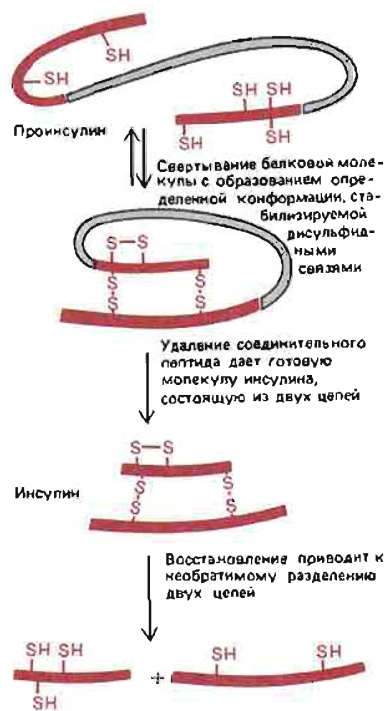


Рис. 3-44. Пептидный гормон инсулин синтезируется в виде белка-предшественника проинсулина, который свертывается нужным образом, а затем расщепляется протеолитическим ферментом. Поэтому после восстановления дисульфидных связей инсулин не может самопроизвольно принять исходную конформацию. Вырезание части полипептидной цепи проинсулина приводит, таким образом, к невозможности потери информации, необходимой для самосборки молекулы.

же некоторые простые белки, в том числе структурный белок коллаген и гормон инсулин (рис. 3-44). На основании этих сравнительно простых примеров можно прийти к выводу, что сборка таких сложных структур, как митохондрия или ресничка, управляется и во времени, и в пространстве другими клеточными компонентами и, кроме того, включает в себя стадии необратимого созревания, катализируемые расщепляющими ферментами.

В случае некоторых сложных органелл не исключено, что для построения новой копии необходима информация, заключенная в самой структуре. Так, макромолекулярные компоненты митохондрий и аппарата Гольджи по мере роста клетки обычно встраиваются в соответствующие предсуществующие структуры с помощью процесса, включающего в себя специфическое узнавание новосинтезированными молекулами мембраны соответствующей органеллы (т. 2, гл. 7). Маловероятно, чтобы эти органеллы оказались способными сами по себе собираться после диссоциации клетки на отдельные макромолекулы. При полной диссоциации, видимо, произойдет непоправимая потеря части информации. В этом смысле некорректно говорить, что вся информация о строении клетки заключена в ее ДНК.

Заключение

Аминокислотная последовательность белковой молекулы определяет ее пространственную структуру. Конкретная структура полипептидной цепи стабилизируется нековалентными взаимодействиями между ее частями. Гидрофобные аминокислоты стремятся сгруппироваться внутри молекулы, а возникновение локальных водородных связей между пептидными группами приводит к образованию α -спиралей и β -слоев. Многие белки собраны, как из модулей, из небольших глобулярных образований, называемых доменами; несколько доменов, объединенных короткими участками полипептидной цепи, образуют глобулярный белок.

Те же силы, которые определяют пространственную структуру белков, ответственны и за образование белковых агрегатов. Белки, имеющие центр связывания, комплементарный их собственной поверхности, могут образовывать димеры или более крупные олигомеры: замкнутые кольца, сферические частицы или спирали. Смесь множества различных белков, содержащая иногда структурные нуклеиновые кислоты, может самопроизвольно собираться в пробирке в большие сложные структуры. Однако не все клеточные структуры способны к самопроизвольной реконструкции после диссоциации на отдельные компоненты, так как во многих случаях процесс сборки включает необратимые этапы.

3.4. Функции белков [20]

Химические свойства белковых молекул практически полностью зависят от экспонированных на их поверхности аминокислотных остатков, способных образовывать разнообразные слабые связи с другими молекулами. Чтобы взаимодействие белка с другой молекулой (именуемой в дальнейшем **лигандом**) было эффективным, между ними должно одновременно образовываться много слабых связей. Поэтому к белку могут прочно присоединиться лишь те лиганды, которые в точности подходят к его поверхности.

Центр связывания, т.е. участок белка, который взаимодействует с лигандом, обычно имеет вид углубления, сформированного на поверхности белко-

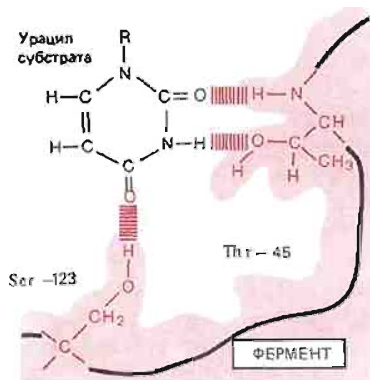


Рис. 3-45. Образование водородных связей между белком и лигандом. Здесь схематически показано, как фермент рибонуклеаза удерживает часть своего субстрата РНК. Данные получены с помощью рентгеноструктурного анализа фермент-субстратного комплекса.

вой молекулы определенным расположением аминокислот. Эти аминокислоты часто принадлежат удаленным друг от друга участкам полипептидной цепи (рис. 3-45) и составляют лишь небольшую долю всех аминокислот белка. Остальные аминокислоты необходимы для поддержания правильной формы белковой молекулы и для создания дополнительных центров связывания, играющих регуляторную роль. Значение внутренней части белка обычно ограничивается лишь тем, что она обеспечивает нужную форму поверхности и необходимую жесткость структуры.

3.4.1. Конформация белка определяет его химические свойства

Соседние аминокислотные остатки поверхности белковой молекулы часто взаимодействуют таким образом, что меняется реакционная способность боковых групп определенных аминокислот. Такие взаимодействия можно подразделить на несколько типов.

Во-первых, соседние части полипептидной цепи могут взаимодействовать таким образом, что доступ молекул воды к другим участкам поверхности белка будет ограничен. Поскольку молекулы воды стремятся образовать водородные связи, они должны конкурировать с лигандами за предназначенные для последних боковые группы аминокислот на поверхности белка. Поэтому прочность водородных связей (и ионных взаимодействий) между белком и лигандом значительно больше в том случае, если удалось исключить молекулы воды. На первый взгляд трудно представить себе механизм, способный ограничить доступ к белковой поверхности столь маленькой молекулы, как молекула воды, и не повлиять при этом на связывание самого лиганда. Но молекулы воды благодаря сильной тенденции к образованию водородных связей формируют большие молекулярные сети (схема IX, стр. 114), и индивидуальной молекуле часто бывает энергетически невыгодно оторваться от такой сети, чтобы проникнуть в углубление белковой поверхности.

Во-вторых, образование кластера из соседних полярных аминокислот изменяет реакционную способность их боковых групп. Например, полипептидная цепь может свернуться так, что сблизит ряд отрицательно заряженных ами-

Рис. 3-46. Необычайно реакционно-способная аминокислота в активном центре фермента. Здесь для примера показана «система переноса заряда», которая активирует серин, расположенный в активном центре ферментов типа химотрипсина или эластазы, при связывании субстрата (см. рис. 3-29). При гидролизе пептидной связи активированный серин на время образует ковалентную связь с субстратом, как показано на рис. 3-49.

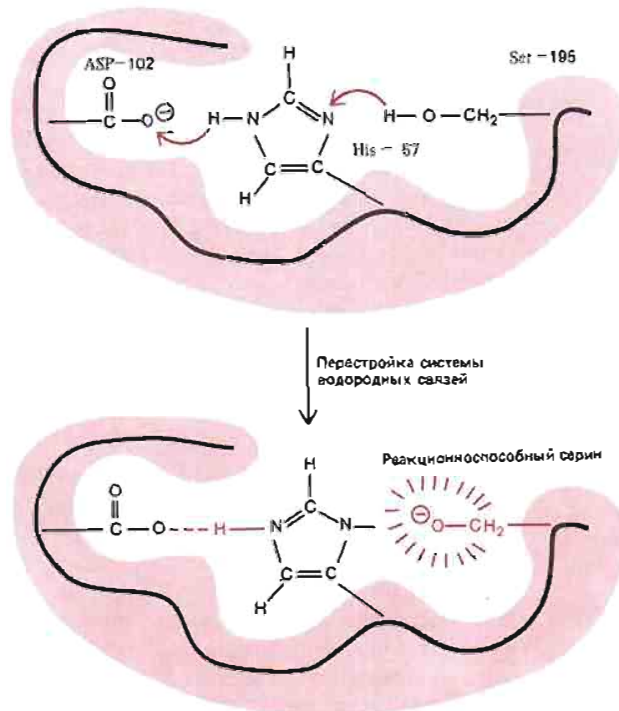
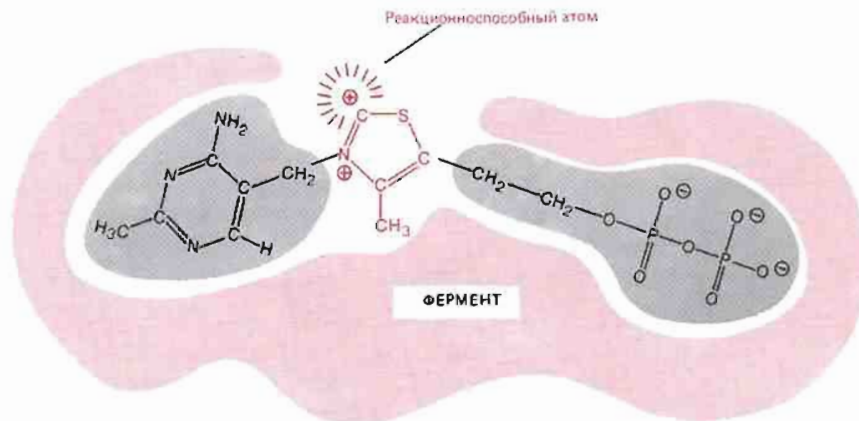


Рис. 3-47. Коферменты, например изображенный здесь тиаминпирофосфат, — это небольшие молекулы, которые связываются с поверхностью фермента, обуславливая тем самым способность катализировать определенные реакции. Активность тиаминпирофосфата сосредоточена в «кислом» атоме углерода, который с легкостью обменивает связанный с ним атом водорода на атом углерода молекулы субстрата. Другие части молекулы тиаминпирофосфата, видимо, служат «ручками», за которые фермент удерживает кофермент в правильном положении.



ноокислот, несмотря на их взаимное отталкивание. Когда это происходит, резко возрастает сродство каждой из боковых групп к положительно заряженному иону. Боковые группы некоторых аминокислот могут также образовывать водородные связи и таким путем активировать обычно неактивные боковые группы (например, $-\text{CH}_2\text{OH}$ -группу серина, рис. 3-46). Активированные боковые группы могут вступать в реакции, приводящие к образованию или разрыву определенных ковалентных связей.

Таким образом, поверхность каждой белковой молекулы имеет уникальные химические свойства, зависящие не только от природы аминокислот, расположенных на поверхности, но и от точной взаимной ориентации этих аминокислот. Поэтому даже незначительные изменения конформации белковой молекулы могут привести к резкому изменению ее химических свойств.

В тех случаях, когда химические свойства боковых групп аминокислот не могут обеспечить решение конкретной каталитической задачи, белки прибегают к помощи специальных небелковых молекул. Такие лиганды часто служат в ферментативных реакциях **коферментами** и могут быть столь прочно связаны с белком, что фактически являются его частью. В качестве примера можно назвать: содержащие железо *гемы* в молекуле гемоглобина и цитохромов; *тиаминпирофосфат* в ферментах, участвующих в переносе альдегидной группы; *биотин* в ферментах, участвующих в переносе карбоксильной группы (разд. 2.4.4). В процессе эволюции каждый кофермент был отобран по определенной химической активности, которую он проявляет в комплексе с белком. Кроме реакционноспособного центра в состав коферментов нередко входят остатки, связывающие их с соответствующими белками (рис. 3-47). Коферментами часто служат очень сложные органические молекулы, химические свойства которых в комплексе с белком не всегда понятны в деталях. На рис. 3-48, А и В показаны объемные модели двух ферментов, связанных со своими коферментами.

3.4.2. Связывание субстрата — первая стадия ферментативного катализа [21]

Одна из важнейших функций белков состоит в специфическом катализе химических реакций. Лигандом в этом случае служит молекула субстрата, связывание которой ферментом — необходимая предпосылка химической реакции (рис. 3-48, Б и Г). Ферменты способны очень сильно ускорять химические реакции — значительно сильнее, чем любые искусственные катализаторы. Столь высокую эффективность можно приписать нескольким факторам. Во-первых, ферменты увеличивают локальную концентрацию молекул субстрата в каталитическом центре и удерживают соответствующие атомы в ориентации, необходимой для последующей реакции. Но наиболее важное значение имеет

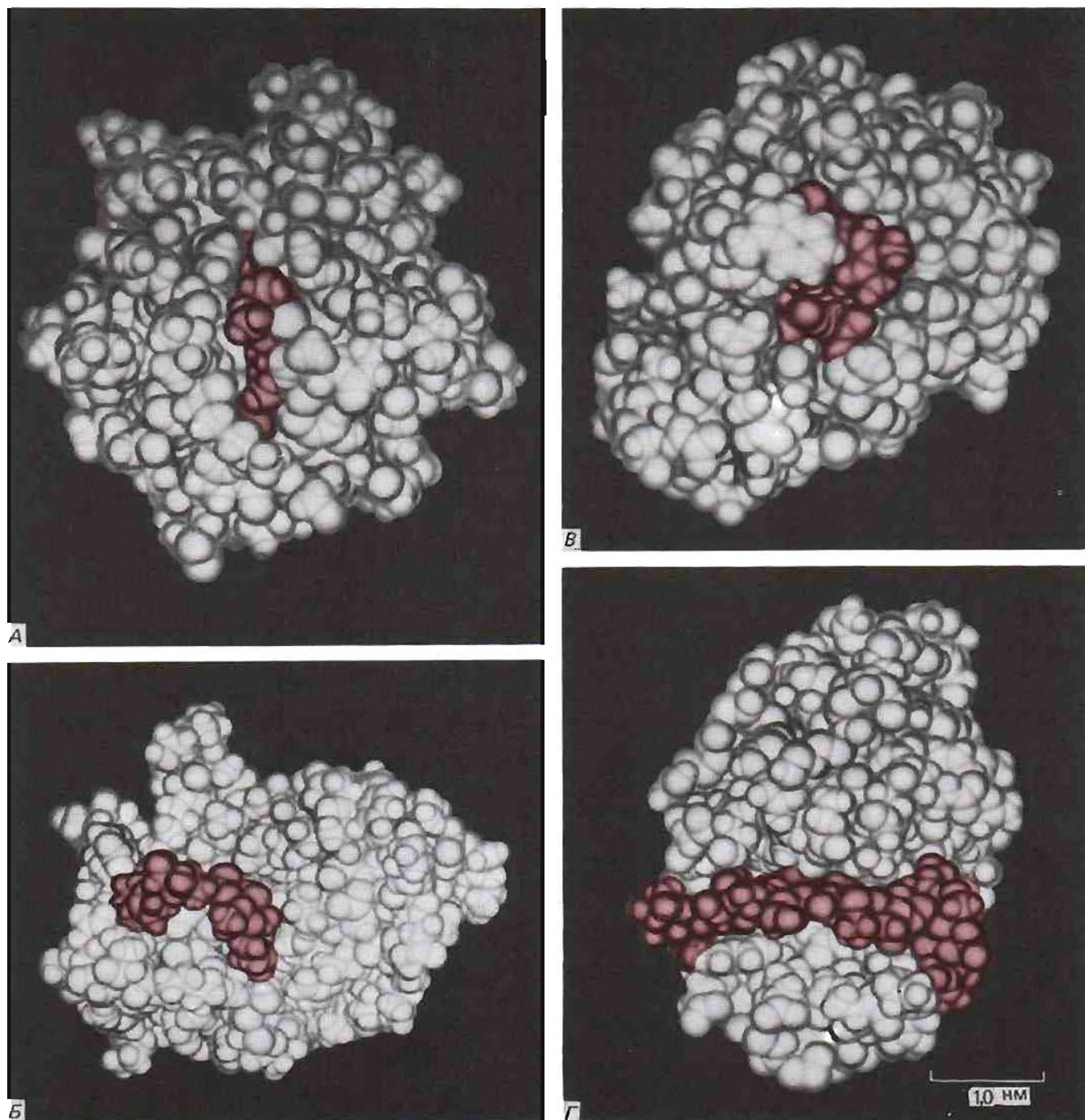


Рис. 3-48. Нарисованные компьютером объемные модели четырех ферментов, связанных с коферментами или субстратами. Связанный лиганд показан в цвете. *А.* Цитохром с со связанным гемом. *Б.* Рибонуклеаза, связавшая динуклеотид. *В.* Флаводоксин со связанным флавиномононуклеотидом. *Г.* Лизоцим яичного белка со связанным олигосахаридом. (С любезного разрешения Richard J. Feldmann.)

Рис. 3-49. Иногда ферменты образуют временную ковалентную связь со своими субстратами. В приведенном здесь примере карбоксильная группа разорвавшейся полипептидной цепи образует ковалентную связь с активированным сериновым остатком протеиназы (см. рис. 3-46). После диссоциации несвязанной части полипептида происходит вторая (не показанная здесь) стадия реакции: молекула воды гидролизует вновь образованную ковалентную связь и освобождает оставшуюся часть полипептидной цепи. При этом серин в положении 195 вновь приобретает атом водорода.

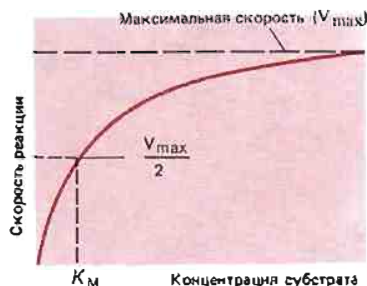
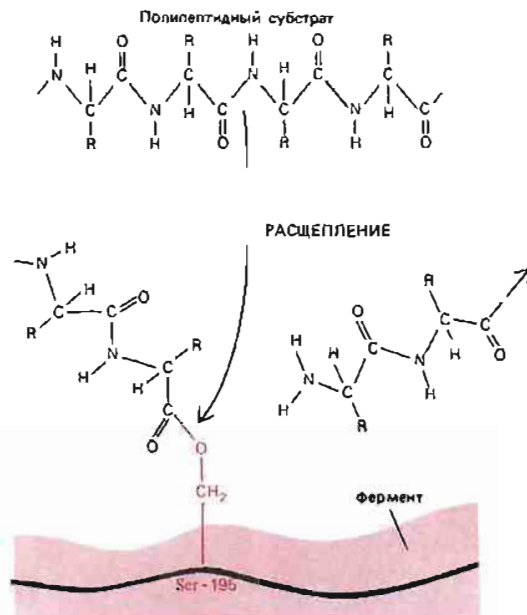


Рис. 3-50. При увеличении концентрации субстрата скорость ферментативной реакции V увеличивается до тех пор, пока не достигнет максимального значения $V_{\max}$. Происходит это при такой концентрации субстрата, при которой уже не остается незанятых молекул фермента, и скорость реакции лимитируется скоростью каталитического процесса на поверхности фермента. Для большинства ферментов концентрация субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной K_M , отражает прочность связывания субстрата с ферментом. Большие значения K_M соответствуют слабому связыванию, и наоборот.

тот факт, что часть энергии связывания непосредственно используется для катализа. Дело в том, что молекула субстрата перед тем, как превратиться в продукты реакции, проходит через ряд промежуточных форм с измененной геометрией и измененным электронным распределением. Свободная энергия всех этих промежуточных форм и особенно наименее стабильных переходных состояний существенно снижена, если молекула связана с поверхностью фермента. Обычно ферменты имеют значительно большее сродство к нестабильным *переходным состояниям* субстратов, чем к их стабильным формам. Используя энергию связывания, ферменты помогают субстратам принять определенное переходное состояние и таким образом значительно ускоряют одну определенную реакцию.

Некоторые ферменты ковалентно взаимодействуют с одним или несколькими из своих субстратов. При этом субстрат связывается с аминокислотой (например, с серином, цистеином, гистидином или лизином) или с молекулой кофермента (например, пиридоксальфосфата). Такие ферментативные реакции часто происходят в несколько стадий так, что один субстрат захватывается центром связывания и ковалентно связывается, а затем реагирует на поверхности фермента со вторым субстратом (рис. 3-49).

Способ действия ферментов накладывает ограничение на количество молекул субстрата, которое может быть «обработано» одной молекулой фермента в единицу времени. При увеличении концентрации субстрата скорость образования продукта сначала тоже увеличивается, но затем достигает максимального значения при насыщении молекул фермента субстратом (рис. 3-50). В этих условиях скорость реакции зависит только от того, сколь быстро фермент может «обработать» одну молекулу субстрата. Эту скорость выражают как *число оборотов*, которое для многих ферментов составляет около 1000 молекул субстрата в секунду.

Другой часто используемый для характеристики ферментов кинетический параметр — это их *константа Михаэлиса* K_M , определяемая как концентрация субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной (рис. 3-50). Низкое значение K_M означает, что фермент достигает максимальной скорости катализа при *низкой концентрации* субстрата и обычно означает очень прочное связывание субстрата ферментом.

3.4.3. Ферменты ускоряют реакции, но не смещают химического равновесия

Сколь бы хитро не был устроен фермент, он не может сделать катализируемую им реакцию более энергетически выгодной. Как и уже обсуждавшееся простое связывание, каждая химическая реакция имеет **положение равновесия**, при котором скорости прямой и обратной реакций равны и, следовательно, не происходит дальнейшего изменения концентраций (см. рис. 3-5). Если фермент ускоряет прямую реакцию $A + B \rightarrow AB$ в 10^8 раз, то и обратную реакцию $AB \rightarrow A + B$ он должен ускорить в 10^8 раз. **Отношение** скоростей прямой и обратной реакций зависит только от концентраций A , B и AB . Сколь угодно сильное связывание ферментом молекул субстратов A и B и сколь угодно слабое связывание продукта AB не могут изменить этого простого химического факта. Положение равновесия остается в точности тем же вне зависимости от того, катализирует реакцию фермент или нет.

3.4.4. Многие ферменты заставляют реакции протекать преимущественно в одном направлении, сопрягая их с гидролизом АТР [22]

Живая клетка представляет собой далекую от равновесия химическую систему: продукт каждого фермента обычно быстро расходуется, так как используется в качестве субстрата другим ферментом данного метаболического пути. Еще более важно, что многие из уже описанных в гл. 2 ферментативных реакций *сопряжены* с расщеплением АТР на АДФ и неорганический фосфат (разд. 2.2.6). Чтобы это оказалось возможным, пул АТР в свою очередь должен поддерживаться на уровне, далеком от равновесия, так, чтобы отношение концентрации АТР к концентрации продуктов его гидролиза было высоким (т. 3, разд. 9.1.10). Таким образом пул АТР служит «аккумулятором», поддерживающим постоянный перенос в клетке энергии и атомов по метаболическим путям, определяемым наличными ферментами. Приближение живой системы к химическому равновесию равнозначно ее распаду и смерти.

3.4.5. Мультиферментные комплексы повышают темп клеточного метаболизма [23]

Для поддержания жизни первостепенную роль играет не только эффективность ускоряющих метаболические реакции ферментов, но и внутриклеточная организация последних. По сути дела клетки должны постоянно противостоять неизбежным процессам приближения к химическому равновесию. Если бы скорость ключевых реакций не была выше скорости их обратных реакций, клетка быстро бы погибла. Представление о скорости метаболизма можно получить на основании того факта, что пул АТР типичной клетки млекопитающего за 1–2 мин полностью обновляется (т.е. все молекулы расщепляются и заменяются вновь синтезированными). Значит, за одну секунду каждая клетка использует 10^7 молекул АТР, а весь человеческий организм, таким образом, перерабатывает около грамма АТР в минуту.

Такая высокая скорость клеточных реакций обеспечивается эффективностью ферментных катализаторов. Эффективность многих ключевых ферментов столь высока, что ее дальнейшее увеличение бессмысленно, поскольку катализируемые этими ферментами реакции лимитирует скорость столкновений фермента с субстратами; другими словами, скорость реакций *лимитируется диффузией*.

Если реакция лимитируется диффузией, то ее скорость будет зависеть от концентрации фермента и субстрата. Поэтому для очень большой скорости ряда последовательных реакций необходимо, чтобы каждый промежуточный продукт и все ферменты присутствовали в высоких концентрациях. Но огромное количество одновременно протекающих в клетке различных реакций на-

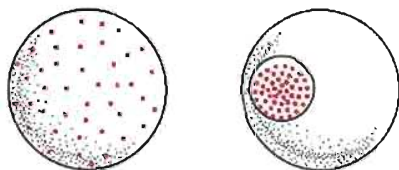


Рис. 3-51. Ограниченные мембранами компартменты. Если взаимодействующие молекулы находятся лишь в одном субклеточном отсеке эукариотической клетки, их концентрация заметно возрастает.

кладывает ограничение на достижимые концентрации реагентов. На деле большинство метаболитов присутствует в микромолярных концентрациях (10^{-6} М), а клеточная концентрация большинства ферментов значительно меньше 10^{-6} М. Как же в таком случае возможно поддерживать очень высокие скорости метаболизма?

Ответ кроется в пространственной организации клеточных компонентов. Скорость реакций можно повысить, не увеличивая концентрации субстратов, если собрать различные участвующие в последовательных реакциях ферменты в большой **мультиферментный комплекс**. При таком способе организации продукт фермента А переходит непосредственно к ферменту Б и т.д. до конечного продукта, причем лимитирующая стадия диффузии отсутствует даже при очень низких внутриклеточных концентрациях промежуточных соединений. Подобные ферментные комплексы встречаются очень часто. Структура одного из них — пируват-дегидрогеназы — была показана на рис. 2-40. В синтезе РНК, ДНК и белков тоже участвуют большие мультиферментные комплексы, однако их структура охарактеризована хуже.

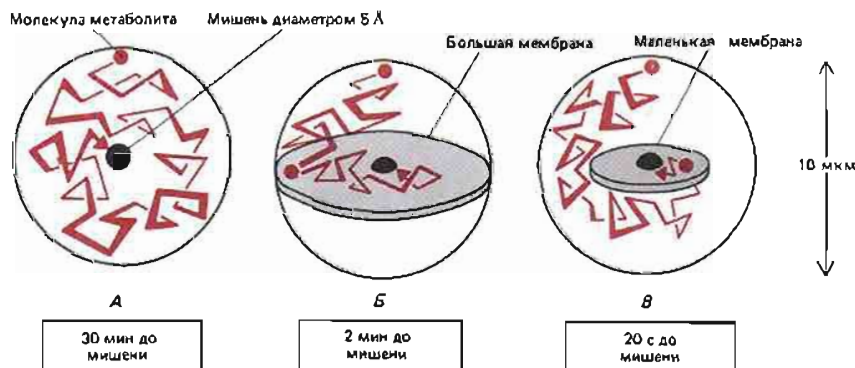
Два других механизма, предназначенных для преодоления кинетических проблем, связаны с внутриклеточными мембранами.

3.4.6. Внутриклеточные мембраны ускоряют реакции, лимитируемые диффузией [24]

Обширная сеть внутриклеточных мембран эукариотических клеток по крайней мере двумя способами ускоряет реакции, скорость которых в отсутствие мембран зависела бы от скорости диффузии. Во-первых, мембраны способны изолировать ряд субстратов и действующие на них ферменты в одном компартменте, например в митохондриях или ядре. Если принять, что каждый такой компартмент занимает около 10% объема типичной клетки, то концентрация реагентов в этих органеллах может быть в 10 раз выше, чем в такой же клетке без компартментализации (рис. 3-51). И чем меньше относительный объем органеллы, тем больше может быть эффект увеличения скорости реакций, лимитируемых диффузией.

Во-вторых, диффузия молекул может происходить в двух измерениях — на мембране, что значительно повышает вероятность соударения ферментов со своими субстратами по сравнению с трехмерной диффузией. Хотя скорость диффузии молекулы на мембране в 100 раз меньше, чем в водном растворе, в типичной эукариотической клетке реагенты встретятся значительно быстрее в том случае, если они сначала присоединятся к какой-либо внутриклеточной мембране, например к эндоплазматическому ретикулуму (рис. 3-52). Указанный механизм захвата молекул мембраной почти наверняка действует в случае ферментов и субстратов, участвующих в синтезе липидов. Тот же механизм, видимо, ускоряет многие реакции, катализируемые связанными с мембранами ферментами.

Рис. 3-52. Мембраны ускоряют соударения молекул. Скорости реакций возрастают, когда из-за наличия мембран трехмерная диффузия заменяется двумерной. Здесь показан результат серии теоретических расчетов. А. При диффузии в отсутствие мембран средней молекуле понадобится около 30 мин, чтобы найти любую единичную «мишень» внутри сферической частицы диаметром 10 мкм. Б. Если мишень фиксирована на мембране, то время диффузии значительно уменьшается. Средней молекуле требуется около 1 с, чтобы попасть на большую внутреннюю мембрану, и около 2 мин, чтобы найти на мембране мишень. В. Если уменьшить площадь внутренней мембраны в 10 раз, то молекуле потребуется 10 с, чтобы попасть на мембрану, но поиск мишени теперь займет приблизительно в 10 раз меньше времени, чем в случае Б. Таким образом, поиск наиболее эффективен в случае В — частота соударений увеличена по сравнению со случаем А почти в 100 раз.



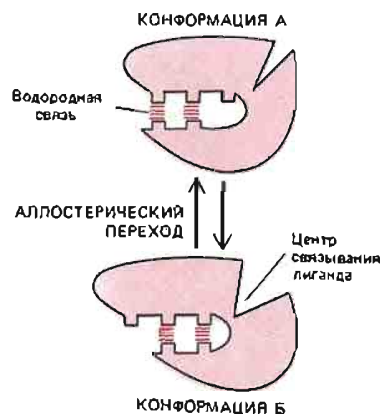


Рис. 3-53. Альтернативные конформации аллостерического белка. Каждая из конформаций А и Б включает по две водородные связи, поэтому они стабильнее любых промежуточных конформаций.

3.4.7. Молекулы белка способны обратимо изменять свою форму [25]

Поскольку стабильность молекулярных структур — условие, необходимое для нормальной жизнедеятельности клетки, естественный отбор действовал против способности белков случайным образом изменять свою конформацию. Но давление отбора не полностью устранило эту способность, а лишь специфически ограничило ее так, что молекулы большинства белков могут обратимо переходить в одну из нескольких различных, но близкородственных стабильных конформаций. Белки с такими свойствами называют **аллостерическими белками**. Например, в таком белке могут образовываться несколько различных наборов водородных связей с приблизительно одинаковой энергией, причем установление каждого набора связей требует небольшого изменения взаимной пространственной ориентации различных складок полипептидной цепи. Энергетически выгодны лишь строго определенные конформации молекул, а все промежуточные конформации нестабильны. Причина дискретности стабильных конформаций пояснена на рис. 3-53: вероятность конформации, промежуточной между конформациями А и Б, мала, так как она не позволяет образоваться ни одному из возможных наборов выгодных водородных связей.

Каждая дискретная конформация аллостерического белка имеет несколько отличную от других поверхность, поэтому разные конформации одного белка различаются по способности связываться с другими молекулами. Часто лишь одна из двух конформаций имеет высокое сродство к конкретному лиганду; в этом случае наличие или отсутствие лиганда определяет принимаемую белком конформацию (рис. 3-54). В тех случаях, когда с различными участками поверхности одного белка могут связываться два разных лиганда, изменение концентрации одного из них меняет сродство белка к другому. Подобные аллостерические изменения играют ведущую роль в регуляции многих биологических процессов.

3.4.8. Аллостерические белки участвуют в регуляции метаболизма

Аллостерические белки участвуют в регуляции по **принципу обратной связи**, которая контролирует поток веществ через метаболические пути (разд. 2.5.2). Например, ферменты, действующие на ранних стадиях какого-либо метаболического пути, почти всегда являются аллостерическими белками, способными существовать в двух альтернативных конформациях. Одна из них — это активная конформация. Белок в активной конформации связывает в **активном центре** субстрат и превращает его в следующий метаболит данного пути. Другая

Рис. 3-54. Связывание лиганда стабилизирует конформацию белка. Прочное связывание лиганда лишь с одной из возможных конформаций аллостерического белка переводит белок в эту конформацию.

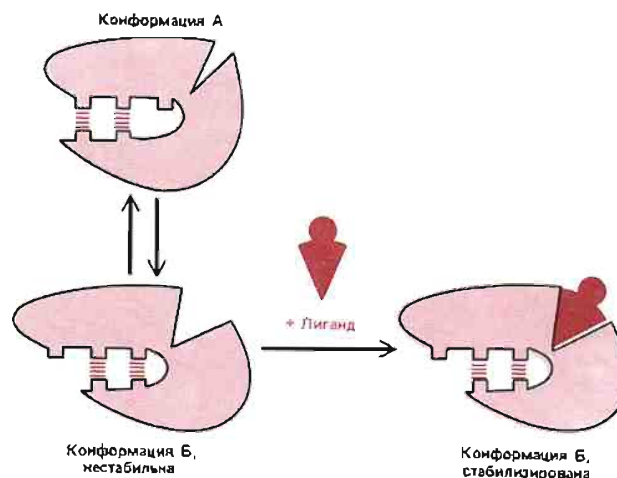
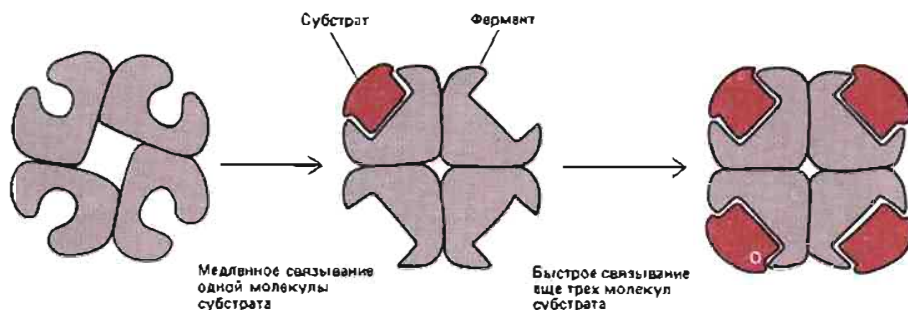


Рис. 3-55. Кооперативное связывание субстрата с ферментом. В агрегате, состоящем из аллостерических субъединиц, конформация одной субъединицы часто влияет на конформацию соседних субъединиц. Поэтому связывание одной молекулы субстрата может повлиять на сродство фермента к другим молекулам субстрата.



конформация — неактивная. Белок в этой конформации прочно связывает конечный продукт того же самого пути в специальном участке поверхности (регуляторном центре). По мере накопления конечного продукта фермент переходит в неактивную форму, поскольку она стабилизируется связыванием продукта с регуляторным центром (рис. 3-54). В других случаях фермент определенного метаболического пути *активируется* в результате аллостерического перехода, который происходит при недостатке в клетке продукта этого пути. Таким образом, клетка добивается того, что каждый продукт синтезируется лишь тогда, когда он необходим, и автоматически поддерживает относительно постоянные концентрации всех метаболитов.

3.4.9. Аллостерические белки совершенно необходимы для клеточной сигнализации [25]

Мы уже отметили, что аллостерические белки (например, те, которые участвуют в регуляции по принципу обратной связи) имеют по меньшей мере два центра связывания — один для субстрата и один или более для регуляторных лигандов. Эти центры занимают различные участки поверхности белка и узнают совершенно разные малые молекулы или ионы. Но, как мы уже видели, связывание одного лиганда с соответствующим центром может изменить конформацию белка и повлиять на связывание другого лиганда. Этот факт лежит в основе очень мощного принципа клеточной организации, так как позволяет регулировать любую ферментативную реакцию или метаболический путь продуктом любой другой реакции вне зависимости от его химической природы. Например, синтез и распад гликогена в мышечных клетках регулируются концентрацией Ca^{2+} с помощью аллостерических ферментов, активность которых меняется при изменении концентрации Ca^{2+} .

Аллостерические белки особенно эффективны, если, как это часто случается, они состоят из нескольких идентичных субъединиц. В этом случае конформация одной субъединицы может влиять на конформацию других субъединиц, что приводит к своего рода усилению; например, молекула субстрата (или другого лиганда), связанная с соответствующим центром одной субъединицы, может стабилизировать такую конформацию других субъединиц, при которой следующим молекулам субстрата будет легче связываться с данным ферментом (рис. 3-55). Зависимость активности аллостерического фермента от концентрации субстрата описывается характерной сигмоидной кривой (рис. 3-56). Аллостерические белки этого рода работают наподобие переключателей и за минимальное время переходят из одного состояния в другое (том 3, рис. 13-38).

3.4.10. Белки можно заставить изменять конформацию [25]

Белки обеспечивают направленное течение всех происходящих в клетке процессов. Как же можно заставить молекулы самих белков двигаться упорядоченным образом? Прежде чем ответить на этот вопрос, мы должны рассмо-

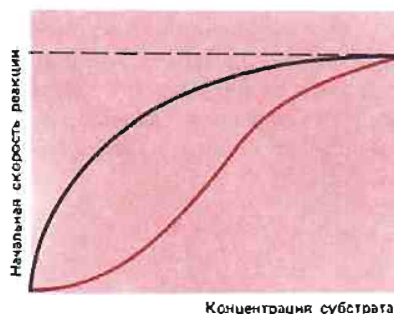
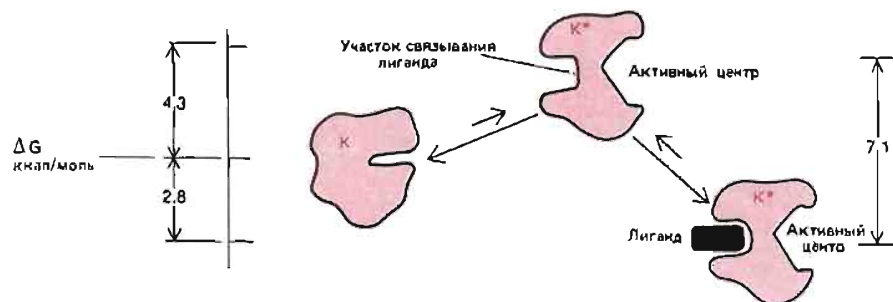


Рис. 3-56. При изменении концентрации субстрата активность изображенного на рис. 3-55 фермента меняется так, как здесь показано. Кооперативное связывание молекул субстрата приводит к характерной «сигмоидной» зависимости (выделена цветом), отличной от кривой простого насыщения субстратом неаллостерического фермента (черная кривая) (см. также рис. 3-50).

Рис. 3-57. Эта схема показывает связывание лиганда с активной конформацией аллостерического белка. Свободная энергия связывания ΔG составляет $-7,1$ ккал/моль (что соответствует константе сродства 10^5 л/моль). Присоединение лиганда «перетаскивает» белок К из обычной неактивной формы К в каталитически активную конформацию К*. В этом примере в отсутствие лиганда неактивная конформация в 1000 раз предпочтительнее активной, а в присутствии лиганда активная конформация в 100 раз предпочтительнее (см. табл. 3-3).

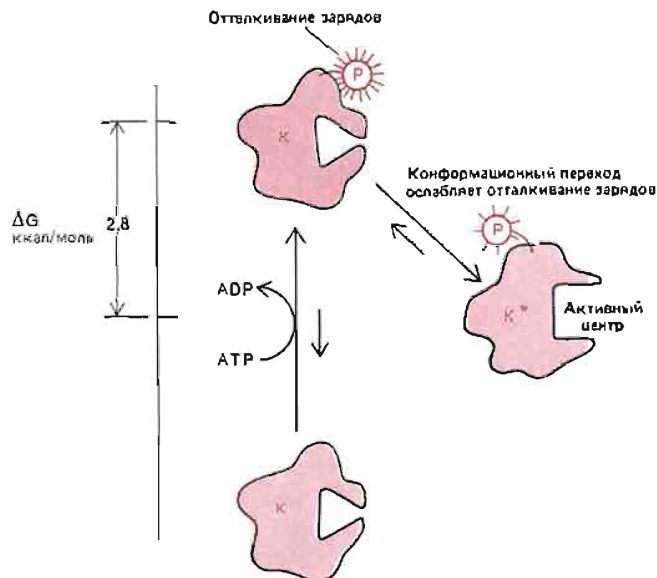


треть, каким образом клетка контролирует изменения конформации аллостерических белков. Рассмотрим аллостерический белок, способный принимать две альтернативные конформации – неактивную низкоэнергетическую К и активную высокоэнергетическую К*, энергия которых различается на 4,3 ккал/моль (что приблизительно соответствует энергии образования на поверхности белка четырех водородных связей). При такой разнице энергий вероятность конформации К будет в 1000 раз превышать вероятность конформации К* (табл. 3-3), и белок почти всегда будет находиться в неактивной конформации. Есть, однако, два способа заставить белок принять активную конформацию.

Связывание низкомолекулярного лиганда, образно выражаясь, «перетаскивает» молекулу в активную конформацию К*. Если лиганд связывается только с К*, то энергия этой конформации избирательно уменьшается, а энергия К останется неизменной (рис. 3-57). Поскольку лиганд связывается с белком достаточно слабо (большая часть энергии связывания уходит на удержание подходящей для лиганда формы белка), он с легкостью диссоциирует, и поэтому такое изменение конформации белка полностью обратимо.

Другой способ состоит в использовании дополнительной химической энергии для того, чтобы «толкнуть» белок на изменение конформации К на активную конформацию К*. В этом случае изменение конформации не столь обратимо. Обычно происходит ковалентный перенос фосфата с молекулы АТФ на остатки серина, треонина или тирозина белка. Предположим, что тем самым создается невыгодное для конформации К отталкивание зарядов. Если это отталкивание уменьшено в активной форме К*, то белок будет стремиться перейти из К в К* (рис. 3-58). Регулируемое фосфорилирование, активирующее

Рис. 3-58. АТФ фосфорилирует многие белки. На этой схеме рассматривается предположительный механизм: фосфорилирование неактивной формы аллостерического белка создает энергетически невыгодное отталкивание зарядов; этот эффект частично снимается переходом в активную конформацию К*. Таким образом, фосфорилирование «толкает» фермент в активную конформацию. Следует, однако, иметь в виду, что это не единственный возможный механизм действия фосфорилирования. В случае гликоген-фосфоорилазы, изученной лучше других, фосфорилирование приводит к притяжению зарядов, которое вызывает конформационное изменение, сближающее удаленные части белка.



щее или подавляющее функционирование специфических белков,—обычное явление в эукариотических клетках (т. 3, разд. 13.4.1); в самом деле, приблизительно одна десятая различных белков клеток млекопитающих содержит ковалентно связанный фосфат.

Иногда при добавлении ADP к таким фосфорилированным белкам *in vitro* наблюдается синтез АТФ. Эти данные непосредственно показывают, что существенная часть энергии гидролиза АТФ была запасена в напряженной конформации, принимаемой белком при его фосфорилировании. Как же, однако, происходящие с потреблением энергии изменения конформации белка вызывают движения и производят в клетке полезную работу?

3.4.11. Изменения конформации белка, происходящие с затратой энергии, могут быть использованы для выполнения полезной работы [26]

Предположим, что белку необходимо «пройти» вдоль тонкой нити, например вдоль микротрубочки или молекулы ДНК. На рис. 3-59 показано, как аллостерический белок может выполнить эту задачу, принимая различные конформации. Если ничто не направляет и не упорядочивает конформационные изменения, то изменения формы белка будут полностью обратимы, т.е. белок будет случайно и бесцельно блуждать вдоль нити или волокна.

Поскольку при направленном движении белка совершается работа, то по законам термодинамики на движение должна быть затрачена какая-либо энергия (в противном случае это движение можно было бы использовать для создания вечного двигателя). Поэтому, как бы мы ни модифицировали показанную на рис. 3-59 модель, например путем введения стабилизирующих ту или иную конформацию лигандов, молекула белка не будет способна к направленному движению, если не снабдить ее источником энергии.

Необходимо каким-либо образом сделать последовательность изменений конформации белка направленной. Например, весь цикл может стать направленным, если какую-либо из стадий сделать необратимой. Один из способов достижения необратимости состоит в использовании уже описанного цикла фосфорилирования—дефосфорилирования. Но аллостерические изменения белков можно направлять и без этого, используя энергию гидролиза АТФ. К примеру, в показанной на рис. 3-60 модифицированной схеме циклического перемещения связывание АТФ заставляет белок изменить конформацию 1 на конформацию 2. Затем происходит гидролиз АТФ, продуктами которого являются связанные ADP и P_i . Этот гидролиз сопровождается переходом конформации 2 в конформацию 3. Наконец, освобождение ADP и P_i позволяет белку вернуться в конформацию 1.

Поскольку на последовательность конформационных переходов $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 1$ затрачивается энергия гидролиза АТФ, то весь цикл при физиологических условиях становится практически необратимым (т.е. вероятность образования АТФ из ADP и P_i по пути $1 \rightarrow 3 \rightarrow 2 \rightarrow 1$ очень низка). Так как необратимость обеспечивает однонаправленность цикла, то молекула белка в нашем схематическом примере будет непрерывно перемещаться вправо. Примерами белков, осуществляющих направленное движение с помощью описанного механизма, могут служить мышечный белок *миозин* и белок ДНК-геликазы, играющий важную роль в репликации ДНК.

Многие белковые устройства используют аналогичные механизмы для выполнения упорядоченных движений. Все эти белки способны претерпевать циклические изменения формы, сопровождающиеся гидролизом АТФ. Некоторые из них по ходу цикла временно фосфорилируются, другие—нет.

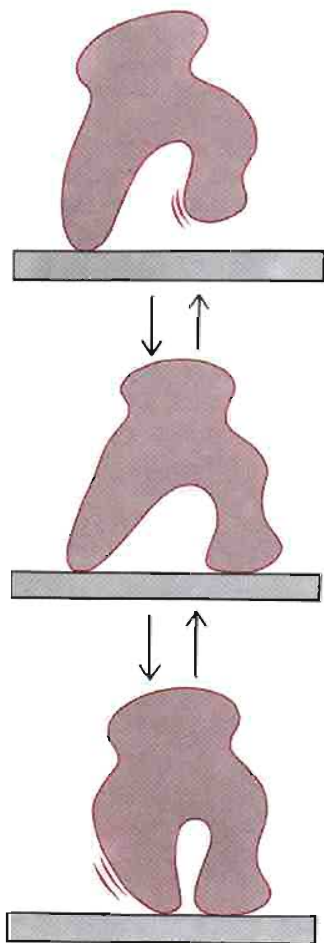


Рис. 3-59. Схематическое изображение аллостерического «шагающего» белка. Хотя три различные конформации белка позволяют ему случайно блуждать взад-вперед по волокну, с которым он связан, постоянное движение в одном направлении невозможно.

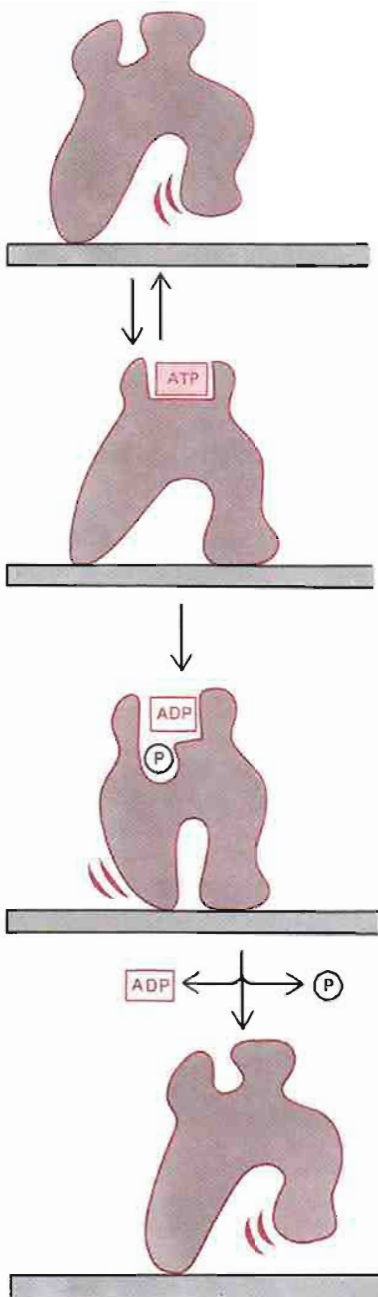


Рис. 3-60. «Шагающий» белок, который использует энергию гидролиза АТФ для упорядочивания переходов между тремя различными конформациями. Цикл становится практически необратимым, поскольку один из конформационных переходов сопряжен с гидролизом АТФ. В результате белок постоянно движется по волокну вправо.

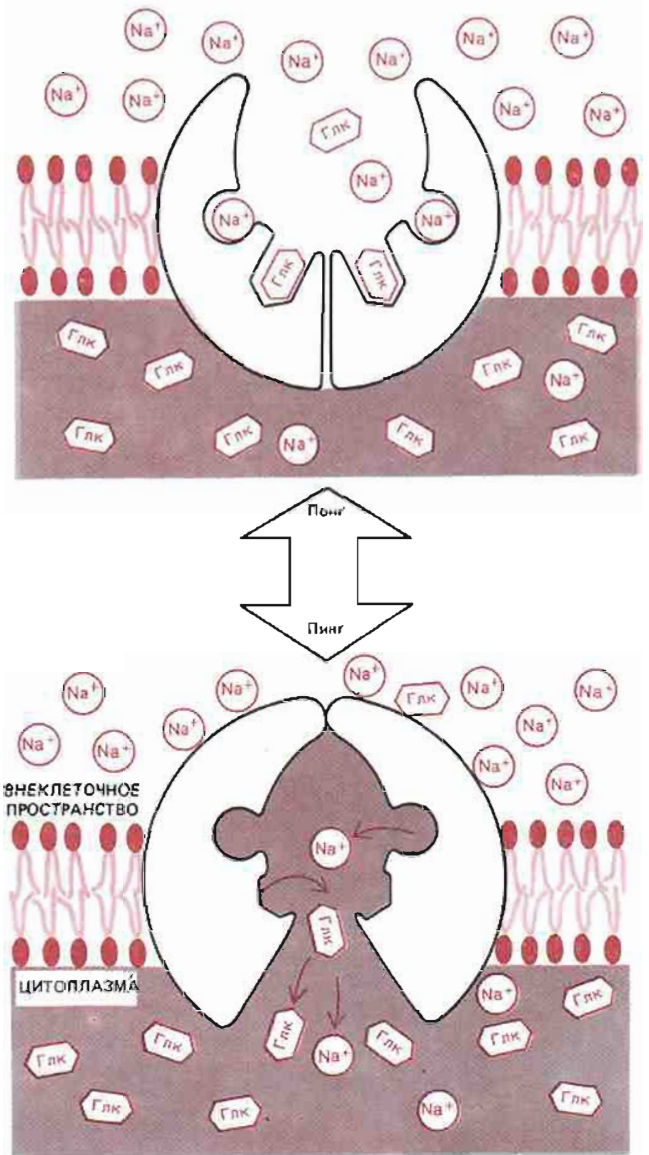


Рис. 3-61. Гипотетическая схема, показывающая, как градиент концентрации Na^+ мог бы приводить в действие глюкозный насос. Насос случайно колеблется между двумя альтернативными состояниями «пинг» и «понг». В состоянии «понг» белок открыт во внеклеточное пространство, в состоянии «пинг» – в цитоплазму. Na^+ связывается с белком в обоих состояниях одинаково хорошо, но связывание Na^+ существенно повышает сродство белка к глюкозе (Глк). Поскольку концентрация Na^+ во внеклеточном пространстве выше, чем в цитоплазме, глюкоза с большей вероятностью присоединится к насосу в состоянии «понг». Следовательно, Na^+ и глюкоза входят в клетку благодаря переходу «понг → пинг» значительно чаще, чем покидают ее (при переходе «пинг → понг»), и в результате система переносит глюкозу и Na^+ в клетку.

3.4.12. Мембранные аллостерические белки, используя энергию АТР, могут служить молекулярными насосами [27]

Аллостерические белки могут использовать энергию гидролиза АТР не только для создания механического напряжения, но и для осуществления других форм работы. Например, присутствующий в плазматической мембране всех клеток животных аллостерический белок под названием $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-}$ зависимая АТРаза в каждом цикле конформационных изменений, сопровождающихся АТР-зависимым фосфорилированием белка, выкачивает из клетки 3 иона Na^+ и накачивает в клетку 2 иона K^+ . О существенном значении этого насоса, работающего за счет энергии АТР, говорит тот факт, что на его долю приходится более 30% энергетических потребностей большинства клеток. Выкачивание Na^+ и накачивание K^+ приводят к тому, что во внутриклеточной среде содержание Na^+ оказывается ниже, а содержание K^+ выше, чем во внеклеточной среде. Таким путем создаются противоположно направленные трансмембранные градиенты концентраций ионов K^+ и Na^+ . Сейчас мы рассмотрим, как заключенная в этих и других ионных градиентах энергия в свою очередь направляет конформационные изменения множества других мембранных аллостерических белков, заставляя их выполнять полезную для клетки работу.

3.4.13. Белки могут мобилизовать энергию ионных градиентов для выполнения полезной работы [27]

АТР и другие нуклеозидтрифосфаты – крайне важные, но не единственные источники энергии, легкодоступной для различных клеточных целей. Другой важный источник энергии – это различие концентраций (градиент) ионов по обе стороны различных клеточных мембран. В этом случае запасание и высвобождение энергии можно сравнить с перепадом уровня воды с двух сторон от плотины. Например, созданный $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-}$ зависимой АТРазой большой перепад концентрации Na^+ с двух сторон плазматической мембраны приводит в движение другие белковые насосы, транспортирующие в клетку глюкозу или аминокислоты.

Детали работы таких насосов пока не ясны (скорее всего они устроены сложно), но один из возможных способов использования энергии градиента ионов Na^+ для приведения в движение насоса, закачивающего в клетку глюкозу, схематически показан на рис. 3-61.

Мембранные аллостерические насосы, питаемые энергией гидролиза АТР, способны работать в обратном направлении и использовать энергию ионного градиента для синтеза АТР. В самом деле, как мы увидим в гл. 9, именно такой механизм мобилизует энергию градиента протонов $[\text{H}^+]$, направленного поперек внутренней мембраны митохондрий, для синтеза большинства молекул АТР в мире животных.

Заключение

Биологические функции белка определяются деталями химических свойств его поверхности. Углубления на поверхности белка, образованные точно расположенными аминокислотными остатками, формируют центры специфического связывания. Ферменты катализируют химические изменения связанных с ними молекул субстратов: при этом для расширения своих возможностей они часто используют маленькие, прочно связанные молекулы коферментов. Скорость ферментативных реакций нередко лимитируется диффузией, однако она может быть выше, если фермент и субстрат оказываются вместе в одном и том же небольшом клеточном компартменте.

Связывание лигандов с поверхностью аллостерических белков обратимо меняет форму последних. Изменения, вызванные присоединением одного лиганда, могут повлиять на связывание второго лиганда, что обеспечивает механизм

регуляции различных клеточных процессов. Использование дополнительной химической энергии может внести направленность в изменения формы белка. Например, за счет сопряжения аллостерических изменений с гидролизом АТФ белки могут выполнять полезную работу, скажем создавать механическое усилие или перекачивать ионы через мембрану.

Литература

Общая

- Judson H. F., *The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology*, New York, Simon and Schuster, 1979. (Компетентное изложение истории молекулярной биологии.)
- *Lehninger A. L., *Principles of Biochemistry*, New York, Worth, 1982.
- Schulz G. E., Schirmer R. H., *Principles of Protein Structure*, New York, Springer, 1979.
- **Stryer L., *Biochemistry*, 2nd ed, San Francisco, Freeman, 1981.
- ***Watson J. D., *Molecular Biology of the Gene*, 3rd ed, Menlo Park, Ca., Benjamin-Cummings, 1976.

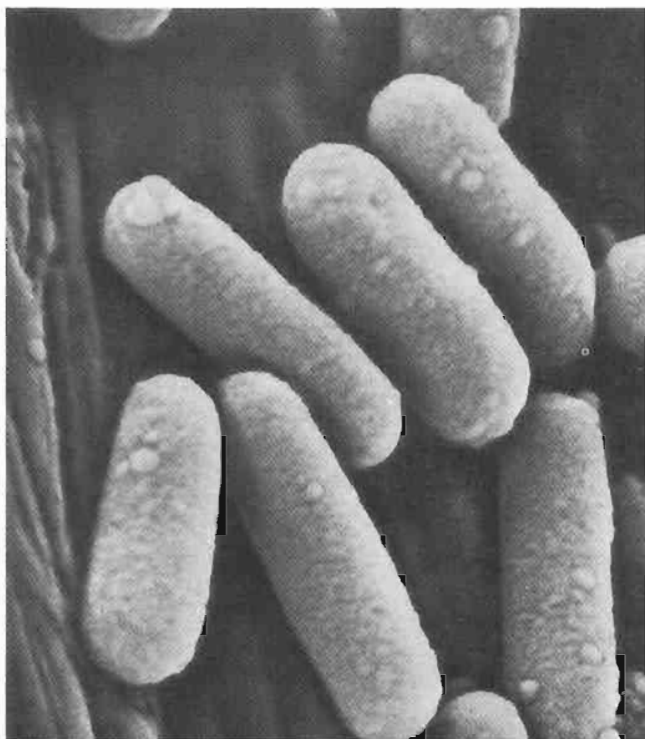
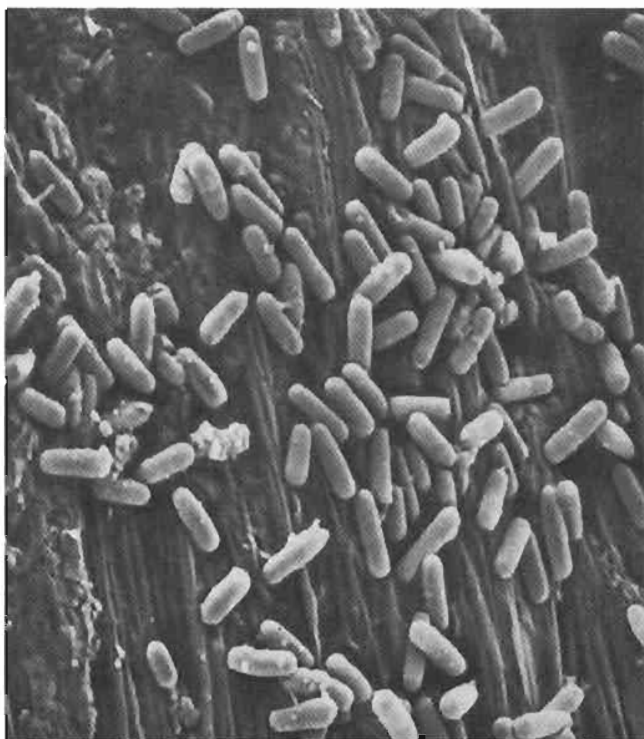
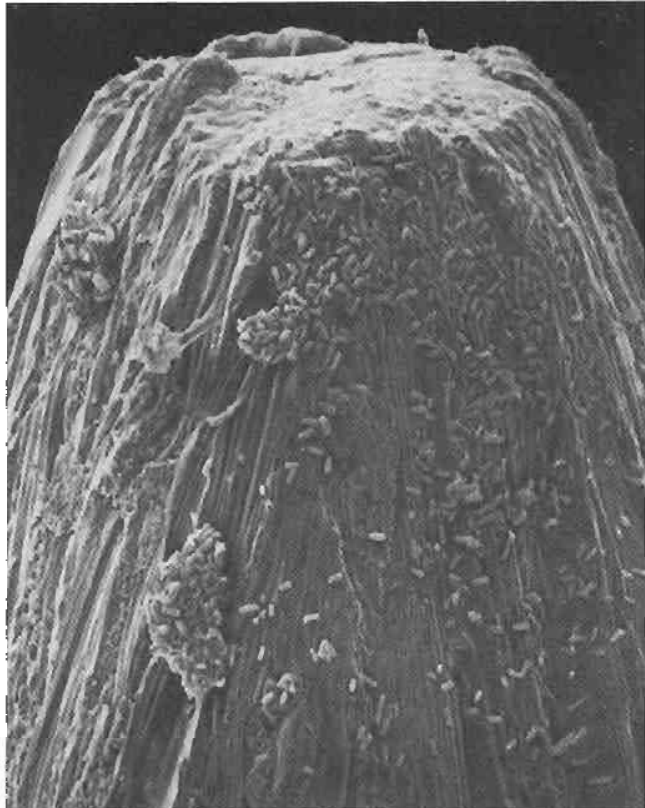
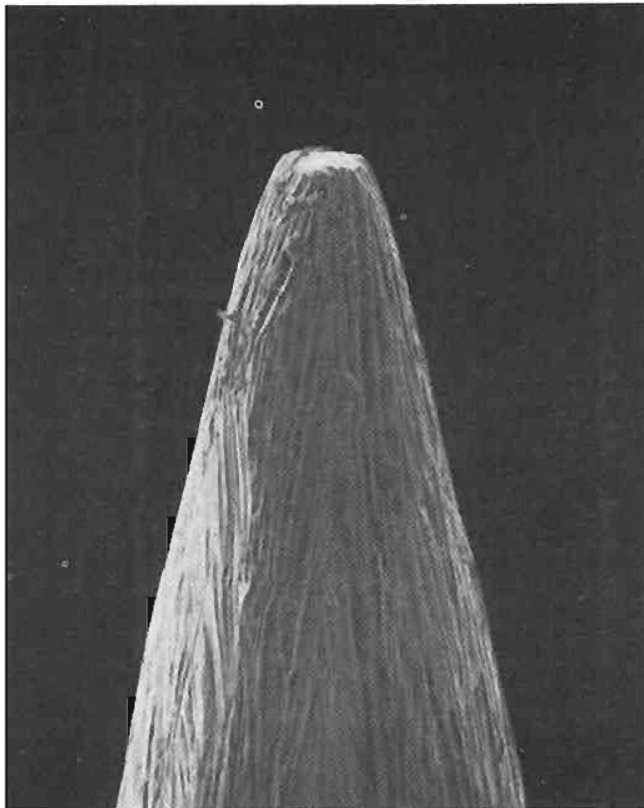
Цитированная

1. ****Cantor C. R., Schimmel P. R., *Biophysical Chemistry*, Part 1 and Part 3, San Francisco, Freeman, 1980.
- Eisenberg D., Crothers D., *Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences*, Menlo Park, Ca., Benjamin-Cummings, 1979.
- ****Pauling L., *The Nature of the Chemical Bond*, 3rd ed, Ithaca, N.Y., Cornell University Press, 1960. (Классическое изложение принципов взаимодействия атомов в органических молекулах.)
2. *****Stent G. S., *Molecular Genetics: An Introductory Narrative*, San Francisco, Freeman, 1971.
- Olby R., *The Path to the Double Helix*, Seattle, University of Washington Press, 1974.
3. Watson J. D., Crick F. H. C., Molecular structure of nucleic acids, A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature*, 171, 737-738 (1953).
4. Watson J. D., Crick F. H. C., Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid, *Nature*, 171, 964-967 (1953).
- Meselson M., Stahl F. W., The replication of DNA in *E. coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 44, 671-682 (1958).
- Sanger F. et al., Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA, *Nature*, 265, 687-695 (1977).
5. Drake J. W., *The Molecular Basis of Mutation*, San Francisco, Holden-Day, 1970.
6. Thompson E. O. P., The insulin molecule, *Scientific American*, 192(5), 36-41 (1955). (Описано, как впервые была расшифрована последовательность.)
- Yanofsky C., Gene structure and protein structure, *Sci., Am.*, 216 (5), 80-94 (1967). (Доказательство коллинеарности.)
7. Brenner S., Jacob F., Meselson M., An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis, *Nature*, 190, 576-581 (1961).
8. Crick F. H. C., The genetic code, *Sci. Am.*, 215 (4), 55-62 (1966).
9. Rich A., Kim S. H., The three-dimensional structure of transfer RNA, *Sci., Am.*, 238 (1), 52-62 (1978).
10. Lake J. A., The ribosome, *Sci. Am.*, 245 (2), 84-97 (1981).
11. Schulz G. E., Schirmer R. H., *Principles of Protein Structure*, New York, Springer, 1979. (Первые пять глав.)
- ****Cantor C. R., Schimmel P. R., *Biophysical Chemistry*, Part 1, The Conformation of Biological Macromolecules, San Francisco, Freeman, 1980. (Главы 2 и 5.)
- Dickerson R. E., Gels I., *The Structure and Action of Proteins*, New York, Harper and Row, 1969.
12. Anfinsen C. B., Principles that govern the folding of protein chains, *Science*, 181, 223-230 (1973).
13. Richardson J. S., The anatomy and taxonomy of protein structure, *Adv. Protein Chem.*, 34, 167-339 (1981).
- Pauling L., Corey R. B., Branson H. R., The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 37, 205-211 (1951).

- Pauling L., Corey R.B., Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: two new pleated sheets, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **37**, 729–740 (1951).
14. Hartley B.S., Homologies in serine proteases, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)*, **257**, 77–87 (1970).
Smith E.L., Evolution of enzymes, In *The Enzymes*, 3rd ed., Vol. 1 (P.D. Boyer, ed.), p. 267–339, New York, Academic Press, 1970.
Doolittle R.F., Protein evolution, In *The Proteins*, 3rd ed., Vol. 4 (H. Neurath, R.L. Hill, eds.), p. 1–118, New York, Academic Press, 1979.
 15. Rossmann M.G., Argos P., Protein folding, *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 497–532 (1981).
Blake C.C.F., Do genes-in-pieces imply proteins-in-pieces? *Nature*, **273**, 267 (1978).
Banks R.D. et al., Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase: a possible hinge-bending enzyme, *Nature*, **279**, 773–777 (1979).
 16. ***** Metzler D.E., *Biochemistry*, New York, Academic Press, 1977. (В гл. 4 описано, как макромолекулы собираются в большие агрегаты.)
 17. Caspar D.L.D., Klug A., Physical principles in the construction of regular viruses, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **27**, 1–24 (1962).
Harrison S.C., Structure of simple viruses; specificity and flexibility in protein assemblies, *Trends Biochem. Sci.*, **3**, 3–7 (1978).
Harrison S.C., Virus crystallography comes of age, *Nature*, **286**, 558–559 (1980).
 18. Fraenkel-Conrat H., Williams R.C., Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **41**, 690–698 (1955).
Nomura M., Assembly of bacterial ribosomes, *Science*, **179**, 864–873 (1973).
Butler P.J.G., Klug A., The assembly of a virus, *Sci. Am.*, **239** (5), 62–69 (1978).
King J., Regulation of structural protein interactions as revealed in phage morphogenesis, in *Biological Regulation and Development*, Vol. 2 (R.F. Goldberger, ed.), p. 101–132, New York, Plenum, 1980.
 19. Steiner D.F., Kemmler W., Tager H.S., Peterson J.D., Proteolytic processing in the biosynthesis of insulin and other proteins, *Fed. Proc.*, **33**, 2105–2115 (1974).
 20. ***** Metzler D., *Biochemistry: The Chemical Reactions of a Living Cell*, New York, Academic press, 1977. (В гл. 6 описаны общие принципы ферментативного катализа и характерные особенности аллостерических белков.)
Fersht A., *Enzyme Structure and Mechanism*, San Francisco, Freeman, 1977.
 21. Wolfenden R., Analog approaches to the structure of the transition state in enzyme reactions, *Accounts Chem. Res.*, **5**, 10–18 (1972).
 22. Wood W.B., Wilson J.H., Benbow R.M., Hood L.E., *Biochemistry: A Problems Approach*, 2nd ed, Menlo Park, Ca., Benjamin-Cummings, 1981. (Главы 9, 15 и связанные с ними задачи.)
 23. Reed L.J., Cox D.J., Multienzyme complexes. In: *The Enzymes*, 3rd ed. (P.D. Boyer, ed.), p. 213–240, New York, Academic Press, 1970.
Reed L.J., Multienzyme complexes, *Accounts Chem. Res.*, **7**, 40–46 (1974).
Srere P.A., Mosback K., Metabolic compartmentation: symbiotic, organellar, multienzymic, and microenvironmental, *Annu. Rev. Microbiol.*, **28**, 61–83 (1974).
 24. Adam G., Delbruck M., Reduction of dimensionality in biological diffusion processes, In: *Structural Chemistry and Molecular Biology* (A. Rich, N. Davidson eds.), p. 198–215, San Francisco, Freeman, 1968.
 25. Monod J., Changeux J.P., Jacob F., Allosteric proteins and cellular control systems, *J. Mol. Biol.*, **6**, 306–329 (1963).
Edelstein S.J., *Introductory Biochemistry*, San Francisco, Holden-Day, 1973. (В гл. 10 описаны белковые агрегаты и аллостерические взаимодействия.)
***** Cantor C.R., Schimmel P.R., *Biophysical Chemistry, Part III, The Behavior of Biological Macromolecules*, San Francisco, Freeman, 1980. (Главы 15 и 17.)
 26. Hill T.L., A proposed common allosteric mechanism for active transport, muscle contraction and ribosomal translocation, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **64**, 267–274 (1969).
Hill T.L., Biochemical cycles and free energy transduction, *Trends Biochem. Sci.*, **2**, 204–207 (1977).
 27. Kyte J., Molecular considerations relevant to the mechanism of active transport, *Nature*, **292**, 201–204 (1981).
Hokin L.E., The molecular machine for driving the coupled transport of Na^+ and K^+ is an $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase, *Trends Biochem. Sci.*, **1**, 233–237 (1976).
Hopfer U., Groseclose R., The mechanism of Na^+ -dependent D-glucose transport, *J. Biol. Chem.*, **255**, 4453–4462 (1980).

В русском переводе имеются следующие издания:

- * *Ленинджер А. Основы биохимии. В 3-х томах.*—М.: Мир, 1985.
- ** *Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах.*—М.: Мир, 1984—1985.
- *** *Уотсон Дж. Молекулярная биология гена.*—М.: Мир, 1978.
- **** *Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. В 3-х томах.*—М.: Мир, 1984—1985.
- ***** *Паулинг Л. Природа химической связи.*—М.-Л.: Госхимиздат, 1947.
- ***** *Стент Г. Молекулярная генетика.*—М.: Мир, 1974. [Имеется также перевод 2-го издания: Стент Г., Кэлиндар Р. Молекулярная генетика.—М.: Мир, 1981.]
- ***** *Мецлер Д. Биохимия. В 3-х томах.*—М.: Мир, 1980.



Эффект масштаба. На этих микрофотографиях, полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа, показаны при все более возрастающем увеличении клетки бактерий на кончике обычной булавки. (С любезного разрешения Tony Brain, Science Photo Library.)

Клетки очень малы по размеру и сложно устроены: трудно рассмотреть их структуру, трудно определить молекулярный состав и еще труднее установить, как функционируют их отдельные элементы. Для изучения клеток разработано множество экспериментальных методов, возможности которых определяют уровень наших знаний в этой области. Успехи в изучении биологии клетки, включая наиболее удивительные достижения последних лет, как правило, связаны с применением новых методов. Поэтому для понимания клеточной биологии необходимо иметь некоторое представление о соответствующих экспериментальных методах.

В этой главе мы вкратце познакомимся с наиболее важными методами современной клеточной биологии и рассмотрим принципы и логику, на основе которых данные методы были разработаны. Многие из этих методов будут упоминаться в последующих главах, и в отдельных случаях мы вернемся к ним, чтобы изложить более подробно.

4.1. Микроскопия [1]

Диаметр типичной животной клетки составляет 10–20 мкм, что в пять раз меньше размеров мельчайшей видимой частицы. Именно поэтому только с появлением более совершенных световых микроскопов в начале XIX в. было обнаружено, что ткани животных и растений состоят из отдельных клеток. Это открытие, обобщенное Шлейденом и Шванном в 1835 г. в виде **клеточной теории**, знаменует собой начало клеточной биологии. Будучи чрезвычайно малыми по размерам, животные клетки к тому же бесцветны и прозрачны; вследствие этого их мельчайшие структурные части и самые крупные клеточные органеллы удалось обнаружить лишь после того (в конце XIX в.), как было получено множество красителей, которые обеспечили достаточный контраст исследуемых препаратов и сделали эти органеллы видимыми. Наконец, после изобретения в начале 40-х годов электронного микроскопа и разработки соответствующих методов хранения и окрашивания клеток сложность внутреннего строения клетки начала выявляться во всей полноте.

На рис. 4-1 сравниваются степени разрешения современных светового и электронного микроскопов. Характер изображения клеток и их содержимого в таких микроскопах зависит как от свойств используемого света и электронов, так и от реакции клеток на различные методы окрашивания и приготовления препаратов. Эти темы обсуждаются в последующих разделах.

4.1.1. С помощью светового микроскопа можно различить детали, отстоящие друг от друга на 0,2 мкм [2]

В общем случае излучение данной длины волны может быть использовано для изучения только таких структур, минимальные размеры которых еще сопоставимы с длиной волны самого излучения. Этот фундаментальный принцип ограничивает возможности любого микроскопа. Предел разрешения светового микроскопа задается длиной световой волны, которая в зависимости от

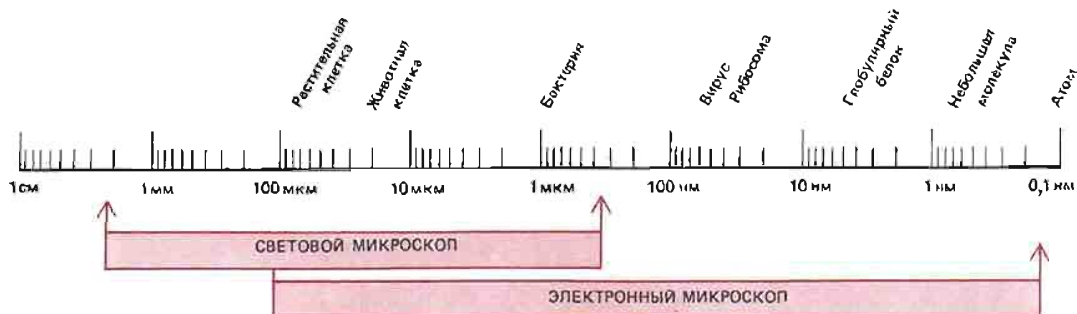


Рис. 4-1. Размеры клеток и клеточных компонентов, а также рабочие диапазоны светового и электронного микроскопов, изображенные в логарифмической шкале. В микроскопии принято пользоваться следующими единицами длины:

мкм (микромметр) — 10^{-6} м
 нм (наномметр) — 10^{-9} м
 Å (ангстрем) — 10^{-10} м



Рис. 4-2. Интерференция световых волн. Если две световые волны совпадают по фазе, амплитуда результирующей волны возрастает и, следовательно, яркость увеличивается. Если две световые волны не совпадают по фазе, они гасят друг друга и образуют волну, амплитуда которой (а следовательно, и яркость) уменьшается.

области спектра лежит в пределах 0,4–0,7 мкм. На практике же мельчайшими объектами, четко различимыми в световом микроскопе, являются бактерии и митохондрии, размеры которых составляют около 500 нм (0,5 мкм); более мелкие объекты видны нечетко вследствие эффекта оптической дифракции. Чтобы понять, почему это так, проследим за тем, что происходит с лучом света, когда он проходит через линзы микроскопа.

Оптическая дифракция обусловлена интерференцией световых волн, пути прохождения которых через оптическую систему несколько различаются. Если световые волны точно совпадают по фазе, т.е. гребень одной соответствует гребню другой, а впадина одной — впадине другой, то они взаимно усиливаются, и яркость возрастает. С другой стороны, если фазы волн не совпадают, они будут взаимно погашаться (рис. 4-2). Взаимодействие света с объектом изменит характер взаимосвязи фаз световых волн и вызовет эффект интерференции. Тень прямого края, например, освещенного светом одной длины волны, при большом увеличении будет выглядеть как набор параллельных линий, тогда как округлое пятно проявится в виде набора концентрических окружностей (рис. 4-3). По этой же причине отдельная точка выглядит в микроскопе как яркое пятно, а два близлежащих точечных объекта дают перекрывающиеся изображения, которые сливаются в одно. Повышение точности обработки линз не позволяет преодолеть это ограничение, поскольку оно задано волновой природой света. Таким образом, при использовании видимого света минимальное расстояние между двумя объектами, при котором они видны раздельно (так называемый **предел разрешения**), составляет 0,2 мкм. Этот предел был достигнут конструкторами микроскопов еще в конце XIX в. (однако в современных микроскопах, производимых серийно, достигается очень редко). Хотя изображение и можно увеличить до любых желаемых размеров, например проецируя его на экран, все же в световой микроскоп нельзя различить детали с размерами меньше 0,2 мкм.

Дифракция не всегда мешает исследованию клеток; более того, далее мы увидим, что интерференция, обусловленная дифракцией, может быть использована в микроскопе для изучения живых клеток и выявления в биологических структурах регулярно повторяющихся элементов. Но сначала обсудим, как используются химические красители для выявления деталей строения клетки.

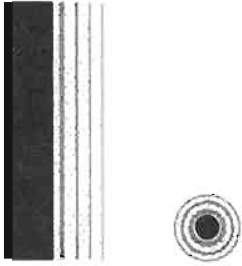


Рис. 4-3. Эффект интерференции, который можно наблюдать при большом увеличении по краям твердого объекта, расположенного между источником света и наблюдателем.



Рис. 4-4. Приготовление срезов на микротоме после заливки ткани, предназначенной для исследования с помощью светового микроскопа.

4.1.2. Различные компоненты клетки окрашиваются по-разному [1, 3]

В большинстве случаев только немногие компоненты клеток (70% массы которых составляет вода) препятствуют прохождению световых лучей. Поэтому без специальной обработки клетки практически не видны в обычный световой микроскоп. Для того чтобы сделать их видимыми, используют органические красители, обладающие определенной избирательностью.

В начале XIX в. возникла потребность в красителях для окрашивания текстильных тканей, что в свою очередь вызвало ускоренное развитие органической химии. Оказалось, что некоторые из этих красителей окрашивают и биологические ткани и, что было уж совсем неожиданно, часто предпочтительно связываются с определенными компонентами клетки, например ядром или мембранами. Использование таких избирательных красителей дает возможность более тонко исследовать внутреннее строение клетки. Сейчас в распоряжении ученых имеется богатый выбор органических красителей с такими колоритными названиями, как *малахитовый зеленый*, *судан черный*, *кумасси синий*, каждый из которых обладает специфическим сродством к определенным внутриклеточным органеллам. Например, краситель *гематоксилин* связывается главным образом с отрицательно заряженными молекулами, и поэтому его используют для изучения внутриклеточного распределения ДНК или РНК. Необходимо отметить, что химическая основа специфичности многих красителей неизвестна.

Сравнительно недавно были получены красящие вещества с еще более высокой специфичностью. Локализацию некоторых ферментов, например, можно определить, обработав клетки соответствующим субстратом: в месте локализации специфического фермента образуется видимый продукт ферментативной реакции. Для выявления специфических макромолекул получают антитела к ним. Осуществив ковалентное связывание этих антител с ферментом или с флуоресцирующим красителем, можно определить внутриклеточное распределение исследуемых макромолекул.

4.1.3. Для проведения микроскопических исследований ткани ее обычно фиксируют и режут

Большую часть биологических тканей перед окраской фиксируют. После фиксации клетки становятся пронизываемыми для красителей, а макромолекулы связываются таким образом, что фиксируется их местоположение и стабилизируется структура. Некоторые ранние методы фиксации включали кратковременное воздействие на фиксируемую ткань кислот или органических растворителей, например метилового спирта. При использовании современных методов клетки обычно обрабатывают реакционноспособными альдегидами, в частности формальдегидом и глутаральдегидом. Эти соединения образуют ковалентные связи со свободными аминогруппами и таким образом связывают близлежащие белковые молекулы.

Фиксация и окрашивание не единственные процедуры, используемые микроскопистами для приготовления препаратов. Толщина большинства тканей слишком велика, чтобы их сразу же можно было наблюдать при высоком разрешении. Поэтому ткани сперва режут на тонкие ломтики (*срезы*), каждый из которых укладывают плашмя на поверхность специального предметного стекла. Срезы нарезают на *микротоме*. В этом приборе использован принцип хлебoreзки. Обычно толщина срезов для световой микроскопии 1–10 мкм. Для нарезания срезов используют острое металлическое лезвие (рис. 4-4).

Большинство тканей слишком мягкие, чтобы из них сразу же можно было получить срезы. Поэтому после фиксации их *заливают* в расплавленный парафин или специальную смолу, которые пропитывают и окружают всю ткань. Используемая для заливки среда охлаждается или полимеризуется, образуя твердый блок, который затем режут на микротоме.

Недостаток такого подхода состоит в том, что любая обработка, исполь-

зованная для фиксации, может нарушить структуру клетки. Поэтому применяют другой метод приготовления срезов, где эта опасность уменьшена, — быстрое замораживание. Здесь можно обойтись без фиксации и заливки. Замороженную ткань режут на специальном микротоме (криотоме), оборудованном холодной камерой (криостатом).

Замороженные срезы, приготовленные таким способом, имеют явное преимущество, поскольку в них лучше сохраняются особенности нативной структуры. Однако их трудно готовить, а присутствие кристаллов льда приводит к тому, что многие морфологические детали исчезают.

4.1.4. Живые клетки можно наблюдать с помощью фазово-контрастного и интерференционного микроскопов [2]

Микроскопистов всегда беспокоила возможность потери или искажения некоторых компонентов клетки в процессе фиксации или окраски. Поэтому полученные результаты проверяют. Для этого изучают клетки с помощью различных методов; если во всех случаях получается одно и то же изображение, оно, вероятно, не является артефактом, а представляет собой реальную структуру.

Наиболее надежный способ показать существование в живых клетках той или иной структуры состоит в том, чтобы исследовать под микроскопом живые клетки, не подвергавшиеся воздействию предварительной фиксации или окрашиванию, пока клетки еще живы. Такой подход требует использования особых оптических систем, которые были бы сконструированы с учетом дифракционных свойств клетки. При прохождении света через живую клетку фаза световой волны меняется. Толщина клетки в разных участках различна, и поэтому фаза световых волн, проходящих через относительно более толстую или плотную часть клетки, такую, как ядро, сдвигается по отношению к фазе световых волн, проходящих через близлежащий более тонкий участок цитоплазмы. При наложении этих световых волн возникает явление интерференции, которое используется в **фазово-контрастном** и **интерференционном микроскопах**. При исследовании с помощью таких микроскопов многие детали живой клетки видны более отчетливо (рис. 4-5 и 4-6).

В самом простом случае строение неокрашенной клетки наблюдают, используя свет, рассеиваемый различными компонентами клетки. В **темнопольном микроскопе** свет осветителя направлен сбоку и поэтому только рассеянный свет достигает линз. В этом случае клетка видна как освещенный

Рис. 4-5. Окрашенные участки клетки (А) уменьшают амплитуду проходящих световых волн определенной длины. В результате можно получить окрашенное изображение, видимое при прямом наблюдении. Амплитуда световых волн, проходящих через неокрашенную живую клетку (Б), практически не меняется: поэтому многие детали нельзя увидеть при прямом наблюдении. Однако происходит изменение фазы проходящего света — явление, используемое в фазово-контрастном и интерференционном микроскопах для получения высококонтрастного изображения.

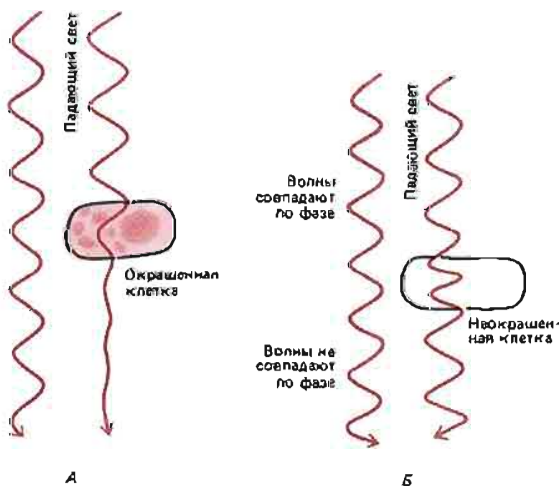
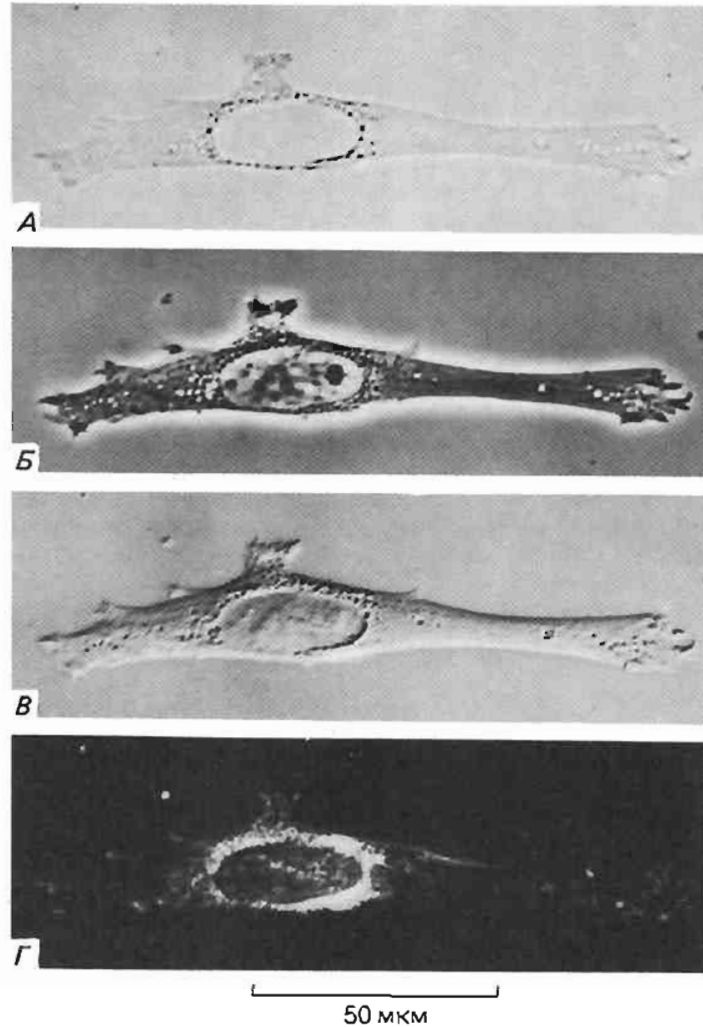


Рис. 4-6. Фибробласт в культуре ткани при наблюдении с помощью четырех различных типов световой микроскопии. **А.** Изображение получено при прямом прохождении лучей через клетку (метод, называемый *микроскопией в светлом поле*). Остальные изображения получены с помощью методов, рассматриваемых в тексте: **Б.** Фазово-контрастная микроскопия; **В.** Интерференционная микроскопия; **Г.** Микроскопия в темном поле. Простая замена компонентов оптики большинства современных микроскопов позволяет получать все четыре типа изображений.



объект на темном фоне. Подобная конструкция может быть использована для выявления флюоресценции объекта (применение метода флюоресцентной микроскопии будет описано ниже). На рис. 4-6 приведены изображения одной и той же клетки, которые были получены при помощи четырех различных систем световой микроскопии.

Одно из важных преимуществ микроскопов этих типов состоит в том, что они позволяют наблюдать клетку в активном состоянии и изучать ее движения, например, в процессах митоза или перемещения в окружающей среде. Многие клеточные движения происходят слишком медленно, и их неудобно изучать в реальном времени. В этих случаях используют покадровую (цейтратерную) киносъемку или видеозапись. Последовательные кадры снимают или записывают через определенные промежутки времени. Если кино- или видеофильмы проецируются или воспроизводятся с нормальной скоростью, реальные события значительно ускоряются. Так можно установить точную картину движения клеток и их органелл и скорость таких движений.

В табл. 4-1 указаны некоторые виды развития световой микроскопии.

Таблица 4-1. Некоторые важнейшие открытия из истории световой микроскопии

- 1611 – Кеплер (Kepler) предложил путь создания сложного светового микроскопа
- 1655 – Гук (Hook) использовал сложный микроскоп для описания небольших пор в срезах пробки, названных им «клетками»
- 1674 – Левенгук (Leeuwenhoek) сообщил об открытии одноклеточных. Спустя 9 лет он впервые увидел бактерии
- 1833 – Браун (Brown) опубликовал свои микроскопические наблюдения над орхидеями, в которых он четко описал ядро клетки
- 1835 – Шлейден и Шванн (Schleiden, Schwann) предложили клеточную теорию, согласно которой структурной и функциональной единицей строения растений и животных является клетка, которая содержит ядро
- 1857 – Колликер (Kolliker) описал митохондрии в мышечных клетках
- 1876 – Аббе (Abbé) проанализировал влияние дифракции на формирование изображения и показал возможность усовершенствования конструкции микроскопа
- 1879 – Флемминг (Flemming) с большой точностью описал поведение хромосом во время митоза животных клеток
- 1881 – Ретциус (Retzius) наиболее подробно описал многие ткани животных. В течение следующих 20 лет он, Кахал (Cajal) и другие гистологи разработали методы окрашивания тканей и заложили основы микроскопической анатомии
- 1882 – Кох (Koch) для окрашивания микроорганизмов использовал анилиновые красители и идентифицировал бактерии, вызывающие туберкулез и холеру. В течение последующих 20 лет другие бактериологи, в том числе Клебс и Пастер (Kiebs, Pasteur) выявили и описали возбудителей многих болезней, изучая окрашенные препараты под микроскопом
- 1886 – Цейсс (Zeiss) по конструкции Аббе (Abbé) получил серию линз – усовершенствование, благодаря которому микроскописты смогли различать структуры, размеры которых были соизмеримы с теоретическим пределом разрешения для видимого света
- 1898 – Гольджи (Golgi), окрашивая клетки азотнокислым серебром, впервые наблюдал и описал аппарат Гольджи
- 1924 – Лакассань (Lacassagne) и его сотрудники разработали первый метод радиоавтографии для выявления радиоактивного полония в биологических образцах
- 1930 – Лебедев разработал и создал первый интерференционный микроскоп. В 1932 г. Зернике (Zernicke) изобрел фазово-контрастный микроскоп. Эти два изобретения позволили впервые наблюдать подробное строение неокрашенных живых клеток
- 1941 – Кунс (Coons) для выявления клеточных антигенов использовал аятитела, связанные с флуоресцирующими красителями
- 1952 – Номарский (Nomarski) разработал и запатентовал систему дифференциального интерференционного контраста для светового микроскопа, которая до сих пор носит его имя

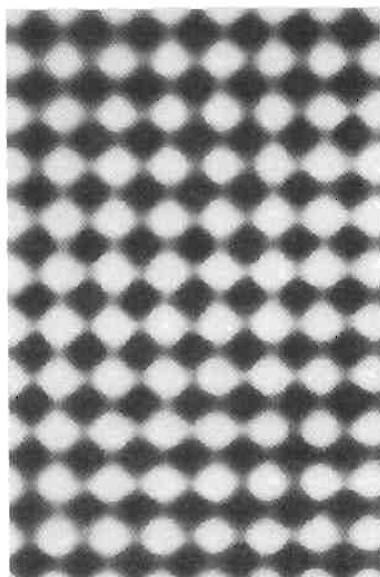


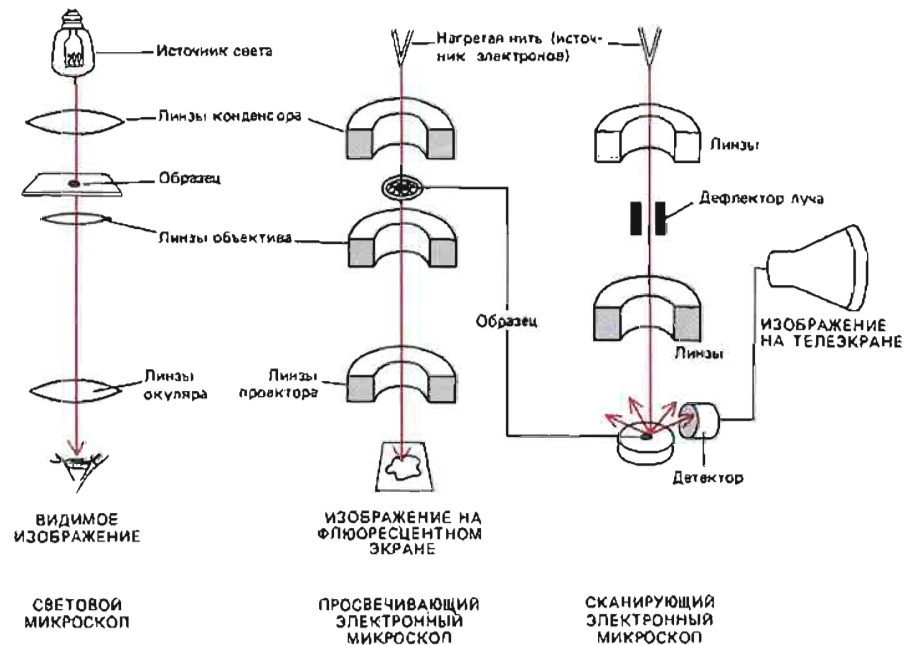
Рис. 4-7. Электронная микроскопия тонкого слоя золота позволяет выявить отдельные атомы в виде ярких пятен. Расстояние между соседними атомами золота около 0,2 нм. (С любезного разрешения Graham Hills.)

4.1.5. С помощью электронного микроскопа можно выявить тонкую структуру клетки [1, 4]

Длина волны электрона значительно меньше, чем длина волны видимого света, и если вместо света использовать электроны, то предел разрешения микроскопа, определяемого длиной волны используемого излучения, может быть снижен. Более того, с увеличением скорости электронов их длина волны уменьшается. В электронном микроскопе с ускоряющим напряжением 100 000 В длина волны электрона составляет около 0,004 нм. Теоретическое разрешение такого микроскопа составляет около 0,002 нм; однако вследствие того, что aberrации электронных линз выше, чем у стеклянных линз, разрешение большинства современных электронных микроскопов не превышает 0,1 нм (1 Å) (рис. 4-7). Более того, из-за проблем, связанных с приготовлением образца и его контрастированием, а также с радиационным повреждением образца, предел разрешения для биологических тканей составляет 2 нм (20 Å). И все же, несмотря на эти ограничения, разрешение электронного микроскопа в 100 раз выше, чем у светового микроскопа.

В общих чертах просвечивающий (трансмиссионный) электронный микроскоп (ПЭМ) напоминает световой микроскоп, но ПЭМ значительно больше и как

Рис. 4-8. Схематически показаны основные узлы светового микроскопа, просвечивающего электронного микроскопа и сканирующего электронного микроскопа, которые изображены таким образом, чтобы подчеркнуть сходные черты конструкции этих приборов. В электронных микроскопах обоих типов образец должен находиться под вакуумом.



бы перевернут (рис. 4-8). Источником освещения является нить катода, излучающего электроны. Катод находится на вершине цилиндрической колонны, высота которой составляет примерно 2 м. Для того чтобы сформировать линейный пучок электронов, из колонны микроскопа откачивают воздух и таким образом создают вакуум. На нити близлежащего анода электроны ускоряются и проникают через крошечное отверстие в нем в нижнюю часть колонны, формируя электронный луч. Вдоль колонны через равномерные промежутки расположены электромагниты, которые фокусируют электронный луч подобно тому, как стеклянные линзы фокусируют световой луч в световом микроскопе. Через воздушный шлюз образец помещают в вакуум, где он попадает под сфокусированный пучок электронов. Часть электронов, которые проходят через образец, рассеиваются (в зависимости от плотности вещества в данном месте), а остальные фокусируются и образуют изображение на фотопластинке или фосфоресцирующем экране. Это напоминает формирование изображения в световом микроскопе. Рассеянные электроны не формируют изображения, и поэтому плотные участки образца, в которых поток электронов ослабляется, выявляются в виде светлых зон.

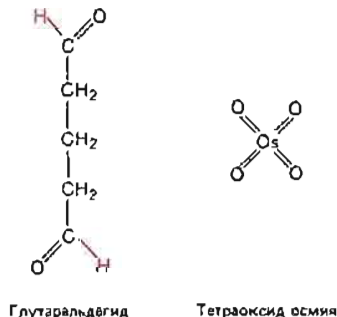


Рис. 4-9. Глутаральдегид и тетраоксид осмия — наиболее распространенные фиксаторы, используемые в электронной микроскопии. Две реакционноспособные альдегидные группы глутаральдегида позволяют сшивать различные типы молекул с помощью ковалентных связей, вытесняющих атомы водорода (выделены цветом). Тетраоксид осмия восстанавливается многими органическими соединениями, с которыми он образует поперечно-сшитые комплексы. Это свойство особенно ценно в случае клеточных мембран, поскольку тетраоксид осмия реагирует с двойными связями $C=C$, характерными для многих жирных кислот.

4.1.6. Для исследования биологических образцов с помощью электронного микроскопа необходима специальная обработка препаратов [4, 5]

В начальный период исследования биологических материалов с помощью электронной микроскопии в клетке было обнаружено множество структур, о существовании которых даже не подозревали. Для изучения биологических образцов электронным микроскопистам пришлось разработать новые методы заливки, резки и окрашивания тканей.

Приготовление образцов для электронной микроскопии требует решения многих проблем. Здесь ткани подвергаются воздействию вакуума с высокой степенью разрежения, и поэтому на каком-то из этапов приготовления образцов их необходимо высушить. При высушивании структура влажных тканей может нарушаться, и во избежание этого ткани фиксируют смесью глутаральдегида и тетраоксида осмия; глутаральдегид ковалентно связывает соседние белковые молекулы, а тетраоксид осмия связывает и стабилизирует липиды двойного слоя и тканевые белки (рис. 4-9).

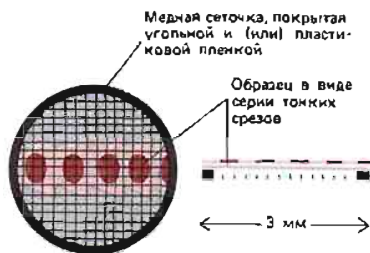
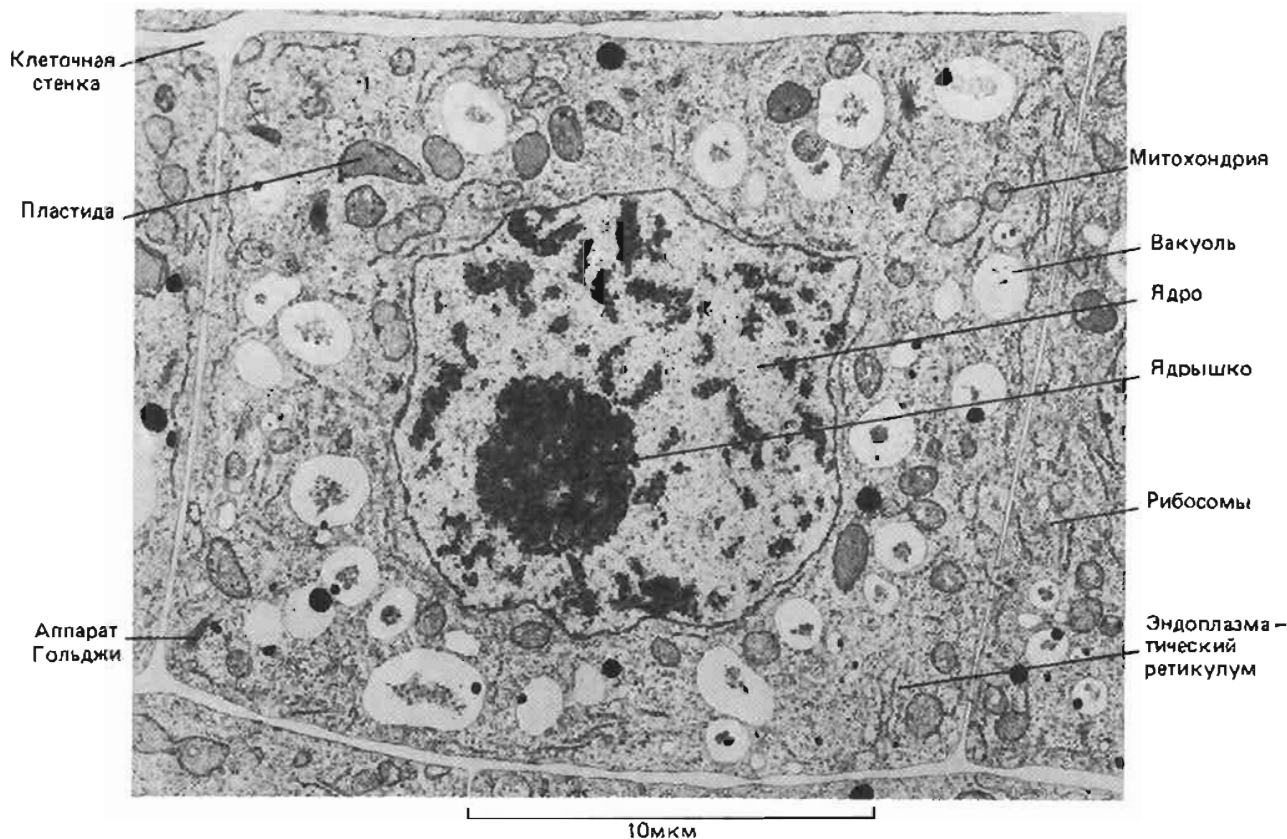


Рис. 4-10. Схематическое изображение медной сеточки, используемой для поддержания тонких срезов образца в просвечивающем электронном микроскопе.

Рис. 4-11. Тонкий срез верхушки корня злака. Легко различимы клеточная стенка, ядро, вакуоли, митохондрии, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и рибосомы. (С любезного разрешения Brian Gunning.)



Электроны обладают очень ограниченной проникающей способностью, и поэтому ткани следует нарезать на срезы толщиной 50–100 нм (около 1/200 диаметра клетки). Для того чтобы получить столь *тонкие срезы*, ткани сперва пропитывают смолой в форме мономера: смола полимеризуется и формирует твердый пластмассовый блок. Затем с помощью острого стеклянного или алмазного ножа срезы нарезают на специальном микротоме и помещают на маленькую круглую металлическую сеточку (рис. 4-10).

Контраст изображения в электронном микроскопе определяется порядковым номером атомов, из которых состоит образец: чем выше порядковый номер, тем большее число электронов рассеивается и тем сильнее контраст. Биологические молекулы состоят из атомов с низким порядковым номером. Это в основном углерод, кислород и водород. Чтобы молекулы стали видимыми, тонкие срезы биологических образцов окрашивают солями тяжелых металлов (урана, свинца). Различные элементы клетки контрастируются по-разному — соответственно степени импрегнации этими слоями. Например, липиды окрашиваются сильнее, благодаря чему удается выявить локализацию клеточных мембран (рис. 4-11).

В некоторых случаях в тонких срезах клеток можно специфически помечать исследуемые макромолекулы. Например, если инкубировать срезы с субстратом, можно локализовать некоторые ферменты. Реакция субстрата с ферментом приводит к локальному отложению электронноплотного осадка (рис. 4-12). Ферменты или молекулы, обладающие высокой электронной плотностью (железосодержащий ферритин), можно связать с антителами и в таком виде использовать их для выявления на срезах макромолекул, опознаваемых этими антителами.

Рис. 4-12. Электронная микрофотография клетки, демонстрирующая локализацию конкретного фермента (тиамин-пирофосфатазы) в аппарате Гольджи. Тонкий срез клетки инкубировали с субстратом, образующим под действием фермента электроноплотный осадок. (С любезного разрешения Daniel Friend.)

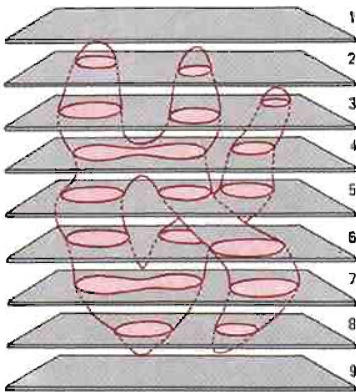
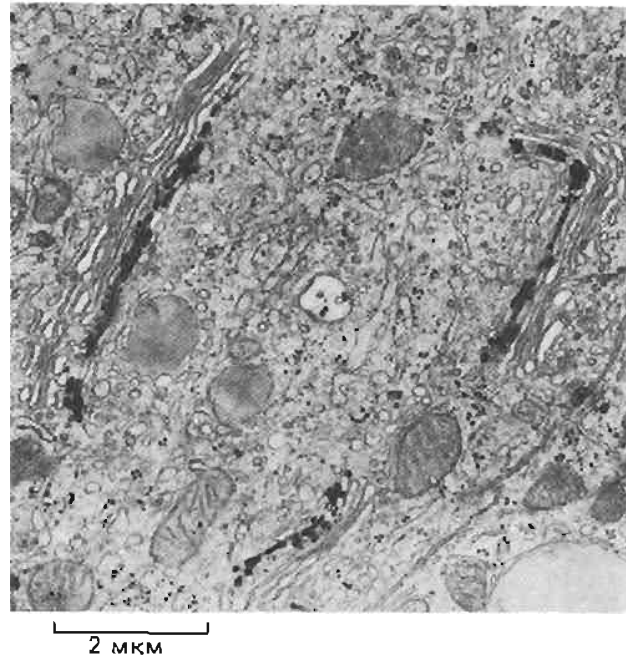


Рис. 4-13. Схематическое изображение, иллюстрирующее, как легко прийти к ошибочным выводам, изучая отдельные тонкие срезы. Так, например, в данном случае рассматриваются срезы через клетку, в которой расположена лишь одна разветвленная митохондрия. Между тем создается впечатление, что большинство срезов содержит две или три отдельные митохондрии. Более того, может показаться, что на срезах 4 и 7 выявляемая митохондрия находится в процессе деления. Серийные срезы позволяют реконструировать реальную форму, существующую в действительности.

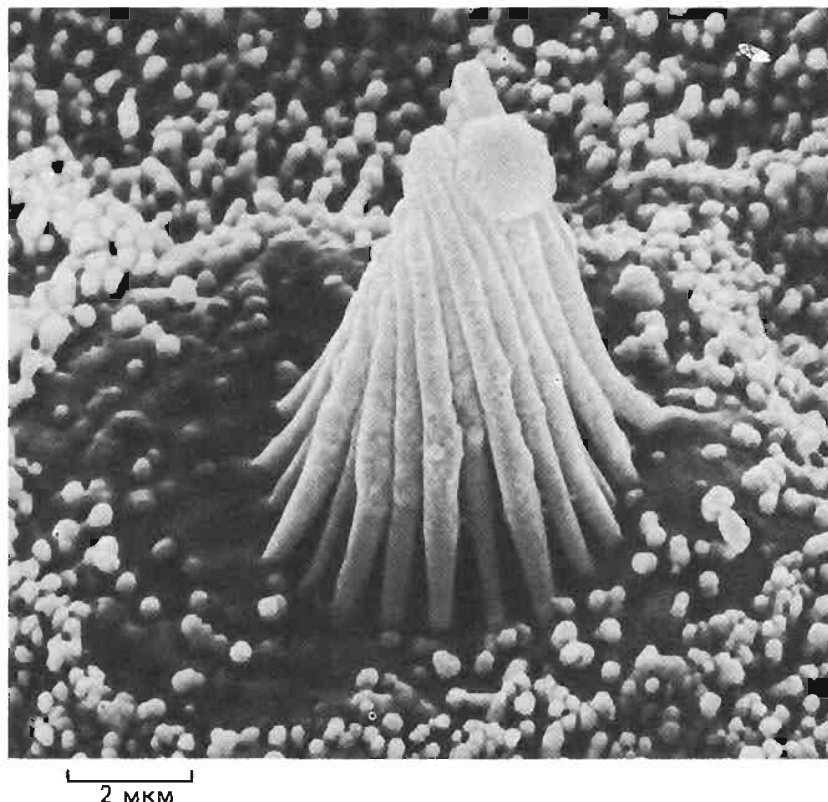
4.1.7. Электронная микроскопия может быть использована для получения трехмерного изображения [6]

Тонкие срезы – это практически двумерные ломтики ткани, и, работая с ними, нельзя воспроизвести трехмерную организацию клеточных компонентов. Трехмерное изображение может быть получено путем реконструкции сотен серийных срезов (рис. 4-13), но это слишком утомительный и длительный процесс.

Однако известны более прямые способы получения трехмерного изображения. Один из них состоит в исследовании образца с помощью **скавирующего электронного микроскопа (СЭМ)**. Здесь электронный луч не проходит через образец, как в ПЭМ, а отражается от поверхности образца. Исследуемый образец фиксируют и высушивают, после чего покрывают тонким слоем металла, испаряемого в вакууме, – процесс, называемый *оттенением*. Размеры СЭМ меньше, и его устройство проще, чем у просвечивающего электронного микроскопа. Здесь образец скавируют сфокусированным пучком электронов. Когда луч попадает на образец, металлическая поверхность испускает «вторичные» электроны; они регистрируются и преобразуются в изображение на телевизионном экране. 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 ощущение трехмерности (рис. 4-14). Максимальное разрешение у большинства модификаций СЭМ невелико (около 10 нм), а увеличение до $\times 20\,000$. Этим и объясняется тот факт, что СЭМ используется в основном для исследования объектов, размеры которых лежат в диапазоне между размерами интактных одиночных клеток и небольших организмов.

До известного предела трехмерное изображение может быть получено с использованием обычных тонких срезов, когда объект наклоняют по отношению к электронному пучку и фотографируют под двумя различными углами. Трехмерное изображение возникает при изучении пары микрофотографий через стереочки. Толщина образцов, которые можно изучать таким образом, зависит от проникающей способности электронов и, следовательно, от их энергии. Для таких исследований были созданы **высоковольтные электронные**

Рис. 4-14. Полученная с помощью сканирующего микроскопа микрофотография стереоцилий, расположенных в виде органичных труб на поверхности волосковых клеток внутреннего уха. (С любезного разрешения R. Jacob, A. J. Hudspeth.)



микроскопы, в которых электронный луч ускоряется напряжением не 100 000 В, а 1 000 000 В. На этих гигантских приборах можно изучать срезы толщиной 1 мкм.

4.1.8. Методы электронной микроскопии «замораживание–скалывание» и «замораживание–травление» позволяют увидеть клетку по-новому [7]

Процесс напыления тонкой пленки тяжелых металлов (платины) на высушенный образец называется **оттением**. Оттение используется не только при работе со сканирующим электронным микроскопом, но в некоторых случаях и для исследования образцов с помощью трансмиссионного электронного микроскопа. Если линейные размеры образца или толщина срезов достаточно малы, электронный луч способен проникнуть сквозь них. В этом случае образцы можно исследовать сразу после оттнения. Такой подход используют при работе с отдельными молекулами, вирусами или клеточными стенками (рис. 4-15). Но толщина других образцов чрезмерно велика, и поэтому после оттнения органическую материю, подстилающую слой металла, необходимо растворить. В результате остается тонкая металлическая *реплика* (или *отпечаток*) с поверхности образца. Перед тем как поместить реплику на сеточку и исследовать под электронным микроскопом, ее укрепляют пленкой углерода. Напыление металла на образец производится под углом, чем и объясняется образование слоя металла переменной толщины (рис. 4-16). Этим обусловлено появление эффекта тени, и образующееся изображение кажется трехмерным.

Реплики используются в двух методах, с помощью которых были получены принципиально новые результаты. Первый из этих методов был назван **замораживанием–скалыванием**. Он предоставил уникальную возможность на-

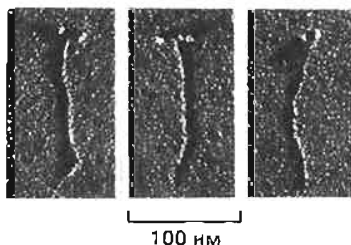


Рис. 4-15. Электронные микрофотографии отдельных молекул белка миозина, оттненные платиной. Миозин – основной компонент сократительного аппарата мышц. (С любезного разрешения Arthur Elliot.)

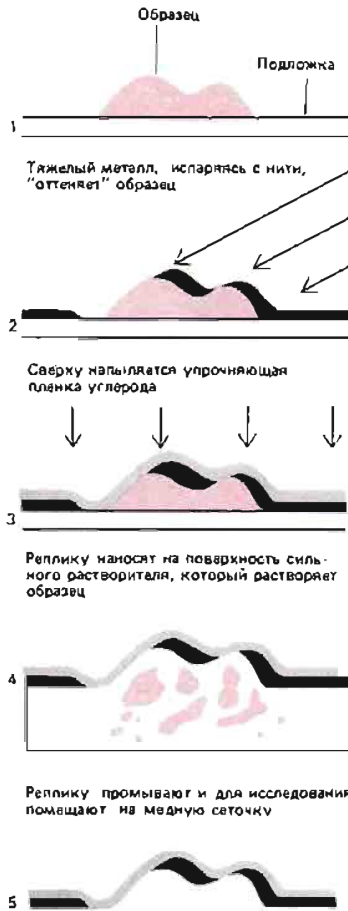


Рис. 4-16. Схематически показано приготовление реплики с поверхности образца, «оттененного» металлом. Обратите внимание, что толщина металла отражает контуры поверхности исходного образца.

блюдать внутреннее строение мембран клетки. При замораживании клеток в них образуются кристаллики льда, которые вносят существенные искажения в структуру клетки. Во избежание этого клетки замораживают при температуре жидкого азота (-196°C) в присутствии антифриза (криопротектора). Замороженный блок раскалывают лезвием ножа. Плоскость скола во многих случаях проходит через гидрофобную середину двойного слоя липидов. При этом выявляется внутренняя поверхность мембран клетки (рис. 4-17). Образовавшуюся поверхность скола оттеняют платиной, удаляют органическую материю и изучают полученные реплики с помощью электронного микроскопа. Оказалось, что такие реплики усеяны небольшими частицами (внутримембранными частицами), которые, как полагают, состоят в основном из крупных белков, проникающих через двойной слой липидов (рис. 4-18). С помощью этого метода впервые удалось показать, что многие межклеточные контакты (места контактов клеток друг с другом) состоят из уложенных в определенном порядке мембранных белков.

В электронной микроскопии известен еще один родственный метод, названный замораживанием – травлением. С помощью этого метода исследуют

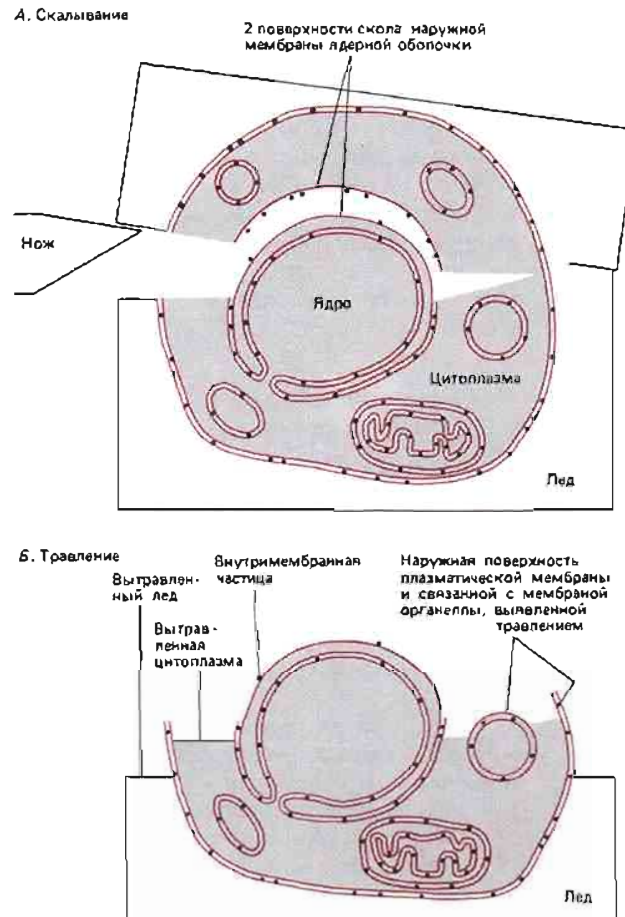


Рис. 4-17. При использовании метода электронной микроскопии «замораживания – скалывания» (А) замороженный образец скалывают ножом. Плоскость скола имеет тенденцию проходить через середину двойного слоя липидов, как это показано на рисунке. При «замораживании – травлении» (Б) образец сперва раскалывают, как показано на А, а затем, сублимируя воду под вакуумом, уменьшают слой льда и обнажают таким образом поверхность клетки. После этого готовят реплику замороженной поверхности (как описано на рис. 4-16) и изучают ее с помощью просвечивающего электронного микроскопа.

Рис. 4-18. Электронная микрофотография, полученная при помощи метода «замораживания — скалывания», на которой изображена плазматическая мембрана эпителиальной клетки мочевого пузыря крысы. Плоскость скола прошла через середину двойного липидного слоя и обнажила упорядоченное множество внутримембранных частиц, которые, как полагают, являются крупными мембранными белками. Хотя внутримембранные частицы обнаружены во всех плазматических мембранах, они сравнительно редко упакованы столь плотно, как в этих клетках. (С любезного разрешения N. J. Severs.)

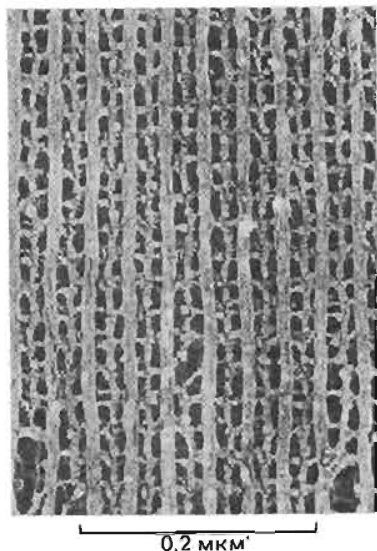
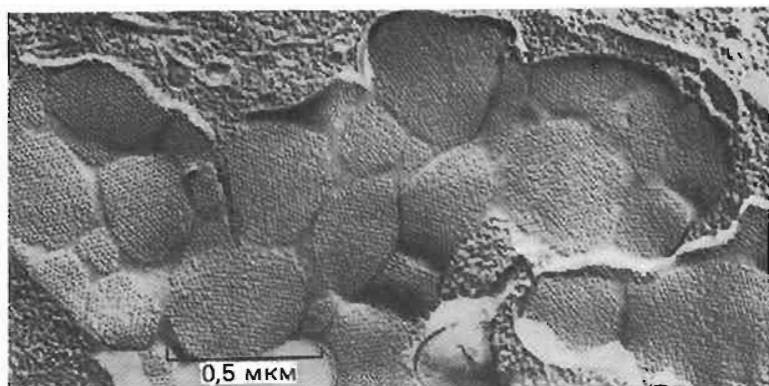


Рис. 4-19. Регулярно уложенные белковые филаменты в мышце насекомых. Для получения этого изображения мышечные клетки были заморожены в жидком гелии, расколоты через цитоплазму и подвержены глубокому высушиванию. Затем была приготовлена металлическая реплика, которую изучали при большом увеличении. (С любезного разрешения Roger Cooke, John Heuser.)

наружную поверхность клеток и мембран (но не внутреннюю поверхность мембран). При работе этим методом клетки замораживают при температуре жидкого азота и замороженный блок раскалывают лезвием ножа. Но в данном случае количество льда вокруг клетки (и в меньшей степени внутри клетки) понижают возгонкой воды в вакууме при повышении температуры. Этот процесс называют **замораживанием — высушиванием** (рис. 4-17). Участки клетки, выявленные в процессе **травления**, затем превращаются в платиновые реплики, так же как и при обычном замораживании — скалывании.

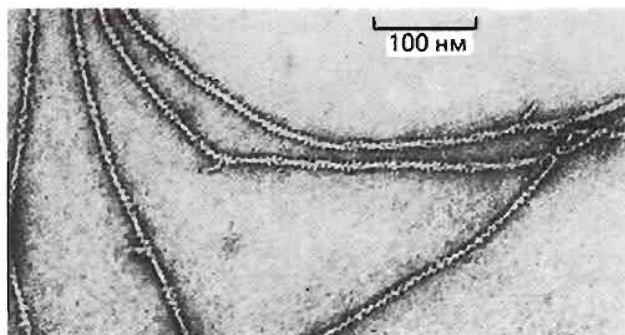
При использовании метода замораживание — травление криопротекторы не используют, поскольку они нелетучи и после сублимации воды остаются в образце. Вследствие этого имеет место образование кристалликов льда, что в прошлом значительно ограничивало разрешающую способность этого метода. В последних модификациях метода образование кристаллов льда предупреждают путем очень быстрого замораживания образца (при скорости замораживания, большей чем 20°C в 1 мс). Осуществляют такое **быстрое замораживание** путем мгновенного контакта препарата с медным блоком, который охлажден жидким гелием до -269°C . Если замороженные клетки подвергнуть сильному замораживанию — высушиванию, можно достичь впечатляющих эффектов. Такое **глубокое травление** позволяет выявить тончайшие внутриклеточные структуры. Например, различные белковые нити мышечной клетки можно довести до такого «обнаженного состояния», что их конфигурация будет видна очень четко (рис. 4-19).

4.1.9. С помощью электронной микроскопии можно увидеть отдельные макромолекулы

Современная электронная микроскопия позволяет в идеальных условиях изучать структуры с разрешением 0,1–0,2 нм (1–2 Å) (рис. 4-7). Но при работе с биологическими образцами такое разрешение практически недостижимо. И все же при изучении изолированных макромолекул — ДНК или крупных белков — к этому пределу удалось приблизиться. Сейчас этот метод получил достаточно широкое распространение. Здесь на сеточку, покрытую углеродом, помещают изолированные макромолекулы и для получения нужного контраста оттеняют тяжелыми металлами (платиной, палладием, золотом) (рис. 4-15).

Отдельные макромолекулы можно наблюдать еще более детально с помощью **негативного контрастирования**. В этом случае макромолекулы также помещают на сеточку, покрытую углеродом, сушат и затем смачивают концентрированным раствором солей тяжелых металлов, например уранилацетатом. После высушивания образец сеточка везде, кроме тех мест, где находятся макромолекулы, оказывается покрытой тонкой пленкой соли тяжелого металла. Поскольку рассеивание электронов на макромолекулах меньше, чем на остальной поверхности, покрытой красителем, в составе которого имеется

Рис. 4-20. Электронная микрофотография негативно окрашенных актиновых нитей. Диаметр каждой из этих нитей составляет примерно 6 нм. При тщательном исследовании видно, что актиновые нити состоят из двух спирально закрученных цепей глобулярных молекул актина. (С любезного разрешения Roger Craig.)



тяжелый металл, формируется обращенное, или негативное, изображение. Негативное контрастирование наиболее часто используется для изучения агрегатов макромолекул, например вирусов или рибосом, а также нитей или двумерных пленок, состоящих из повторяющихся субъединиц (рис. 4-20).

4.1.10. Детальная структура молекул, образующих кристаллическую решетку, может быть рассчитана на основе полученных дифракционных картин

Применение самых совершенных методов окрашивания не позволяет получить достаточно отчетливое изображение отдельной молекулы. Попытки получить больше полезной информации путем удлинения времени наблюдения и усиления интенсивности освещающего луча бесплодны, поскольку приводят к повреждению и преждевременному разрушению объекта. Детали молекулярной структуры объекта можно выявить только путем обобщения информации о строении многих идентичных молекул и усреднения таким образом случайных ошибок в изображении. Такой подход применим к веществам, которые формируют регулярную кристаллическую структуру, где громадное количество молекул разделены одинаковыми промежутками и ориентированы идентичным образом. В этом случае общепринятый метод извлечения необходимой информации основан на дифракции.

Сперва рассмотрим одиночный объект (например, отдельную молекулу), расположенный на пути любого излучения, длина волны которого меньше размеров объекта. Объект будет рассеивать часть излучения. Рассеянное излучение можно рассматривать как набор перекрывающихся волн, каждая из которых отражается разными участками объекта. Если волны перекрываются, они подвергаются интерференции, и излучение распределяется случайным образом. Такое распределение излучения называют **дифракционной картиной**. Дифракционная картина может быть зарегистрирована на экране, помещенном на некотором расстоянии от предмета, или представлена с помощью ко-

Рис. 4-21. Рассеивание излучения одиночным объектом, размеры которого соизмеримы с длиной волны излучения. Излучение, падающее на объект, рассеивается в различных направлениях и с разной интенсивностью. Интенсивность излучения, рассеиваемого в данном направлении, зависит от интерференции излучения, рассеиваемого разными участками поверхности объекта. Результирующая интенсивности рассеивания во всех возможных направлениях обозначена на диаграмме различной плотностью окрашенных лучей, отраженных объектом.

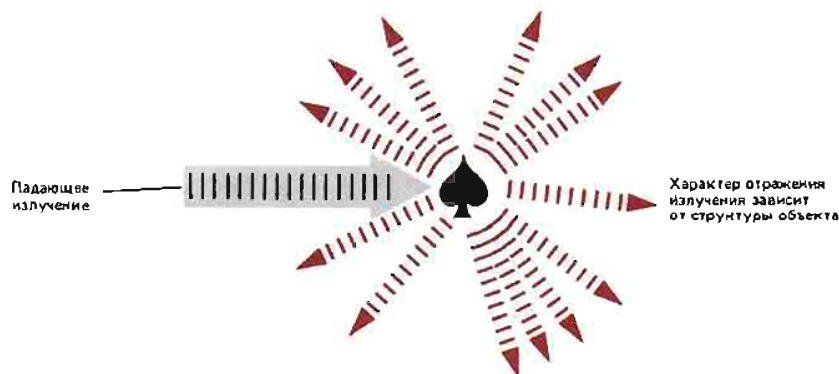
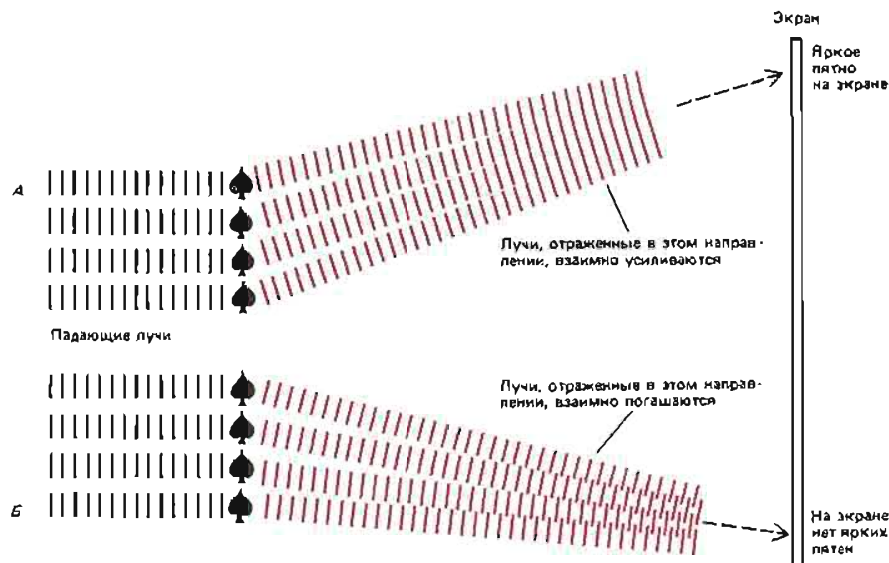


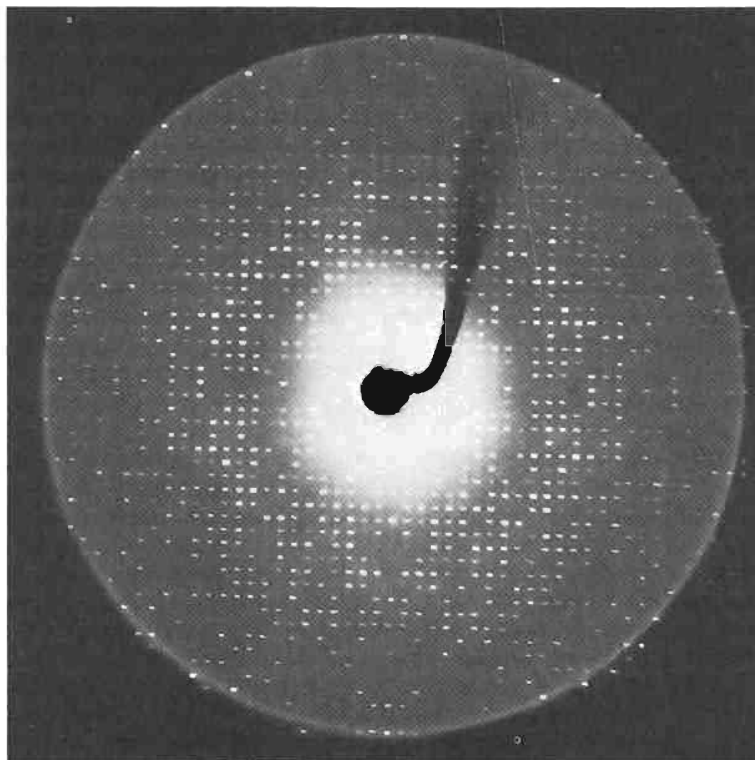
Рис. 4-22. Рассеивание излучения кристаллом. Если многие идентичные объекты расположены в виде кристаллической решетки, излучение, рассеиваемое каждым объектом, интерферирует с излучением, рассеиваемым другими объектами. Отдельные отраженные лучи усиливаются только в определенных направлениях (в зависимости от пространственного расположения объектов в решетке), образуя яркие пятна. Интенсивность данного яркого пятна зависит от интенсивности, с которой каждый объект в решетке мог бы рассеивать излучение в данном направлении, если бы его исследовали в отдельности, как это показало на рис. 4-21.



личества рассеянного излучения, отраженного объектом в разных направлениях (рис. 4-21). Форму дифракционной картины определяет структура объекта. С другой стороны, исходя из полного описания дифракционной картины, можно теоретически вычислить структуру данного объекта. Опыт показывает, что дифракционная картина для отдельной молекулы чересчур слаба и недостоверна, и поэтому ее нельзя использовать в качестве отправной точки для теоретического анализа.

Предположим, что множество одинаковых молекул формирует кристаллическую решетку, которую мы осветили неким излучением (рис. 4-22). Излучение, рассеиваемое одной молекулой, будет интерферировать с излучением, рассеянным другими молекулами. В некоторых направлениях индиви-

Рис. 4-23. Часть рентгенограммы кристалла белка. Именно этот кристалл был использован для определения расположения атомов в молекуле протеолитического фермента трипсина (С любезного разрешения Robert Stroud.)



дуальные рассеянные лучи будут усиливаться, образуя на дифракционной картине яркое пятно. Полная дифракционная картина кристаллической решетки будет состоять из многих отдельных ярких пятен различной интенсивности (рис. 4-23).

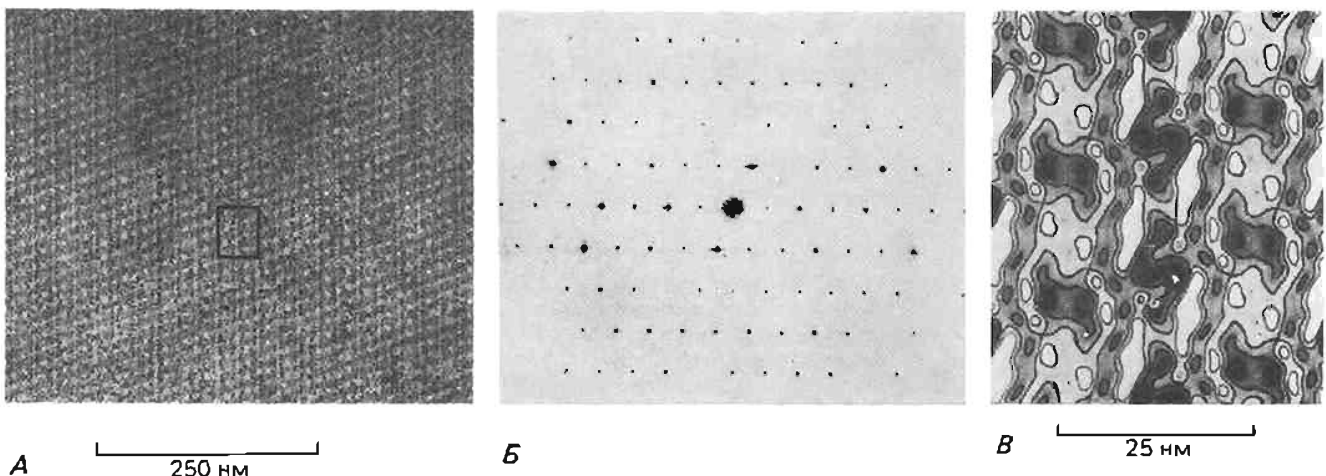
Относительная интенсивность различных пятен в дифракционной картине зависит от способности отдельных молекул в решетке рассеивать излучение. В действительности интенсивность данного пятна пропорциональна средней интенсивности излучения, которое будет отражаться в том же направлении от характерного одиночного объекта (молекулы). Таким образом, тогда как *положения* пятен в дифракционной картине зависят от расположения объектов в системе, *интенсивность* пятен дает информацию о внутренней структуре типичного объекта. Такая информация получена путем объединения вклада множества равноценных источников. Поэтому в отличие от информации, полученной от одного объекта, она является точной и достаточной для проведения дальнейших расчетов. И как мы увидим далее, пользуясь довольно полным описанием дифракционной картины такой решетки, можно зачастую вычислить структуру отдельных объектов, образующих кристаллическую решетку.

Рис. 4-24. Использование метода дифракции для получения детального двумерного изображения молекул по их микрофотографиям. А. Исходная микрофотография высокоупорядоченной структуры, образованной молекулами гликопротеинов клеточной стенки мелких водорослей (темные участки — краситель, светлые — молекулы гликопротеинов). Б. Вычисленная дифракционная картина этого изображения. В. Реконструированное изображение небольшого участка той же структуры, воссозданное по дифракционной картине. На реконструированном изображении отчетливо видны детали формы молекул (темные участки — молекулы гликопротеинов), которые довольно трудно различить на исходной фотографии. (Фотографии приводятся с любезного разрешения Graham Hills, Peter Shaw.)

4.1.11. Методы построения изображения, основанные на дифракции рентгеновских лучей, используют для извлечения из электронных микрофотографий дополнительной информации [8]

В принципе построить изображение по дифракционной картине можно, используя любое излучение, длина волны которого соизмерима с исследуемым объектом. На рис. 4-24 показано, как этот метод используется для извлечения подробной информации о структуре объекта из, казалось бы, нечеткой электронной микрофотографии молекул, формирующих кристалл. Для этого микрофотографию (но не саму кристаллическую решетку) освещают лазерным лучом и затем строят изображение типичной индивидуальной молекулы из решетки по образующейся *оптической дифракционной картине*. В настоящее время более широкое применение нашел другой подход: для *вычисления* возможной дифракционной картины используют ЭВМ, а освещение лазером опускают. И по дифракционной картине, рассчитанной ЭВМ, затем строится изображение.

Такие методы построения изображения позволяют усреднить информацию о всех молекулах кристаллической решетки и таким путем выявить детали, которые неразличимы на исходной микрофотографии, где они могут быть смазаны случайными «шумами», присутствующими в изображении индивидуальных молекул. Этот метод особенно хорош для изучения таких молекул,



как мембранные белки, формирующие двумерную кристаллическую решетку. В лучшем случае метод построения изображения по электронным микрофотографиям позволяет представить внешний вид отдельной белковой молекулы с разрешением 0,7 нм (7 Å). Однако атомы разделены в молекуле промежутками 0,1–0,2 нм, и поэтому такое разрешение все еще недостаточно для полного описания структуры молекулы.

В табл. 4-2 приведены некоторые вехи в развитии электронной микроскопии.

Таблица 4-2. Основные вехи в изобретении электронного микроскопа и его применение в биологии клетки

1897–	Дж. Дж. Томсон (J.J. Thomson) сообщал о существовании отрицательно заряженных частиц, названных позже <i>электронами</i>
1924–	Де Бройль (de Broglie) предположил, что движущийся электрон обладает волновыми свойствами
1926–	Буш (Busch) доказал, что с помощью цилиндрических магнитных линз можно сфокусировать электронный луч. Так были заложены основы электронной оптики
1931–	Руска (Ruska) и соавторы создали первый просвечивающий электронный микроскоп
1935–	Кноль (Knoll) показал возможность создания сканирующего электронного микроскопа; спустя три года фон Арден (Von Arden) сконструировал его прототип
1939–	Сименс (Siemens) создал первый просвечивающий электронный микроскоп, который был пущен в продажу
1944–	Уильямс и Виков (Williams, Wyckoff) разработали метод оттенения металлом
1945–	Портер, Клод и Фуллам (Porter, Claude, Fullam) использовали электронный микроскоп для изучения клеток в культурах тканей после их фиксации и окраски
1948–	Пис и Бейкер (Pease, Baker) представили убедительные доказательства, что ими были получены тонкие срезы биологического материала (толщиной 0,1–0,2 мкм)
1952–	Паладе, Портер и Шёстранд (Palade, Porter, Sjöstrand) разработали методы фиксации и приготовления тонких срезов. Это позволило впервые увидеть многие внутриклеточные структуры. Х. Е. Хаксли (H. E. Huxley) был одним из первых, кто применил эти методы, и ему удалось показать, что скелетная мышца содержит перекрывающиеся сети белковых филаментов. Так были получены доказательства в пользу гипотезы «скользящих нитей», объясняющей сокращение мышц
1953–	Портер и Блюм (Porter, Blum) разработали ультрамикротом, который первым нашел широкое применение. В нем были использованы многие принципы, предложенные ранее Клодом и Шёстрандом (Claude, Sjöstrand).
1956–	Глауэрт (Glauert) и сотрудники показали, что смола <i>аралдит</i> является высокоэффективным агентом для заключения препаратов в электронной микроскопии. Пятью годами позже Люфт (Luf) предложил другую смолу для заключения препаратов – <i>эпон</i>
1957–	Робертсон (Robertson) первым наблюдал в электронный микроскоп и описал трехслойное строение клеточной мембраны
	– Метод «замораживание–скалывание», разработанный Стиром (Steere), был усовершенствован Муром и Мюлеталером (Moore, Mühlethaler). Позже (в 1966 г.) Брентон (Brenton) показал, что метод замораживания–скалывания позволяет изучать внутреннее строение мембран
1959–	Бреннер и Хорн (Brenner, Horne) усовершенствовали метод негативного контрастирования, который был разработан Холлом (Hall) четырьмя годами ранее, после чего этот метод стал общепринятым
1963–	Сабатини, Бенш и Барнетт (Sabatini, Bensch, Barnett) начали использовать глутаральдегид (с последующей обработкой OsO ₄) в качестве фиксатора для электронной микроскопии
1965–	Фирма «Кембридж инструменты» (Cambridge Instruments) впервые выпустила для продажи сканирующий электронный микроскоп
1968–	Де Розьер и Клуг (de Rosier, Klug) описали метод построения трехмерных структур по электронным микрофотографиям
1979–	Хейзер, Риз (Heuser, Reese) и сотрудники разработали метод глубокого травления, основанный на очень быстром замораживании и обладающий высокой степенью разрешения

4.1.12. Дифракция рентгеновских лучей дает возможность выявить трехмерное расположение атомов в молекуле [9]

Наиболее широкое применение дифракции для анализа структуры молекул связано с использованием рентгеновских лучей. Дифракция рентгеновских лучей, или рентгеноструктурный анализ, обеспечивает по сравнению с самыми сложными методами электронной микроскопии значительно лучшее разрешение. Если при рентгеноструктурном анализе кристалла использовать рентгеновские лучи с длиной волны 0,1 нм, то можно проследить за расположением индивидуальных атомов в молекулах, образующих кристалл. Рентгеновские лучи в отличие от видимого света или электронного пучка нельзя фокусировать после того, как они прошли через образец. Поэтому, используя рентгеновские лучи, нельзя получить обычное изображение. Но дифракционную картину можно зарегистрировать на фотопленке, а более высокая проникающая способность рентгеновских лучей дает возможность использовать значительно более толстые образцы. Рентгеноструктурный анализ позволяет исследовать образцы, содержащие воду, и тем самым избежать искажений структуры образца, возникающих при его высушивании, необходимом для проведения электронно-микроскопического исследования.

Таблица 4-3. Основные вехи развития метода рентгеноструктурного анализа и его применение в исследовании биологических молекул

1864	Хоппе-Зейлер (Hoppe-Seyler) получил кристаллы белка гемоглобина и предложил для него название
1895	Рентген (Röntgen) наблюдал образование новой формы проникающей радиации при попадании катодных лучей (электронов) на металлическую мишень. Эту форму радиации Рентген назвал X-лучи (в русской научной литературе «рентгеновские лучи»)
1912	фон Лауэ (Von Laue) получил первую рентгенограмму с изображением дифракции рентгеновских лучей при пропускании рентгеновских лучей через кристалл сульфида цинка
	– В. Л. Брэгг и В. Х. Брэгг (W. L. Bragg, W. H. Bragg) обнаружили простую взаимосвязь между характером дифракционной картины и расположением атомов в кристалле
1926	Самнер (Sumner) получил кристаллы уреазы из экстракта канавалии мечевидной и показал, что эти белки обладают каталитической активностью
1931	Полинг (Pauling) опубликовал свою работу «Природа химической связи», в которой уточнил правила ковалентного связывания
1934	Бернал и Кроуфут (Bernal, Crowfoot) представили первую подробную рентгенограмму белка, полученную для кристаллов фермента пепсина
1935	Паттерсон (Patterson) разработал аналитический метод определения расстояния между атомами по данным рентгеноструктурного анализа
1941	Эстбюри (Astbury) получил первую рентгенограмму ДНК
1951	Полинг и Коря (Pauling, Corey) обосновали существование двух основных типов структуры цепи L-аминокислот в спиральной конформации (α -спираль) и структуру β -складчатого слоя, которые были позже обнаружены во многих белках
1953	Уотсон и Крик (Watson, Crick) предложили модель двойной спирали ДНК, построенную на основе рентгенограмм, полученных Франклином и Уилкинсом (Franklin, Wilkins)
1954	Перуц (Perutz) и сотрудники разработали метод тяжелых атомов для решения проблемы фазы в кристаллографии белка
1960	Кендрю (Kendrew) впервые описал подробную структуру белка (миоглобина кашалота) с разрешением 0,2 нм, а Перуц (Perutz) – структуру более крупного белка – гемоглобина, но в этом случае разрешение было несколько хуже
1966	Филлипс (Phillips) впервые подробно описал структуру белка – лизоцима
1976	Ким, Рич и Клуг (Kim, Rich, Klug) и сотрудники, используя данные рентгеноструктурного анализа, подробно описали трехмерную структуру тРНК
1977–1978	Холмс и Клуг (Holmes, Klug) определяли структуру ВТМ, а Гаррисон и Россман (Harrison, Rossman) – структуру двух сферических вирусов

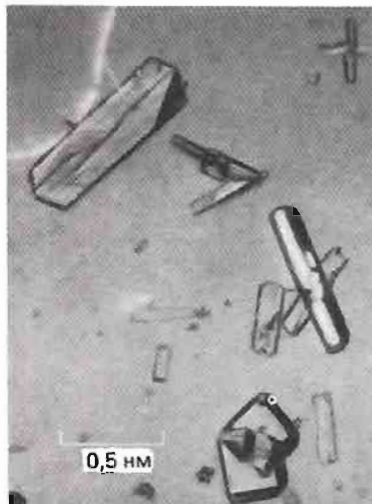


Рис. 4-25. Кристаллы фермента гликоген-фосфорилазы при наблюдении в световой микроскоп. (С любезного разрешения Robert Fletterick.)

Чтобы достигнуть высокого разрешения, необходимо иметь кристаллы с высокой степенью упорядоченности. По мере проникновения через образец рентгеновские лучи рассеиваются в основном электронами. Поэтому большие атомы с большим количеством электронов рассеивают рентгеновские лучи сильнее, чем небольшие атомы; атомы С, N, O, P регистрируются более надежно, чем атомы H. По этой же причине атомы любых металлов, например атом железа в молекуле гемоглобина, образуют интенсивный рефлекс рассеянных рентгеновских лучей. Процесс преобразования рентгенограммы в трехмерную структуру атомов, уложенных в молекулу, весьма сложен. Расшифровка рентгенограмм, образованных крупными и неупорядоченными молекулами белков, до 1960 г. была невозможна (табл. 4-3). И до сих пор такое исследование длится месяцами, в течение которых происходит автоматизированное накопление данных. Полученные данные в течение многих часов рассчитывают на больших ЭВМ. Обычно наиболее длительный этап такой работы — это получение больших кристаллов белков необходимого качества (рис. 4-25). Для получения полной информации о дифракции используют несколько наборов кристаллов. Некоторые из них модифицируют введением атомов тяжелых металлов в специфические точки. Выращивание кристаллов белка требует от экспериментатора настоящего искусства, поскольку для получения кристаллов для каждого типа молекул может потребоваться несколько лет.

Но несмотря на эти трудности, рентгеноструктурный анализ все же нашел широкое применение, поскольку до настоящего времени остается единственным методом определения детального расположения атомов в больших молекулах. Например, имея хорошие кристаллы, можно рассчитать структуру белка с разрешением 0,3–0,4 нм и выявить не только основные закономерности расположения полипептидной цепи, но и некоторые более мелкие детали. Затратив значительные усилия, можно получить кристаллы высокого качества, что в свою очередь позволяет достичь разрешения 0,15 нм и выявить расположение почти всех неводородных атомов в молекуле белка.

Заключение

Для изучения клеток можно использовать большой набор методов микроскопии. С помощью светового микроскопа можно наблюдать живые клетки, используя фазово-контрастную, интерференционную, темнопольную оптику. Фиксированные мертвые клетки можно окрашивать различными красителями или более специфическими реактивами, которые связываются определенными компонентами клетки. Просвечивающий электронный микроскоп дает возможность исследовать клетки с более высоким разрешением и наблюдать расположение органелл клетки, мембран и белковых филаментов. Для локализации в клетке или на клеточных поверхностях специфических макромолекул можно использовать реактивы, которые вводят электронно-плотную метку. Внутреннее строение клеточной мембраны выявляют, используя метод замораживания — скалывания, а контуры клеточной поверхности в трех измерениях можно изучать с помощью сканирующего микроскопа.

Просвечивающий электронный микроскоп также используют для исследования формы индивидуальных макромолекул, опущенных в тяжелый металл или негативным контрастированием. Однако точное расположение каждого атома в молекуле можно определить только после образования молекулами крупных кристаллов. В этом случае пучок рентгеновских лучей проходит через кристалл и на основании полученной рентгенограммы вычисляется трехмерное расположение атомов в молекулах, образующих кристалл.

4.2. Культура клеток [10]

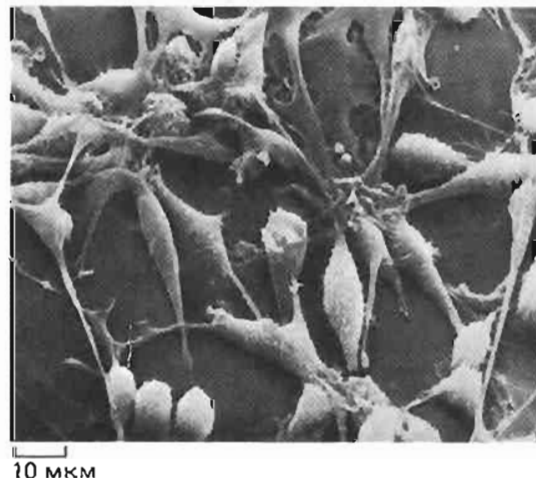
Большинство видов клеток растений и животных в благоприятных условиях способно выжить, размножаться и даже дифференцироваться в специальных чашках для культуры ткани. Следовательно, в этих условиях можно изучать влияние различных специфических молекул, в том числе гормонов или факторов роста, на поведение клеток. Используя методы культуры ткани, можно получить гомогенную популяцию клеток, на которой удобно изучать взаимодействия клеток различных типов или проводить биохимический анализ. В научной литературе часто можно встретить упоминание о том, что эксперименты с клетками в культуре выполняются *in vitro*, что дословно означает «в стекле». Этот же термин, но в ином смысле используют биохимики, характеризуя биохимические реакции, проводимые вне живых клеток. Возможность изучения сложного поведения клеток в строго определенных условиях, создаваемых в культуральной чашке, часто дает большое преимущество, однако все эти наблюдения необходимо проверять, сравнивая поведение клеток *in vitro* с их поведением в естественном окружении, т.е. *in vivo*.

4.2.1. Клетки можно выращивать в культуральной чашке [11]

Начало метода культуры тканей было заложено в 1907 г. экспериментом, который должен был внести ясность в дискуссию, происходившую среди нейробиологов. Гипотеза, правомочность которой следовало проверить, получившая название *нейронной доктрины*, сводилась к следующему: каждое нервное волокно образуется, вырастая из одной нервной клетки, а не путем слияния многих клеток. Для решения этого вопроса небольшие кусочки спинного мозга помещали в теплую влажную камеру и наблюдали под микроскопом через равные промежутки времени. Примерно через сутки можно было увидеть, что от отдельных нервных клеток начинают отходить длинные тонкие отростки. Так были получены данные, свидетельствовавшие в пользу нейронной доктрины, и был заложен фундамент для переворота, происшедшего в клеточной биологии в результате применения метода клеточных культур.

Основопологающие эксперименты, проведенные в 1907 г., включали использование культуры небольших фрагментов ткани, или *эксплантатов*. В наше время культуры обычно выращивают в клеточной суспензии, полученной путем диссоциации ткани. Основное преимущество таких *диссоциированных культур* (рис. 4-26) состоит в том, что, используя эти культуры, экспериментатор может выделить из смеси различных клеток, которые всегда присутствуют в ткани, отдельные типы клеток и исследовать их по отдельности.

Рис. 4-26. Микрофотография фибробластов крысы, растущих в культуре ткани, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. (С любезного разрешения Gunter Albrecht-Buehler.)



Большинство клеток, образующих ткани многоклеточных организмов, в отличие от бактериальных клеток не способны расти в суспензии. Для роста и деления им необходима твердая поверхность. Вначале, когда метод культивирования только появился, в качестве механической опоры использовали сгусток плазмы, но в настоящее время его обычно заменяют поверхностью пластиковой культуральной чашки. Клетки очень различаются по своим потребностям; некоторые из них могут расти или дифференцироваться только в том случае, если культуральная чашка покрыта компонентами внеклеточного матрикса, например коллагеном.

Культуры, приготовленные непосредственно из тканей организма, называют **первичными культурами**. В большинстве случаев клетки первичной культуры можно перенести из культуральной чашки и использовать для получения большого количества **вторичных культур**, которые можно последовательно перевивать в течение недель или месяцев. Часто эти клетки сохраняют признаки дифференцировки тех тканей, из которых они были получены. Так, фибробласты продолжают секретировать коллаген; клетки скелетных мышц эмбриона сливаются и образуют гигантские мышечные волокна, которые спонтанно сокращаются в чашке для культуры тканей; у нервных клеток образуются аксоны, обладающие электровозбудимостью и способностью образовывать синапсы с другими нервными клетками; клетки эпителия формируют большие слои, сохраняющие многие свойства интактного эпителия. Все эти явления происходят в культуре и поэтому доступны для изучения с помощью приемов, неприемлемых при работе с интактными тканями.

4.2.2. С помощью сред определенного химического состава можно идентифицировать специфические факторы роста [12]

До начала 70-х годов культура ткани представляла собой нечто вроде смеси науки и колдовства. Хотя на смену сгусткам плазмы пришли пластмассовые чашки и жидкие среды с точно составленной смесью солей, аминокислот и витаминов, все же в большинстве сред содержалось небольшое количество плохо охарактеризованного биологического материала, например лошадиной

Таблица 4-4. Состав типичной среды, пригодной для культивирования клеток млекопитающих¹⁾

Аминокислоты	Витамины	Соли	Другие соединения
Аргинин	Биотин	NaCl	Глюкоза
Валин	Никотинамид	KCl	Пенициллин
Гистидин	Пантотенат	NaH ₂ PO ₄	Стрептомицин
Глутамин	Пиридоксаль	NaHCO ₃	Феноловый красный
Изолейцин	Рибофлавин (B ₂)	CaCl ₂	Сыворотка цельная
Лейцин	Тиамин (B ₁)	MgCl ₂	
Лизин	Фолиевая кислота		
Метионин	Холин		
Тирозин			
Треонин			
Триптофан			
Фенилаланин			
Цистин			

¹⁾ Концентрация глюкозы составляет 5–10 мМ. Все аминокислоты находятся в L-форме; за исключением одного или двух случаев аминокислоты используются в концентрации 0,1 или 0,2 мМ. Концентрация витаминов в 100 раз ниже, т.е. составляет примерно 1 мкМ. Сыворотка, обычно лошадиная или теленка, добавляется до концентрации 10% от общего объема. Пенициллин и стрептомицин – антибиотики, добавляемые для подавления бактериального роста. Феноловый красный – индикатор pH; используется для поддержания pH 7,4.

Для культивирования обычно используются пластиковые или стеклянные контейнеры, поверхность которых обработана так, чтобы к ней могли прикрепляться клетки. Контейнеры помещают в инкубатор при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха.

Таблица 4-5. Некоторые наиболее известные клеточные линии

Клеточная линия ¹⁾	Тип клеток и соответствующий организм
3T3	Фибробласт (мышь)
BHK 21	Фибробласт (сирийский хомячок)
HeLa	Эпителиальная клетка (человек)
PTK 1	Эпителиальная клетка (кенгуровая крыса)
L 6	Миобласт (крыса)
PC 12	Хромаффинная клетка (крыса)
SP 2	Плазматическая клетка (мышь)

¹⁾ Многие из этих клеточных линий происходят из опухолей. Все они способны размножаться в культуре ткани неопределенно долго и проявляют по крайней мере некоторые свойства, характерные для дифференцированных клеток, из которых происходят. Клетки линий BHK 21, HeLa, SP 2 могут расти в суспензии; другим клеткам для размножения необходима твердая опора.

сыворотки, неочищенного экстракта из куриных эмбрионов или эмбриональной сыворотки телят. Для большинства обычных тканевых культур такие среды используются до сих пор (табл. 4-4), но они не пригодны для изучения особых потребностей, возникающих при росте и дифференцировке определенных клеток.

Все это привело к тому, что были разработаны различные среды определенного химического состава, используемые для культивирования клеток различных типов. Такие среды обычно содержат один или несколько различных белковых факторов роста, необходимых многим клеткам для выживания и пролиферации в культуре. Некоторым нервным клеткам как в культуре, так и в организме животного необходимы следовые количества фактора, стимулирующего рост нейронов. Были открыты и другие факторы подобного типа, имеющие жизненно важное значение для развития клеток определенных типов и поддержания их нормального существования. Появление сред определенного химического состава значительно облегчило поиск новых факторов.

4.2.3. Для получения гомогенной культуры клеток обычно используют клеточные линии эукариот

Большинство клеток млекопитающих в культуре погибает после определенного числа делений. Клетки кожи человека, например, прежде чем погибнуть, делятся около 50–100 раз. Существует предположение, что ограниченный срок жизни клеток в культуре отражает ограниченный срок жизни животного, из организма которого были получены эти клетки. Так, например, при культивировании клеток от больных, страдающих такими заболеваниями, которые вызывают преждевременное старение и смерть, срок жизни клеток в культуре оказывается укороченным. Иногда в культуре случайно появляются мутантные клетки, которые практически бессмертны. Такие клетки могут размножаться бесконечно и образуют клеточную линию (табл. 4-5). Эти клетки лучше растут на твердой поверхности, и после образования непрерывного слоя клеток их рост, как правило, прекращается.

Обычно мутантные клетки, способные к непрерывному делению, все же отличаются от раковых клеток, способных к непрерывному делению и *in vitro*, и *in vivo*. В отличие от других клеточных линий раковые клетки могут расти, не прикрепляясь к какой-либо поверхности, и пролиферируют, образуя в культуральных чашках популяции более плотные, чем популяции обычных клеток. Аналогичные свойства можно вызвать экспериментально и у нормальных клеток путем трансформации опухолеродным вирусом или каким-либо соединением. Полученные таким образом неопластически трансформированные клеточные линии способны вызывать образование опухолей после введения в организм животных. И трансформированные, и нетрансформированные клеточные линии служат источником большого количества клеток одного типа и поэтому представляют большую ценность для исследования клеток. Такие клеточные линии имеют еще и то преимущество, что при — 70°C их можно хранить неопределенно долго и при этом они сохраняют способность производить жизнеспособные клетки после размораживания.

Однородность клеточных линий можно усилить еще больше путем клонирования. Клон — это популяция клеток, происходящих из одной и той же клетки-предшественника. Клонирование клеток используется в основном для выделения мутантных клеточных линий, у которых мутация затронула специфические гены. Исследование таких клеток, дефектных по специфическому белку, позволяет узнать много нового о функции белка в нормальных клетках.

4.2.4. Осуществив слияние клеток, можно получить гибридные клетки [13]

Две клетки, сливаясь, образуют **гетерокарион** — одну комбинированную клетку с двумя отдельными ядрами. Обычно, чтобы осуществить слияние клеток, суспензию клеток обрабатывают определенными инактивированными вирусами или полиэтиленгликолем. Оба этих агента повреждают плазматическую мембрану клеток, что и приводит к слиянию клеток. Образование гетерокарионов дает возможность смешивать компоненты двух отдельных клеток — плазматические мембраны, цитоплазму и ядра, а это в свою очередь дает возможность изучать взаимодействие внутриклеточных компонентов разных клеток. Например, если неактивное ядро куриного эритроцита попадает в результате слияния в цитоплазму клетки, растущей в культуре ткани, то такое ядро реактивируется: начинается синтез РНК, а в конечном итоге и репликация ДНК. Именно в опытах по слиянию клеток человека и мыши были получены данные, непосредственно свидетельствующие о том, что белки поверхности клеток человека и мыши, находившиеся вначале на своих половинках плазматической мембраны гетерокариона, быстро диффундируют и перемешиваются по всей поверхности гетерокариона.

По истечении определенного времени гетерокарион делится митотически, образуя в результате **гибридную клетку**. Ядерные оболочки у этой клетки разрушаются, все хромосомы объединяются в одно большое ядро (рис. 4-27). Такие гибридные клетки можно клонировать и получить гибридную клеточную линию. Поскольку гибридные линии нестабильны и утрачивают хромосомы, их с успехом можно использовать для картирования генов в хромосомах человека. Обычная процедура картирования включает в себя слияние клеток мыши и человека. Образующиеся при этом клеточные гибриды — человек по неизвестным причинам теряют хромосомы человека. В результате образуется множество гибридных линий мышь—человек, каждая из которых содержит одну или несколько хромосом человека. Проанализировав много таких линий, можно установить, какие конкретно хромосомы человека ответственны за те или иные биохимические функции. Например, характерную для человека разновидность фермента *уридинмонофосфаткиназы* синтезируют гибридные клетки, содержащие хромосому I человека. Из этого следует, что ген, кодирующий этот фермент, локализован в хромосоме I.

В табл. 4-6 указаны основные открытия, обусловившие разработку методов культуры тканей.

Рис. 4-27. Схема, иллюстрирующая слияние клеток человека и мыши, приводящее к образованию гетерокарионов, имеющих по одному или более ядер. В некоторых случаях из гетерокарионов образуются гибридные клетки с одним слившимся ядром. Такие гибридные клетки используются для картирования индивидуальных генов в определенных хромосомах человека. Возможность такого картирования обусловлена тем, что гибридизация сопровождается быстрой потерей большинства хромосом человека, происходящей случайным образом. В образующихся клонах сохраняются только одна или несколько хромосом человека. В гибридных клетках, образованных в результате слияния клеток других типов, часто сохраняется большинство исходных хромосом.



Таблица 4-6. Основные вехи в разработке методов культуры тканей

- 1885– Ру (Roux) показал, что клетки куриного эмбриона сохраняют жизнеспособность в солевом растворе вне тела животного
- 1907– Гаррисон (Harrison) культивировал спинной мозг амфибий в сгустке плазмы. Он пытался показать, что аксоны образуются в виде выростов отдельных нервных клеток
- 1910– Раус (Raus) индуцировал опухоль, используя профильтрованный экстракт куриной опухоли, содержащий, как было установлено позже, РНК-вирус (вирус саркомы Рауса)
- 1913– Каррель (Carrel) доказал, что в асептических условиях клетки могут расти в культуре в течение длительного времени, если их обеспечить необходимыми питательными веществами
- 1948– Эрл (Earle) и сотрудники установили, что одиночные клетки клеточной линии L в культуре ткани формируют клоны клеток
- 1952– Джей (Geu) и сотрудники получили перевиваемую клеточную линию из карциномы шейки матки; эта клеточная линия широко известна как линия клеток HeLa
- 1954– Леви-Монтальчини (Levi-Montalcini) и сотрудники показали, что в культуре тканей фактор, стимулирующий рост нейронов, вызывает рост аксонов
- 1955– Игл (Eagle) впервые систематически исследовал пищевые потребности клеток в условиях культуры тканей и обнаружил, что клетки животных способны существовать в определенной смеси низкомолекулярных веществ, дополненной небольшим количеством белков сыворотки
- 1956– Пак (Puck) и сотрудники отобрали из культуры клеток HeLa мутантов, потребности которых для роста в культуре резко отличались от потребностей обычных клеток
- 1958– Темин и Рубин (Temin, Rubin) разработали количественный тест инфицирования клеток цыпленка в культуре очищенным вирусом саркомы Рауса. В течение следующего десятилетия Стокер, Дульбекко, Грин (Stoker, Dulbecco, Green) и другие вирусологи установили характеристики вирусной трансформации различных типов
- 1961– Хайфлик и Мурхэд (Hayflick, Moorhead) показали, что в культуре фибробласты человека погибают после определенного числа делений
- 1964– Литтлфилд (Littlefield) впервые использовал для выращивания гибридов соматических клеток селективную среду HAT. Это нововведение в сочетании с методом гибридизации клеток позволило приступить к изучению генотики соматических клеток
- Като и Такеуши (Kato, Takeuchi) получили целое растение моркови из растущей в культуре ткани одиночной клетки корня моркови
- 1965– Хэм (Ham) предложил бессывороточную среду определенного химического состава, которая способна поддерживать рост клонов некоторых клеток животных
- Харрис и Уоткинс (Harris, Watkins) индуцировали вирусом слияние клеток мыши и человека и получили первые гетерохаряоны клеток млекопитающих
- 1968– Августин-Точчо и Сато (Augusti-Tocco, Sato) адаптировали к условиям культуры клеток опухоль нервных клеток мыши (нейробластома) и выделили клоны, которые реагировали на раздражение электрическим током и разрастались в нервные волокна. Одновременно получено большое количество других дифференцированных клеточных линий, включая линии скелетных мышц и печени
- 1975– Кёлер и Мильштейн (Köhler, Milstein) получили первые клеточные линии гибридом, секретирующих моноклональные антитела
- 1976– Сато (Sato) и сотрудники опубликовали первую серию статей, в которых было показано, что для роста в бессывороточной среде различными клеточными линиями необходимы различные смеси гормонов и факторов роста

Заключение

Многие клетки растений и животных выживают и часто способны пролиферировать в культуральной чашке при наличии питательной среды соответствующего состава. Разные типы клеток нуждаются в различных питательных веществах, в том числе в одном или нескольких белковых факторах роста. Большинство клеток животных погибает после конечного числа делений, но иногда в культуре клеток спонтанно возникают редкие варианты клеток, способные поддерживаться бесконечно долго в виде клеточных линий.

Клеточные линии можно использовать для получения клонов, которые происходят из одиночной клетки-предшественника. Так, можно выделить мутантные клетки, дефектные по одному белку. Можно осуществить слияние двух различных типов клеток с образованием гетерокарионов (клеток с двумя ядрами), из которых в конечном счете образуются гибридные клетки (ядра клеток которых слились воедино). Гибридные клетки можно использовать при изучении взаимодействия между компонентами двух различных клеток. Кроме того, метод этот дает возможность установить, в каких конкретно хромосомах находятся те или иные гены.

4.3. Фракционирование клеток и клеточного содержимого [14]

Микроскоп дает возможность определять в клетках и тканях взаимное расположение органелл и агрегатов макромолекул. Используя методы специфического окрашивания, можно даже локализовать в клетке специфические молекулы. Но чтобы изучить организацию клетки на молекулярном уровне, необходимо провести биохимический анализ. Для этого надо прежде всего разрушить клетку, а затем последовательно отпрепарировать ее микроскопические структуры. При разрушении клеток биологи придерживаются определенного порядка, что позволяет извлечь максимум информации об исходном расположении исследуемых молекул. Обычно собственно биохимический анализ начинают только после разделения различных клеток и клеточных органелл на отдельные фракции.

4.3.1. Клетки можно выделить из ткани и разделить на отдельные типы [15]

Многие типы дифференцированных клеток нельзя получить в культуре в виде чистой клеточной линии. Кроме того, для проведения крупномасштабного биохимического анализа дешевле и быстрее использовать клетки, которые были выделены непосредственно из животного или растения. Уязвимость этого подхода заключается в том, что все ткани высших животных или растений состоят из смеси клеток разных типов, которые необходимо разделить и уже только после этого анализировать. Сначала разрушают внеклеточный матрикс и межклеточные контакты, удерживающие клетки вместе, и получают из ткани суспензию отдельных клеток. Обычно наибольший выход жизнеспособных диссоциированных клеток получают из эмбриональных тканей или из тканей новорожденных. Этап разделения клеток включает в себя обработку ткани протеолитическими ферментами (например, трипсином или коллагеназой) и соединениями, связывающими, или *хелатирующими*, ионы Ca^{2+} (например, ЭДТА – этилендиаминтетрауксусной кислотой). Затем, подвергнув ткани мягкому механическому разрушению, разделяют их на отдельные клетки. Для фракционирования смешанной суспензии клеток на отдельные типы клеток используют несколько подходов. В основе одного из этих подходов лежит тот факт, что клетки различаются по своим физическим свойствам. В этом случае, используя седиментацию или центрифугирование, можно отделять большие клетки от маленьких, а плотные (более тяжелые) клетки от легких. В свое время эти методы были разработаны для разделения органелл и макромолекул, и поэтому мы рассмотрим их ниже при обсуждении проблем, связанных с фракционированием клетки. В основе другого подхода лежит способность некоторых клеток прочно прикрепляться к стеклу или пластмассе, что дает возможность отделять такие прикрепившиеся клетки от клеток, прикрепляющихся менее прочно.

Наиболее тонкий метод разделения клеток включает в себя мечение специфических клеток антителами, связанными с флюоресцентными красителями. Меченые клетки разделяют с помощью электронного флюоресцентно-актив-

Рис. 4-28. Схема флуоресцентно-активируемого клеточного сортира. Лазерный луч анализирует флуоресценцию проходящих через него клеток. Капельки, содержащие отдельные клетки, в зависимости от наличия флуоресценции клеток заряжаются положительно или отрицательно. Затем капельки направляются в пробирки-накопители согласно заряду. Заметим, что концентрация клеток должна быть подобрана таким образом, чтобы большая часть капель не содержала клеток. Следовательно, большая часть капель наряду с любыми скоплениями клеток направляется в контейнер для отходов.

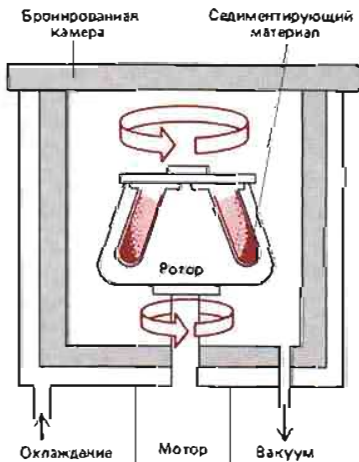
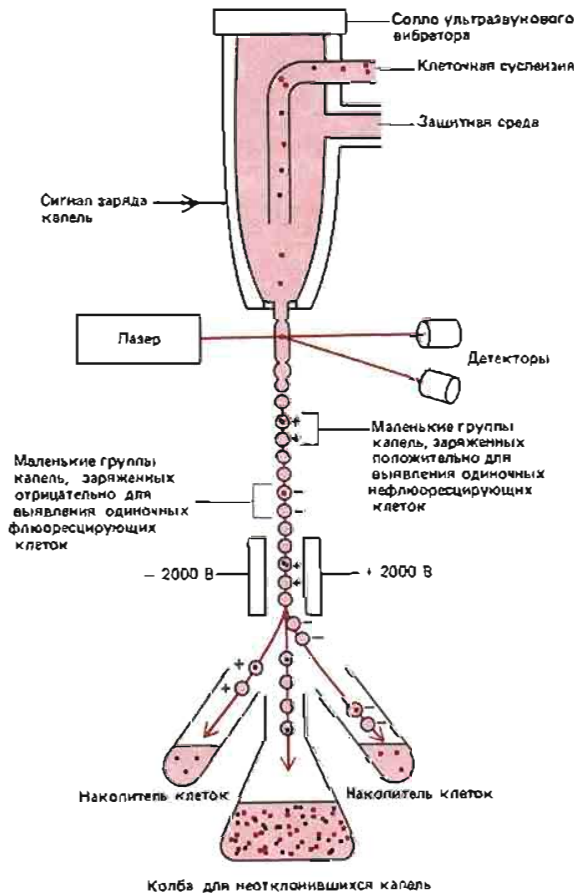


Рис. 4-29. Схема препааративной ультрацентрифуги. Исследуемый образец находится в пробирках, помещенных в расположенные по кругу цилиндрические гнезда в металлическом роторе. При быстром вращении ротора развивается большая центробежная сила, под действием которой частицы исследуемого образца осаждаются. В условиях вакуума трение снижается; в результате ротор не нагревается и вмонтированная в центрифугу система охлаждения поддерживает температуру образца при 4°C .

руемого анализатора клеток (сортира) на меченые и немеченые. При работе этим методом отдельные клетки движутся одна за другой в узком потоке и проходят через лазерный луч, где производится оценка наличия флуоресценции. Затем вибрирующее сопло формирует крошечные капельки, большинство из которых либо содержит только одну клетку, либо вообще не содержит клеток. Капли в момент образования автоматически приобретают положительный или отрицательный заряд в зависимости от наличия в капле флуоресцирующей клетки. Затем сильное электрическое поле направляет капли в соответствующие контейнеры. Случайные комки клеток опознаются по усилению светорассеяния, остаются незаряженными и отбрасываются в контейнер для отходов (рис. 4-28). Клеточный анализатор может отобрать одну клетку из тысячи; каждую секунду он сортирует около 5000 клеток.

4.3.2. С помощью ультрацентрифугирования можно разделять органеллы и макромолекулы [16]

После того как клетки очищены, их необходимо разрушить. Для этого используют различные подходы: осмотический шок, ультразвуковую вибрацию, продавливание через маленькое отверстие или измельчение. Мембраны клеток (в том числе плазматическая мембрана и мембраны эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи), разрушенные с помощью этих методов, распадаются на фрагменты, которые сразу же замыкаются, образуя мельчайшие пузырьки. При осторожном применении методов разрушения можно сохранить некоторые органеллы в интактном состоянии (в том числе ядра, митохондрии, лизосомы и пероксисомы). Таким образом, популяция клеток



Рис. 4-30. Схематически показано фракционирование субклеточных компонентов из экстрактов клеток путем повторного центрифугирования при постепенно возрастающих скоростях. В общем случае, чем меньше по размерам субклеточный компонент, тем более высокая центробежная сила требуется для его осаждения. Обычно на различных этапах центрифугирования используются следующие условия:

Низкая скорость	1 000 g – 10 мин
Средняя скорость	20 000 g – 20 мин
Высокая скорость	80 000 g – 1 ч
Очень высокая скорость	150 000 g – 3 ч

превращается в растворимый экстракт, содержащий довольно грубую суспензию связанных с мембранами частиц, обладающих характерными размерами, зарядом и плотностью. Было показано, что при правильном выборе среды для гомогенизации (а это требует тщательного анализа методом проб и ошибок в отношении каждой из органелл) частицы экстракта сохраняют большую часть биохимических свойств, присущих intactным органеллам в клетке.

После того как в начале 40-х годов начали широко использовать **препаративную ультрацентрифугу**, разделение клеточных компонентов стало вполне реальным. Экстракты разрушенных клеток фракционируют, подвергая их высокоскоростному центрифугированию (рис. 4-29). Крупные компоненты экстракта, в том числе ядра или неразрушенные клетки, быстро оседают (седиментируют) при относительно низких скоростях и образуют осадок на дне центрифужной пробирки. При более высокой скорости выпадают в осадок митохондрии, а при еще более высоких скоростях и длительных периодах центрифугирования сперва осаждаются мелкие и замкнутые пузырьки (микросомы), а затем рибосомы (рис. 4-30). Все эти фракции загрязнены, но, если процедуру ресупендирования осадка и ультрацентрифугирования повторить несколько раз, многие примеси исчезнут.

Можно достигнуть и более высокой степени разделения фракций, но для этого необходимо наложить гомогенат клеток тонким слоем поверх солевого раствора в центрифужной пробирке. Во избежание перемешивания осаждаемых компонентов под действием конвекции солевой раствор должен содержать инертный и хорошо растворимый материал (например, сахарозу), плотность которого постепенно увеличивается сверху вниз, формируя **градиент плотности**. В этих условиях различные фракции седиментируют с различной скоростью и образуют отдельные полосы, которые можно выделить (рис. 4-31). Скорость седиментации каждого компонента зависит от его размеров и формы и обычно выражается с помощью **коэффициента седиментации**, обозначаемого s (табл. 4-7). Ротор в современных ультрацентрифугах вращается со скоростью 80 000 об/мин, так что на разделяемые частицы действуют силы, превосходящие силу тяжести более чем в 500 000 раз. Под действием столь больших сил даже такие сравнительно небольшие макромолекулы, как тРНК или простейшие ферменты, отделяются друг от друга и распределяются в строгом соответствии со своими размерами.

Ультрацентрифуга используется для разделения компонентов клеток не только по массе, но и по **плавающей плотности**. В этом случае образец седиментирует в крутом градиенте, образованном высококонцентрированным раствором сахарозы или хлористого цезия. Компоненты клетки опускаются по градиенту до тех пор, пока не достигнут участка, плотность раствора в котором равна собственной плотности компонентов. Дальнейшей седиментации компонентов не происходит, и они «застревают» на этом уровне. Данный метод настолько чувствителен, что с его помощью можно отделять немеченые макромолекулы от макромолекул, содержащих тяжелые изотопы (^{13}C или

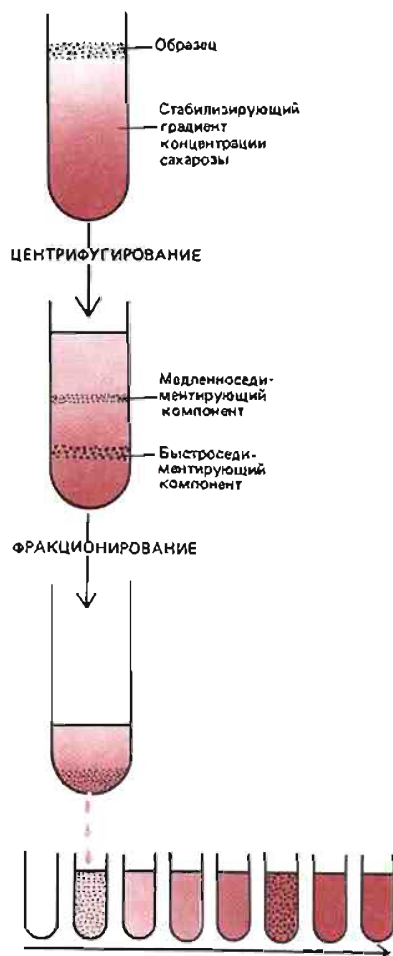


Рис. 4-31. Образец субклеточных компонентов наносят поверх раствора сахаразы и осаждают при различных скоростях в зависимости от размера. В пробирке устанавливают непрерывный градиент плотности сахаразы, концентрация которой возрастает в направлении дна пробирки (обычно используют концентрацию сахаразы в пределах 5–20%). Градиент концентрации сахаразы необходим для стабилизации раствора и седиментирующих полос в условиях конвекции. После центрифугирования различные компоненты можно, как правило, собрать в отдельности. Для этого пластмассовую центрифужную пробирку прокалывают и собирают капли со дна, как это показано на рисунке.

Таблица 4-7. Некоторые типичные коэффициенты седиментации¹⁾

Частица или молекула	Коэффициент седиментации, S
Лизосома	9400
Вирус табачной мозаики	198
Рибосома	80
Молекула рибосомной РНК	28
Молекула тРНК	4
Молекула гемоглобина	4,5

¹⁾ Коэффициенты седиментации s измеряются в секундах и задаются уравнением $(dx/dt)/\omega^2 x$, где x – расстояние от центра вращения в сантиметрах (см), dx/dt – скорость оседания (седиментации) в сантиметрах в секунду (см/с), ω – угловая скорость вращения ротора центрифуги в радианах в секунду (рад/с). Поскольку такие коэффициенты измеряются очень малыми числами, они обычно выражаются в единицах Сведберга (S), где $1 S = 1 \cdot 10^{-13}$ с.

¹⁵N). Метод центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия был разработан в 1957 г. для разделения меченой и немеченой ДНК, синтезированной бактериями в присутствии меченных ¹⁵N предшественников нуклеотидов. С помощью этого теперь уже классического эксперимента было прямо доказано, что репликация ДНК осуществляется полуконсервативным путем (разд. 3.2.3).

4.3.3. Детали сложных внутриклеточных процессов на молекулярном уровне можно изучать только после разделения компонентов клетки [17]

Выделение органелл и других крупных субклеточных компонентов производят в основном с помощью ультрацентрифугирования. Следовательно, ультрацентрифуга играет важную роль в изучении функциональной активности различных компонентов клетки. Вспомним, что только возможность получить очищенные фракции из митохондрий и хлоропластов позволила установить ключевую роль этих органов в процессе превращения энергии. Аналогично этому исследователям удалось разделить замкнутые пузырьки, образованные при разрушении аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулаума, и использовать эти пузырьки в качестве миниатюрной модели интактной органеллы – подход, позволивший подробно проанализировать многочисленные функции каждой из органелл.

Фракционированные клеточные экстракты, называемые также бесклеточными системами, широко используются для изучения внутриклеточных процессов. Только работая с бесклеточными экстрактами, можно установить детальный молекулярный механизм биологических процессов, поскольку лишь в этом случае исследуемый биологический процесс может быть изолирован и изучен в чистом виде – без помех, создаваемых происходящими в клетке сложными побочными реакциями. Использование бесклеточных систем принесло первый триумфальный успех при изучении механизма биосинтеза белка. Здесь в качестве отправной точки использовали неочищенный клеточный экстракт, способный транслировать молекулы РНК в белок. После многократного фракционирования этого экстракта были получены рибосомы, тРНК и различные ферменты, составляющие в совокупности аппарат биосинтеза белка. Когда отдельные компоненты были получены в чистом виде, исследователи могли добавлять эти компоненты в систему и исключать из нее и таким образом уточнять роль каждого из них в процессе биосинтеза белка. Несколько позже в опытах с бесклеточной системой был расшифрован генетический код – с использованием в качестве матричной РНК (мРНК) искусственных полинуклеотидов известного состава. Множество систем трансляции *in vitro* наряду с различными методами клонирования ДНК применяются в настоящее время для определения белков, кодируемых очищенными препара-

Таблица 4-8. Основные вехи в разработке метода ультрацентрифугирования и приготовления бесклеточных экстрактов

1897–	Бюхнер (Buchner) показал, что бесклеточные экстракты дрожжей способны расщеплять сахара с образованием диоксида углерода и этилового спирта. Так были заложены основы энзимологии
1926–	Сведберг (Svedberg) изобрел аналитическую центрифугу и использовал ее для определения молекулярной массы гемоглобина, которая оказалась равной 68 000 дальтон
1935–	Пикелс и Бимс (Pickels, Beams) несколько усовершенствовали конструкцию центрифуги, что позволило использовать ее для проведения препаративных исследований
1938–	Беренс (Behrens) использовал дифференциальное центрифугирование для разделения ядер и цитоплазмы клеток печени. Позже этот метод был усовершенствован в 40-х и начале 50-х годов Клодом, Браше, Хогбумом (Claude, Brachet, Hageboom) и другими исследователями. Это позволило использовать метод дифференциального центрифугирования для разделения органелл клетки
1949–	Сент-Дьердьи (Szent-Györgyi) показал, что изолированные миофибриллы из клеток скелетных мышц сокращаются при добавлении АТФ. В 1955 г. аналогичную бесклеточную систему использовал Хофман-Берлинг (Hofman-Berling) для изучения движения жгутика
1951–	Бракк (Brakke) использовал ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы для очистки вирусов растений
1953–	де Дюв (de Duve) выделил методом центрифугирования лизосомы, в несколько позже пероксисомы
1954–	Замечник (Zamecnik) и сотрудники получили первую бесклеточную систему синтеза белка. За этим открытием последовало десятилетие интенсивных исследований, завершившихся расшифровкой генетического кода
1957–	Меселсон, Сталь и Виноград (Meselson, Stahl, Vinograd) для разделения нуклеиновых кислот разработали метод центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия

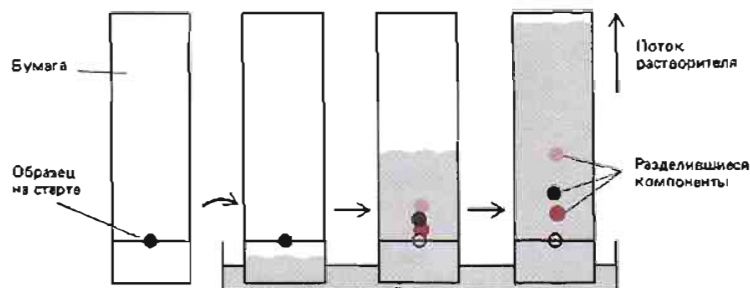
ратами мРНК (разд. 4.5.3 и табл. 4-13). В табл. 4-8 приведены некоторые даты из истории разработки методов фракционирования клеточных экстрактов.

Одна из основных задач современной биологии состоит в разработке бесклеточных систем для моделирования наиболее сложных внутриклеточных процессов, например расхождения хромосом в митозе. Однако в конечном итоге успех биохимического анализа с помощью бесклеточных систем зависит от степени чистоты каждого из белковых компонентов системы. Методы разделения белков рассматриваются в последующих разделах.

4.3.4. Для фракционирования белков можно использовать хроматографию

В настоящее время **хроматография** является одним из методов, наиболее широко используемых для фракционирования белка. Первоначально этот метод был разработан для фракционирования низкомолекулярных соединений – сахаров и аминокислот. Наибольшее распространение получила **распределительная хроматография** – метод, нашедший широкое применение для разделения небольших молекул. В общей форме этот метод состоит в следующем. Каплю образца наносят на специальную бумагу (*хроматография на бумаге*) или пластинку из стекла или пластмассы, покрытую тонким слоем инертного сорбента, например целлюлозы или силикагеля (*хроматография в тонком слое*, или *тонкослойная хроматография*). Затем такую пластинку одним концом помещают в смесь растворителей (например, воды и спирта). По мере передвижения растворителей по пластинке они подхватывают те молекулы образца, которые растворяются в этих растворителях. Растворители выбирают так, чтобы они связывались сорбентом по-разному. В результате молекулы образца, более растворимые в связанном растворителе, движутся медленнее, а дру-

Рис. 4-32. Разделение низкомолекулярных соединений методом хроматографии на бумаге. Образец наносят на старт и высушивают, а затем через бумагу, используя капиллярный эффект, пропускают смесь двух растворителей. Разные компоненты образца движутся в бумаге с различной скоростью, зависящей от относительной растворимости исследуемых компонентов в растворителе, адсорбируемом бумагой сильнее.

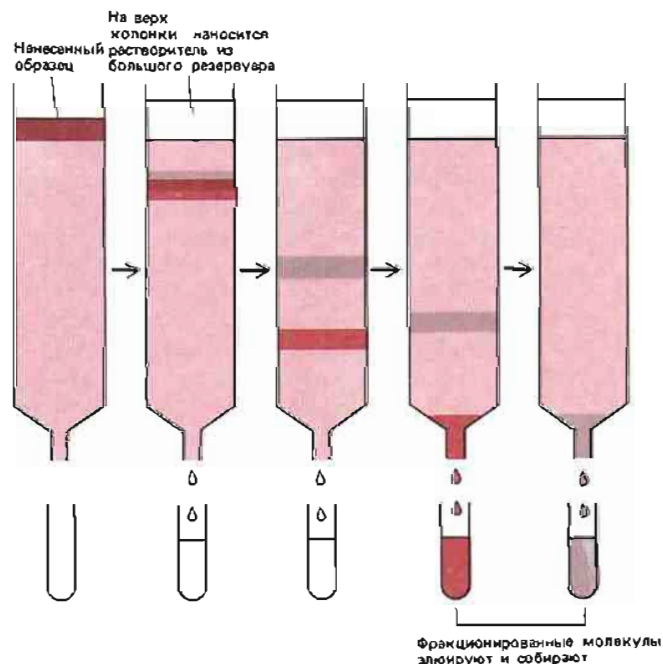


гие — более растворимые в другом растворителе — движутся быстрее. После завершения разгонки для выявления различных молекул хроматограмму сушат и затем окрашивают (рис. 4-32). Разные формы тонкослойной хроматографии и хроматографии на бумаге до сих пор все еще находят широкое применение для анализа различных низкомолекулярных соединений.

Белки чаще всего разделяют методом *хроматографии на колонках* (*колоночной хроматографии*). В этом случае смесь белков в растворе пропускают через колонку, содержащую пористый твердый матрикс. В результате взаимодействия с матриксом разные белки проходят через колонку с различной скоростью. После того как разные белки достигнут в определенной последовательности дна колонки, их собирают отдельными фракциями (рис. 4-33). В настоящее время разработано и применяется множество матриксов различных типов, используя которые, можно разделять белки, не нарушая их нативную структуру. Существуют матриксы, позволяющие разделять белки по заряду, размерам или по способности присоединяться к определенным химическим группам, связанным с матриксом.

В продаже имеется широкий выбор матриксов различных типов (рис. 4-34). *Ионообменные колонки* набиты маленькими шариками, заряженными положительно или отрицательно. При использовании таких колонок фракционирование белков происходит в соответствии с расположением зарядов на поверхности белковых молекул. *Гидрофобные колонки* наполнены

Рис. 4-33. Разделение молекул методом хроматографии на колонках. Стеклообразную или пластмассовую колонку сначала заполняют твердым проникаемым матриксом, потом растворителем и наносят сверху исследуемый образец. Затем через колонку медленно прокачивают большое количество растворителя, который собирают со дна колонки в отдельные пробирки. Различные компоненты образца проходят через колонку с различной скоростью, что и лежит в основе их фракционирования.



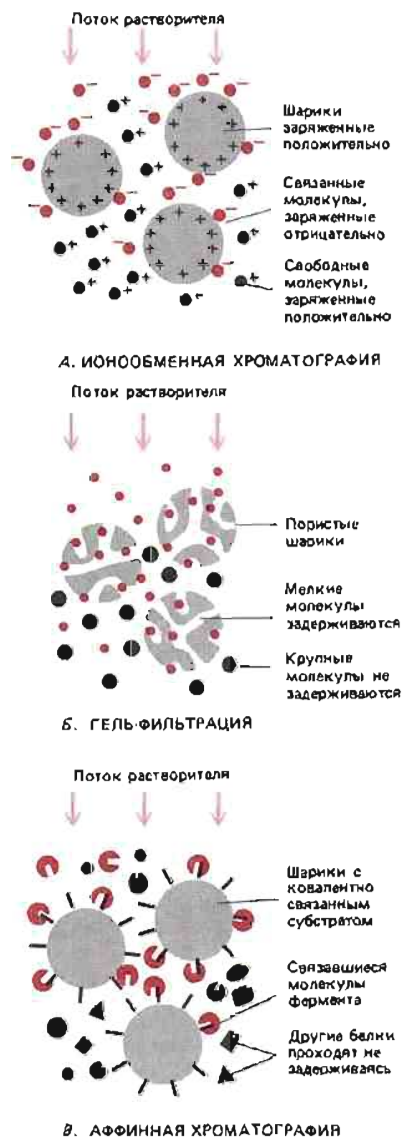


Рис. 4-34. На схеме изображены некоторые типы матриц, используемых в хроматографии. При ионообменной хроматографии (А) нерастворимый матрикс содержит ионы, задерживающие молекулы с противоположным зарядом. Для разделения белков используются следующие матриксы: диэтиламиноцеллюлоза (ДЭА-целлюлоза) — заряжена положительно; карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза) и фосфоцеллюлоза — заряжены отрицательно. Сила взаимодействия между молекулами в растворе и ионообменником определяется ионной силой и pH элюирующего раствора. При хроматографии методом гель-фильтрации (Б) матрикс инертен, но содержит поры. Низкомолекулярные соединения проникают внутрь частиц матрикса. Оказавшись при этом в относительно большем объеме, они проходят через колонку медленнее. В качестве матрикса можно использовать зерна поперечно-сшитого полисахарида (декстран или агароза). Поскольку в продаже имеются полисахариды с самым различным размером пор, их можно использовать для фракционирования молекул размером от 500 до $5 \cdot 10^6$ дальтон. При аффинной хроматографии (В) используется нерастворимый матрикс, ковалентно связанный со специфическим лигандом (антителами или субстратом фермента), присоединяющим специфический белок. Однократная хроматография на такой колонке позволяет зачастую достигнуть очень высокой степени очистки препарата.

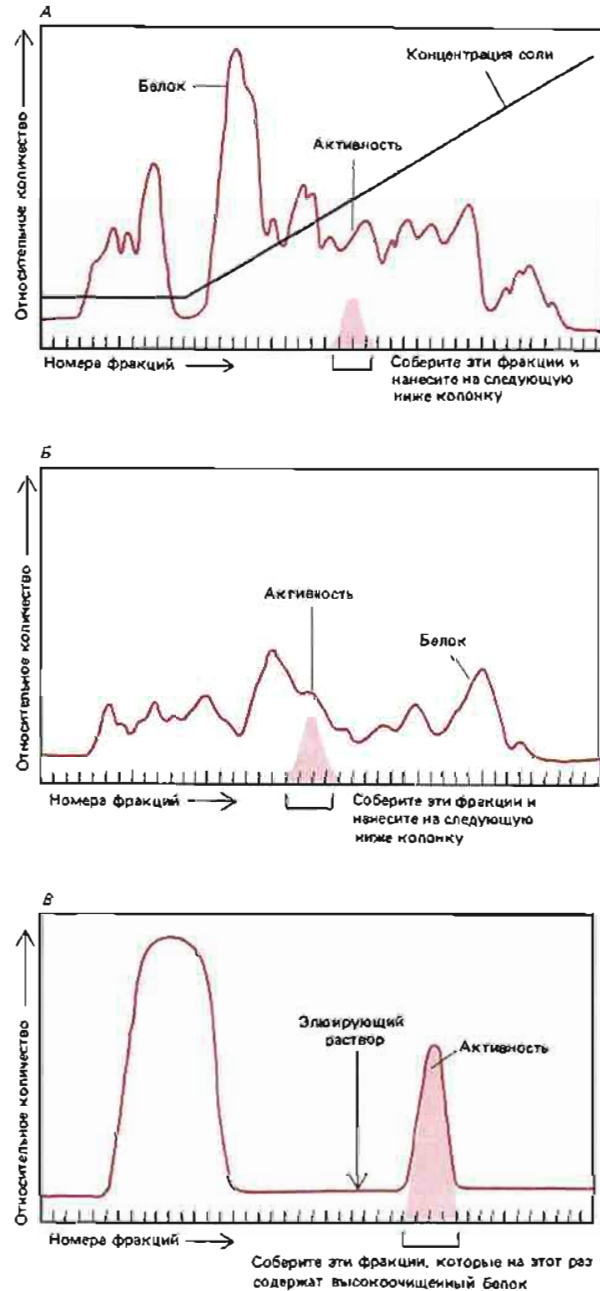
шариками, из которых выступают гидрофобные цепи; в таких колонках удерживаются белки с обнаженными гидрофобными участками. Колонки, предназначенные для *гель-фильтрации*, наполнены крошечными пористыми шариками; при использовании таких колонок происходит разделение белков по размерам. Молекулы небольшого размера по мере передвижения через колонку проникают внутрь шариков, а более крупные молекулы остаются в промежутках между шариками. В результате они быстрее проходят через колонку и выходят из нее первыми. Гель-фильтрация обычно используется и для разделения молекул, и для определения размеров молекул.

На каждом этапе колоночной хроматографии содержание белка в смеси увеличивается не более чем в 20 раз, и поэтому выделить из сложной смеси отдельный белок за один цикл практически невозможно.

На долю каждого белка, как правило, приходится менее 1/1000 всех белков клетки, и для его очистки требуется последовательное использование нескольких различных типов колонок (рис. 4-35). Гораздо более эффективен метод *аффинной хроматографии* (хроматографии по сродству). В основе этого метода лежит использование биологически важных взаимодействий, происходящих на поверхностях белковых молекул.

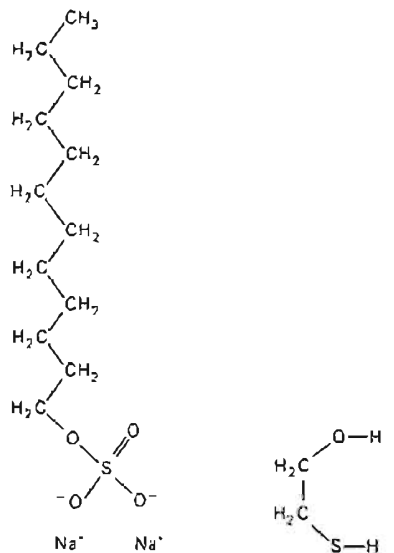
С матриксом, например с теми же полисахаридными шариками, можно ковалентно связать субстрат фермента. В этом случае интересующий нас фермент будет задерживаться матриксом наряду с очень небольшим числом других белков. Аналогичным путем можно связать с матриксом специфические антитела и использовать этот матрикс для очистки белков, распознаваемых этими антителами. *Аффинные колонки* обладают высокой степенью специфичности; за один цикл хроматографии можно добиться очень высокой степени очистки (в 1000–10 000 раз).

Рис. 4-35. Типичные результаты, полученные при очистке белка тремя различными методами хроматографии. В данном случае подлежащий фракционированию целый клеточный экстракт сначала пропускали через колонку, заполненную ионообменной смолой (А). Затем колонку промывали и связавшиеся белки элюировали сверху вниз раствором, содержащим постепенно нарастающую концентрацию соли. Белки с наименьшим сродством к ионообменной смоле проходят через колонку, не задерживаясь, и собираются со дна колонки в первых порциях элюата. Остальные белки элюируются соответственно сродству к ионообменной смоле. Для элюирования белков, связывающихся со смолой наиболее сильно, требуется наивысшая концентрация соли. Исследуемый белок элюировался в виде узкого пика; он был выявлен по ферментативной активности. Фракции с такой активностью собирали и наносили на вторую колонку для гelfильтрации (Б). Фракцию все еще недостаточно очищенного белка выявляли по ферментативной активности; активные фракции собирали и очищали до гомогенного состояния на аффинной колонке (В), содержащей иммобилизованный субстрат фермента.



4.3.5. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) можно определить размер и субъединичный состав белков [18]

Белки обычно несут суммарный положительный или отрицательный заряд, обусловленный наличием на поверхности белковой молекулы положительно или отрицательно заряженных групп аминокислот. Если белки поместить в электрическое поле, белок начнет перемещаться со скоростью, зависимой от суммарного заряда, а также от формы и размера белковой молекулы. На этом явлении основан метод **электрофореза** – метод разделения смесей белков



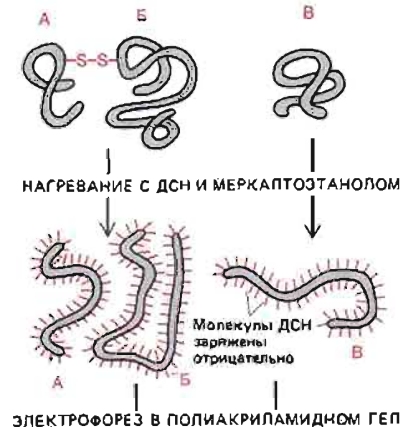
Додецилсульфат натрия (ДСН)

β -Меркаптоэтанол

Рис. 4-36. Детергент додецилсульфат натрия (ДСН) в ионизированной форме и восстановитель β -меркаптоэтанол. Эти два реактива используются для сольubilизации белков при ДСН-электрофорезе в полиакриламидном геле.

Белок из 2 субъединиц. А и Б, соединенных дисульфидным мостиком

Белок из 1 субъединицы Б



Блок полиакриламидного геля

в свободных водных растворах и в твердом пористом матриксе, в качестве которого можно использовать крахмал.

В середине 60-х годов был разработан модифицированный метод электрофореза — электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ). Этот метод был существенным шагом вперед по сравнению с обычными методами анализа белков, известными к тому времени. При использовании этого метода белки мигрируют в инертном матриксе — полиакриламидном геле с высоким содержанием поперечных сшивок. Обычно гель готовят полимеризацией мономеров непосредственно перед использованием. Размеры пор геля могут быть подобраны произвольно, с тем чтобы гель мог замедлить миграцию определенных молекул.

При этом белки находятся в растворе, содержащем мощный, отрицательно заряженный детергент — додецилсульфат натрия, или ДСН (рис. 4-36). Связываясь с гидрофобными участками белковых молекул, этот детергент вызывает разворачивание белковых молекул в вытянутые полипептидные цепи. Разворачиваясь, отдельные белковые молекулы высвобождаются из комплексов с другими белками или молекулами липидов и сольubilизируются в растворе детергента. В качестве восстанавливающего агента обычно добавляют меркаптоэтанол (рис. 4-36), разрушающий в белках связи S—S. Это дает возможность анализировать полипептиды, образующие мультисубъединичные комплексы.

Что же произойдет, если смесь белков, растворенных в ДСН, подвергнуть электрофорезу в блоке полиакриламидного геля. Поскольку белки ассоциированы со многими молекулами детергента, несущими отрицательный заряд, после того как будет приложено напряжение, каждый белок станет двигаться к положительному полюсу. Небольшие белки легче продвигаются сквозь поры в молекулярном сите геля, чем крупные белки, и поэтому сложная смесь белков разделяется на ряд отдельных белковых полос, расположенных в соответствии с их молекулярной массой (рис. 4-37). Окрасив гель красителем кумасси синим, можно выявить основные фракции полипептидов. Минорные белки идентифицируют серебрением; минимальное количество белка, выявляемое в полосе, составляет в последнем случае 10 нг. С помощью таких гелей можно идентифицировать специфический белок, если пометить его антителами, связанными с радиоактивными изотопами или флюоресцентным красителем. Идентификацию часто выполняют после переноса белков из геля на лист нитроцеллюлозной бумаги (посредством «блоттинга»). Ниже этот метод описан более подробно применительно к изучению нуклеиновых кислот (разд. 4.5.5).

Метод ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле значительно мощнее любого другого метода анализа белков из известных ранее хотя бы потому, что может быть использован для анализа и выделения любого белка независимо от его растворимости в водных растворах. С помощью этого метода можно разделить на отдельные фракции белки мембран, белковые компоненты цитоскелета и белки, входящие в состав крупных макромолекулярных агрегатов. При использовании этого метода полипептиды разделяют-

Рис. 4-37. ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле — мощный метод фракционирования белков. Идентифицируемые белки образуют комплекс с молекулами додецилсульфата натрия, несущими отрицательный заряд, и мигрируют через пористый гель полиакриламида в виде отрицательно заряженного комплекса ДСН-белок. Поскольку скорость передвижения в этих условиях тем выше, чем меньше размеры полипептида, этот метод может быть использован для определения приблизительной молекулярной массы полипептидной цепи, а также для изучения субъединичного состава белка.

ся строго по размерам, поэтому с помощью этого метода можно получить информацию о субъединичном составе любого комплекса и о молекулярной массе белков, образующих этот комплекс (рис. 4-37).

4.3.6. Методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле можно разделить в одном геле более 1000 белков [19]

Любой метод разделения белков, например ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле или хроматография, позволяет выявить лишь относительно небольшое количество белков—обычно менее 50. В 1975 г. был разработан новый метод анализа белков, названный **двумерным гелем-электрофорезом**. Объединяя в себе преимущества двух различных методов фракционирования белков, этот метод дает возможность разделить более 1000 различных белков, получая результаты в виде «белковой карты».

При работе данным методом на первом этапе образец растворяют в небольшом объеме раствора, содержащем неионный детергент меркаптоэтанол и в качестве денатурирующего агента мочевины. В этом растворе происходят солбоилизация, денатурация и диссоциация всех полипептидных цепей без сопутствующего изменения заряда цепей. Диссоциированные полипептидные цепи разделяют затем методом **изоэлектрического фокусирования**, основанного на изменении заряда белковой молекулы при изменении pH окружающей среды. Каждый из белков может быть охарактеризован *изоэлектрической точкой*—значением pH, при котором суммарный заряд белковой молекулы равен 0 и, следовательно, белок не способен перемещаться под действием электрического поля. При изоэлектрическом фокусировании белки подвергаются электрофорезу в узкой трубке, заполненной полиакрила-

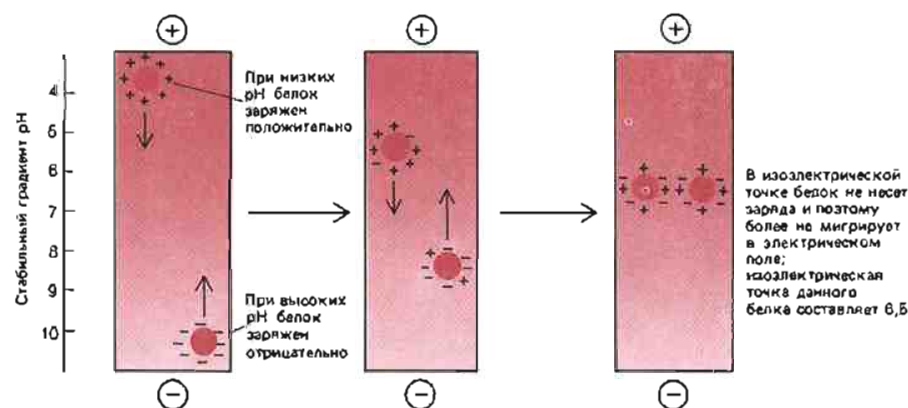


Рис. 4-38. Разделение молекул белка методом изоэлектрического фокусирования. При низких значениях pH (при высокой концентрации ионов H^+) карбоксильные группы белков имеют тенденцию оставаться незаряженными ($-COOH$), а основные, азотсодержащие группы белков полностью заряжены (например, $-NH_3^+$), обуславливая наличие у белков суммарного положительного заряда. При высоких значениях pH карбоксильные группы заряжены отрицательно ($-COO^-$), а основные группы имеют тенденцию оставаться незаряженными (например, NH_2). В результате белки приобретают отрицательный суммарный заряд (см. рис. 2-8). Суммарный заряд белка при его *изоэлектрической точке* равен 0. Следовательно, если пробирку, содержащую раствор с фиксированным градиентом pH, подвергнуть действию сильного электрического поля, каждый вид белка будет перемещаться до тех пор, пока не образует узкой полосы в области pH, соответствующей его изоэлектрической точке, как это показано на рисунке.

Рис. 4-39. Фракционирование белков клетки *E. coli* методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле. Каждое пятно соответствует отдельной полипептидной цепи. Сначала белки разделяли соответственно их изоэлектрическим точкам методом изоэлектрического фокусирования слева направо. Далее в присутствии ДСН их разделяли методом электрофореза сверху вниз соответственно молекулярной массе их субъединиц. Отметим, что содержание разных белков различно. (С любезного разрешения Patrick O'Farrell.)



Таблица 4-9. Основные вехи в развитии хроматографии и электрофореза и применение этих методов для исследования биологических макромолекул

1883	– Фарадей (Faraday) сформулировал фундаментальные законы, описывающие электрические явления в растворах
1850	– Рунге (Runge) разделил неорганические соединения по их дифференциальной адсорбции на бумаге, предвосхитив тем самым появление методов хроматографического разделения
1906	– М. С. Цвет изобрел хроматографию на колонках. Он пропустил петролейные экстракты листьев растений через колонку с порошкообразным мелом
1933	– Тизелиус (Tiselius) использовал электрофорез для разделения белков в растворе
1942	– Мартин и Синг (Martin, Synge) изобрели распределительную хроматографию, на основе которой через два года был разработан метод хроматографии на бумаге
1946	– Стайя и Мур (Stein, Moore) впервые определили аминокислотный состав белка. Сперва в качестве наполнителя в колоночной хроматографии они использовали крахмал, а позже ионообменные смолы
1955	– Смитис (Smithies) для разделения белков с помощью электрофореза использовал крахмальный гель – Сэнгер (Sanger) завершил анализ аминокислотной последовательности бычьего инсулина. Это первый белок, у которого была определена полная последовательность аминокислот
1956	– Инграм (Ingam) получил первые пептидные карты («фингерпринты», «отпечатки пальцев»), показав при этом, что различие между гемоглобином эритроцитов больных серповидноклеточной анемией и нормальным гемоглобином обусловлено заменой одной-единственной аминокислоты
1959	– Реймонд (Raymond) ввел в употребление полиакриламидный гель, который превосходит гели из крахмала при электрофоретическом разделении белков; в течение нескольких следующих лет Орнштейн и Дэвис (Ornstein, Davis) разработали более эффективные буферные системы, что позволило проводить разделение белков с высокой степенью разрешения
1966	– Мэйзел (Maizel) для усовершенствования электрофореза белков в полиакриламидном геле предложил использовать додецилсульфат натрия (ДСН, SDS)
1975	– О'Фаррел (O'Farrell) разработал систему двумерного гель-электрофореза для анализа белковых смесей. Предложенный им метод представляет собой сочетание ДСН-электрофореза белков в полиакриламидном геле с изоэлектрическим фокусированием

мидным гелем, в котором с помощью специальных буферов создается градиент pH. Под действием электрического поля каждый белок перемещается в ту зону градиента, которая соответствует его изоэлектрической точке, и остается там (рис. 4-38). Так происходит разделение в одном направлении двумерного гель-электрофореза.

На втором этапе узкий гель, содержащий белки, фракционированные по изоэлектрическим точкам, пропитывают додецилсульфатом натрия и проводят электрофорез через блок ДСН-полиакриламидного геля. Каждая полипептидная цепь мигрирует теперь соответственно молекулярной массе, образуя в геле отдельные пятна. Так осуществляется разделение во втором направлении двумерного гель-электрофореза. Неразделенными в результате остаются только белки, неразличимые по размерам и по изоэлектрической точке, — ситуация, встречающаяся очень редко. Используя различные методы окрашивания белков, а в случае белков, меченных радиоактивными изотопами, — метод радиоавтографии (разд. 4.4.2), можно выявить следовые количества практически всех полипептидных цепей. За один прием методом двумерного электрофореза в геле можно разделить до 2000 отдельных полипептидных цепей; этого количества достаточно, чтобы выявить большинство бактериальных белков (рис. 4-39). Разрешение этого метода настолько велико, что позволяет разделить два практически идентичных белка, отличающихся лишь одной заряженной аминокислотой.

В табл. 4-9 приведены некоторые основные даты разработки методов хроматографии и электрофореза.

4.3.7. Избирательное расщепление белка приводит к образованию характерного набора пептидных фрагментов [20]

Молекулярная масса и изоэлектрическая точка — характерные параметры белка, однако в основе точной идентификации белковой молекулы лежит определение аминокислотной последовательности. Уже на первом этапе этого процесса, включающего расщепление белка на мелкие фрагменты, можно получить значительную информацию о данном белке. В настоящее время в продаже имеются протеолитические ферменты и химические реактивы, расщепляющие белки по определенным аминокислотным остаткам (табл. 4-10). Так, фермент *трипсин* отщепляет остатки лизина и аргинина со стороны карбоксильных групп; химический реактив *бромистый циан* расщепляет пептидные связи, расположенные после остатков метионина. Поскольку такие специфические ферменты и реактивы расщепляют в белковой молекуле сравнительно немного связей, при их воздействии образуется смесь больших пептидов. Разделив эту смесь методом электрофореза или хроматографии, можно получить *пептидную карту*, характеризующую исследованный белок. Такие пептидные карты называют иногда «фингерпринтами» (отпечатками пальцев) белка (рис. 4-40).

Этот метод был разработан в 1956 г. для сравнения нормального гемо-

Таблица 4-10. Некоторые реактивы, используемые обычно для расщепления пептидных связей в белках

	Аминокислота 1	Аминокислота 2
Фермент		
Трипсин	Лизин или аргинин	Любая
Химотрипсин	Фенилаланин, триптофан или тирозин	«
V8-протеаза	Глутаминовая кислота	«
Химический реактив		
Бромистый циан	Метионин	«
2-нитро-5-тиоцианобензоат	Любая	Цистеин



Рис. 4-40. Получение пептидной карты («фингерпринта» или «отпечатков пальцев») белков. В данном случае белок расщепляли трипсином и получили смесь мелких фрагментов полипептидов. Эту смесь фракционировали в двух направлениях методами электрофореза и распределительной хроматографии. Полученное расположение пятен характеризует анализируемый белок.

глобина с мутантной формой того же белка, обнаруживаемой в крови больных *серповидноклеточной анемией*. Оказалось, что мутантный белок отличается от нормального по одной-единственной аминокислоте. Так впервые было доказано, что мутация может привести к замене в белке только одной аминокислоты.

Обычно модифицированная форма этого метода используется в комплексе с ДСН-гель-электрофорезом. Из геля вырезают отдельные белковые полосы и смешивают их с протеолитическим ферментом паллаином. Тщательно контролируя длительность расщепления и количество протеолитического фермента, можно получить набор крупных, не полностью фрагментированных полипептидов. При анализе во втором ДСН-геле такая смесь образует простой, но характерный набор полос, и его достаточно для определения идентичности двух белков, выделенных разными методами.

4.3.8. С помощью автоматических приборов можно анализировать короткие аминокислотные последовательности [21]

Осуществив расщепление белка на мелкие фрагменты, приступают к следующему этапу – определяют последовательность аминокислот в каждом из выделенных пептидных фрагментов. Для этого проводят многократные серии химических реакций, которые впервые были предложены в 1967 г. Сперва пептид обрабатывают каким-либо реактивом, взаимодействующим только со свободной аминогруппой на N-конце пептида. Далее этот реактив активируют, воздействуя на него слабой кислотой. Теперь он специфически расщепляет пептидную связь, соединяющую N-концевую аминокислоту с пептидной цепью; высвобождающуюся при этом аминокислоту идентифицируют методом хроматографии. Оставшийся пептид укорачивается в результате этого на одну аминокислоту. Его тоже подвергают реакции, проводимым в той же последовательности, – и так до тех пор, пока в пептиде не будет определена каждая аминокислота.

Циклический характер этих реакций дает возможность автоматизировать весь процесс. В настоящее время выпускаются приборы (**аминокислотные секвенаторы**), производящие автоматическое определение последовательности аминокислот в пептидных фрагментах. На последнем этапе анализа последовательности аминокислот полученные фрагменты пептидов располагают в такой же последовательности, в какой они были расположены в интактной полипептидной цепи. Для этого сравнивают последовательности различных наборов перекрывающихся пептидных фрагментов, полученных при расщеплении одного и того же белка различными протеолитическими ферментами.

Сравнительно недавно были проведены усовершенствования, значительно повысившие скорость и чувствительность методов определения аминокислотной последовательности белков. Частично это было достигнуто путем миниатюризации компонентов секвенатора, а частично – путем модификации метода колоночной хроматографии, обусловившей более высокую степень разрешения и более высокую скорость разделения исследуемых компонентов. При использовании этого метода хроматографии, известного как HPLC (от англ. high performance liquid chromatography – **высокоэффективная жидкостная хроматография**), анализируемый раствор проходит через длинную тонкую колонку, наполненную крошечными шариками. Раствор продавливается через колонку под большим давлением; при этом повышается чистота фракций, а само хроматографическое разделение длится уже не часы, а минуты.

В результате этих усовершенствований чувствительность аминокислотного анализа по сравнению с чувствительностью исходного метода возрастает примерно в 1000 раз. Сейчас последовательность нескольких десятков аминокислот со стороны свободной аминогруппы пептида можно определять, имея всего несколько микрограммов белка – именно такое количество белка содержится в одной полосе ДСН-полиакриламидного геля.

И все же, несмотря на эти усовершенствования и на тот факт, что процесс

происходит полуавтоматически, определение полной аминокислотной последовательности белка остается сложной задачей – и тем сложнее, чем больше длина полипептидной цепи. В случае белка, состоящего из 100 остатков аминокислот, последовательность аминокислот, как правило, может быть определена через месяц, в течение которого исследователю необходимо очень упорно трудиться. Поскольку анализ труднорастворимых пептидов до сих пор создает значительные трудности, этот метод не получил значительного распространения и к нему все еще относятся с известной долей почтительности. Поэтому, как мы увидим ниже, в настоящее время для определения последовательности аминокислот в большинстве белков осуществляют клонирование гена исследуемого белка, а затем используют значительно более быстрые и эффективные методы определения нуклеотидных последовательностей ДНК с последующей расшифровкой аминокислотной последовательности с помощью генетического кода.

Заключение

Обычно в качестве исходного материала для выделения клеток отдельных типов используются клетки эмбриональных тканей или тканей новорожденных животных. Такие очищенные клетки или гомогенные клеточные линии в культуре можно подвергнуть биохимическому анализу после разрушения и фракционирования содержимого клеток при помощи ультрацентрифугирования. Фракционированные клеточные экстракты используют для анализа сложных внутриклеточных процессов (например, синтеза белка или репликации ДНК) в качестве бесклеточных систем.

Методом хроматографии на колонках можно очищать белки, которые в клеточных экстрактах представлены в относительно больших количествах. Доступность разнообразных типов матриц, используемых в хроматографии на колонках, позволяет разделять белки по их молекулярной массе, заряду или сходству к другим молекулам при сохранении биологической активности исследуемых белков. Обычно в ходе очистки образцы последовательно пропускают через несколько таких колонок. После очистки белка до гомогенного состояния можно определять его аминокислотную последовательность. Здесь белок сначала расщепляют с образованием набора мелких пептидов, а затем с помощью чувствительных автоматизированных методов определяют последовательность аминокислот в пептидах.

Даже если количество белка очень невелико, его молекулярную массу и субъединичный состав можно определить, используя ДСН-электрофорез в ПААГ. В случае двумерного электрофореза белки разделяют на отдельные фракции изоэлектрическим фокусированием в одном направлении, после чего следует ДСН-электрофорез в ПААГ во втором направлении. Этот метод может быть использован даже для разделения тех белков, которые в норме считаются нерастворимыми.

4.4. Изучение клеточных макромолекул с помощью антител и радиоактивных изотопов

Для изучения внутриклеточных макромолекул можно использовать практически все свойства молекул – физические, химические и биологические. При биологическом исследовании молекулы внутри клеток выявляют обычно по оптическим свойствам (в чистом виде или в комплексе с красителями), а также по биохимической активности. Здесь мы рассмотрим два метода определения молекул в клетке: один из них включает использование радиоактивных изотопов, а другой – использование антител. Оба метода можно использовать для выявления определенных молекул в сложных смесях. Потенциально эти методы очень чувствительны и при оптимальных условиях дают возможность выявить в образце молекулы, общее количество которых меньше 1000.

Таблица 4-11. Использование некоторых радиоактивных изотопов в биологических исследованиях

Изотоп	Период полураспада ¹⁾
³² P	14 сут
¹³¹ I	8,1 сут
³⁵ S	87 сут
¹⁴ C	5570 лет
⁴⁵ Ca	164 сут
³ H	12,3 года

¹⁾ Изотопы расположены в порядке уменьшения энергии испускаемых ими β-частиц электронов. ¹³¹I испускает также γ-лучи. Период полураспада — время, в течение которого распадается 50% атомов данного изотопа.

4.4.1. Методы выявления радиоактивных атомов обладают высокой чувствительностью [22]

Большинство встречающихся в природе элементов представляет собой смесь изотопов, различающихся массой атомного ядра. Имея, однако, одинаковый набор электронов вокруг ядра, разные изотопы обладают одинаковыми химическими свойствами. Ядра радиоактивных изотопов, или радионуклидов, нестабильны и подвергаются спонтанному распаду, образуя различные атомы. При распаде ядра испускаются заряженные частицы (например, электроны) или излучение (например, γ-лучи).

Вследствие своей нестабильности в природе радиоактивные изотопы встречаются редко, но в ядерных реакторах, где происходит облучение атомов других элементов частицами высокой энергии, радиоактивные атомы можно получать в большом количестве (табл. 4-11). В настоящее время многие биологические элементы стали доступны в форме, содержащей радиоактивные атомы. Для регистрации излучения, испускаемого радиоактивными изотопами, используются различные подходы. Электроны (β-частицы) можно определять по ионизации газа, которую они вызывают в счетчике Гейгера или в сцинтилляционном счетчике по маленьким вспышкам света в сцинтилляционной жидкости. С помощью этих методов в биологическом образце можно определить содержание определенного радиоактивного изотопа. Радиоактивные изотопы можно локализовать в образце по их действию на зерна серебра в фотоэмульсии. Эти методы определения радиоактивных изотопов обладают очень высокой чувствительностью, и в благоприятных условиях можно зарегистрировать практически каждый распад, т.е. может быть учтен практически каждый распавшийся атом.

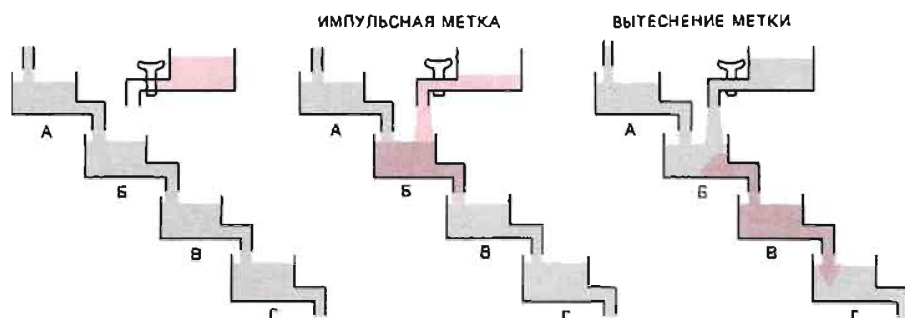
4.4.2. Радиоактивные изотопы используют для изучения перемещения молекул в клетках и в целом организме [22, 23]

Одним из первых случаев использования явления радиоактивности для исследования биологических процессов было изучение химического превращения углерода при фотосинтезе. Одноклеточные зеленые водоросли поместили в атмосферу, содержащую радиоактивно меченный CO₂ (¹⁴CO₂), и освещали в течение различного времени солнечным светом. Затем радиоактивное содержимое водорослей фракционировали с помощью хроматографии на бумаге. Небольшие молекулы, содержащие атомы ¹⁴C, происходящие из молекулы CO₂, выявляли на хроматограмме, помещая поверх высушенной бумажной хроматограммы лист фотопленки. Таким образом было идентифицировано большинство основных компонентов, образующихся в процессе фотосинтеза сахаров из CO₂.

Радиоактивные молекулы можно использовать для исследования практически всех внутриклеточных процессов. Для этого обычно в ходе эксперимента в культуральную среду добавляют предшественник в радиоактивной форме; при этом радиоактивные молекулы смешиваются с присутствующими в клетке нерадиоактивными. Клетка использует оба типа молекул, поскольку они отличаются только массой атомного ядра. Изменение локализации радиоактивных молекул в клетке или их химические превращения можно проследить во времени. Чувствительность таких экспериментов во многих случаях повышают, используя метод **вытеснения метки** (pulse-chase). При использовании этого метода радиоактивные вещества добавляют на очень короткое время (**импульсная метка**), затем их удаляют и замещают нерадиоактивными молекулами. Образцы отбирают через различные промежутки времени и в каждой такой точке определяют химическую природу и локализацию радиоактивных веществ (рис. 4-41).

Используя эти методы, можно проследить судьбу даже таких стабильных и реакционно неактивных молекул, как белки хрящей и костей. С помощью радиоактивных меток удалось установить, что почти все молекулы в живой

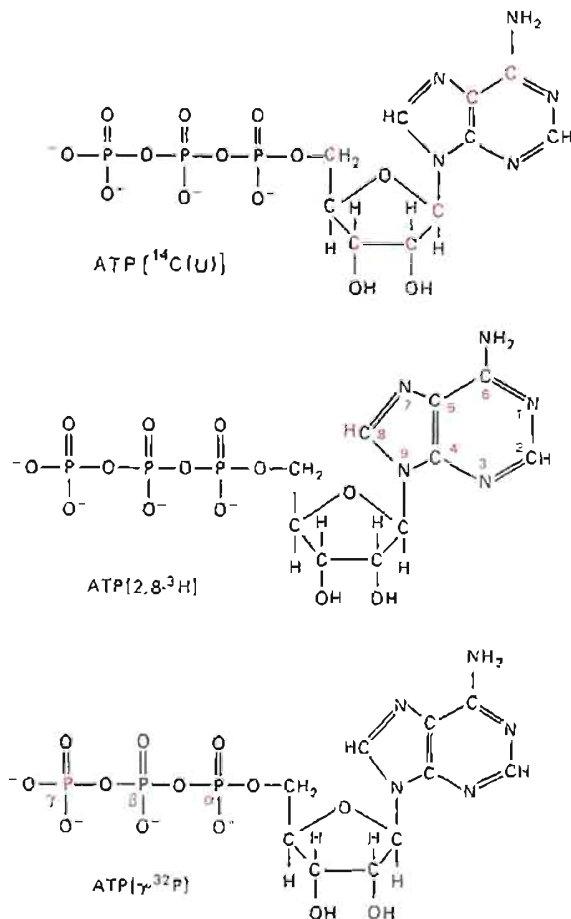
Рис. 4-41. Схема, иллюстрирующая суть типичного эксперимента с вытеснением импульсной метки. Буквами А, Б и В помечены резервуары, которые соответствуют различным компартментам клетки (выявляемым с помощью радиоавтографии или в опытах, включающих фракционирование клетки) или различным химическим соединениям (выявляемым хроматографически или с помощью каких-либо иных химических методов).



клетке постоянно разрушаются и замещаются другими молекулами. Такие медленные обменные процессы могли бы остаться незамеченными, если бы не радиоактивные изотопы. В настоящее время промышленность производит в радиоактивной форме практически все распространенные низкомолекулярные вещества. Независимо от степени сложности биологических молекул почти все из них можно пометить радиоактивной меткой. Часто получают химические соединения, в структуру которых радиоактивные атомы введены в определенных положениях. Это делают для того, чтобы получить возможность следить за независимыми превращениями, претерпеваемыми различными частями одной молекулы (рис. 4-42).

Одна из наиболее важных областей применения радиоактивных изотопов в биологии клетки — это определение локализации радиоактивных соединений

Рис. 42. Три радиоактивные формы АТФ, имеющиеся в продаже. Радиоактивные атомы выделены цветом. Приведены обозначения, с помощью которых указываются расположение и тип радиоактивных атомов.



в срезах клеток или целых тканей методом **радиоавтографии**. При использовании этого метода живые клетки подвергают кратковременному (импульсному) мечению с последующей их инкубацией в течение различных промежуточных времени в нерадиоактивной среде. Затем клетки фиксируют и обрабатывают для проведения световой или электронной микроскопии. Каждый приготовленный препарат покрывают тонким слоем фотоэмульсии и оставляют на несколько дней в темноте – время, в течение которого происходит распад радиоактивного изотопа. Затем фотоэмульсию проявляют. Местоположение радиоактивных молекул в каждой клетке можно определить по расположению темных зерен серебра. Если инкубировать клетки с радиоактивным предшественником ДНК (^3H -тимидином), можно увидеть, что ДНК синтезируется в ядре и там остается. И наоборот, мечение клеток радиоактивным предшественником РНК (^3H -уридином) показывает, что РНК исходно синтезируется в ядре, но затем быстро накапливается в цитоплазме клеток.

4.4.3. Для выявления и выделения специфических молекул можно использовать антитела [24]

Антителами называют белки, продуцируемые позвоночными животными для защиты от инфекции. Количество различных форм антител достигает миллионов; этим антитела отличаются от прочих белков. Каждая форма антител обладает определенными участками связывания, которые предназначены для специфического узнавания молекул, стимулировавших синтез антител. Эти молекулы называют **антигенами**. Высокая специфичность антител в отношении антигенов делает антитела мощным инструментом для изучения биологии клетки (рис. 4-43). После окрашивания антител флюоресцентными красителями их можно использовать для изучения внутриклеточной локализации специфических макромолекул с помощью флюоресцентной микроскопии (рис. 4-44). Если связать антитела с молекулами электроноплотного соединения (например, **ферритина**), такие антитела можно использовать для точной локализации клеточных антигенов при помощи электронного микроскопа. После разделения белков электрофорезом в полиакриламидном геле их идентифицируют с помощью антител к этим белкам. Более того, антитела можно «пришить» к инертному матриксу и получить таким образом аффинную колонку, которую можно использовать затем для очистки специфических макромолекул из грубых клеточных экстрактов. Если же антиген расположен на поверхности клетки, антитела используются для извлечения различных типов живых клеток из гетерогенных клеточных популяций.

Обычно антитела извлекают из сыворотки, обогащенной антителами, которую получают путем многократного введения животному (например, кролику или козе) антигена. Эта **антисыворотка** содержит гетерогенную смесь антител, каждый тип которых был синтезирован различными клетками, секретирующими антитела (В-лимфоциты). Различные антитела опознают различные части молекулы антигена, а также примеси в препарате антигена. Иногда специфичность антисыворотки к различным антигенам можно повы-

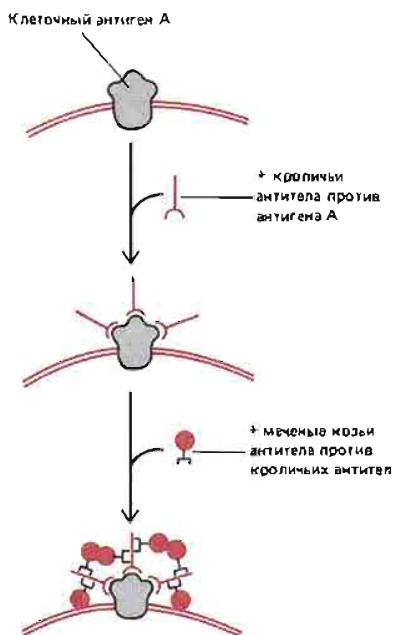
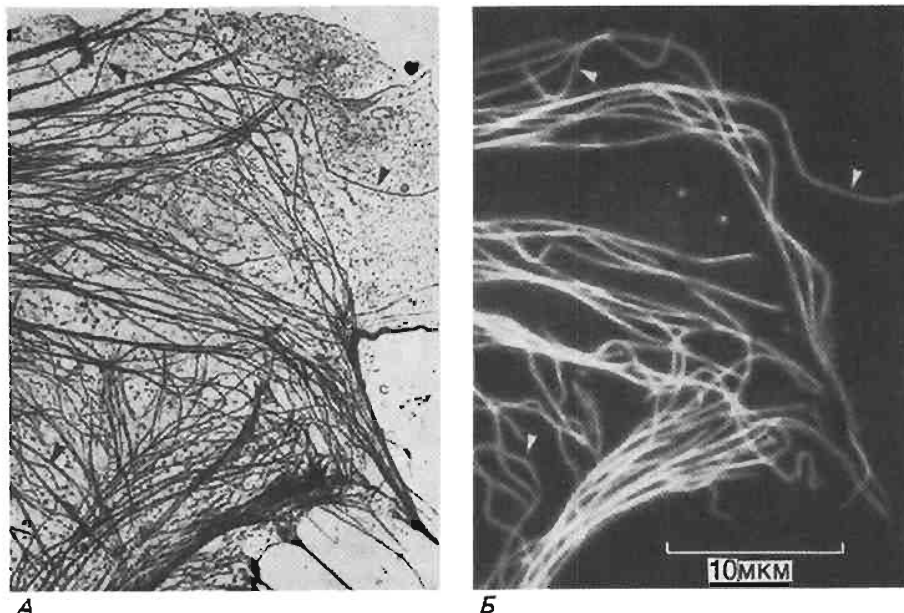


Рис. 4-43. Схематически показано использование антител для определения некоторых молекул в образцах, приготовленных для микроскопии. Данная модификация метода (**непрямая иммуноцитохимия**) особенно чувствительна, поскольку каждое антитело, связывающееся с антигеном, в свою очередь распознается антителами второго порядка. Антитела второго порядка ковалентно связаны с маркерной молекулой, что позволяет наблюдать расположение этой молекулы в микроскоп. В качестве маркера для флюоресцентной микроскопии используется флюоресцеин или родамин, а для электронной микроскопии – ферритин.

Рис. 4-44. А. На электронной микрофотографии периферического участка эпителиальной клетки в культуре можно различить расположение микротрубочек и других филаментов. Б. С помощью метода непрямого иммуноцитохимии тот же участок окрашен флюоресцирующими антителами к тубулину, который является мономером микротрубочек (см. рис. 4-43). Стрелками указаны отдельные микротрубочки, хорошо различимые на обеих микрофотографиях. (Osborn M., Webster R., Weber K. J. Cell Biol., 77, R27–R34, 1978. Воспроизводится с разрешения Rockefeller University Press.)



силь, удалив молекулы нежелательных антител, которые связываются другими молекулами. Например, антисыворотку, полученную к белку X, можно пропустить через аффинную колонку с антигенами Y и Z и удалить таким образом все загрязняющие анти-Y- и анти-Z-антитела. Однако даже в этом случае сыворотка все еще гетерогенна, что ограничивает ее применение.

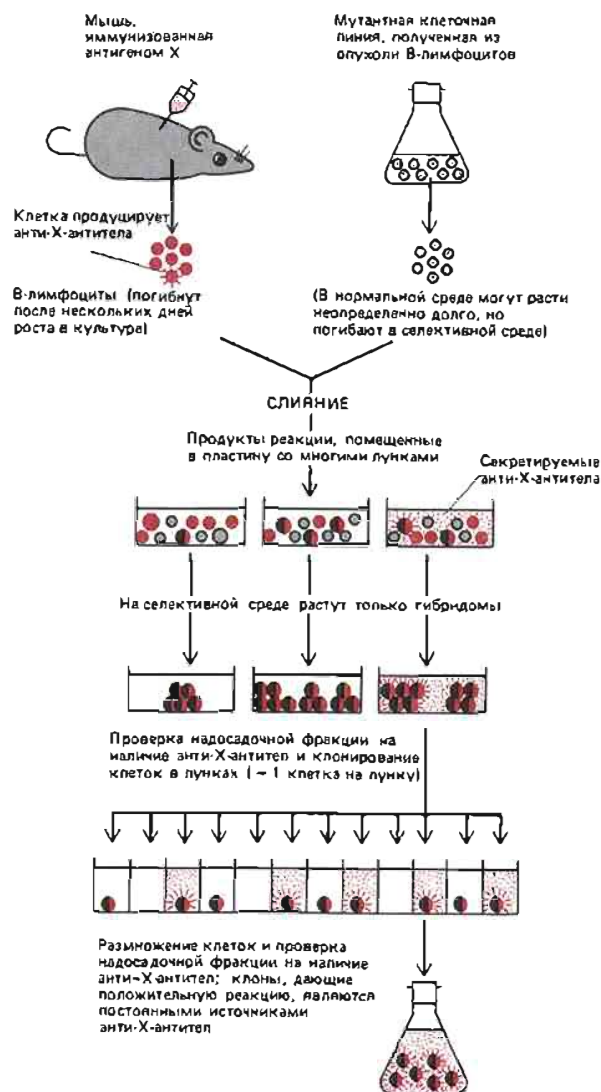
4.4.4. Клеточные линии гибридом служат постоянным источником моноклональных антител [25]

Проблему гетерогенности антисыворотки удалось преодолеть в 1976 г. – после разработки нового метода, который произвел революцию в исследовании внутриклеточных процессов с помощью антител. Этот метод включает клонирование В-лимфоцитов, секретирующих только один определенный вид антител, что обеспечивает получение больших количеств однородных антител. Время жизни В-лимфоцитов в культуре обычно весьма ограничено, и поэтому от иммунизированных мышей получают В-лимфоциты, секретирующие отдельные виды антител, и осуществляют их слияние с клетками, происходящими из «бессмертной» опухоли, полученной из В-лимфоцитов. В результате образуется гетерогенная смесь гибридных клеток, из которых отбирают гибриды, обладающие способностью размножаться в культуре и синтезировать антитела определенного вида. Эти так называемые **гибридомы** клонируют по отдельности и получают клоны, каждый из которых является постоянным источником **моноклональных антител** одного типа (рис. 4-45).

Моноклональные антитела продуцируются В-лимфоцитами одного клона, т.е. клетками, ведущими свое начало от одной-единственной клетки. Поэтому все молекулы антител данного вида обладают одинаковой специфичностью связывания антигенов. Одна такая молекула может опознавать, например, определенную конформацию отдельной группы из 5 или 6 аминокислот в боковой цепи белковой молекулы и такое же количество остатков сахаров в полисахариде. Благодаря своей строгой специфичности моноклональные антитела имеют значительное преимущество по сравнению с обычной антисывороткой, которая, как правило, содержит антитела, опознающие множество различных участков антигенов даже на небольшой макромолекуле.

Основное преимущество метода гибридом определяется возможностью получения моноклональных антител против неочищенных молекул, содержащихся в сложной смеси в качестве минорного компонента. Это преимущество

Рис. 4-45. Схема получения гибридных клеток, или гибридом. секретирующих гомогенные моноклональные антитела против определенного антигена (X). Используемая для роста клеток селективная среда содержит ингибитор (аминоптерин), блокирующий нормальные пути биосинтеза нуклеотидов. Поэтому для синтеза нуклеиновых кислот клеткам приходится использовать обходной путь (шунт) биосинтеза. Но именно этот шунт нарушен у мутантных клеток, используемых для слияния с нормальными В-лимфоцитами. Поскольку ни одна из используемых в опыте клеточных линий в этой среде размножаться не может, в ней выживают только гибридные клетки.



обеспечивается возможностью выбора индивидуальных гибридом, образующих антитела определенного вида, из сложной смеси различных гибридных клеток, продуцирующих множество различных антител. Таким образом, в принципе можно получить моноклональные антитела против любого белка, содержащегося в клетке. Каждый тип антител можно затем использовать в качестве специфического зонда как для локализации белков с помощью цитологических методов, так и для очистки белков. Получив белки в чистом виде, мы можем исследовать их структуру и функцию. К настоящему времени было выделено не более 5% из 10 000 или более различных белков, которые, судя по имеющимся данным, содержатся в типичной клетке млекопитающих. Поэтому трудно представить себе какую-либо область биологии клетки, которую бы не затронула революция, произведенная появлением моноклональных антител.

4.4.5. Антитела и другие макромолекулы можно инъектировать в живые клетки [26]

Антитела широко используются для инактивации связываемых ими молекул. Например, у новорожденных крысят, получивших антитела к белковому фак-

тору, стимулирующему рост нейронов, не развиваются нервные клетки определенного типа. Аналогично этому антитела, вступающие во взаимодействие с молекулами на поверхности некоторых клеток определенных типов, используются для извлечения этих клеток из смешанных клеточных популяций.

Поскольку плазматическая мембрана клетки непроницаема для крупных молекул, белки, расположенные внутри живых клеток, не могут взаимодействовать с антителами, добавляемыми извне. Если такие белки необходимо связать, в цитоплазму клеток эукариот можно ввести антитела и другие макромолекулы, инъецируя их тонкой стеклянной пипеткой через плазматическую мембрану. Прокалываемая при этом плазматическая мембрана обладает способностью «самозалатываться» спустя некоторое время после инъекции. Так, например, если в делящиеся яйца морских ежей инъецировать антитела к миозину, деление яйцеклетки приостанавливается, хотя деление ядер происходит нормально. Это наблюдение показывает, что миозин играет ключевую роль в процессах сокращения, обеспечивающих деление цитоплазмы при митозе, но не принимает, очевидно, участия в работе митотического веретена. Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью; их нетрудно получить в концентрированной форме, и поэтому они особенно удобны для проведения таких исследований.

В настоящее время **микроинъекции** используются значительно шире — для введения в клетки млекопитающих не только антител, но и различных макромолекул и даже органелл; менее чем за час опытный экспериментатор может обработать несколько сот клеток, растущих в культуральных чашках. Наряду с этим специфические макромолекулы можно вводить одновременно в большое количество клеток, используя для этого липидные пузырьки или «тени» (оболочки) эритроцитов. Сперва такие липидные пузырьки или тени эритроцитов заполняют веществом, которое необходимо ввести в клетки, а затем осуществляют слияние пузырьков с плазматической мембраной живых клеток так, чтобы содержимое пузырьков попало в цитоплазму клеток-мишеней. Можно добиться, чтобы инъецируемые таким образом молекулы включались более чем в 50% клеток популяции.

Заключение

В клетке можно пометить любые молекулы. Для этого в них вводят один или несколько радиоактивных атомов. Нестабильные радиоактивные атомы распадаются, испуская излучение, что позволяет проследить судьбу исследуемых молекул. Анализ метаболических путей и изучение методом радиоавтографии локализации в клетке индивидуальных молекул — вот лишь два примера использования радиоактивных изотопов в биологии клетки.

Антитела также являются удобным и чувствительным инструментом для локализации специфических биологических макромолекул. В организме позвоночных животных продуцируются миллионы различных антител, в каждом из которых имеются участки связывания, опознающие специфические группы молекул. Метод гибридом позволяет получать моноклональные антитела с одинаковой специфичностью практически в неограниченных количествах. В принципе можно получать моноклональные антитела против любых макромолекул клетки и затем использовать эти антитела для локализации и очистки определенных молекул, а в некоторых случаях и для анализа внутриклеточной функции этих молекул.

4.5. Технология рекомбинантных ДНК [27]

Еще не так давно, всего лишь в начале 70-х годов, биохимики считали, что ДНК — наиболее сложный для исследования компонент клетки. Чрезвычайно длинную и химически монотонную последовательность нуклеотидов в на-

следственном материале тогда можно было исследовать лишь с помощью косвенных методов – либо определяя первичную структуру белка или РНК, либо с помощью генетического анализа. В настоящее время эта ситуация крайне изменилась. Если раньше анализ ДНК представлялся исследователю структуры биологических макромолекул наиболее трудной задачей, то теперь, когда были разработаны новые методы анализа первичной структуры ДНК, такой анализ не составляет особого труда. В настоящее время можно вырезать отдельные участки ДНК, получать их практически в неограниченном количестве и определять последовательность нуклеотидов по несколько сот нуклеотидов в день.

Новая технология рекомбинантных ДНК обеспечивает разработку современных многообещающих подходов для изучения сложных механизмов, участвующих в регуляции выражения генов у эукариот. Эта новая технология значительно превосходит традиционные методы, используемые для определения аминокислотной последовательности белков. Усовершенствование технологии рекомбинантных ДНК может принести значительный экономический эффект в условиях крупномасштабного производства белковых гормонов и вакцин, для получения которых в настоящее время затрачиваются значительные усилия и средства.

Технология рекомбинантных ДНК включает в себя набор методов – как новых, так и заимствованных из других дисциплин, например генетики микроорганизмов (табл. 4-12). К наиболее важным из этих методов относятся:

- 1) специфическое расщепление ДНК *рестриктурирующими нуклеазами*;
- 2) *гибридизация нуклеиновых кислот*, которая в силу способности нуклеиновых кислот связываться во взаимно комплементарных участках позволяет определять с высокой точностью специфические последовательности ДНК и РНК;
- 3) *клонирование ДНК*, используемое для введения специфических фрагментов ДНК в быстро реплицирующиеся генетические элементы (плазмиды или вирусы). Клонирование дает возможность размножить такие фрагменты в бактериях или дрожжах;
- 4) *определение нуклеотидной последовательности* в клонируемом фрагменте ДНК.

Таблица 4-12. Основные вехи в развитии технологии рекомбинантных ДНК

1869	Мишер (Miescher) впервые выделил ДНК
1944	Эвери (Avery) установил, что ДНК, а не белок переносит генетическую информацию при трансформации бактерий
1953	Уотсон и Крик (Watson, Crick) предложили модель двойной спирали ДНК, основанную на результатах рентгеноструктурного анализа, проведенного Франклином и Уилкинсоном (Franklin, Wilkins)
1961	Мармур и Доти (Marburg, Doty) открыли явление ренатурации ДНК, установив специфичность и точность реакций гибридизации нуклеиновых кислот
1962	Арбер (Arber) впервые получил данные о существовании ферментов рестрикции ДНК, впоследствии выделенных и использованных для определения последовательности ДНК Натансом и Х. Смитом (Nathans, H. Smith)
1966	Ниренберг, Очоа и Корана (Nirenberg, Ochoa, Khorana) расшифровали генетический код
1967	Геллерт (Gellert) открыл ДНК-лигазу – фермент, используемый для сшивания фрагментов ДНК
1972–1973	Была разработана технология клонирования ДНК – в лабораториях Бойера, Козна и Берга (Boyer, Cohen, Berg) и их коллег в Станфордском университете и в Калифорнийском университете в Сан-Франциско
1975–1977	Сэнгер и Баррелл (Sanger, Barrell), а также Максам и Гилберт (Maxam, Gilbert) разработали методы быстрого определения нуклеотидной последовательности ДНК

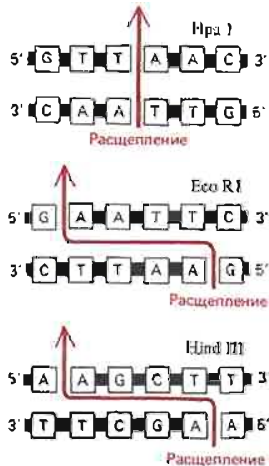
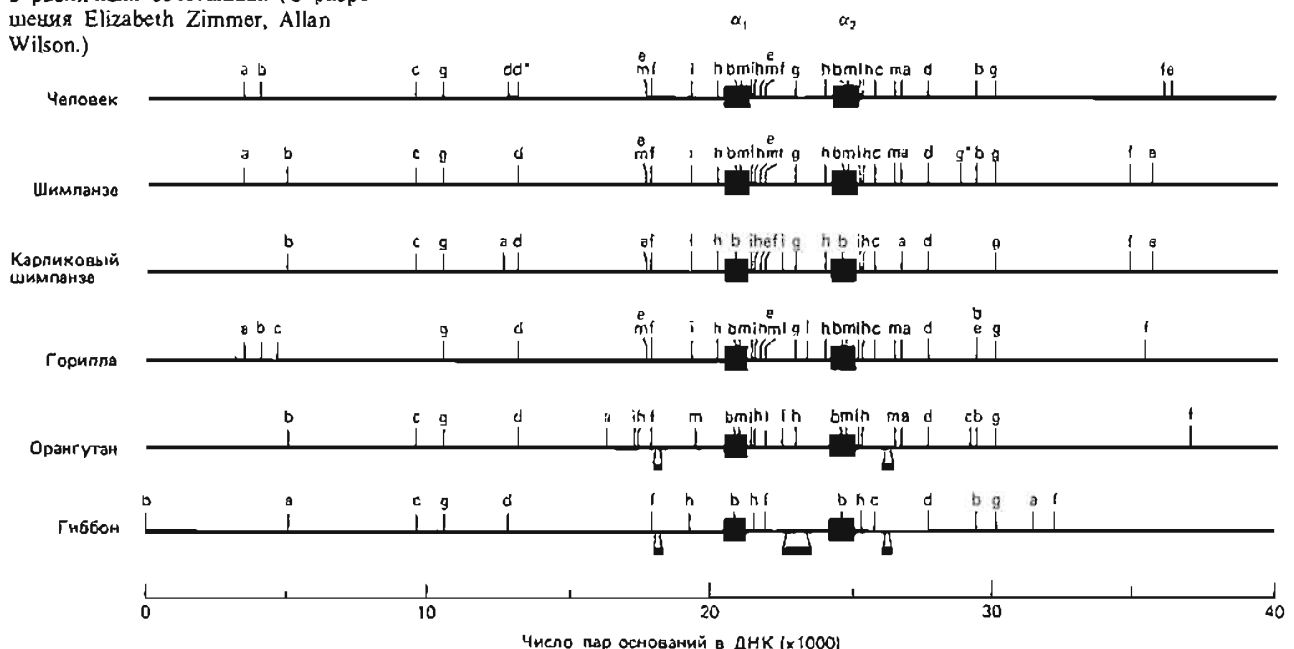


Рис. 4-46. Последовательности нуклеотидов в ДНК, узнаваемые тремя широко используемыми рестриктирующими нуклеазами (участки узнавания). Такие последовательности, как и в рассматриваемом примере, часто содержат шесть нуклеотидов и являются «палиндромными», т.е. последовательности нуклеотидов в них в обоих направлениях читаются одинаково. Две цепи ДНК разрезаются в участке узнавания или вблизи от него, причем две цепи во многих случаях разрезаются не прямо против друг друга, а наискосок, образуя в результате липкие концы, например для Eco RI и Hind III. Рестриктирующие нуклеазы получают из различных бактерий: HPA I – из *Haemophilus parainfluenzae*, Eco RI – из *Escherichia coli* и Hind III – из *Haemophilus influenzae*.

Рис. 4-47. Рестрикционные карты ДНК в кластере генов, кодирующих гемоглобин у человека и различных приматов. Два окрашенных квадрата в каждой карте показывают расположение участков ДНК, соответствующих генам α -глобина. Каждая буква указывает участок, расщепляемый различными рестриктирующими нуклеазами. Положение каждого разреза определяли, сравнивая размеры фрагментов ДНК, образующихся при обработке ДНК различными рестриктирующими нуклеазами в отдельности и в различных сочетаниях. (С разрешения Elizabeth Zimmer, Allan Wilson.)



4.5.1. Рестриктирующие нуклеазы расщепляют ДНК в специфических участках нуклеотидных последовательностей [28]

Для защиты от молекул чужеродных ДНК, способных проникнуть в бактериальную клетку и вызвать ее трансформацию, многие бактерии вырабатывают ферменты – так называемые **рестриктирующие нуклеазы**, способные разрушить чужеродную ДНК. Каждый такой фермент опознает в ДНК специфическую последовательность из 4–6 нуклеотидов. Соответствующие последовательности в геноме самих бактерий замаскированы метилированием остатков А и С, но любая чужеродная молекула ДНК, попав в клетку, немедленно опознается нуклеазой, и обе цепи ее ДНК разрезаются (рис. 4-46). Из различных видов бактерий было выделено множество рестриктирующих нуклеаз. В настоящее время различными фирмами производится более ста таких ферментов, большинство из которых опознают различные последовательности нуклеотидов.

Индивидуальная рестриктирующая нуклеаза способна разрезать двойную спираль ДНК любой длины с образованием серии фрагментов, называемых **рестриктонными фрагментами**. Сравнение размеров фрагментов ДНК, полу-

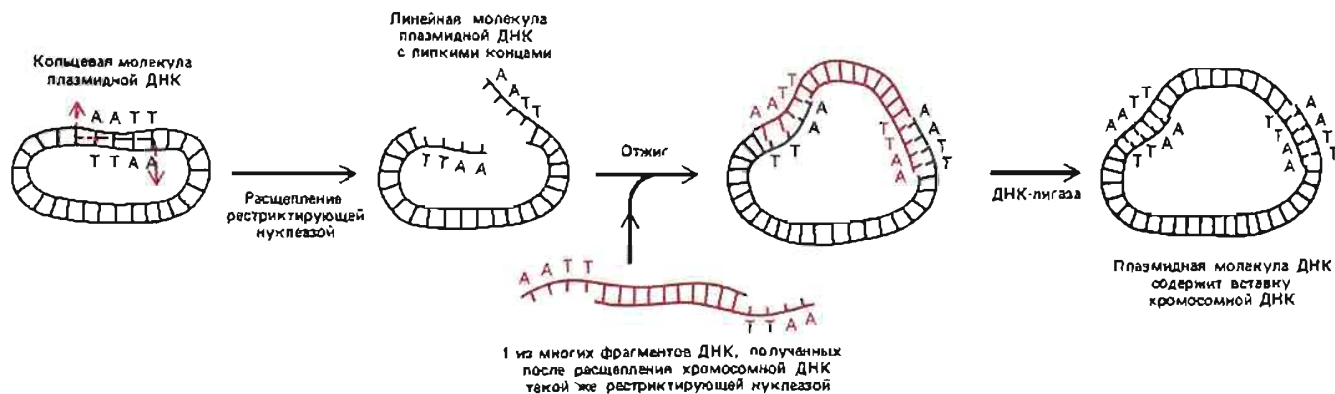


Рис. 4-48. Образование липких концов под действием различных рестриктирующих нуклеаз (см. рис. 4-46), приводящее к соединению двух фрагментов ДНК в результате спаривания комплементарных нуклеотидов. Соединенные таким образом фрагменты ДНК могут затем связываться ковалентными связями под действием ДНК-лигазы. Образующаяся в результате гибридная молекула плазмидной ДНК содержит фрагмент (вставку) хромосомной ДНК.

ченных после обработки некоторого участка генома набором различных рестриктирующих нуклеаз, позволяет построить **рестрикционную карту**, в которой показана локализация каждого разреза (рестрикции) участка относительно соседних участков рестрикции. Поскольку рестрикционные карты отражают расположение определенных последовательностей нуклеотидов в данной области генома, сравнение таких карт для двух или более родственных генов позволяет приблизительно оценить гомологию между ними. Например, рестрикционные карты, а следовательно, и предполагаемые нуклеотидные последовательности тех участков хромосом, в которых закодированы цепи гемоглобина у человека, орангутана и шимпанзе, в основном совпадают. Поэтому можно предположить, что последовательности нуклеотидов в этих участках сохранились в неизменном виде в течение последних 5–10 млн. лет – с тех пор, как эти виды дивергировали (рис. 4-47).

Многие рестриктирующие нуклеазы вносят разрывы в две цепи ДНК со смещением на несколько нуклеотидов, так что на концах обоих фрагментов образуются короткие одноцепочечные участки. Эти одноцепочечные концевые участки обладают способностью образовывать комплементарные пары оснований с любым другим одноцепочечным концевым участком, полученным с помощью того же фермента, и поэтому их называют **липкими концами**. Если концевую молекулу ДНК разрезать в одном месте рестриктирующей нуклеазой такого типа, то молекула будет стремиться вновь образовать кольцо в результате спаривания липких концов. Образующиеся рестриктирующими нуклеазами липкие концы играют важную роль в технологии рекомбинантных ДНК, поскольку при помощи липких концов можно соединить два любых фрагмента ДНК, при условии что эти фрагменты были получены с помощью одной и той же рестриктирующей нуклеазы и, следовательно, имеют комплементарные липкие концы. После того как два липких конца соединились между собой путем образования комплементарных пар оснований, их можно «закрепить» ковалентными фосфодиэфирными связями, образующимися между противоположными концами каждой цепи ДНК под действием фермента **ДНК-лигазы** (рис. 4-48). Таким путем фрагменты любой ДНК можно ввести в состав самореплицирующихся элементов – для этого необходимы рестриктирующие нуклеазы и ДНК-лигаза.

4.5.2. Методом клонирования можно получать большие количества нужных последовательностей ДНК [29]

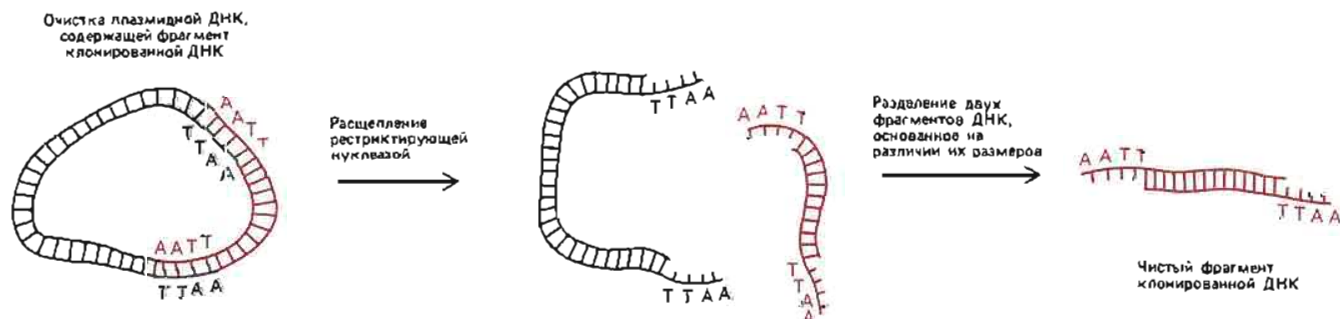
Клонирование ДНК – это метод, с помощью которого фрагменты ДНК любого происхождения можно ввести в *плазмиду* или *вирус бактерий (бактериофаг)* и затем размножить эти генетические элементы в клетках бактерий или дрожжей, увеличивая таким образом их количество более чем в миллион раз. Плазмиды – это небольшие кольцевые молекулы двуцепочечной ДНК, которые в естественных условиях встречаются в клетках бактерий или дрожжей,

Множество плазмид, каждая из которых содержит различные вставки ДНК; одна из них представляет интерес для исследователя



Рис. 4-49. Очистка и размножение специфических последовательностей ДНК с помощью клонирования ДНК в бактериях. Аналогичным путем осуществляется клонирование фрагментов ДНК в дрожжевых клетках.

Рис. 4-50. Выделение клонированного фрагмента ДНК из плазмиды, содержащей молекулу рекомбинантной ДНК. Фрагмент вырезают из плазмиды с помощью той же рестриктирующей нуклеазы, которая была использована при получении фрагментов ДНК для клонирования.



где они реплицируются в процессе пролиферации клеток-хозяев как независимые единицы. Хотя на долю плазмид обычно приходится лишь небольшая часть клеточной ДНК, именно плазмиды зачастую несут жизненно важные для клетки гены, например гены устойчивости к антибиотикам. Присутствие таких генов, а также относительно небольшие размеры плазмид делают их весьма удобными для использования в технологии рекомбинантных ДНК.

Плазмидная ДНК значительно меньше по размерам, чем ДНК клеток-хозяев, и поэтому ее можно сравнительно легко выделить и очистить. При использовании плазмид в качестве векторов клонирования очищенные молекулы плазмидной ДНК разрезают в одной точке рестриктирующей нуклеазой и затем подвергают отжигу с фрагментом ДНК, который необходимо клонировать. Образующиеся в результате гибридные молекулы ДНК вводят в бактериальные клетки, обработанные специальным образом – так, чтобы они на короткое время стали проницаемы для макромолекул. Плазмиды проникают только в некоторые из обработанных клеток. Эти клетки легко выделить, поскольку только они могут расти в присутствии антибиотиков, так как вместе с плазмидой получили соответствующий ген устойчивости. При делении таких бактерий плазмиды также реплицируются, образуя огромное количество копий исходного фрагмента ДНК (рис. 4-49). В конце периода пролиферации из клеток выделяют гибридные молекулы плазмидной ДНК и, обрабатывая их повторно той же рестриктирующей нуклеазой, вырезают копии исходных фрагментов ДНК (рис. 4-50).

Часто ДНК для клонирования получают путем расщепления всего генома клетки специфической рестриктирующей нуклеазой. При этом образуется огромное число фрагментов ДНК (из генома млекопитающих, например, $10^5 - 10^7$ фрагментов). Далее путем клонирования можно получить миллионы различных колоний бактериальных или дрожжевых клеток, каждая из которых содержит плазмиду с включенными в нее различными фрагментами геномной ДНК. Затем необходимо отобрать те немногие колонии, плазмиды которых содержат интересующий исследователя фрагмент ДНК. Путем размножения этих колоний можно получить большую популяцию нужных клеток, или клон. Отбор нужной колонии часто представляет собой наиболее трудную часть процедуры клонирования. Колонии, содержащие специфический фрагмент клонированной ДНК, идентифицируют с помощью радиоактивных нуклеиновых кислот-зондов, комплементарных клонированной ДНК. Ниже мы рассмотрим, каким путем обычно получают такие зонды.

4.5.3. Копии специфических молекул мРНК можно клонировать [30, 31]

В предыдущем разделе мы обсудили метод клонирования, который иногда называют методом «дробовика» (shotgun). При использовании этого метода весь геном разрезают на большое множество фрагментов, расположенных по отношению к генам случайным образом. В результате некоторые из фрагментов будут содержать отдельные участки генов, а многие фрагменты – только ДНК из некодирующих участков генома, т.е. совсем не будут содержать генов. Известен еще один более целенаправленный подход, когда процесс кло-

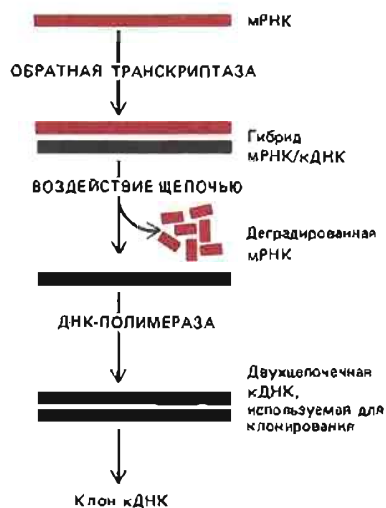


Рис. 4-51. С помощью фермента обратной транскриптазы была получена ДНК-копия молекулы мРНК (кДНК). Этот вирусный фермент использует цепь РНК в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи ДНК, образуя в результате гибридную спираль ДНК/РНК. Обработка гибрида ДНК/РНК щелочами приводит к избирательной деградации цепи РНК до нуклеотидов. Оставшаяся одиночная кДНК копируется затем с помощью фермента ДНК-полимеразы с образованием двухцепочечной кДНК.

нирования начинают с выбора только тех последовательностей ДНК, которые транскрибируются в РНК. Для этого из клеток экстрагируют мРНК (или очищенную субфракцию мРНК) и на этих молекулах с помощью *обратной транскриптазы*, катализирующей синтез комплементарной цепи ДНК на РНК-матрице, синтезируют *ДНК-копии* (называемые *кДНК*). Одноцепочечные молекулы кДНК можно превратить в двухцепочечные с помощью фермента *ДНК-полимеразы*, а затем ввести в плазмиды и клонировать (рис. 4-51).

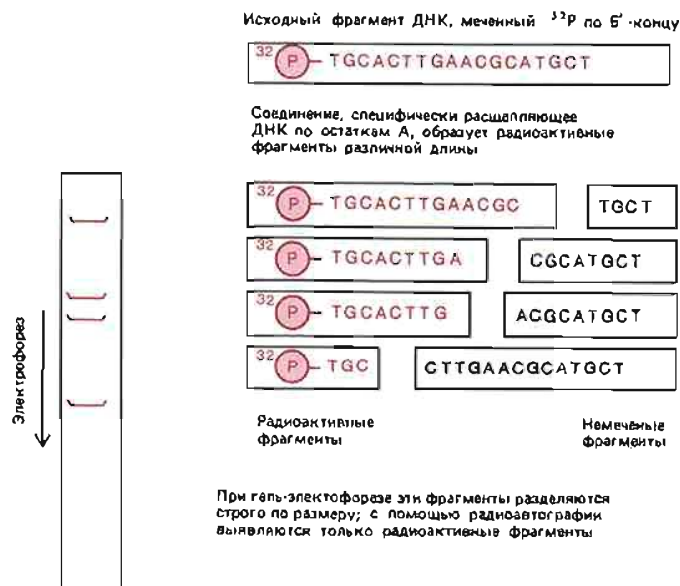
Плазмиды можно сконструировать таким образом, что клонированная ДНК будет направлять синтез в клетке большого количества того конкретного белка, который закодирован в кДНК. Используя такую «генную инженерию», можно добиться, чтобы бактерии или дрожжи синтезировали в большом количестве нужные нам белки, например инсулин человека, гормон роста или интерферон.

Если же клоны были получены методом «дробовика», для идентификации тех редких клонов, которые содержат гены, можно использовать кДНК. В этом случае, используя радиоактивные предшественники нуклеотидов, получают одноцепочечную кДНК. Такую меченую кДНК гибридизуют с комплементарным геномным клоном, как описано ниже. Поскольку кДНК получают на мРНК, кДНК соответствует такой ДНК генома, которая кодирует белок. Гибридизация кДНК с ДНК клона свидетельствует о наличии в ДНК клона участка гена, кодирующего молекулу данной мРНК.

4.5.4. Последовательность клонированных фрагментов ДНК можно легко определить [32]

Сравнительно недавно были разработаны методы, позволяющие довольно быстро и легко определять последовательность клонированных фрагментов ДНК. Принцип, лежащий в основе одного из таких методов, проиллюстрирован на рис. 4-52 и 4-53. При помощи этой новой технологии уже определена полная последовательность ДНК более чем 100 генов млекопитающих – в том числе генов инсулина, гемоглобина, цитохрома с и интерферона. В настоящее время наиболее легкий и точный метод определения аминокислотной последовательности какого-либо белка сводится к тому, что определяют нуклео-

Рис. 4-52. Получение семейства фрагментов ДНК путем статистического расщепления цепи ДНК по определенному нуклеотиду. Каждый акт расщепления проводится посредством мягкой химической обработки, в результате которой происходит удаление из цепи только одного нуклеотида, тогда как большинство других таких нуклеотидов остается в цепи. Радиоактивными являются только фрагменты, несущие на 5'-конце ^{32}P -фосфатную группу.



При гель-электрофорезе эти фрагменты разделяются строго по размеру; с помощью радиоавтографии выявляются только радиоактивные фрагменты

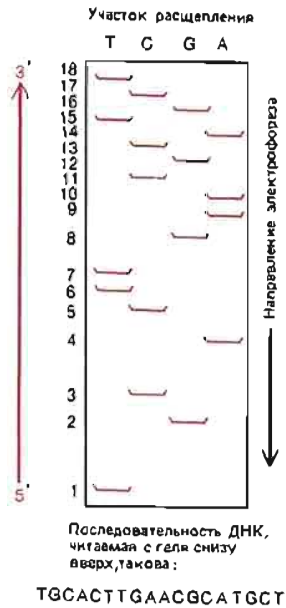


Рис. 4-53. Схематическая иллюстрация одного из методов определения нуклеотидной последовательности ДНК. Методика, описанная на рис. 4-52, используется для одновременной обработки четырех образцов одной и той же ДНК с помощью агентов, которые в первом образце расщепляют ДНК специфически по Т, во втором – по С, в третьем – по G и в четвертом – по А. Полученные фрагменты разгоняют на параллельных дорожках одного геля и получают картину, анализ которой позволяет определить последовательность ДНК. Так, 1-я снизу полоса соответствует нуклеотиду, расположенному на 5'-конце. При этом определяют, на какой из дорожек расположена полоса – в данном случае это Т. Для определения полной последовательности эту же процедуру повторяют на уровне 2-й, затем 3-й полосы и т.д. В данном случае метод идеализирован; на самом деле химическая обработка менее специфична, чем это здесь указано.

тидную последовательность его гена и затем, используя генетический код в качестве словаря, устанавливают последовательность данного белка.

Хотя считывание любой ДНК может в принципе происходить с шестью различными рамками считывания (по три в каждой цепи), истинную рамку считывания узнают по следующему признаку: обычно это единственная рамка считывания, в которой стоп-кодона встречаются редко (разд. 3.2.7). Объем информации, заложенной в последовательности ДНК ($> 10^6$ нуклеотидов), настолько велик, что для ее хранения и анализа потребовались бы компьютеры.

4.5.5. Реакция гибридизации нуклеиновых кислот – чувствительный метод выявления специфических последовательностей нуклеотидов [33]

Если водный раствор ДНК нагреть до 100°C или сильно защелочить ($\text{pH} > 13$), то комплементарные пары оснований, удерживающие вместе две цепи двойной спирали, разрушатся и ДНК быстро диссоциирует на две отдельные цепи. Этот процесс, называемый *денатурацией ДНК*, ранее считался необратимым. Однако в 1961 г. было обнаружено, что, если комплементарные цепи ДНК выдерживать в течение длительного времени при температуре 65°C , они легко спариваются, восстанавливая структуру двойной спирали (процесс, получивший название *ренатурация* или *гибридизация*). Подобные процессы гибридизации могут происходить между двумя любыми одинарными цепями нуклеиновых кислот (ДНК : ДНК, РНК : РНК, ДНК : РНК), при условии что они имеют комплементарные последовательности нуклеотидов.

Скорость образования двойной спирали лимитируется вероятностью столкновения двух комплементарных последовательностей нуклеиновых кислот. Поэтому концентрацию молекул ДНК с определенной последовательностью нуклеотидов можно определить по той скорости, с которой препараты этой ДНК гибридизуются с радиоактивно меченной клонированной ДНК-зондом с комплементарной последовательностью нуклеотидов. Точность этого теста настолько велика, что с его помощью можно выявить комплементарные зонду последовательности даже в тех случаях, когда концентрация этих последовательностей составляет всего лишь одну молекулу на клетку (рис. 4-54). С помощью таких измерений можно определить, сколько

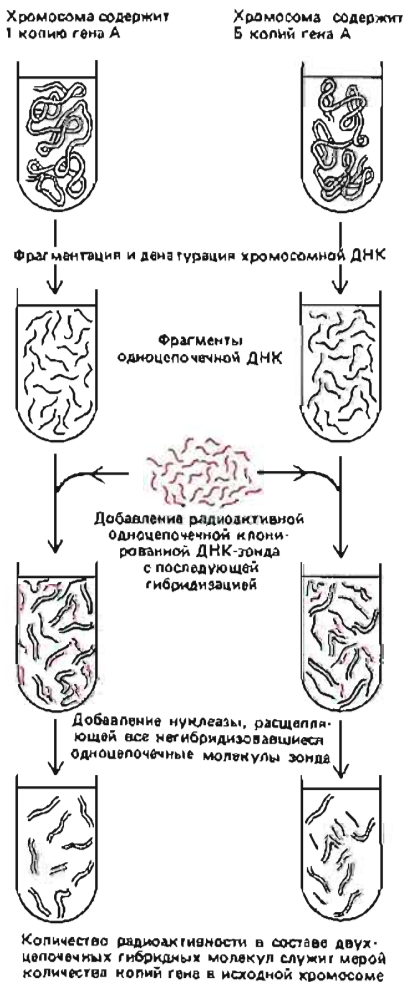


Рис. 4-54. Измерение количества копий специфического гена в образце ДНК с помощью гибридизации ДНК. Одноцепочечный радиоактивный фрагмент ДНК, используемый в таких экспериментах, называют *ДНК-зондом*: хромосомная ДНК в данном случае не содержит радиоактивных атомов.

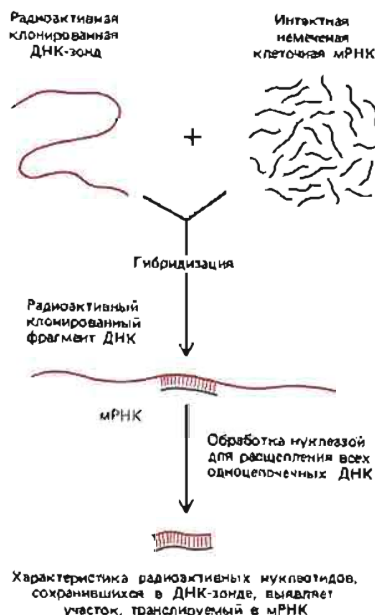


Рис. 4-56. После расщепления образца ДНК рестриктирующей нуклеазой и электрофоретического разделения множества полученных фрагментов ДНК переносят с помощью «блоттинга» на нитроцеллюлозный фильтр и затем гибридизуют с радиоактивной ДНК-зондом в течение длительного времени в условиях отжига. Затем фильтр тщательно промывают, чтобы радиоактивно меченными остались только те фрагменты, которые гибридизуются с ДНК-зондом. На радиоавтографе, полученном с листа нитроцеллюлозы, эти фрагменты выявляются в виде полос.

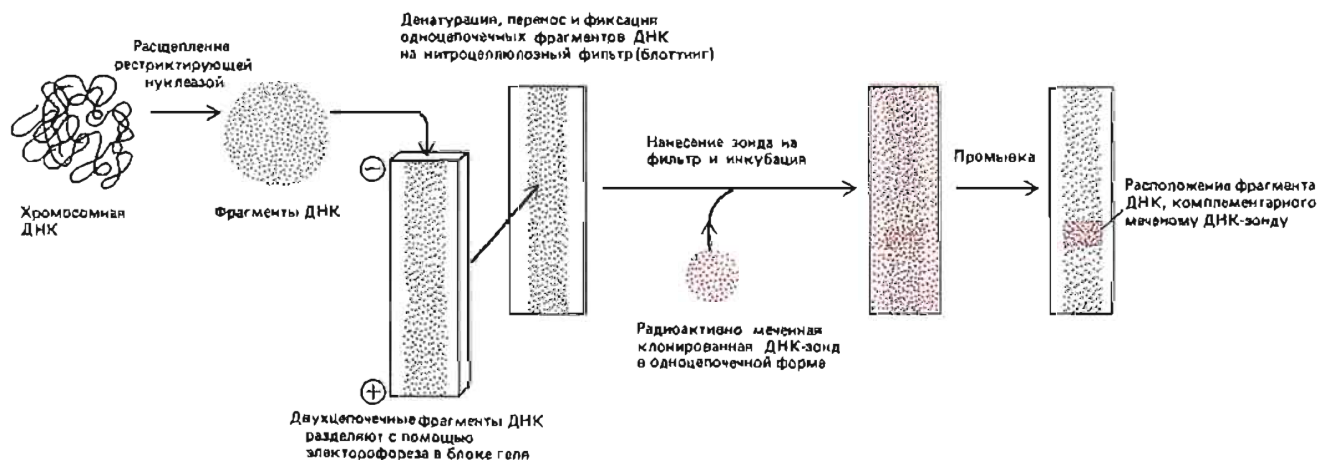
Рис. 4-55. Использование гибридизации нуклеиновых кислот для определения участка клонированного фрагмента ДНК, который транскрибируется в мРНК. С помощью этого метода было открыто существование в генах эукариот вставочных (некодирующих) последовательностей (интронов).

в клеточной ДНК содержится копий, комплементарных клонированной ДНК-зонду. Таким путем было показано, что большая часть последовательностей представлена одной или несколькими копиями в расчете на гаплоидный геном, тогда как некоторые другие – сотнями или тысячами копий. Это так называемые *повторяющиеся последовательности ДНК*, или *ДНК-повторы*.

Кроме того, используя в опытах по гибридизации в качестве зонда РНК, выделенную из клеток, определяют, транскрибируется ли некая последовательность ДНК в РНК. Если да, то сколько копий такой РНК образуется в расчете на одну клетку и в каких тканях и клетках происходит этот синтез. Пользуясь более тонкими модификациями этого метода, можно точно идентифицировать участок ДНК-зонда, гибридизующийся с молекулами клеточных РНК, и определить таким образом точки начала и конца транскрипции (рис. 4-55). Таким путем можно также определить участки, вырезаемые из РНК-транскрипта в ходе *процессинга РНК* (интроны).

Радиоактивные клонированные ДНК-зонды широко используются для локализации специфических последовательностей нуклеиновых кислот при фракционировании методом гель-электрофореза смеси рестрикционных фрагментов ДНК. Для этого используют «блоттинг» [от англ. blot – промакать (фильтровальная бумага)]: все фракционированные фрагменты ДНК переносят на лист нитроцеллюлозной бумаги путем диффузии или электрофореза и таким образом получают реплику (отпечаток) геля.

Затем методом радиоавтографии определяют положение фрагментов, гибридизующихся с радиоактивной ДНК-зондом (рис. 4-56). Аналогичным путем на нитроцеллюлозном фильтре могут быть получены отпечатки бактериальных колоний, растущих на поверхности агара. Используя такую нитроцеллюлозную реплику бактериальных колоний для гибридизации со специфическим радиоактивным зондом, идентифицируют немногие клетки, содержащие плазмиду с клонированным специфическим фрагментом ДНК.



4.5.6. Для локализации специфических последовательностей нуклеиновых кислот в хромосомах и клетках используют методы гибридизации *in situ* [34]

Все макромолекулы клетки, и в том числе нуклеиновые кислоты, занимают в тканях и клетках строго определенные положения. Экстрагирование этих молекул из тканей или клеток путем гомогенизации приводит к потере той части информации, которая касается расположения нуклеиновых кислот в клетках. Поэтому были разработаны методы для локализации специфических последовательностей нуклеиновых кислот *in situ* — в изолированных хромосомах в определенных типах клеток, где ДНК- и РНК-зонды используются примерно так же, как меченые антитела. При гибридизации *in situ* раздавленные фиксированные хромосомы подвергают кратковременному воздействию раствора с очень высоким значением pH для разделения комплементарных пар, а затем гибридизуют с используемыми в качестве зонда мечеными нуклеиновыми кислотами с высокой удельной радиоактивностью. Тщательно промыв препарат, методом радиоавтографии выявляют участки хромосом, связывающие радиоактивные зонды (рис. 4-57). Недавно пространственное разрешение этого метода стало значительно выше в результате разработки специальных методов мечения зондов (нуклеиновых кислот) флюоресцирующими красителями.

Аналогичные методы гибридизации *in situ* нашли широкое применение для выявления определенных растущих РНК-транскриптов на гигантских хромосомах типа ламповых щеток. В этом случае хромосомы не подвергают воздействию высоких значений pH, и поэтому хромосомная ДНК в образце сохраняет двухцепочечную структуру и не гибридизуется с зондом. Сходные методы используются для исследования срезов фиксированных тканей, если необходимо определить, какие из клеток сложных тканей содержат молекулы цитоплазматической РНК, комплементарные определенной ДНК-зонду.

4.5.7. С помощью методов рекомбинантных ДНК можно изучать даже минорные белки клетки [31, 35]

До недавнего времени исследование клеточных белков было ограничено мажорными фракциями, т. е. белками, содержащимися в клетках в относительно большом числе. С помощью обычных методов хроматографии и электрофореза из нескольких сот граммов клеток можно получить в чистом виде примерно 0,1 г (100 мг) одного из мажорных белков, составляющих 1% или более от общего количества клеточных белков. Этого количества белка вполне достаточно для изучения его аминокислотной последовательности по стандартному методу для детального анализа биологической или ферментативной (если таковая имеется) активности и получения антител, которые могут быть использованы для локализации белков в клетке. Более того, когда удастся вырастить подходящие кристаллы, то с помощью рентгеноструктурного ана-

Рис. 4-57. Локализация гена дрозофилы с помощью гибридизации *in situ* радиоактивной клонированной ДНК-зонда с полными хромосомами дрозофилы. Скопление потемневших зерен серебра, выявленных на этом радиоавтографе, локализовано на хромосомной карте в положении 27C, как показано на рисунке. Изображены участки двух из четырех гигантских хромосом, содержащихся в каждой клетке слонных желез личинки. (С разрешения Steven Henikoff.)

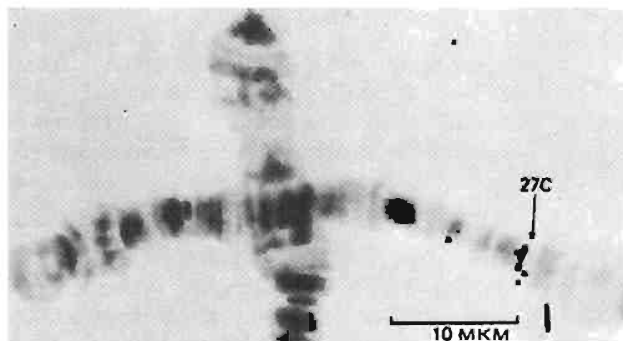


Таблица 4-13. Этапы выделения больших количеств минорного белка с использованием технологии рекомбинантных ДНК

1. Фракционирование клеточного экстракта с помощью нескольких распространенных методов хроматографии, проводимое до тех пор, пока исследуемый белок не будет обогащен настолько, чтобы после гель-электрофореза высокого разрешения можно было выделить из геля 1 мкг очищенного белка
2. Анализ денатурированного белка на микросеквенаторе для определения последовательности первых 30 аминокислотных остатков на аминоконце полипептида
3. Использование генетического кода для предсказания последовательности нуклеотидов в мРНК, соответствующей вышеупомянутой последовательности аминокислот. Используя скоростные химические методы, можно синтезировать набор коротких фрагментов ДНК из 15–20 нуклеотидов, один из которых сможет образовывать комплементарные пары оснований с частью мРНК-последовательности. (Здесь существует некоторая неоднозначность, поскольку несколько различных кодонов детерминируют одну и ту же аминокислоту – разд. 3.2.7.)
4. Гибридизация этих коротких фрагментов ДНК с общей клеточной мРНК и затем обратная транскрипция на молекулах гибридируемой мРНК. Обратная транскриптаза копирует эти комплементарные молекулы мРНК с образованием длинных молекул кДНК (рис. 4-51)
5. Получение методом клонирования значительных количеств ДНК, содержащей последовательности каждой из этих молекул кДНК (рис. 4-49, 4-50)
6. Гибридизация ДНК, полученной из каждого клона кДНК, с общей клеточной мРНК и последующее выделение и очистка молекул мРНК, комплементарных последовательности каждой клонированной кДНК
7. Трансляция каждой из полученных мРНК в бесклеточной системе для выявления мРНК, кодирующей исследуемый белок
8. Определение нуклеотидной последовательности соответствующей кДНК (рис. 4-53) с последующим использованием генетического кода для установления полной последовательности аминокислот в исследуемом белке, а также определение начала и конца последовательности, кодирующей белок
9. Включение клонированной последовательности кДНК в специально созданную плазмидную ДНК-вектор, содержащую сигналы начала транскрипции и трансляции. Использование клеток бактерий или дрожжей, несущих этот новый плазмидный клон, в качестве исходного материала для выделения значительного количества (100 мг и более) очищенного белка

лиза можно исследовать трехмерную структуру белка. Таким путем была определена структура и функция многих распространенных белков, в том числе гемоглобина, трипсина, иммуноглобина и лизоцима.

Эукариотическая клетка содержит тысячи различных белков, но большинство этих белков, и в том числе наиболее интересные, представлены в очень небольшом количестве. Большинство этих белков чрезвычайно трудно, если не невозможно, получить в чистом виде в количестве, превышающем несколько микрограммов. Однако в настоящее время применение технологии рекомбинантных ДНК позволяет в принципе исследовать структуры и функции практически всех белков, в том числе минорных, что ранее было возможно только в отношении немногих избранных белков. В табл. 4-13 приведены основные этапы в исследовании минорных белков.

4.5.8. Мутантные гены можно исправить уже сейчас [36]

Предположим, что некто выделил из клеточного экстракта новый белок и клонировал ген, пользуясь методом «дробовика», который был описан выше. Как установить внутриклеточную функцию этого белка? Тут мы сталкиваемся с крайне трудной проблемой, так как ни трехмерная структура белка,

ни полная последовательность нуклеотидов гена этого белка не позволяют выявить его функцию. Кроме того, многие белки, такие, как структурные белки или белки сложных мультиферментных комплексов, будучи отделены от других компонентов сложной функциональной единицы, в состав которой они входят, не проявляют своей обычной активности.

Один из подходов, который мы уже рассматривали, состоит в том, чтобы инактивировать определенный белок с помощью специфических антител. В сочетании с методом микроинъекций такой подход позволяет исследовать функцию белка с довольно высокой чувствительностью. Однако даже после инъекции антител в цитоплазму некоторые антигенные участки белков остаются недоступными для антител. Более того, многие антитела связываются белковыми молекулами, но не инактивируют их.

Интересное решение этой проблемы можно получить с помощью генетических подходов. Некоторые мутанты, у которых нарушен синтез одного из белков или происходит синтез температурочувствительной формы фермента, инактивируемого при небольшом повышении (или уменьшении) температуры среды, могут дать ключ к выяснению функции дефектной молекулы. Этот метод оказался чрезвычайно перспективным, например, для выявления основных метаболических путей у бактерий, но его применение ограничено организмами с коротким циклом размножения (бактерии, дрожжи, круглые черви, плодовые мушки), среди которых можно быстро выделить большое число мутантов, а затем отбирать среди них интересующий нас дефект.

В принципе генетический подход теперь может быть использован значительно шире (на большом числе объектов) путем создания специфических мутаций вне клеток. С помощью разработанных недавно методов, используя биохимический подход, можно слегка изменить копию изолированного клонированного гена и затем поместить ген снова в клетку, которая начнет теперь синтезировать измененный белок. В бактериальных и дрожжевых клетках этот мутантный ген будет достаточно часто рекомбинировать с нормальным геном, и в конце концов мы сможем отобрать клетки, в которых мутантный ген заменил единственную копию нормального гена. В результате появятся клетки, содержащие специфический белок в мутантной форме, и, следовательно, появится возможность определить фенотип клетки, у которой отсутствует нормальный ген. Пока нет методов, позволяющих вводить клонированный мутантный ген в клетки млекопитающих с целью замены нормального гена. Однако, имея в виду темпы развития технологии рекомбинантных ДНК, мы не слишком удивимся, если это станет возможным в самое ближайшее время.

Заключение

Технология рекомбинантных ДНК произвела переворот в исследовании клетки. В настоящее время, используя рестриктирующие нуклеазы, можно вырезать любой участок ДНК клетки, клонировать и получить этот генетический материал практически в неограниченном количестве, а затем определить его последовательность со скоростью по несколько сот нуклеотидов в день. Таким путем уже определена последовательность многих генов и некодирующих участков генома эукариот.

Используя методы гибридизации нуклеиновых кислот, можно определить, выделить и транскрибировать в бесклеточной системе молекулы мРНК, соответствующие клонированным молекулам ДНК. Более того, можно пойти в обратном направлении — от белка к гену, кодирующему данный белок: определив аминокислотную последовательность коротких фрагментов белка, можно синтезировать специфические ДНК-зонды, гибридизующиеся с соответствующей мРНК и с ДНК, кодирующей белок.

Возможности технологии рекомбинантных ДНК в прикладных областях простираются далеко. Могут быть созданы бактерии или дрожжи, синтезирующие белки млекопитающих практически в неограниченном количестве. Это

позволит производить анализ структуры и функции белка или получать специальные белки для использования в медицинских целях (вакцины или лекарственные препараты).

Литература

Общая

- * Cantor C. R., Schimmel P. R. Biophysical Chemistry (3 vols.), San Francisco, Freeman, 1980. (Исчерпывающий обзор о физических основах многих биохимических и биофизических методов.)
- Freifelder D. Physical Biochemistry, San Francisco, Freeman, 1976.
- Prescott D., ed. Methods in Cell Biology, New York, Academic Press. (Многотомное серийное издание, содержащее обзоры о современных методах.)
- Work T. S., Work E., Burden R. H., eds. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press. (Многотомное серийное издание, представляющее собой руководство по специализированным биохимическим методам. Последние тома включают следующие методы: определение аминокислотной последовательности белков и пептидов, 1981; гель-фильтрацию, 1980; введение в аффинную хроматографию, 1979.)

Цитированная

1. Bradbury S. The Evolution of the Microscope, Elmsford, N. Y., Pergamon, 1967.
- Bloom W., Fawcett D. W. A Textbook of Histology, 10th ed., Philadelphia, Saunders, 1975. (Прекрасно иллюстрированное описание анатомии клеток, установленной с помощью светового и просвечивающего электронного микроскопов. Гл. 1 знакомит с важнейшими методами.)
2. Spencer M. Fundamentals of Light Microscopy, Cambridge, Eng., Cambridge University Press, 1982.
3. Nairn R. C. Fluorescent Protein Tracing, 4th ed., New York, Churchill Livingstone, 1976.
- Lillie R. D. Biological Stains, 8th ed., Baltimore, Williams and Wilkins, 1969.
4. Wischnitzer S. Introduction to Electron Microscopy, 3rd ed., Elmsford, N. Y., Pergamon, 1981.
- Weakley B. S. A Beginner's Handbook in Biological Transmission Electron Microscopy, 2nd ed., New York, Churchill Livingstone, 1981.
5. Pease D. C., Porter K. R. Electron microscopy and ultramicrotomy, J. Cell Biol., 91, 287s–292s (1981). (Краткий исторический обзор.)
6. Everhart T. E., Hayes T. L. The scanning electron microscope, Sci. Am., 226 (1), 54–69 (1972).
- Hayat M. A. Introduction to Biological Scanning Electron Microscopy, Baltimore, University Park Press, 1978.
- Kessel R. G. Tissues and Organs, San Francisco, Freeman, 1979. (Атлас тканей позвоночных, исследованных с помощью сканирующего электронного микроскопа.)
7. Pinto da Silva P., Branton D. Membrane splitting in freeze-etching, J. Cell Biol., 45, 598–605 (1970).
- Heuser J. Quick-freeze, deep-etch preparation of samples for 3-D electron microscopy, Trends Biochem. Sci., 6, 64–68 (1981).
8. Unwin P. N. T., Henderson R. Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens, J. Mol. Biol., 94, 425–440 (1975).
9. Glusker J. P., Trueblood K. N. Crystal Structure Analysis, A Primer, Oxford, Eng., Oxford University Press, 1972.
- Kendrew J. C. The three-dimensional structure of a protein molecule, Sci. Am., 205 (6), 96–111 (1961).
- Perutz M. F. The hemoglobin molecule, Sci. Am., 211 (5), 64–76 (1964).
10. Paul J. Cell and Tissue Culture, 5th ed., New York, Churchill Livingstone, 1975.
11. Harrison R. G. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement, J. Exp. Zool., 9, 787–848 (1910). (Возможно первое использование культуры ткани.)
12. Ham R. G. Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 288–293 (1965).
- Hayashi I., Lerner J., Sato G. Hormonal growth control of cells in culture, In Vitro, 14, 23–30 (1978).

13. Harris H., Watkins J.F. Hybrid cells derived from mouse and man: artificial heterokaryons of mammalian cells from different species, *Nature*, **205**, 640–646 (1965).
Ruddle F.H., Creagan R.P. Parasexual approaches to the genetics of man, *Annu. Rev. Genet.*, **9**, 407–486 (1975).
14. Colowick S.P., Kaplan N.O., eds. *Methods in Enzymology*, vols. 1–84, New York, Academic Press, 1955–1982. (Многотомное серийное издание, содержащее общие и специальные статьи о большинстве методов, обычно используемых при биохимическом изучении клетки.)
Cooper T.G. *The Tools of Biochemistry*, New York, Wiley, 1977.
de Duve C., Beaufay H. A short history of tissue fractionation, *J. Cell Biol.*, **91**, 293s–299s (1981).
15. Jovin T.M., Arndt-Jovin D.J. Cell separation, *Trends Biochem. Sci.*, **5**, 214–219 (1980).
Herzenberg L.A., Sweet R.G., Herzenberg L.A. Fluorescence-activated cell sorting, *Sci. Am.*, **234** (3), 108–117 (1976).
16. de Duve C. Exploring cells with a centrifuge, *Science*, **189**, 186–194 (1975).
Palade G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis, *Science*, **189**, 347–358 (1975).
Claude A. The coming of age of the cell, *Science*, **189**, 433–435 (1975). (A. Claude, C. de Duve и G. Palade получили в 1974 г. Нобелевскую премию за свою работу по фракционированию тканей.)
Meselson M., Stahl F.W. The replication of DNA in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **44**, 671–682 (1958). (С помощью центрифугирования в градиенте плотности было установлено, что репликация ДНК осуществляется полуконсервативным путем.)
Scheeler P. *Centrifugation in Biology and Medical Science*, New York, Wiley, 1981.
17. Nirenberg N.W., Matthaei J.H. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 1588–1602 (1961).
Zamecnik P.C. An historical account of protein synthesis, with current overtones—a personalized view, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 1–16 (1969).
Recker E. *A New Look at Mechanisms in Bioenergetics*, New York, Academic Press, 1976. (Бесклеточные системы в изучении энергетического обмена.)
18. Andrews A.T. *Electrophoresis*, New York, Oxford University Press, 1981. (Весьма полное руководство по теории, методам и применению в биохимии электрофореза.)
19. O'Farrell P.H. High resolution, two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007–4021 (1975).
20. Ingram V.M. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin, *Nature*, **178**, 792–794 (1956). (Первая работа, в которой описывается получение пептидных карт.)
Cleveland D.W., Fischer S.G., Kirschner M.W., Laemmli U.K. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, **252**, 1102–1106 (1977).
21. Walsh K.A., Ericsson L.H., Parmelee D.C., Titani K. Advances in protein sequencing, *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 261–284 (1981).
22. Rogers A.W. *Techniques of Autoradiography*, 3rd ed., New York, Elsevier/North-Holland, 1979.
23. Calvin M. The path of carbon in photosynthesis, *Science*, **135**, 879–889 (1962). (Пионерская работа об одном из наиболее ранних использований радиоактивных изотопов в биологии.)
24. Coons A.H. Histochemistry with labeled antibody, *Int. Rev. Cytol.*, **5**, 1–23 (1956).
Hudson L., Hay F.C. *Practical Immunology*, 2nd ed., Oxford, Eng., Blackwell, 1980.
Eisen H.N. *Immunology*, 3rd ed., New York, Harper and Row, 1981.
Anderton B.H., Thorpe R.C. New methods of analyzing for antigens and glycoproteins in complex mixtures, *Immunol. Today*, **2**, 122–127 (1980).
25. Milstein C. Monoclonal antibodies, *Sci. Am.*, **243** (4), 66–74 (1980).
Yelton D.E., Scharff M.D. Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine, *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 657–680 (1981).
26. Mueller C., Graessmann A., Graessmann M. Microinjection: turning living cells into test tubes, *Trends Biochem. Sci.*, **5**, 60–62 (1980).
Furusawa M. Cellular microinjection by cell fusion: technique and applications in biology and medicine, *Int. Rev. Cytol.*, **62**, 29–67 (1980).
27. Glover D.M. *Genetic Engineering: Cloning DNA*, New York, Chapman and Hall, 1980. (Краткое изложение методологии; всего 80 стр.)

- Williamson R., ed. Genetic Engineering, vol. 1-3, New York, Academic Press, 1979, 1981, 1982.
- Watson J. D., Tooze J. The DNA Story: A Documentary History of Gene Cloning, San Francisco, Freeman, 1981.
28. Smith H. O. Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases, *Science*, **205**, 455-462 (1979).
29. Novick R. P. Plasmids, *Sci. Am.*, **243** (6), 102-107 (1980).
- Cohen S. N. The manipulation of genes, *Sci. Am.*, **233** (1), 24-33 (1975).
- Maniatis T., et al. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA, *Cell*, **15**, 687-701 (1978).
30. Maniatis T., Kee S. G., Efstratiadis A., Kafatos F. C. Amplification and characterization of a β -globin gene synthesized in vitro, *Cell*, **8**, 163-182 (1976).
31. Abelson J., Butz E., eds. Recombinant DNA, *Science*, **209**, 1317-1438 (1980). (Сборник статей, написанных ведущими специалистами в этой области.)
32. Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA, *Science*, **214**, 1205-1210 (1981).
- Gilbert W. DNA sequencing and gene structure, *Science*, **214**, 1305-1312 (1981).
33. Hood L. E., Wilson J. H., Wood W. B. Molecular Biology of Eucaryotic Cells: A Problems Approach, pp. 56-61, 192-201, Menlo Park, Ca., Benjamin-Cummings, 1975. (Четко описано использование метода гибридизации для анализа.)
- Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
34. Pardue M. L., Gall J. G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **64**, 600-604 (1969).
- Hermig W. In situ hybridization of nucleic acids, *Trends Biochem. Sci.*, **1**, 285-287 (1976).
35. Gilbert W., Villa-Komaroff L. Useful proteins from recombinant bacteria, *Sci. Am.*, **242** (4), 74-94 (1980).
- Itakura K. Synthesis of genes, *Trends Biochem. Sci.*, **5**, 114-116 (1980).
36. Shortle D., Nathans D. Local mutagenesis: a method for generating viral mutants with base substitutions in preselected regions of the viral genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2170-2174 (1978).
- Hinnen A., Hicks J. B., Fink G. R. Transformation of yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1929-1933 (1978).
- Berg P. Dissections and reconstructions of genes and chromosomes, *Science*, **213**, 296-303 (1981).
- Anderson W. F., Diacumakos E. G. Genetic engineering in mammalian cells, *Sci. Am.*, **245** (1), 106-121 (1981).

В русском переводе имеется:

* Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. В 3-х томах.-М.: Мир, 1984-1985.

Оглавление

Предисловие редактора перевода 5

Предисловие 6

Благодарности 8

Пролог 11

Примечание для читателей 18

Глава 1. Эволюция клетки 21

- 1.1. От молекул – к первой клетке 22
 - 1.1.1. Простые биологические молекулы могут образовываться в пребиотических условиях 22
 - 1.1.2. Полинуклеотиды способны направлять собственный синтез 22
 - 1.1.3. Самореплицирующиеся молекулы подвержены естественному отбору 24
 - 1.1.4. Информация передается от полинуклеотидов полипептидам 25
 - 1.1.5. Первая клетка окружает себя мембраной 26
 - 1.1.6. Микоплазмы – простейшие из живых клеток 28
- Заключение 29
- 1.2. От прокариот – к эукариотам 29
 - 1.2.1. Прокариотические клетки имеют простую структуру, но различаются по биохимическим свойствам 30
 - 1.2.2. Развитие метаболических реакций 31
 - 1.2.3. Цианобактерии способны фиксировать CO_2 и N_2 32
 - 1.2.4. Бактерии могут осуществлять аэробное окисление молекул пищи 33
 - 1.2.5. Клетки эукариот содержат несколько характерных оргanelл 136
 - 1.2.6. Эукариотические клетки зависят от митохондрий, осуществляющих окислительный метаболизм 37
 - 1.2.7. Хлоропласты могут быть потомками прокариотических водорослей 37
 - 1.2.8. Эукариотические клетки содержат множество различных внутренних мембран 39
 - 1.2.9. Эукариотические клетки имеют цитоскелет 40
 - 1.2.10. К царству простейших относятся наиболее сложные из известных клеток 41
 - 1.2.11. Гены можно включать и выключать 42
 - 1.2.12. Клетки эукариот содержат значительно больше ДНК, чем это необходимо для кодирования белков 43
 - 1.2.13. Генетический материал эукариотических клеток упакован очень сложно 43
- Заклучение 46
- 1.3. От клеток – к многоклеточным организмам 46

- 1.3.1. Одиночные клетки способны объединяться и образовывать колонии 47
- 1.3.2. Клетки высших организмов становятся специализированными и взаимозависимыми 47
- 1.3.3. В основе многоклеточной организации лежит взаимодействие клеток 48
- 1.3.4. Эпителиальные слои клеток окружают защищенную от внешних воздействий внутреннюю среду организма 48
- 1.3.5. Межклеточные коммуникации определяют пространственное строение многоклеточных организмов 50
- 1.3.6. Клеточная память позволяет развиваться сложным формам 50
- 1.3.7. Основные программы развития имеют тенденцию сохраняться в процессе эволюции 51
- 1.3.8. Эукариотические организмы имеют сложный аппарат воспроизведения 51
- 1.3.9. Клетки позвоночных имеют более 200 различных типов специализации 52
- 1.3.10. Клетки иммунной системы специализируются на химическом узнавании 53
- 1.3.11. Нервные клетки позволяют организму быстро адаптироваться в изменчивом окружении 54
- 1.3.12. Нервная система собирается из нервных клеток в ходе индивидуального развития 55
- 1.3.13. Связи между нервными клетками определяют тип поведения 56
- Заклучение 58
- Литература 60

Глава 2. Малые молекулы, энергия и биосинтез 61

- 2.1. Химические компоненты клетки 61
 - 2.1.1. Основа клеточной химии – соединения углерода 61
 - 2.1.2. Клетки используют четыре основных типа молекул 68
 - 2.1.3. Сахара как пища для клеток 68
 - 2.1.4. Жирные кислоты – компоненты клеточных мембран 74
 - 2.1.5. Аминокислоты – субъединицы белков 75
 - 2.1.6. Нуклеотиды – субъединицы ДНК и РНК 75
- Заклучение 81
- 2.2. Упорядоченность биологических систем и энергия 81
 - 2.2.1. Упорядоченность биологических систем обусловлена выделением клеткой тепловой энергии 81
 - 2.2.2. Фотосинтезирующие организмы используют солнечный свет для синтеза органических соединений 82
 - 2.2.3. Химическая энергия переходит от растений к животным 83

- 2.2.4. Клетка получает энергию в результате окисления биологических молекул 84
- 2.2.5. Распад органических молекул осуществляется в результате последовательных ферментативных реакций 84
- 2.2.6. Часть энергии, выделенной в реакциях окисления, расходуется на образование АТФ 85
- 2.2.7. Гидролиз АТФ обеспечивает упорядоченность в клетке 86
Заключение 86
- 2.3. Питательные вещества и источники энергии клетки 87
- 2.3.1. Молекулы питательных веществ, расщепляясь в три этапа, образуют АТФ 87
- 2.3.2. При гликолизе АТФ может образовываться даже в отсутствие кислорода 89
- 2.3.3. Окислительный катаболизм поставляет значительно большее количество биологически полезной энергии 90
- 2.3.4. Центральным процессом метаболизма является цикл лимонной кислоты 91
- 2.3.5. Перенос электронов к кислороду приводит к образованию АТФ 93
- 2.3.6. Аминокислоты и нуклеотиды принимают участие в круговороте азота 94
Заключение 94
- 2.4. Биосинтез и создание упорядоченности 95
- 2.4.1. Необходимая для биосинтеза энергия высвобождается при гидролизе АТФ 95
- 2.4.2. Реакции биосинтеза зачастую непосредственно сопряжены с гидролизом АТФ 97
- 2.4.3. Выход сопряженных реакций зависит от общего изменения свободной энергии 97
- 2.4.4. Коферменты участвуют в переносе специфических химических групп 99
- 2.4.5. Для биосинтеза необходимы восстановительные эквиваленты 100
- 2.4.6. Синтез биологических полимеров осуществляется путем повторения элементарных реакций дегидратации 101
Заключение 102
- 2.5. Координация катаболизма и биосинтеза 102
- 2.5.1. Метаболизм – организуемый и регулируемый процесс 102
- 2.5.2. Метаболические пути регулируются изменениями ферментативной активности 104
- 2.5.3. Катаболические реакции могут обращаться при поглощении энергии 105
- 2.5.4. Ферменты могут переходить в активное или неактивное состояние путем ковалентных модификаций 107
- 2.5.5. Реакции компартментализованы как на уровне клеток, так и на уровне всего организма 108
Заключение 109
Литература 109
- Глава 3. Макромолекулы: структура, форма и информационные функции 111**
- 3.1. Процессы молекулярного узнавания 111
- 3.1.1. Заключение в макромолекуле информация выражается с помощью слабых ковалентных связей 113
- 3.1.2. Диффузия – первая стадия молекулярного узнавания 116
- 3.1.3. Тепловое движение не только приводит молекулы в соприкосновение, но и отбрасывает их друг от друга 117
- 3.1.4. Процесс молекулярного узнавания не может быть совершенно безошибочным 118
Заключение 119
- 3.2. Нуклеиновые кислоты 119
- 3.2.1. Гены состоят из ДНК 119
- 3.2.2. Молекулы ДНК состоят из двух длинных комплементарных цепей, удерживаемых вместе благодаря спариванию оснований 122
- 3.2.3. Структура ДНК дает ключ к пониманию механизмов наследственности 123
- 3.2.4. Ошибки репликации ДНК приводят к мутациям 126
- 3.2.5. Последовательность нуклеотидов в гене определяет последовательность аминокислот в белке 127
- 3.2.6. С последовательностей в белке снимаются РНК-копии для синтеза белка 128
- 3.2.7. Последовательность мРНК «считывается» группами по три нуклеотида и переводится в последовательность аминокислот 128
- 3.2.8. Соответствие между аминокислотами и триплетами нуклеотидов устанавливают молекулы тРНК 129
- 3.2.9. Считывание мРНК от одного конца до другого осуществляют рибосомы 130
Заключение 132
- 3.3. Структура белка 132
- 3.3.1. Конформация белковой молекулы определяется ее аминокислотной последовательностью 132
- 3.3.2. Одни и те же способы укладки цепи постоянно повторяются в разных белках 134
- 3.3.3. Структура белков характеризуется чрезвычайным разнообразием 138
- 3.3.4. Уровни структурной организации белков 139
- 3.3.5. Сравнительно немногие потенциально возможные полипептидные цепи могут оказаться полезными 139
- 3.3.6. Новые белки часто возникают в результате незначительных изменений старых 140
- 3.3.7. Новые белки часто возникают в результате объединения разных полипептидных доменов 140
- 3.3.8. Белковые субъединицы способны к самосборке в большие клеточные структуры 142
- 3.3.9. Одинаковые белковые субъединицы могут взаимодействовать с образованием геометрически регулярных агрегатов 143
- 3.3.10. Самособирающиеся структуры могут состоять из различных белковых субъединиц и нуклеиновых кислот 145
- 3.3.11. Не все клеточные структуры образуются путем самосборки 147
Заключение 148
- 3.4. Функции белков 148
- 3.4.1. Конформация белка определяет его химические свойства 149
- 3.4.2. Связывание субстрата – первая стадия ферментативного катализа 150
- 3.4.3. Ферменты ускоряют реакции, но не смещают химического равновесия 153
- 3.4.4. Многие ферменты заставляют реакции протекать преимущественно в одном направлении, сопрягая их с гидролизом АТФ 153
- 3.4.5. Мультиферментные комплексы повышают темп клеточного метаболизма 153
- 3.4.6. Внутриклеточные мембраны ускоряют реакции, лимитируемые диффузией 154

- 3.4.7. Молекулы белка способны обратимо изменять свою форму 155
- 3.4.8. Аллостерические белки участвуют в регуляции метаболизма 155
- 3.4.9. Аллостерические белки совершенно необходимы для клеточной сигнализации 156
- 3.4.10. Белки можно заставить изменять конформацию 156
- 3.4.11. Изменения конформации белка, происходящие с затратой энергии, могут быть использованы для выполнения полезной работы 158
- 3.4.12. Мембранные аллостерические белки, используя энергию АТФ, могут служить молекулярными насосами 160
- 3.4.13. Белки могут мобилизовать энергию ионных градиентов для выполнения полезной работы 160
 - Заключение 160
 - Литература 161

Глава 4. Как изучают клетки? 165

- 4.1. Микроскопия 165
 - 4.1.1. С помощью светового микроскопа можно различить детали, отстоящие друг от друга на 0,2 мкм 165
 - 4.1.2. Различные компоненты клетки окрашиваются по-разному 167
 - 4.1.3. Для проведения микроскопических исследований ткани ее обычно фиксируют и режут 167
 - 4.1.4. Живые клетки можно наблюдать с помощью фазово-контрастного и интерференционного микроскопов 168
 - 4.1.5. С помощью электронного микроскопа можно выявить тонкую структуру клетки 170
 - 4.1.6. Для исследования биологических образцов с помощью электронного микроскопа необходима специальная обработка препаратов 171
 - 4.1.7. Электронная микроскопия может быть использована для получения трехмерного изображения 173
 - 4.1.8. Методы электронной микроскопии «замораживание – скалывание» и «замораживание – травление» позволяют увидеть клетку по-новому 174
 - 4.1.9. С помощью электронной микроскопии можно увидеть отдельные макромолекулы 176
 - 4.1.10. Детальная структура молекул, образующих кристаллическую решетку, может быть рассчитана на основе полученных дифракционных картин 177
 - 4.1.11. Методы построения изображения, основанные на дифракции рентгеновских лучей, используют для извлечения из электронных микрофотографий дополнительной информации 179
 - 4.1.12. Дифракция рентгеновских лучей дает возможность выявить трехмерное расположение атомов в молекуле 181
 - Заключение 182
- 4.2. Культура клеток 183
 - 4.2.1. Клетки можно выращивать в культуральной чашке 183
 - 4.2.2. С помощью сред определенного химического состава можно идентифицировать специфические факторы роста 184
 - 4.2.3. Для получения гомогенной культуры клеток обычно используют клеточные линии эукариот 185

- 4.2.4. Осуществив слияние клеток, можно получить гибридные клетки 186
 - Заключение 187
- 4.3. Фракционирование клеток и клеточного содержимого 188
 - 4.3.1. Клетки можно выделить из ткани и разделить на отдельные типы 188
 - 4.3.2. С помощью ультрацентрифугирования можно разделять органеллы и макромолекулы 189
 - 4.3.3. Детали сложных внутриклеточных процессов на молекулярном уровне можно изучать только после разделения компонентов клетки 191
 - 4.3.4. Для фракционирования белков можно использовать хроматографию 192
 - 4.3.5. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) можно определить размер и субъединичный состав белков 195
 - 4.3.6. Методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле можно разделять в одном геле более 1000 белков 197
 - 4.3.7. Избирательное расщепление белка приводит к образованию характерного набора пептидных фрагментов 199
 - 4.3.8. С помощью автоматических приборов можно анализировать короткие аминокислотные последовательности 200
 - Заключение 201
- 4.4. Изучение клеточных макромолекул с помощью антител и радиоактивных изотопов 201
 - 4.4.1. Методы выявления радиоактивных атомов обладают высокой чувствительностью 202
 - 4.4.2. Радиоактивные изотопы используют для изучения перемещения молекул в клетках и в целом организме 202
 - 4.4.3. Для выявления и выделения специфических молекул можно использовать антитела 204
 - 4.4.4. Клеточные линии гибридом служат постоянным источником моноклональных антител 205
 - 4.4.5. Антитела и другие макромолекулы можно вводить в живые клетки 206
 - Заключение 207
- 4.5. Технология рекомбинантных ДНК 207
 - 4.5.1. Рестриктирующие нуклеазы расщепляют ДНК в специфических участках нуклеотидных последовательностей 209
 - 4.5.2. Методом клонирования можно получать большие количества нужных последовательностей ДНК 210
 - 4.5.3. Копии специфических молекул мРНК можно клонировать 211
 - 4.5.4. Последовательность клонированных фрагментов ДНК можно легко определить 212
 - 4.5.5. Реакция гибридизации нуклеиновых кислот – чувствительный метод выявления специфических последовательностей нуклеотидов 213
 - 4.5.6. Для локализации специфических последовательностей нуклеиновых кислот в хромосомах и клетках используют методы гибридизации *in situ* 215
 - 4.5.7. С помощью методов рекомбинантных ДНК можно изучать даже минорные белки клетки 215
 - 4.5.8. Мутантные гены можно исправить уже сейчас 216
 - Заключение 217
 - Литература 218