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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

в пяти томах

2

Перевод с английского
канд. биол. наук Т. Н. Власик
канд. биол. наук П. Л. Иванова
и Г. В. Крюковой

под редакцией чл.-корр. АН СССР
Г. П. Георгиева

Москва «Мир» 1986

Scan - nau; Processing of the scan. ocr - waleriy, 2017

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 томах. Т. 2. Пер. с англ.–М.: Мир, 1986. 312 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). Второй том посвящен генетике клетки, клеточным и внутриклеточным мембранам, ядру клетки.

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

М $\frac{2001040000-250}{041(01)-86}$ подл. 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

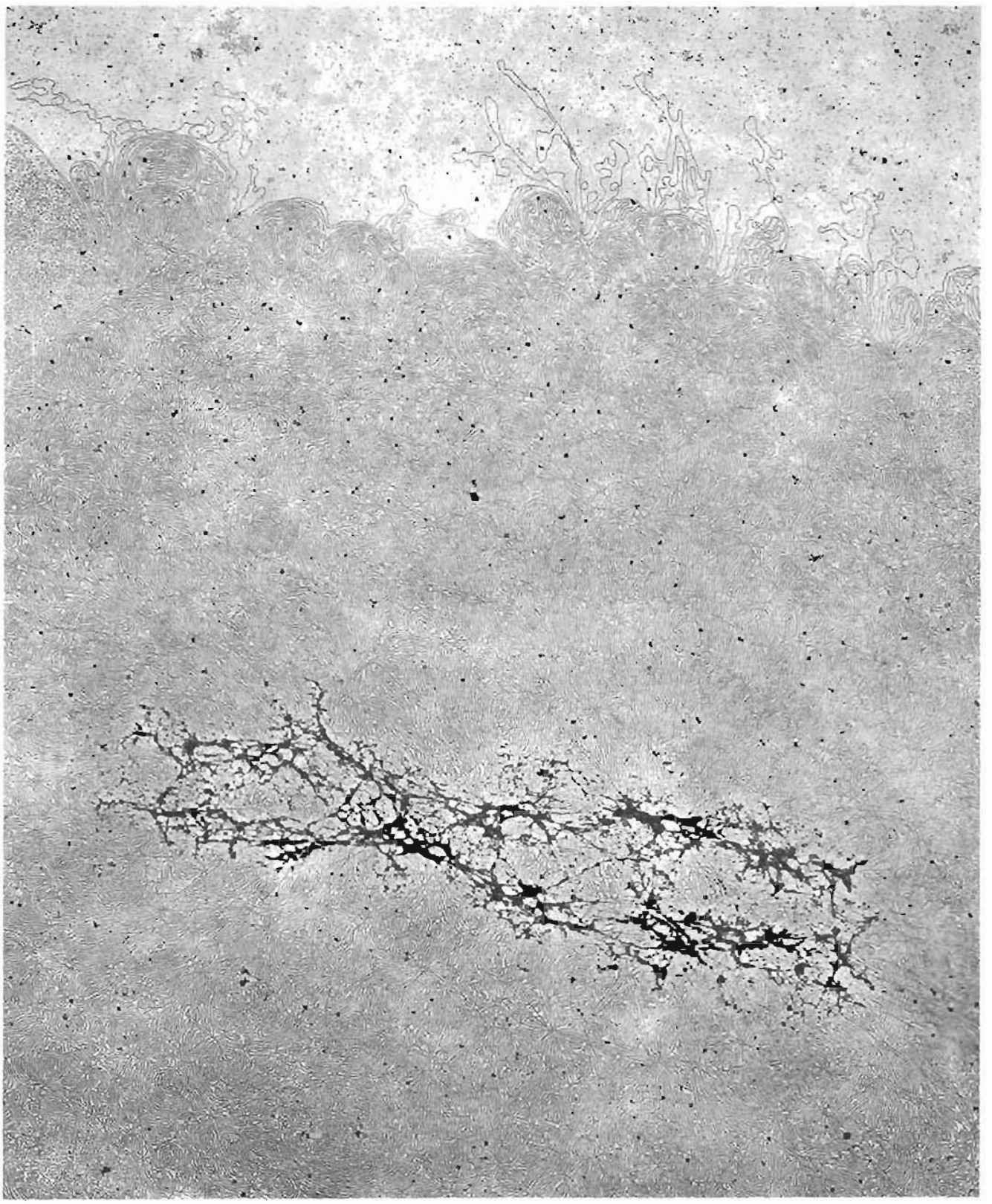
II Молекулярная организация клеток

5 Основные генетические механизмы

6 Плазматическая мембрана

7 Внутренние мембраны и синтез макромолекул

8 Клеточное ядро



Электронная микрофотография ДНК, высвободившейся из разрушенной хромосомы человека. Здесь видно лишь около половины ДНК, находившейся в одной хромосоме. (С любезного разрешения J. Paulson, U. Laemmli)

5 Основные генетические механизмы

Способность клеток поддерживать высокую упорядоченность своей организации в хаотичной Вселенной зависит от генетической информации, которая реализуется, сохраняется, воспроизводится, а иногда и совершенствуется в четырех генетических процессах – *синтезе белка, репарации ДНК, репликации ДНК и генетической рекомбинации*. Эти процессы, в которых создаются и поддерживаются клеточные белки и нуклеиновые кислоты, одномерны: в каждом из них информация, заключенная в линейной последовательности нуклеотидов, используется для образования либо для изменения другой линейной последовательности нуклеотидов (молекулы ДНК или РНК) или линейной последовательности аминокислот (молекулы белка). Поэтому генетические события проще для понимания, чем большинство других клеточных процессов, связанных с выражением информации, которую несут в себе трехмерные поверхности белковых молекул. Быть может, именно благодаря этой относительной простоте генетических механизмов мы знаем и понимаем их гораздо лучше, чем бо́льшую часть других событий, происходящих в клетке.

Эту главу мы начнем с подробного рассмотрения некоторых механизмов белкового синтеза, с которыми познакомились в гл. 3. Затем мы перейдем к механизмам, обеспечивающим неизменность нуклеотидной последовательности ДНК путем ее репарации и воспроизведение ДНК путем репликации. Это заставит нас обратиться к вирусам и рассмотреть их в качестве самореплицирующихся генетических единиц, обладающих способностью внедряться, подобно паразитам, в генетический аппарат клетки, в котором первичным хранилищем генетической информации служат молекулы ДНК или РНК. В заключение будут рассмотрены механизмы генетической рекомбинации. Этот процесс, обусловливающий перераспределение нуклеотидных последовательностей ДНК, крайне важен для адаптации видов в изменяющейся среде.

5.1. Синтез белка

5.1.1. Декодирование заключенной в ДНК информации о структуре белка [1]

На долю белков приходится обычно более половины сухой массы клетки, и синтез их играет главную роль в таких процессах, как поддержание клеточной структуры и функции, рост и дифференцировка. Хотя началом синтеза белка принято считать копирование ДНК с образованием *информационной, или матричной, РНК (мРНК)*, необходим еще и ряд других подготовительных этапов: к каждой из 20 обычных аминокислот должна присоединиться молекула специфической *транспортной РНК (тРНК)*, а к субчастицам рибосом – некоторые вспомогательные молекулы. В процессе синтеза белка все эти компоненты объединяются в цитоплазме клетки, образуя рибосомный комплекс. Единственная находящаяся здесь молекула мРНК шаг за шагом продвигается сквозь *рибосому*, и при этом ее нуклеотидная последовательность переводится (транслируется) в соответствующую последовательность аминокислот, в результате чего создается определенная белковая цепь.

5.1.2. РНК-полимераза «переписывает» заключенную в ДНК информацию в виде РНК [2]

Синтез РНК-копии нуклеотидной последовательности того или иного участка молекулы ДНК катализируется ферментом, который носит название *РНК-полимераза*. Этот процесс, называемый **транскрипцией ДНК**, играет важнейшую роль в передаче информации от ДНК к белку. РНК-полимераза изучена лучше всего у прокариот, у которых весь синтез РНК осуществляется одним-единственным ферментом этого типа.

Транскрипция начинается после присоединения РНК-полимеразы к специфической нуклеотидной последовательности ДНК, к так называемому **промотору**, отмечающему в ДНК то место, с которого должен начаться синтез РНК. Присоединившись к промотору, РНК-полимераза раскручивает примерно один виток спирали ДНК, обнажая короткий участок одноцепочечной ДНК, который должен теперь послужить матрицей для комплементарного спаривания оснований ДНК с основаниями поступающих рибонуклеотидов. Затем РНК-полимераза соединяет между собой два первых поступающих мономера, т.е. два рибонуклеозидтрифосфата, и тем самым кладет начало цепи РНК. Продвигаясь вдоль матричной цепи ДНК, РНК-полимераза постепенно наращивает комплементарную цепь РНК в направлении 5′→3′, добавляя к ней последовательно по одному нуклеотиду (рис. 5-1). Фермент продолжает

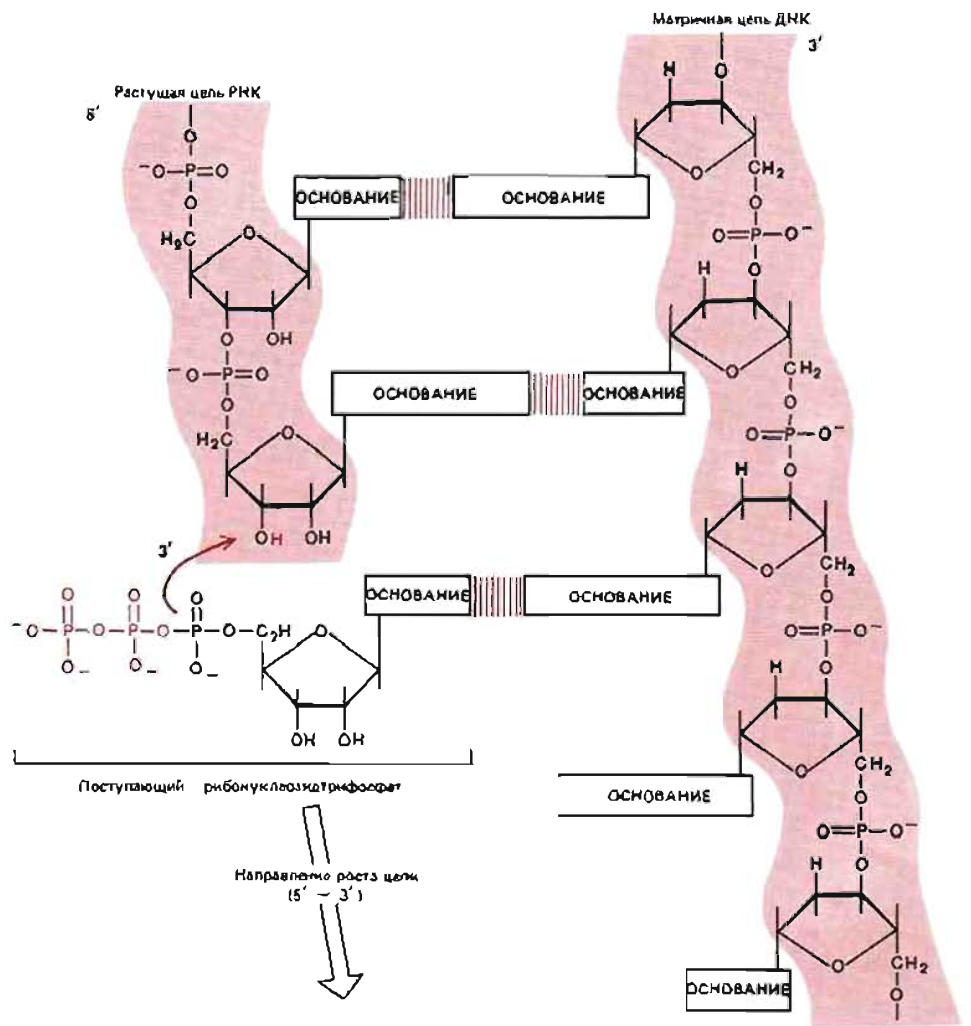


Рис. 5-1. Реакция, катализируемая ферментом РНК-полимеразой. На каждом этапе из поступающих рибонуклеозидтрифосфатов отбирается один, способный к комплементарному спариванию с открытой матричной цепью ДНК; в результате к растущему 3′-ОН-концу цепи РНК добавляется рибонуклеозидмонофосфат (*цветная стрелка*). Таким образом, новая цепь РНК растет в направлении 5′ → 3′ и оказывается комплементарной матричной цепи ДНК.

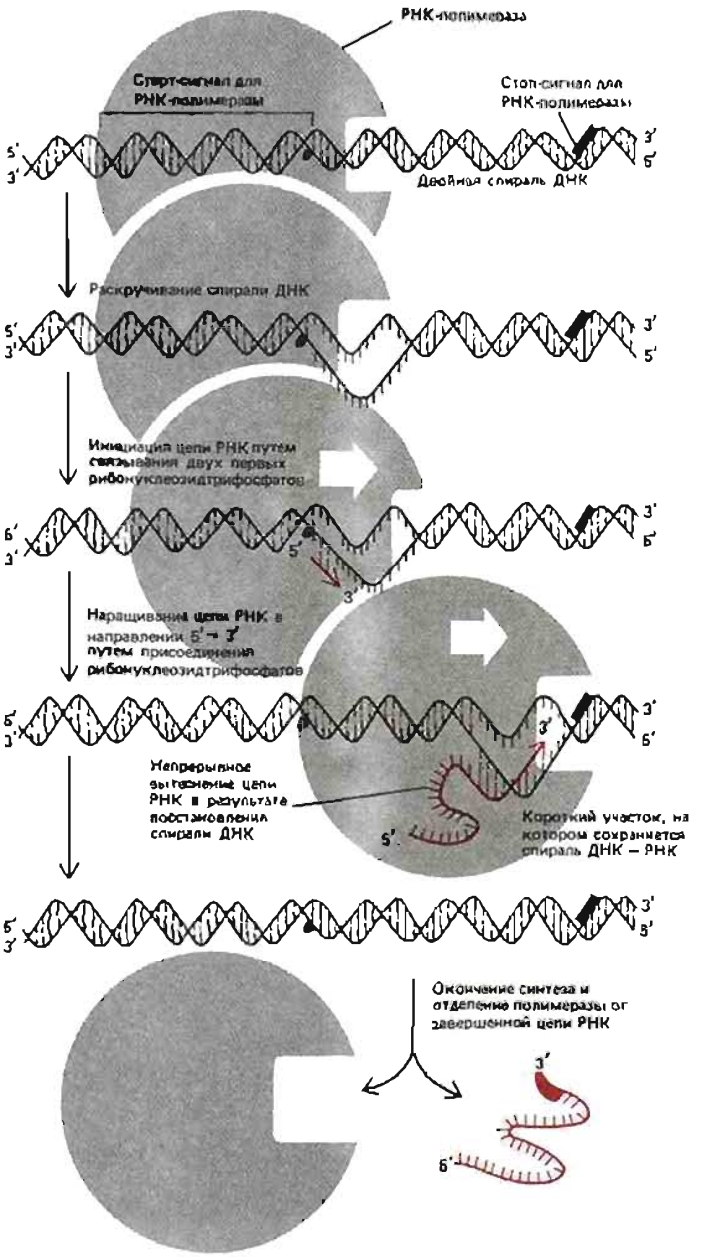


Рис. 5-2. Схема, поясняющая, каким образом РНК-полимераза начинает синтез у специального старт-сигнала в ДНК, называемого промотором, и заканчивает его у специального стоп-сигнала, после чего фермент и синтезированная им готовая цепь РНК отделяются друг от друга. Скорость полимеризации при 37°С равна примерно 30 нуклеотидам в 1 с. Поэтому синтез цепи РНК, насчитывающей 5000 нуклеотидов, длится около 3 мин. Рисунок дает представление о приблизительном соотношении размеров между РНК-полимеразой и спиралью ДНК.

присоединять нуклеотиды к растущей цепи РНК до тех пор, пока не встретит на своем пути еще одну специфическую нуклеотидную последовательность в цепи ДНК, так называемый **стоп-сигнал**, или **сигнал терминации транскрипции**. Достигнув этой точки, РНК-полимераза отделяется и от матричной ДНК, и от новосинтезированной цепи РНК. Во время продвижения фермента вдоль матричной цепи на коротком ее участке образуется двойная спираль РНК—ДНК. Однако она не столь стабильна, как спираль ДНК—ДНК. Поэтому последняя быстро восстанавливается, вытесняя РНК. Вследствие этого каждая завершенная цепь РНК отделяется от ДНК-матрицы в виде свободной одноцепочечной молекулы РНК (рис. 5-2).

В принципе любой участок ДНК может быть транскрибирован с образованием двух различных молекул мРНК – по одной на каждую из двух цепей двойной спирали ДНК. В действительности же транскрибируется только одна

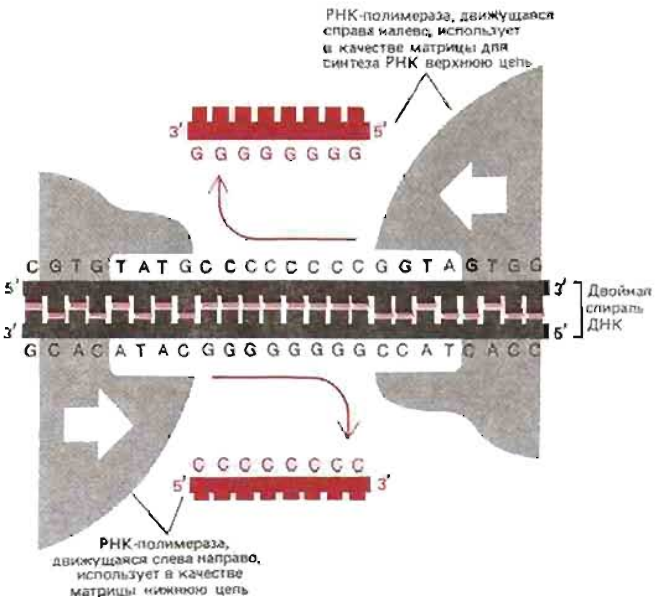


Рис. 5-3. Поскольку цепь ДНК, выполняющая функцию матрицы, должна считываться от 3'-конца к 5'-концу (см. рис. 5-1), выбор одной из двух цепей ДНК в качестве матрицы для синтеза РНК определяется направлением движения РНК-полимеразы. В свою очередь направление движения РНК-полимеразы задается ориентацией нуклеотидной последовательности промотора, с которого РНК-полимераза начинает считывание. Обычно в любом участке двойной спирали ДНК транскрибируется только одна из двух цепей ДНК. Отметим, что каждая синтезированная молекула РНК идентична по своей полярности и нуклеотидной последовательности (если не считать замены T на U) не той цепи, которая послужила для нее матрицей, а второй, которая комплементарна первой.

из двух цепей ДНК, хотя не всегда одна и та же для соседних генов. «Указателем», направляющим транскрипцию на нужный путь, служит промоторная нуклеотидная последовательность (старт-сигнал) в ДНК. Промотор ориентирован таким образом, что РНК-полимераза проходит через данный генетический участок в определенном направлении. Этим автоматически определяется и то, какая из двух цепей ДНК будет транскрибироваться (рис. 5-3).

Нуклеотидные последовательности ДНК, играющие роль промоторов для РНК-полимеразы у *E. coli*, охарактеризованы достаточно хорошо. Изучение их общих свойств показало, что полимераза узнает в молекуле ДНК две нуклеотидные последовательности из 6 нуклеотидов, отделенные одна от другой приблизительно 25 нуклеотидами, которые фермент узнавать не способен (рис. 5-4). У последовательностей ДНК, служащих стоп-сигналом для этой полимеразы, также есть некоторые общие свойства, как это видно из рис. 5-4. Клетки эукариот содержат три разные РНК-полимеразы; в целом эти ферменты напоминают бактериальный фермент, но охарактеризованы они хуже и подчиняются другим старт- и стоп-сигналам (см. гл. 8, разд. 8.2.1).

В приведенном выше описании опущены некоторые подробности: во многих случаях синтез молекулы мРНК включает еще и ряд других сложных этапов. Известно, например, что в определении того, какие участки ДНК будут транскрибироваться РНК-полимеразой, важную роль играют особые белки, регулирующие активность генов, а значит, именно от них в первую очередь зависит, какие белки будет вырабатывать клетка. Далее, в то время как у прокариот молекулы мРНК образуются непосредственно путем транскрипции ДНК, в клетках высших эукариот большинство РНК-транскриптов, прежде чем покинуть клеточное ядро и поступить в цитоплазму в виде мРНК, претерпевает существенные изменения – подвергается так называемому *процессингу*. Все эти специальные аспекты процесса образования мРНК мы обсудим подробно в гл. 8, где речь пойдет о клеточном ядре. Здесь же мы просто будем исходить из того, что в клетке так или иначе образуются функциональные молекулы мРНК, и познакомимся с тем, как они направляют белковый синтез.

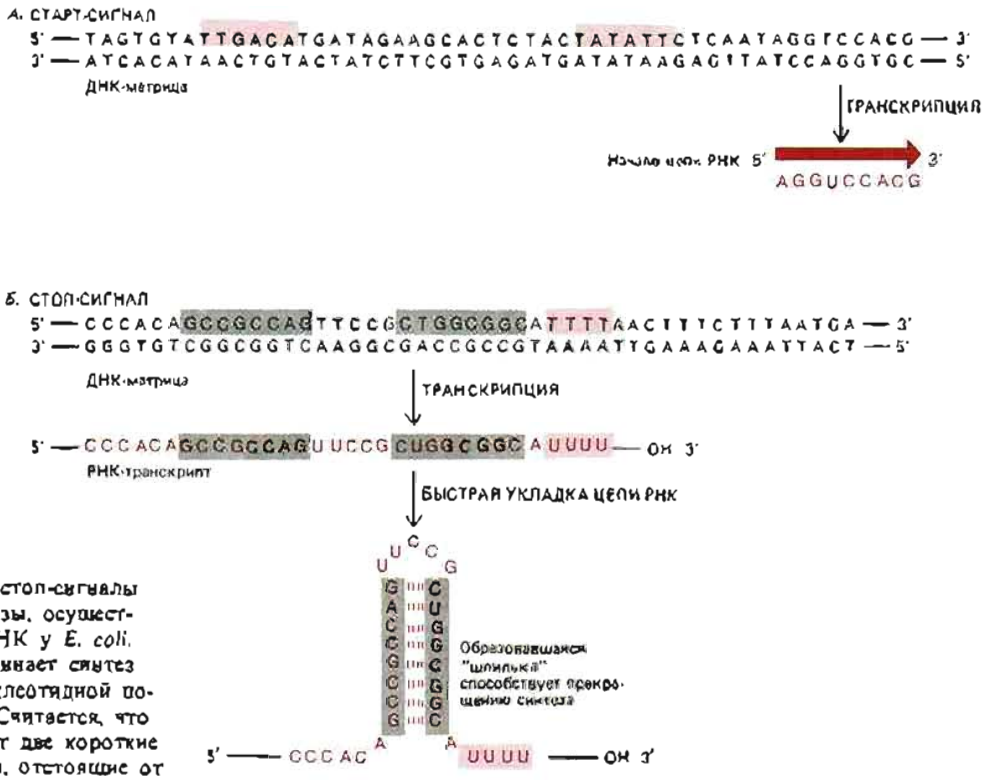


Рис. 5-4. Старт- и стоп-сигналы для РНК-полимеразы, осуществляющей синтез РНК у *E. coli*. *А.* Полимераза начинает синтез у промоторной нуклеотидной последовательности. Считается, что промотором служат две короткие последовательности, отстоящие от точки начала синтеза РНК (*выделена красным*) приблизительно на 35 и 10 нуклеотидов. В каждой из этих двух шестинуклеотидных последовательностей допустимы лишь незначительные модификации; в противном случае промоторная активность утрачивается. Остальная показанная здесь нуклеотидная последовательность ДНК, как полагают, не имеет значения. *Б.* Полимераза прекращает синтез, после того как будет синтезирован участок цепи из нескольких остатков U на матрице, которая в ДНК следует непосредственно за самокомплементарной последовательностью нуклеотидов. Соответствующее сочетание нуклеотидных последовательностей в ДНК служит поэтому стоп-сигналом. Как показано на рисунке, самокомплементарная последовательность (*выделена серым*) в новосинтезированной цепи РНК быстро образует двойную спираль — так называемую шпильку. Аналогично ведут себя многие самокомплементарные последовательности; можно думать поэтому, что не сама нуклеотидная последовательность, а именно «шпилька», необходима для того, чтобы составить эту часть стоп-сигнала.

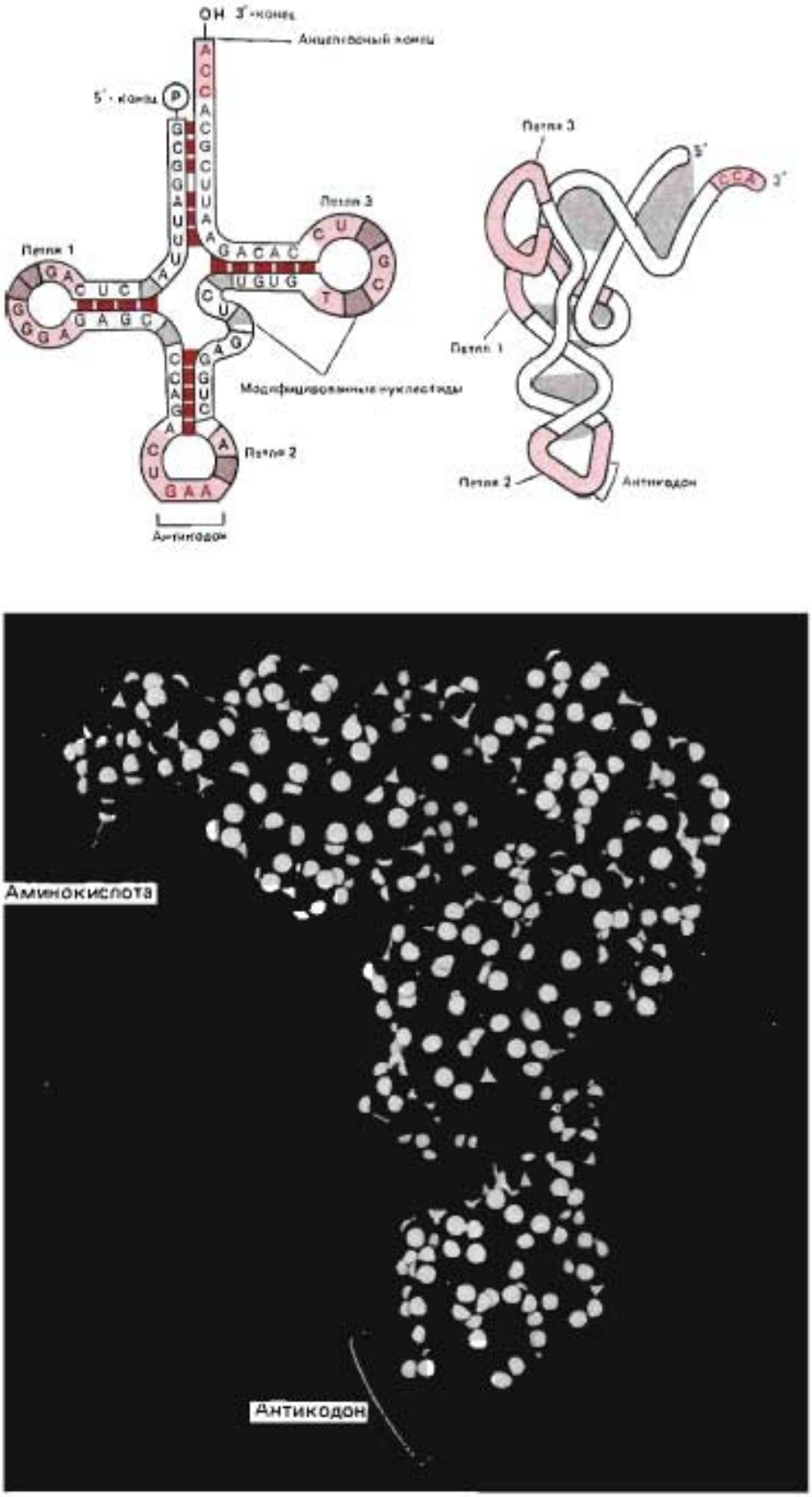
5.1.3. Синтез белка – процесс очень сложный [3]

Молекулярные процессы, лежащие в основе синтеза белка, крайне сложны. Хотя многие из них мы сейчас в состоянии уже описать, пока не представляется возможным понять их смысл в целом так, как это сделано, скажем, в отношении транскрипции, репарации и репликации ДНК. Мы знаем, например, что в синтезе белка участвует не один какой-нибудь класс молекул РНК, а три таких класса (мРНК, тРНК и рРНК), но, почему это так, нам не вполне ясно. Поэтому детали синтеза белка приходится изучать в основном просто как голые факты, не обобщенные пока никакой единой теорией.

Подлинное понимание механизма белкового синтеза могло бы пролить свет и на те давние события, которые связаны с происхождением самой жизни. Решающую роль играет здесь вопрос о взаимосвязи между химической структурой РНК и синтезом полипептидов. Почему порядок расположения аминокислот в полипептидах стал в какой-то момент определяться последовательностью нуклеотидов в цепях РНК? Насколько нам известно, РНК не обладает какими-либо особыми химическими свойствами, от которых могли бы зависеть эти ее необычные взаимоотношения с аминокислотами, т.е. ее способность не только доставлять энергию для образования пептидных связей, но и определять, какие именно аминокислоты должны связываться друг с другом. До тех же пор, пока мы об этом ничего не знаем, нам остается только накапливать сведения об отдельных деталях процесса белкового синтеза в надежде на то, что это со временем позволит нам заглянуть в тайну зарождения жизни.

Роль главных агентов в процессе синтеза белка играют молекулы тРНК (транспортной РНК): к ним присоединяются аминокислоты перед полимеризацией, т.е. перед объединением в полипептиды (рис. 5-5). Присоединяясь к молекуле тРНК своим карбоксильным концом, аминокислоты активируются – переходят в богатую энергией форму, способную спонтанно образовать пептидную связь, что и приводит к синтезу полипептидов. Этот процесс акти-

Рис. 5-5. Строение типичной молекулы тРНК.
А. Схематическое изображение структуры молекулы. Слева показано спаривание оснований в соответствующих участках молекулы, а справа представлена в схематическом виде общая трехмерная конформация молекулы, установленная с помощью дифракции рентгеновских лучей. *Б.* Пространственная модель структуры, представленной на рис. 5-5,*А*. Существует более 20 видов тРНК – не менее чем по одному на каждую из 20 различных аминокислот. Хотя эти молекулы тРНК различаются по своей нуклеотидной последовательности, все они свернуты сходным образом. Во всех случаях аминокислота присоединяется к остатку адениловой кислоты (А) в последовательности ССА на 3'-конце молекулы тРНК. Изображенная здесь молекула тРНК связывает аминокислоту фенилаланин, поэтому условно ее обозначают $тРНК^{Phe}$. (С любезного разрешения Sung-Hou Kim.)



вации – необходимый этап белкового синтеза, поскольку свободные аминокислоты не могут прямо присоединяться к полипептидной цепи. (Спонтанно способен идти лишь обратный процесс – гидролитический разрыв пептидных связей.)

В каком именно месте будет присоединена к растущей полипептидной цепи данная аминокислота, зависит не от самой аминокислоты, а от присоединившей ее молекулы тРНК. Выяснить это удалось при помощи изящного эксперимента, в котором аминокислоту, присоединенную к специфической тРНК, химическим путем превращали в другую аминокислоту (цистеин в аланин). Когда затем такие гибридные молекулы участвовали в синтезе белка в бесклеточной системе, неправильная аминокислота включалась в белковую цепь во всех тех положениях, которые «обслуживались» данной тРНК (рис. 5-6). Успешное декодирование зависит, следовательно, в значительной мере от точности того механизма, который в норме обеспечивает связь между каждой активированной аминокислотой и соответствующей молекулой тРНК.

Не менее важное значение для успешного декодирования мРНК имеет точное спаривание оснований между *кодонами* молекулы мРНК и *антикодонами* молекул тРНК (см. рис. 5-9). Этот процесс эффективно происходит лишь в том случае, если молекулы мРНК и тРНК связываются с соответствующими функциональными центрами рибосом. К сожалению, нам пока не ясна природа этих связывающих взаимодействий, реализующихся на рибосомах, и пройдет, возможно, немало лет, прежде чем мы сумеем ее понять. Рибосомы, как это видно из описания, приведенного в разд. 5.1.7, представляют собой очень сложные молекулярные агрегаты, поэтому маловероятно, чтобы их точную структуру на молекулярном уровне удалось определить уже в ближайшее время.

5.1.4. Каждая аминокислота присоединяется к соответствующей молекуле тРНК при помощи специфического фермента [4]

Каким образом молекула тРНК узнает «свою» аминокислоту? Существует, оказывается, специальный набор ферментов, так называемых **аминоацил-тРНК-синтетаз**, которые присоединяют аминокислоты к соответствующим

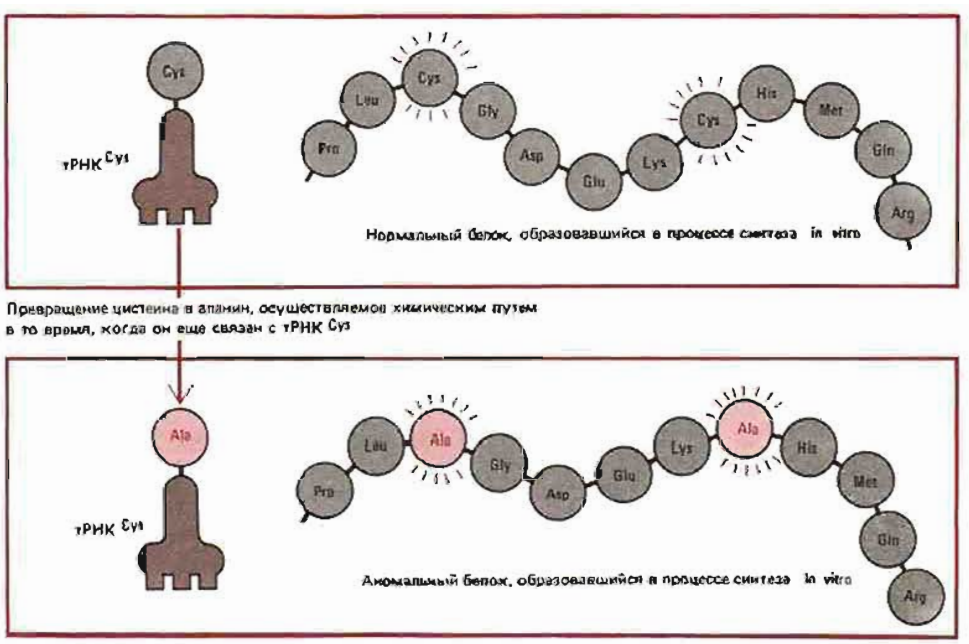


Рис. 5-6. Эксперимент, доказывающий, что только тРНК, а не связанная с ней аминокислота узнает то место, которое данная аминокислота должна занять в растущей полипептидной цепи.

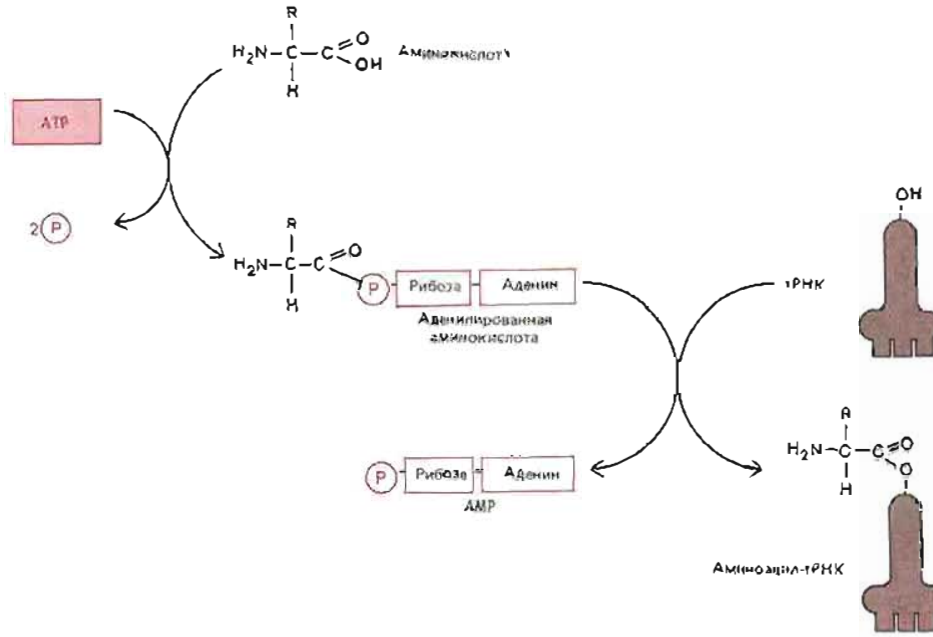


Рис. 5-7. Двухэтапный процесс, в котором аминокислота под действием аминоацил-тРНК-синтетазы переводится в активированную форму, вовлекаемую в синтез белка. Для присоединения каждой аминокислоты к соответствующей молекуле тРНК используется, как здесь показано, энергия гидролиза ATP, поскольку возникающая связь принадлежит к числу богатых энергией связей. Сначала аминокислота активируется путем связывания ее карбоксильной группы непосредственно с AMP, т. е. образуется *аденилированная аминокислота*; источником энергии для реакции аденилирования, в обычных условиях невыгодной в термодинамическом смысле, служит гидролиз ATP. Оставаясь связанной с аминоацил-тРНК-синтетазой, аденилированная карбоксильная группа аминокислоты переносится затем на гидроксильную группу остатка сахара, находящуюся на 3′-конце молекулы тРНК. В результате этого переноса образуется молекула аминоацил-тРНК, в которой аминокислота присоединена к тРНК активированной сложноэфирной связью.

молекулам тРНК. Для каждой из аминокислот имеется своя особая синтетаза: одна присоединяет глицин к $тРНК^{Gly}$, другая – аланин к $тРНК^{Ala}$ и т. д. Реакция присоединения протекает в два этапа, как это видно из рис. 5-7, и приводит к образованию молекулы **аминоацил-тРНК** (рис. 5-8).

Молекулы тРНК играют роль конечных «адапторов», переводящих информацию, заключенную в нуклеотидной последовательности нуклеиновой кислоты, на язык белка. Не менее важную роль, однако, играет в процессе декодирования также и второй набор специфических адапторов – молекул аминоацил-тРНК-синтетаз. Таким образом, генетический код расшифровывается при помощи двух взаимосвязанных наборов адапторов, каждый из которых осуществляет высокоспецифическую подгонку одной молекулярной поверхности к другой; в результате совместного действия двух этих наборов адапторов каждая аминокислота может быть отождествлена с определенной последовательностью из трех нуклеотидов в молекуле мРНК, иными словами, со своим кодоном (рис. 5-9).

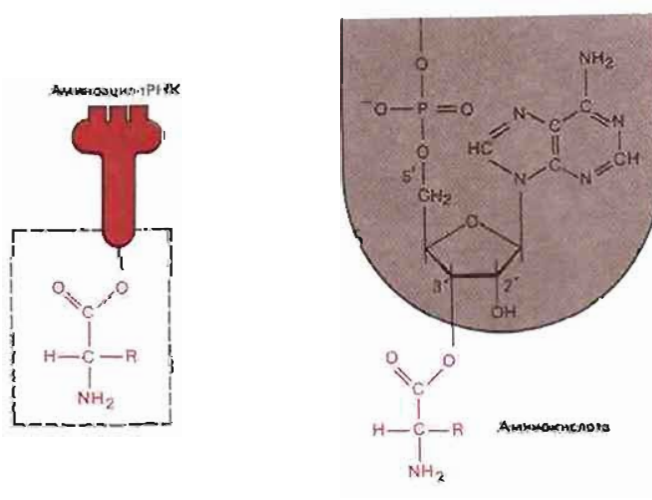


Рис. 5-8. Связывание аминокислоты с тРНК. Карбоксильная группа аминокислоты присоединена сложноэфирной связью к рибозе (через 2′- или 3′-кислородный атом рибозы). *А.* Схематическое изображение аминоацил-тРНК. *Б.* Структура той части молекулы аминоацил-тРНК, которая на рис. 5-8 *А* показана в рамке.

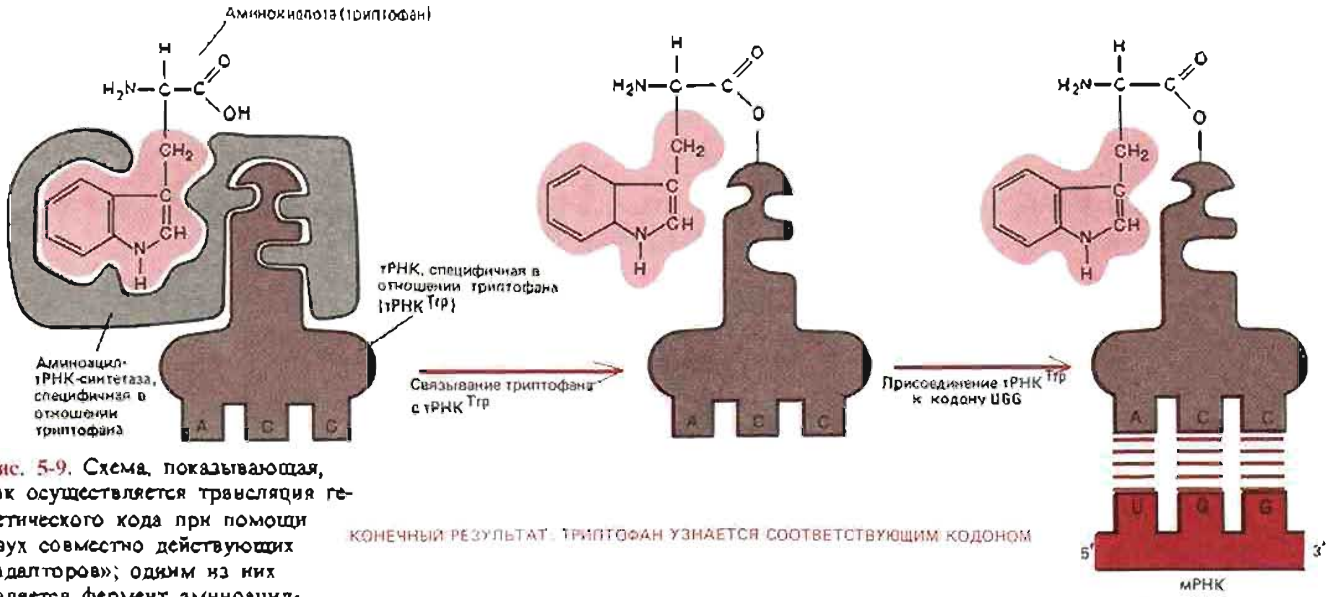


Рис. 5-9. Схема, показывающая, как осуществляется трансляция генетического кода при помощи двух совместно действующих «адаптеров»; одним из них является фермент аминоацил-тРНК-синтетаза, присоединяющий данную аминокислоту к соответствующей тРНК, а вторым – молекула тРНК, которая связывается затем с надлежащей нуклеотидной последовательностью в мРНК.

5.1.5. Аминокислоты присоединяются к карбоксильному концу растущей полипептидной цепи

Основная реакция в синтезе белка – это реакция, приводящая к образованию пептидной связи между карбоксильной группой на конце растущей полипептидной цепи и свободной аминогруппой аминокислоты. Белковая цепь синтезируется, следовательно, путем ее постепенного наращивания от аминного конца к карбоксильному. На протяжении всего процесса растущий карбоксильный конец полипептидной цепи остается в активированном состоянии, будучи связан ковалентной связью с тРНК (в молекуле *пептидил-тРНК*). В каждом цикле синтеза происходит разрыв этой ковалентной связи, однако она тут же замещается точно такой же связью, образуемой следующей присоединяемой к цепи аминокислотой (рис. 5-10). Таким образом, в процессе синтеза белка каждая добавляемая аминокислота несет с собой энергию акти-

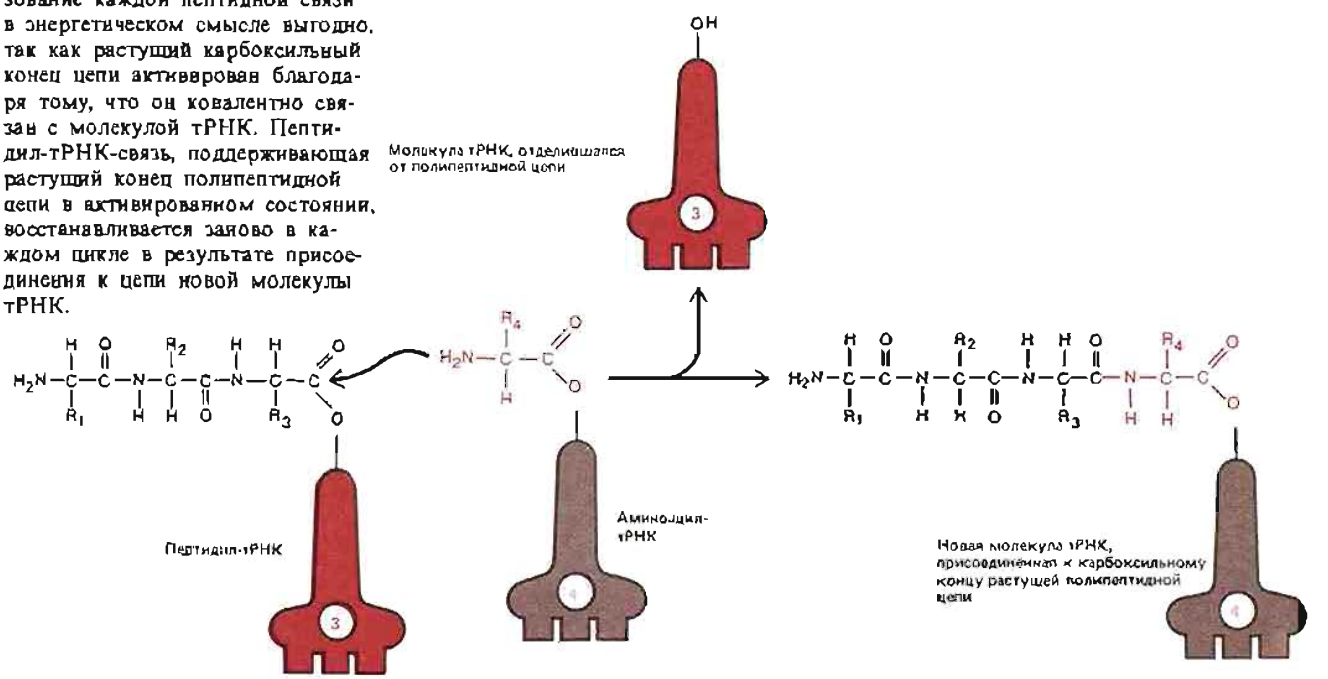


Рис. 5-10. Полипептидная цепь растет путем последовательного добавления новых аминокислот к ее карбоксильному концу. Образование каждой пептидной связи в энергетическом смысле выгодно, так как растущий карбоксильный конец цепи активирован благодаря тому, что он ковалентно связан с молекулой тРНК. Пептидил-тРНК-связь, поддерживающая растущий конец полипептидной цепи в активированном состоянии, восстанавливается заново в каждом цикле в результате присоединения к цепи новой молекулы тРНК.

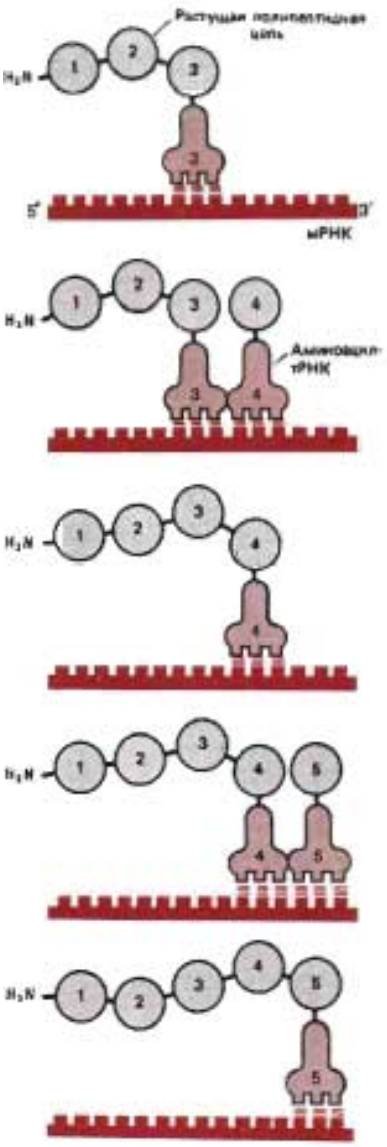


Рис. 5-11. Выбор каждой аминокислоты, добавляемой к растущему концу полипептидной цепи, определяется комплементарным спариванием оснований между антикодоном присоединившей аминокислоту тРНК и очередным кодоном цепи мРНК.

вации, необходимую не для ее собственного присоединения, а для присоединения *следующей* аминокислоты. (Это один из примеров «роста с головы», описанного в гл. 2 [рис. 2-34, т. 1].)

5.1.6. Выбор присоединяемой аминокислоты определяется комплементарным спариванием оснований между связанной с ней молекулой тРНК и цепью мРНК [5]

В процессе трансляции нуклеотидная последовательность мРНК считывается группами по три нуклеотида по мере того, как считывающий «аппарат» перемещается вдоль молекулы мРНК в направлении 5′ → 3′. Каждая аминокислота соответствует определенному триплету нуклеотидов (**кодону**) в молекуле мРНК, который спаривается с последовательностью из трех комплементарных нуклеотидов в антикодоновой петле молекулы тРНК. Поскольку спариваться с данным кодоном способен только один из многих различных видов молекул тРНК, выбор аминокислоты, присоединяемой в каждый данный момент к растущему концу полипептидной цепи, определяется кодоном (рис. 5-11).

Число возможных сочетаний трех нуклеотидов четырех типов равно 64 (4 · 4 · 4). Большинство этих сочетаний действительно встречается почти во всех молекулах мРНК. Три кодона из 64 не кодируют никаких аминокислот; эти кодоны определяют собой прекращение (терминацию) синтеза полипептидной цепи, и потому их называют *стоп-кодонами* или *терминирующими кодонами*. Остается, таким образом, 61 кодон, тогда как число различных встречающихся в белках аминокислот равно только 20. Ясно, следовательно, что бóльшая часть аминокислот представлена более чем одним кодоном. Поэтому генетический код называют *вырожденным* (рис. 5-12).

Вырожденность генетического кода можно истолковать двояко: 1) одна молекула тРНК может спариваться более чем с одним кодоном и 2) для каждой аминокислоты имеется более одной тРНК. В действительности справедливо и то и другое. Для некоторых аминокислот существует более одной тРНК. Кроме того, некоторые тРНК таковы, что требуют точного спаривания только по первым двум положениям кодона; в третьем положении допускается и неверное спаривание (так называемое *неоднозначное соответствие*).

Нуклеотиды в завершенной цепи нуклеиновой кислоты (подобно аминокислотам в белке, разд. 7.2.8) могут претерпевать ковалентную модификацию, изменяющую биологическую активность данной нуклеиновой кислоты. Особенно много различных модифицированных нуклеотидов встречается в популяции молекул тРНК. Все они возникают в результате ковалентной модификации уже после того, как данная тРНК синтезировалась (несколько примеров такого рода приведено на рис. 5-13). Некоторые необычные нуклеотиды изменяют конформацию антикодона и его способность к спариванию, облегчая тем самым узнавание соответствующего кодона (или кодонов) мРНК молекулой тРНК. Столь же свойствен молекулам тРНК и другой тип

	AGA									UUA					AGC					
	AGG									UUG					AGU					
GCA	CGA							GGA		CUA				CCA	UCA	ACA			GUA	
GCC	CGC							GGC		CUC		AUA		CCC	UCC	ACC			GUC	UAA
GCG	CGG	GAC	AAC	UGC	GAA	CAA		GGG	CAC	CUG	AAA	AUC		CCG	UCG	ACG		UAC	GUG	UAG
GCU	CGU	GAU	AAU	UGU	GAG	CAG		GGU	CAU	CUU	AAG	AUU	AUG	CCU	UCU	ACU	UGG	UAU	GUU	UGA
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ileu	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	Стоп

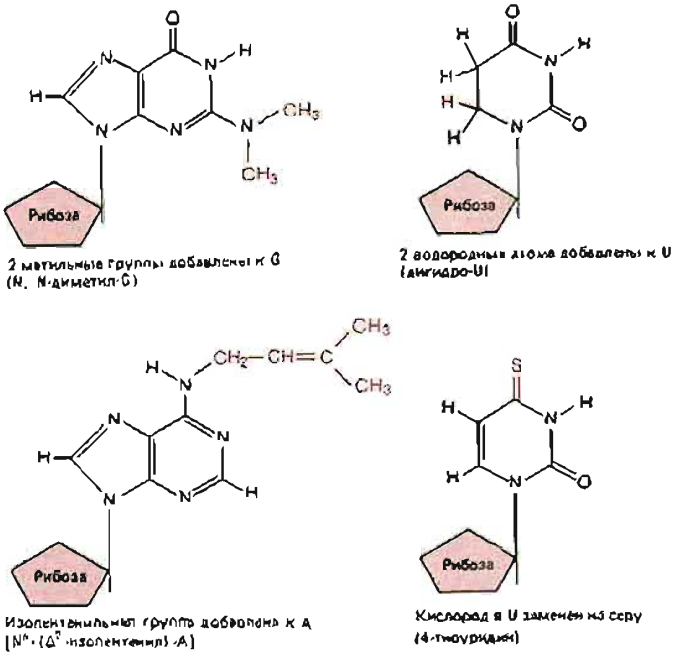


Рис. 5-13. Некоторые необычные нуклеотиды, встречающиеся в молекулах тРНК. Они возникают в результате ковалентной модификации обычного нуклеотида уже после того, как он включился в полинуклеотидную цепь. В большинстве молекул тРНК подобным образом видоизменено приблизительно 10% нуклеотидов (см. рис. 5-5,*А*).

посттранскрипционной модификации: сначала они образуются как часть более длинного РНК-транскрипта, а затем вырезаются из него и особый фермент достраивает их, добавляя к их 3'-концу три нуклеотида – ССА. Процессинг тРНК обоих этих типов встречается как у прокариот, так и у эукариот; процессинг же предшественников мРНК широко распространен только у эукариот (см. гл. 8).

5.1.7. Реакции синтеза белка протекают на рибосомах [6]

Для осуществления реакций белкового синтеза, которые мы только что описали, требуется сложный каталитический аппарат. Растущий конец полипептидной цепи должен, например, определенным образом подстраиваться к молекуле мРНК, для того чтобы каждый последующий кодон в мРНК мог соединиться с молекулой тРНК. Это значит, что растущий конец полипептида должен при добавлении каждой новой аминокислоты продвигаться вперед вдоль цепи мРНК ровно на три нуклеотида. Этот и другие этапы белкового синтеза, оказываются возможными благодаря тому, что синтез осуществляется крупным мультиферментным комплексом – **рибосомой**, построенной из молекул белков и РНК.

Рибосомы эукариот и прокариот очень сходны по своей структуре и функции. Каждая из них состоит из двух субчастиц – большой и малой. В эукариотических рибосомах приблизительно половину их массы составляет РНК; малая субчастица состоит из одной молекулы рибосомной РНК (рРНК), связанной приблизительно с 33 различными рибосомными белками, а в большой субчастице свыше 40 различных рибосомных белков связано с тремя разными молекулами рРНК. Прокариотические рибосомы несколько мельче и содержат меньшее число компонентов (рис. 5-14). В рибосомах обоих типов имеется бороздка, удерживающая растущую полипептидную цепь, и бороздка, удерживающая молекулу мРНК. Длина бороздок такова, что в первой из них умещается примерно 30 аминокислот, а во второй – около 35 нуклеотидов РНК.

5.1.8. Рибосома продвигается шаг за шагом вдоль цепи мРНК [6, 7]

В рибосоме имеется два разных участка, связывающих молекулы тРНК. Один из них удерживает молекулу тРНК, присоединенную к растущему кон-

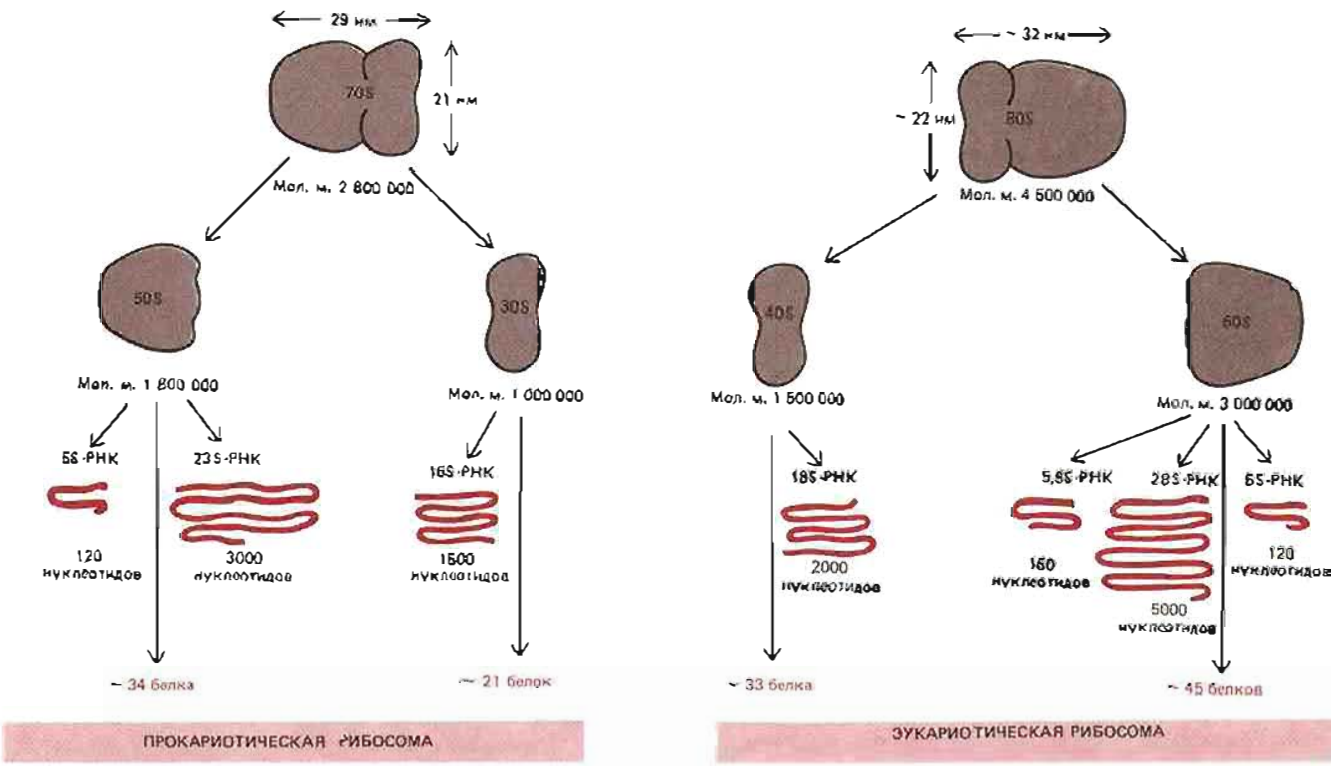
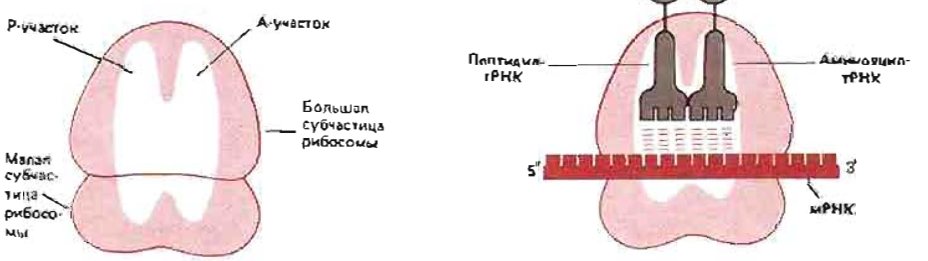


Рис. 5-14. Сравнение структур прокариотических и эукариотических рибосом. Несмотря на различия в структуре, эти рибосомы очень сходны в функциональном отношении.

цу полипептидной цепи; поэтому его называют **пептидил-тРНК-связывающим участком или Р-участком.** Второй служит для удержания только что прибывшей молекулы тРНК, нагруженной аминокислотой; его называют **аминоацил-тРНК-связывающим участком** или А-участком. К обоим участкам молекула тРНК прочно прикрепляется лишь в том случае, если ее антикодон спаривается с комплементарным ему кодоном мРНК. А- и Р-участки располагаются очень близко друг к другу, так что две связанные с ними молекулы тРНК спариваются с двумя соседними кодонами в молекуле мРНК (рис. 5-15).

Процесс наращивания (элонгации) полипептидной цепи на рибосоме может рассматриваться как цикл, слагающийся из трех отдельных этапов (рис. 5-16). На 1-м этапе молекула аминоацил-тРНК связывается со свободным А-участком рибосомы, примыкающим к занятому Р-участку; связывание осуществляется путем спаривания нуклеотидов антикодона с тремя нуклеотидами мРНК, находящимися в А-участке. На 2-м этапе карбоксильный конец полипептидной цепи отделяется в Р-участке от молекулы тРНК и образует пептидную связь с аминокислотой, присоединенной к молекуле тРНК

Рис. 5-15. Схематическое изображение трех главных участков связывания, в которых молекулы РНК присоединяются к рибосоме. Слева представлена ненагруженная рибосома, справа – нагруженная.



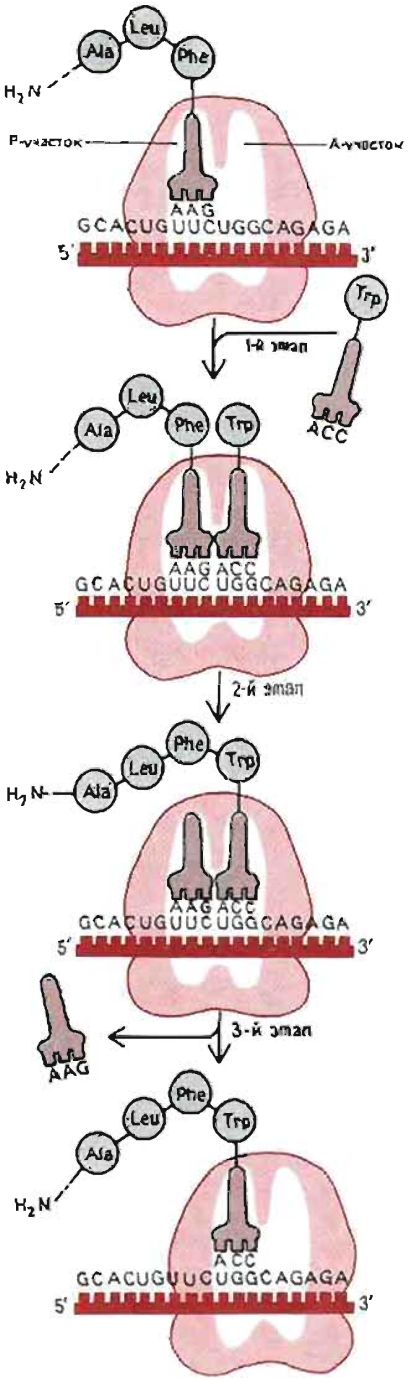


Рис. 5-16. Фаза элонгации в синтезе белка, протекающая на рибосоме. Представленный здесь трехэтапный цикл многократно повторяется во время синтеза белковой цепи. На 1-м этапе молекула аминоацил-тРНК присоединяется к А-участку рибосомы; на 2-м этапе образуется новая пептидная связь; на 3-м этапе рибосома продвигается вдоль цепи мРНК на расстояние, соответствующее трем нуклеотидам, т.е. устанавливается в таком положении, чтобы цикл мог повториться сначала.

в А-участке. Эта реакция катализируется **пептидилтрансферазой** – ферментом, прочно связанным с рибосомой. На 3-м этапе новая пептидил-тРНК переносится в Р-участок рибосомы в то время, как рибосома продвигается вдоль молекулы мРНК ровно на три нуклеотида. Этот этап требует затраты энергии; движущей силой служит для него ряд конформационных изменений, индуцируемых в одном из рибосомных белков гидролизом связанной с ним молекулы GTP (т. 1, разд. 3.4.11). Процесс транслокации, составляющий 3-й этап, включает в себя и возвращение свободной молекулы тРНК, отделившейся от полипептидной цепи в Р-участке во время 2-го этапа, в цитоплазматический пул тРНК. Поэтому после завершения 3-го этапа незанятый А-участок может принять новую молекулу тРНК, нагруженную очередной аминокислотой, т.е. цикл может начаться снова. В бактериальной клетке продолжительность одного цикла элонгации полипептидной цепи составляет при оптимальных условиях около 1/20 с, так что синтез среднего по размерам белка, состоящего из 400 аминокислот, занимает приблизительно 20 с.

В большей части клеток синтез белка – самый энергоемкий из всех биосинтетических процессов. Образование каждой новой пептидной связи сопровождается расщеплением четырех высокоэнергетических фосфатных связей. Две из них расходуются на то, чтобы нагрузить аминокислотой молекулу тРНК (см. рис. 5-7), а две – на сам синтез в двух циклических реакциях, протекающих на рибосоме: при связывании аминоацил-тРНК на 1-м этапе цикла и при транслокации рибосомы на 3-м этапе.

5.1.9. Белковая цепь отделяется от рибосомы, как только она достигает какого-либо одного из трех терминирующих кодонов [6, 8]

Выше уже говорилось о том, что три кодона в мРНК являются **стоп-кодонами**: они останавливают трансляцию. Особый белок, называемый *фактором освобождения*, непосредственно связывается с любым стоп-кодоном (UAA, UAG или UGA), достигшим А-участка рибосомы. Это связывание изменяет активность соседней пептидилтрансферазы. Фермент с такой измененной активностью присоединяет теперь к пептидил-тРНК не свободную аминогруппу аминокислоты, а молекулу воды. Вследствие этого карбоксильный конец растущей полипептидной цепи отделяется от молекулы тРНК. А поскольку растущий полипептид удерживается на рибосоме только посредством его связи с молекулой тРНК, завершенная белковая цепь оказывается свободной и, отделившись от рибосомы, поступает в цитоплазму (рис. 5-17).

5.1.10. Рамка считывания матрицы устанавливается в момент инициации синтеза полипептидной цепи [6, 9]

Теоретически нуклеотидная последовательность РНК может быть декодирована с помощью любой из трех различных рамок считывания, причем образующиеся полипептидные цепи будут в этих трех случаях совершенно разными (см. рис. 3-13, т. 1). Как в действительности пойдет считывание, определяется в тот момент, когда рибосома соединяется с молекулой мРНК, т.е. когда образуется так называемый *инициаторный комплекс*. Сборка этого комплекса на молекуле мРНК происходит в том самом месте, с которого должен начаться синтез полипептидной цепи.

Процесс инициации сложен. Он слагается из ряда этапов, катализируемых

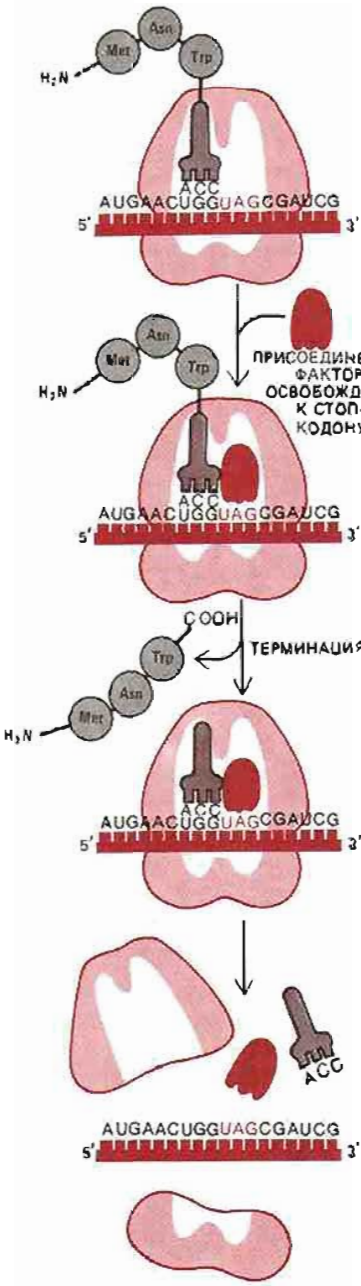


Рис. 5-17. Последняя фаза синтеза белка. Присоединение фактора освобождения к стоп-кодону прекращает трансляцию: завершенный полипептид освобождается, а рибосома распадается на две отдельные субчастицы.

белками, которые носят название факторов инициации; многие из них сами состоят из нескольких полипептидных цепей. В силу этой сложности инициации многие ее детали до сих пор не вполне выяснены. Известно, однако, что каждая рибосома собирается на цепи мРНК из двух отдельных субчастиц. Первой присоединяется малая субчастица. Еще до того, как эта малая субчастица присоединится к мРНК, она нагружается особой инициаторной тРНК, узнающей кодон AUG и несущей метионин. Этот процесс катализируется одним из факторов инициации, а именно *фактором инициации 2*, или *IF-2*. В некоторых эукариотических клетках этот фактор контролирует общую скорость белкового синтеза (см. ниже).

Малая субчастица рибосомы присоединяется к тому участку мРНК, где должен начаться синтез полипептидной цепи, путем спаривания антикодона соединенной с ней инициаторной тРНК со старт-кодоном AUG (рис. 5-18). В молекуле мРНК имеется обычно много триплетов AUG, и каждый из них кодирует метионин. Однако подавляющее их большинство не служит старт-кодонами. Какой из триплетов AUG будет узнан как старт-кодон, зависит от других частей нуклеотидной последовательности мРНК (подробнее об этом будет сказано в разд. 7.2.6).

По завершении процесса инициации все факторы инициации, оставшиеся до этого момента связанными с малой субчастицей рибосомы, отделяются от нее, и теперь к ней может присоединиться большая рибосомная субчастица. Так образуется готовая функциональная рибосома. Молекула инициаторной тРНК оказывается связанной с Р-участком рибосомы, так что синтез белковой цепи может начаться сразу же после присоединения к А-участку рибосомы второй молекулы аминоацил-тРНК (см. рис. 5-18). Далее следуют очередные этапы фазы элонгации белкового синтеза, описанные выше (см. 2-й этап на рис. 5.16).

Поскольку инициаторная тРНК всегда несет аминокислоту метионин или (у прокариот) его аминоформилированное производное, у всех новосинтезированных белковых цепей на аминном конце стоит остаток метионина. Этот метионин не играет обычно никакой роли в функционировании данного белка и вскоре после включения удаляется в результате ограниченного протеолиза вместе с несколькими другими аминокислотными остатками, встречающимися на аминном конце многих белков.

5.1.11. Общая скорость белкового синтеза регулируется у эукариот факторами инициации [10]

Известно (подробнее об этом см. в гл. 11), что клетки многоклеточного организма размножаются только тогда, когда они находятся в соответствующем окружении. Механизм, посредством которого внеклеточные сигналы побуждают клетки расти и делиться, неизвестен, но ясно, что одним из главных эффектов должно быть увеличение общей скорости белкового синтеза (разд. 11.1.4). Чем определяется эта скорость? Прямые исследования на тканях крайне сложны, но если клетки в культуре не получают достаточного количества незаменимых аминокислот, глюкозы или сыворотки, то резко снижается скорость *инициации* синтеза полипептидных цепей, причем можно показать, что это торможение обусловливается инактивацией одного из факторов инициации белкового синтеза, а именно IF-2. Более того, показано, что по крайней мере у одного типа клеток (в незрелых эритроцитах) активность IF-2 снижается контролируемым образом в результате фосфорилирования одной из трех его белковых субъединиц. Можно предположить поэтому, что скорость белкового синтеза у эукариот регулируется в известной степени специфическими протеинкиназами, которые в своей активной форме тормозят инициацию этого синтеза. Возможно, что какие-то не известные нам ростовые сигналы в тканях заставляют клетки размножаться, инактивируя эти протеинкиназы, если клетки оказываются в подходящем для этого окружении.

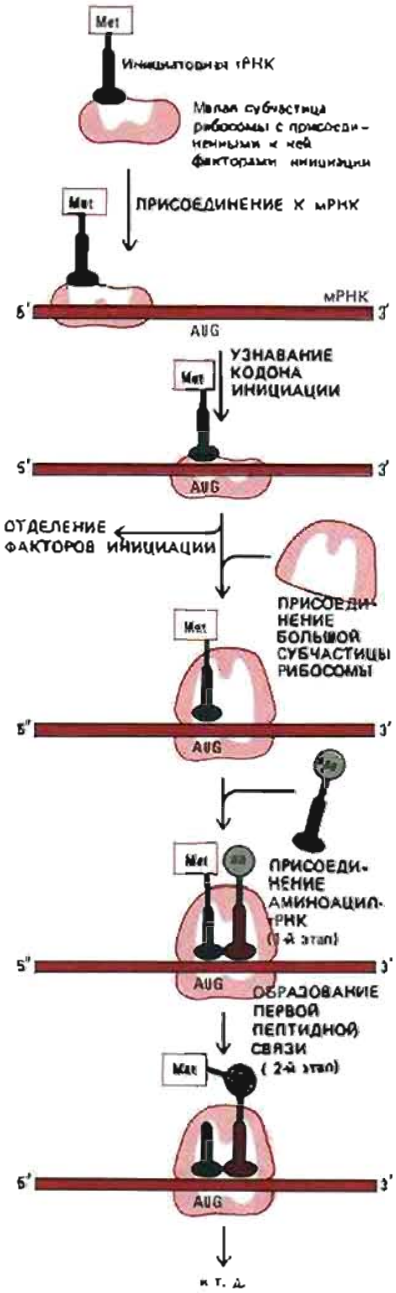


Рис. 5-18. Фаза инициации в синтезе белка. Здесь представлена последовательность событий, свойственная эукариотам, но очень сходный процесс протекает и у бактерий. Этапы 1 и 2 относятся к фазе элонгации (см. рис. 5-16).

У эукариот факторы инициации, необходимые для синтеза белка, более многочисленны и более сложны, нежели у прокариот, хотя и у тех и у других они выполняют одни и те же основные функции. Многочисленные дополнительные компоненты, возможно, представляют собой регуляторные белки, координирующие рост клеток в многоклеточном организме эукариот путем регуляции синтеза белка.

5.1.12. Многие ингибиторы белкового синтеза прокариот – эффективные антибиотики [11]

Многие из наиболее эффективных антибиотиков, применяемых в современной медицине, действуют, подавляя в бактериальных клетках синтез белка. Ряд таких лекарственных препаратов создан с учетом структурных и функциональных различий между рибосомами прокариот и эукариот. Именно в силу избирательности их действия эти соединения часто можно назначать человеку в относительно высоких концентрациях, не опасаясь токсических эффектов. Разные антибиотики связываются с различными белковыми субкомплексами бактериальных рибосом и поэтому часто ингибируют разные этапы процесса синтеза. В табл. 5-1 перечислены наиболее известные соединения этой группы и указано их специфическое действие. В таблицу включены также и некоторые другие часто применяемые ингибиторы белкового синтеза, в том числе и такие, которые действуют только на эукариотические клетки. Поскольку их можно применять для того, чтобы блокировать определенные этапы процессов, осуществляющих передачу генетической информации от ДНК к белку, эти соединения находят широкое применение в различных биохимических и цитологических исследованиях.

Таблица 5-1. Ингибиторы синтеза белка или РНК

Ингибитор	Специфический эффект
Действует только на клетки прокариот[1]	
Тетрациклин	Блокирует связывание аминоацил-тРНК с А-участком рибосомы
Стрептомицин	Препятствует переходу от инициаторного комплекса к рибосоме, осуществляющей удлинение цепи
Хлорамфеникол	Блокирует пептидилтрансферазную реакцию на рибосомах (2-й этап на рис. 5-16)
Эритромицин	Блокирует реакцию транслокации на рибосомах (3-й этап на рис. 5-16)
Рифамицин	Блокирует инициацию цепей РНК, присоединяясь к РНК-полимеразе (препятствует синтезу РНК)
Действует на клетки прокариот и эукариот	
Пуромицин	Присоединяясь к растущему концу синтезируемой полипептидной цепи, вызывает ее преждевременное отделение от рибосомы
Актиномицин D	Связывается с ДНК и блокирует перемещение РНК-полимеразы (препятствует синтезу РНК)
Действует только на клетки эукариот	
Циклогексимид	Блокирует пептидилтрансферазную реакцию на рибосомах (2-й этап на рис. 5-16)
α-Аманитин	Блокирует синтез мРНК вследствие преимущественного связывания с РНК-полимеразой II

[1] Рибосомы в митохондриях (и хлоропластах) эукариот по своей чувствительности к ингибиторам часто близки к рибосомам прокариот.

Заключение

Для того чтобы мог начаться синтез какого-нибудь определенного белка, в ядре должна образоваться соответствующая мРНК (путем транскрипции ДНК), которая затем должна перейти в цитоплазму клетки. После этого вступает в действие сложный механизм. Процесс начинается с присоединения малой рибосомной субчастицы к молекуле мРНК. Особая инициаторная тРНК связывает малую рибосомную субчастицу со специальным старт-кодоном на мРНК. Присоединение большой субчастицы завершает сборку рибосомы. Далее следует фаза элонгации. Каждая очередная аминокислота присоединяется к карбоксильному концу растущего полипептида с помощью циклического процесса, состоящего из трех последовательных этапов: связывания аминоацил-тРНК, образования пептидной связи и транслокации рибосомы. Рибосома перемещается вдоль молекулы мРНК в направлении 5′→3′ от одного кодона к другому до тех пор, пока не будет достигнут какой-либо из трех стоп-кодонов. К этому стоп-кодону присоединяется затем фактор освобождения, останавливающий трансляцию и вызывающий отделение завершенного полипептида от рибосомы.

Молекула аминоацил-тРНК играет роль декодирующего устройства, при помощи которого каждая данная последовательность из трех рибонуклеотидов в мРНК транслируется однозначно, т. е. во вновь синтезируемый белок включается только строго определенная аминокислота. Подгонка каждой из 20 аминокислот к соответствующему кодону осуществляется в двухэтапном процессе узнавания: на первом этапе аминокислота узнается особой аминоацил-тРНК-синтетазой, которая присоединяет ее к специфической тРНК; на втором этапе определенная последовательность из трех нуклеотидов в мРНК узнается антикодоном молекулы тРНК. Для каждой аминокислоты имеется по меньшей мере одна специфическая аминоацил-тРНК-синтетаза и по меньшей мере одна специфическая тРНК.

5.2. Механизмы репарации ДНК [12]

В то время как шансы на долговременное выживание вида могут возрастать вследствие изменений в его генетической конституции, для его кратковременного выживания, безусловно, необходимо, чтобы генетическая информация надежно сохранялась. Для поддержания такого постоянства генетического материала требуется не только чрезвычайно точный механизм для однократного копирования нуклеотидных последовательностей ДНК в каждом новом клеточном поколении, но и механизм для репарации многочисленных повреждений, спонтанно возникающих в ДНК. Однако, прежде чем говорить об этих механизмах репликации и репарации ДНК, коснемся вкратце вопроса о том, насколько точно воспроизводятся нуклеотидные последовательности ДНК из поколения в поколение.

5.2.1. Высокая надежность сохранения нуклеотидных последовательностей ДНК [13]

Темп изменений в нуклеотидных последовательностях ДНК (частоту мутаций) удается определять только косвенным путем. Один из способов состоит в сравнении аминокислотных последовательностей одного и того же белка у нескольких биологических видов. Долю аминокислот, которые окажутся при этом различными, сопоставляют затем с числом лет, прошедших с того момента, как два данных вида дивергировали в процессе эволюции от общего предка (этот срок оценивают на основе данных палеонтологической летописи). Исходя из этого, можно вычислить среднее число лет, необходимое для того, чтобы какое-либо стойкое изменение затронуло 1% всех аминокислот данного белка. Поскольку каждое такое изменение отражает, как правило, одиночное изменение в нуклеотидной последовательности гена, кодирующего

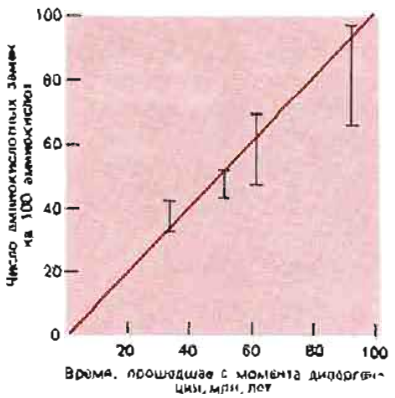


Рис. 5-19. Частота возникновения аминокислотных замен в процессе эволюции фибринопептидов.

этот белок, мы тем самым узнаем и среднее число лет, требующееся для возникновения в данном гене одной стабильной мутации.

Такого рода определения дают нам всегда заниженные оценки истинной частоты мутаций, поскольку некоторые мутации, нарушающие функцию данного белка, исчезают из популяции под давлением отбора. Есть, однако, среди изученных белков одно семейство, для которого это возражение почти не имеет силы. Это так называемые **фибринопептиды** – фрагменты из 20 аминокислотных остатков, отщепляемые от белка *фибриногена*, когда он при свертывании крови, активируясь, превращается в *фибрин*. Фибринопептиды не выполняют никакой прямой функции, а потому они толерантны почти ко всем возможным аминокислотным заменам. Анализ фибринопептидов (рис. 5-19) показывает, что белок среднего размера, состоящий из 400 аминокислот, изменяется случайным образом в результате одной аминокислотной замены приблизительно каждые 200 000 лет. Позже, с разработкой методов определения нуклеотидных последовательностей ДНК (т. 1, разд. 4.5.4), появилась возможность выявлять степень сходства нуклеотидных последовательностей ДНК в гомологичных некодирующих участках генома у разных видов млекопитающих. Полученные таким путем оценки частоты мутаций прекрасно согласуются с теми, какие дает анализ фибринопептидов.

5.2.2. Частоты спонтанных мутаций, определенные прямым методом, совпадают с оценками, полученными на основе эволюционных исследований [14]

Частоту ошибок, возникающих при репликации ДНК, можно оценить более прямым способом, исходя из темпа, с каким появляются спонтанные изменения в геноме растущих клеток. Для этого либо определяют частоту возникновения новых мутантов в очень больших популяциях животных (например, у плодовой мушки или в колониях мышей), либо проводят скрининг с целью выявить изменения в активности определенных ферментов у клеток, растущих в культуре. Хотя такие оценки носят лишь приближенный характер, они в обоих случаях согласуются с представлением о том, что при репликации на 10^9 пар оснований (в среднем) происходит одна ошибка, т.е. одна замена пары оснований. У млекопитающих это соответствует приблизительно трем заменам на гаплоидный геном в каждом клеточном поколении. Следовательно, для того чтобы в гене, кодирующем средний по размерам белок и насчитывающем примерно 10^3 кодирующих пар оснований, могла возникнуть мутация, требуется около 10^6 клеточных поколений. Эта величина вполне удовлетворительно согласуется с оценкой, полученной на основе эволюционных исследований, согласно которой мутация в среднем гене возникает один раз каждые 200 000 лет, если исходить приблизительно из пяти клеточных поколений в год в среднем зародышевом пути (от родительского яйца до дочернего яйца).

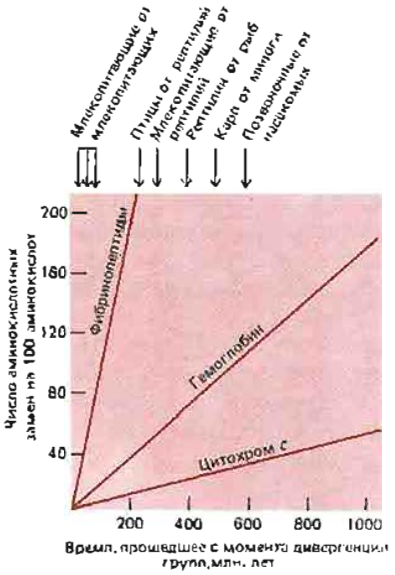


Рис. 5-20. Сравнение частот аминокислотных замен в гемоглобине и цитохроме *c* с соответствующей величиной для фибринопептидов. Гемоглобин и цитохром *c* изменяются в процессе эволюции гораздо медленнее, чем фибринопептиды.

5.2.3. Большинство мутаций, изменяющих белки, вредны и элиминируются естественным отбором [13]

Если число различий в аминокислотном составе одного и того же белка у двух разных биологических видов представить как функцию времени, прошедшего с момента дивергенции этих видов, то мы получим прямую линию. Иными словами, чем длиннее период, прошедший с момента дивергенции, тем больше число таких различий. Для удобства наклон прямой может быть охарактеризован через единицу эволюционного времени для данного белка (среднее время, необходимое для того, чтобы в последовательности из 100 аминокислот появилась одна аминокислотная замена). Сделав это для разных белков, мы убедимся в том, что каждый из них характеризуется своей особой скоростью эволюции (рис. 5-20). Поскольку все пары оснований подвержены случайным мутациям в равной мере, эти данные доказывают, что изменения

Таблица 5-2. Наблюдаемые скорости изменения аминокислотных последовательностей в различных белках на протяжении эволюционного времени

Белок	Единица эволюционного времени[1], млн. лет
Фибринопептид	1,2
Гемоглобин	6,1
Цитохром *c*	21
Гистон H4	600

[1] Единица эволюционного времени – среднее время, необходимое для того, чтобы в данном белке на каждые 100 содержащихся в нем аминокислот могла появиться одна *приемлемая* аминокислотная замена.

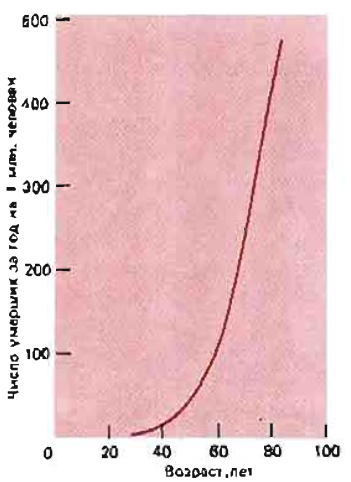


Рис. 5-21. Смертность от рака толстого кишечника в США в зависимости от возраста. Экспоненциальный рост кривой показывает, что для появления раковой клетки этого типа требуется несколько независимых друг от друга генетически обусловленных событий.

в аминокислотной последовательности нарушают функцию у одних белков гораздо сильнее, чем у других. Цифры, приведенные в табл. 5-2, позволяют считать, что в гемоглобине вредными оказываются примерно 4 из каждых 5 случайных аминокислотных замен, в цитохроме *c* – 17 из каждых 18, тогда как в гистоне H4 почти все аминокислотные замены вредны. Можно думать, что носители таких вредных мутаций элиминируются из популяции под действием естественного отбора.

5.2.4. Наблюдаемые низкие частоты мутаций необходимы для жизни [15]

Элиминирование мутантных белков показывает, что ни один биологический вид не может позволить себе быстро накапливать мутации в своих зародышевых клетках. Однако и соматические клетки тоже должны быть защищены от генетических изменений. Нуклеотидные замены в соматических клетках могут, например, привести к неконтролируемому размножению клеток, т.е. к развитию рака, на долю которого в Западном полушарии приходится около 20% всех преждевременных смертей. В пользу того, что эти смерти вызваны главным образом накоплением изменений в нуклеотидных последовательностях ДНК соматических клеток, говорят следующие наблюдения:

1. Почти все раковые опухоли возникают как клоны клеток, происходящих от одной аномальной клетки.
2. Большинство веществ, канцерогенных для человека (или продуктов их метаболических превращений), повышает частоту мутаций у бактерий.
3. Есть группа генетических болезней человека (например, *пигментная ксеродерма*), связанных с недостаточностью определенного фермента, участвующего в репарации ДНК (разд. 5.2.7). У лиц, страдающих этими болезнями, значительно чаще возникает рак кожи, вызываемый повреждением ДНК под действием ультрафиолетовых лучей.
4. Частота раковых заболеваний резко возрастает с возрастом. Анализ статистических данных показывает, что появлению раковой клетки в данной клеточной линии должны предшествовать от трех до шести независимых случайных событий (каждое из которых предположительно представляет собой ту или иную мутацию) (рис. 5-21).

Позже мы обсудим, почему при наблюдаемой частоте мутаций число необходимых белков, которые могут быть закодированы в клетках зародышевого пути любого организма, не должно превышать 30 000 (разд. 8.1.15). Если бы частота мутаций была в 10 раз выше, в силу той же причины организм должен был бы довольствоваться 3000 белков. В этом случае эволюция, очевидно, не пошла бы дальше организмов, стоящих по степени сложности ниже плодовой мушки.

Таким образом, и для сохранения вида, имеющего 30 000 белков (т.е. для стабильности зародышевых клеток), и для предотвращения рака, возникающего как результат мутаций в соматических клетках (т.е. для стабильности соматических клеток), эукариотам совершенно необходима высокая точность воспроизведения нуклеотидных последовательностей ДНК.

5.2.5. Низкие частоты мутаций означают, что родственные организмы построены практически из одних и тех же белков [13]

Человек как род, отличный от крупных человекообразных обезьян, возник всего несколько миллионов лет назад. В каждом гене, следовательно, могло произойти за это время лишь сравнительно немного нуклеотидных замен, причем большинство из них естественный отбор должен был элиминировать. Значительная часть нашего генетического наследия сформировалась, несомненно, задолго до появления *Homo sapiens* в процессе эволюции млекопитающих (начавшейся приблизительно $3 \cdot 10^8$ лет назад) и даже ранее. Неудиви-

тельно поэтому, что у таких филогенетически далеких млекопитающих, как кит и человек, белки очень сходны. Эволюционные изменения, породившие резкие морфологические различия между млекопитающими, должны были осуществить это при поразительно малых изменениях в том материале, из которого все мы построены.

5.2.6. Без коррекции спонтанные повреждения в ДНК быстро изменили бы ее нуклеотидные последовательности [16]

Физик Эрвин Шрёдингер в 1945 г. высказал мнение, что ген независимо от его химической природы (а она в то время еще не была известна) должен быть крайне мал – не более нескольких атомов. В противном случае, полагал Шрёдингер, огромное число генов, необходимое, как считалось, каждому организму, не могло бы уместиться в клеточном ядре. Было ясно, однако, что при столь малых размерах ген должен быть подвержен значительным изменениям вследствие спонтанных реакций, обусловленных беспорядочными тепловыми соударениями с окружающими молекулами. Возникала, таким образом, серьезная дилемма, поскольку генетические данные свидетельствовали о том, что вещество генов весьма стабильно и спонтанные изменения (мутации) происходят в нем чрезвычайно редко.

Эта шрёдингеровская дилемма вполне реальна. Молекулы в гене действительно претерпевают значительные изменения, связанные с тепловыми флуктуациями. Мы знаем, например, что ДНК каждой клетки человеческого организма теряет за сутки около 5000 пуриновых оснований (остатков аденина и гуанина) вследствие термального разрыва N-гликозидных связей между пурином и дезоксирибозой (процесс *апуринизации*). Аналогичный пример составляют спонтанно происходящие в ДНК реакции дезаминирования цитозина в урацил, частота которых, согласно оценкам, достигает 100 на один ген в сутки (рис. 5-22). Содержащиеся в ДНК основания изменяются также под влиянием реакционноспособных метаболитов, нарушающих их нормальное спаривание, а также под действием ультрафиолетовой радиации Солнца, которая может вызвать образование ковалентной связи между двумя соседними остатками тимина в ДНК (образование *димеров тимина*). Все перечисленное выше – это лишь небольшая часть тех многочисленных изменений, которые происходят спонтанно в нашей ДНК. Большинство из них должно было бы привести либо к выпадению одной или нескольких пар оснований в дочерней

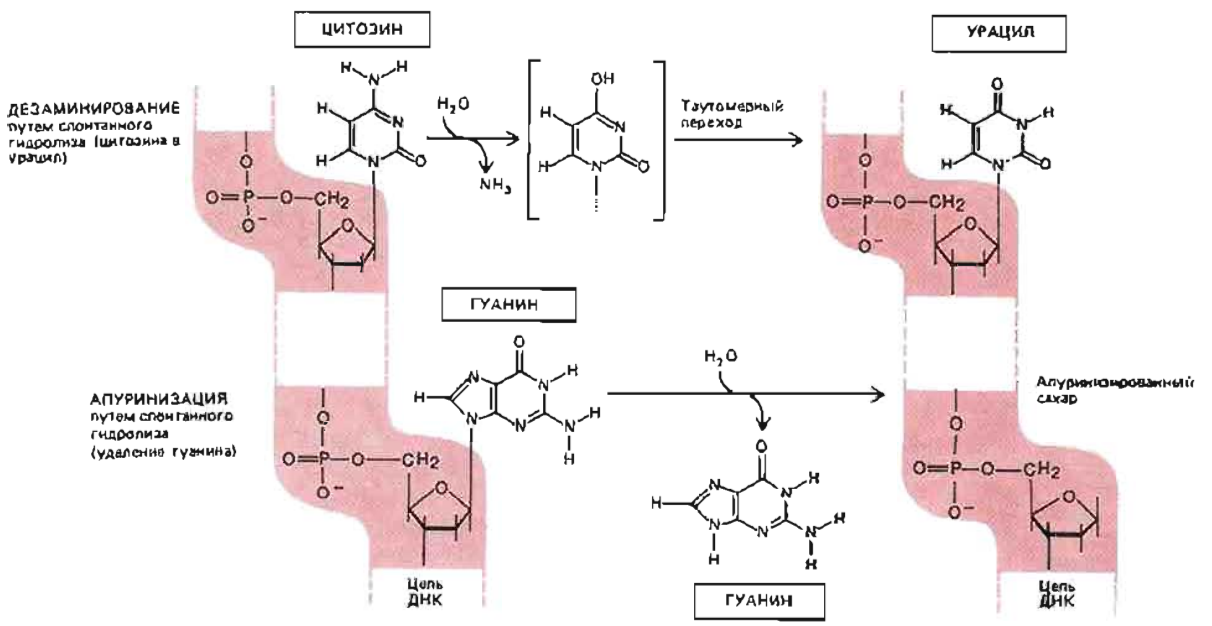


Рис. 5-22. Дезаминирование и апуринизация – две часто встречающиеся спонтанные химические реакции, вызывающие в клетках серьезное повреждение ДНК. Здесь приведено лишь по одному примеру реакций этих двух типов.

цепи ДНК после цикла репликации, либо к замене пары оснований (например, каждое дезаминирование C → U должно было бы вызвать в конце концов замену пары C—G на пару T—A, поскольку U ведет себя сходно с T и образует комплементарную пару с A; см. рис. 3-6, т. I). Как мы уже знаем, такие изменения имели бы роковые последствия для живых организмов.

5.2.7. Стабильность генов обеспечивается репарацией ДНК [17]

Хотя в ДНК любой клетки человека под влиянием тепловой энергии происходят ежедневно тысячи случайных изменений, за год в каждой клетке накапливается (если только вообще накапливается) лишь очень небольшое число стабильных изменений нуклеотидной последовательности ДНК. Объясняется это тем, что такого рода повреждения очень эффективно ликвидируются посредством процесса, известного как **репарация ДНК**. Все различные репарационные механизмы основаны на том, что в клетке существуют две копии генетической информации – по одной в каждой из двух цепей двойной спирали ДНК. Как видно из схемы на рис. 5-23, измененный участок поврежденной цепи распознается и удаляется при помощи одного набора ферментов, а затем замещается новым, точно таким же, как до повреждения, под действием другого фермента – *ДНК-полимеразы* (разд. 3.2.3, т. I), копирующей информацию, содержащуюся в «хорошей» цепи ДНК, путем комплементарного спаривания оснований. В заключение фермент, называемый *ДНК-лигазой*, сшивает разрыв, оставшийся в спирали ДНК, и тем самым завершает восстановление интактной цепи ДНК.



Рис. 5-23. Репарация ДНК – удаление поврежденного участка и восстановление правильной структуры. Восстановление включает два этапа: заполнение ДНК-полимеразой бреши, возникшей вследствие удаления поврежденной части цепи, и сшивание ДНК-лигазой разрыва, оставшегося в «исправленной» цепи. Сшивание осуществляется путем восстановления разорванной фосфодиэфирной связи.

Чаще всех прочих встречаются в ДНК повреждения, вызванные **апуринизацией**. Этот тип повреждений исправляется весьма эффективно таким способом, как показано на рис. 5-24. Сначала одна из репарационных нуклеаз распознает участок цепи ДНК, в котором недостает основания, и разрывает в этом измененном участке фосфодиэфирную связь. Затем вместе с поврежденным нуклеотидом вырезается и еще несколько нуклеотидов, примыкавших к первоначальному месту разрыва. После этого правильная последовательность нуклеотидов в ДНК восстанавливается так, как показано на рис. 5-23.

Другой крайне важный путь репарации связан с участием особого набора ферментов, называемых **ДНК-гликозилазами**. Каждый из этих ферментов узнает какой-либо один определенный тип измененных оснований в ДНК и катализирует гидролитическое отщепление такого основания от дезоксирибозы (рис. 5-25). Существует, как полагают, не менее 20 различных ферментов, входящих в эту группу. Среди них имеются ферменты, удаляющие дезаминированный цитозин, дезаминированный аденин, алкилированные основания различных типов, основания с разомкнутым кольцом и основания, в которых двойная углерод-углеродная связь заменена простой.

Общий для всех случаев механизм проиллюстрирован на рис. 5-26 конкретным примером. Здесь представлено удаление дезаминированного цитозина. Сначала фермент урацил-ДНК-гликозилаза удаляет измененное основание. Затем другой фермент (тот самый, который узнает апуринизированные участки ДНК) узнает остаток сахара, утративший бывшее при нем основание, и разрывает фосфодиэфирный остов в этом участке ДНК. После того как при помощи еще одного фермента будет удален поврежденный остаток вместе с ближайшими его соседями в той же цепи, ДНК-полимераза завершает дело, катализируя репаративный синтез ДНК. В итоге U, возникший в результате случайного дезаминирования, вновь замещается на C, т.е. восстанавливается нормальная нуклеотидная последовательность (рис. 5-26).

Важность процесса удаления из ДНК случайно дезаминированных оснований удалось продемонстрировать непосредственно на двух примерах. Первый из них касается бактериальных мутантов, у которых вследствие мутации отсутствует фермент урацил-ДНК-гликозилаза. Выяснилось, что у таких мутантов частота спонтанных замен C—G на T—A (в норме низкая) возрастает приблизительно в 20 раз. Второй пример связан с тем обстоятельством, что

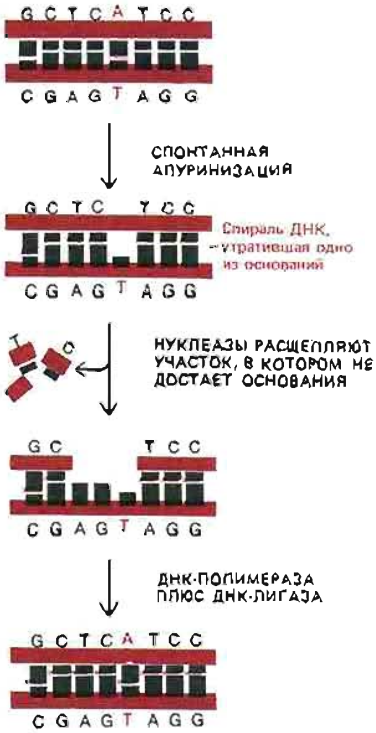


Рис. 5-24. Репарация участка, в котором произошла апуринизация,—одно из наиболее часто встречающихся спонтанных повреждений ДНК. Удалению участка, в котором отсутствует одно из оснований, предшествует узнавание этого участка: после того как фосфодиэфирная связь будет здесь разорвана, репарационные нуклеазы удалят и несколько соседних нуклеотидов, как показано на схеме. Далее следуют этапы, представленные на рис. 5-23.

Рис. 5-25. Реакция, которую способны катализировать все ДНК-гликозилазы. Есть много различных ДНК-гликозилаз; каждая из них узнает какой-либо один тип измененных оснований.

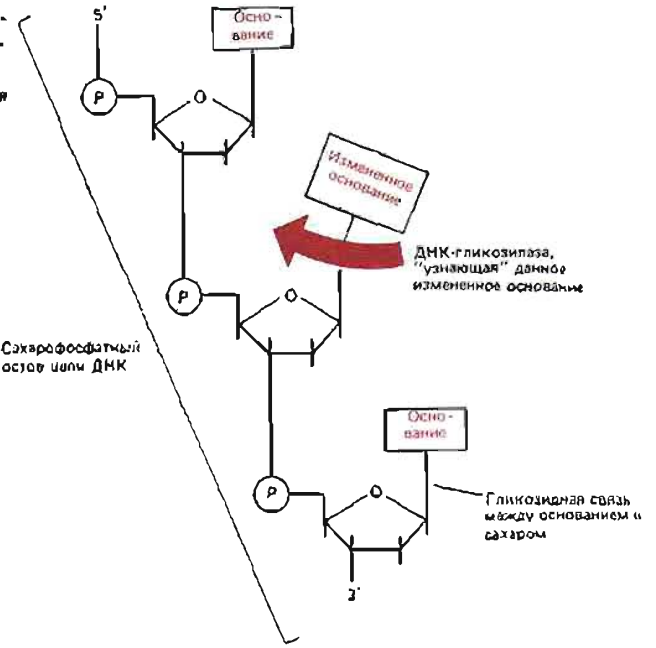




Рис. 5-26. Путь репарации с участием урацил-ДНК-гликозилазы. Так вновь образуется в цепи ДНК цитозин после его случайного дезаминирования.

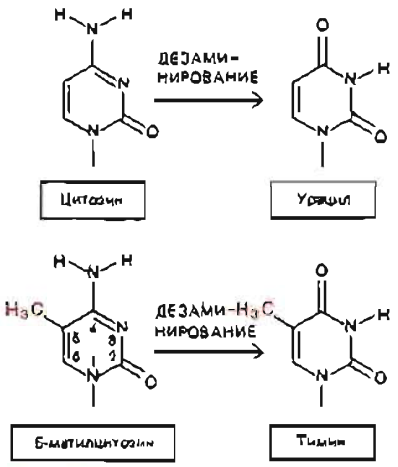


Рис. 5-27. При дезаминировании метилированного остатка цитозина в цепи ДНК образуется не урацил, а тимин, который урацил-ДНК-гликозилаза не способна распознать и удалить.

некоторые остатки цитозина обычно подвергаются метилированию, и потому в определенных участках нуклеотидной последовательности ДНК стоит 5-метилцитозин. (Это свойственно как бактериям, так и эукариотическим клеткам.) При изучении одного из бактериальных генов выяснилось, что подобные метилирования повышают вероятность возникновения мутации в метилированном участке. Этот феномен связывают с тем, что спонтанное дезаминирование 5-метил-С приводит не к U, а к T, который в отличие от U является нормальным компонентом ДНК. Именно по этой причине такие случаи дезаминирования цитозина клеточная урацил-ДНК-гликозилаза не узнает и репарации соответственно не происходит (рис. 5-27).

Поскольку различные ДНК-гликозилазы узнают очень широкий спектр повреждений, связанных с изменением оснований в ДНК, большинство аномальных оснований быстро удаляется. Возникает участок, в котором основание утрачено. Все такие участки претерпевают затем репарацию. Осуществляет ее та же эффективная репарационная система, которая восстанавливает основания ДНК, утраченные в процессе апуринизации.

В клетках имеется особый многоэтапный путь для удаления почти любого типа повреждения в ДНК, затрагивающего очень большой ее участок. Такие обширные повреждения возникают, например, при ковалентных взаимодействиях между основаниями ДНК и объемистыми углеводородами, в частности бензпиреном, обладающим канцерогенными свойствами. К ним же относятся и димеры тимина, возникающие под действием солнечных лучей. В подобных случаях крупный мультиферментный комплекс узнает не какое-либо одно специфическое изменение основания, а обширное повреждение двойной спирали ДНК. На первом этапе происходит расщепление фосфодиэфирного остова ДНК рядом с поврежденным местом, на втором – удаление поврежденного участка и ресинтез ДНК в том месте, где произошло повреждение (см. рис. 5-23).

О значении этих репарационных процессов для жизни свидетельствует то, что клетки затрачивают большую долю своих ресурсов на производство репарационных ферментов. Генетический анализ больных с пигментной ксеродермой показал, например, что у человека не менее пяти различных ферментов принимают участие в удалении одних только обширных повреждений в ДНК. Значительно более широкие исследования такого рода удалось провести на дрожжах. При этом было выявлено свыше 50 различных типов ферментов, участвующих в репарации ДНК. В любой дрожжевой клетке все эти ферменты постоянно держат ее ДНК под контролем.

5.2.8. Особенности структуры и химические свойства двойной спирали ДНК облегчают ее репарацию

Описанный нами механизм, осуществляющий удаление дезаминированных остатков цитозина (рис. 5-26), не мог бы функционировать, если бы четвертым нуклеотидом в ДНК был урацил, а не тимин (т.е. не 5-метилурацил). Спонтанное дезаминирование C дает U, и потому фермент, узнающий и удаляющий такие случайно возникшие остатки U, наряду с ними удалял бы и остатки U, которые были бы нормальными компонентами этой ДНК (рис. 5-28). Аналогичным образом обстоит дело и в другом случае. Простейший пурин, специфически спаривающийся с C, – это гипоксантин, с которым C образует две водородные связи. Но гипоксантин является непосредственным продуктом дезаминирования A (рис. 5-28). Добавив к гипоксантину вторую аминогруппу и образовав тем самым гуанин, эволюция создала пару оснований G—C с тремя водородными связями. Благодаря этому пурины A и G при спонтанном дезаминировании не превращаются друг в друга. Таким образом, любое возможное дезаминирование в ДНК ведет к появлению необычного основания, которое именно в силу своей необычности может быть сразу же распознано и удалено специальной ДНК-гликозилазой (рис. 5-28).

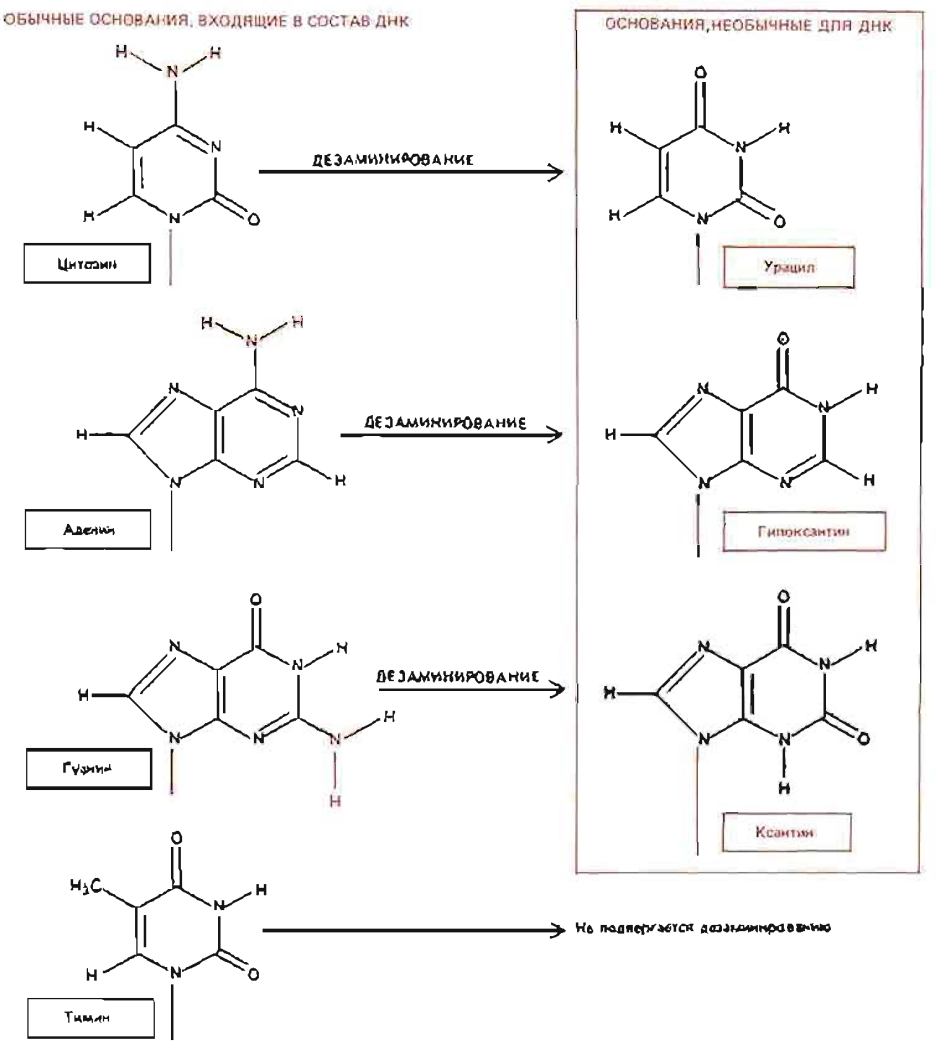


Рис. 5-28. Продукты спонтанного дезаминирования различных оснований ДНК. Все эти продукты дезаминирования необычны в составе ДНК и распознаются именно по этой причине.

Итак, сама химическая природа оснований гарантирует, что дезаминирование не останется незамеченным. Однако точная репарация (а вместе с тем и радикальное решение шрёдингеровской дилеммы) зависит от существования двух отдельных копий генетической информации, каждая из которых представлена одной из двух цепей двойной спирали ДНК. Лишь в случае крайне маловероятного события, а именно одновременного повреждения обеих членов одной и той же пары оснований, в клетке не окажется ни одной правильной копии, которая могла бы служить матрицей для репарации ДНК.

Генетическая информация может также храниться в одноцепочечной ДНК, и некоторые очень мелкие вирусы обладают одноцепочечными геномами. Однако такая ДНК не поддается репарации, поэтому частота мутаций у этих вирусов весьма велика. Лишь организмы с совсем крошечными геномами могут позволить себе хранить генетическую информацию не в двойной спирали ДНК, а в иных структурах.

Заключение

Судить о надежности сохранения нуклеотидных последовательностей ДНК у высших эукариот можно, исходя из скорости изменения аминокислотных последовательностей второстепенных белков и нуклеотидных последовательностей ДНК на протяжении эволюционного времени. Эта надежность столь

велика, что за год в геноме млекопитающего, насчитывающем $3 \cdot 10^9$ пар оснований, в среднем происходит всего лишь около 15 замен оснований, затрагивающих зародышевый путь. В то же время в геноме такого размера из-за неизбежных процессов химического распада ежедневно повреждаются тысячи нуклеотидов ДНК. Генетическая информация может надежно храниться в нуклеотидных последовательностях ДНК лишь потому, что широкий набор различных репарационных ферментов осуществляет непрерывный «осмотр» ДНК и удаляет из нее поврежденные нуклеотиды.

Процесс репарации ДНК основан на том, что генетическая информация представлена в ДНК двумя копиями—по одной копии в каждой из двух цепей двойной спирали ДНК. Благодаря этому случайное повреждение в одной из цепей может быть удалено репарационным ферментом и данный участок цепи ресинтезирован в своем нормальном виде за счет информации содержащейся в неповрежденной цепи.

5.3. Механизмы репликации ДНК [18]

Живые организмы должны не только поддерживать целостность нуклеотидных последовательностей ДНК путем репарации ДНК, но еще и очень точно воспроизводить свою ДНК перед каждым клеточным делением. При **репликации** ДНК скорость полимеризации колеблется в пределах от 500 нуклеотидов в 1 с у бактерий приблизительно до 50 нуклеотидов у млекопитающих. Ясно, что ферменты, катализирующие процесс репликации, должны работать и точно, и быстро. Быстрота и точность достигаются с помощью особого мультиферментного комплекса, направляющего процесс репликации. Этот комплекс, состоящий из нескольких различных белков, представляет собой сложный и совершенный «аппарат репликации».

5.3.1. Репликация ДНК, как и ее репарация, основана на комплементарном спаривании оснований [19]

Матричная активность ДНК проявляется в том, что ее нуклеотидная последовательность копируется (целиком или частично) путем комплементарного спаривания оснований (A с T или U и G с C) в виде комплементарной последовательности нуклеотидов ДНК или РНК. Процесс этот предполагает узнавание каждого нуклеотида в ДНК свободным (неполимеризованным) комплементарным нуклеотидом и обязательное разделение (хотя бы на время) двух цепей спирали ДНК, с тем чтобы в каждом основании группы, играющие роль доноров и акцепторов при образовании водородных связей, оказались доступными для осуществления комплементарного спаривания оснований. Таким образом, соответствующие одиночные нуклеотиды (A, G, C или T) выстраиваются в определенном порядке вдоль матричной цепи ДНК для ферментативной полимеризации, продуктом которой является новая полинуклеотидная цепь. В 1956 г. был открыт первый фермент, катализирующий процесс полимеризации нуклеотидов; он был назван **ДНК-полимеразой**. Было показано, что субстратами ДНК-полимеразы служат дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, полимеризующиеся на одноцепочечной ДНК-матрице (двухступенчатый механизм этой полимеризации представлен на рис. 5-29). Выше мы уже познакомились с тем, как этот фермент функционирует при репарации ДНК (рис. 5-23).

Во время репликации ДНК каждая из двух старых цепей ДНК служит матрицей для образования новой цепи. Поэтому чрезвычайно длинная нуклеотидная последовательность клеточной ДНК реплицируется, как это принято называть, «полуконсервативно», и каждая из двух дочерних клеток получает при клеточном делении новую двойную спираль ДНК, состоящую из одной старой и одной новой цепи (см. т. 1, рис. 3.11).

Радиоавтографические исследования, проведенные в начале 1960-х годов на целых реплицирующихся хромосомах, меченных импульсной меткой (^{3}H-

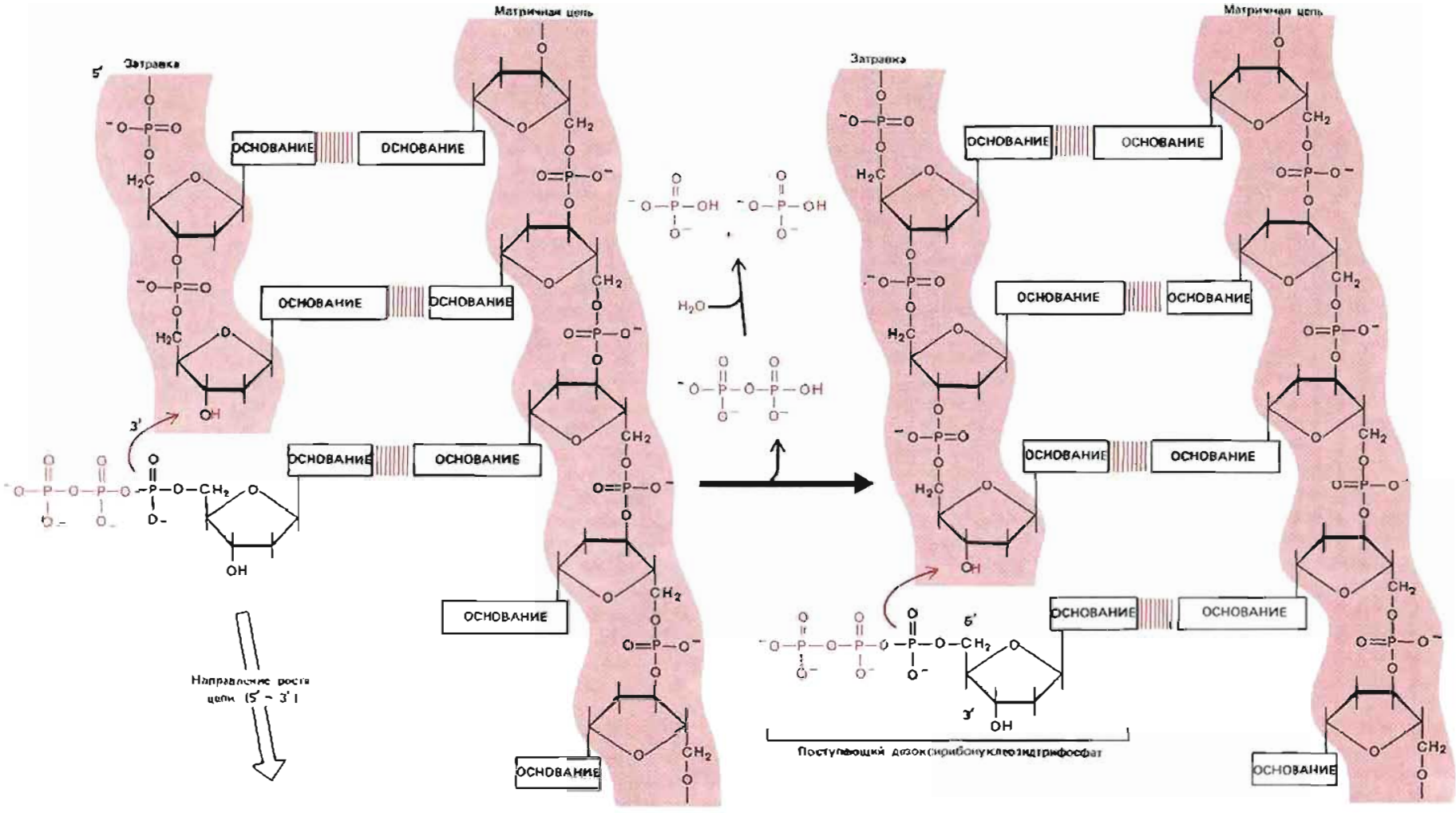


Рис. 5-29. Две последовательные стадии реакции, катализируемой ДНК-полимеразой. Движущей силой этой реакции служит гидролиз пирофосфата, высвобождающегося при добавлении к цепи каждого нового нуклеотида (т. 1, разд. 2.4.2). Нуклеотиды отбираются, как показано, по одному путем спаривания оснований с матричной цепью и затем при помощи ДНК-полимеразы присоединяются ковалентной связью к растущей цепи (*цветная стрелка*). Новая цепь ДНК растет при этом в направлении 5′ → 3′. Для реакции требуется (помимо матричной цепи) предобразованная полинуклеотидная цепь, к 3′-ОН-концу которой присоединяются новые нуклеотиды; эта цепь играет роль *затравки* для ДНК-полимеразы.

тимидин), выявили существование ограниченной зоны репликации, перемещающейся вдоль родительской спирали ДНК. Эта активная зона из-за своей Y-образной формы была названа **репликационной вилкой**. В каждом таком участке синтезируется ДНК двух новых дочерних спиралей.

5.3.2. Репликационная вилка асимметрична [20]

В 1960-х годах казалось вполне вероятным, что простейший механизм репликации ДНК заключается в непрерывном росте обеих новых цепей нуклеотид за нуклеотидом по мере перемещения репликационной вилки от одного конца молекулы ДНК к другому. Однако, поскольку две цепи в спирали ДНК антипараллельны (см. т. 1, рис. 3-6), такой механизм означал бы, что одна из дочерних цепей растет в направлении 5′ → 3′, а другая – в направлении 3′ → 5′ (рис. 5-30). Такой репликационной вилке потребовалось бы две разные ДНК-полимеразы. Одна из них наращивала бы цепь в направлении 5′ → 3′, как это показано на рис. 5-29, где каждый поступающий мономер (дезоксирибонуклеозидтрифосфат) привносит с собой необходимую для его присоединения к цепи энергию, носителем которой является трифосфатная группа. Другая ДНК-полимераза, перемещающаяся в направлении 3′ → 5′, катализировала бы так называемый «рост с головы», при котором энергию, необходимую для присоединения каждого очередного нуклеотида, нес бы конец растущей цепи ДНК. В действительности такой (3′ → 5′)-ДНК-полимеразы не существует, хотя биохимикам известны некоторые другие процессы полимеризации, протекающие по типу «роста с головы» (см. т. 1, рис. 2-34).

Каким же образом происходит рост цепи ДНК в направлении 3′ → 5′? Возможный ответ на этот вопрос подсказали в конце 1960-х годов эксперименты

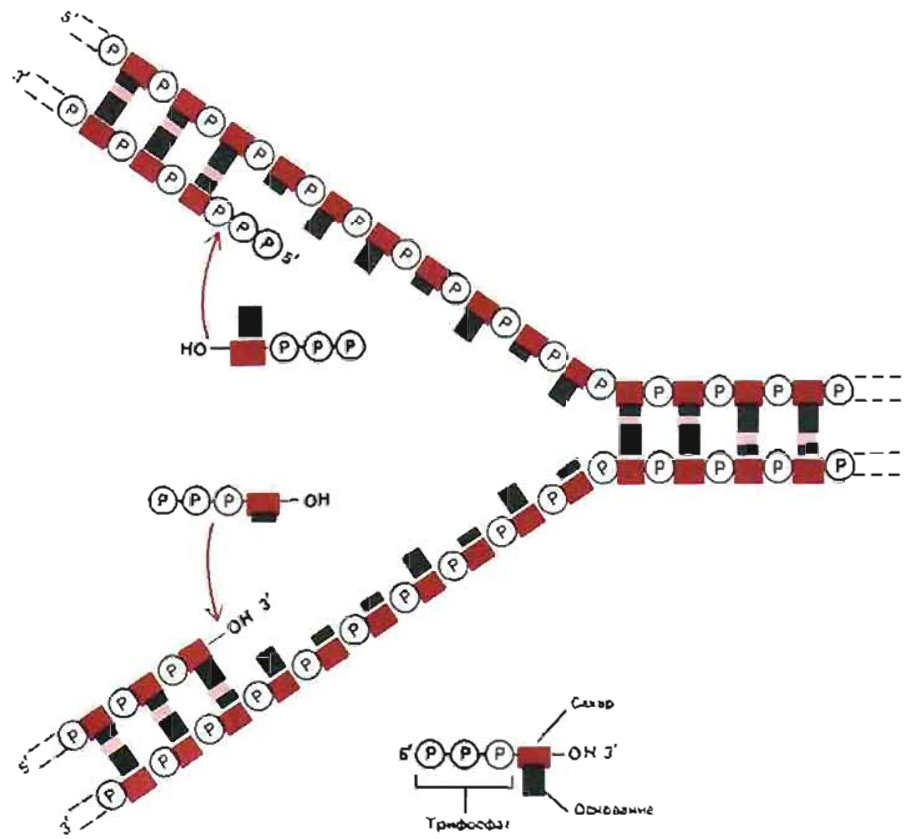


Рис. 5-30. На первый взгляд простейшим механизмом репликации ДНК представляется механизм, изображенный на этой (неверной!) схеме. Обе дочерние цепи должны были бы при этом расти непрерывно за счет присоединения нуклеотидов соответственно в 5′ → 3′- и 3′ → 5′-направлении, как показано на рисунке.

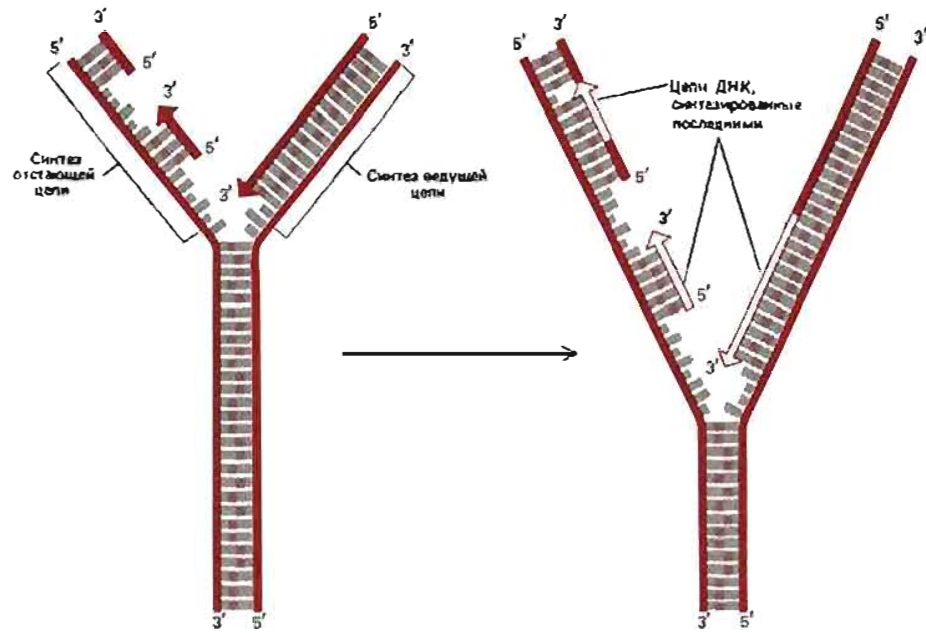


Рис. 5-31. Истинное строение репликационной вилки. Обе дочерние цепи строятся в направлении 5′ → 3′. Для этого отстающая цепь ДНК должна синтезироваться в виде ряда коротких фрагментов.

с радиоактивно меченными предшественниками ДНК. Если растущие клетки получают всего на несколько секунд высокорадиоактивный ^{3}H-тимидин, то метка включится лишь в ДНК, синтезированную в самый последний момент, т.е. в ту ее часть, которая следует непосредственно за репликационной вилкой. Этим методом избирательного введения метки было выявлено, что при репликации бактериальной ДНК в области репликационной вилки образуются и какое-то время существуют фрагменты, насчитывающие от 1000 до 2000 нуклеотидов (впоследствие за ними закрепилось название *фрагменты Оказаки*; у эукариот они гораздо короче: от 100 до 200 нуклеотидов). Несколько позже было показано, что синтез этих фрагментов ДНК идет только в направлении 5′ → 3′; синтезированные фрагменты соединяются затем в длинные цепи ДНК под действием того же фермента, который сшивает разрывы в спирали ДНК во время ее репарации, т.е. под действием *ДНК-лигазы* (рис. 5-23).

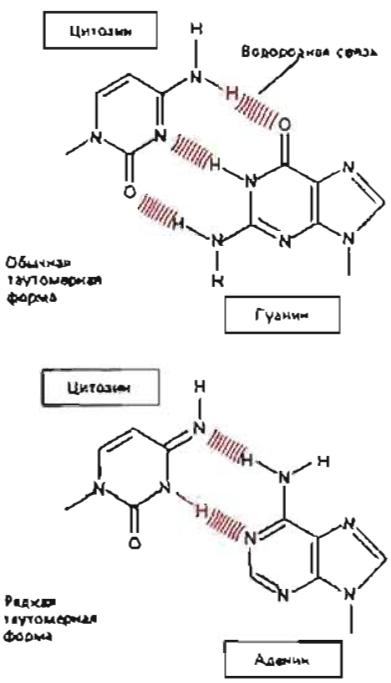


Рис. 5-32. Пример ожидаемого возникновения редкой неправильной пары оснований: находясь в термодинамически невыгодной таутомерной форме, цитозин легко образует водородные связи с аденином.

Теперь мы знаем, что репликационная вилка асимметрична (рис. 5-31). Из двух синтезируемых дочерних цепей ДНК одна строится непрерывно, а другая с перерывами. Первую называют **ведущей** (или **лидирующей**), поскольку она синтезируется быстрее, а вторую – **отстающей**. Синтез второй цепи идет медленнее, потому что, хотя *в целом* вся эта цепь строится в направлении 3′ → 5′, каждый из ее фрагментов в отдельности наращивается в направлении 5′ → 3′. Именно благодаря тому, что ДНК на отстающей части вилки строится при помощи механизма, работающего прерывисто по типу «шитья назад иголкой» (backstitching mechanism), в репликационной вилке не требуется никакого другого фермента, кроме (5′ → 3′)-ДНК-полимеразы.

5.3.3. Высокая точность репликации ДНК предполагает наличие механизма, осуществляющего коррекцию [21]

Точность копирования при репликации ДНК столь велика, что в среднем на каждые $1 \cdot 10^9$ комплементарных пар, образующихся в процессе воспроизведения генома млекопитающих, насчитывающего $3 \cdot 10^9$ пар оснований (разд. 5.2.2), приходится лишь около одной ошибки. Однако во время репликации могут образовываться не только обычные комплементарные пары оснований. В нормальной ДНК возникают на короткое время с частотой 10^{-4}–10^{-5} редкие таутомерные формы всех четырех ее оснований. Эти формы

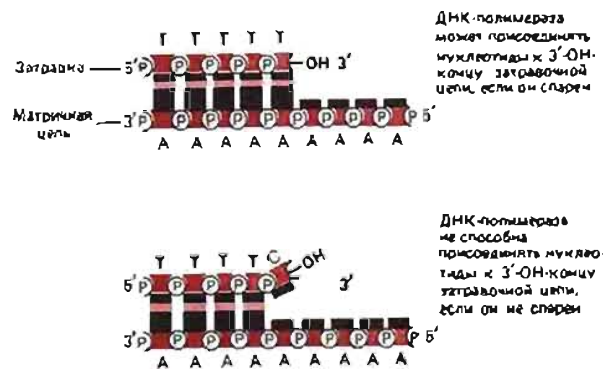


Рис. 5-33. Синтетические молекулы ДНК, испытываемые в качестве матриц для ДНК-полимеразы. В таких тестах затравочная цепь наращивается лишь в том случае, если основание на ее 3′-конце спарено.

образуют неправильные пары. Так, редкая таутомерная форма C спаривается с A вместо G, в результате чего возникает мутация (рис. 5-32). Таким образом, высокая точность репликации ДНК определяется наличием механизмов, осуществляющих коррекцию.

Коррекция в большой мере зависит от особых свойств ДНК-полимеразы. В отличие от РНК-полимераз ДНК-полимеразы не могут начать синтез новой полинуклеотидной цепи, просто связав друг с другом два нуклеозидтрифосфата. Им совершенно необходим для этого 3′-ОН-конец какой-либо полинуклеотидной цепи, которая должна быть спарена с матричной цепью ДНК; ДНК-полимеразы способны только добавлять новые нуклеотиды к уже имеющемуся 3′-ОН-концу полинуклеотидной цепи (см. рис. 5-29). Эту предобразованную цепь, к которой добавляются нуклеотиды, называют *затравкой* или *праймером*. Когда в качестве матриц для ДНК-полимераз испытываются разнообразные синтетические молекулы ДНК, копируются только те из них, с которыми соединена затравочная цепь, имеющая спаренный 3′-ОН-конец (рис. 5-33). Молекулы ДНК с затравкой, у которой 3′-ОН-конец не спарен, не могут служить матрицами. Вступив в контакт с такими молекулами ДНК, известные репликативные ДНК-полимеразы используют присущую им (3′ → 5′)-экзонуклеазную активность и отщепляют (путем гидролиза) любые неспаренные нуклеотиды на затравочном конце. Отщепляется ровно столько нуклеотидов, сколько требуется для того, чтобы у затравки появился спаренный конец и образовалась активная матрица.

Действуя таким образом, ДНК-полимераза выступает в роли «самокорректирующего» фермента: она устраняет свои собственные ошибки, возникшие в процессе полимеризации. Полагают, что этот тип коррекции используется для удаления неправильных пар, образуемых редкими таутомерными формами оснований, как показано на рис. 5-34.

Нам теперь ясно, что ДНК-полимераза, не способная начать синтез новой полинуклеотидной цепи путем связывания двух дезоксирибонуклеозидтрифосфатов в отсутствие затравки, обладает важным преимуществом. Потребность в правильно спаренном конце как раз и наделяет ДНК-полимеразу способностью исправлять свои собственные ошибки. Такой фермент, очевидно, мог бы начать синтез ДНК при полном отсутствии затравки, только утратив способность различать спаренный и неспаренный концы. В то же время РНК-полимеразы, участвующие в транскрипции генов (разд. 5.1.2), судя по всему, не нуждаются в самокоррекции, потому что в РНК-транскриптах допустимо довольно большое число ошибок. РНК-полимеразы могут начинать синтез

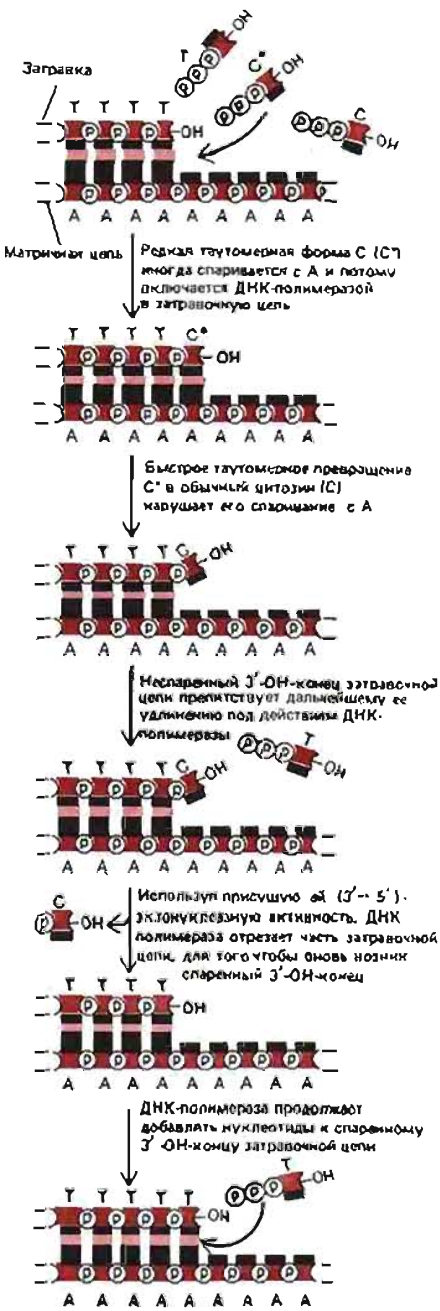


Рис. 5-34. Схема, поясняющая, как протекает процесс коррекции (устранения ошибок) при синтезе ДНК, катализируемом прокариотическими ДНК-полимеразами. Для большинства ДНК-полимераз, выделенных из клеток высших эукариот, продемонстрировать существование механизма такого типа пока не удалось.

новых полинуклеотидных цепей в отсутствие затравки, причем ошибки встречаются с частотой 10^{-4} как при синтезе РНК, так и при трансляции, т.е. при переводе нуклеотидных последовательностей РНК в аминокислотные последовательности белков.

5.3.4. Репликация ДНК в направлении 5′ → 3′ по самой своей природе отличается большей точностью

То, о чем говорилось выше, может помочь и в объяснении еще одного факта. Высказанные соображения позволяют понять, почему нам не удалось обнаружить другую ДНК-полимеразу, которая соединяла бы дезоксирибонуклеозидтрифосфаты так, чтобы цепь росла в направлении 3′ → 5′, как это требуется для непрерывного роста обеих дочерних цепей (согласно схеме на рис. 5-30). С такой (3′ → 5′)-полимеразой (т.е. в случае, если бы активирующую трифосфатную группировку нес растущий 5′-конец цепи, а не поступающий мононуклеотид) ошибки в полимеризации не могли бы устраняться простым гидролизом, потому что появление свободного 5′-конца немедленно обрывало бы синтез ДНК. Ясно, следовательно, что основание, только что неправильно спарившееся на 3′-конце, устранить гораздо легче, чем такое же основание, присоединившееся к 5′-концу цепи ДНК. Поэтому, хотя механизм репликации ДНК, изображенный на рис. 5-31, кажется на первый взгляд значительно более сложным и громоздким, чем неверный гипотетический механизм, представленный на рис. 5-30, этот реально функционирующий механизм способен обеспечить гораздо большую точность в силу того, что синтез ДНК идет здесь только в направлении 5′ → 3′.

5.3.5. Для синтеза коротких затравочных молекул на матрице отстающей цепи требуется особый фермент

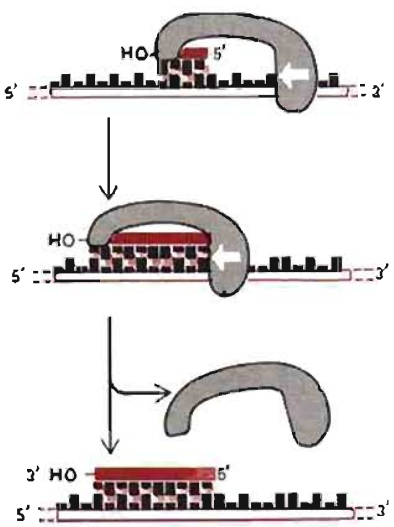


Рис. 5-35. Схема реакции, катализируемой РНК-праймазой – ферментом, синтезирующим короткие РНК-затравки в отстающей цепи ДНК. В отличие от ДНК-полимеразы этот фермент способен начинать синтез новой полинуклеотидной цепи с соединения двух нуклеозидтрифосфатов. Образовав короткий полинуклеотид, РНК-праймаза прекращает работу. Теперь к свободному 3′-концу может добавлять нуклеотиды ДНК-полимераза.

С того момента, как возникла репликационная вилка, для ДНК-полимеразы, синтезирующей ведущую цепь, всегда есть спаренный 3′-конец, необходимый ей для того, чтобы начать синтез новой цепи. Иначе обстоит дело с ДНК-полимеразой, ответственной за синтез отстающей цепи. Ей требуется всего каких-нибудь 4 с для того, чтобы синтезировать один короткий фрагмент ДНК, после чего она должна переключиться на синтез совсем другого фрагмента на новом участке матричной цепи, расположенном на некотором расстоянии от первого (рис. 5-31). Для этого ей всякий раз нужна затравка со спаренным 3′-концом, а следовательно, нужен и механизм, способный производить такие затравки. В этот механизм входит полимераза, называемая *РНК-праймазой*. Она синтезирует из рибонуклеозидтрифосфатов короткие **РНК-затравки (праймеры)**, состоящие примерно из 10 нуклеотидов (рис. 5-35). Эти РНК-затравки синтезируются с определенными интервалами на матрице для отстающей цепи; здесь их наращивает ДНК-полимераза, начиная, таким образом, всякий раз новый фрагмент Оказаки (см. рис. 5-31). Молекула ДНК-полимеразы продолжает это наращивание до тех пор, пока она не достигнет РНК-затравки, присоединенной к 5′-концу предыдущего фрагмента ДНК. Чтобы обеспечить образование непрерывной цепи ДНК из многих таких фрагментов, в действие вступает особая система репарации ДНК, быстро удаляющая РНК-затравку и заменяющая ее на ДНК. Завершает процесс ДНК-лигаза, соединяющая 3′-конец нового фрагмента ДНК с 5′-концом предыдущего фрагмента (рис. 5-36).

Почему предпочтение отдается удаляемой РНК-затравке, а не ДНК-затравке, которую не требовалось бы удалять, что, конечно, более экономно? Выше мы отмечали, что самокорректирующая полимераза не способна начинать синтез полипептидных цепей de novo; это предполагает и обратное утверждение: тот фермент, который начинает синтез цепей de novo, к эффективной самокоррекции не способен. Значит, любой фермент, катализирующий инициацию синтеза фрагментов Оказаки, неизбежно создал бы не слишком



Рис. 5-36. Отдельные этапы синтеза каждого из фрагментов отстающей цепи ДНК. У эукариот РНК-затравки синтезируются в отстающей цепи с интервалами приблизительно 200 нуклеотидов, и каждая из них состоит из 10 нуклеотидов. Старт-сигналы для РНК-праймазы пока не известны, но если эту функцию выполняют какие-нибудь матричные последовательности нуклеотидов, то они должны быть очень короткими.

точную копию (не менее 1 ошибки на 10^5). Это означало бы колоссальное увеличение частоты мутаций даже при том, что количество таких копий, сохранившихся в конечном продукте, составляло бы не более 5% всего генома (например, 10 нуклеотидов во фрагменте ДНК, состоящем из 200 нуклеотидов). Естественно думать поэтому, что выдвижение РНК, а не ДНК на роль затравки влекло за собой важное преимущество, поскольку рибонуклеотиды автоматически метят такие последовательности как «плохие копии», которые должны быть удалены.

5.3.6. Особые белки способствуют расплетанию двойной спирали ДНК перед репликационной вилкой [22]

Двойная спираль ДНК должна быстро расплетаться по ходу продвижения репликационной вилки, для того чтобы поступающие дезоксирибонуклеозидтрифосфаты могли спариваться с родительской матричной цепью. Однако в обычных условиях двойная спираль ДНК весьма стабильна; спаренные основания соединены столь прочно, что для разделения двух цепей ДНК в пробирке требуются температуры, приближающиеся к точке кипения воды (90°С). По этой причине большинство ДНК-полимераз может копировать лишь ту молекулу ДНК, у которой матричная цепь уже отделилась от другой цепи. Для того чтобы двойная спираль ДНК раскрылась и соответствующая матричная цепь стала доступной для ДНК-полимеразы, необходимы особые белки. Они бывают двух типов.

1. *Дестабилизирующие белки* (их называют также *белками, связывающими одноцепочечную ДНК*, или *SSB-белками*). Эти белки связываются кооперативным образом (см. рис. 8-7) с одиночными цепями ДНК. Они выстраиваются в длинные ряды на одноцепочечной ДНК, растягивая ее остов и делая основания доступными для спаривания. Дестабилизирующие белки не связываются непосредственно с ДНК в ее двуспиральной форме, но сильно дестабилизируют двойную спираль ДНК, присоединяясь к одиночным цепям ДНК, и тем самым способствуют любому процессу расплетания спирали. Более того, в их присутствии разрушаются и те небольшие двуспиральные структуры (шпильки), которые обычно возникают в участках ДНК, уже превратившихся в одноцепочечные. Матрицей для молекулы ДНК-полимеразы, синтезирующей отстающую цепь, служит в действительности сегмент одноцепочечной ДНК, депирализованный и выпрямленный вследствие присоединения к нему белков (рис. 5-37). Считается, что бо́льшая часть одноцепочечной ДНК в клетке покрыта дестабилизирующими

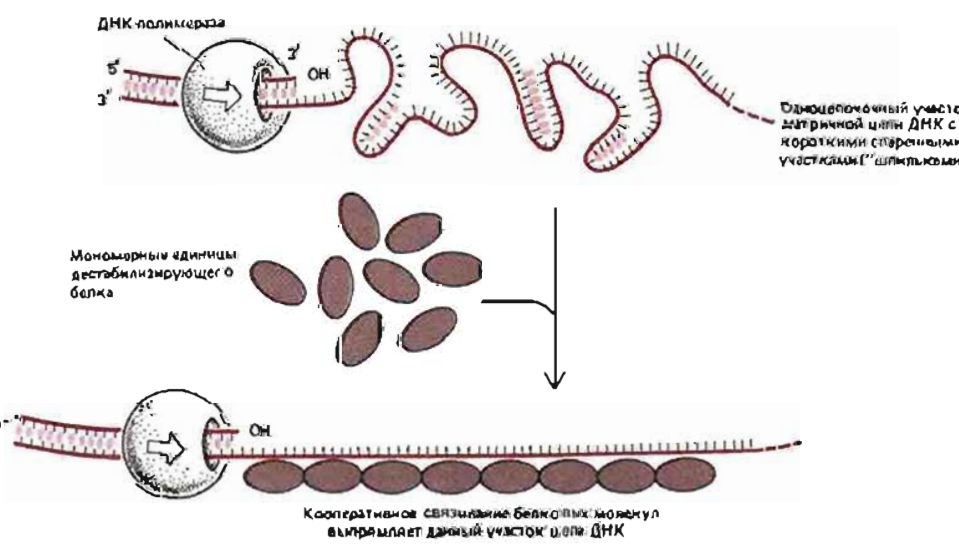


Рис. 5-37. Влияние дестабилизирующих белков на структуру одноцепочечной ДНК. Кооперативно связываясь с ДНК, как здесь показано, эти белки образуют длинные кластеры, выпрямляющие матричные цепи ДНК и облегчающие процесс полимеризации. Структуры в форме «шпилек», возникающие в свободной одноцепочечной ДНК, образуются путем случайного спаривания оснований в коротких участках, содержащих взаимно комплементарные последовательности нуклеотидов.

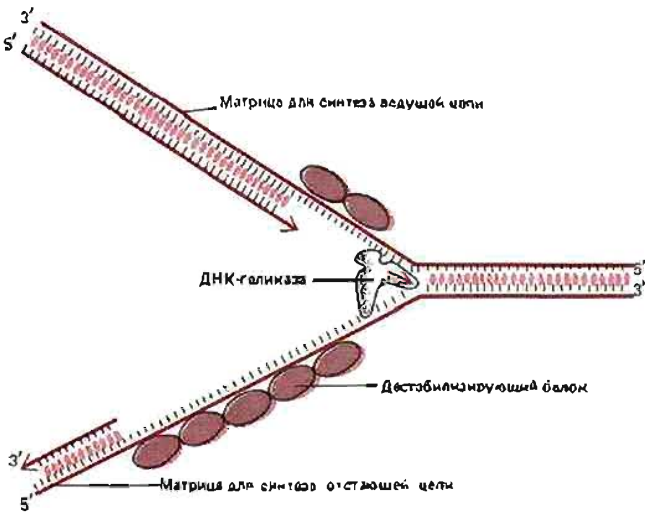


Рис. 5-38. Предполагают, что спираль ДНК перед репликационной вилкой быстро расплетается в результате совместного действия ДНК-геликазы и белков, дестабилизирующих спираль.

белками, которые благодаря этому играют важную роль в репарации ДНК и генетической рекомбинации (разд. 5.5.3).

2. *Репликационные белки, представляющие собой АТР-зависимые «машины», движущиеся по ДНК.* Гидролиз АТР может изменять форму белка, вследствие чего белок будет производить механическую работу подобно тому, как это происходит в мышце. На рис. 3-60 (т. 1) приведена схема, показывающая, как некий гипотетический ДНК-связывающий белок мог бы использовать энергию АТР для перемещения по ДНК. Действительно, удалось показать, что такие белки – их назвали *ДНК-геликазами* – участвуют в раскручивании спиралей ДНК в репликационной вилке. Схема на рис. 5-38 поясняет, как могут взаимодействовать дестабилизирующий белок и АТР-зависимая ДНК-геликаза, осуществляя раскручивание спирали во время репликации ДНК.

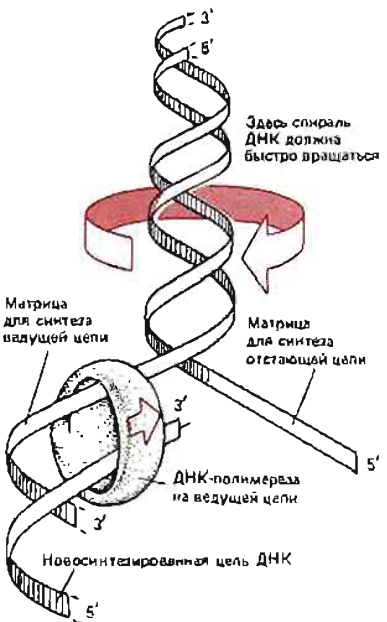


Рис. 5-39. «Проблема кручения», возникающая при репликации ДНК. Для того чтобы репликационная вилка могла продвигаться вперед со скоростью 500 нуклеотидов в 1 с, родительская спираль ДНК должна вращаться со скоростью 50 об/с.

5.3.7. Другие специализированные белки предотвращают спутывание ДНК [23]

Изображая спираль ДНК так, как мы это делали до сих пор, т.е. неправильно, в виде плоской «лестницы», мы игнорировали «проблему кручения» (winding problem). Между тем на каждые 10 пар оснований, образующихся в репликационной вилке, родительская двойная спираль должна совершить один полный оборот вокруг своей оси (рис. 5-39). Следовательно, для того чтобы репликационная вилка могла продвигаться вперед, вся хромосома впереди нее должна, очевидно, быстро вращаться, а это для длинных хромосом потребовало бы большой затраты энергии. Предполагают, что эта проблема решается так же, как и аналогичная проблема при транскрипции ДНК,– путем образования в спирали своего рода «шарнира» при помощи особого класса белков, называемых **ДНК-топоизомеразами**.

ДНК-топоизомераза представляет собой нечто вроде «обратимой нуклеазы». Сначала она разрывает цепь ДНК, а затем ковалентно присоединяется к разорванному концу. Этот возникший под действием топоизомеразы временный разрыв цепи дает возможность спирали ДНК по обе стороны от него вращаться вокруг фосфодиэфирной связи, находящейся напротив разрыва, и тем самым ослаблять накопившееся напряжение (рис. 5-40). Ковалентная связь белок—ДНК обладает довольно значительной энергией, потому что в ней сохраняется энергия разорванной фосфодиэфирной связи. Вследствие этого реакция, приводящая к разрыву цепи, обратима, и разорванные концы соединяются вновь, как только будет удален белок. Поэтому спивание происходит быстро и не требует дополнительной затраты энергии.

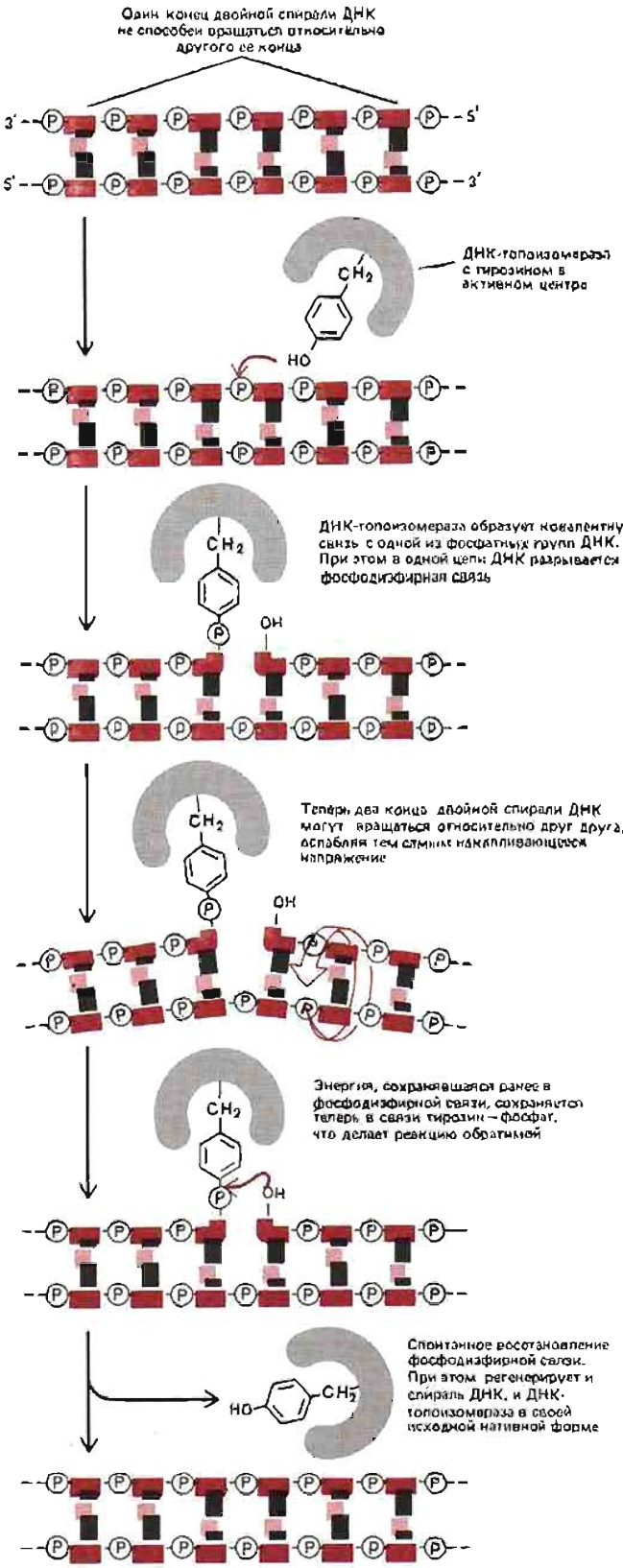


Рис. 5-40. Обратимая реакция, приводящая к появлению разрыва в одной из цепей ДНК. Реакция катализируется ДНК-топоизомеразой. Ферменты этой группы образуют временную ковалентную связь с ДНК, в результате чего возникает остаток фосфотирозина. Изображенный здесь фермент представляет собой ДНК-топоизомеразу типа I.

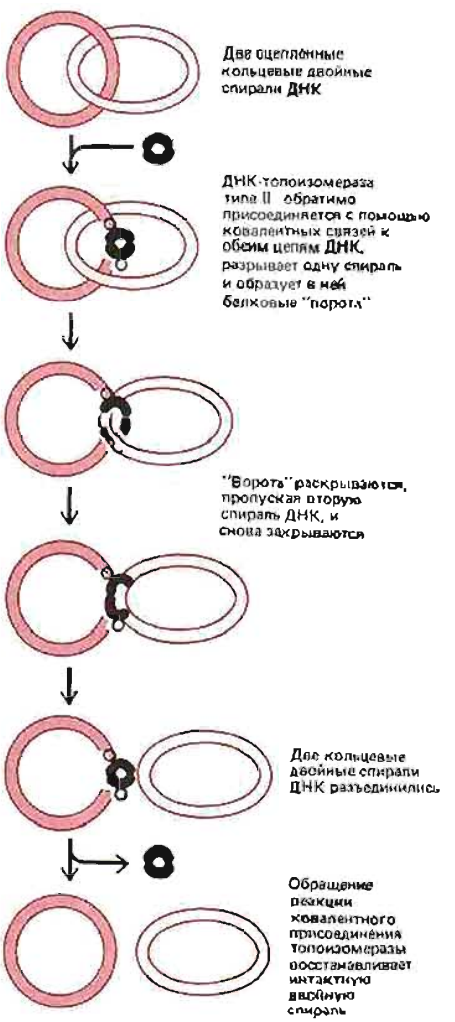


Рис. 5-41. Пример реакции разделения двух сцепленных кольцевых молекул ДНК, катализируемой ДНК-топоизомеразой типа II. Эти ферменты, имеющиеся как у прокариот, так и у эукариот, по всей вероятности, выполняют много функций.

Этот механизм весьма существенно отличается от механизма действия ДНК-лигазы, сшивающей предобразованные разрывы во время репарации ДНК (рис. 5-23 и 5-36). Прежде чем соединить два конца разорванной цепи ДНК, ДНК-лигаза использует молекулу ATP, чтобы образовать богатую энергией связь, активирующую открытый 5'-конец цепи ДНК в месте разрыва.

Существуют различные типы ДНК-топоизомераз. Те из них, которые действуют так, как описано выше, называются *ДНК-топоизомеразами типа I*, потому что они обратимо разрывают только одну из двух цепей двойной спирали ДНК (рис. 5-40). Несколько позже были открыты *ДНК-топоизомеразы типа II*. Они ковалентно связываются с обеими цепями двойной спирали ДНК и вносят в нее на время двухцепочечный разрыв. Вторая двойная спираль ДНК, сцепленная с первой, проходит через этот разрыв, после чего обе разорванные цепи сшиваются. Действуя подобным образом, такие топоизомеразы очень быстро распутывают спутанные кольцевые молекулы ДНК или разделяют две сцепленные кольцевые молекулы (рис. 5-41).

ДНК-топоизомеразы типа II, вероятно, просто незаменимы во всех тех случаях, когда молекулы ДНК во время репликации спутываются. Именно они, очевидно, обеспечивают полное разделение двух длинных дочерних спиралей ДНК при репликации каждой хромосомы. Насколько нужен в таком деле подобный «инструмент», поймет каждый, кто хоть раз пытался распутать безнадежно запутавшуюся леску, не имея под рукой ножниц.

5.3.8. Репликация ДНК у эукариот и прокариот в основных чертах сходна [24]

Схема на рис. 5-42 дает представление о некоторых главных этапах репликации ДНК. В репликационной вилке работают две идентичные молекулы ДНК-полимеразы; одна из них синтезирует ведущую цепь, а другая – отстающую. Спираль ДНК расплетается, поскольку ДНК-полимераза ведущей цепи действует вместе с дестабилизирующими белками и ферментом ДНК-геликазой. Синтезируя ведущую цепь, ДНК-полимераза может продвигаться непрерывно, тогда как при образовании отстающей цепи фермент через определенные промежутки должен начинать синтез заново, так что синтезируемая ДНК образуется в виде ряда коротких фрагментов (фрагментов Оказаки). Каждый такой фрагмент начинается с того, что ДНК-полимераза добавляет дезоксирибонуклеотиды к короткой РНК-затравке (синтезированной под дей-

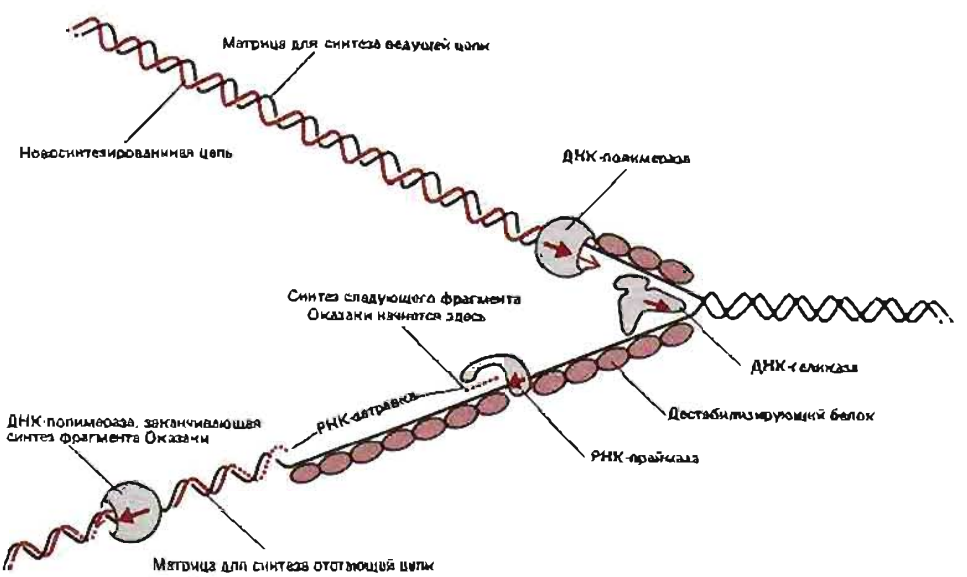


Рис. 5-42. Главные типы белков, действующих в области репликационной вилки.

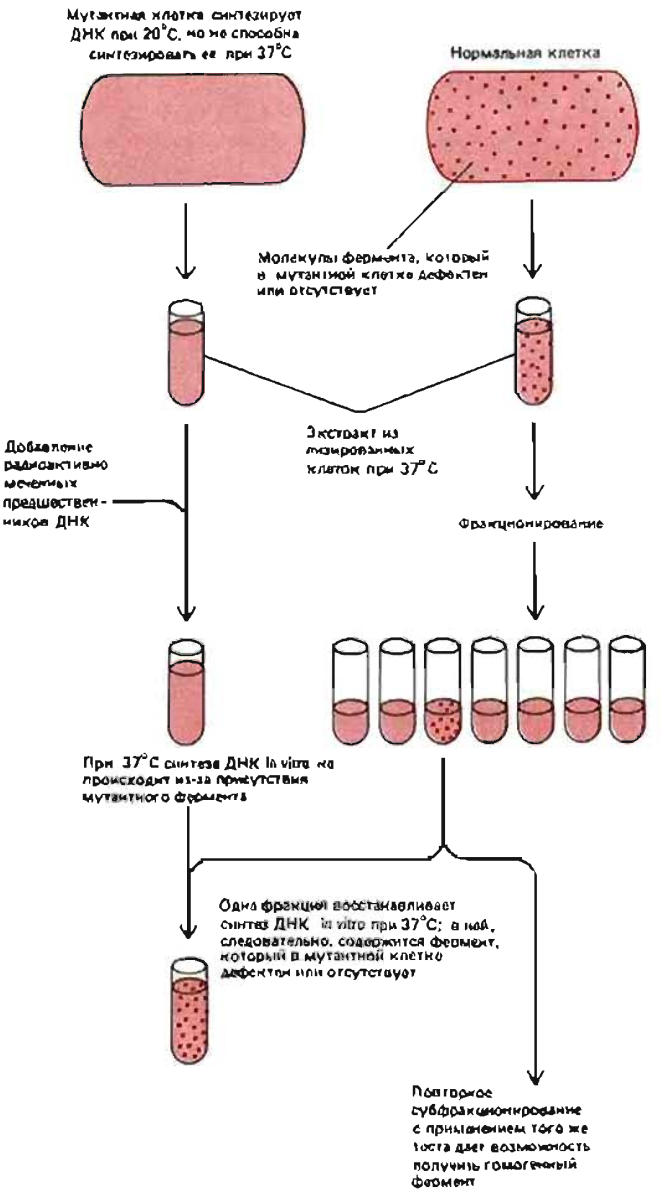


Рис. 5-43. Получение у бактерий и бактериофагов мутантов с различными нарушениями репликации ДНК открыло возможности для выявления и очистки ферментов, выполняющих какую-либо еще не известную функцию, необходимую для репликации ДНК у прокариот. В модифицированной форме такие «тесты на комплементацию in vitro» полезны также при биохимическом изучении многих других процессов в тех случаях, когда соответствующие мутанты могут быть выделены.

ствием РНК-праймазы на матрице отстающей цепи), и завершается, когда ДНК-лигаза соединяет его 3′-конец с 5′-концом предыдущего фрагмента.

Информация, суммированная на рис. 5-42, основывается главным образом на данных, полученных в конце 1970-х годов, когда были выделены и очищены мультиферментные системы бактерий и бактериофагов, способные осуществлять репликацию ДНК in vitro. Получение таких систем заметно облегчилось после того, как удалось выделить мутанты по целому ряду различных генов, ответственных за репликацию, которые можно было использовать для идентификации и очистки соответствующих ферментов (рис. 5-43).

У эукариот энзимология репликации ДНК пока еще детально не изучена, главным образом потому, что получать здесь необходимые мутантные формы гораздо труднее. Однако схема репликации у прокариот и эукариот в своих основных чертах, включая геометрию репликационной вилки и потребность в РНК-затравке, по-видимому, одинакова. Главное различие заключается в том, что у эукариот ДНК реплицируется не как таковая, а в виде

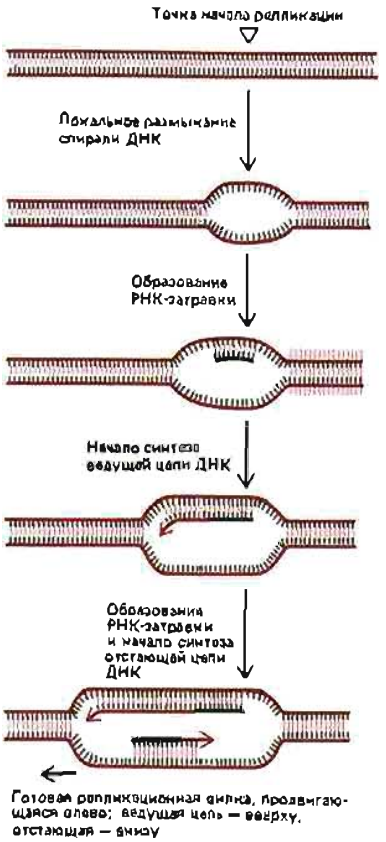


Рис. 5-44. Гипотетическое представление о процессе инициации репликационных вилок. Детали процесса инициации неизвестны.

хроматина, в котором она прочно связана с белками, принадлежащими к классу *гистонов*. В гл. 8 мы узнаем, что гистоны образуют комплексы в форме дисков, вокруг которых обвивается эукариотическая ДНК, в результате чего возникают регулярно повторяющиеся структуры, называемые *нуклеосомами*. Нуклеосомы располагаются вдоль молекулы ДНК с интервалами 200 пар оснований. Быть может, именно этим объясняется тот факт, что новые фрагменты отстающей цепи ДНК закладываются у эукариот с интервалами в 10 раз более короткими (от 100 до 200 нуклеотидов), чем у бактерий (от 1000 до 2000 нуклеотидов). Кроме того, если нуклеосомы служат барьерами, на время останавливающими продвижение полимеразы, присутствие хроматина (а не голой ДНК) может, вероятно, объяснить и то, что репликационные вилки движутся у эукариот приблизительно в 10 раз медленнее, чем у бактерий.

5.3.9. Репликационные вилки возникают в точках начала репликации [25]

И у бактерий, и у млекопитающих, т.е. у филогенетически очень далеких групп, образование репликационных вилок начинается, по-видимому, с возникновения особой структуры, называемой *репликационным глазом* (replication bubble). Это небольшой участок, в котором две цепи родительской спирали ДНК отделились одна от другой и были использованы в качестве матриц для синтеза фрагментов двух комплементарных дочерних цепей (рис. 5-44, *внизу*). В принципе вилка могла бы образоваться подобным образом, если бы в каком-нибудь ограниченном участке двойной спирали ДНК ее комплементарные цепи были разделены в достаточной степени особыми инициаторными белками, так что на разъединившихся одиночных цепях ДНК РНК-праймаза могла бы синтезировать РНК-затравку (рис. 5-44). Однако этот процесс инициации вилки чрезвычайно трудно воспроизвести в клеточных экстрактах, и мы не знаем ни тех ферментов, которые в нем участвуют, ни способа его осуществления.

Для бактерий и некоторых вирусов, размножающихся в эукариотических клетках, удалось показать, что репликационный глаз образуется в тех местах молекулы ДНК, где находятся специфические нуклеотидные последовательности, получившие название **точек начала репликации**. Эти последовательности состоят приблизительно из 300 нуклеотидов и, как выяснилось, в отдельных случаях содержат участки, способные связывать специфические белки, необходимые для процесса инициации вилки. Предполагают, что аналогичные точки начала репликации с участками, способными связывать специфические белки, существуют и в эукариотическом геноме, однако надежных доказательств этого пока нет.

В общем виде способ инициации и роста репликационных вилок в эукариотических клетках мы обсудим в гл. 11 в связи с описанием фазы синтеза ДНК в клеточном цикле. Выяснение точного механизма образования репликационных вилок очень важно, поскольку он может быть тесно связан с процессом, посредством которого контролируется клеточный рост.

Заключение

Поразительная точность репликации ДНК частично объясняется тем, что полимеризация нуклеотидов идет на обеих цепях спирали ДНК в направлении 5′→3′, благодаря чему весь синтез осуществляется при участии самокорректирующей ДНК-полимеразы. Поскольку две цепи двойной спирали ДНК антипараллельны, в направлении 5′→3′ может непрерывно синтезироваться лишь одна из двух цепей (ее называют ведущей). Другая, отстающая цепь синтезируется в виде коротких фрагментов ДНК по принципу «шитья иголкой назад». Самокорректирующая ДНК-полимераза не способна сама начинать синтез новой цепи. Поэтому для закладки фрагментов отстающей цепи ДНК

используются короткие молекулы РНК-затравки, которые позже удаляются – их заменяет ДНК.

Процесс репликации ДНК требует совместного действия многих белков. В нем участвуют: 1) ДНК-полимераза и РНК-праймаза, катализирующие полимеризацию нуклеозидтрифосфатов; 2) ДНК-геликазы и дестабилизирующие белки, помогающие расплести спираль ДНК, которую предстоит копировать; 3) ДНК-лигаза и фермент, разрушающий молекулы РНК-затравки; они нужны для сшивания прерывисто синтезируемых фрагментов отстающей цепи ДНК; 4) ДНК-топоизомеразы, помогающие решить «проблему кручения» спирали ДНК; 5) инициаторные белки, способствующие образованию новой репликационной вилки в точке начала репликации (они пока еще плохо охарактеризованы).

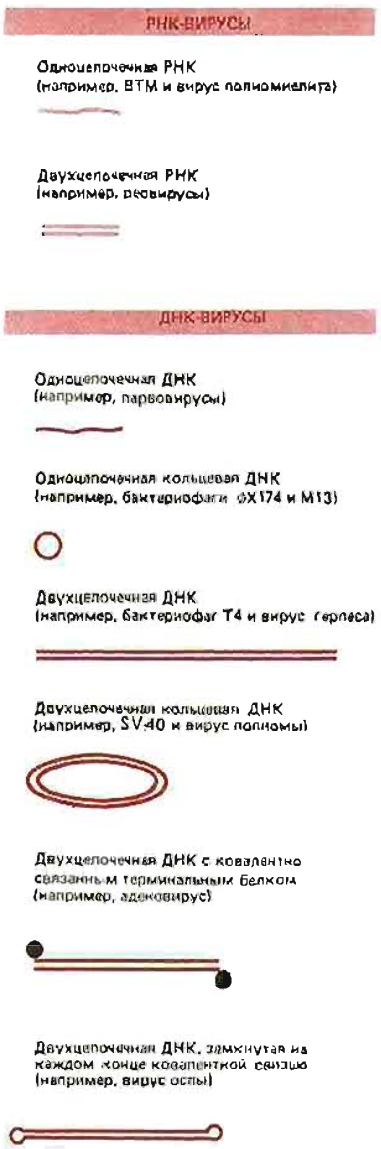


Рис. 5-45. Схематическое изображение (истинное соотношение размеров не соблюдено) вирусных геномов различных типов. Самые крупные вирусы содержат несколько сотен генов, и геном представлен у них двухцепочечной ДНК. Особые концы у некоторых из этих молекул ДНК, так же как и их кольцевые формы, возникли, вероятно, в процессе эволюции из-за трудностей, с которыми связано воспроизведение нескольких последних нуклеотидов на конце цепи ДНК.

5.4. Вирусы

В первой части этой главы мы обсудили фундаментальные процессы транскрипции ДНК и белкового синтеза, а также объяснили, каким образом генетическая информация сохраняется из поколения в поколение благодаря репарации и репликации ДНК. Теперь нам предстоит познакомиться с тем, как общие для всех клеток генетические механизмы используются вирусами, и рассмотреть свойственные вирусам уникальные особенности механизма репликации ДНК.

5.4.1. Вирусы – это мобильные гены [26]

В первых определениях вирусы характеризовались как болезнетворные агенты, которые размножаются только в клетках и имеют настолько малые размеры, что способны проходить через ультратонкие фильтры, задерживающие самые мелкие бактерии. До появления электронного микроскопа природа их оставалась неясной, хотя уже и тогда высказывалось мнение, что это, возможно, просто голые гены, которые приобрели способность переходить из одной клетки в другую. В 1930-х годах использование ультрацентрифуги сделало возможным отделение вирусов от компонентов клетки-хозяина. В результате уже в начале 1940-х годов стало более или менее ясно, что все вирусы содержат нуклеиновые кислоты. Это укрепило исследователей в мысли, что вирусы и генетический материал выполняют сходные функции. Подтверждение такой точки зрения было получено при изучении вирусов бактерий (бактериофагов). В 1952 г. было показано, что в клетку бактерии-хозяина проникает одна только ДНК бактериофага (без его белка) и что именно она инициирует здесь процесс репликации, приводящий в конечном счете к появлению в инфицированной клетке нескольких сотен дочерних вирусных частиц.

Таким образом, вирусы можно рассматривать как генетические элементы, одетые в защитную оболочку и способные переходить из одной клетки в другую. Размножение вирусов само по себе часто оказывается летальным для клетки, в которой оно происходит. Многие вирусы разрушают инфицированную клетку (вызывают ее лизис), что и дает возможность потомству вируса переходить в соседние клетки. Клинические симптомы вирусной инфекции во многих случаях отражают именно эту цитолитическую способность вируса.

Строение оболочки вируса, тип его нуклеиновой кислоты, способ проникновения в клетку и механизм размножения в клетке – все эти свойства у разных вирусов сильно варьируют. Рис. 5-45 и 5-46 дают представление о некоторых структурных различиях между вирусами.

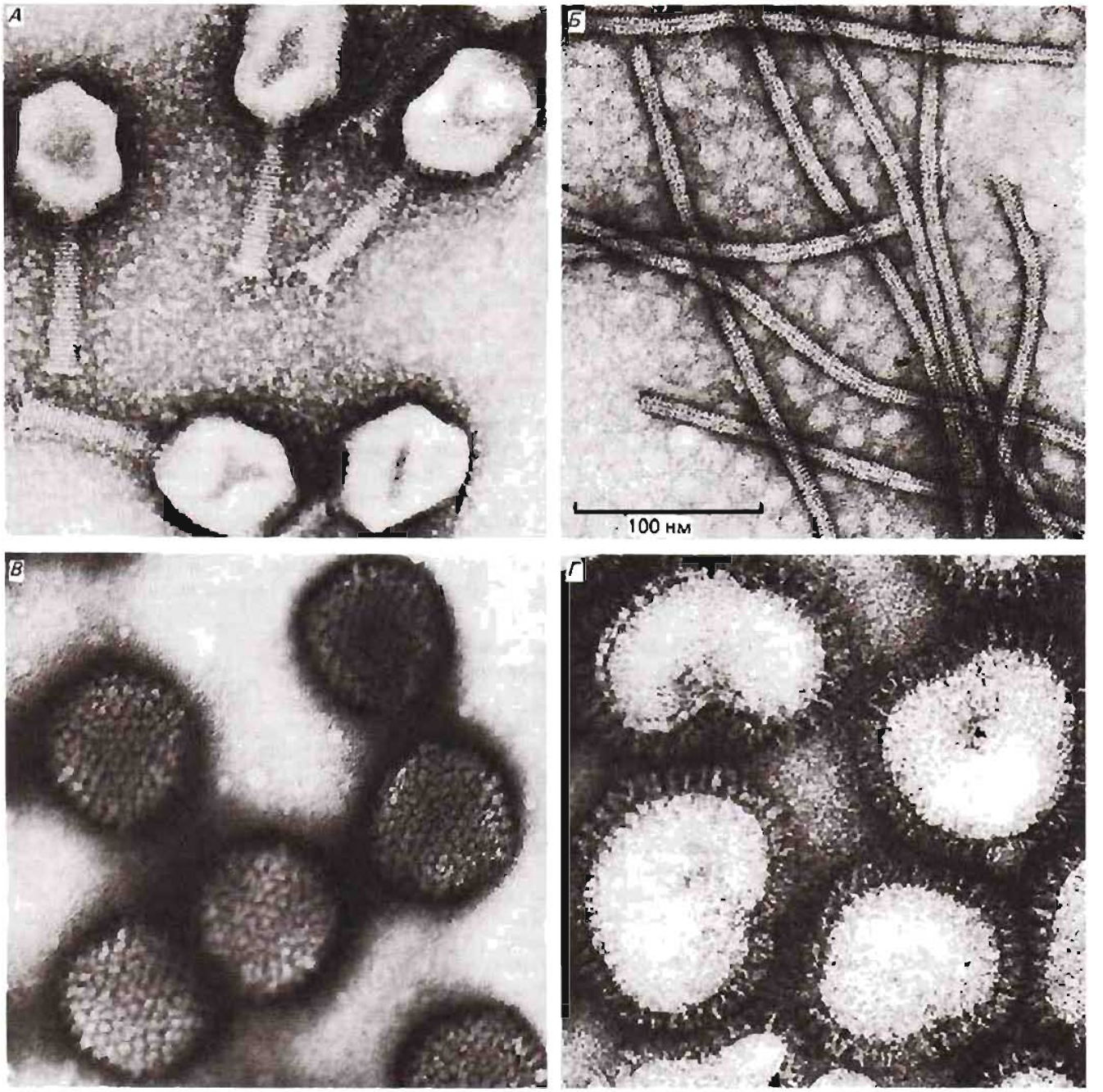


Рис. 5-46. Электронные микрофотографии вирусных частиц (метод негативного контрастирования). Все вирусы сфотографированы при одном и том же увеличении; масштаб указан на фото Б.
А. Бактериофаг Т4 – крупный ДНК-содержащий вирус, заражающий бактерию *E. coli*. ДНК помещается в головке бактериофага и впрыскивается в бактериальную клетку при помощи его цилиндрического хвоста. (С любезного разрешения James Paulson.)
Б. Вирус Х картофеля. Нитевидные частицы этого вируса растений содержат РНК-геном. (С любезного разрешения Graham Hills.) *В.* Аденовирус – ДНК-содержащий вирус, заражающий различные клетки человека. Снаружи вирусные частицы одеты белковой оболочкой – капсидом. (С любезного разрешения Mei Lie Wong.) *Г.* Вирус гриппа – крупный РНК-содержащий вирус животных. Поверх белкового капсида у него имеется еще мембранная оболочка. (С любезного разрешения R. C. Williams, H. W. Fisher.)

5.4.2. Генетическим компонентом вируса является ДНК или РНК [27]

В вирусной ДНК заключена информация о вирусоспецифических белках, которые образуют белковую оболочку всех ДНК-вирусов. Вначале казалось вероятным, что молекула вирусной ДНК – это один-единственный ген, кодирующий один белок, но позже стало ясно, что даже в мельчайших вирусах молекулы нуклеиновой кислоты несут в себе информацию для нескольких белков. В самых крупных вирусных геномах, таких, как геном бактериофага Т4, число кодируемых белков достигает нескольких сотен. Поэтому нуклеиновокислотные компоненты вирусов представляют собой как бы крошечные хромосомы.

Значительно менее ясной представлялась вначале роль РНК, содержащейся в некоторых вирусах, например в вирусе табачной мозаики (ВТМ). Там, где присутствовала РНК, никогда не встречалась ДНК. Проще всего поэтому было бы заключить, что РНК представляет собой генетический компонент вируса, но в начале 1950-х годов этот вывод вопиющим образом противоречил всеобщему убеждению, что единственная роль РНК заключается в передаче информации от ДНК к белку. Однако уже в 1956 г. удалось получить очищенные препараты РНК ВТМ и показать, что они сохраняют инфекционность при полном отсутствии вирусного белка. Вскоре после этого выяснилось, что РНК содержат и многие другие вирусы, в частности вирусы полиомиелита, гриппа и кори. В настоящее время способность РНК служить хранилищем генетической информации уже ни у кого не вызывает сомнения.

5.4.3. Вирус заключен в белковый капсид или в мембранную оболочку

Первоначально предполагалось, что наружная оболочка вирусов построена из одних только белковых молекул, возможно из молекул какого-нибудь одного главного типа. Считалось, что вирусные инфекции начинаются с разъединения хромосомы и белковой оболочки вируса. Далее следует самовоспроизведение хромосомы с образованием большого числа ее идентичных копий и синтез вирусоспецифических белков оболочки, при этом кодируемые вирусным геномом цепи РНК выполняют функции мРНК. Затем происходит образование дочерних вирусных частиц в результате спонтанной сборки белковой оболочки вокруг дочерних вирусных хромосом (рис. 5-47).

Теперь мы отдаем себе отчет в том, что эти первые описания, хотя и верные в общем виде, давали лишь самое упрощенное представление о чрезвычайно разнообразных жизненных циклах вирусов. Во-первых, белковая оболочка (или капсид) почти у всех вирусов состоит из полипептидных цепей более чем одного типа, причем эти цепи нередко сгруппированы в несколько слоев. Во-вторых, у многих вирусов их белковый капсид окружен еще и мембраной, в которую помимо белка входят липиды и которая по своему строению напоминает плазматическую мембрану, окружающую все клетки. У таких вирусов, имеющих мембрану, липидные компоненты идентичны тем, какие содержатся в плазматической мембране клетки-хозяина, тогда как белки вирусоспецифичны. У многих из этих вирусов сборка их самой наружной оболочки происходит в плазматической мембране клетки-хозяина, и дочерние вирусные частицы выходят наружу, отпочковываясь от этой плазматической

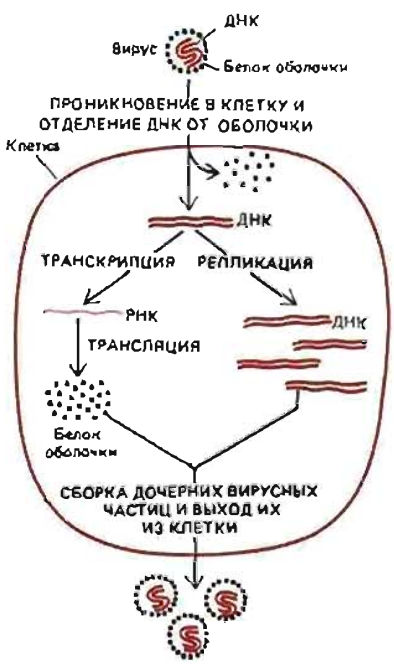


Рис. 5-47. Простейший жизненный цикл вируса. Представленный здесь гипотетический вирус содержит небольшую двухцепочечную молекулу ДНК, кодирующую единственный вирусный белок, из которого построен капсид вируса. Вирусов с таким простым строением мы не знаем.

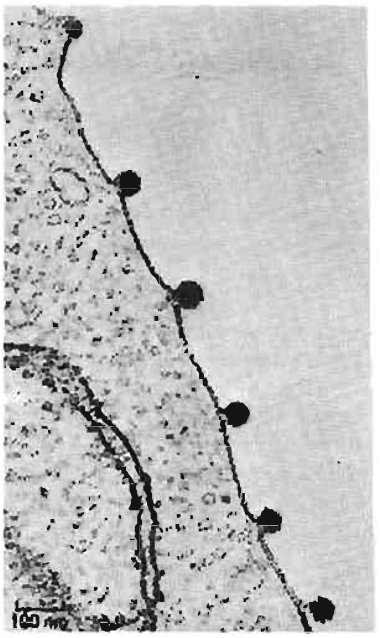


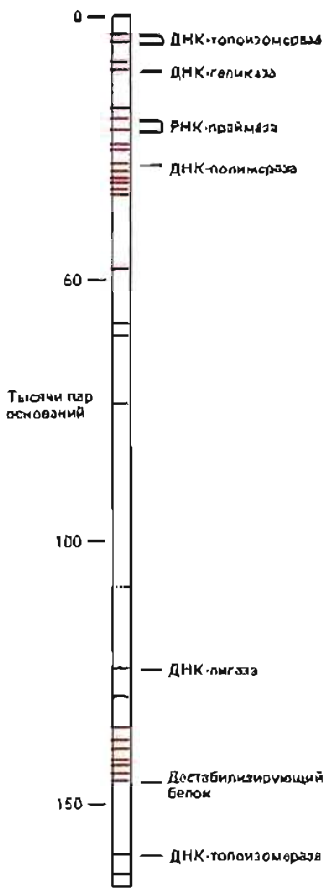
Рис. 5-48. Электронная микрофотография тонкого среза животной клетки, от которой отпочковывается несколько частиц вируса, заключенного в мембранную оболочку (вирус леса Семлики). (С любезного разрешения M. Olsen, G. Griffiths.)

мембраны (рис. 5-48). Отпочковывание позволяет потомству вируса покидать клетку, не нарушая ее плазматической мембраны, т.е. не убивая клетку; подробнее это явление мы обсудим в гл. 7.

5.4.4. Хромосомы вируса обычно несут в себе информацию для синтеза одного или нескольких ферментов, участвующих в репликации вирусной нуклеиновой кислоты [28]

В вирусных хромосомах закодированы обычно не только белки оболочки вируса, но и ферменты, необходимые для репликации его нуклеиновой кислоты. Так, в ДНК сравнительно крупного бактериофага T4 закодировано не менее 30 различных ферментов, обеспечивающих избирательную и быструю репликацию хромосомы бактериофага T4 в ущерб репликации ДНК клетки-хозяина, т.е. *E. coli* (рис. 5-49). Эти белки участвуют в непрерывных циклах репликации T4-ДНК, и они же осуществляют избирательное включение 5-гидроксиметилцитозина, который в T4-ДНК замещает цитозин. В геноме бактериофага T4 закодированы также и нуклеазы, избирательно разрушающие ДНК *E. coli*. Кроме того, в нем закодированы белки, изменяющие молекулы бактериальной РНК-полимеразы таким образом, что они на разных стадиях инфекции транскрибируют различные группы генов бактериофага.

Более мелкие ДНК-содержащие вирусы, например обезьяний вирус SV40 или мельчайший бактериофаг ϕX174, несут в себе гораздо меньше генетической информации и гораздо больше зависят от ферментов клетки-хозяина как в синтезе своих белков, так и в синтезе своей ДНК. Однако и в их геноме закодированы ферменты, избирательно инициирующие синтез их собственной ДНК, потому что вирус может успешно размножаться лишь при том условии, если ему удастся игнорировать регуляторные сигналы клетки, которые в противном случае не дадут вирусной ДНК удваиваться более чем один раз в каждом клеточном цикле.



5.4.5. Геномы вирусов представлены разнообразными формами [29]

Когда была открыта двойная спираль ДНК, естественно возникло убеждение, что ДНК должна существовать только в этой форме; если одна полинуклеотидная цепь будет случайно повреждена, то комплементарная цепь удержит разорванные концы на месте до тех пор, пока повреждение не будет исправлено. Однако это соображение не кажется существенным, когда речь идет о вирусных хромосомах. Они сравнительно коротки, т.е. содержат лишь несколько тысяч нуклеотидов, и, значит, вероятность случайного повреждения здесь очень невелика в сравнении с риском, которому подвергается клеточный геном, насчитывающий миллионы нуклеотидов. Кроме того, в каждом жизненном цикле вируса образуются сотни дочерних молекул ДНК,

Рис. 5-49. Хромосома бактериофага T4 с указанием локализации более чем 30 генов, участвующих в репликации T4-ДНК. Геном бактериофага T4 насчитывает свыше 160 000 пар оснований, кодирующих более 150 различных белков, в том числе и белков, участвующих в репликации ДНК. Среди остальных белков много таких, которые участвуют в сборке головки и отростка бактериофага (см. рис. 5-46,*A*).

и если даже некоторые из них и будут повреждены, то это не приведет ни к каким серьезным последствиям. Поэтому обнаружение того факта, что многие мелкие ДНК-вирусы содержат одноцепочечную ДНК (а сведения об этом постоянно накапливались в 50–60-е годы), теперь ретроспективно не кажется нам особенно удивительным. Одно время предполагали, что этим вирусам свойствен какой-то совершенно особый способ репликации ДНК, однако мы теперь знаем, что репликация начинается у них с образования в качестве промежуточного продукта так называемой репликативной двухцепочечной формы ДНК. Исследователи склоняются в настоящее время к мысли, что любой процесс репликации ДНК включает образование комплементарных полинуклеотидных цепей.

Первые вирусные хромосомы, которые удалось изучить, представляли собой простые линейные двойные спирали ДНК. Однако геномы вирусов могут быть представлены также двойными спиралями ДНК, замкнутыми в кольцо (вирусы SV40 и полиомы), кольцевыми молекулами одноцепочечной ДНК (бактериофаги M13 и ϕX174) или линейными молекулами одноцепочечной ДНК (парвовирусы). Недавно были открыты более сложные линейные двойные спирали. У некоторых бактериофагов и у аденовирусов к 5′-концам цепей ДНК ковалентно присоединены белковые молекулы, а у очень крупных вирусов оспы две комплементарные цепи ДНК на обоих концах соединены одна с другой ковалентной фосфодиэфирной связью (см. рис. 5-45). Естественно, что для репликации каждой из этих форм требуется особый ферментативный механизм.

5.4.6. Хромосомы вирусов способны включаться в хромосомы клетки-хозяина [30]

Вначале смысл проникновения вирусной хромосомы в клетку-хозяина усматривали лишь в ее немедленном размножении, которое служило прелюдией к образованию большого числа дочерних вирусных частиц. Однако многие вирусы могут существовать в *латентной* форме: они при этом, хотя и присутствуют в клетке, остаются неактивными; образования дочерних частиц не происходит. О молекулярных основах латентности вирусов не было известно ничего до начала 1950-х годов, т.е. до того времени, когда выяснилось, что многие бактерии, казалось бы неинфицированные, продуцируют бактериофаг, если подвергнуть их облучению ультрафиолетом. После этого были проведены эксперименты, которые показали, что у таких *лизогенных бактерий* в хромосому включена полная хромосома вируса. Эти интегрированные вирусные хромосомы стали называть *провирусами*.

Бактериофаги, способные включаться в бактериальные хромосомы, называются **лизогенизирующими бактериофагами**. Наиболее полно изучен среди них бактериофаг *лямбда* (λ). Когда бактериофаг λ заражает подходящую клетку *E. coli*, он обычно размножается в ней и образует несколько сотен дочерних фаговых частиц, которые выходят наружу в момент лизиса клетки; это так называемая *литическая инфекция*. Гораздо реже линейные инфицирующие молекулы ДНК замыкаются в кольцо и включаются в кольцевую хромосому бактерии-хозяина путем сайт-специфической рекомбинации (разд. 5.5.6). По завершении такой интеграции образовавшаяся лизогенная бактерия, несущая хромосому бактериофага λ в виде провируса, размножается, как обычно, до тех пор, пока на нее не воздействует какой-нибудь повреждающий внешний фактор, например ультрафиолетовые лучи или ионизирующее излучение. Это воздействие вынуждает интегрированный провирус выйти из хромосомы хозяина и начать обычный, свойственный вирусу цикл размножения. Интегрированный провирус, таким образом, не осужден на гибель вместе с поврежденной клеткой-хозяином; у него есть шанс ускользнуть из нее и перейти в соседнюю неповрежденную клетку *E. coli* (рис. 5-50).

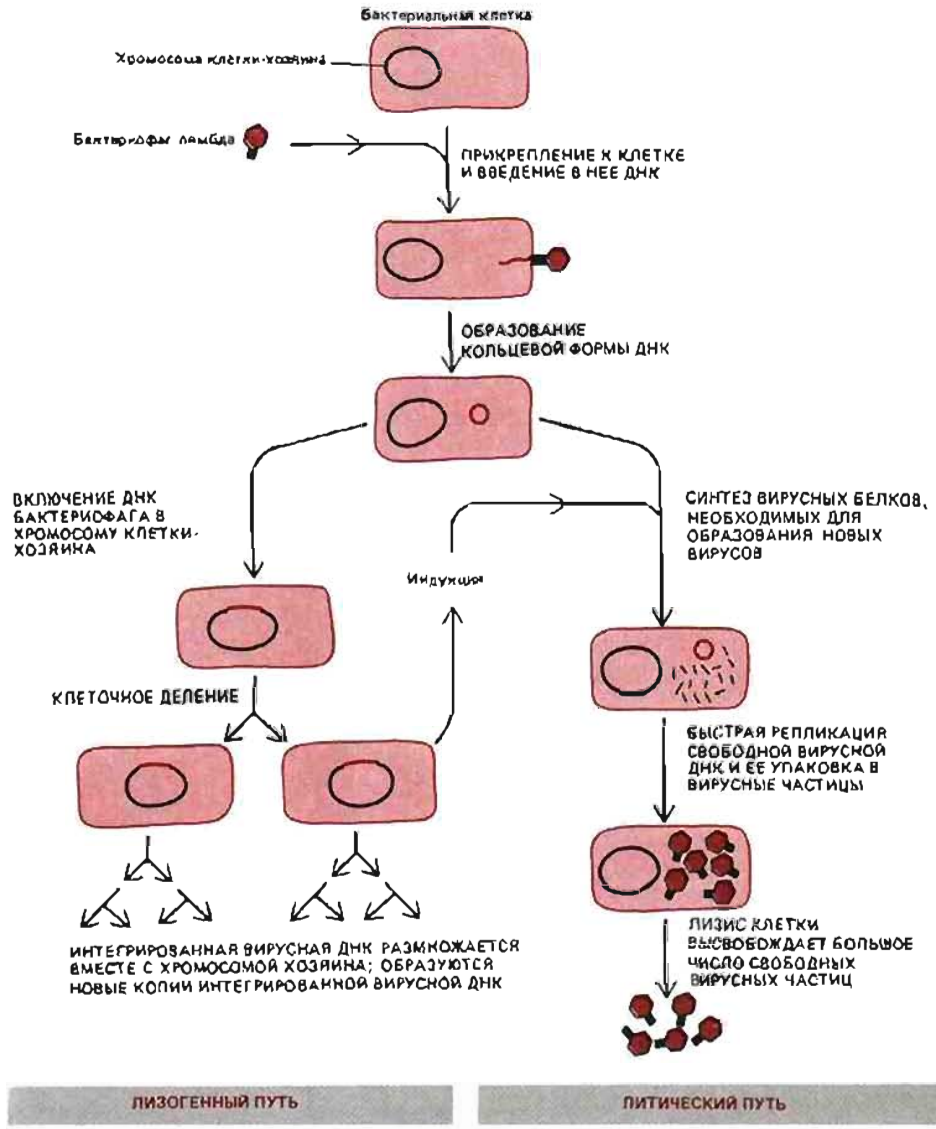


Рис. 5-50. Жизненный цикл бактериофага λ. Геном бактериофага λ состоит приблизительно из 50 000 пар оснований и кодирует около 50 белков. Его двухцепочечная ДНК способна существовать как в линейной, так и в кольцевой форме. Развитие бактериофага может пойти, как это здесь изображено, и по литическому, и по лизогенному пути. Повреждение ДНК клетки, находящейся в лизогенном состоянии, вынуждает интегрированную вирусную ДНК (провирус) выйти из хромосомы хозяина и начать литический цикл. Включение вирусной ДНК в хромосому хозяина и выход из хромосомы осуществляются путем сайт-специфической генетической рекомбинации, катализируемой особым белком бактериофага λ, так называемой *интеразой* (см. разд. 5.5.6).

5.4.7. РНК-вирусы реплицируются также путем образования комплементарных цепей [26, 31]

Размножение РНК-вирусов также связано с образованием комплементарных полинуклеотидных цепей. Многие из хорошо изученных РНК-вирусов, например бактериофаг R17 или вирус полиомиелита, обладают одноцепочечной хромосомой, однако есть и такие вирусы, у которых хромосома представлена двуспиральной РНК; таковы, в частности, реовирусы, заражающие столь далекие друг от друга организмы, как дрожжи и млекопитающие. Во всех случаях в репликации РНК участвуют специфические РНК-зависимые РНК-полимеразы (*репликазы*), кодируемые РНК-хромосомой вируса. Эти ферменты часто включаются в дочерние вирусные частицы, и тогда при вирусной инфекции они уже сразу имеются в наличии, т.е. могут немедленно начинать репликацию вирусной РНК. У так называемых *вирусов с негативным геномом*, к которым принадлежат, в частности, вирусы гриппа и везикулярного стоматита, репликазы всегда включаются в дочерние частицы. У этой группы виру-

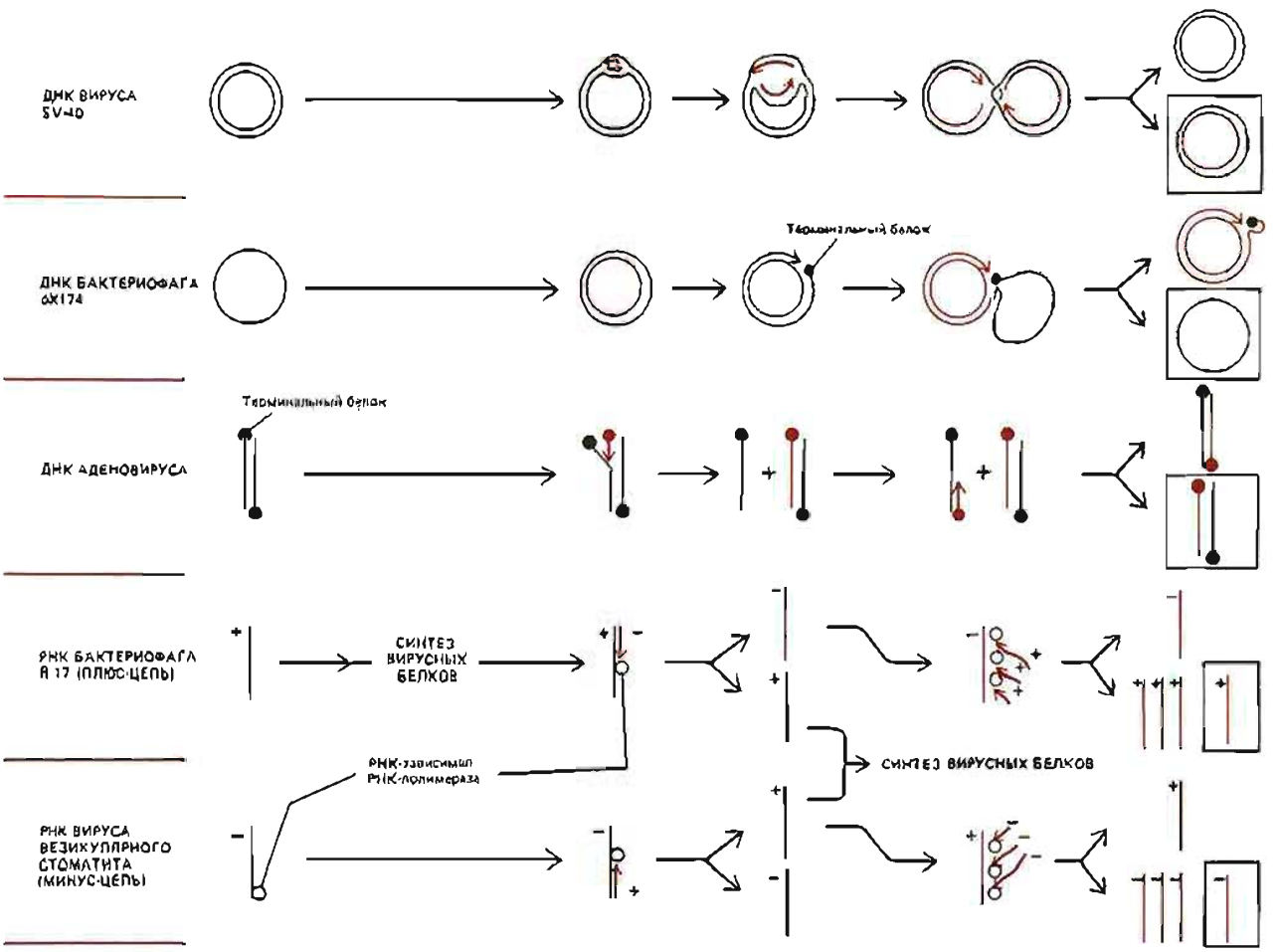


Рис. 5-51. Примеры, иллюстрирующие разнообразные способы репликации вирусных геномов. В двух случаях, как мы видим, к концам цепей ДНК ковалентно присоединены *терминальные белки*; эти белки играют важную роль в соответствующем процессе репликации. Отметьте главное различие между РНК-вирусами с *позитивными* и *негативными геномами*: оно заключается в том, что вирусы с «минус»-цепью, прежде чем образовать вирусные белки, должны синтезировать «плюс»-цепь РНК. Для этой цели в капсиде РНК-вируса должна присутствовать вирусная полимераза (одна или несколько молекул), поскольку в клетках хозяина фермент с аналогичной функцией отсутствует.

сов инфицирующая цепь не кодирует никаких белков. Только комплементарная ей цепь несет полезную генетическую информацию; в ней находятся также нуклеотидные последовательности, кодирующие вирусную репликазу и белки оболочки вируса. Таким образом, инфицирующая цепь не может индуцировать размножение вируса без необходимой для этого репликазы.

Синтез вирусной РНК начинается всегда на 3′-конце РНК-матрицы (т. е. с 5′-конца новой молекулы вирусной РНК) и идет в направлении 5′ → 3′ до тех пор, пока не будет достигнут 5′-конец матрицы. Никаких механизмов, которые корректировали бы синтез вирусной РНК, нет, но их отсутствие при небольших размерах РНК-хромосомы вируса серьезным образом не сказывается на репликации. Геномы всех РНК-вирусов невелики в сравнении с геномами крупных ДНК-содержащих вирусов, и это является прямым следствием того, что у них механизм репликации более примитивен.

На рис. 5-51 представлены некоторые способы репликации геномов, встречающиеся у вирусов.

5.4.8. Генетические элементы вирусов способны превращать нормальные клетки в раковые [32]

Животные клетки, в которых ДНК-вирусы могут размножаться литическим путем, принято называть *пермиссивными*. Клетки, в которых их размножение блокируется, называются *непермиссивными*. В небольшой доле случаев события развиваются иначе: ДНК-вирус превращает непермиссивные клетки в ра-

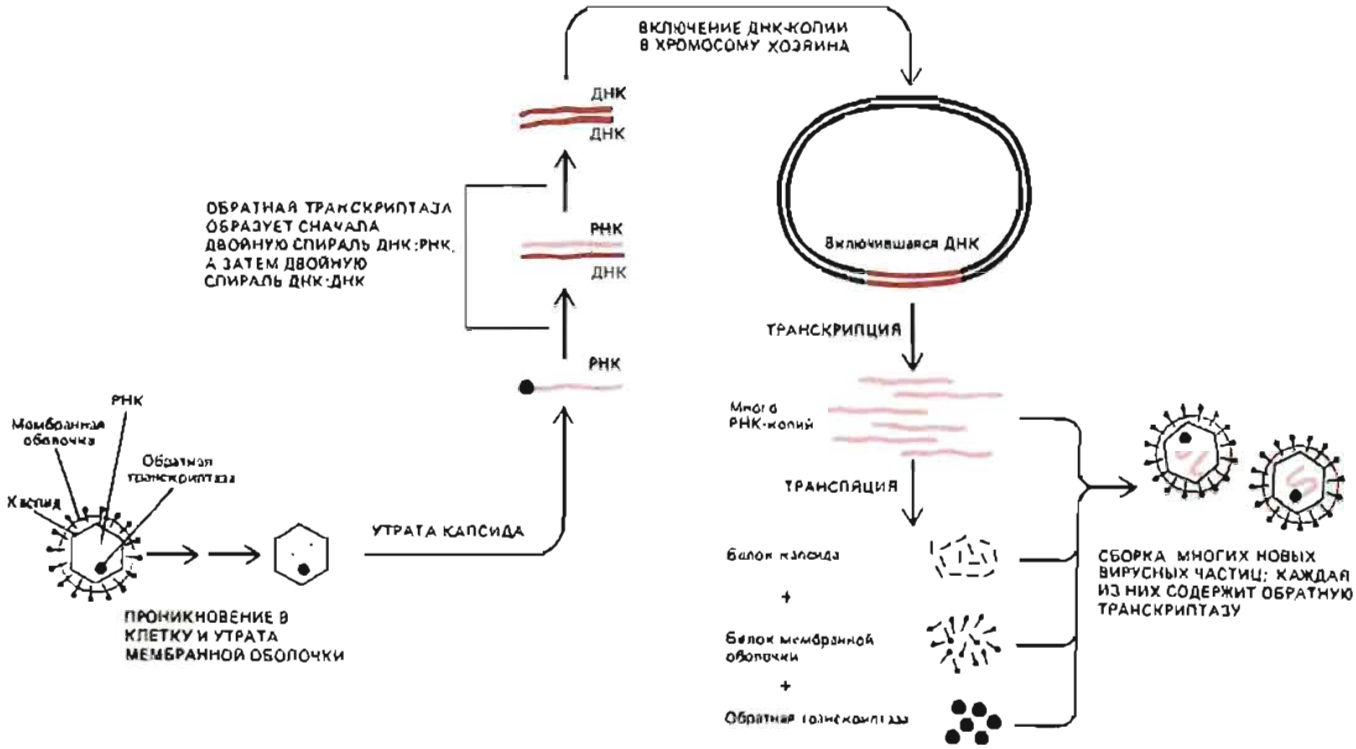


Рис. 5-52. Жизненный цикл ретровируса. Фермент *обратная транскриптаза* представляет собой ДНК-полимеразу, которая образует сначала ДНК-копию вирусной молекулы РНК, а затем вторую цепь ДНК, так что в итоге получается двухцепочечная ДНК-копия РНК-генома. Включение этой двойной спирали ДНК в хромосому клетки-хозяина, катализируемое какими-то неизвестными клеточными ферментами, необходимо для синтеза новых молекул вирусной РНК.

ковые. При такой неопластической трансформации один или несколько генов вируса включаются в геном клетки-хозяина и вызывают в ней синтез белков, которые в норме образуются только при размножении вируса. Мы пока еще не знаем, почему вирусные продукты превращают нормальные клетки в раковые, но нам известно, что в некоторых случаях в этом превращении участвуют протеинкиназы; подробнее мы обсудим этот вопрос в гл. 11, где речь будет идти о генетике опухолевых вирусов.

Труднее для понимания представлялось вначале поведение опухолевых РНК-вирусов; проникновение их в клетку-хозяина ведет одновременно и к нелетальному для клетки высвобождению дочерних вирусных частиц (отделяющихся от клеточной поверхности), и к стойкому изменению в инфицированной клетке, которое превращает эту клетку в раковую. Как может заражение РНК-вирусом вызвать стойкое генетическое изменение, было непонятно до тех пор, пока не обнаружилось, что и размножение вируса, и опухолевая трансформация блокируются ингибиторами синтеза ДНК. Это послужило указанием на то, что синтез ДНК является необходимым условием размножения опухолевых РНК-вирусов. Подтвердилось это предположение в 1970 г., когда был открыт фермент *обратная транскриптаза*, с помощью которого цепи инфицирующей РНК транскрибируются в комплементарные им цепи ДНК. По этой причине опухолевые РНК-вирусы, к которым относится первый хорошо изученный опухолевый вирус, а именно вирус саркомы Рауса, принято называть *ретровирусами* (т. 3, разд. 11.2). Жизненный цикл одного из ретровирусов представлен на рис. 5-52.

5.4.9. Как эволюционировали вирусы?

Даже самые крупные вирусы не способны осуществлять биосинтетические процессы самостоятельно; они зависят в этом отношении от клеток-хозяев. Среди известных нам вирусов ни один не имеет собственных рибосом и не обладает способностью синтезировать АТР, в котором он нуждается. Ясно поэтому, что клетки должны были появиться в процессе эволюции раньше

вирусов. Предшественниками вирусов были, вероятно, небольшие фрагменты нуклеиновых кислот, которые приобрели способность размножаться независимо от хромосом их клеток-хозяев. Возможно, что предшественники РНК-вирусов напоминали собой *вироиды*, встречающиеся в некоторых растительных клетках; эти небольшие кольцевые молекулы РНК (не более 300–400 нуклеотидов) размножаются только с помощью ферментов растительной клетки, поскольку они не кодируют никаких белков. Не имея капсида, вироиды существуют лишь как голые молекулы РНК и переходят от растения к растению только в том случае, когда и донорная клетка, и клетка-реципиент оказываются поврежденными. (Именно капсид придает другим вирусам способность проникать в интактные клетки.) ДНК-вирусы, возможно, развились в процессе эволюции из небольших кольцевых фрагментов, случайно образовавшихся из куска хромосомы клетки. Под давлением естественного отбора такие независимо реплицирующиеся элементы – как РНК, так и ДНК – могли, очевидно, включать в себя те нуклеотидные последовательности клетки-хозяина, которые облегчали их самостоятельное размножение, в том числе и некоторые последовательности, кодирующие белки. Таким путем могли появиться молекулы РНК или ДНК, напоминающие мелкие *ДНК-плазмиды*, описанные в гл. 4 (т. 1, разд. 4.5.2). Плазмиды сходны с вироидами в том отношении, что и у них нет капсида, и потому они не могут переходить из клетки в клетку так, как это делают вирусы.

Первый вирус возник, вероятно, тогда, когда у плазмиды появились гены, кодирующие белки капсида. Однако в капсиде умещается ограниченное количество нуклеиновой кислоты, и, значит, число генов, которые вирус может в себе заключать, лимитируется размерами капсида. Будучи принуждены оптимальным образом использовать свой небольшой геном, некоторые мелкие вирусы (вроде бактериофага ϕX174) обзавелись в ходе эволюции *перекрывающимися генами*, в которых часть нуклеотидной последовательности, кодирующей один какой-нибудь белок, используется (с той же или с иной рамкой считывания) для кодирования второго белка. У других вирусов в процессе эволюции возникли более крупные капсиды, что должно было дать им возможность приобретать новые полезные гены (частью путем рекомбинации с иными вирусами и частью от клеток-хозяев).

Обладая уникальной способностью к переносу ДНК через видовые барьеры, вирусы, почти несомненно, играли важную роль в эволюции других организмов. Большинство вирусов часто вступает в рекомбинацию с хромосомами клеток-хозяев, захватывает случайные куски хромосом и переносит их в другие клетки или другие организмы. Кроме того, включившиеся в геном хозяина (интегрированные) копии вирусной ДНК (провирусы) становятся постоянными компонентами генома у большей части организмов. И хотя эта ДНК часто видоизменяется так, что способность образовывать полноценный вирус у нее утрачивается, она все еще может кодировать белки, причем некоторые из них оказываются полезными для клетки. Вирусы, следовательно, открывают для эволюции такой путь, как смешение генофондов различных организмов.

Вирусы сыграли также важную роль и в цитологии, но уже по совсем другой причине. Благодаря тому что они относительно просто устроены, изучение процесса их размножения подвигалось необычайно быстро, и это пролило свет на многие основные молекулярные механизмы жизнедеятельности клеток. Особенно это касается механизма генетической рекомбинации, к рассмотрению которого мы теперь и перейдем.

Заключение

Вирусы – это инфекционные частицы, которые состоят из молекул ДНК или РНК (они образуют геном вируса), упакованных в белковый капсид. Вирус способен размножаться только в клетке-хозяине; при этом для своего собственного воспроизведения он использует генетические механизмы клетки, нарушая

их нормальное функционирование. И строение вирусного генома, и способ его репликации сильно варьируют. Обычно вирусная инфекция завершается лизисом инфицированной клетки и высвобождением потомства вируса. Однако некоторые вирусы могут включаться в хромосому клетки, не вызывая лизиса последней. Здесь вирусные гены затем реплицируются вместе с генами хозяина. Поскольку вирусы переносят иногда фрагменты ДНК хозяина от одного биологического вида к другому, они создают возможности для случайного смешения различных генофондов в процессе эволюции.

5.5. Механизмы генетической рекомбинации [33]

В предыдущих разделах этой главы мы рассмотрели механизмы, благодаря которым нуклеотидные последовательности клеточной ДНК передаются из поколения в поколение почти неизменными, и рассказали, как вирусы используют различные варианты этих механизмов для репликации своих собственных геномов. Теперь мы опишем подробно те процессы, которые приводят к перераспределению нуклеотидных последовательностей. Их объединяют под общим названием **генетическая рекомбинация**. Это группа родственных, но различных реакций генетического обмена между двумя отдельными сегментами двойной спирали ДНК.

События, из которых слагается генетическая рекомбинация, могут быть подразделены на два больших класса: *общая рекомбинация* и *сайт-специфическая рекомбинация*. В процессе общей рекомбинации генетический обмен происходит между гомологичными нуклеотидными последовательностями ДНК, по большей части между двумя копиями одной и той же хромосомы. Одним из самых известных примеров такого рода служит обмен участками гомологичных хромосом (гомологов) в процессе *мейоза*; этот обмен может происходить между плотно конъюгированными хромосомами на ранних стадиях развития яйца или сперматозоида (т. 4, разд. 14.2). Общая рекомбинация увеличивает разнообразие генных комбинаций в хромосомах скрещивающейся популяции и тем самым повышает ее шансы на выживание в изменяющейся среде (т. 4, разд. 14.1.2). Мейоз свойствен только эукариотам, но преимущества подобного комбинирования генов столь велики, что и у прокариотических организмов развились в ходе эволюции такие процессы, как скрещивание и перегруппировка генов путем общей генетической рекомбинации.

Сайт-специфическая рекомбинация отличается от общей рекомбинации тем, что для ее осуществления не требуется гомологии ДНК. В обмен вступают короткие специфические нуклеотидные последовательности одной и той же или обеих спиралей ДНК, участвующих в этом процессе. Таким образом, сайт-специфическая рекомбинация изменяет распределение нуклеотидных последовательностей в геноме. Иногда эти изменения приурочены к каким-то этапам и определенным образом организованы, как, например, при исключении интегрированного бактериофага из бактериальной хромосомы (разд. 5.4.6). Однако они могут носить и совершенно случайный характер, например при включении в геном подвижных элементов (разд. 5.5.6).

Биохимия генетической рекомбинации у высших эукариот пока не изучена. Как и в случае репликации ДНК, большую часть того, что мы знаем об этих процессах, удалось выяснить в исследованиях на более доступных биологических системах, в частности на *E. coli* и ее вирусах.

5.5.1. Процессы общей рекомбинации направляются взаимодействиями, обусловленными спариванием оснований между комплементарными цепями гомологичных спиралей ДНК [34]

Общая рекомбинация включает ряд промежуточных этапов, для понимания которых необходимо затратить определенные усилия. Кроме того, путь, по которому идет обмен между цепями ДНК, по-видимому, несколько разли-

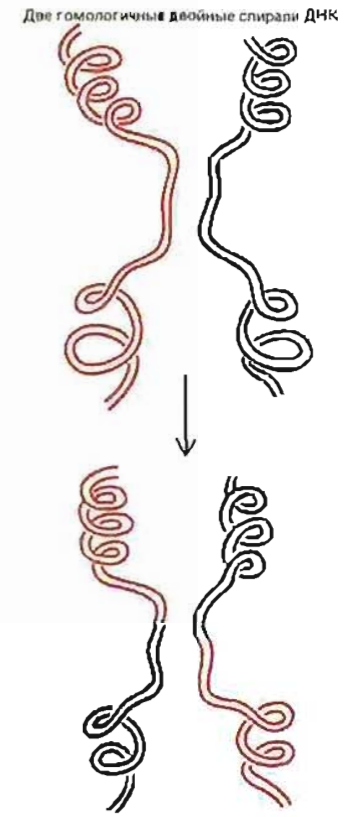


Рис. 5-53. Разрыв и воссоединение двух гомологичных двойных спиралей ДНК. В результате образуются две кроссоверные хромосомы.

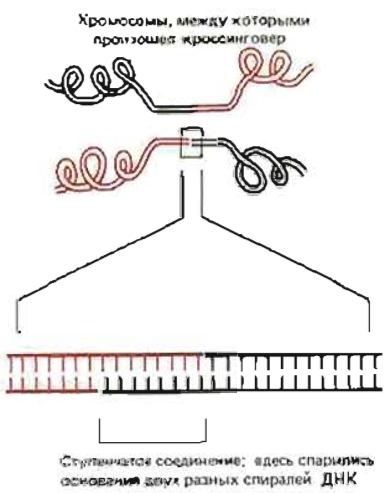


Рис. 5-54. Ступенчатое соединение, связывающее две хромосомы в том месте, где между ними произошел кроссинговер. Длина таких соединений часто достигает нескольких тысяч нуклеотидов.

чается у разных организмов. Однако детальный генетический анализ скрещивающихся бактерий, вирусов и грибов дает основания считать, что в целом результаты общей рекомбинации всегда одинаковы:

1. Конечный итог процесса сводится к тому, что две гомологичные двойные спирали ДНК разрываются и разорванные концы одного гомолога соединяются с соответствующими концами другого, так что вновь получаются две целые спирали ДНК, но теперь уже каждая из них состоит из частей двух исходных молекул ДНК (рис. 5-53).
2. Точка обмена (т.е. то место, где на рис. 5-53 красная спираль соединяется с черной) может прийтись на любой участок гомологичных нуклеотидных последовательностей хромосом, вовлекаемых в обмен.
3. В точке обмена каждая полинуклеотидная цепь одной из спиралей соединяется путем спаривания оснований с цепью другой спирали, и между двумя разными спиралями ДНК возникает *ступенчатое соединение* (рис. 5-54). Такие ступенчатые соединения могут состоять из нескольких тысяч пар оснований. Как именно они возникают, мы объясним позже.
4. В точке обмена не происходит изменения нуклеотидных последовательностей. Точность разрыва и воссоединения настолько велика, что ни один нуклеотид не утрачивается, не добавляется и не превращается в какой-нибудь другой.

Механизм общей рекомбинации таков, что в обмен могут вступать только два участка спирали ДНК, нуклеотидные последовательности которых обладают высокой степенью гомологии. Обеспечивается это наличием ступенчатого соединения в точке обмена, поскольку такое соединение может образоваться лишь в том случае, если комплементарные взаимодействия между цепями, принадлежавшими двум исходным спиралям, происходят на достаточно длинном участке. Но как именно возникает это ступенчатое соединение и как две гомологичные спирали ДНК, которые должны спариться, распознают гомологию своих нуклеотидных последовательностей? Как мы увидим, гомологичные участки сначала узнают друг друга непосредственно путем комплементарного спаривания. В дальнейшем образование пар оснований между комплементарными цепями, принадлежащими двум спиралям ДНК, направляет общую рекомбинацию таким образом, что она происходит лишь в пределах достаточно протяженной области гомологии двух нуклеотидных последовательностей ДНК без каких бы то ни было изменений в организации хромосом.

5.5.2. Общая рекомбинация инициируется в точке разрыва одной из цепей двойной спирали ДНК [34, 35]

Каждая из двух цепей двойной спирали ДНК не только спарена с другой цепью, но и закручена вокруг нее в спираль. Вследствие этого любые комплементарные взаимодействия между двумя гомологичными двойными спиралями ДНК возможны лишь в том случае, если сначала в какой-либо одной из цепей возникнет разрыв, который освободит эту цепь для необходимого раскручивания и повторного закручивания. По той же причине для любого *взаимного* обмена цепями между двумя двойными спиралями ДНК нужно не меньше двух разрывов, т.е. по одному одноцепочечному разрыву в каждой из двух двойных спиралей. Ясно, наконец, что для перестройки, изображенной на рис. 5-53, должны разорваться все четыре цепи, потому что лишь в этом случае каждая из них сможет воссоединиться с другим партнером. Как же осуществляются и координируются все эти события, которые происходят лишь тогда, когда в двух спиралях ДНК имеются достаточно протяженные участки с гомологичными нуклеотидными последовательностями?

Ключ к пониманию этого был получен, когда выяснилось (и подтвердилось в экспериментах со многими различными организмами), что для инициации событий, из которых слагается общая рекомбинация, достаточно одного

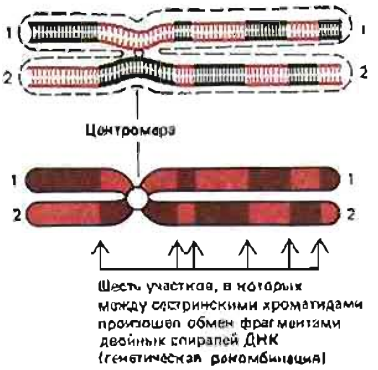


Рис. 5-55. Схема, помогающая связать обмены между сестринскими хроматидами (выявляемые в световом микроскопе) с кроссинговером, происходящим на уровне двойной спирали ДНК. Конденсированная хромосома эукариотической клетки изображена здесь такой, какой она видна в метафазе. В нижней части схемы показана окрашенная хромосома; верхний рисунок дает представление о ее структуре. Полагают, что каждая хроматида состоит из одной очень длинной двойной спирали ДНК (подробное обсуждение этого вопроса см. в гл. 8). Хроматида 1 и хроматида 2 – сестринские образования, возникшие в результате репликации одной и той же родительской спирали ДНК в одной и той же клетке на более раннем этапе (см. гл. 11). Только что синтезированную хроматиду 1 (до обменов) следовало бы изобразить здесь в виде сплошь красной двойной спирали ДНК, а хроматиду 2 – в виде сплошь черной. Произошедшие между ними обмены, которые здесь показаны, могут быть обнаружены при помощи специальной методики окрашивания, выявляющей хроматин каждой дочерней спирали ДНК (см. рис. 5-56). Обратите внимание на реципрокное расположение соответствующих участков в сестринских хроматидах.

разрыва только в одной из двух цепей спирали ДНК. Оказалось, что факторы, вызывающие появление таких одноцепочечных разрывов, в частности γ-лучи и рентгеновские лучи, могут инициировать генетическую рекомбинацию. Например, в клетках позвоночных в S- и G_2-фазах митотического цикла эти факторы индуцируют обмены между двумя сестринскими хроматидами каждой хромосомы (рис. 5-55). Поскольку обмен между сестринскими хроматидами есть не что иное, как обмен между идентичными копиями одной и той же хромосомы, он не приводит к перетасовке разных геномов: его нельзя поэтому обнаружить генетическими методами. Можно, однако, воспользоваться особой методикой окрашивания, позволяющей различать две сестринские хроматиды, и тогда в метафазе легко обнаружить хроматиды, между которыми произошел обмен, по их необычному виду, напоминающему костюм арлекина (рис. 5-56).

Представляется вероятным, что во время мейоза у эукариот и в аналогичном рекомбинационном процессе у бактерий некий фермент вносит одноцепочечный разрыв в точке, с которой начинается спаривание оснований (эти точки разбросаны по спирали ДНК, но их распределение отнюдь неслучайно). Рис. 5-57 дает общее представление о том, как может такой разрыв индуцировать начальное взаимодействие между двумя комплементарными участками двойной спирали ДНК. Детали нам пока не известны, но изучение некоторых белков, о которых мы будем сейчас говорить, позволяет считать, что в процессе общей рекомбинации такой этап действительно имеется.

5.5.3. Специальные белки дают возможность одиночным цепям ДНК спариваться с гомологичным участком двойной спирали ДНК [36]

Сведения по энзимологии генетической рекомбинации были получены главным образом в исследованиях на мутантах *E. coli* с нарушенным механизмом общей рекомбинации. В этих исследованиях были идентифицированы некоторые необходимые для данного процесса белки. Один из них – это *белок SSB E. coli*, тот самый дестабилизирующий спираль белок, который необходим также и для репликации ДНК *E. coli* (разд. 5.3.6). Этот низкомолекулярный белок (19 000 дальтон) прочно связывается в виде кооперативно образованных кластеров (разд. 8.1.4) с сахарофосфатным остовом всех присутствующих в клетке одиночных цепей ДНК и вызывает тем самым распрямление ранее довольно компактно свернутых цепей, благодаря чему все их основания оказываются «открытыми» (рис. 5-58). В такой растянутой конформации одиночные цепи ДНК легко связывают удовлетворяющие требованиям комплементарности свободные нуклеозидтрифосфаты (при репликации ДНК) или комплементарные сегменты другой одиночной цепи ДНК (в процессе общей рекомбинации).

Комплементарные взаимодействия, играющие в общей рекомбинации центральную роль, можно воспроизвести в экспериментах in vitro по ренатурации ДНК, разделенной на отдельные цепи. Такая ренатурация происходит, когда в растворе вследствие случайного соударения одиночных цепей ДНК комплементарные нуклеотидные последовательности оказываются одна против другой и образуют короткий отрезок двойной спирали. За этим сравнительно медленным этапом *нуклеации спирали* следует очень быстрый этап «застегивания молнии»: двойная спираль при этом растет до тех пор, пока не образуется максимально возможное число водородных связей (рис. 5-59). Когда дестабилизирующий белок *E. coli* (белок SSB) связывается с такими цепями ДНК и придает им растянутую конформацию, при физиологических условиях он ускоряет нуклеацию спирали, а значит, и реассоциацию цепей более чем в 1000 раз. Однако эта катализируемая реакция спаривания происходит между двумя одиночными цепями ДНК, и самой по себе ее недостаточно для начальных этапов образования комплементарных пар оснований в процессе генетической рекомбинации, потому что в этот процесс вовлекаются две

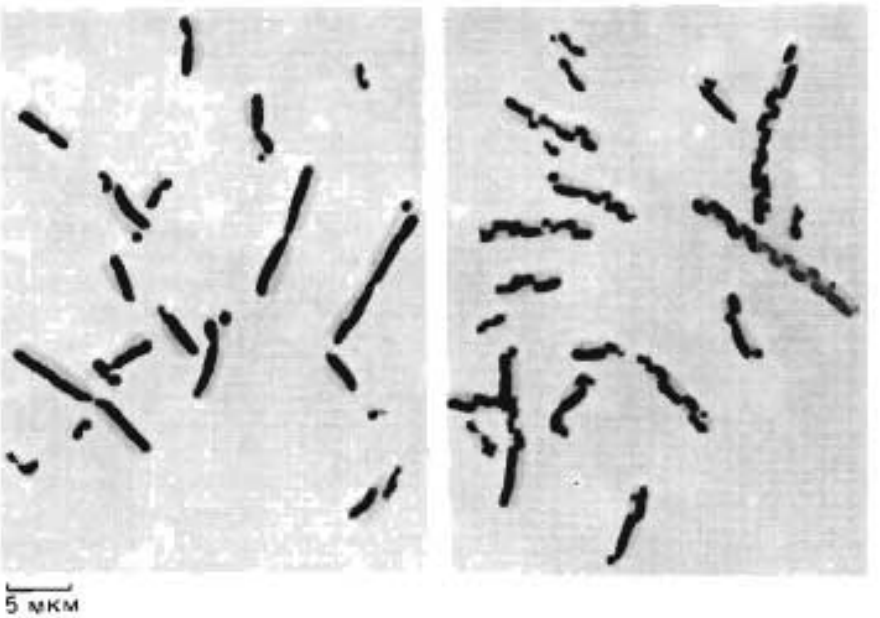


Рис. 5-56. Обмены между сестринскими хроматидами, выявленные в метафазных хромосомах. Слева – хромосомы из контрольных клеток, в которых произошло лишь небольшое число таких обменов. Справа – хромосомы из клеток, подвергнутых обработке, вызывающей одноцепочечные разрывы в ДНК; здесь каждая хроматида участвовала во многих актах обмена. Обратите внимание на реципрокный характер окрашивания сестринских хроматид. (См. также рис. 5-55.) (С любезного разрешения Judy Bodycote, Sheldon Wolff.)

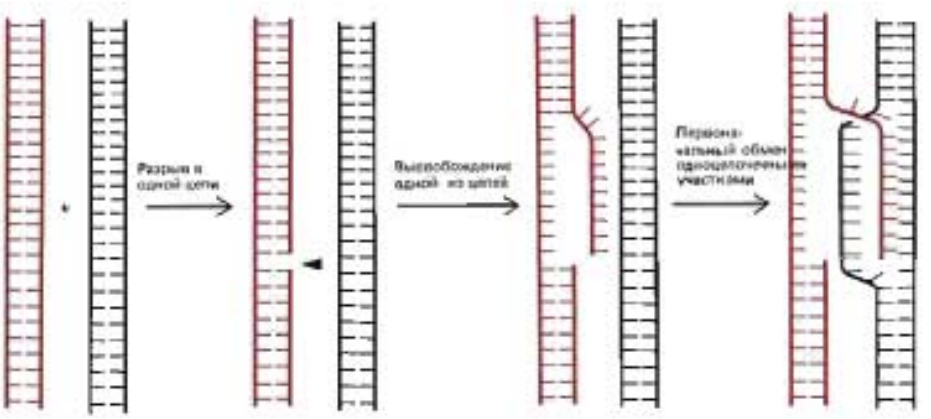


Рис. 5-57. Схема, иллюстрирующая начальный одноцепочечный обмен между двумя гомологичными двойными спиралями ДНК в процессе общей рекомбинации. Разрыв в одной из цепей ДНК высвобождает эту цепь, и она внедряется во вторую спираль, образуя здесь короткий спаренный участок. Спариваться таким путем и тем самым инициировать общую рекомбинацию могут только такие две молекулы ДНК, у которых нуклеотидные последовательности комплементарны.

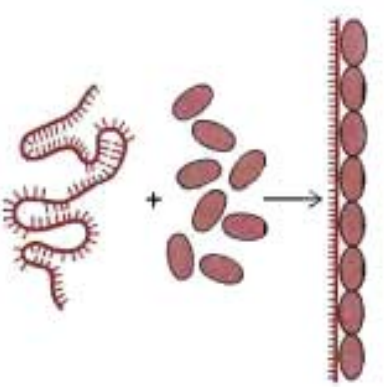


Рис. 5-58. Присоединение дестабилизирующего белка к одиночной цепи ДНК способствует реализации комплементарных взаимодействий. Уже связанные с полинуклеотидной цепью белковые мономеры помогают присоединиться к ней соседним мономерам, и таким образом все они выстраиваются вдоль цепи ДНК в длинные кластеры. В генетической рекомбинации, по-видимому, участвует тот же самый дестабилизирующий белок, что и в репликации ДНК (см. рис. 5-37).

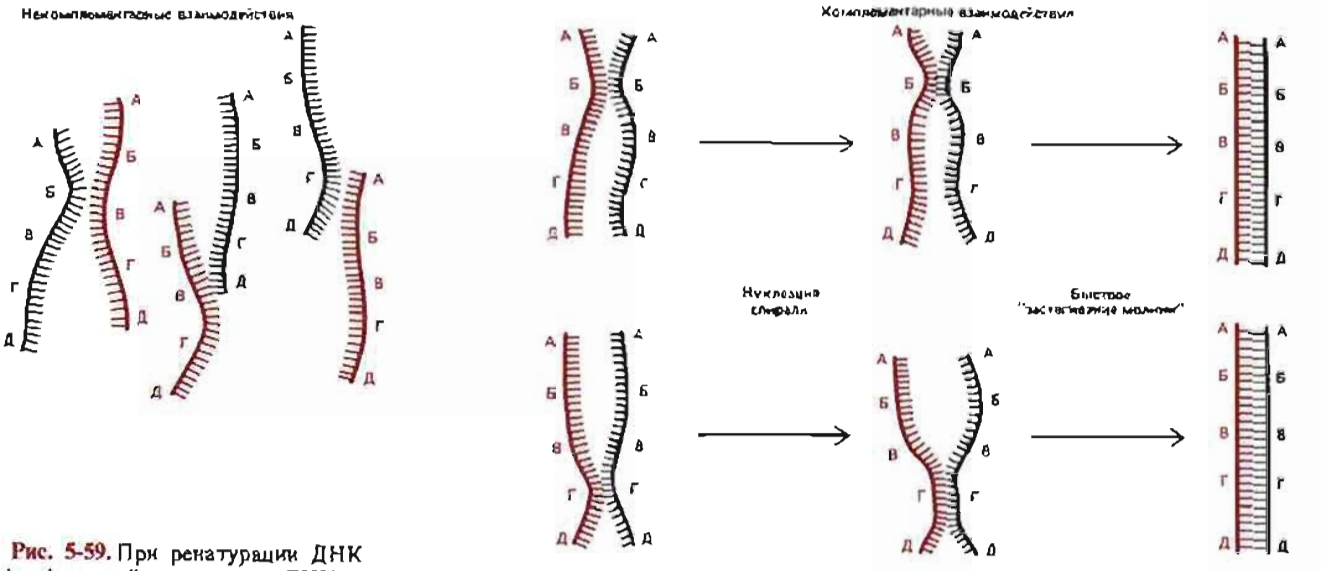


Рис. 5-59. При ренатурации ДНК in vitro двойные спирали ДНК образуются заново из ранее разделившихся цепей. Восстановление спиралей зависит от случайного соударения двух комплементарных цепей (см. т. 1, разд. 4.5.5). Большинство таких соударений безрезультатно (как это видно из левой части рисунка), но некоторые из них приводят к образованию на коротком участке комплементарных пар оснований (т.е. к нуклеации спирали). За этим следует быстрое «застегивание молнии» – и двойная спираль готова. Посредством такого процесса – методом проб и ошибок – каждая цепь ДНК может найти себе комплементарного партнера среди миллионов «неподходящих» цепей. По-видимому, общая рекомбинация всегда инициируется именно таким путем: комплементарные партнеры узнают друг друга по методу проб и ошибок.

двойные спирали ДНК. Известно, что у *E. coli* генетическая рекомбинация происходит с участием по крайней мере еще одного белка, а именно белка RecA.

Белок RecA назван так по гену, который, как выяснилось в 1965 г., играет главную роль в конъюгации хромосом. Биохимики долго вели поиски важного, но неуловимого продукта этого гена, и наконец в 1976 г. его удалось получить в чистом виде. Он оказался белком с молекулярной массой 38 000. Выяснилось, что ему свойственно несколько любопытных видов ферментативной активности. Подобно дестабилизирующему белку, он прочно связывается с одиночными цепями ДНК и может способствовать высвобождению разорванной цепи из двойной спирали ДНК (как это предусматривается схемой, изображенной на рис. 5-57). Он может также одновременно присоединяться и к двойной спирали ДНК, тем самым удерживая вместе одиночную цепь и двойную спираль (рис. 5-60, *А*). Кроме того, белок RecA обладает свойствами ДНК-зависимой АТР-азы: у него имеется дополнительный активный центр для связывания и гидролиза АТР. Эта ферментативная активность обеспечивает в белке серию конформационных изменений, вследствие которых трехцепочечный комплекс, изображенный на рис. 5-60, *А*, превращается в структуру, показанную на рис. 5-60, *Б*. Последняя реакция является ключевой, поскольку она порождает прямое комплементарное взаимодействие между одиночной цепью и двойной спиралью, т.е. именно то взаимодействие, которое, как полагают, инициирует главные события в процессе рекомбинации. Подробно эта ключевая реакция пока не изучена, но есть предположение, что энергия гидролиза АТР используется белком RecA для продвижения одиночной цепи вдоль двойной спирали в поисках участка с гомологичной нуклеотидной последовательностью, которая необходима для того, чтобы могло начаться спаривание оснований.

В экспериментах in vitro было показано, что дестабилизирующий белок *E. coli* (белок SSB) и белок RecA действуют кооперативно, облегчая реакции спа-

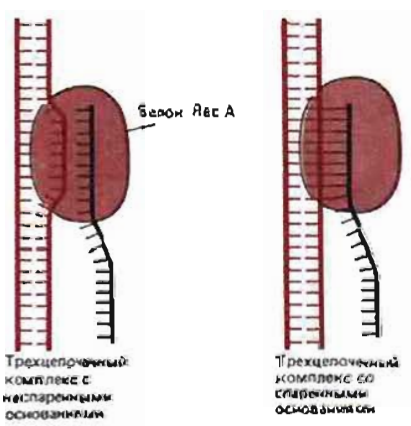


Рис. 5-60. Два типа комплексов, образующихся между одиночной цепью и двойной спиралью ДНК при участии белка RecA. Когда молекулы ДНК инкубируют in vitro с белком RecA, сначала образуется комплекс с неспаренными основаниями, а затем комплекс, в котором основания спарены.

ривания. Быть может, именно по этой причине генетическая рекомбинация в клетке *E. coli* резко ослабевает, если хоть один из этих белков оказывается дефектным.

5.5.4. Генетическая рекомбинация включает обычно обмен с перекрещиванием цепей [37]

Трудным и медленным этапом в процессе генетической рекомбинации является начальный одноцепочечный обмен между двумя двойными спиралями (см. рис. 5-57). После этого начального обмена гомологичные нуклеотидные последовательности двух взаимодействующих спиралей устанавливаются в строгом соответствии одна с другой, и поэтому расширение области спаривания и «закладка» новых обменов между двумя спиралями происходят быстро. Во время этих событий часто наблюдаются удаление некоторого количества нуклеотидов и локальный ресинтез ДНК, сходные с теми, какие имеют место при репарации ДНК. Однако возможных вариантов здесь много, так что разные организмы нередко используют на этой стадии различающиеся в деталях пути, и даже в одних и тех же клетках во время отдельных событий эти пути могут быть неодинаковыми. Бо́льшая часть путей включает в качестве промежуточного этапа обмен с перекрещиванием цепей между двумя спиралями ДНК. Один из самых простых путей, предусматривающих образование соответствующей структуры, показан на рис. 5-61.

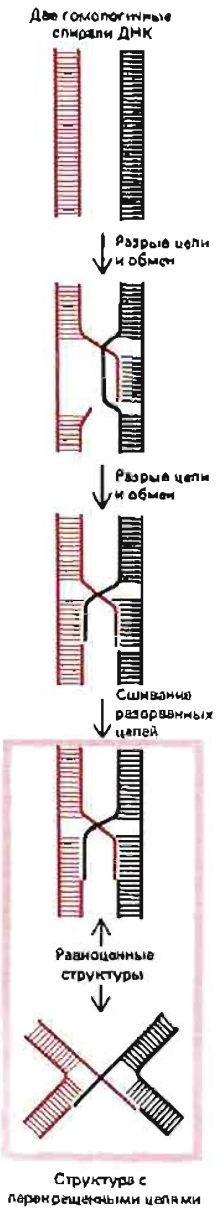


Рис. 5-61. Обмен с перекрещиванием цепей. Много возможных путей ведет от структуры, представленной на рис. 5-57, к структуре с перекрещенными цепями. Здесь показан один из таких путей.

В случае обмена с перекрещиванием цепей две гомологичные спирали ДНК после первоначального этапа спаривания удерживаются вместе благодаря перекрестному обмену двумя цепями из имеющихся четырех – по одной цепи от каждой спирали. Для поддержания этой структуры не требуется, чтобы нарушалось спаривание оснований. Структура обладает некоторыми интересными и важными свойствами: 1) Точка обмена между двумя гомологичными спиралями ДНК, расположенная там, где скрещиваются две их цепи, может быстро перемещаться по спирали взад и вперед; этот спонтанный процесс называют **миграцией ветвей** (рис. 5-62). Миграция ветвей способна значительно увеличивать область спаривания оснований между двумя взаимодействующими цепями, принадлежавшими первоначально разным спиралям ДНК; возможно, что именно от нее зависит значительная протяженность области спаривания между рекомбинировавшими участками (см. рис. 5-54). 2) Структура, образующаяся при обмене с перекрещиванием цепей, содержит две перекрещенные и две неперекрещенные цепи. Эта структура может существовать в различных *изомерных формах*, возникающих в результате вращения составляющих ее элементов относительно друг друга, как показано на рис. 5-63. Изомеризация изменяет положение двух пар цепей: две ранее перекрещивавшиеся цепи становятся неперекрещивающимися и наоборот.

Для того чтобы вновь восстановились две отдельные спирали ДНК и тем самым прекратился процесс спаривания, в каждой из двух перекрещенных цепей должен произойти разрыв. Если он произойдет *до того*, как структура с перекрещенными цепями подвергнется изомеризации, то две исходные спирали ДНК отделятся друг от друга почти неизменными – у каждой из них будет изменена только одна из цепей и только на коротком отрезке (рис. 5-63). Если же разрыв двух перекрещенных цепей произойдет после изомеризации, то часть каждой исходной спирали ДНК окажется присоединенной (ступенчатым соединением) к части другой спирали; иными словами, между двумя спиралями ДНК произойдет кроссинговер (рис. 5-63).

Рис. 5-64 показывает, как бы мог протекать этот процесс между двумя сестринскими хроматидами в митотических клетках или между несестринскими хроматидами во время мейоза (т. 4, разд. 14.2.2). Хотя изомеризация, играющая здесь ключевую роль, должна происходить спонтанно с определенной частотой, в клетках она, возможно, ускоряется под действием ферментов или регулируется каким-либо иным путем. Какая-то регуляция осуществляется, по

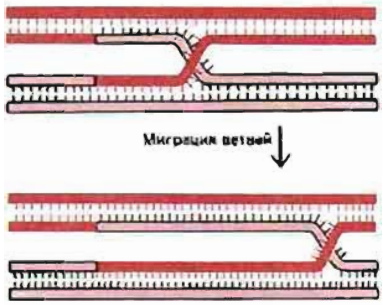
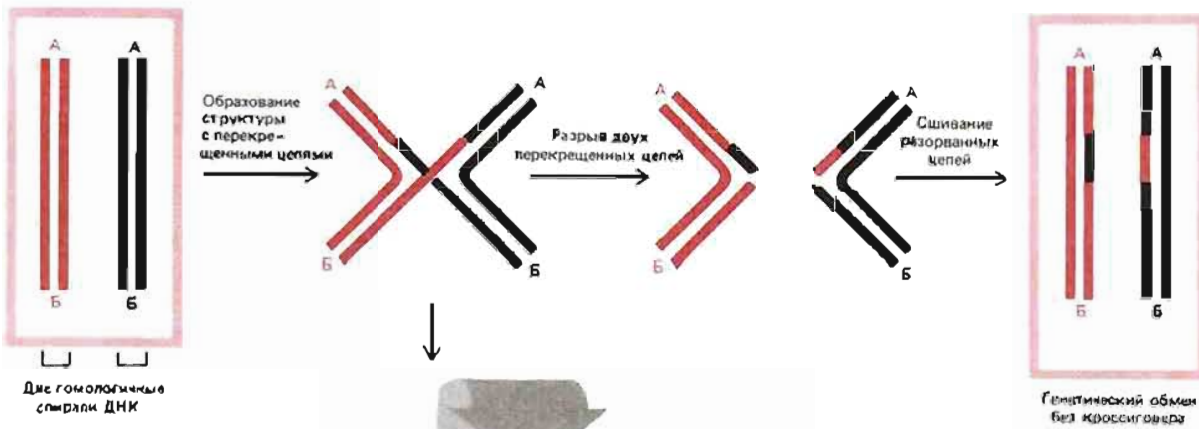


Рис. 5-62. При обмене с перекрешиванием цепей происходит быстрая миграция ветвей, которая расширяет область спаривания цепей, принадлежащих двум разным спиралям ДНК.



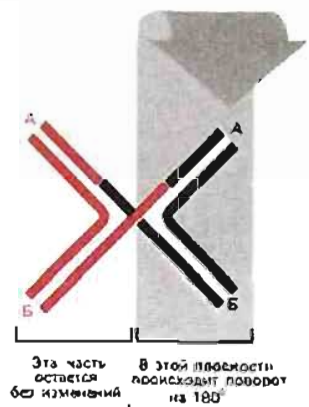
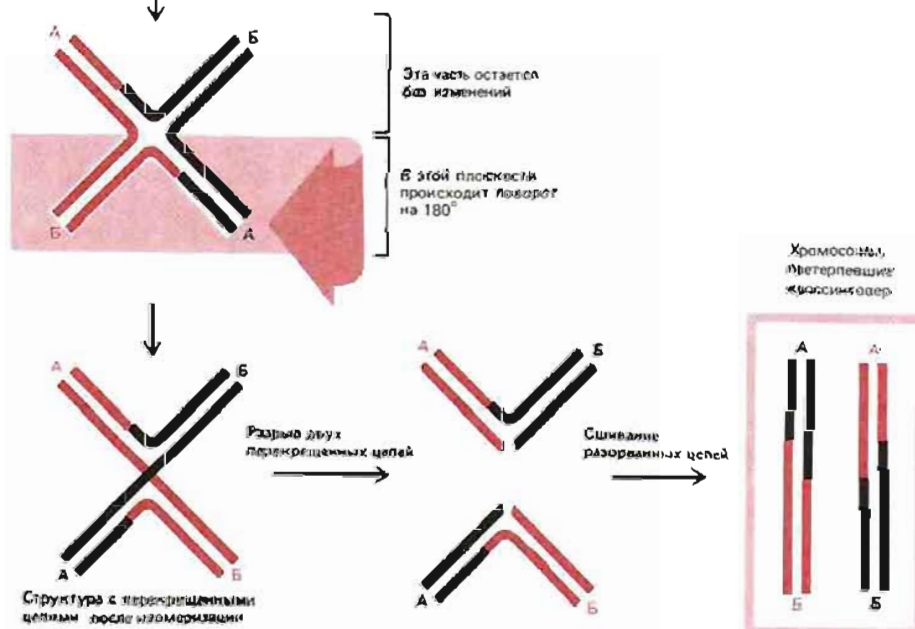


Рис. 5-63. Изомеризация структуры с перекрещенными цепями. При отсутствии изомеризации разрыв двух перекрещенных цепей приводит к тому, что обмен завершается без кроссинговера (*вверху*). В случае изомеризации разрыв перекрещенных цепей дает две кроссоверные хромосомы (*внизу*).



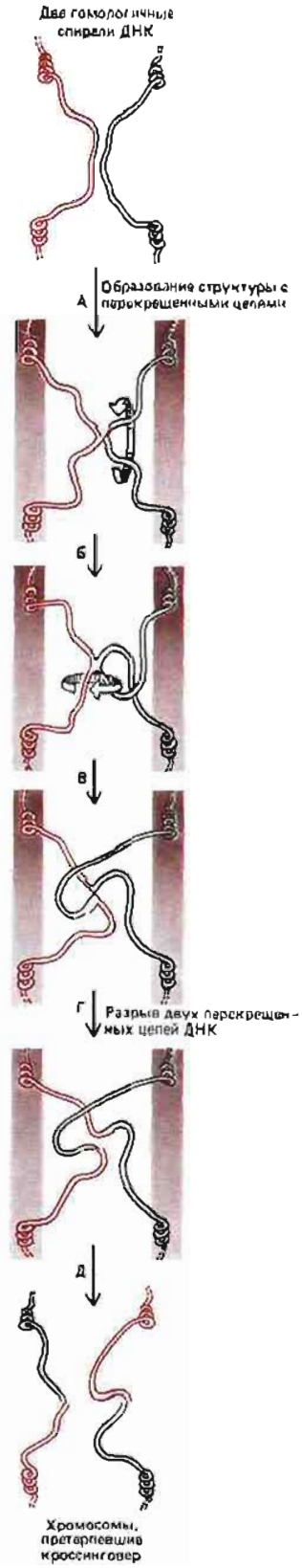


Рис. 5-64. Генетическая рекомбинация между двумя гомологичными хромосомами. Изомеризация структуры с перекрещенными цепями происходит так, как это представлено на рис. 5-63.

всей вероятности, во время мейоза, когда две спаривающиеся двойные спирали ДНК оказываются прижатыми одна к другой в *синаптонемальном комплексе* (т. 4, разд. 14.2.3).

5.5.5. Общая рекомбинация способствует процессам репарации ДНК [38]

Существует довольно большая вероятность того, что под воздействием некоторых видов излучения, а также реакционноспособных химических веществ обе цепи спирали ДНК будут повреждены одновременно в одном и том же участке этой спирали. Когда это случается, повреждение часто не может быть исправлено ни одним из упомянутых выше механизмов репарации ДНК. Есть, однако, убедительные данные (они были получены на бактериях), указывающие на то, что некоторые серьезные повреждения в ДНК, не поддающиеся никаким другим репаративным воздействиям, могут быть устранены посредством особых репаративных процессов, связанных с генетической рекомбинацией. Механизм такой репарации нам не известен, но мы знаем, что во время главного события, т.е. конъюгация хромосом, четыре копии генетической информации, заключенной в данной последовательности нуклеотидов (четыре цепи ДНК), оказываются на время сведенными вместе (рис. 5-63). Это в принципе делает возможной репарацию с участием сестринских хроматид даже тогда, когда в одной из двух спиралей ДНК, участвующих в конъюгации, повреждены обе цепи вблизи одной и той же пары оснований. Поэтому обмены между сестринскими хроматидами, о которых мы говорили выше (рис. 5-55 и 5-56), возможно, выполняют определенную функцию, хотя они происходят в соматических клетках и перетасовывают только идентичные гены.

5.5.6. Ферменты сайт-специфической рекомбинации вводят в геномы особые нуклеотидные последовательности ДНК и выводят их из геномов [39]

В сравнении с рассмотренной выше общей рекомбинацией генетическая рекомбинация другого типа гораздо более ограничена в своем действии. В этом случае весь процесс с его начальным этапом узнавания, который сводит вместе две спирали ДНК, направляется особым рекомбинационным ферментом; спаривания оснований здесь не требуется (даже в тех системах, где оно все-таки происходит, в образовании ступенчатого соединения участвует не более нескольких пар оснований). Эта форма рекомбинации называется **сайт-специфической рекомбинацией**, потому что рекомбинационный фермент узнает специфические нуклеотидные последовательности в одной или в двух рекомбинирующих молекулах ДНК; именно в этих местах (сайтах) и происходит рекомбинация.

Среди систем этого типа первой была обнаружена система, обеспечивающая включение бактериофага лямбда в хромосому *E. coli* и его исключение из нее. Фермент, ответственный за эту реакцию,– его называют *лямбда-интеразой* – кодируется одним из генов данного вируса. В очищенном виде фермент катализирует реакцию, представленную на рис. 5-65. Интеграза узнает две различные негомологичные нуклеотидные последовательности: одну – в кольцевой двойной спирали бактериофага и вторую – в бактериальной хромосоме. Во время рекомбинации обе цепи двойной спирали ДНК бактериофага на время разрываются и соединяются с концами точно так же разорванных цепей двойной спирали бактериальной ДНК. Фермент тесно сближает специфи-

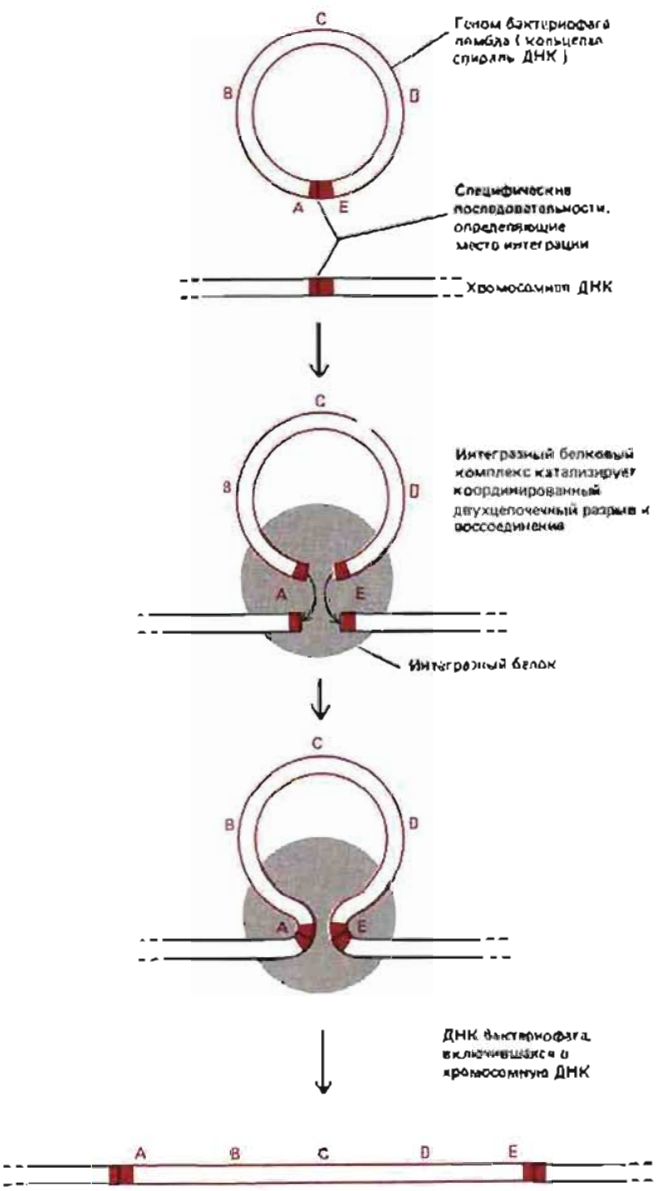


Рис. 5-65. Сайт-специфическая рекомбинация, посредством которой ДНК бактериофага λ внедряется в хромосому клетки-хозяина (*E. coli*). Особые участки (сайты), которые узнает интеграза, представляют собой определенные нуклеотидные последовательности ДНК. Здесь их символизируют красные прямоугольники (см. также рис. 5-50).

ческие участки (сайты) бактериальной и фаговой хромосом, а затем инициирует необходимые реакции разрыва и воссоединения ДНК. Отдельные этапы этого процесса следуют друг за другом так быстро, что уловить какие-либо промежуточные формы ДНК, которые, по-видимому, все-таки образуются, не представляется возможным.

Рис. 5-66 показывает, что тот же механизм сайт-специфической рекомбинации может использоваться бактериофагом лямбда и для *обратного* действия, обеспечивающего исключение бактериофага из бактериальной хромосомы, после чего начинается быстрое его размножение в бактериальной клетке. Реакция этого же типа свойственна, как полагают, и развивающимся В-лимфоцитам, в которых исключение определенных нуклеотидных последовательностей ДНК приводит к перегруппировке генов, ответственных за синтез иммуноглобулинов (т. 5, разд. 17.4.2). Той же реакции приписывают и инверсию гена, контролирующего образование оболочки у бактерии *Salmonella* (разд. 8.5.7).

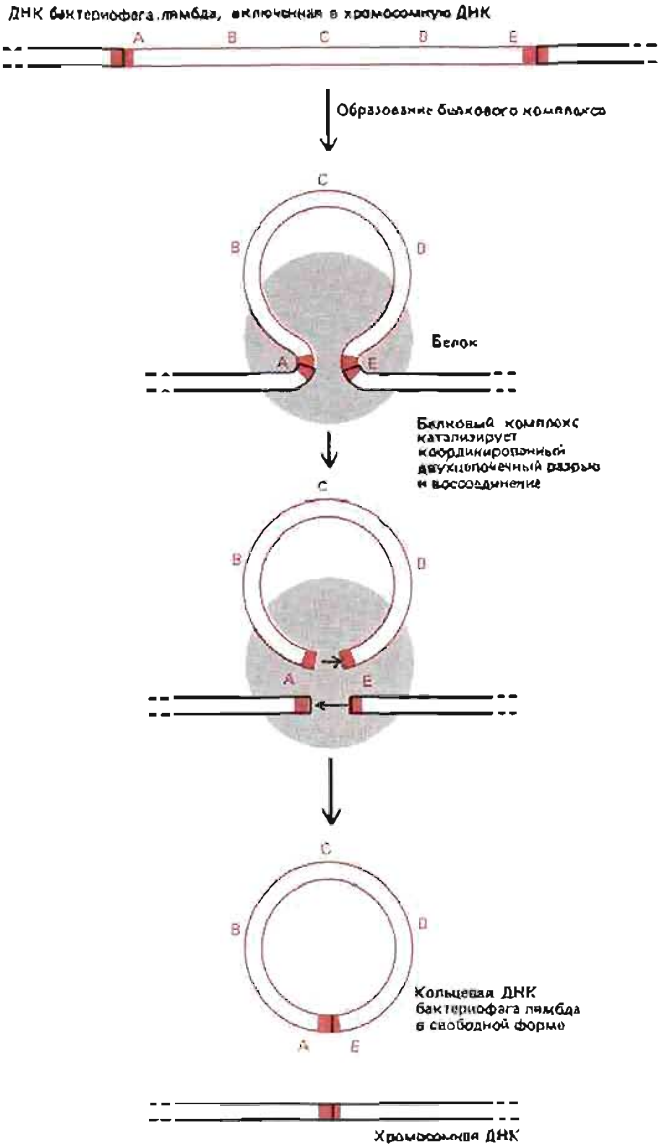


Рис. 5-66. ДНК бактериофага λ исключается из хромосомы клетки-хозяина посредством реакции, обратной той, какая показана на рис. 5-65. Данная реакция катализируется комплексом интегразы с еще одним белком бактериофага. Активность этого белка регулируется, так что включение бактериофага в хромосому и его исключение из нее находятся под контролем (см. рис. 5-50).

Открыта большая группа *мобильных генетических элементов*, встречающихся в хромосомах как прокариот, так и эукариот. Они обладают способностью включаться в геном своих хозяев и выходить из него, подобно тому как это делает бактериофаг лямбда. Некоторые из них, как и бактериофаг лямбда, являются вирусами и могут переходить из клетки в клетку в форме частицы, в которой ДНК-геном (или РНК-геном) защищен оболочкой, дающей вирусу возможность покидать клетки и вновь внедряться в них. Многие другие мобильные генетические элементы не образуют вирусных частиц и не способны выйти из клетки. Эти нуклеотидные последовательности могут перемещаться с места на место лишь в хромосомах одной и той же клетки и ее потомства; они называются **подвижными элементами**. Как и многие вирусы, подвижные элементы перемещаются при посредстве системы сайт-специфической рекомбинации, способной узнавать их ДНК даже в интегрированном виде, в геноме хозяина.

Хотя способ, посредством которого вирусы и подвижные элементы внедряются в геном, ясен еще не до конца, мы уже знаем, что разные мобильные

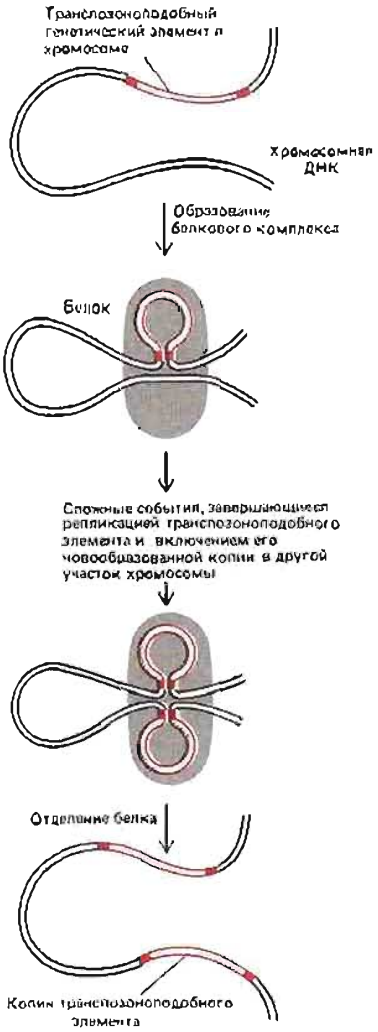


Рис. 5-67. Перемещение одного из подвижных генетических элементов в хромосоме. Элемент такого типа, который представлен здесь, появляется в новом месте, но при этом данная нуклеотидная последовательность ДНК не покидает своего старого места. Красными квадратиками обозначены две идентичные нуклеотидные последовательности ДНК, обычно примыкающие с двух концов к таким подвижным элементам.

элементы используют для этой цели разные механизмы. В отличие от бактериофага лямбда, узнающего в хромосоме хозяина специфический участок прикрепления, многие мобильные элементы прикрепляются к хромосоме в точках, выбранных более или менее случайно. У некоторых мобильных элементов в интеграции участвует, очевидно, какая-то интеграза, напоминающая аналогичный фермент бактериофага лямбда. Однако на бактериях было показано, что ряд транспозоноподобных элементов перемещается посредством сайт-специфической рекомбинации более сложного типа. У этих элементов интеграция сопровождается репликацией их нуклеотидной последовательности, благодаря чему копия данной последовательности может включаться в новый участок хромосомы, тогда как исходная последовательность остается в старом участке (рис. 5-67).

Предполагается, что интегрированные формы вирусов и различные подвижные генетические элементы рассеяны в геномах всех клеток, но до сих пор такие подвижные элементы удалось достаточно хорошо охарактеризовать лишь у бактерий, дрожжей, кукурузы и плодовой мушки. Существует множество самых разных типов подвижных элементов, и каждый из них в какой-то момент активируется не известными нам сигналами, вынуждающими его включиться в соответствующий участок генома или, наоборот, покинуть его. Процесс этот катализируется целым рядом еще мало изученных сайт-специфических ферментных комплексов. Поскольку такие перемещения могут происходить чрезвычайно редко (для многих бактериальных транспозонов не чаще 1 раза на 10^5 клеточных генераций), выявить присутствие этих нуклеотидных последовательностей часто бывает очень трудно. Иногда их считают паразитами, и нередко они представлены в клетке большим числом копий.

К нуклеотидной последовательности любого подвижного элемента (насчитывающей от нескольких сотен до десятков тысяч пар оснований) обычно примыкают с двух сторон две одинаковые нуклеотидные последовательности. По всей вероятности, действие ферментов сайт-специфической рекомбинации основано на том, что они узнают именно эти одинаковые концевые последовательности и вводят находящийся между ними подвижный элемент в хромосому или, наоборот, исключают его из хромосомы.

Подвижные элементы обычно не только сами способны перемещаться, но иногда также перемещают или перераспределяют находящиеся по соседству с ними нуклеотидные последовательности генома хозяина. Они, например, часто вызывают делеции, или выпадение, соседних нуклеотидных последовательностей, а в ряде случаев переносят их с собой на новое место. Таким образом, благодаря наличию подвижных элементов расположение нуклеотидных последовательностей в хромосомах оказывается гораздо менее стабильным, чем принято было считать ранее, и можно думать поэтому, что именно они ответственны за многие изменения в геномах, важные с эволюционной точки зрения.

Заключение

Механизмы генетической рекомбинации обеспечивают возможность перемещения из хромосомы в хромосому больших фрагментов двойной спирали ДНК. Выработавшиеся для этого в процессе эволюции последовательности реакций таковы, что две спирали ДНК, разрываясь и воссоединяясь вновь, претерпевают минимальное повреждение, так что легко происходит восстановление двух целых хромосом. Процессы рекомбинации распадаются на два больших класса. При общей рекомбинации начальные реакции зависят от комплементарных взаимодействий, происходящих на обширных участках между цепями двух двойных спиралей ДНК, вовлекаемых в рекомбинацию. Общая рекомбинация может поэтому происходить лишь между двумя гомологичными молекулами ДНК; и хотя хромосомы при этом обмениваются генами, общая последовательность расположения генов в хромосоме не нарушается. При

сайт-специфической рекомбинации реакции спаривания зависят от узнавания — при посредстве специального белка — двух нуклеотидных последовательностей, которым предстоит рекомбинировать. Сайт-специфическая рекомбинация обычно изменяет относительное расположение нуклеотидных последовательностей в хромосомах.

Литература

Общая

Stent G.S. Molecular Genetics: An Introductory Narrative, San Francisco, Freeman, 1971.
Watson J.D. Molecular Biology of the Gene, 3rd ed., Menlo Park, Ca., Benjamin-Cummings, 1976.

Цитированная

1. *Stryer L. Biochemistry*, 2nd ed., San Francisco, Freeman, 1981. (Главы 25, 26 и 27.)
Hershey J.W.B. The translational machinery. In: Cell Biology, A Comprehensive Treatise, Vol. 4, D.M. Prescott and L. Goldstein, eds., New York, Academic Press, 1980.
2. *Chamberlin M.J.* RNA polymerase: an overview. In: RNA Polymerase, R. Losick and M. Chamberlin, eds., pp. 17–67, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1976.
Pribnow D. Genetic control signals in DNA. In: Biological Regulation and Development, Vol. 1, R. Goldberger, ed., pp. 219–277, New York, Plenum, 1979.
Rosenberg M., Court D. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription, Annu. Rev. Genet., 13, 319–353, 1979.
3. *Rich A., Kim S.H.* The three-dimensional structure of transfer RNA, Sci. Am., **238** (1), 52–62, 1978.
4. *Schimmel P.R., Söll D.* Aminoacyl tRNA synthetase: general features and recognition of transfer RNAs, Annu. Rev. Biochem., **48**, 601–648, 1979.
5. *Crick F.H.C.* The genetic code: III. Sci. Am., **215** (4), 55–62, 1966.
Schimmel P.R., Söll D., Abelson J., eds. Transfer RNA, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1980.
6. *Nomura M., Tissières A., Lengyel P., eds.* Ribosomes, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1974.
Lake J.A. The ribosome, Sci. Am., **245** (2), 84–97, 1981.
Chambliss G. et al., eds. Ribosomes: Structure, Function and Genetics, Baltimore, University Park, 1980.
7. *Clark B.* The elongation step of protein biosynthesis, Trends Biochem. Sci., 5, 207–210, 1980.
8. *Caskey C.T.* Peptide chain termination, Trends Biochem. Sci., 5, 234–237, 1980.
9. *Hunt T.* The initiation of protein synthesis, Trends Biochem. Sci., 5, 178–181, 1980.
Steitz J.A. Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA, in Biological Regulation and Development, Vol. 1, R. Goldberger, ed., pp. 349–399, New York, Plenum, 1979.
10. *Ochoa S., deHaro C.* Regulation of protein synthesis in eucaryotes, Annu. Rev. Biochem., **48**, 549–580, 1979.
Ranu R.S. Regulation of protein synthesis in eucaryotes by the protein kinases that phosphorylate initiation factor eIF-2, FEBS Lett., **112**, 211–215, 1980.
11. *Jiménes A.* Inhibitors of translation, Trends Biochem. Sci., 1, 28–30, 1976.
12. *Lindahl T.* DNA repair enzymes, Annu. Rev. Biochem, **51**, 61–88, 1982.
13. *Dickerson R., Geis J.* The Structure and Action of Proteins, pp. 59–66, New York, Harper and Row, 1969.
Wilson A.C., Carlson S.S., White T.J. Biochemical evolution, Annu. Rev. Biochem, **46**, 573–639, 1977.
Jukes T.H. Silent nucleotide substitutions and the molecular evolutionary clock, Science, **210**, 973–978, 1980.
14. *Drake J.W.* Comparative rates of spontaneous mutation, Nature, **221**, 1132, 1969.
15. *Cairns J.* Cancer: Science and Society, San Francisco, Freeman, 1978. (В гл. 7 обсуждается роль мутаций в развитии рака.)

Ohta T., Kimura M. Functional organization of genetic material as a product of molecular evolution, Nature, **233**, 118–119, 1971. (Частота мутаций ограничивает максимальное число генов в организме.)

16. *Schrödinger E.* What is Life? Cambridge, Eng., Cambridge University Press, 1945.
17. *Lindahl T.* New class of enzymes acting on damaged DNA, Nature, **259**, 64–66, 1976.
Kornberg A. DNA Replication, San Francisco, Freeman, 1980. (В гл. 16 рассматриваются ферменты, участвующие в репарации ДНК.)
Coulondre C., Miller J. H., Farabaugh P. J., Gilbert W. Molecular basis of base substitution hotspots in *E. coli*, Nature, **274**, 775–780, 1978.
Arlett C. F., Lehmann A. R. Human disorders showing increased sensitivity to the induction of genetic damage, Annu. Rev. Genet., **12**, 95–115, 1978.
18. *Kornberg A.* DNA Replication, San Francisco, Freeman, 1980.
Alberts B. M., Sternglanz R. Recent excitement in the DNA replication problem, Nature, **269**, 655–661, 1977.
19. *Meselson M., Stahl F. W.* The replication of DNA in *E. coli*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **44**, 671–682, 1958.
Cairns J. The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography, J. Mol. Biol., **6**, 208–213, 1963.
20. *Inman R. B., Schnös M.* Structure of branch points in replicating DNA: presence of single-stranded connections in lambda DNA branch parts, J. Mol. Biol., **56**, 319–325, 1971. (Электронная микроскопия показывает, что репликационная вилка асимметрична.)
Ogawa T., Okazaki T. Discontinuous DNA replication, Annu. Rev. Biochem., **49**, 421–457, 1980.
21. *Topal M., Fresco J. R.* Complementary base pairing and the origin of substitution mutations, Nature, **263**, 285–289, 1976.
Brutlag D., Kornberg A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid: a proofreading function for the 3′ to 5′ exonuclease activity in DNA polymerases, J. Biol. Chem., **247**, 241–248, 1972.
Fersht A. R. Enzymatic editing mechanisms in protein synthesis and DNA replication, Trends Biochem. Sci., **5**, 262–265, 1980.
22. *Alberts B. M., Frey L.* T4 bacteriophage gene 32: a structural protein in the replication and recombination of DNA, Nature, **227**, 1313–1318, 1970.
Coleman J. E., Oakley J. L. Physical chemical studies of the structure and function of DNA binding (helix-destabilizing) proteins, Crit. Rev. Biochem., **7**, 247–290, 1979.
Abdel-Monem M., Hoffmann-Berling H. DNA unwinding enzymes, Trends Biochem. Sci., **5**, 128–130, 1980.
23. *Wang J. C.* Interaction between DNA and an *E. coli* protein ω, J. Mol. Biol., **55**, 523–533, 1971. (Открытие первой ДНК-топоизомеразы.)
Wang J. C. DNA topoisomerases, Sci. Am., **247** (1), 94–109, 1982.
Gellert M. DNA topoisomerases, Annu. Rev. Biochem., **50**, 879–910, 1981.
24. *Edenberg H. J., Huberman J. A.* Eukaryotic chromosome replication, Annu. Rev. Genet., **9**, 245–284, 1975.
25. *Kriegstein H. J., Hogness D. S.* Mechanism of DNA replication in *Drosophila* chromosomes: structure of replication forks and evidence for bidirectionality, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **71**, 135–139, 1974.
Harland R. Initiation of DNA replication in eucaryotic chromosomes, Trends Biochem. Sci., **6**, 71–74, 1981.
26. *Luria S. E., Darnell J. E., Baltimore D., Campbell A.* General Virology, 3rd ed., New York, Wiley, 1978. (Вводная глава представляет собой исторический обзор развития вирусологии.)
27. *Gierer A., Schramm G.* Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus, Nature, **177**, 702–703, 1956.
28. *Cohen S. S.* Virus-Induced Enzymes, New York, Columbia University Press, 1968.
29. *Kornberg A.* DNA Replication, San Francisco, Freeman, 1980. (В гл. 14 и 15 представлены современные, прекрасно иллюстрированные данные о репликации ДНК у бактериофагов и животных вирусов.)
30. *Lwoff A.* Lysogeny, Bacteriol. Rev., **17**, 269–337, 1953.
31. *Zinder N. D.* RNA Phages, Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1975.
Fenner F., McAuslan B. R., Mims C. A., Sambrook J., White D. O. The Biogogy of Animal Viruses, 2nd ed. New York, Academic Press, 1974.
32. *Temin H. M.* The participation of DNA in Rous sarcoma virus production, Virology, **23**, 486–494, 1964.

Temin H. M., Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus, Nature, **226**, 1211–1213, 1970.
Baltimore D. Viral RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses, Nature, **226**, 1209–1211, 1970.

33. *Stahl F. W.* Genetic Recombination, San Francisco, Freeman, 1979.
Fincham J. R. S., Day P. R., Radford A. Fungal Genetics, 4th ed., Berkeley, University of California Press, 1979. (глава 11.)
Alberts B. M., ed. Mechanistic Studies of DNA Replication and Genetic Recombination, ICN-UCLA Symposia of Molecular and Cellular Biology, Vol. **19**. New York, Academic Press, 1980.
Dressler D., Potter H. Molecular mechanisms of genetic recombination, Annu. Rev. Biochem., **51**, 727–762, 1982.

34. *Holliday R.* A mechanisms for gene conversion in fungi, Genet. Res., **5**, 282–304, 1964.
Meselson M. S., Radding C. M. A general model for genetic recombination, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 358–361, 1975.

35. *Wolff S.* Sister chromatid exchange, Annu. Rev. Genet., **11**, 183–201, 1977.

36. *Radding C. M.* Genetic recombination: strand transfer and mismatch repair, Annu. Rev. Biochem., **47**, 847–880, 1978.
Radding C. M. Recombination activities of *E. coli* RecA protein, Cell, **25**, 3–4, 1981.

37. *Sigal N., Alberts B.* Genetic recombination: the nature of a crossed strand-exchange between two homologous DNA molecules, J. Mol. Biol., **71**, 789–793, 1972.
Sobel H. M. Concerning the stereochemistry of strand equivalence in genetic recombination. In: Molecular Mechanisms in Genetic Recombination, R. F. Grell, ed., pp. 433–438, New York, Plenum, 1975.

38. *Howard-Flanders P.* Inducible repair of DNA, Sci. Am., 245 (5), 72–80, 1981.

39. *Campbell A.* Some general questions about movable elements and their implications, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **45**, 1–9, 1981.
Landy A., Ross W. Viral integration and excision: structure of the lambda *att* sites, Science, **197**, 1147–1160, 1977.
Nash H. A. Integration and excision of bacteriophage lambda: the mechanism of conservative site specific recombination, Annu. Rev. Genet., **15**, 143–167, 1981.
Cohen S. N., Shapiro J. A. Transposable genetic elements, Sci. Am., **242** (2), 40–49, 1980.
Calos M. P., Miller J. H. Transposable elements, Cell, **20**, 579–595, 1980.
Bukhari A. I. Models of DNA transposition, Trends Biochem. Sci., **6**, 56–59, 1981.

6 Плазматическая мембрана

Возникновение плазматической мембраны было решающим этапом в зарождении самых ранних форм жизни – без мембран существование клетки невозможно. **Плазматическая мембрана**, окружающая каждую клетку, определяет ее величину и обеспечивает сохранение существенных различий между клеточным содержимым и окружающей средой. Но мембрана – это не просто механическая перегородка. Она служит также высокоизбирательным фильтром, который поддерживает разницу концентраций ионов по обе стороны мембраны и позволяет питательным веществам проникать внутрь клетки, а продуктам выделения выходить наружу.

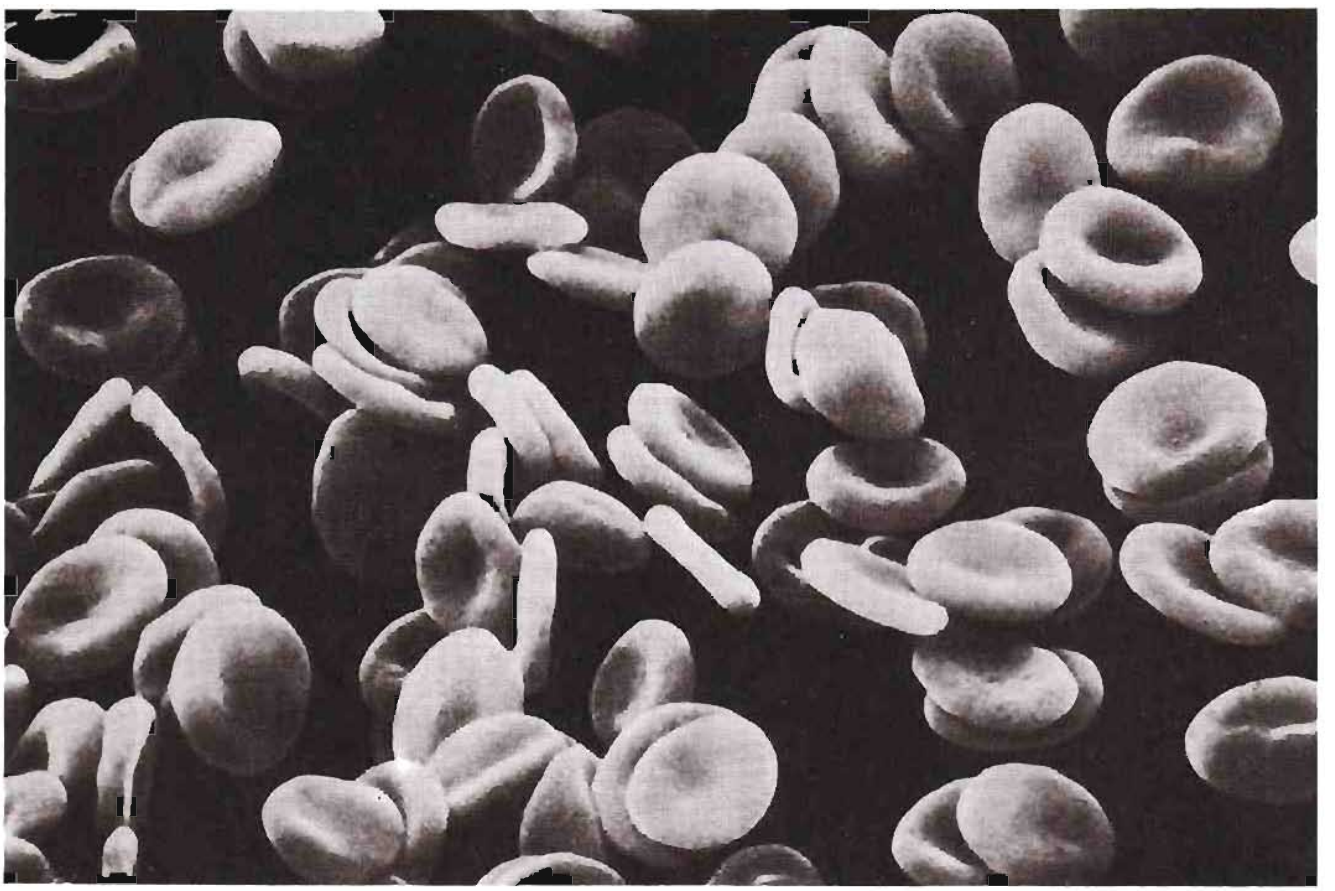
Все биологические мембраны, включая плазматическую мембрану и внутренние мембраны эукариотических клеток, имеют общие структурные особенности: они представляют собой ансамбли липидных и белковых молекул, удерживаемых вместе с помощью нековалентных взаимодействий. Как показано на рис. 6-1, липидные молекулы образуют непрерывный двойной слой толщиной 4–5 нм. **Липидный бислой** – это основная структура мембраны, которая создает относительно непроницаемый барьер для большинства водорастворимых молекул. Белковые молекулы как бы «растворены» в липидном бислое. При посредстве белков выполняются разнообразные функции мембраны: одни из них обеспечивают транспорт определенных молекул внутрь клетки или из нее, другие являются ферментами и катализируют ассоциированные с мембраной реакции, а третьи осуществляют структурную связь цитоскелета с внеклеточным матриксом или же служат в качестве рецепторов для получения и преобразования химических сигналов из окружающей среды.

Все клеточные мембраны представляют собой подвижные текучие структуры: бóльшая часть составляющих их молекул липидов и белков способна достаточно быстро перемещаться в плоскости мембраны. Мембраны к тому же асимметричны: оба их слоя различаются по липидному и белковому составам, что отражает, по-видимому, функциональные различия их поверхностей.

Несмотря на то что каждому типу мембран присущи определенные липидные и белковые компоненты, основные структурные и функциональные особенности, обсуждаемые в этой главе, характерны как для внутриклеточных, так и для плазматических мембран. После описания структуры и организации основных компонентов биологических мембран – липидов, белков и углеводов – мы обсудим различные механизмы, с помощью которых в клетках осуществляется перенос через плазматические мембраны небольших молекул, а также макромолекул и крупных частиц.

6.1. Липидный бислой [1]

Первые сведения о том, что молекулы липидов в биологической мембране образуют бислой, относятся к 1925 г. Было показано, что липиды из мембран эритроцитов, экстрагированные ацетоном, всплывают на поверхность воды, образуя пленку. Площадь пленки уменьшали с помощью подвижного барьера



Микрофотография эритроцитов человека, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Поскольку в этих клетках нет никаких других мембран, кроме плазматической мембраны, последняя относительно легко поддается изучению и о ее структуре известно гораздо больше, чем о структуре любой другой мембраны эукариотических клеток. (С любезного разрешения Bernadette Chailley.)

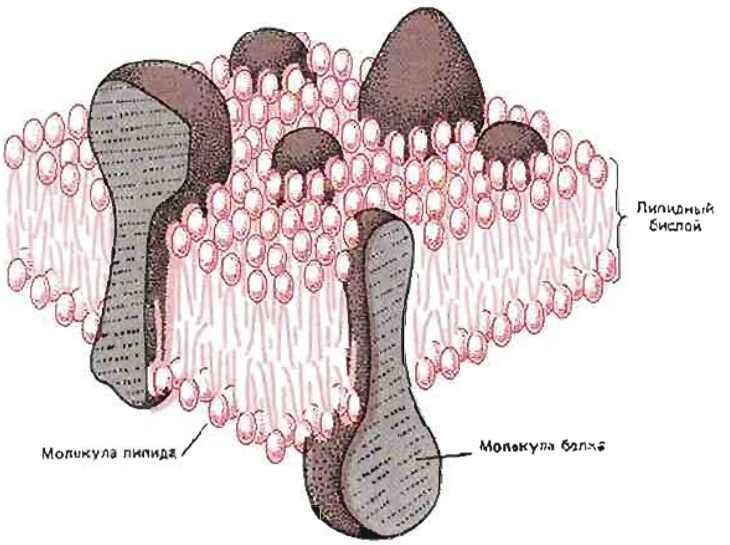


Рис. 6-1. Схематическое трехмерное изображение небольшого участка клеточной мембраны площадью около 10 мкм^2.

до тех пор, пока не формировался сплошной мономолекулярный слой. При этом оказалось, что площадь монослоя в два раза больше первоначальной площади поверхности клеток. Поскольку единственной мембраной эритроцитов является плазматическая мембрана, экспериментаторы заключили, что липидные молекулы в этой мембране должны быть организованы в виде непрерывного бислоя. Вывод оказался правильным, но, как стало ясно потом, он был основан на двух ошибочных предположениях, которые случайно скомпенсировали друг друга. С одной стороны, ацетон экстрагировал из мембраны не все липиды. С другой стороны, площадь поверхности эритроцитов оказалась значительно занижеиной, поскольку ее вычисляли на сухих, а не на влажных препаратах. Тем не менее выводы, сделанные на основе этого эксперимента, оказали глубокое влияние на клеточную биологию. Представление о биологической мембране как о липидном бислое стало общепринятым, хотя строгие доказательства его существования были получены позднее.

Исследования высокоупорядоченных биологических мембран с помощью дифракции рентгеновских лучей показали, что основная масса молекул липидов в этих мембранах действительно организована в виде бислоя. Другим доказательством того, что все биологические мембраны – это липидные бислои, служит возможность механического расщепления их замороженных образцов между двумя липидными монослоями, как следует из данных, полученных с помощью электронной микроскопии методом замораживания – скалывания (разд. 6.2.8).

Почему же все клеточные мембраны состоят из двойных слоев липидных молекул? Одна из причин заключается в том, что формирование бислоя является особым свойством молекул липидов, которое реализуется даже вне клетки.

6.1.1. Мембранные липиды – это амфипатические молекулы, самопроизвольно формирующие бислои [2]

Липиды нерастворимы в воде, однако легко растворяются в органических растворителях. В большинстве животных клеток они составляют около 50% массы плазматической мембраны. В участке липидного бислоя размером 1 × × 1 мкм находится приблизительно $5 \cdot 10^6$ молекул липидов. Из этого следует, что плазматическая мембрана небольшой животной клетки содержит примерно 10^9 липидных молекул. В клеточной мембране присутствуют липиды трех главных типов – *фосфолипиды* (наиболее распространенный тип), *холестерол* и *гликолипиды*. Все они представляют собой *амфипатические* мо-

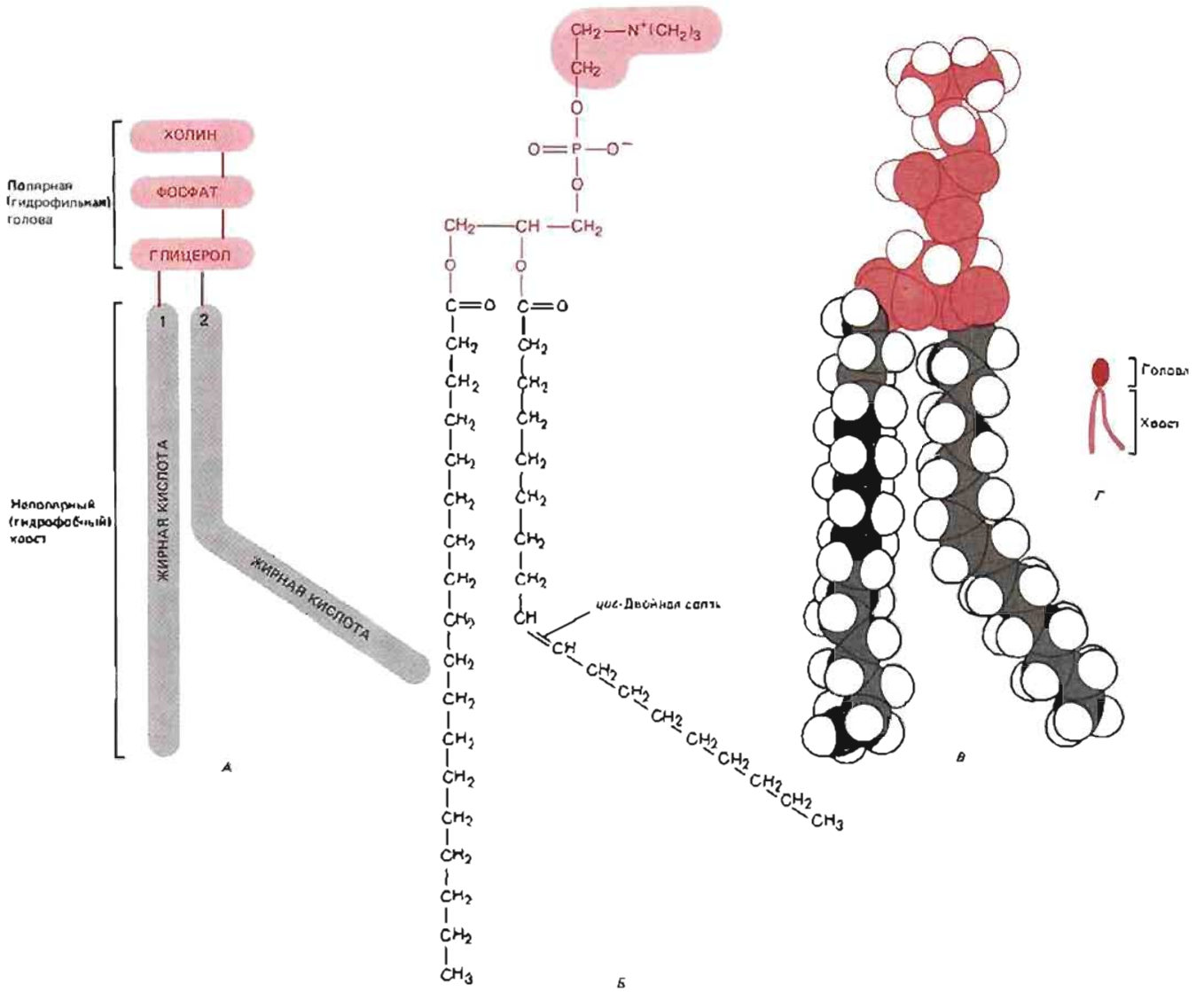


Рис. 6-2. Молекула фосфолипида фосфатидилхолина, представленная схематически (*А*), химической формулой (*Б*), в виде пространственной модели (*В*) и символом (*Г*).
Чтобы отличить ненасыщенную цепь жирной кислоты от насыщенной, на этом рисунке (и везде далее) ненасыщенная цепь изображена с отчетливым изгибом. На самом же деле в ненасыщенной жирной кислоте жесткостью обладает только двойная связь. Вокруг всех одинарных связей возможно свободное вращение, поэтому в каждом липидном монослое обе цепи жирных кислот — как насыщенная, так и ненасыщенная — будут стремиться упаковаться параллельно.

лекулы, т.е. у них есть гидрофильный («любящий воду», или полярный) и гидрофобный («боящийся воды», или неполярный) концы. Например, типичная молекула **фосфолипида**, изображенная на рис. 6-2, имеет *полярную голову* и два *гидрофобных углеводородных хвоста*. Длина хвостов варьирует от 14 до 24 атомов углерода в цепи. Один из хвостов, как правило, содержит одну или более *цис*-двойных связей (т.е. это *ненасыщенный* углеводород), тогда как у другого (*насыщенного* углеводорода) двойных связей нет. Как показано на рис. 6-2, каждая двойная связь вызывает появление изгиба в хвосте. Подобные различия в длине хвостов и насыщенности углеводородных цепей важны, поскольку они влияют на текучесть мембраны (см. ниже).

Амфипатические молекулы, находящиеся в водном окружении, обычно агрегируют, при этом гидрофобные хвосты оказываются спрятанными, а гидрофильные головы остаются в контакте с молекулами воды. Агрегация такого типа осуществляется двумя способами: либо путем образования сферических *мицелл* с хвостами, обращенными внутрь, либо путем формирования бимолекулярных пленок, или *бислоев*, в которых гидрофобные хвосты располагаются между двумя слоями гидрофильных голов. Обе эти возможности проиллюстрированы на рис. 6-3.

Большинство фосфолипидов и гликолипидов в водной среде самопро-

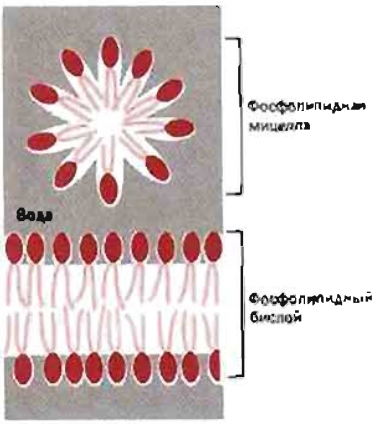


Рис. 6-3. Схематическое изображение фосфолипидной мицеллы и фосфолипидного бислоя в поперечном разрезе. Фосфолипидные молекулы самопроизвольно образуют подобные структуры в воде.

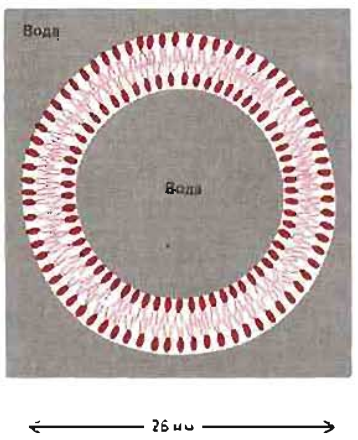


Рис. 6-4. Схематическое изображение небольшой сферической липосомы в поперечном разрезе. Липосомы обычно используются в экспериментальных исследованиях в качестве модельных мембран.

Рис. 6-5. Схематическое изображение искусственного липидного бислоя, называемого черной мембраной, в поперечном разрезе. Мембрана закрывает небольшое отверстие в перегородке между двумя отделениями сосуда, заполненными водой. Черные мембраны используются для измерения проницаемости искусственных мембран.

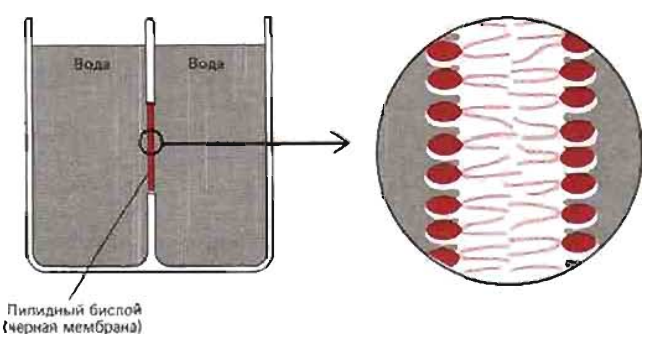
извольно образуют бислои. Следовательно, формирование липидной основы биологических мембран – это, по существу, процесс самосборки. Кроме того, подобные липидные бислои обычно замыкаются сами на себя, образуя закрытые отсеки (компартменты). В результате устраняются свободные края, на которых гидрофобные хвосты могли бы соприкасаться с водой. По той же причине компартменты, построенные из липидных бислоев, стремятся сами «залечивать» свои повреждения, смыкая края разорванных участков.

Кроме способности к самосборке и самовосстановлению липидный бислой обладает другими свойствами, которые делают его идеальным материалом для клеточных мембран. Важнейшее из этих свойств – текучесть, которая, как мы увидим в дальнейшем, обусловливает многие функции мембраны.

6.1.2. Липидный бислой – это двумерная жидкость [3]

О том, что отдельные молекулы липидов способны свободно диффундировать в пределах липидного бислоя, исследователи впервые узнали, как это ни странно, только в начале 1970-х годов. Первоначально это было показано на искусственных липидных бислоях. Для экспериментальных исследований оказались весьма полезными искусственные бислои двух типов: 1) **липосомы**, имеющие форму сферических пузырьков, диаметр которых варьирует от 25 нм до 1 мкм в зависимости от способа их получения (рис. 6-4), и 2) плоские бислои, называемые **черными мембранами**, «закрывающие» отверстие в перегородке между двумя отделениями сосуда, заполненными водой (рис. 6-5).

Для измерения подвижности отдельных липидных молекул и их частей используются разнообразные методы. Так, к полярной голове молекулы липида можно присоединить «спиновую метку», например нитроксильную группу, имеющую неспаренный электрон. Спин этого электрона порождает парамагнитный сигнал, обнаруживаемый методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Этот метод позволяет легко определить движение и ориентацию в бислое подобного спин-меченого липида. Такие исследования показывают, что липидные молекулы в искусственных мембранах чрезвычайно редко перескакивают из одного монослоя мембраны в другой. Любая индивидуальная молекула липида осуществляет подобный перескок (флип-флоп) реже, чем один раз в две недели (рис. 6-6). С другой стороны, липидные молекулы без труда меняются местами со своими соседями в пределах одного монослоя (примерно 10^7 раз в 1 с), что приводит к быстрой латеральной диффузии, причем коэффициент диффузии D составляет около 10^{-8} см^2 с$^{-1}$. Это означает, что липидная молекула средних размеров диффундирует на расстояние, равное длине большой бактериальной клетки (~ 2 мкм), приблизительно за 1 с. Кроме того, подобные исследования показывают, что молекулы липидов очень быстро вращаются вокруг своих продольных осей, а их углеводородные цепи обладают гибкостью; при этом наибольшая подвижность наблюдается у центра бислоя, а наименьшая – около полярной головы (рис. 6-6).



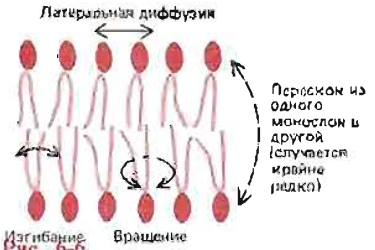


Рис. 6-6. Различные типы движений фосфолипидных молекул в липидном бислое.

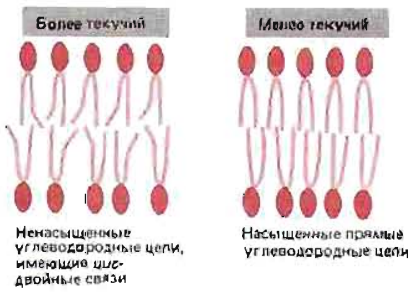


Рис. 6-7. Двойные связи в ненасыщенных углеводородных цепях увеличивают текучесть липидного бислоя, затрудняя совместную упаковку гидрофобных хвостов.

Рис. 6-8. Молекула холестерола, представленная в виде химической формулы (*А*), схематического изображения (*Б*) и в процессе взаимодействия с двумя фосфолипидными молекулами в монослое (*В*).

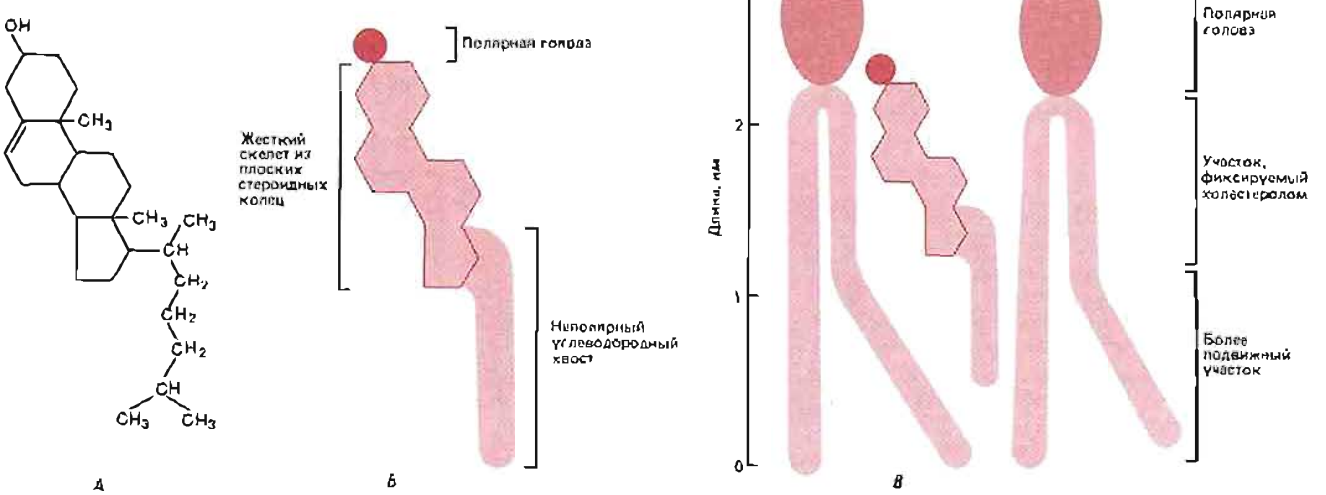
Изучение меченых липидных молекул в изолированных биологических мембранах и относительно простых целых клетках, таких, как микоплазма, бактерии и эритроциты, показало, что поведение липидных молекул в клеточных мембранах в основном сходно с поведением этих молекул в искусственных бислоях: липидный компонент биологической мембраны представляет собой двумерную жидкость, в которой отдельные молекулы липидов быстро перемещаются, но только в пределах своего монослоя.

6.1.3. Текучесть липидного бислоя зависит от его состава [4]

Искусственный липидный бислой, состоящий из фосфолипидов одного типа, при понижении температуры до строго определенного значения (точки замерзания) переходит из жидкого состояния в кристаллическое (или гелеобразное). Это изменение состояния называется *фазовым переходом*. Температура перехода оказывается ниже (т.е. мембрану труднее заморозить), если углеводородные цепи короткие или в них содержатся двойные связи. При меньшей длине цепи взаимодействие углеводородных хвостов становится менее вероятным, а изломы, вызванные наличием *цис*-двойных связей, мешают более компактной упаковке хвостов (рис. 6-7).

В искусственных бислоях, содержащих смесь фосфолипидов с различной степенью насыщенности (и, следовательно, с различными температурами фазового перехода), может происходить *разделение фаз*. При этом индивидуальные фосфолипидные молекулы одного типа формируют кластеры геля, когда температура снижается до точки замерзания. Поскольку в биологических мембранах в одной и той же липидной молекуле обычно содержится как насыщенная, так и ненасыщенная цепь жирной кислоты, в клетке такое разделение фаз невозможно.

Другим фактором, определяющим текучесть мембраны, служит холестерол. Плазматические мембраны эукариот содержат довольно большое количество холестерола – приблизительно одну молекулу на каждую молекулу фосфолипида. Помимо регулирования текучести холестерол, как полагают, увеличивает механическую прочность бислоя. Молекулы холестерола ориентируются в бислое таким образом, чтобы их гидроксильные группы примыкали к полярным головам фосфолипидных молекул. При этом плоские стероидные кольца молекул холестерола частично иммобилизуют участки



углеводородных цепей, непосредственно примыкающих к полярным головам. Остальные части углеводородных цепей не утрачивают своей гибкости (рис. 6-8). Холестерол, присутствующий в большинстве плазматических мембран эукариот, предотвращает слипание и кристаллизацию углеводородных цепей. Его роль также заключается в ингибировании фазовых переходов, связанных с изменением температуры. Таким образом предотвращается резкое уменьшение текучести мембран, которое в противном случае имело бы место при низкой температуре.

О важности холестерола для поддержания механической прочности мембран говорят данные по изучению мутантных линий животных клеток, не способных его синтезировать. При отсутствии холестерола в культуральной жидкости такие клетки быстро лизируются. Добавленный в среду холестерол встраивается в плазматическую мембрану, тем самым стабилизируя липидный бислой; в результате клетки выживают.

Определенная текучесть плазматической мембраны имеет важное биологическое значение. Об этом свидетельствует тот факт, что бактерии, дрожжи и другие пойкилотермные организмы, принимающие температуру окружающей среды, изменяют жирнокислотный состав своих плазматических мембран таким образом, чтобы текучесть мембраны оставалась примерно постоянной. Остается установить, какие имеющо процессы, связанные с мембранами, наиболее сильно зависят от текучести бислоя. Показано, например, что определенные транспортные и ферментативные свойства мембраны исчезают, когда вязкость бислоя превышает некоторый критический уровень.

6.1.4. Липидный бислой служит растворителем для мембранных белков [5]

Липидные составы различных биологических мембран сравниваются в табл. 6-1. Плазматические мембраны бактерий обычно имеют фосфолипид только одного типа и не содержат холестерол. В то же время в большинстве плазматических мембран эукариотических клеток имеется не только значительное количество холестерола, но и множество различных фосфолипидов.

Таблица 6-1. Примерный липидный состав различных клеточных мембран

Липид	Процентное содержание от общего количества липидов (по весу)					
	Плазматическая мембрана клеток печени	Плазматическая мембрана эритроцита	Миелин	Мембраны митохондрий (внутренняя и наружная)	Эндоплазматический ретикулум	E. coli
Холестерол	17	23	22	3	6	0
Фосфатидилэтаноламин	7	18	15	35	17	70
Фосфатидилсерин	4	7	9	2	5	Следовое количество
Фосфатидилхолин	24	17	10	39	40	0
Сфингомиелин	10	18	8	0	5	0
Гликолипиды	7	3	28	Следовое количество	Следовое количество	0
Остальные липиды	22	13	8	21	27	30

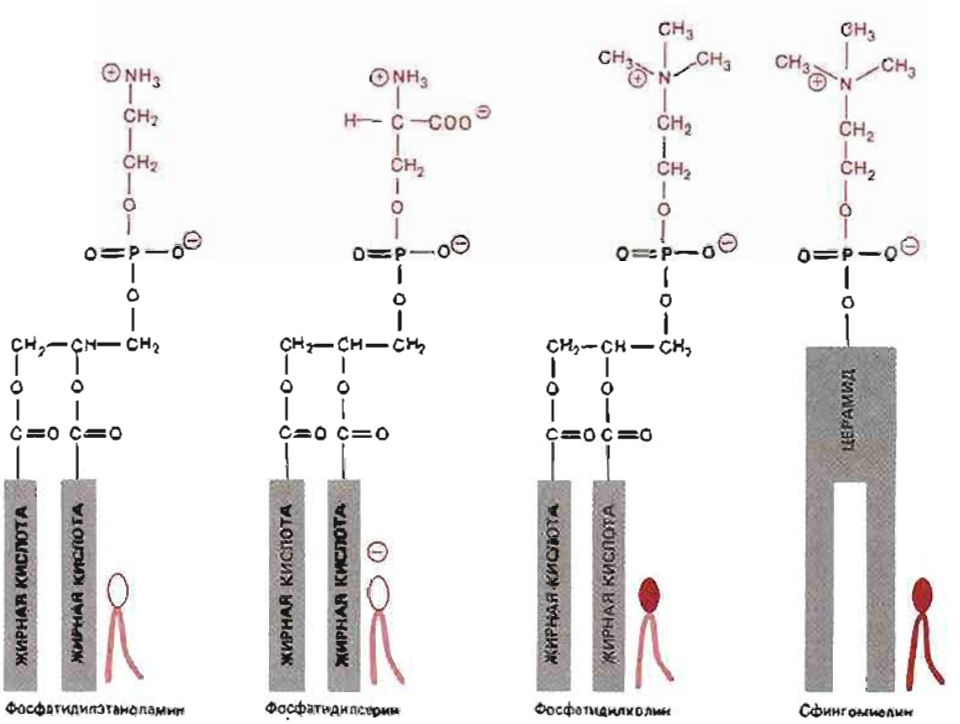


Рис. 6-9. Формулы и символы главных фосфолипидов, содержащихся в мембранах эритроцитов человека. Обратите внимание, что различные полярные головы обозначены разными символами. (Структура церамида показана на рис. 6-11.)

Например, в плазматической мембране эритроцита человека обнаруживаются четыре основных фосфолипида: *фосфатидилхолин*, *сфингомиелин*, *фосфатидилсерин* и *фосфатидилэтаноламин*. Структуры этих молекул приведены на рис. 6-9; отметим, что из них только фосфатидилсерин имеет отрицательный заряд, а остальные три при физиологических pH оказываются электрически нейтральными.

Возникает вопрос, с чем связано такое разнообразие фосфолипидов в плазматических мембранах эукариот? Возможно, липидный бислой является двумерным растворителем для белков в составе мембраны, подобно тому как вода служит трехмерным растворителем для белков в водном растворе. Можно предположить также, что некоторые мембранные белки функционируют только в присутствии специфических фосфолипидных полярных групп, напоминая в этом отношении многие ферменты, для активирования которых в водном растворе необходим какой-либо определенный ион. Это предположение подтверждается данными о том, что в искусственных липидных бислоях для оптимальной активности функционирующих мембранных белков требуются определенные специфические фосфолипиды.

6.1.5. Липидный бислой плазматической мембраны асимметричен [6]

Во всех изученных плазматических мембранах две половины бислоя поразительно различаются по липидному составу. Например, в мембране эритроцитов человека большинство липидных молекул, оканчивающихся холином $(CH_3)_3N^+CH_2CH_2OH$, располагаются во внешней половине бислоя, а основная часть фосфолипидов, несущих на конце первичную аминогруппу,– во внутренней (рис. 6-10). Поскольку углеводородные цепи первых более насыщены, асимметрия в распределении полярных голов сопровождается также асимметрией распределения углеводородных хвостов. Известно, что отрицательно заряженный фосфатидилсерин локализован во внутренней половине бислоя; следовательно, два монослоя существенно различаются и по заряду.

Липидные молекулы самопроизвольно не перемещаются из одного монослоя в другой с заметной скоростью, поэтому можно предположить, что

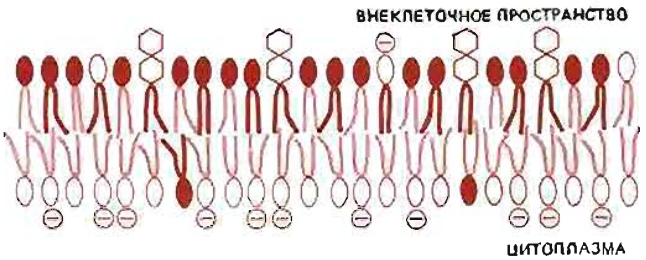


Рис. 6-10. Асимметрическое распределение фосфолипидов и гликолипидов (см. текст) в липидном бислое эритроцитов человека. Символы, используемые для обозначения фосфолипидов, те же, что и на рис. 6-9. Полярные головы гликолипидов изображены в виде шестиугольников. (Холестерол не показан.)

асимметрия бислоя возникает при его биосинтезе в эндоплазматическом ретикулуме и обусловлена существованием белков, переносящих специфические липидные молекулы из одного монослоя в другой (разд. 7.3.14). Асимметрия в распределении липидов, по-видимому, имеет биологический смысл. Она может, например, обеспечивать правильную ориентацию мембранных белков в бислое. Далее мы убедимся в том, что и мембранные белки связаны с мембраной весьма асимметрично. Эта особенность очень важна для их функционирования.

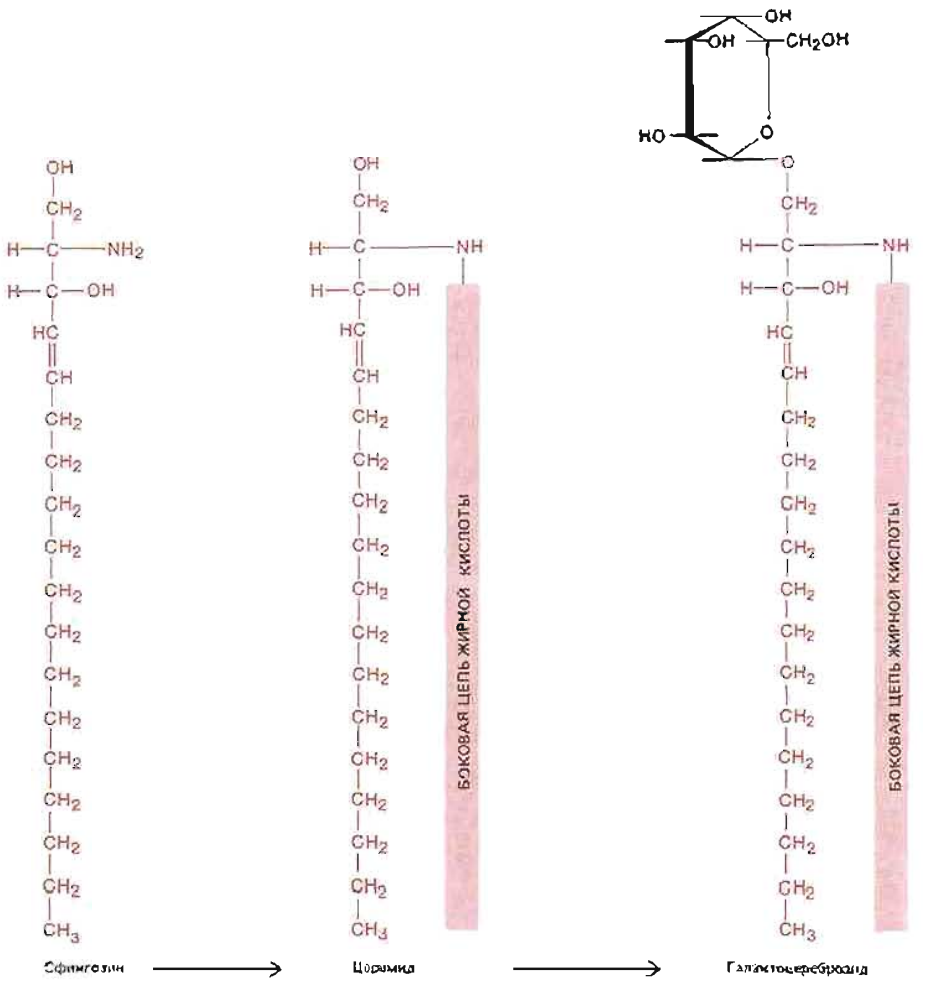
Наиболее асимметрично распределены в плазматических мембранах животных клеток липидные молекулы, принадлежащие к еще не рассмотренному классу олигосахаридсодержащих липидов, называемых гликолипидами. Эти удивительные молекулы обнаруживаются только в наружной половине бислоя, а их сахарные группы ориентированы к поверхности клетки (рис. 6-10). Олигосахариды, образующие головы гликолипидных молекул, могут быть довольно сложными. Это обстоятельство, а также стратегическое расположение олигосахаридов на клеточной поверхности наводят на мысль, что при их участии может осуществляться связь между клетками; однако наличие этой функции у олигосахаридов еще необходимо доказать.

6.1.6. Гликолипиды обнаруживаются на поверхности всех плазматических мембран, однако их функция неизвестна [7]

Гликолипиды, вероятно, присутствуют в плазматических мембранах всех животных клеток и составляют обычно около 5% липидных молекул наружного монослоя. Они сильно различаются у разных видов и даже в разных тканях одного и того же вида. У бактерий и растений почти все гликолипиды образуются из *глицерола*, тогда как в животных клетках они почти всегда синтезируются из *сфингозина* – длинного аминоспирта (рис. 6-11) – и называются *гликосфинголипидами*. Структура гликосфинголипидов в целом аналогична структуре фосфолипидов, образованных из глицерола. Они также имеют полярную голову и две гидрофобные углеводородные цепи (хотя одна из цепей берет начало от сфингозина, а другая представляет собой цепь жирной кислоты). Все гликолипидные молекулы различаются по числу сахарных остатков в их полярных головах.

Среди множества гликолипидов плазматических мембран эукариотических и прокариотических клеток можно выделить группу нейтральных гликолипидов. Их полярные головы содержат от 1 до 15 и более нейтральных сахаров. Некоторые нейтральные гликолипиды можно обнаружить только в определенных тканях отдельных видов животных. Заслуживающим внимания примером нейтрального гликолипида является *галактоцереброзид*, один из простейших гликолипидов, полярная голова которого состоит только из одной галактозы (рис. 6-11). Галактоцереброзид – это главный гликолипид *миелина*, многослойной мембранной оболочки, окружающей нервы. Миелин представляет собой плазматическую мембрану специализированной миелинобразующей клетки (т. 5, разд. 18.2.12), уложенную в виде множества концентрических слоев вокруг нервного волокна. Отличительная особенность этих клеток заключается в высоком содержании галактоцереброзида в их плазматической

Рис. 6-11. Заключительные этапы биосинтеза простого гликосфинголипида – галактоцереброзида.



мембране (до 40% массы наружного монослоя). Поскольку галактоцереброзид не присутствует в значительных количествах в других мембранах, это, возможно, означает, что он играет важную роль в процессе миелинизации.

Самые сложные из гликолипидов – ганглиозиды – содержат один или более остатков сиаловой кислоты (N-ацетилнейраминовой кислоты, или NANA), которые придают молекулам этих гликолипидов отрицательный заряд (рис. 6-12). Особенно много ганглиозидов содержится в плазматической мембране нейронов, где они составляют около 6% общей массы липидов, однако в большинстве типов клеток они встречаются в меньших количествах. В настоящее время идентифицировано более 30 различных ганглиозидов. Некоторые из них представлены на рис. 6-13, где дается также номенклатура, используемая для описания этих соединений.

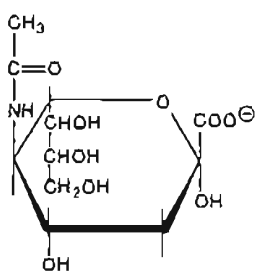


Рис. 6-12. Структура сиаловой кислоты (N-ацетилнейраминовой кислоты, или NANA).

Существуют лишь догадки о возможных функциях гликолипидов. Например, ганглиозид G_{M1} (рис. 6-13) действует как поверхностный рецептор для бактериального токсина, вызывающего изнурительный понос при холере. Холерный токсин проникает внутрь только тех клеток, связываясь с их поверхностью, у которых в плазматической мембране присутствует G_{M1} (к ним относятся, например, эпителиальные клетки кишечника; т. 3, разд. 13.3.6). Хотя связывание бактериальных токсинов не может быть *нормальной* функцией ганглиозидов, приведенные данные наводят на мысль, что такие гликолипиды, возможно, служат в качестве рецепторов для определенных медиаторов, осуществляющих нормальную связь между клетками. Благодаря использованию специфических антител для идентификации гликолипидов становится

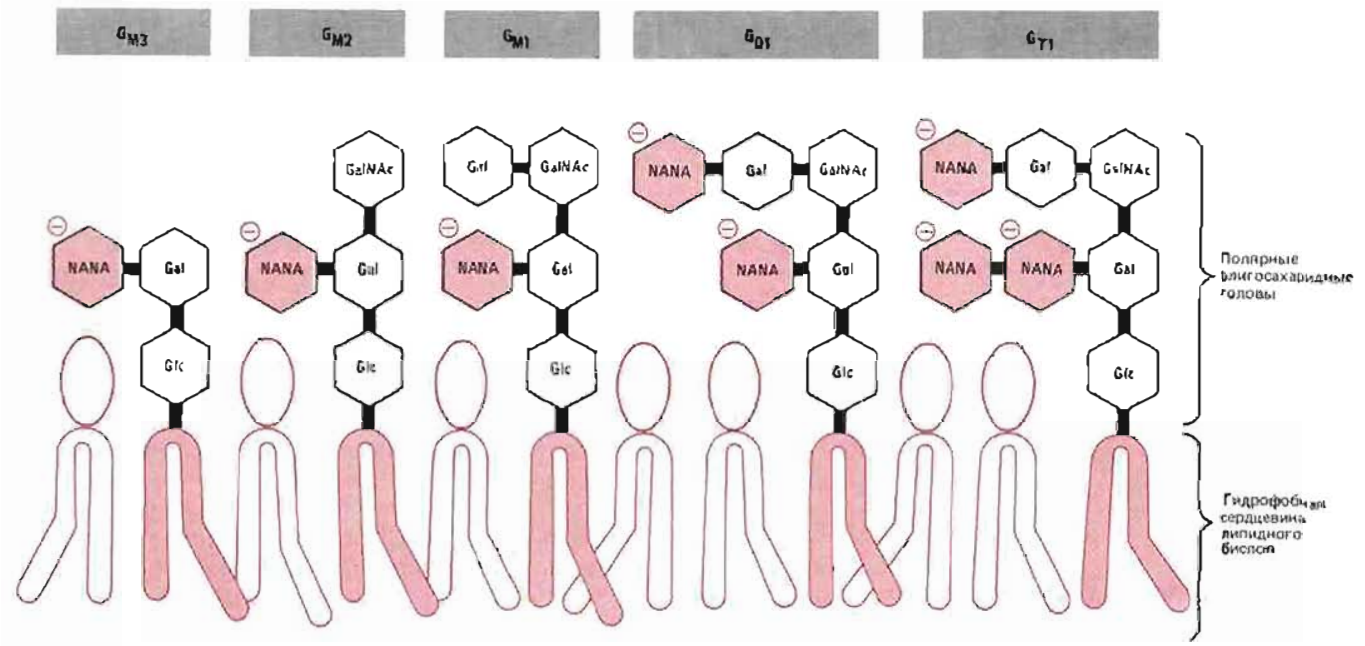


Рис. 6-13. Некоторые типичные ганглиозиды и их стандартные обозначения. В G_{M1}, G_{M2}, G_{M3}, G_{D1} и G_{T1} буквы M, D и T обозначают число остатков сиаловой кислоты – соответственно один, два и три (лат. mono, di и tri), а цифры 1, 2 и 3 представляют собой разность, полученную вычитанием числа незаряженных углеводных остатков из 5. NANA – ацетилнейраминовая (сиаловая) кислота; Gal – галактоза; Glc – глюкоза; GalNAc – N-ацетилгалактозамин. Gal, Glc, и GalNAc не заряжены, а NANA несет отрицательный заряд (см. рис. 6-12).

возможным изучать функции этих таинственных молекул. Суть метода заключается в том, что антитела связывают с гликолипидными молекулами какого-либо типа, расположенными на поверхности клетки, и затем проверяют, ингибируется или стимулируется при этом та или иная специфическая клеточная функция.

Заключение

Все биологические мембраны состоят из непрерывного двойного слоя липидных молекул с погруженными в него различными мембранными белками. Липидный бислой представляет собой жидкость, в которой отдельные молекулы липидов способны быстро диффундировать в пределах своего монослоя, но чрезвычайно редко спонтанно перемещаются из одного монослоя в другой. Мембранные липиды – амфипатические молекулы, и в водной среде большинство из них самопроизвольно образует бислои. Именно это свойство обусловливает самосборку липидных бислоев в клетке и их способность самопроизвольно восстанавливаться при повреждениях. В плазматической мембране имеются три основных класса липидных молекул – фосфолипиды, холестерол и гликолипиды, причем липидные составы внутреннего и наружного монослоев отличаются друг от друга. Различный липидный состав характерен и для разных мембран одной и той же эукариотической клетки.

6.2. Мембранные белки

Хотя основные структурные особенности биологических мембран определяются свойствами липидного бислоя, их специфические функции осуществляются главным образом белками. Вот почему типы белков и их количества в мембране отражают ее функцию: в миелиновой мембране, которая служит преимущественно для изоляции нервных волокон, белки составляют менее 25% массы мембраны, а в мембранах, связанных с процессами превращения энергии (например, во внутренних мембранах митохондрий и хлоропластов) на белок приходится около 75% массы мембраны. В обычной плазматической мембране белок составляет около 50% ее массы (промежуточная величина, лежащая между двумя указанными выше крайними значениями). Поскольку

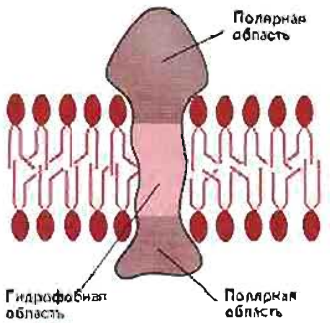


Рис. 6-14. Схема амфипатического мембранного белка. Белок удерживается в липидном бислое гидрофобными взаимодействиями с углеводородными цепями молекул липидов.

размер липидной молекулы весьма мал по сравнению с размерами молекулы белка, из этого следует, что в мембране всегда содержится значительно больше молекул липидов, чем белков. Например, если белки составляют 50% массы мембраны, то на одну белковую молекулу приходится приблизительно 50 липидных молекул.

6.2.1. Многие мембранные белки удерживаются в бислое за счет гидрофобных взаимодействий с липидными молекулами [8]

До недавнего времени существовало ошибочное мнение, что мембранные белки образуют протяженные монослои, расположенные по обеим сторонам липидного бислоя. Теперь известно, что многие мембранные белки погружены в бислой (рис. 6-14). Их молекулы так же, как и молекулы окружающих их липидов, обладают амфипатическими свойствами: у них есть гидрофобные участки, которые взаимодействуют с гидрофобными хвостами липидных молекул внутри бислоя, и гидрофильные участки, обращенные к воде с одной или (что встречается чаще) с обеих сторон мембраны. Гидрофобность некоторых мембранных белков увеличивается за счет ковалентного присоединения одной или более цепей жирных кислот, которые помогают этим белкам удерживаться в бислое.

Мембранные белки в разной степени поддаются выделению их из мембраны. Одни белки высвобождаются в сравнительно мягких условиях (например, путем экстракции солевым раствором), тогда как другие можно выделять только после полного разрушения бислоя с помощью детергентов и органических растворителей. Белки этих двух крайних типов часто называют соответственно *периферическими* и *интегральными* белками. Такую классификацию белков по способу их удаления из мембраны не следует, однако, путать с молекулярным механизмом ассоциации этих белков с бислоем: о нем обычно ничего неизвестно. Существует множество белков, называемых **трансмембранными**, которые пронизывают бислой насквозь и контактируют с водной средой по обеим сторонам мембраны. Другая группа белков соприкасается с водой только с одной стороны бислоя. Некоторые из них прикреплены к мембране при помощи нековалентных взаимодействий с трансмембранными белками, а другая часть белков этой группы ассоциирует с мембраной за счет ковалентно связанных с ними цепей жирных кислот, внедряющихся в один или другой монослой (рис. 6-15).

Поскольку внутри липидного бислоя вода практически отсутствует, можно полагать, что полипептидные цепи в мембранах существуют главным образом в виде α-спиралей или β-слоев. Отсутствие воды означает, что внутри мембраны полярные группы полипептидной цепи, которые в водной среде образуют водородные связи с молекулами воды, в данном случае стремятся образовать их друг с другом. Число водородных связей между пептидными группами оказывается максимальным, если участок полипептидной цепи, проходящий через бислой, образует α-спираль или β-слой. По той же причине по-

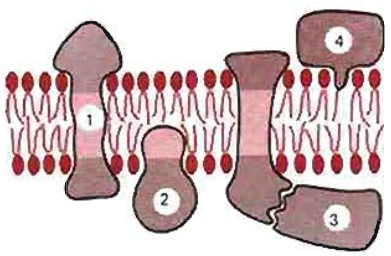


Рис. 6-15. Четыре способа ассоциации мембранных белков с липидным бислоем. Некоторые белки, как известно, пронизывают бислой насквозь (1), а некоторые удерживаются нековалентными взаимодействиями с другими мембранными белками (3). Окончательно не выяснено, существуют ли белки, лишь частично погруженные в бислой (2). Недавно было показано, что есть мембранные белки, к которым ковалентно присоединена одна или более цепей жирных кислот, помогающих белку «заякориваться» в том или другом монослое. Хотя большинство таких белков являются трансмембранными, некоторые могут ими и не быть (4).

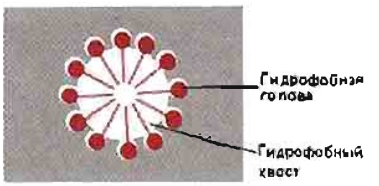


Рис. 6-16. Схематическое изображение поперечного разреза мицеллы, образовавшейся в воде из молекул детергента. Молекулы детергента можно назвать амфипатическими, поскольку они имеют как полярный, так и неполярный конец.

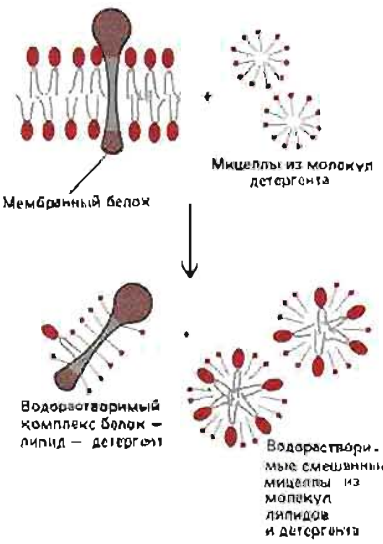


Рис. 6-17. Солюбилизация мембранных белков с помощью детергента. Детергент разрушает липидный бислой, в результате чего белки оказываются в растворе в виде комплексов с молекулами липидов и детергента. Фосфолипиды мембран также солюбилизируются с помощью детергента.

липептидная цепь в составе мембраны, вероятно, не изменяет своего первоначального направления, так как наличие изгиба в цепи привело бы к уменьшению числа регулярных водородных связей. Вследствие этого, вероятно, лишь немногие мембранные белки погружены в липидный бислой частично, а не пронизывают его насквозь.

Как правило, трансмембранные белки (и некоторые другие прочно связанные с мембраной белки) могут быть солюбилизированы только с помощью реагентов, разрушающих гидрофобные взаимодействия и в конечном счете бислой. Наиболее успешно это можно сделать, используя детергенты — небольшие амфипатические молекулы, стремящиеся образовать в воде мицеллы (рис. 6-16). При смешивании детергента с мембраной гидрофобные концы его молекул связываются с гидрофобными участками на поверхности мембранных белков, вытесняя оттуда молекулы липидов. Поскольку противоположный конец молекулы детергента полярный, такое связывание приводит к тому, что мембранные белки переходят в раствор в виде комплексов с детергентом. Некоторые прочно связанные с белками молекулы липидов также остаются в этих комплексах (рис. 6-17). Полярные концы детергентов могут быть либо заряженными (ионными), как в *додецилсульфате натрия* (ДСН), либо незаряженными (неионными), как в случае *тритона*. Структуры этих двух используемых повсеместно детергентов изображены на рис. 6-18.

Если детергент удалить, то солюбилизированные мембранные белки обычно становятся почти нерастворимыми в водной среде и выпадают в осадок, содержащий смесь многих различных белков (рис. 6-19). Поэтому очищать и изучать мембранные белки значительно сложнее, чем водорастворимые белки. Еще одна трудность заключается в том, что сильные детергенты (в частности, ионные) часто разрушают нативную структуру белков, разворачивая полипептидную цепь и внедряясь во внутреннее «гидрофобное ядро» белка (см. т. 1, рис. 3-18). Такие солюбилизированные белки, которые называют *денатурированными*, обычно не пригодны для исследования их функции, поскольку после утраты нормальной трехмерной конформации они оказываются неактивными. Однако в наиболее благоприятных случаях

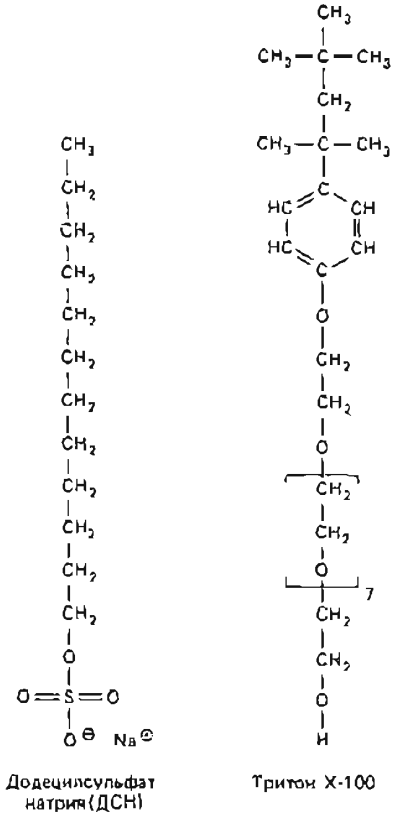


Рис. 6-18. Структуры молекул двух широко используемых детергентов: додецилсульфата натрия (ДСН; анионного детергента) и тритона X-100 (неионного детергента).

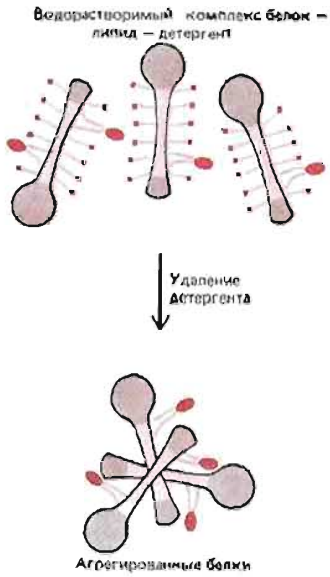


Рис. 6-19. Схема, показывающая, что при удалении детергента из солюбилизированных с его помощью мембранных белков почти не защищенные от контактов с водой гидрофобные участки на поверхности белков (связанных лишь с несколькими липидными молекулами) стремятся взаимодействовать друг с другом, в результате чего образуются большие агрегаты белков, осаждающиеся из раствора.

мембранные белки можно солюбилизировать при низких концентрациях мягкого детергента и затем изучать их, так как они находятся в активной форме, хотя, вероятно, и не сохраняют полностью нативную конформацию.

6.2.2. Использование электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия произвело революцию в исследовании мембранных белков

Солюбилизация белков с помощью детергентов была с большим успехом использована для изучения главных белков, присутствующих в различных мембранах. В типичном случае мембраны сначала прогревают до 100°С в 1%-ном растворе сильного детергента ДСН, который разрушает все нековалентные белок-белковые и белок-липидные взаимодействия и полностью денатурирует белки. Полученный раствор наносят затем на полиакриламидный гель, содержащий ДСН, и подвергают электрофорезу в сильном электрическом поле в течение нескольких часов. Количество отрицательно заряженного ДСН, связавшегося с белком, пропорционально массе полипептида, вследствие чего суммарный отрицательный заряд детергента значительно превышает собственный заряд белка. Поэтому каждый отдельный белок перемещается в электрическом поле со скоростью, определяемой в конечном счете его молекулярной массой: чем крупнее белок, тем в большей степени он задерживается сложной сетью молекул полиакриламида, составляющих гель, и, следовательно, тем медленнее он движется. Если после электрофореза произвести окрашивание белков в геле, используя краситель, связывающийся с белком, например кумасси синий, то главные белки образца можно увидеть как индивидуальные полосы в геле (см. т. 1, рис. 4-37).

В дальнейшем для изучения мембранных белков стал применяться метод двумерного электрофореза. С его помощью в плазматической мембране только одного типа было идентифицировано более 50 различных белков. Поскольку белки, присутствующие в малых количествах, весьма трудно обнаружить даже этим методом, несомненно, что в типичной плазматической мембране помимо идентифицированных присутствует множество других белков.

6.2.3. Поверхность мембранных белков, обращенную к цитоплазме, можно изучать на примере эритроцитов [9]

О плазматической мембране эритроцитов человека (рис. 6-20) известно гораздо больше, чем о любой другой мембране эукариотической клетки. Такая ситуация сложилась вследствие ряда причин. 1) Эритроциты можно получить в большом количестве (например, из банков крови), при этом они практически не загрязнены клетками других типов. 2) Поскольку плазматическая мембрана – это единственная присутствующая в эритроцитах мембрана, ее можно

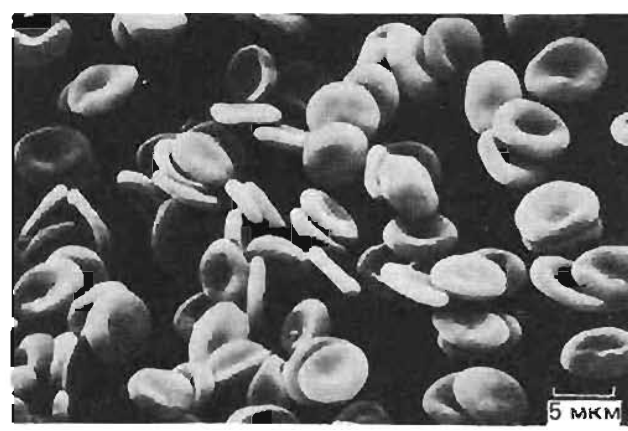


Рис. 6-20. Микрофотография эритроцитов человека, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Клетки имеют двояковогнутую форму, и в них отсутствуют ядра. (С любезного разрешения Bernadette Chailley.)

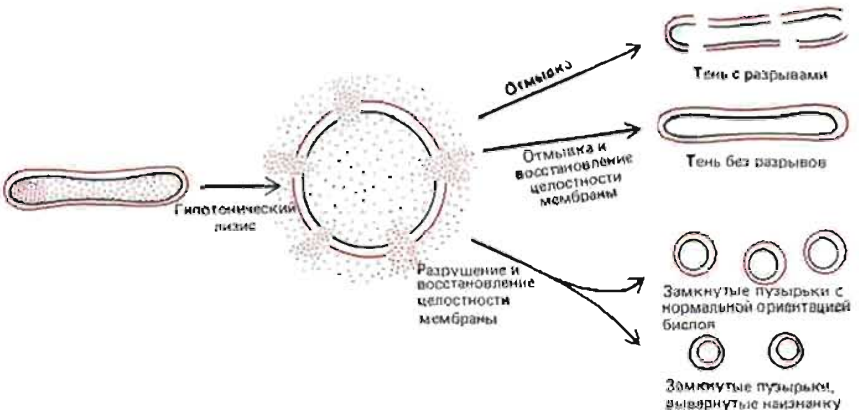


Рис. 6-21. Получение теней эритроцитов с разрывами и без разрывов, а также замкнутых пузырьков с правильной ориентацией бислоя и вывернутых наизнанку. Ориентация мембраны в пузырьках определяется ионными условиями во время процедуры разрушения.

выделить в чистом виде, без примеси внутренних мембран. При получении плазматической мембраны из клеток других типов это представляет серьезную проблему. 3) Мембраны эритроцитов, или «тени» (пустые оболочки), легко получить, поместив клетки в гипотонический солевой раствор. Концентрация соли в таком растворе ниже, чем в клетке, поэтому вода устремляется внутрь эритроцитов, заставляя их разбухать и лопаться (лизироваться), высвобождая гемоглобин (единственный немембранный белок, представленный в большом количестве). 4) Мембранные «тени» можно изучать как в поврежденном виде (в этом случае реагенты взаимодействуют с молекулами на обеих сторонах мембраны), так и после самопроизвольного восстановления их целостности, когда реагенты могут взаимодействовать только с внешней поверхностью мембраны. Кроме того, из теней эритроцитов можно получить замкнутые, вывернутые наизнанку пузырьки (рис. 6-21); это дает возможность изучать независимо друг от друга внешнюю и внутреннюю (цитоплазматическую) стороны мембраны. Использование теней эритроцитов с разрывами и без разрывов впервые позволило установить, что некоторые мембранные белки пронизывают липидный бислой и что липидный бислой асимметричен.

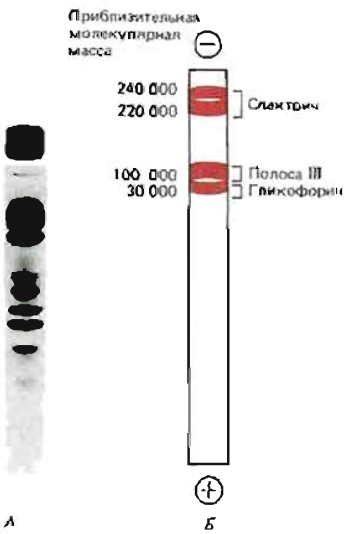


Рис. 6-22. Картина, полученная при электрофорезе белков, входящих в состав мембраны эритроцитов человека, в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН). Окрашивание проводилось кумасси синим (*А*). Положения трех преобладающих белков показаны на *Б*; остальные полосы в геле, соответствующие белкам, содержащимся в меньших количествах, на рисунке опущены. Многочисленные углеводные остатки в гликофорине замедляют движение молекул этого белка настолько, что они движутся почти так же, как значительно более крупные молекулы полосы III. (С любезного разрешения Vincent Marchesi.)

Характер расположения в мембране того или иного белка можно определить двумя способами. Первый из них заключается в применении реагентов, меченных флуоресцентными красителями или несущих радиоактивную метку. Эти реагенты не способны проникать через мембрану и поэтому ковалентно связываются со специфическими группами только на ее наружной стороне (см. ниже). После этого мембраны растворяют, белки разделяют методом электрофореза в полиакриламидном геле, а меченые белки идентифицируют либо по радиоактивности с помощью радиоавтографии гелей, либо по флуоресценции в ультрафиолетовом свете. Используя такое *направленное мечение*, можно определить, как конкретный белок (полоса в геле) ориентирован в мембране: если он метится одновременно и на внешней стороне (вместе с нативными клетками и тенями без разрывов), и на цитоплазматической стороне (вместе с замкнутыми вывернутыми наизнанку пузырьками), то это, несомненно, трансмембранный белок. Альтернативный подход состоит в обработке либо наружной, либо внутренней поверхности мембраны не проникающими через нее протеолитическими ферментами: если какой-либо белок частично расщепляется в обоих случаях, то он должен быть трансмембранным.

При изучении белков плазматической мембраны эритроцитов человека методом одномерного электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН удается идентифицировать около 15 главных белков с молекулярной массой от 15 000 до 250 000. Три из них – *спектрин*, *гликофорин* и так называемая *полоса III* – составляют в сумме более 60% (по весу) всех мембранных белков (рис. 6-22). Все три белка связываются с мембраной по-разному. Поэтому мы рассмотрим данные белки в качестве примеров трех известных способов ассоциации белков с мембранами.

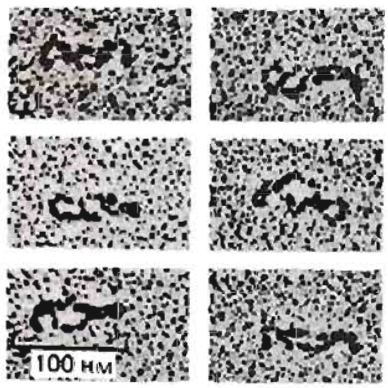


Рис. 6-23. Электронные микрофотографии молекул спектрина, оттененных платиной. Каждая молекула состоит из двух полипептидных цепей, соединенных по обоим концам. (С любезного разрешения David M. Shotton. Перепечатано из статьи D. M. Shotton, B. E. Burke, D. Branton, J. Mol. Biol., 131, 303–329, 1979. © Academic press Inc. [London] Ltd.)

6.2.4. Спектрин непрочно связан с внутренней стороной мембраны эритроцитов [10]

Основная часть мембранных белков эритроцитов человека контактирует с водной средой только на внутренней (цитоплазматической) стороне мембраны, и большинство этих белков можно отделить от мембраны в растворах с очень низкой ионной силой. Самый распространенный из таких белков спектрин представляет собой длинную фибриллярную молекулу. Его масса в клетке составляет около 30% массы мембранных белков, что соответствует $3 \cdot 10^5$ копий на клетку (рис. 6-23). Молекула спектрина состоит из двух больших полипептидных цепей (около 220 000 и 240 000 дальтон каждая). Этот белок образует сеть филаментов на внутренней поверхности мембраны (рис. 6-24). Существуют данные, что актин и по крайней мере еще один белок также принимают участие в формировании этой сети, которая, по-видимому, служит для поддержания двояковогнутой формы эритроцитов и в то же время позволяет им деформироваться при прохождении через узкие капилляры. Спектрин не прямо, а через белок, называемый *анкирином*, взаимодействует с цитоплазматическим концом белка полосы III (см. ниже). Это взаимодействие сильно уменьшает скорость диффузии белковых молекул полосы III в плоскости мембраны.

Таким образом, спектрин можно считать компонентом цитоскелета эритроцитов, а не мембранным белком. Нынешний интерес к спектрину объясняется в значительной степени надеждой, что знания, полученные при изучении этого белка, помогут нам разобраться в том, как другие белки, образующие филаменты, взаимодействуют с белками плазматической мембраны клеток, имеющих ядро. Хотя сам спектрин, вероятно, встречается только в эритроцитах, родственные ему белки недавно были обнаружены в клетках других типов. Как будет видно из дальнейшего, белки внутриклеточных филаментов, по-видимому, способны регулировать распределение и подвижность определенных белков плазматической мембраны.

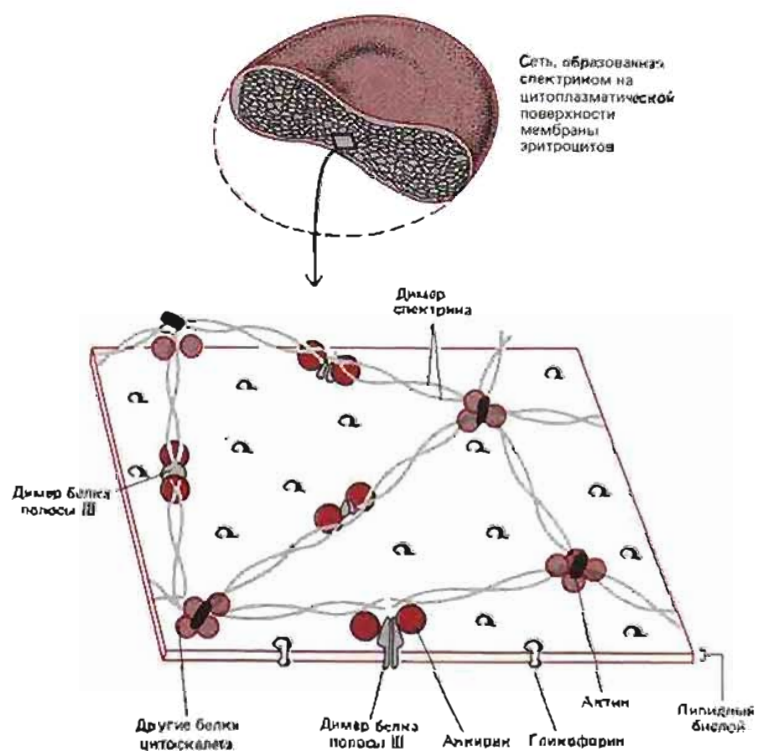


Рис. 6-24. Схема, показывающая возможную организацию молекул спектрина на внутренней (цитоплазматической) поверхности мембраны эритроцитов человека. Две полипептидные цепи спектрина располагаются параллельно и закручиваются различными способами одна вокруг другой, образуя подвижные димеры (см. рис. 6-23). Димеры спектрина связываются «голова к голове», формируя тетрамеры, которые объединяются с помощью коротких актиновых филаментов и других белков, в результате чего на цитоплазматической поверхности мембраны образуется сеть. Спектрин взаимодействует также с белком полосы III, но не прямо, а через белок, называемый анкирином.

6.2.5. Гликофорин пронизывает липидный бислой в виде одиночной α-спирали [11]

Гликофорин – это один из двух главных белков, выступающих на внешней поверхности эритроцита человека. Он оказался первым мембранным белком, для которого была определена полная аминокислотная последовательность, и до сих пор остается одним из наиболее хорошо изученных белков плазматической мембраны. Гликофорин представляет собой трансмембранный гликопротеин, состоящий из 131 аминокислотного остатка. Бо́льшая часть его массы находится на наружной поверхности мембраны, где локализован и его

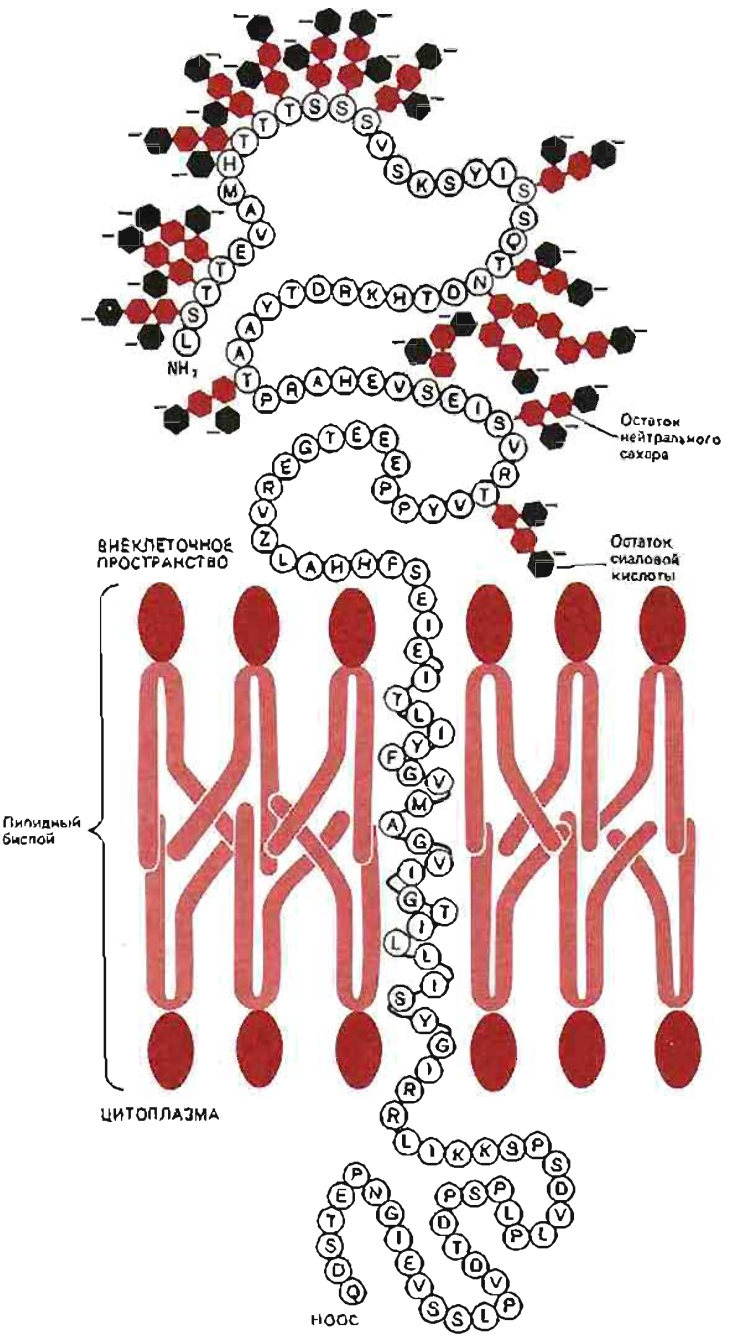


Рис. 6-25. Схематическое изображение молекулы гликофорина в мембране эритроцитов человека. Однобуквенные обозначения аминокислотных остатков те же, что и на схеме G (т. 1).

гидрофильный N-концевой участок. С этой областью белковой молекулы связаны 16 отдельных олигосахаридных боковых цепей, в которых в сумме содержится около 100 остатков сахаров, что составляет примерно 60% массы молекулы гликопротеина. Фактически подавляющую часть углеводов клеточной поверхности (включая более 90% сиаловой кислоты и, следовательно, бо́льшую часть всех отрицательных зарядов клеточной поверхности) несут на себе молекулы гликофорина. Гидрофильные С-концевые хвосты этих молекул погружены в цитоплазму, а гидрофобный α-спиральный участок длиной около 20 аминокислотных остатков пронизывает неполярный бислой (рис. 6-25).

Гликофорин, так же как и спектрин, обнаружен только в эритроцитах. Несмотря на то что в каждой клетке насчитывается более $6 \cdot 10^5$ молекул этого белка, его функция остается неизвестной. Более того, люди, в эритроцитах которых этот белок отсутствует, производят впечатление совершенно здоровых.

6.2.6. Полоса III из мембраны эритроцитов человека представляет собой транспортный белок [12]

О белке, содержащемся в полосе III, известно (в отличие от гликофорина), что он играет важную роль в выполнении клеткой ее специализированной функции. Этот белок называется полосой III, поскольку при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии ДСН он занимает соответствующее положение относительно других белков. Как и гликофорин, полоса III является трансмембранным белком, но в пределах липидного бислоя этот белок находится в более свернутой или глобулярной конформации; при этом его полипептидная цепь, вероятно, пронизывает бислой несколько раз (рис. 6-26). Белок полосы III имеет молекулярную массу около 100 000 (примерно 800 аминокислот) и содержит небольшой углевод, выступающий на наружной поверхности клетки. Вероятно, белок полосы III существует в виде димеров, число которых в одной клетке составляет около $5 \cdot 10^5$.

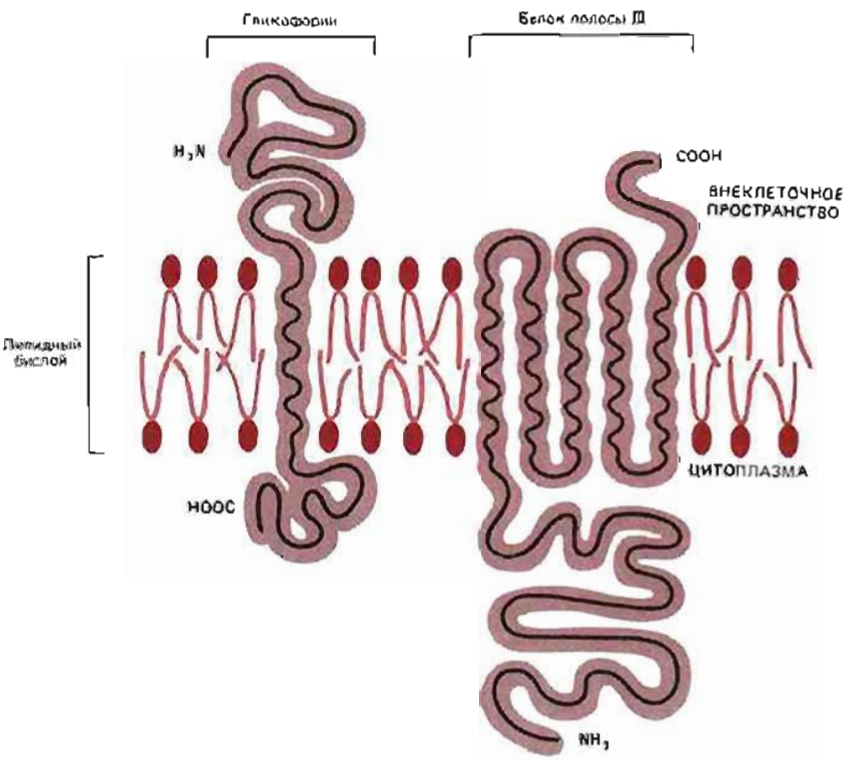


Рис. 6-26. Схема, показывающая возможное расположение белка полосы III в мембране эритроцитов человека; гликофорин показан для сравнения. Хотя точно не известно, как белок полосы III располагается в мембране, есть данные, что он пересекает бислой несколько раз. Обратите внимание на то, что N-конец гликофорина находится снаружи клетки, а N-конец белка полосы III, по-видимому, внутри.

Основная функция эритроцитов, как известно, заключается в переносе O_2 из легких ко всем тканям и CO_2 из тканей к легким. Имеются убедительные данные о том, что белок полосы III принимает участие в этом обмене. Находясь в легких, эритроциты избавляются от CO_2 путем замены HCO_3^- на Cl^-. В мембране есть специальный анионный канал для осуществления данного процесса. Газообмен может быть заблокирован с помощью специфического ингибитора, связывающегося с белком, формирующим этот канал. При использовании ингибитора, меченного радиоактивным изотопом, можно идентифицировать в мембране эритроцитов белок, образующий анионный канал. Таким белком оказался белок полосы III.

Нетрудно себе представить, каким образом трансмембранный белок, например такой, как белок полосы III, основная масса которого расположена в пределах липидного бислоя, может осуществлять пассивный транспорт полярных молекул через неполярный бислой. Например, белок полосы III (или его димер) мог бы сформировать гидрофильный канал необходимого размера и заряженный соответствующим образом, что позволило бы ионам Cl^- и HCO_3^- перетекать через бислой по градиентам их концентраций. С другой стороны, маловероятно, что подобный транспорт может осуществлять молекула гликофорина, которая пронизывает бислой в виде простой α-спирали. Таким образом, можно полагать, что белки, непосредственно участвующие в активном или пассивном транспорте полярных молекул через мембраны, по способу ассоциации с липидным бислоем гораздо больше похожи на белок полосы III, чем на гликофорин. Для того чтобы понять механизм функционирования транспортных белков, необходима точная информация об их трехмерной структуре в составе бислоя. В случае белка полосы III наших знаний об этом еще не достаточно. Единственный мембранный транспортный белок, для которого подобные детали известны,–это *бактериородопсин*, обнаруживаемый в плазматической мембране некоторых бактерий и работающий как фотоактивируемый протонный насос (H^+). Поскольку механизм действия бактериородопсина, вероятно, в чем-то аналогичен работе мембранных транспортных белков у высших организмов, мы сделаем краткое отступление, чтобы обсудить данные о структуре и функции этого бактериального мембранного белка.

6.2.7. Бактериородопсин – это протонный насос, пересекающий бислой в виде семи α-спиралей [13]

«Пурпурная мембрана» бактерии *Halobacterium halobium* – это четко очерченный участок (пятно) неправильной формы на плазматической мембране (рис. 6-27). Пурпурная мембрана содержит молекулы одного белка – **бактериородопсина**, полипептидная цепь которого состоит из 248 аминокислот. В каждой молекуле имеется одна поглощающая свет простетическая группа, или хромофор (называемый *ретиналем*), идентичная хромофору, обнаруженному в родопсине палочек сетчатки глаза у позвоночных (т. 5, разд. 18.5.3). Ретиналь ковалентно связан с боковой цепью лизина в белке. При активации одним квантом света возбужденный хромофор вызывает конформационные изменения в белке, в результате чего два протона переносятся с внутренней поверхности клетки на наружную. Вследствие такого переноса в мембране создается градиент концентрации протонов и градиент электрического потенциала, которые в свою очередь обусловливают синтез ATP.



Рис. 6-27. Схематическое изображение бактерии *Halobacterium halobium*. В виде пятен изображены участки пурпурной мембраны, содержащие молекулы бактериородопсина.

Молекулы родопсина образуют плоскую кристаллическую решетку, подобную двумерному кристаллу. Сочетание методов электронной микроскопии низкой интенсивности и малоуглового рентгеновского рассеяния позволило выявить трехмерную структуру белка и его ориентацию в мембране с разрешением 0,7 нм. Последний метод аналогичен рентгеноструктурному анализу, который используется для изучения трехмерных кристаллов растворимых белков. Хотя структура одного вирусного мембранного гликопротеина уже расшифрована с помощью дифракции рентгеновских лучей (см. рис. 7-30),

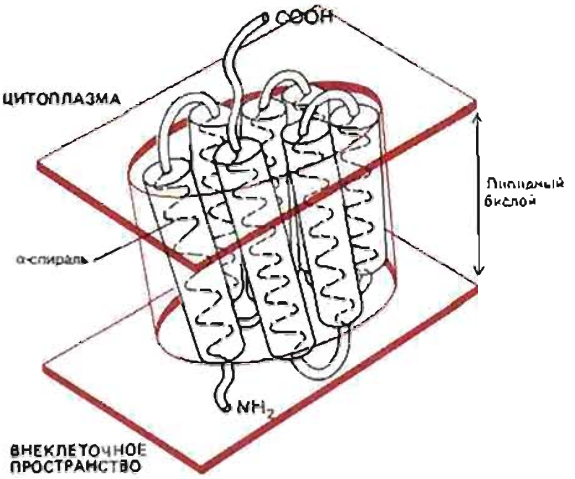


Рис. 6-28. Структура молекулы бактериородопсина и ее расположение в липидном бислое. Полипептидная цепь пересекает бислой в виде семи α-спиралей.

до сих пор не получено пригодных для этой цели трехмерных кристаллов белков, входящих в состав клеточной мембраны. В ходе исследования бактериородопсина было показано, что его молекула состоит из семи α-спиралей (каждая из которых содержит около 30 аминокислот), плотно упакованных друг с другом (рис. 6-28). Эти спирали пересекают липидный бислой примерно под прямым углом к плоскости мембраны. Недавние исследования показали, что семь спиралей бактериородопсина не образуют сколь-нибудь широкого, заполненного водой канала; поэтому возможно, что протоны проходят через мембрану при участии хромофора по сопряженной системе боковых цепей α-спиралей, однако детальные механизмы этого процесса еще не известны. Поскольку таким способом могут передаваться только протоны (и электроны), кажется маловероятным, чтобы с бактериородопсином был связан общий механизм транспорта других ионов через мембрану.

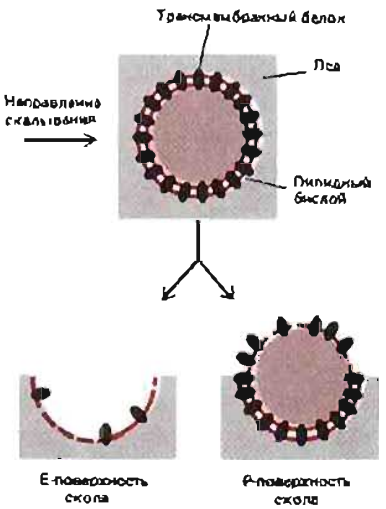


Рис. 6-29. Схема, показывающая, как с помощью электронной микроскопии образцов, приготовленных методов замораживания — скалывания, можно получить изображения внутренней гидрофобной поверхности цитоплазматической (или протоплазматической) половины бислоя (называемой P-поверхностью) и наружной половины бислоя (называемой E-поверхностью). После показанного здесь процесса скалывания открытые поверхности сколов оттеняют платиной и углеродом, органические вещества удаляют, а полученную платиновую реплику рассматривают в электронный микроскоп.

6.2.8. Транспортные белки мембран можно увидеть в электронный микроскоп с помощью метода замораживания — скалывания [14]

Электронная микроскопия препаратов, полученных методом **замораживания — скалывания**, это единственный способ увидеть гидрофобную внутренность мембран. Согласно этому методу, клетки замораживают при температуре жидкого азота (− 196°C) и образовавшийся кубик льда подвергают скалыванию. Плоскость скола обычно проходит через гидрофобную сердцевину бислоя любой биологической мембраны, разделяя его на два монослоя. Открывающиеся при этом *поверхности сколов* затем оттеняют платиной и углеродом, органическое вещество удаляют и полученную в результате платиновую реплику рассматривают в электронный микроскоп. Как показано на рис. 6-29, с помощью этой методики открываются и затем оттеняются поверхности сколов двух различных типов, представляющие собой гидрофобные внутренние стороны цитоплазматической (или протоплазматической) половины бислоя (P-поверхность, от англ. protoplasmic) и наружной половины бислоя (E-поверхность, от англ. external).

Мембраны эритроцитов человека, обработанные в соответствии с этим методом, оказываются довольно хаотично усеянными маленькими крупинками примерно одинакового размера (около 7,5 нм), называемыми **внутримембранными частицами**. Эти частицы обнаруживаются на обеих поверхностях скола, но на P-поверхности их гораздо больше (рис. 6-30). Внутримембранные частицы в биологических мембранах, по всей вероятности, состоят главным образом из белка, поскольку на поверхности сколов искусственных мембран, не содержащих белков, их нет и эти поверхности кажутся гладкими. Чтобы на электронных микрофотографиях сколов полипептид выглядел в виде отдель-

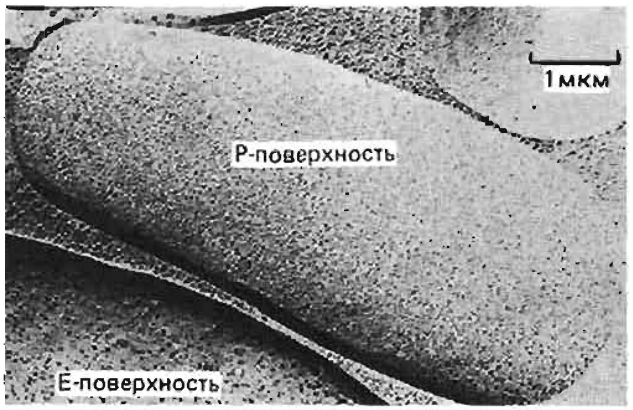


Рис. 6-30. Электронная микрофотография скола эритроцитов человека. Обратите внимание, что плотность внутримембранных частиц на цитоплазматической (P) поверхности выше, чем на наружной (E). (С любезного разрешения L. Engstram и D. Branton.)

ной частицы, он должен (либо сам по себе, либо как часть более сложного комплекса) пронизывать мембрану насквозь и иметь в пределах бислоя достаточный объем, чтобы «отбрасывать тень». В настоящее время еще не ясно, какие именно белки образуют внутримембранные частицы в эритроцитах человека, однако представляется вероятным, что это преимущественно белок полосы III: число димеров этого белка (около 500 000 на клетку) приблизительно соответствует числу наблюдаемых частиц; кроме того, на сколах искусственных липидных бислоев, реконструированных в присутствии очищенного белка полосы III, видны типичные внутримембранные частицы размером 7,5 нм.

Что же происходит с трансмембранными белками во время процедуры замораживания–скалывания? При расщеплении бислоя на два составляющих его монослоя либо наружная, либо внутренняя половина такого белка должна «выдернуться» из замороженного монослоя, с которым она была связана. В противном случае нарушилась бы целостность полипептидной цепи (при разрыве ковалентных связей) в том месте, где эта цепь пересекает бислой (при этом белок не был бы виден как внутримембранная частица). Поскольку молекулы белка полосы III все-таки выглядят как внутримембранные частицы, можно сделать вывод, что во время процедуры замораживания–скалывания они обычно не расщепляются. Вероятно, они остаются целыми из-за того, что значительная доля их массы располагается внутри бислоя. Бóльшая часть полипептидной цепи белка полосы III выступает не с наружной, а с цитоплазматической поверхности бислоя, поэтому следовало бы ожидать, что при использовании метода замораживания–скалывания молекулы этого белка чаще будут оставаться во внутренней половине замороженного бислоя. Это объяснило бы преимущественную локализацию внутримембранных частиц на внутренней (P) половине мембраны эритроцитов. С другой стороны, такой белок, как гликофорин, при скалывании мог бы или разорваться, или выдернуть свой короткий С-концевой хвост из замороженного внутреннего монослоя. В любом случае, однако, выступающая на поверхности скола молекула гликофорина не будет иметь достаточную массу, чтобы выглядеть как внутримембранная частица (рис. 6-31).

В настоящее время удалось реконструировать функционирующую систему мембранного транспорта в искусственных бислоях с помощью нескольких выделенных транспортных белков, в том числе и белка, содержащегося в полосе III. Все изучавшиеся до сих пор транспортные белки можно было увидеть на сколах в электронный микроскоп как частицы. Поскольку это в основном те транспортные белки, которые в пределах бислоя имеют достаточную массу, чтобы отчетливо выделяться на фоне окружающих фосфолипидов, то, вероятно, большинство внутримембранных частиц представляет собой белки, выполняющие определенные транспортные функции.

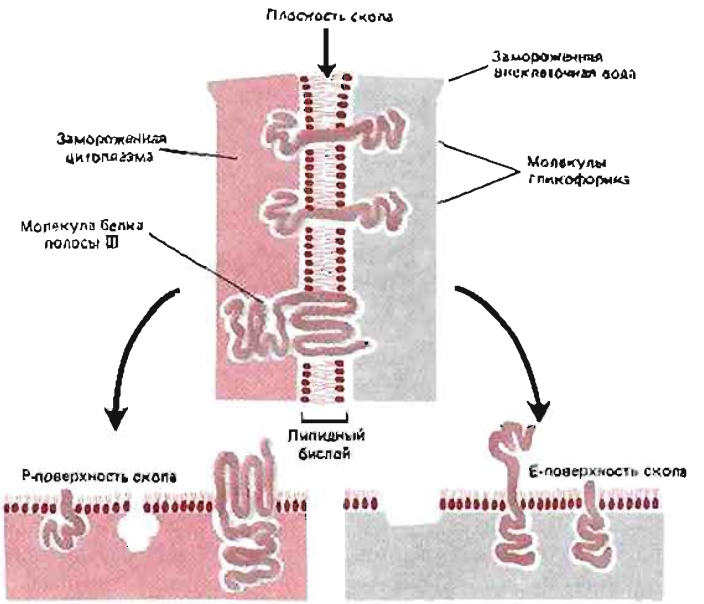


Рис. 6-31. Схема, показывающая, что может произойти с молекулами гликофорина и белка полосы III в мембранах эритроцитов человека во время процедуры замораживания–скалывания. Молекулы белка полосы III обычно остаются на внутренней (P) поверхности скола и имеют достаточно большую массу над плоскостью скола, благодаря чему они выглядят как внутримембранные частицы. Молекулы гликофорина, возможно, либо расщепляются, либо остаются на наружной (E) поверхности скола, но в любом случае, видимо, не будут выглядеть как внутримембранные частицы.

6.2.9. Для изучения некоторых белков из плазматической мембраны клеток, имеющих ядро, можно использовать реагенты, осуществляющие направленное мечение [15]

В отличие от эритроцитов человека, имеющих только плазматическую мембрану, клетки с ядром содержат множество внутренних мембран: мембраны эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи, митохондрий, лизосом и разнообразных пузырьков. На долю плазматической мембраны часто приходится менее 10% общей площади всех мембран этих клеток. Поэтому такие плазматические мембраны можно изучать прямыми методами только после их отделения от внутренних мембран. Однако хорошей очистки достигнуть весьма трудно, так что почти всегда препараты плазматических мембран оказываются загрязненными. Альтернативный подход заключается в использовании обсуждавшихся ранее реагентов, осуществляющих *направленное мечение* белков и не способных проникать через мембрану. С помощью этих реагентов можно метить и таким образом идентифицировать только те белки, которые выходят на поверхность клетки. В результате применения этого метода мечеными оказываются многие белки плазматической мембраны, тогда как белки, растворенные в цитоплазме или связанные с внутренними мембранами, не метятся. Для такого направленного мечения широко используется фермент *лактопероксидаза*, который окисляет радиоактивный иодид $^{125}I^-$ в присутствии перекиси водорода H_2O_2 и переводит его в более реакционноспособную, связанную с ферментом форму. Эта активированная форма иодирует боковые группы тирозина и гистидина в других белках. Однако активная форма иода не может высвободиться из лактопероксидазы, а крупная молекула фермента сама по себе не способна проникнуть через мембрану; поэтому в неповрежденных клетках иодироваться (и, следовательно, метиться) будут только белки, выступающие на наружную поверхность (рис. 6-32). Недостаток данного метода заключается в том, что с его помощью идентифицируются не все белки плазматической мембраны, а лишь те, у которых на наружной поверхности клетки находятся остатки гистидина или тирозина. Еще сложнее в клетках, имеющих ядро, провести избирательное мечение внутренней стороны плазматической мембраны, обращенной к цитоплазме. Для этого используют методы получения замкнутых, вывернутых наизнанку пузырьков из

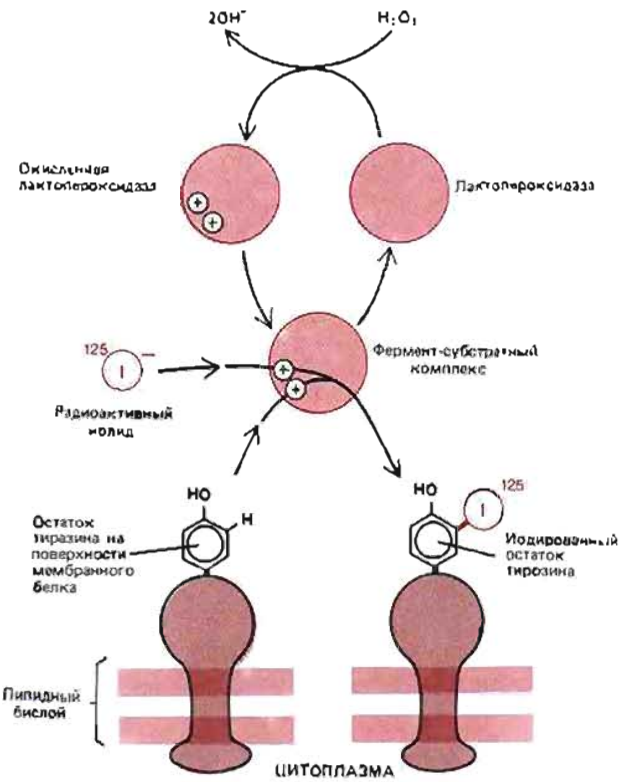


Рис. 6-32. Избирательное мечение белков на наружной поверхности плазматической мембраны с помощью иодирования, катализируемого лактопероксидазой. Как было показано, все реакции с иодом происходят на поверхности фермента. В активном центре фермента находится атом железа, который вызывает в остатке тирозина, подвергающемся иодированию, образование свободного радикала, представляющего собой промежуточный продукт реакции.

выделенных плазматических мембран. Загрязненность подобных препаратов тем не менее остается нерешенной проблемой.

Эксперименты по направленному мечению показали, что плазматическая мембрана типичной клетки, имеющей ядро, как правило, содержит гораздо больше различных белков, чем мембрана эритроцитов человека. Так, например, в культуре типичных клеток, имеющих ядро, с помощью катализируемого лактопероксидазой иодирования наружной поверхности можно идентифицировать свыше 50 отдельных видов белков. До сих пор мало известно о том, каким образом большинство этих белков располагается в мембране и какова их функция, однако, как мы сейчас увидим, недавно выяснилось, что многие из них обладают подвижностью в плоскости мембраны.

6.2.10. При слиянии двух клеток белки их плазматических мембран быстро перемешиваются [16]

То, что некоторые белки плазматической мембраны способны передвигаться в плоскости бислоя, было прямо показано в 1970 г. с помощью изящных экспериментов на гибридных клетках (*гетерокарионах*; т. 1, разд. 4.2.4), полученных искусственным путем в результате слияния клеток мыши и человека. Жизнеспособность таких клеток свидетельствует о том, что при слиянии структурная и функциональная целостность плазматических мембран сохраняется. Естественно возникает вопрос: остается ли новая мембрана разделенной на две области или же молекулы (например, мембранные белки), исходно принадлежавшие разным организмам, перемешиваются? В эксперименте, который дал четкий ответ на этот вопрос, были использованы антитела двух видов: первые связывались с белками на поверхности клеток человека, а вторые – с белками на поверхности клеток мыши. Человеческие белки идентифицировались с помощью антител, к которым был присоединен родамин – красный флуоресцентный краситель, а белки мыши – с помощью антител, связанных с флуоресцеином – флуоресцентным красителем зеленого цвета.

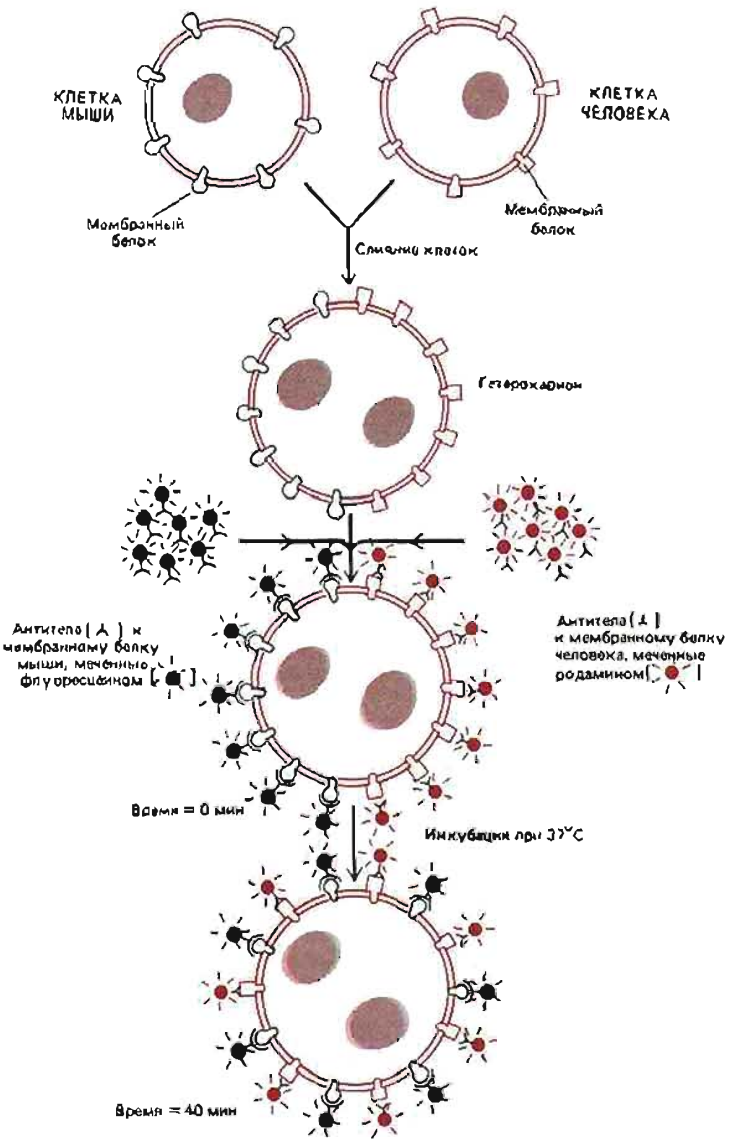


Рис. 6-33. Схема эксперимента, демонстрирующего перемешивание белков плазматической мембраны в клеточных гибридах мышь–человек. Белки мыши и человека первоначально располагаются на своих собственных половинах новообразованной плазматической мембраны гетерокариона, но со временем перемешиваются.

В большей части гетерокарионов человеческие и мышиные белки сначала располагались только в своих областях, образуя двухцветные картины, напоминающие одежду арлекина. Однако примерно за 1 ч оба набора белков в большинстве клеток перемешались и распределились по всей поверхности, что свидетельствует об их способности быстро перемещаться в плоскости общей мембраны (рис. 6-33).

Текучая структура липидного бислоя дает возможность мембранным белкам быстро диффундировать и взаимодействовать между собой, а также обеспечивает простой способ распространения мембранных компонентов от мест, где они вошли в состав бислоя после того, как были синтезированы, в другие области клетки. Текучесть позволяет мембранам сливаться друг с другом, причем способность к регуляции их проницаемости не утрачивается. Во время клеточного деления благодаря той же текучести молекулы, содержащиеся в мембранах, разделяются поровну между дочерними клетками. Трудно представить, как клетка могла бы жить, расти и делиться, если бы ее мембраны не были текучими.

6.2.11. Если мембранные белки «сшить» с помощью антител, они собираются в кластеры, образуя на поверхности клетки дискретные зоны неправильной формы [17]

Антитела, несущие флуоресцентную метку, связываются с определенными белками плазматической мембраны, выступающими на поверхность различных клеток. Такими клетками могут быть, например, лимфоциты – особый класс лейкоцитов, ответственных за иммунные реакции (см. гл. 17). Связывание белков с антителами вызывает агрегацию этих белков и образование пятен неправильной формы – пэтчей (от англ. patch). Антитела представляют собой *бивалентные молекулы*, т.е. у них имеются два участка связывания *антигена* (белка или какого-либо другого вещества). Это свойство обусловливает способность антител «сшивать» растворимые антигены, формируя большие комплексы антиген – антитело, осаждающиеся из раствора. Образование кластеров антигенов на поверхности клетки, индуцированное связыванием антител, аналогично этой реакции осаждения (правда, в данном случае реакция идет как бы в двух измерениях в плоскости мембраны). Однако, чтобы антитела могли «сшить» мембранные белки в большие комплексы, эти белки должны свободно перемещаться латерально в пределах липидного бислоя, а это в свою очередь означает, что мембрана должна быть текучей.

Применение меченых антител было распространено задолго до того, как стало понятным, что мембраны являются текучими. Меченые антитела широко использовались для того, чтобы увидеть белки на поверхности лимфоцитов, а наблюдаемые при этом пятна исследователи ошибочно принимали за обычное распределение этих белков в мембране. То, что появление пятен на самом деле есть прямое следствие связывания мембранных белков с антителами, можно показать с помощью *моновалентных* фрагментов антител, получаемых при обработке последних протеолитическим ферментом папаином. В результате такой обработки во фрагментах антител сохраняется только по одному участку связывания с антигеном, и поэтому они не могут сшивать друг с другом расположенные рядом мембранные белки (т. 5, разд. 17.2.4). Если такие моновалентные фрагменты антител пометить флуоресцентным красителем, то обнаруживается, что, хотя их связывание с белками на поверхности лимфоцитов и происходит, распределение метки оказывается равномерным; молекулам белка не удается образовать пятна, аналогичные тем, которые индуцируются бивалентными антителами (рис. 6-34).

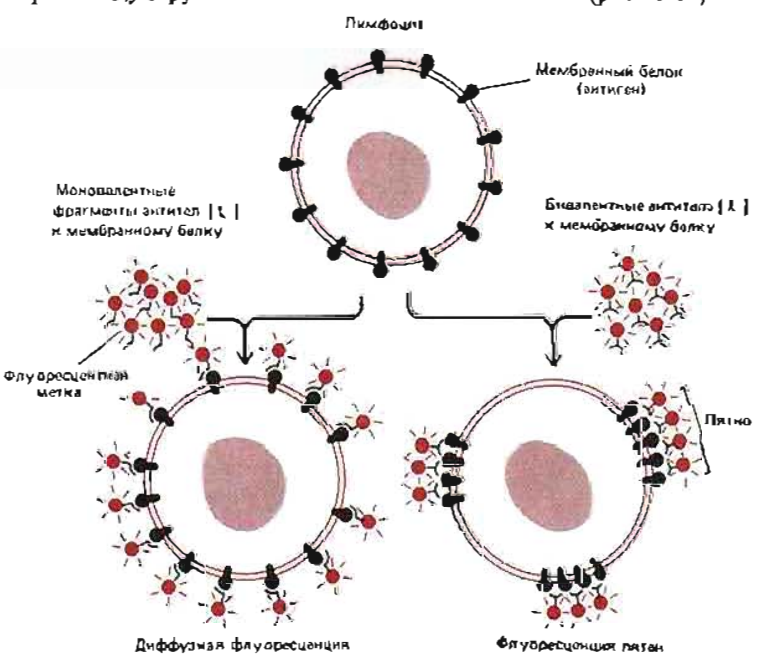


Рис. 6-34. Схема, показывающая образование индуцируемых антителами пятен антигенов (пэтчинг и кластеризация) на поверхности лимфоцита. Моновалентные антитела остаются диффузно распределенными по поверхности лимфоцита, тогда как бивалентные антитела сшивают антигены и собирают их вместе в пятна.

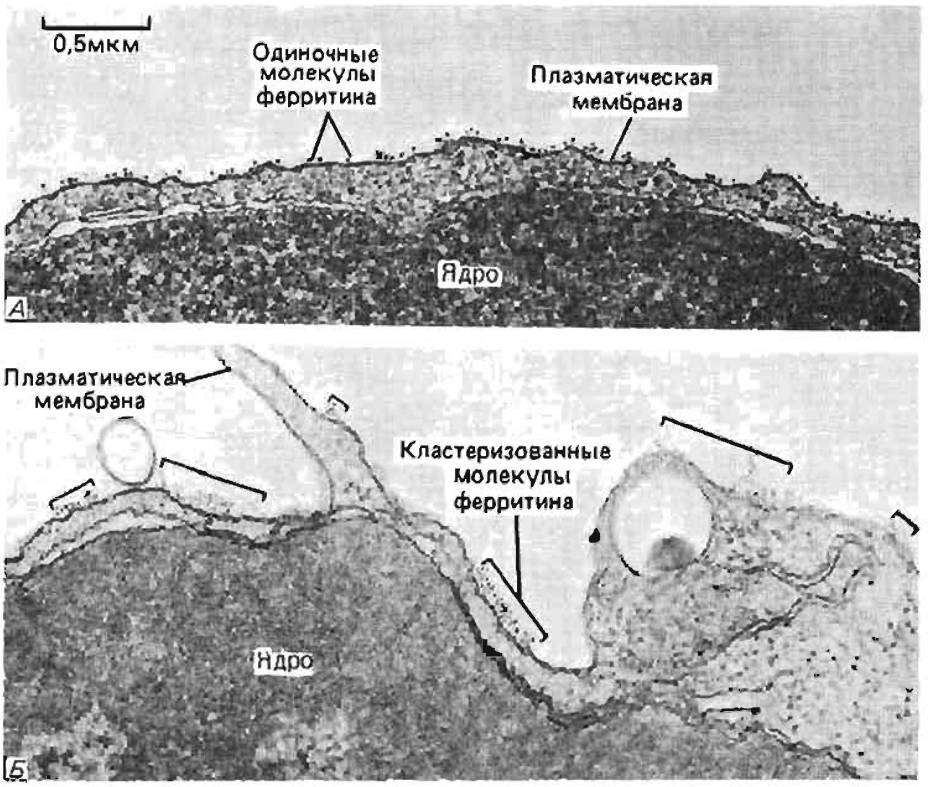


Рис. 6-35. Электронная микрофотография, показывающая диффузное распределение связанных с ферритином моновалентных антител (*А*) и кластеризацию связанных с ферритином бивалентных антител (*Б*) на поверхности лимфоцита. Каждая молекула ферритина выглядит как черная точка. (С любезного разрешения Stefanello de Petris.)

Кластеризация мембранных молекул, вызываемая антителами, была продемонстрирована для большого числа различных белков и гликолипидов во всех изучавшихся до сих пор клетках, имеющих ядро. Образование подобных пятен (**пэтчинг**) индуцируется не только антителами, но и белками совершенно другого класса – **лектинами**. У этих белков, обычно выделяемых из растений, имеются два или более участков связывания специфических углеводных остатков, присоединенных к расположенным на поверхности клетки гликопротеинам и гликолипидам. Поэтому лектины, как и антитела, могут сшивать молекулы, содержащие соответствующие углеводные остатки.

Распределение белков в мембранах можно наблюдать на молекулярном уровне с помощью антител или лектинов (общее название таких связывающих молекул – *лиганды*), присоединенных к железосодержащему белку *ферритину*. Поскольку ферритин имеет высокую электронную плотность, отдельные его молекулы можно увидеть в электронный микроскоп. В большинстве случаев, когда связанные с ферритином лиганды используются для изучения взаимного расположения мембранных макромолекул в условиях, предотвращающих индуцируемую лигандами кластеризацию (с помощью моновалентных лигандов или посредством химической «фиксации» клеточной мембраны, приводящей к иммобилизации мембранных белков), обнаруживается, что в неповрежденной плазматической мембране одиночных клеток, суспендированных в жидкости, макромолекулы распределены диффузно (рис. 6-35, *А*). С другой стороны, если эксперимент проводится на нефиксированных мембранах, то меченые молекулы перераспределяются и образуют кластеры (рис. 6-35, *Б*).

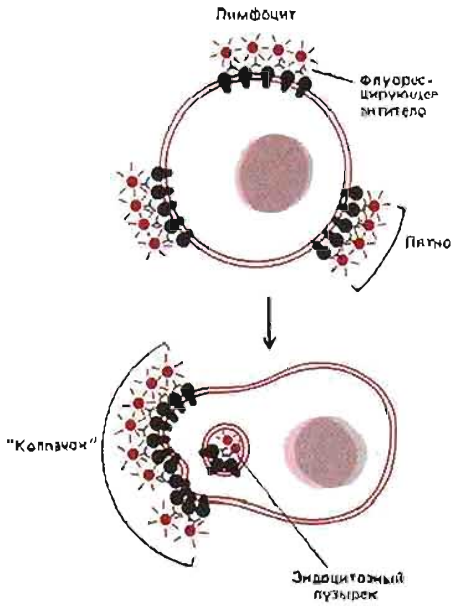


Рис. 6-36. Схема образования «колпачка» (кэппинг). Индуцированные антителами пятна быстро перемещаются к хвосту лимфоцита, где они образуют «колпачок». Часто антитела (и белки, с которыми они связаны) после этого захватываются в эндоцитозные пузырьки, а лимфоцит принимает форму, характерную для передвигающейся клетки.

6.2.12. Сшитые друг с другом мембранные белки активно перемещаются к одному полюсу клетки в процессе «кэппинга» [18]

После того как пятна, индуцируемые на поверхности лимфоцита сшивающими лигандами, образовались, они быстро (в течение нескольких минут) собираются вместе на одном полюсе клетки в виде «колпачка». Этот процесс называется **кэппингом** (от англ. cap – колпачок) (рис. 6-36, 6-37). Колпачок при этом почти всегда возникает на том конце клетки, который был бы хвостом подвижного лимфоцита, перемещающегося по поверхности (рис. 6-36). Однако очевидно, что для кэппинга не требуется подобного перемещения, поскольку он наблюдается даже в том случае, когда лимфоциты растут в суспензии и не могут взаимодействовать с какой-либо поверхностью. Колпачки так же, как и пятна, возникают только при участии сшивающих лигандов, но их образование в отличие от образования пятен – это активный процесс, для которого необходимы энергия (ATP) и неповрежденные актиновые филаменты.

Механизм кэппинга пока не выяснен. Лимфоцит в процессе кэппинга часто напоминает лимфоцит, движущийся по поверхности. Более того, большинство типов эукариотических клеток, способных перемещаться по поверхности, образуют колпачки (если молекулы их плазматических мембран сшить при помощи поливалентных лигандов), тогда как клетки, не обладающие способностью двигаться, не образуют колпачков. Эти наблюдения наводят на мысль, что механизм кэппинга аналогичен механизму перемещения клеток. Можно даже рассматривать перемещение клеток как следствие формирования колпачков, если считать, что плотно прилегающая к клетке поверхность, подобно растворимым поливалентным лигандам, сшивает взаимодействующие с ней мембранные белки. С этой точки зрения клетка как бы пытается оттолкнуть прилегающую поверхность по направлению к своему хвосту и благодаря этому продвинуться вперед. С другой стороны, кэппинг можно рассматривать как своего рода движение. Когда растворимый сшивающий лиганд связывается с мембраной клетки в суспензии, клетка отвечает на это, как если бы она взаимодействовала с твердой поверхностью: активируется механизм, осуществляющий перемещение клетки, что и приводит к образованию колпачка. С этой точки зрения формирование колпачков оказывается удобной моделью для изучения перемещения клеток.

Мембранные молекулы, сшитые антителами или другими лигандами, часто поглощаются клеткой в процессе так называемого **лиганд-индуцируемого эндоцитоза**. Хотя в лимфоцитах эндоцитоз такого типа происходит в основном только после завершения кэппинга (рис. 6-36), это в большой степени зависит от того, с какими именно молекулами на поверхности клетки взаимодействуют лиганды. В некоторых случаях лиганд и связанная с ним молекула не подвергаются эндоцитозу, а отрываются от клеточной поверхности. Более

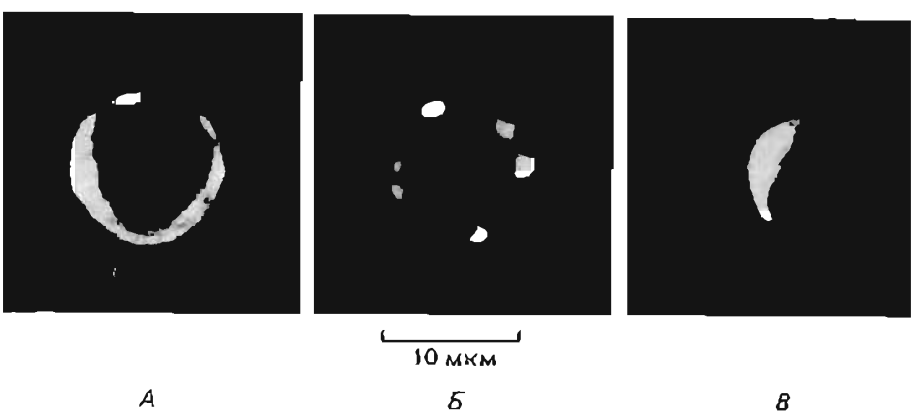


Рис. 6-37. Иммунофлуоресцентные микрофотографии, демонстрирующие различные типы распределения флуоресцирующих антител на поверхности лимфоцитов. В случае моновалентных антител имеет место диффузное окрашивание (*А*), тогда как бивалентные антитела сначала собираются вместе в пятна (*Б*), а затем образуют «колпачок» (*В*). (С любезного разрешения Stefanello de Petris.)

детально лиганд-индуцируемый эндоцитоз (называемый также *опосредуемым рецепторами эндоцитозом* или *адсорбционным эндоцитозом*) обсуждается в разд. 6.5.7.

6.2.13. Противоположные точки зрения на то, как образуются колпачки: гипотеза мембранного потока и гипотеза перетаскивания [19]

Для объяснения того, как образуются колпачки, были выдвинуты две гипотезы. Первая из них предполагает, что пятна переносятся в хвостовую часть клетки в результате непрерывного тока мембраны. Этот ток возникает благодаря тому, что фрагменты плазматической мембраны поглощаются в хвостовой части клетки (путем эндоцитоза), затем транспортируются в виде пузырьков через всю цитоплазму и, наконец, встраиваются в мембрану в передней части клетки (путем экзоцитоза; разд. 6.5.1). Согласно этой гипотезе, отдельные белковые молекулы диффундируют в плазматической мембране достаточно быстро, так что, несмотря на мембранный поток, сохраняется их приблизительно равномерное распределение. Однако, когда мембранные белки сшиваются с образованием больших агрегатов, их движение замедляется и ток мембраны собирает их вместе к одному полюсу клетки (рис. 6-38). Для направленного транспорта пузырьков, который, как предполагают, необходим для того, чтобы создать мембранный поток, требуются актиновые филаменты и АТР. Подобная идея была высказана и для объяснения движения фибробластов.

Вторая гипотеза, объясняющая механизм кэппинга, предполагает, что сшитые лигандами мембранные белки взаимодействуют с сократительной системой актиновых филаментов цитоплазмы и активно перетаскиваются в хвостовую часть клетки этими филаментами (рис. 6-39). Одна из трудностей, связанных с этой моделью, заключается в том, что в действительности любой белок (и даже гликолипиды) способен образовать «колпачок» с помощью соответствующего поливалентного лиганда. Для реализации этой модели, по-видимому, необходимо, чтобы актиновые филаменты, расположенные вблизи мембраны, каким-то образом узнавали кластерированные мембранные моле-

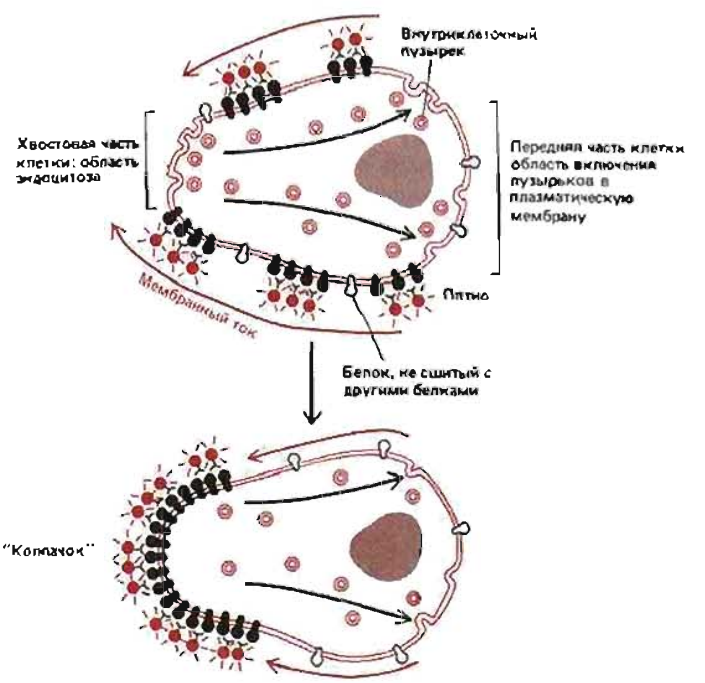


Рис. 6-38. Гипотеза мембранного потока, объясняющая образование «колпачков». Пузырьки поглощаются в хвостовой части лимфоцита, транспортируются через цитоплазму и вновь встраиваются в мембрану в передней части клетки. Это создает ток мембраны на поверхности клетки, в результате чего большие пятна сшитых белков переносятся к хвосту лимфоцита. Даже в том случае, когда эндоцитоз идет по всей клеточной поверхности, что, видимо, имеет место по крайней мере в некоторых типах клеток, мембранный поток все равно будет существовать, если пузырьки вновь встраиваются в мембрану в каком-то локальном ее участке.

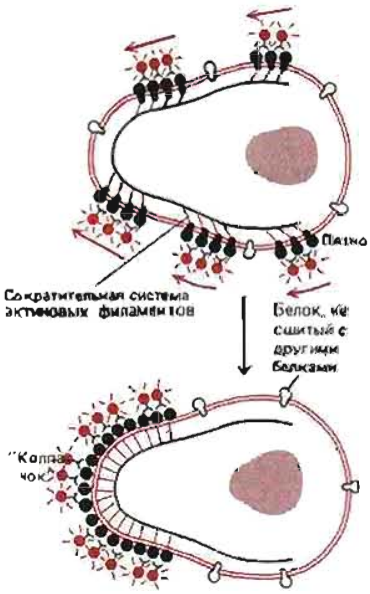


Рис. 6-39. Гипотеза «перетаскивания», объясняющая образование «колпачков». Пятна на клеточной поверхности, состоящие из белков, сшитых лигандами, взаимодействуют прямо или опосредованно с сократительной системой актиновых филаментов, которая перетаскивает пятна к хвосту лимфоцита.

кулы и связывались с ними независимо от типа этих молекул. Такое узнавание трудно себе представить, однако оно могло бы иметь место, если бы существовал специальный класс мембранных белков, взаимодействующих с актиновыми филаментами, и если бы другие мембранные белки (или гликолипиды), образовав кластеры, связывались с этими специальными белками.

Пока еще нет достаточно надежных экспериментальных данных, позволяющих выбрать между гипотезой «мембранного потока» и гипотезой «перетаскивания», хотя скопление актина и миозина в области пятен и «колпачков» свидетельствует в пользу второй модели. В любом случае, каким бы ни оказался ответ на заданный вопрос, интерес к кэппингу помогает сконцентрировать внимание исследователей на важных взаимодействиях между некоторыми белками плазматической мембраны и частями цитоскелета. Из множества других экспериментов стало ясно, что плазматическая мембрана не является независимой органеллой; она структурно и функционально связана с цитоскелетом (см. гл. 10).

6.2.14. С помощью индуцированного антителами перераспределения молекул можно определить, связаны ли два полипептида друг с другом в плазматической мембране

Одна из важных задач, стоящих перед биохимией мембран, заключается в выяснении того, каким образом различные мембранные молекулы взаимодействуют между собой. Например, можно попытаться определить, связаны ли друг с другом два мембранных полипептида А и В. Один из подходов к решению этого вопроса состоит в использовании меченых антител против обоих полипептидов: антителами против А индуцируют образование пятен и «колпачка» из молекул А; затем с помощью моновалентных фрагментов антител против В выясняют, что при этом происходит с молекулами В (рис. 6-40). Если В перемещается совместно с А, то, судя по всему, оба полипептида связаны друг с другом в мембране; в противном случае связь между ними, видимо, отсутствует. Антитела двух различных видов можно наблюдать одновременно, если их пометить разными флуоресцентными красителями, такими, как флуоресцеин и родамин. Подавляющее большин-

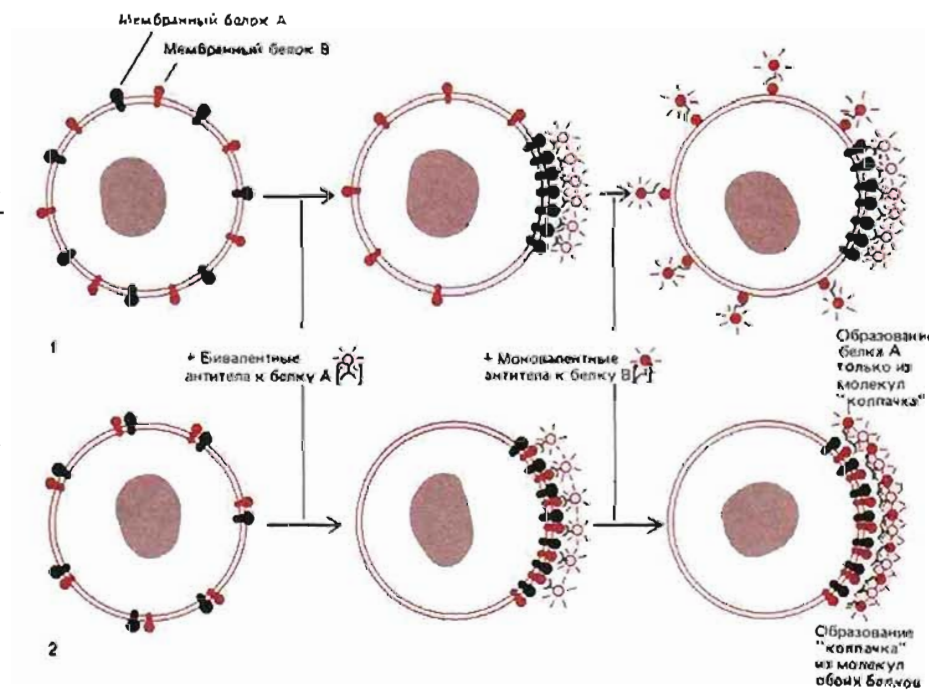


Рис. 6-40. Метод, используемый для определения того, ассоциированы ли друг с другом физически два мембранных белка А и В. Если они не ассоциированы, то «колпачок» формируют только молекулы А, а распределение В остается диффузным (1). Если же между белками имеется связь, то «колпачок» образуется из молекул обоих типов (2). Обратите внимание, что распределение В определяется с помощью моновалентных фрагментов антител, чтобы избежать прямой (не зависящей от А) индуцируемой бивалентными антителами кластеризации В.

На рисунке вместо Образование белка А только из молекул «колпачка» следует читать: Образование «колпачка» только из молекул белка А.

ство белков (главным образом белки из плазматической мембраны лимфоцитов), изученных таким способом, образуют «колпачки» независимо друг от друга, что свидетельствует об отсутствии стабильных взаимодействий дальнего порядка между мембранными белками.

6.2.15. Скорость латеральной диффузии мембранных белков можно измерить [20]

Мембранные белки так же, как и мембранные липиды, способны вращаться вокруг оси, перпендикулярной плоскости бислоя (*вращательная диффузия*), а также перемещаться в плоскости самой мембраны (*латеральная диффузия*). Однако они не могут переворачиваться и перескакивать с одной стороны бислоя на другую (такой перескок носит название *флип-флоп*). Измерение скоростей латеральной диффузии различных белковых молекул во многих мембранах показало, что коэффициент диффузии D может варьировать в довольно широком диапазоне значений – от $5 \cdot 10^{-9}$ до 10^{-12} $см^2с^{-1}$. (Для сравнения напомним, что коэффициент диффузии молекулы фосфолипида в мембране составляет около 10^{-8} $см^2с^{-1}$.) По-видимому, наиболее точное измерение было проведено на индивидуальных молекулах родопсина в мембранах дисков, присутствующих в палочках сетчатки глаза у позвоночных. Для этого в молекулах родопсина, находящихся на одной стороне палочки, с помощью хорошо сфокусированного луча света большой интенсивности быстро обесцвечивают хромофор (ретиналь), а затем измеряют время, в течение которого обесцвеченные молекулы диффундируют на другую сторону клетки (рис. 6-41). Коэффициент диффузии, полученный таким образом, оказался равным около $5 \cdot 10^{-9}$ $см^2с^{-1}$. Недавно подобный подход был использован для изучения скоростей диффузии некоторых белковых молекул в плазматической мембране живых клеток. В этом случае флуоресцирующие антитела, связанные с белками на поверхности клетки, обесцвечивались на малой площади с помощью лазерного луча, после чего измерялось время, необходимое для того, чтобы соседние необесцвеченные молекулы переместились путем диффузии в обесцвеченный участок. Измеренные таким способом скорости диффузии различных белков плазматической мембраны оказались в 10–1000 раз меньше, чем у молекул родопсина. Одно из возможных объяснений этих данных состоит в том, что скорости диффузии некоторых белков уменьшают-

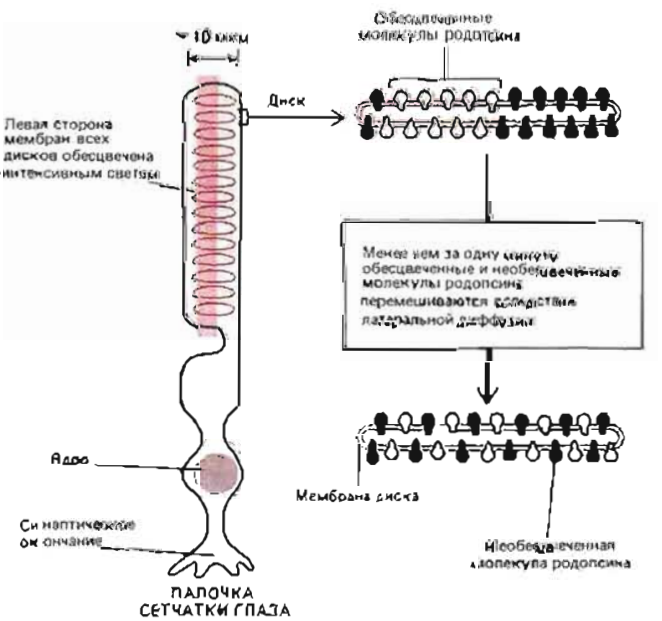


Рис. 6-41. Измерение скорости латеральной диффузии молекул родопсина в мембранах дисков палочки сетчатки. Молекулы родопсина обесцвечиваются на одной стороне клетки; затем измеряется скорость, с которой они диффундируют в необесцвеченную область.

ся из-за взаимодействия с другими макромолекулами, находящимися либо в самой мембране, либо в непосредственной близости от нее. С другой стороны, вполне вероятно, что лазерный луч большой интенсивности повреждает мембрану, и это приводит к аномально низким скоростям диффузии.

6.2.16. В клетках существуют способы уменьшения латеральной подвижности некоторых мембранных белков

Хотя осознание того, что биологические мембраны – это двумерные жидкости, является значительным шагом вперед в понимании их структуры и функции, представление о биологической мембране как липидном море, в котором свободно плавают белки, оказалось сильно упрощенным. Известно, что латеральная подвижность многих мембранных белков ограниченна. Например, в эпителиальных клетках, выстилающих поверхность разнообразных внутренних полостей организма, некоторые ферменты плазматической мембраны и транспортные белки располагаются только на апикальной поверхности клеток, тогда как другие – только на базальной или латеральной поверхности. Ограничение подвижности достигается с помощью барьеров, образованных при участии клеточных контактов особого рода (называемых *плотными контактами*; рис. 6-42 и т. 3, разд. 12.2.2). Тем не менее в своем большинстве эти белковые молекулы, видимо, способны свободно передвигаться в пределах соответствующих областей мембраны, в которых они заключены. Более сильное ограничение подвижности наблюдается в местах самих клеточных контактов, потому что специфические мембранные белки, участвующие в образовании этих контактов, как правило, вообще не способны к латеральной диффузии.

В принципе существует несколько возможных способов регуляции латеральной подвижности мембранных белков. Три из них показаны на рис. 6-43. Первый способ регуляции осуществляется в пурпурной мембране *Halobacterium*. В ней молекулы бактериородопсина собраны в большие двумерные кристаллы, в которых отдельные белковые молекулы фиксированы по отношению друг к другу. Крупные агрегаты такого типа диффундируют со столь малой скоростью, что их можно считать практически неподвижными (рис. 6-43, *А*). В других случаях подвижность белков плазматической мембраны ограничивается в результате взаимодействия с внеклеточными образованиями, например когда специфические белки плазматических мембран двух взаимодействующих клеток ассоциируют друг с другом, формируя специализированный клеточный контакт (рис. 6-43, *Б*). И наконец, как уже говорилось, движение и распределение молекул мембранных белков регулируются при их взаимодействии с белковыми комплексами цитоплазмы, такими, как актиновые филаменты (рис. 6-43, *В*). Именно этим способом спектрин связывает определенные белки плазматической мембраны эритроцитов (см. рис. 6-24). Детальный механизм этих предполагаемых взаимодействий между белками

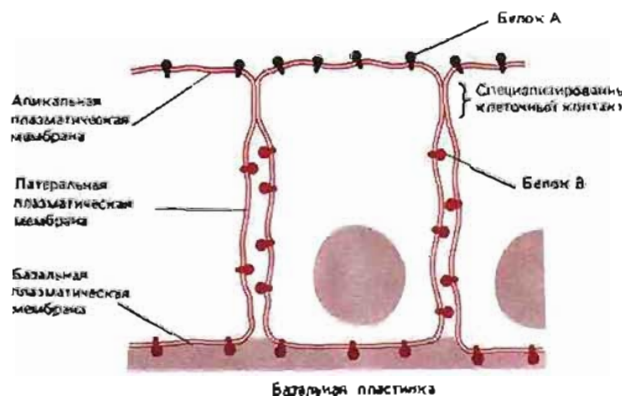


Рис. 6-42. Схематическое изображение клетки эпителия, показывающее, каким образом может ограничиваться область распределения различных белков в плазматической мембране. Белки А (в апикальной мембране) и В (в базальной и латеральной мембранах) способны латерально диффундировать только в пределах соответствующих областей мембраны, а проникнуть в другие участки им мешают специализированные клеточные контакты, называемые плотными контактами.

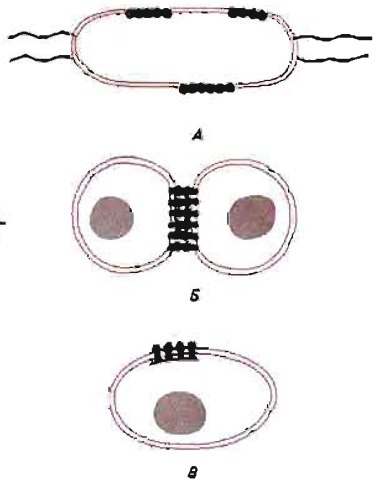


Рис. 6-43. Три способа ограничения латеральной подвижности белков плазматической мембраны. Белки могут ассоциировать в большие комплексы (как молекулы бактериородопсина в пурпурной мембране *Halobacterium*; *А*) или могут связываться с белками снаружи (*Б*) или внутри (*В*) клетки.

плазматической мембраны и различными элементами цитоплазмы в клетках, имеющих ядро, еще не известен, однако он служит предметом очень активного изучения.

Заключение

Липидный бислой определяет основные структурные особенности биологических мембран, тогда как белки ответственны за большинство мембранных функций. Они выступают в качестве специфических рецепторов и ферментов, а также осуществляют транспорт через мембрану различных веществ. Многие мембранные белки имеют гидрофобные поверхности и потому нерастворимы в водных растворах. Белки ассоциируют с липидным бислоем различными способами: одни из них пронизывают бислой насквозь в виде одиночной α-спирали, а другие находятся в более свернутой конформации, так что их полипептидные цепи пересекают бислой несколько раз. У белков второго типа, большинство из которых, по-видимому, представляет собой транспортные белки, значительная часть полипептидной цепи упакована в пределах липидного бислоя: поэтому на электронных микрофотографиях препаратов, полученных методом замораживания – скалывания, их можно видеть как отдельные внутримембранные частицы. Существуют также мембранные белки, которые не пронизывают бислой насквозь, а контактируют с водным окружением только с одной стороны мембраны. Они, вероятно, связаны с мембраной посредством ковалентно присоединенных к ним цепей жирных кислот или при помощи нековалентных взаимодействий с трансмембранными белками.

Многие мембранные белки так же, как и липидные молекулы, способны свободно перемещаться в плоскости мембраны. Одним из наглядных доказательств такой подвижности служит образование кластеров, происходящее при сшивании мембранных белков поливалентными лигандами, например антителами или лектинами. В некоторых клетках такие кластеры активно собираются вместе на одном полюсе клетки, формируя здесь «колпачок». Однако клетки могут и ограничивать латеральную подвижность мембранных белков. Такое ограничение подвижности наблюдается, например, при связывании определенных белков с другими макромолекулами на наружной или внутренней (цитоплазматической) поверхности мембраны.

6.3. Мембранные углеводы

На поверхности всех эукариотических клеток имеются углеводы. Они представлены главным образом в виде олигосахаридных боковых цепей, ковалентно присоединенных к мембранным белкам (гликопротеины) и в меньшей степени к липидам (гликолипиды). Подавляющая часть белков плазматической мембраны, выступающих на поверхности клеток, по-видимому, связана с остатками сахаров. В то же время из десяти липидных молекул в наружном монослое большинства плазматических мембран с углеводами оказывается связанной менее чем одна молекула. Следует учесть также, что молекула гликопротеина может иметь много олигосахаридных боковых цепей, а молекула гликолипида содержит лишь одну такую цепь. В целом содержание углеводов в плазматических мембранах варьирует от 2 до 10% (по весу).

6.3.1. Углеводы в биологических мембранах располагаются только на поверхности, не контактирующей с цитоплазмой [21]

Как мы уже знаем, биологические мембраны чрезвычайно асимметричны: наружный и внутренний монослои различаются как по липидному составу (по крайней мере в плазматической мембране), так и по белковому. Еще более выраженная асимметрия наблюдается в распределении углеводов: олигосахаридные боковые цепи гликолипидов и гликопротеинов во внутренних и

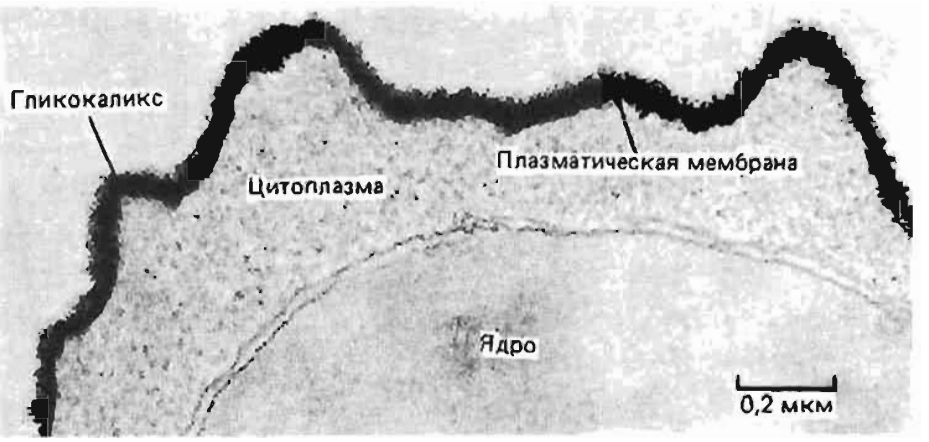


Рис. 6-44. Электронная микрофотография поверхности лимфоцита, окрашенного рутениевым красным с целью получить контрастное изображение клеточной оболочки (гликокаликса). (С любезного разрешения A. M. Glauert и G. M. W. Cook.)

в плазматических мембранах локализованы исключительно на той стороне мембраны, которая не контактирует с цитоплазмой. В плазматических мембранах все остатки сахаров выступают на внешнюю поверхность клетки, а во внутренних мембранах они обращены внутрь ограниченного мембраной компартмента.

Термин **клеточная оболочка**, или **гликокаликс**, часто используется для обозначения обогащенной углеводами периферической зоны на поверхности большинства эукариотических клеток. При использовании различных красителей, например рутениевого красного, эту зону можно отчетливо видеть в электронный микроскоп (рис. 6-44). Углеводы, встречающиеся в мембранах, представляют собой олигосахаридные боковые цепи связанных с плазматической мембраной гликолипидов и гликопротеинов. Кроме того, они часто входят в состав гликолипидов и протеогликанов, которые секретируются клетками и затем адсорбируются на клеточной поверхности (рис. 6-45). (Протеогликаны состоят из большого числа полисахаридных цепей, присоединенных к белковому кору; т. 3, разд. 12.3.7). Некоторые из таких адсорбированных макромолекул являются компонентами внеклеточного матрикса, так что вопрос о том, где кончается плазматическая мембрана и где начинается внеклеточный матрикс, можно считать чисто семантическим. Хотя высокая концентрация углеводов на клеточной поверхности должна оказывать существенное влияние на многие функции плазматической мембраны, природа этого влияния еще не известна.

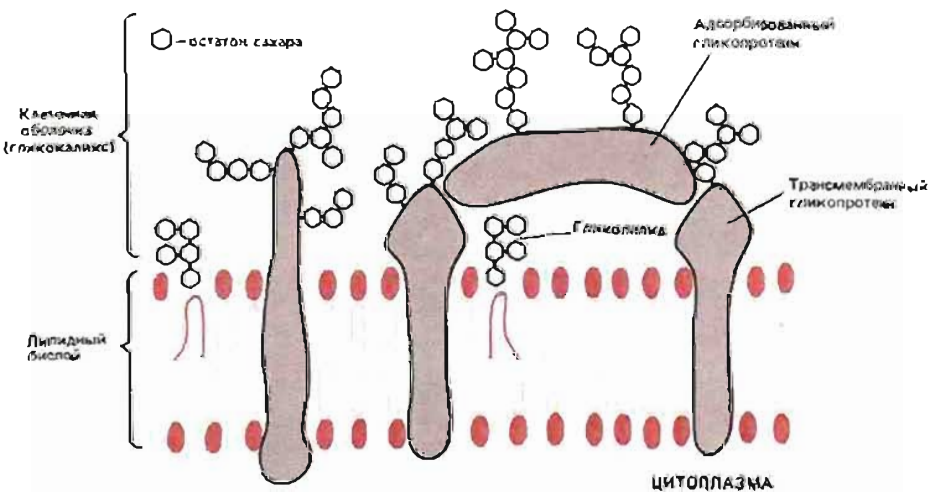


Рис. 6-45. Схематическое изображение клеточной оболочки (гликокаликса), состоящей из боковых олигосахаридных цепей мембранных гликолипидов и гликопротеинов, а также из адсорбированных гликопротеинов и протеогликанов. Адсорбированные протеогликаны не показаны. Обратите внимание, что все углеводы располагаются на наружной стороне мембраны.

6.3.2. Предполагается, что углеводы, расположенные на клеточной поверхности, играют важную роль во взаимодействии между клетками, но это трудно доказать [22]

Из более чем 100 существующих в природе различных моносахаридов в мембранных гликопротеинах и гликолипидах встречаются только девять; главные из них – галактоза, манноза, фукоза, галактозамин, глюкозамин, глюкоза и сиаловая кислота. Остатки сиаловой кислоты находятся обычно на концах углеводных боковых цепей, и в основном именно они ответственны за общий отрицательный заряд клеточной поверхности, характерный для всех эукариотических клеток. Боковые олигосахаридные цепи гликопротеинов и гликолипидов могут быть достаточно сложными. Хотя обычно эти цепи содержат менее 15 остатков сахаров, в них часто встречаются разветвления, причем сахара связываются друг с другом множеством различных способов. В принципе даже из трех сахарных остатков можно образовать более 1000 различных трисахаридов. До сих пор еще технически очень трудно определить последовательность сложных олигосахаридных боковых цепей в мембранных белках или липидах, поэтому детали структур олигосахаридов во многих случаях не известны.

Функция углеводных цепей в мембранных гликолипидах и гликопротеинах не ясна. Можно предположить, что определенным трансмембранным белкам эти цепи помогают «заякориваться» и правильно ориентироваться в мембране, предотвращая таким образом отрыв белков от мембраны, их соскальзывание в цитозоль или перескок с одной стороны бислоя на другую. Углеводы могут играть также какую-то роль в стабилизации пространственной структуры гликопротеина. Кроме того, не исключено, что они принимают участие в транспорте мембранных гликопротеинов, направляя их к соответствующему месту назначения в клетке или на ее поверхности, подобно тому как специальные углеводные цепи лизосомных белков направляют эти растворимые гликопротеины к лизосомам (разд. 7.5.6). Однако на этом возможные функции углеводов, входящих в состав мембранных гликопротеинов, по-видимому, не исчерпываются. Об этом свидетельствуют следующие данные: если клетки обработать антибиотиком, ингибирующим гликозилирование многих мембранных белков (*туникамицин*, см. рис. 7-63), то некоторые из таких не связанных с углеводами белков нормально включаются в плазматическую мембрану и при этом, очевидно, оказываются правильно ориентированными и стабильными. Более того, такие предполагаемые функции углеводов, как ориентация, «заякоривание», стабилизация и транспорт белков, не могут объяснить ни наличия углеводов в молекулах гликолипидов, ни сложности ряда углеводных цепей в гликопротеинах.

Сложность некоторых олигосахаридов, входящих в состав гликопротеинов и гликолипидов плазматической мембраны, а также то, что углеводы располагаются только на поверхности клетки, свидетельствуют о важной роли углеводов в тонких процессах межклеточного узнавания. У некоторых клеток на поверхности имеются белки, связывающие определенные олигосахариды; можно предположить, что подобные лектины способны узнавать олигосахариды на поверхности других клеток и таким образом участвовать в управлении межклеточными взаимодействиями. Хотя такого рода взаимодействия описаны у растений, трудно доказать, что на поверхности животных клеток углеводы функционируют аналогичным образом. Тем не менее число косвенных данных в пользу этого положения увеличивается.

Заключение

В плазматических мембранах всех эукариотических клеток большинство белков, расположенных на поверхности клетки, а также некоторые липидные молекулы наружного липидного монослоя ковалентно связаны с олигосахаридны-

ми цепями. Эти углеводные цепи могут быть достаточно сложными, и во многих случаях их точные последовательности не установлены. Хотя функция этих углеводов еще не известна, кажется вероятным, что по крайней мере некоторые из олигосахаридных цепей принимают участие в процессах межклеточного узнавания.

6.4. Транспорт через мембрану малых молекул

Поскольку внутренняя часть липидного бислоя гидрофобна, он представляет собой практически непроницаемый барьер для большинства полярных молекул. Благодаря такому барьеру предотвращается утечка водорастворимого содержимого клеток. Однако из-за наличия подобного барьера клетки оказались вынужденными создать специальные пути для переноса полярных молекул через свои мембраны. Например, клетки должны получать необходимые питательные вещества и выделять вредные продукты метаболизма. Кроме того, клеткам надо регулировать внутриклеточные концентрации ионов, что подразумевает возможность транспорта определенных ионов в клетку или из клетки. Перенос малых молекул через липидный бислой осуществляется с помощью особых трансмембранных белков, каждый из которых отвечает за транспортировку определенной молекулы или группы родственных молекул. В клетках существуют также способы переноса через плазматические мембраны макромолекул (например, белков) и даже крупных частиц, однако механизмы такого переноса сильно отличаются от механизмов, используемых для транспорта малых молекул, и потому будут обсуждаться в другом разделе.

Из этого раздела мы узнаем, что избирательная проницаемость биологических мембран по отношению к простым ионам создает значительные различия в ионном составе внутреннего содержимого клетки и внеклеточной жидкости (табл. 6-2). Это позволяет клеточным мембранам запасать потенциальную энергию в виде градиентов концентраций ионов. Трансмембранные ионные градиенты используются при синтезе АТР, для осуществления различных транспортных процессов и для передачи электрических сигналов. Перед тем как приступить к обсуждению свойств специфических транспортных белков и ионных градиентов, создаваемых некоторыми из этих белков, необходимо кое-что узнать о проницаемости липидного бислоя, не содержащего белков.

Таблица 6-2. Сравнение концентраций ионов внутри и снаружи типичной клетки млекопитающего

Ион	Внутриклеточная концентрация, мМ	Внеклеточная концентрация, мМ
Катионы		
Na^+	5 – 15	145
K^+	140	5
Mg^{2+}	30	1–2
Ca^{2+}	1–2 (в свободном состоянии $\leqslant 10^{-7}$ М)	2,5–5
H^+	$4 \cdot 10^{-5}$ ($10^{-7,4}$ М или pH 7,4)	$4 \cdot 10^{-5}$ ($10^{-7,4}$ М или pH 7,4)
Анионы [1]		
Cl^-	4	110

[1] Поскольку клетка должна содержать равное число положительных и отрицательных зарядов (т.е. быть электрически нейтральной), значительный дефицит внутриклеточных анионов отражает тот факт, что большинство клеточных компонентов заряжено отрицательно (HCO_3^-, PO_4^{3-}, белки, нуклеиновые кислоты, метаболиты, несущие фосфатную или карбоксильную группу, и т.д.)

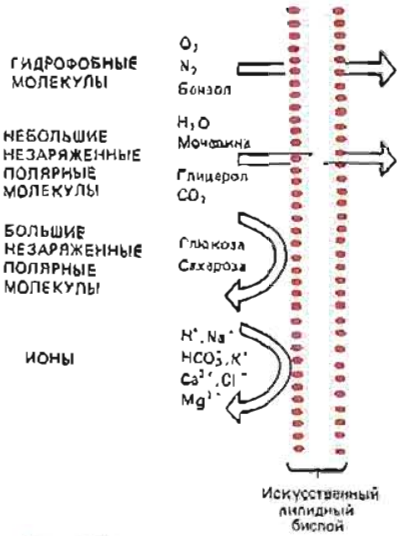


Рис. 6-46. Относительная проницаемость искусственного липидного бислоя для различных классов молекул.

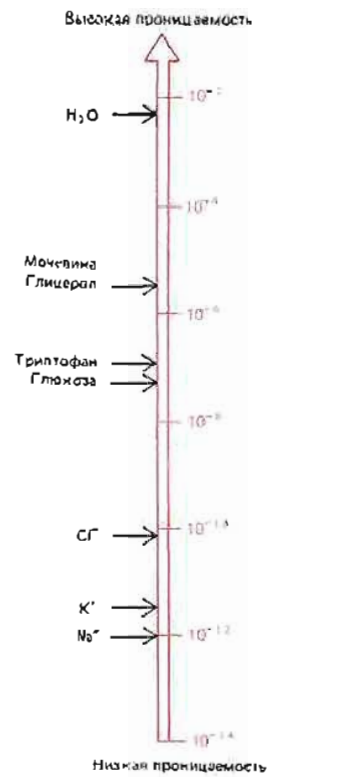


Рис. 6-47. Коэффициенты проницаемости (см/с) искусственного липидного бислоя для различных молекул.

6.4.1. Липидные бислои, не содержащие белков, не проницаемы для ионов, но свободно пропускают воду [23]

В принципе любая молекула за достаточно длительное время пройдет путем диффузии через лишенный белков липидный бислой по градиенту ее концентрации. Однако скорости, с которыми различные молекулы диффундируют через такой бислой, очень сильно варьируют в зависимости главным образом от размера молекулы и ее относительной растворимости в жирах. В общем случае, чем меньше молекула и чем более она «жирорастворима» (т.е. более гидрофобна или неполярна), тем быстрее она будет диффундировать через бислой. *Малые неполярные* молекулы легко растворяются в липидных бислоях и вследствие этого быстро диффундируют через них. *Незаряженные полярные* молекулы также диффундируют с большой скоростью, если они достаточно малы. Например, CO_2 (44 дальтона), этанол (46 дальтон) и мочевина (60 дальтон) проходят через бислой быстро, глицерол (92 дальтона) – медленнее, а глюкоза едва ли вообще способна пройти сквозь бислой (рис. 6-46). Весьма важно, что вода (18 дальтон) диффундирует через липидный бислой очень быстро, несмотря на то что молекулы воды относительно нерастворимы в жирах. Большая скорость диффузии воды отчасти объясняется тем, что ее молекулы малы и не заряжены; кроме того, биполярная структура водных молекул, вероятно, позволяет им необычайно быстро проходить участки бислоя, содержащие липидные головы. Напротив, для всех *заряженных* молекул (ионов) независимо от их размера липидные бислои оказываются в значительной степени непроницаемыми: заряд и высокая степень гидратации таких молекул препятствуют их прохождению через углеводородный участок бислоя. Вот почему искусственные бислои в 10^9 раз более проницаемы для воды, чем даже для таких небольших ионов, как Na^+ или K^+ (рис. 6-47).

6.4.2. Связанные с мембранами транспортные белки переносят через клеточные мембраны определенные молекулы малых размеров [24]

Клеточные мебраны так же, как и искусственные липидные бислои, способны пропускать воду и неполярные молекулы путем простой физической диффузии. Однако клеточные мембраны проницаемы и для различных полярных молекул, таких, как ионы, сахара, аминокислоты, нуклеотиды и многие другие метаболиты, которые проходят через искусственные бислои чрезвычайно медленно. Теперь известно, что за перенос подобных растворенных веществ через клеточные мембраны ответственны специфические белки, называемые **мембранными транспортными белками**. Они обнаруживаются во всех типах биологических мембран и могут сильно отличаться друг от друга. Каждый конкретный белок предназначен для транспорта химических веществ определенного класса (например, ионов, сахаров или аминокислот), а нередко лишь какой-то разновидности молекул из этого класса. Специфичность транспортных белков была впервые показана, когда обнаружилось, что мутации в одном-единственном гене приводят к исчезновению у бактерий способности транспортировать определенные сахара через их плазматические мембраны. Аналогичные мутации известны теперь и у людей, страдающих различными наследственными болезнями, при которых нарушается транспорт тех или иных веществ в почках или в кишечнике.

Некоторые транспортные белки просто переносят какое-либо растворенное вещество с одной стороны мембраны на другую. Такой простой перенос называется **уникортом**. Другие белки функционируют как котранспортные системы, в которых перенос одного растворенного вещества зависит от одновременного или последовательного переноса другого вещества либо в том же направлении (**симпорт**), либо в противоположном (**антипорт**) (рис. 6-48). Например, транспортировка сахаров внутрь многих бактерий происходит посредством направленного в клетку симпорта протонов и молекул сахаров,

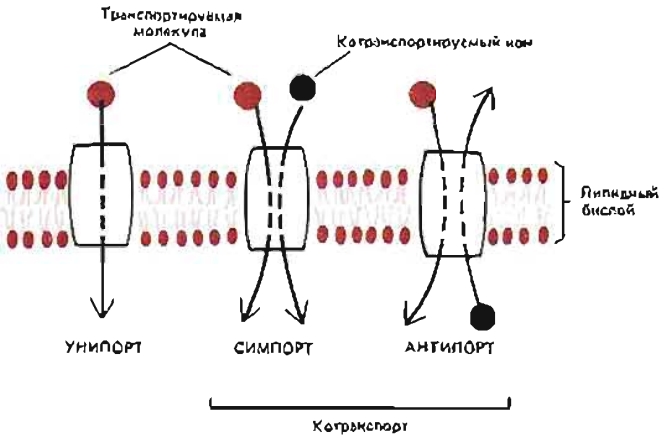


Рис. 6-48. Схема работы транспортных белков, функционирующих по принципу унипорта, симпорта и антипорта.

тогда как $(Na^+ + K^+)$-насос в эукариотических плазматических мембранах работает по принципу антипорта, качая Na^+ из клетки, а K^+ внутрь клетки.

Многие мембранные транспортные белки позволяют тем или иным растворенным веществам проходить через липидный бислой посредством так называемого **пассивного транспорта**. Если молекула транспортируемого вещества не имеет заряда, то направление пассивного транспорта определяется только разностью концентраций этого вещества по обеим сторонам мембраны (*градиентом концентрации*). Однако если молекула заряжена, то на ее транспорт влияют как градиент концентрации, так и общий электрический градиент через мембрану (*мембранный потенциал*). Оба градиента вместе составляют **электрохимический градиент**. Фактически в любой плазматической мембране существует градиент электрического поля, при этом внутренняя сторона мембраны обычно заряжена отрицательно по отношению к наружной. Такой потенциал облегчает проникновение в клетку положительно заряженных ионов, но препятствует проникновению ионов, заряженных отрицательно.

Некоторые транспортные белки, осуществляющие пассивный транспорт, формируют *каналы*, которые позволяют растворенным молекулам, имеющим соответствующие размер и заряд, проходить бислой за счет простой диффузии. Такие белки называются **каналообразующими** или **туннельными**. Другие

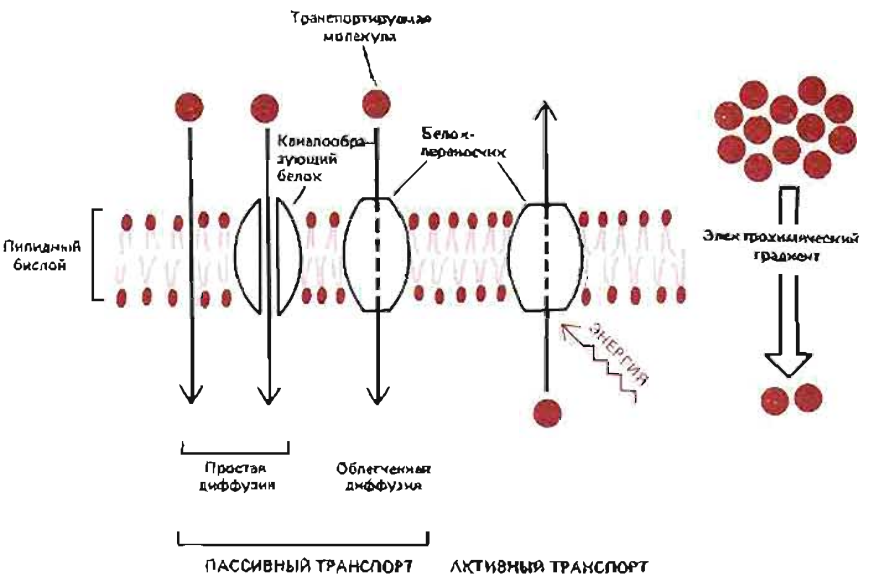


Рис. 6-49. Схема пассивного транспорта по электрохимическому градиенту и активного транспорта против электрохимического градиента. Пассивный транспорт, происходящий либо путем простой диффузии, либо посредством облегченной диффузии, осуществляется самопроизвольно; для активного же транспорта необходимо подведение метаболической энергии. Малые незаряженные молекулы могут прямо проходить через липидный бислой, тогда как перенос заряженных молекул (в том числе и всех небольших ионов) идет с значительной скоростью только при участии каналообразующих белков или белков-переносчиков.

белки связывают молекулу транспортируемого вещества и переносят ее через мембрану. Они называются **белками-переносчиками** (или просто переносчиками либо транспортерами), а весь процесс – *облегченной диффузией*. Некоторые белки-переносчики работают как насосы, перекачивающие растворенные вещества против их электрохимических градиентов посредством так называемого **активного транспорта**. В отличие от пассивного транспорта, который может идти самопроизвольно, активный транспорт обязательно должен быть связан с источником метаболической энергии (рис. 6-49). Чаще всего таким источником служит гидролиз ATP, осуществляемый белками-переносчиками, или котранспорт ионов Na^+ или H^+ по их электрохимическим градиентам.

6.4.3. Транспортные белки формируют в липидном бислое сквозные проходы [25]

Все мембранные транспортные белки, которые изучены настолько детально, что их ориентация в мембране точно установлена, либо проходят липидный бислой насквозь, либо по крайней мере составляют часть более крупной по размерам структуры, пронизывающей бислой. Более того, эти белки в пределах липидного бислоя имеют достаточно большую массу, для того чтобы их можно было легко различить как внутримембранные частицы на электронных микрофотографиях образцов, полученных методом замораживания – скалывания. Поскольку транспортные белки формируют сквозные проходы через мембрану, специфические вещества, перенос которых эти белки осуществляют, непосредственно не контактируют с гидрофобной внутренней частью липидного бислоя.

Прогресс в понимании тонкой структуры и функции транспортных белков идет медленно, что в значительной степени связано с трудностью их выделения в солюбилизированной форме. В настоящее время известны полные аминокислотные последовательности многих сотен растворимых белков, тогда как первая последовательность трансмембранного транспортного белка (бактериородопсина) была определена лишь недавно. Более того, ни один из белков, осуществляющих транспорт через мембрану, не был получен в виде кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа. Тем не менее некоторые транспортные белки удалось очистить и в ряде случаев встроить в искусственный бислой, а затем восстановить их транспортную функцию. Особый случай транспортного белка представляет бактериородопсин. Организация его молекул в виде двумерного кристалла в пурпурной мембране *Halobacterium* (где бактериородопсин работает как фотоактивируемый H^+-насос) позволила определить многие детали его трехмерной структуры *in situ* без выделения и кристаллизации этого белка (разд. 6.2.7).

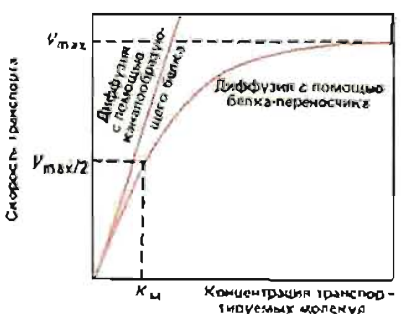


Рис. 6-50. Кинетика диффузии с помощью каналообразующего белка и кинетика диффузии при участии белка-переносчика. В первом случае скорость всегда пропорциональна концентрации транспортируемого вещества, а во втором скорость достигает максимального значения V_{max} при насыщении белка-переносчика. Концентрация, при которой скорость составляет половину максимального значения, принимается равной константе связывания K_M молекул транспортируемого вещества данным переносчиком.

6.4.4. Белки-переносчики действуют как связанные с мембраной ферменты [24]

Белки-переносчики специфически связывают и транспортируют растворенные молекулы через липидный бислой. Этот процесс напоминает ферментативную реакцию, а транспортные белки выступают как особые, связанные с мембраной ферменты. В белках-переносчиках всех типов имеются участки связывания для транспортируемой молекулы (субстрата). Когда белок насыщен (т. е. когда все участки связывания заняты), скорость транспорта максимальна. Эта скорость, обозначаемая V_{max}, является характеристикой данного белка-переносчика. Кроме того, каждый белок-переносчик имеет характерную для него константу связывания K_M, равную концентрации транспортируемого вещества, при которой скорость транспорта составляет половину ее максимальной величины (рис. 6-50). Связывание молекул транспортируемого вещества специфически блокируется конкурентными ингибиторами (которые конкурируют за тот же самый участок связывания и могут или не могут переноситься данным белком) или неконкурентными ингибиторами (которые связываются

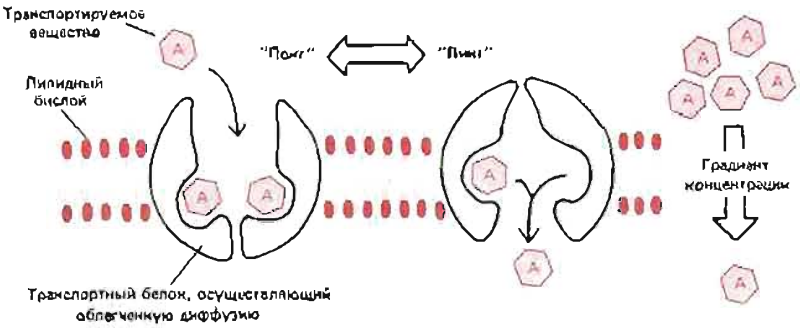


Рис. 6-51. Схема, показывающая, как конформационные изменения в белке-переносчике могли бы обеспечить облегченную диффузию незаряженного растворенного вещества А. Белок может существовать в двух различных конформационных состояниях: в состоянии 1 («понг») участки связывания для А открыты с наружной стороны бислоя; в состоянии 2 («пинг») те же участки оказываются открытыми с другой стороны. Хотя этот процесс полностью обратим, при более высокой концентрации А с наружной стороны бислоя с белком-переносчиком будет связываться большее число молекул А в состоянии 1, что приведет к транспорту вещества А по градиенту его концентрации.

с каким-либо другим участком белка и специфически изменяют структуру последнего). Аналогия с ферментативной реакцией, однако, не является полной, так как молекула транспортируемого вещества обычно не претерпевает ковалентной модификации при взаимодействии с белком-переносчиком.

Хотя молекулярные детали работы белков-переносчиков не известны, представляется маловероятным, чтобы процесс их функционирования включал в себя перескакивание белка из одного монослоя в другой или перемещение его взад-вперед через липидный бислой. Более вероятно, что это трансмембранные белки, которые претерпевают обратимые конформационные изменения при переносе молекул через бислой. Схематическая модель того, как мог бы осуществляться такой перенос при облегченной диффузии, показана на рис. 6-51.

Требуется лишь сравнительно небольшая модификация подобной модели, чтобы связать белок-переносчик с источником энергии, например гидролизом ATP (см. рис. 6-54) или ионным градиентом. Примером белка-переносчика, использующего энергию гидролиза ATP для перекачивания ионов, служит $(Na^+ + K^+)$-*насос*, играющий решающую роль в образовании мембранного потенциала на плазматических мембранах животных клеток.

6.4.5. Мембранный потенциал, существующий на плазматической мембране, поддерживается с помощью $(Na^+ + K^+)$-насоса [26]

Ионная природа мембранного потенциала была впервые установлена в исследованиях, проведенных на гигантском аксоне кальмара – нервном отростке настолько больших размеров (1 мм в диаметре), что в него легко входит специальная канюля (небольшая трубочка), позволяющая заменить цитоплазму определенным солевым раствором. Это дает возможность регулировать концентрацию ионов по обеим сторонам плазматической мембраны. В результате удалось показать, что 1) мембранный потенциал в значительной степени определяется градиентом концентрации ионов K^+ и 2) покоящаяся плазматическая мембрана более проницаема для ионов K^+ по сравнению с ионами Na^+ или анионами. Градиент ионов K^+ и различия в ионной проницаемости в свою очередь зависят от свойств специфических транспортных белков в самой плазматической мембране.

В генерации и поддерживании мембранного потенциала основную роль играют два транспортных белка (рис. 6-52). Первый из них – это $(Na^+ + K^+)$-насос, активно качающий Na^+ из клетки, а K^+ в клетку. В результате концентрация ионов K^+ становится внутри клетки выше, чем снаружи, а концентрация ионов Na^+ – наоборот. Второй белок служит каналом утечки K^+, позволяющим ионам K^+ выходить из клетки по градиенту их концентрации. Вследствие утечки ионов K^+ содержимое клетки становится отрицательно заряженным по отношению к ее наружной поверхности. Возникающий при этом мембранный потенциал препятствует движению ионов K^+ наружу через каналы утечки K^+, и при значении потенциала -75 мВ стремление ионов K^+ выйти из клетки, обусловленное градиентом концентрации, полностью компенсируется стремлением этих ионов войти в клетку из-за наличия элек-

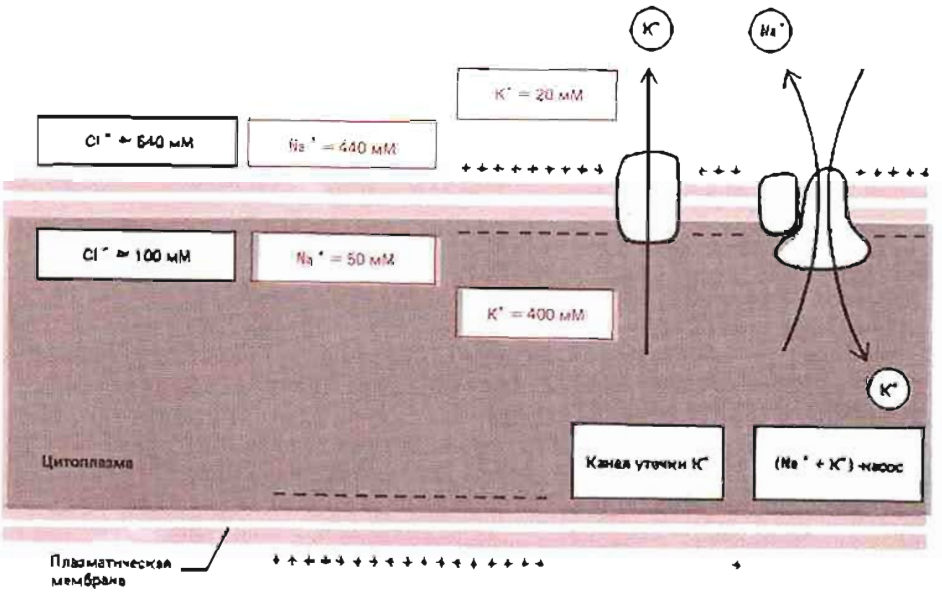


Рис. 6-52. Возникновение мембранного потенциала в аксоне кальмара. $(Na^+ + K^+)$-насос генерирует направленные в противоположные стороны градиенты концентраций Na^+ и K^+. Наличие каналов утечки K^+ делает мембрану значительно более проницаемой для K^+, чем для Na^+ или анионов. В результате K^+ вытекает из клетки по градиенту своей концентрации, при этом внутренность клетки (цитоплазма) становится отрицательно заряженной по отношению к внешней среде (внеклеточному пространству). Остальные катионы и анионы (помимо рассмотренных Na^+, K^+ и Cl^-) присутствуют в таких количествах, что общая концентрация положительных ионов точно скомпенсирована общей концентрацией отрицательных ионов во всех точках, кроме слоя, прилегающего к плазматической мембране.

трического градиента (мембранного потенциала). В этой равновесной точке электрохимический градиент ионов K^+ исчезает и, как следствие, прекращается поток ионов K^+ через мембрану: сколько ионов K^+ входит в аксон, столько и выходит.

Поскольку канал утечки K^+ слегка проницаем и для ионов Na^+, некоторое количество этих ионов медленно поступает в клетку по своему электрохимическому градиенту. В результате этого потока содержимое клетки становится менее электроотрицательным по отношению к ее наружной поверхности, вследствие чего мембранный потенциал уменьшается и тем самым облегчается выход из клетки ионов K^+. Это могло бы в конце концов привести к выравниванию концентраций ионов Na^+ и K^+ с обеих сторон мембраны и к исчезновению мембранного потенциала, если бы не $(Na^+ + K^+)$-насос, который поддерживает градиенты концентраций этих ионов по обе стороны мембраны, качая Na^+ наружу, а K^+ внутрь клетки.

Подобные принципы генерации мембранного потенциала действуют не только в нейроне кальмара, но и в других клетках (его величина может варьировать от -20 до -200 мВ в зависимости от вида организма и типа клетки). Однако проницаемость плазматической мембраны для разных ионов может быть различной. Например, плазматические мембраны многих клеток проницаемы для ионов Cl^-, вследствие чего Cl^- в таких клетках вносит важный вклад в мембранный потенциал.

6.4.6. Повсеместно встречающийся в плазматической мембране $(Na^+ + K^+)$-насос – это АТР-аза [27]

Натриево-калиевые насосы, имеющиеся в плазматических мембранах всех животных клеток, работают по принципу антипорта, активно качая Na^+ из клетки, а K^+ в клетку против градиентов концентраций (в случае же ионов Na^+ и против электрического градиента). Градиенты концентраций ионов Na^+ и K^+, поддерживаемые натриево-калиевым насосом, ответственны не только за мембранный потенциал клетки, но и за регуляцию клеточного объема, а также за активный транспорт сахаров и аминокислот (см. ниже). Вот почему нельзя считать неожиданным тот факт, что на обеспечение работы этого насоса затрачивается более трети необходимой животной клетке энергии. В электрически активных нервных клетках, которые после деполяризации должны регулярно восстанавливать свои мембранные потенциалы, эта величина приближается к 70%.

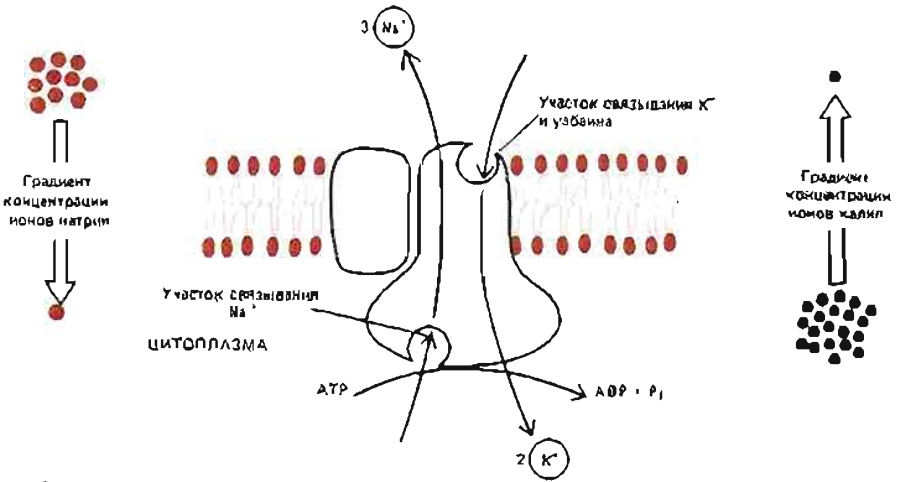


Рис. 6-53. Схематическое изображение $(Na^+ + K^+)$-АТР-азы, активно качающей Na^+ наружу, а K^+ внутрь клетки против их градиентов концентрации. При гидролизе каждой молекулы АТР три иона Na^+ выкачиваются из клетки и два иона K^+ накачиваются в клетку. Обратите внимание, что ионы K^+ и уабаин конкурируют за связывание с одним и тем же участком на внешней стороне АТР-азы. Хотя $(Na^+ + K^+)$-АТР-аза изображена в виде димера, возможно, что в мембране она существует по крайней мере как тетрамер, состоящий из двух малых и двух больших субъединиц.

Значительный шаг вперед в понимании молекулярного механизма натриево-калиевого насоса был сделан в 1957 г., когда обнаружилось, что для оптимальной активности фермента, гидролизующего АТР до ADP и фосфата, требуются Na^+ и K^+. Кроме того, было показано, что известный ингибитор $(Na^+ + K^+)$-насоса *уабаин* ингибирует также и АТР-азу. Таким образом, была установлена связь между $(Na^+ + K^+)$-АТР-азой и $(Na^+ + K^+)$-насосом. Однако главное доказательство того, что именно гидролиз АТР обеспечивает насос необходимой для его работы энергией, было получено при изучении замкнутых теней эритроцитов. В этих опытах концентрации ионов, АТР и ингибиторов с каждой стороны мембраны можно было варьировать и наблюдать, как эти изменения влияют на транспорт ионов и гидролиз АТР. Было обнаружено, что 1) транспорт ионов Na^+ и K^+ и гидролиз АТР тесно связаны между собой, так что ни один из этих процессов не может осуществляться без другого; 2) транспорт ионов и гидролиз АТР происходят лишь в том случае, когда Na^+ и АТР присутствуют внутри теней, а K^+ – снаружи; 3) уабаин ингибирует АТР-азу, только находясь с внешней стороны теней, где он конкурирует за K^+-связывающий участок; 4) при гидролизе каждой молекулы АТР (одна молекула АТР-азы может гидролизовать 100 молекул АТР в 1 с) три иона Na^+ выкачиваются наружу и два иона K^+ накачиваются внутрь (рис. 6-53).

Эти эксперименты неопровержимо доказывали, что АТР поставляет энергию для перекачивания ионов Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану; тем не менее оставалось непонятным, как именно гидролиз АТР связан с транспортом ионов. Дальнейшие исследования показали, что концевая фосфатная группа АТР в присутствии Na^+ переносится на остаток аспарагиновой кислоты в молекуле АТР-азы. Связавшаяся с АТР-азой фосфатная группа затем гидролизуется в присутствии K^+, и именно этот последний этап ингибируется уабаином. Na^+-зависимое фосфорилирование, вероятно, изменяет конформацию АТР-азы, что каким-то образом приводит к выведению Na^+ из клетки. Наоборот, K^+-зависимое дефосфорилирование обусловливает транспорт K^+ внутрь клетки и возвращение АТР-азы в первоначальное состояние (рис. 6-54). В принципе $(Na^+ + K^+)$-насос в тенях эритроцитов можно заставить работать и в противоположном направлении: если градиенты концентраций Na^+ и K^+ увеличить до такой степени, что насос уже не сможет с ними справиться, то ионы будут проходить через мембрану по градиентам их концентраций, а внутри теней из фосфата и ADP будет синтезироваться АТР. Это наводит на мысль, что фосфорилированная форма АТР-азы имеет сильно напряженную конформацию и может релаксироваться, отдавая необходимую энергию (и фосфат) либо для накачивания K^+ внутрь теней, либо (когда градиенты концентраций Na^+ и K^+ очень высоки) для синтеза АТР (т. 1, разд. 3.4.10).

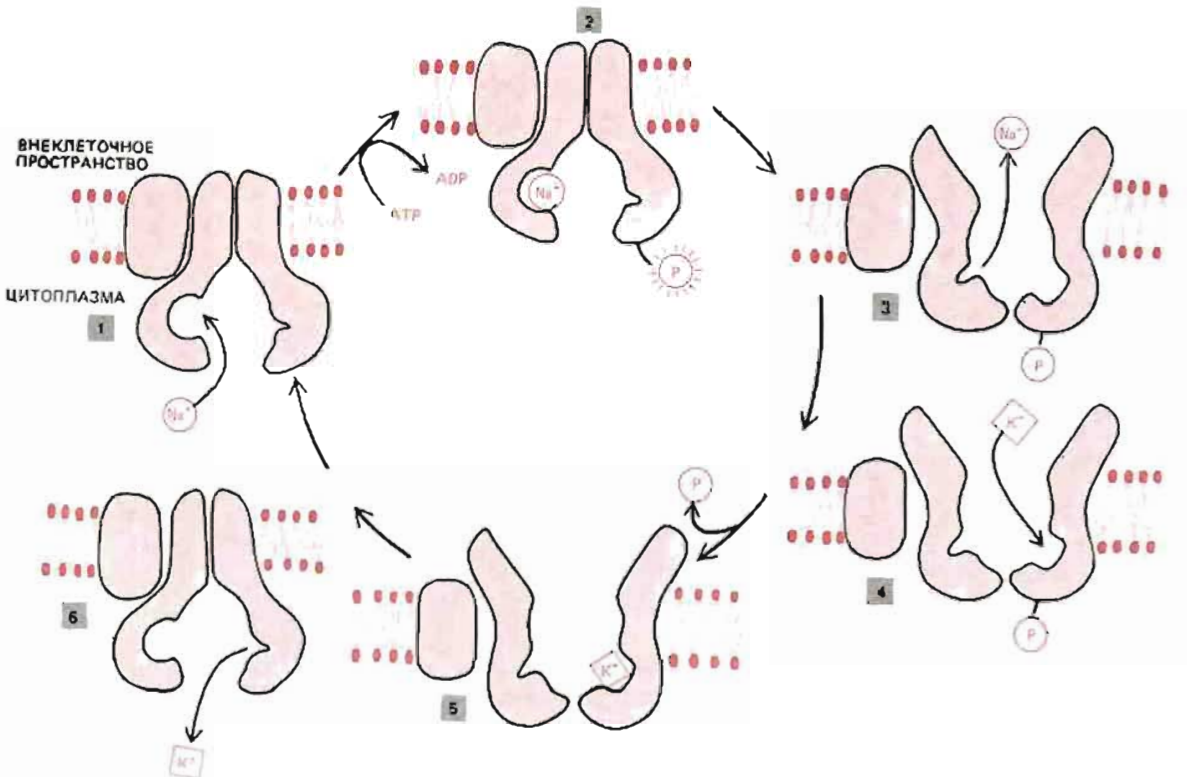


Рис. 6-54. Модель функционирования ($Na^+ + K^+$)-АТР-азы. Связывание Na^+ (1) в последующее фосфорилирование (2) АТР-азы со стороны цитоплазмы индуцируют в белке конформационные изменения, в результате которых Na^+ переносится через мембрану и высвобождается в межклеточное пространство (3). Затем связывание K^+ на внешней поверхности (4) и последующее дефосфорилирование (5) возвращают белок в первоначальную конформацию; при этом K^+ проходит через мембрану и высвобождается в цитоплазму (6). Эти конформационные изменения аналогичны переходам типа «пинг-понг», изображенным на рис. 6-51, за исключением того, что здесь переходы индуцируются фосфорилированием и дефосфорилированием белка, вследствие чего он совершает полезную работу.

После того как ($Na^+ + K^+$)-АТР-аза была получена в чистом виде, выяснилось, что она состоит из двух субъединиц – трансмембранной субъединицы, обладающей каталитической активностью (~ 100 000 дальтон), и ассоциированного с ней гликопротеина (~ 45 000 дальтон). Первая субъединица имеет участки связывания для Na^+ и АТР на цитоплазматической поверхности, а для K^+ и уабаина на наружной. Кроме того, она обратимо фосфорилируется и дефосфорилируется. Функция гликопротеина неизвестна. Работающий ($Na^+ + K^+$)-насос можно воссоздать из очищенной АТР-азы следующим образом: АТР-азу солюбилизируют в детергенте, подвергают очистке и смешивают с соответствующими фосфолипидами. После удаления детергента посредством диализа образуются мембранные пузырьки, которые в присутствии АТР и Mg^{2+} качают Na^+ и K^+ в противоположных направлениях (рис. 6-55).

6.4.7. ($Na^+ + K^+$)-АТР-аза помогает регулировать объем клетки, контролируя внутриклеточные концентрации растворенных веществ [28]

Поскольку ($Na^+ + K^+$)-АТР-аза выкачивает из клетки три иона Na^+ на каждые два иона K^+, накачанных внутрь, она оказывается «электрогенной», т.е. генерирует электрический потенциал на плазматической мембране, сообщая внутренней части клетки отрицательный заряд по отношению к ее наружной поверхности. Таким путем ($Na^+ + K^+$)-АТР-аза вносит небольшой (~ 20%) прямой вклад в мембранный потенциал. Однако, как мы видели, основная часть мембранного потенциала (~ 80%) обусловлена градиентами концентраций K^+ и Na^+, которые поддерживаются ($Na^+ + K^+$)-АТР-азой, а также более высокой проницаемостью плазматической мембраны для K^+, чем для Na^+ или анионов.

($Na^+ + K^+$)-АТР-аза помогает также регулировать объем клетки, так как она контролирует внутриклеточные концентрации растворенных веществ,

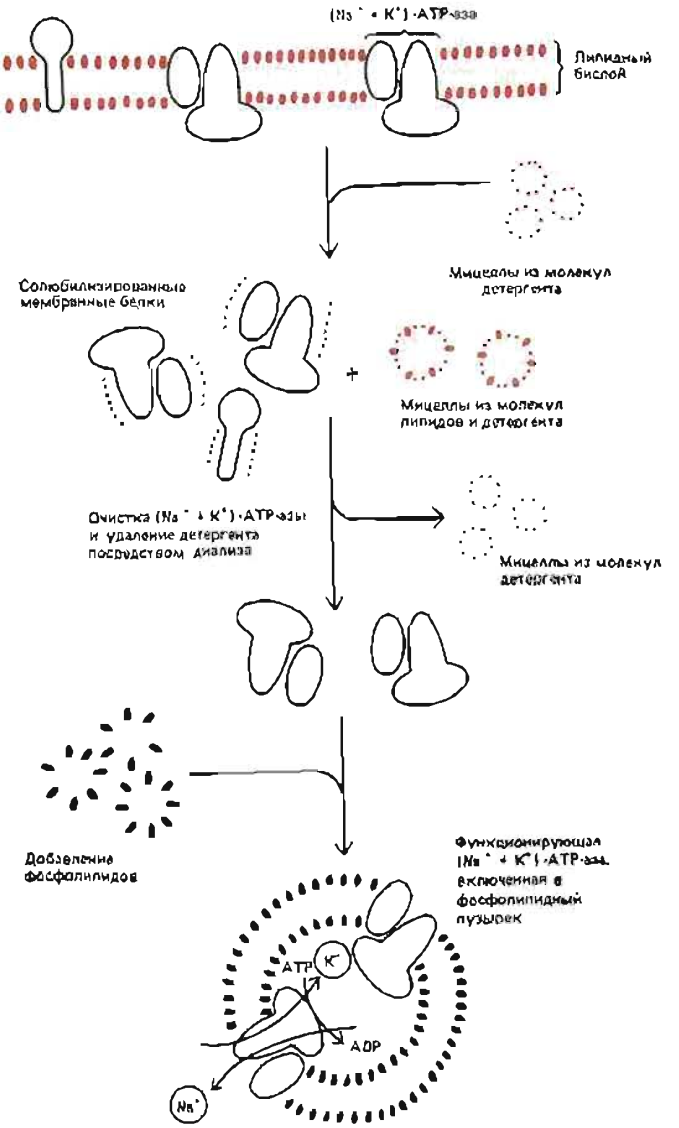


Рис. 6-55. Включение функционирующих молекул $(Na^+ + K^+)$-АТР-азы в реконструированные фосфолипидные пузырьки после солюбилизации и очистки фермента. Реконструкция пузырьков производится в присутствии высоких концентраций Na^+ и АТР, так как АТР-аза функционирует в качестве насоса только при достаточно высокой концентрации этих веществ внутри пузырьков.

а следовательно, и осмотические силы, приводящие к разбуханию или сжатию клетки. Макромолекулы внутри клетки обусловливают осмотическое давление, которое передается на плазматическую мембрану. Кроме того, поскольку макромолекулы в основном заряжены, они всегда существуют в окружении противоионов, например ионов K^+, которые усиливают данный эффект. Это давление на внутреннюю поверхность плазматической мембраны уравновешивается осмотическим давлением, создаваемым молекулами, присутствующими во внеклеточной жидкости (главным образом ионами Na^+ и Cl^-). Однако Na^+ и Cl^- имеют тенденцию проникать в клетку по градиентам их концентраций. При этом равновесие между внешним и внутренним давлением нарушается и клетка разбухает. $(Na^+ + K^+)$-АТР-аза успешно решает эту проблему: она выкачивает из клетки проникшие в нее ионы Na^+ и в то же время противодействует просачиванию внутрь ионов Cl^-, поддерживая в клетке отрицательный потенциал, нейтрализующий эффект градиента концентрации Cl^-.

Важная роль $(Na^+ + K^+)$-АТР-азы в регуляции клеточного объема подтверждается тем фактом, что при обработке животных клеток уабаином, ингибирующим $(Na^+ + K^+)$-АТР-азу, они разбухают и разрываются. Осмоти-

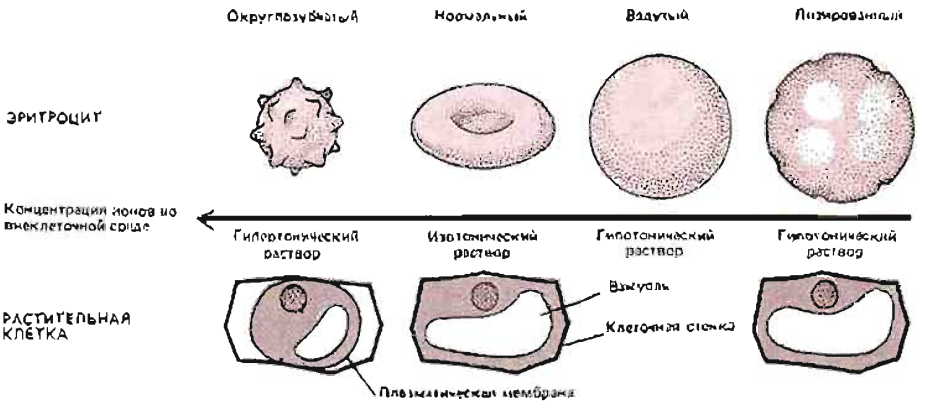


Рис. 6-56. Реакция эритроцитов человека и растительной клетки на изменение осмотических условий во внеклеточной жидкости. Эритроцит разбухает и лизируется в гипотоническом растворе, тогда как растительную клетку предохраняет от лизиса клеточная стенка. Обе клетки сжимаются в гипертоническом растворе, при этом мембрана растительной клетки отходит от клеточной стенки.

ческие проблемы могут решаться в клетках и другими способами. У многих бактерий и растительных клеток плазматическая мембрана окружена полужесткой стенкой, предохраняющей клетку от разрыва. У амеб излишек воды, проникающей внутрь в результате осмоса, собирается в сократительных вакуолях, периодически выбрасывающих свое содержимое наружу. Следует отметить, что в большинстве животных клеток основная роль в предотвращении разрыва из-за осмотического давления принадлежит $(Na^+ + K^+)$-АТР-азе. На рис. 6-56 изображены способы, с помощью которых клетки с клеточными стенками и без них реагируют на действие гипотонических или гипертонических растворов.

6.4.8. Некоторые Ca^{2+}-насосы – это тоже мембраносвязанные АТР-азы [29]

Концентрация ионов Ca^{2+} в цитозоле эукариотических клеток поддерживается на гораздо более низком уровне ($\leqslant 10^{-7}$ М) по сравнению с его концентрацией снаружи клетки ($\sim 10^{-3}$ М). Поток ионов Ca^{2+}, устремляющийся по столь крутому градиенту в ответ на внешние сигналы, – важный способ передачи таких сигналов через плазматическую мембрану внутрь клетки. Градиент частично поддерживается с помощью существующих в плазматической мембране Ca^{2+}-насосов, активно выводящих Ca^{2+} из клетки. В настоящее время уже известно, что некоторые из таких насосов представляют собой АТР-азы, однако эти белки пока еще не выделены в чистом виде, и об их структуре и функции известно сравнительно мало.

Больше всего данных имеется о связанном с мембраной Ca^{2+}-насосе из *саркоплазматического ретикулума* мышечных клеток. Саркоплазматический ретикулум образует сеть тонких каналов в мышечных клетках и служит внутриклеточным хранилищем ионов Ca^{2+}. Кальциевый насос отвечает за перекачивание Ca^{2+} из цитозоля в саркоплазматический ретикулум. (Когда нервный импульс деполяризует мембрану мышечной клетки, Ca^{2+} высвобождается из саркоплазматического ретикулума в цитозоль, стимулируя мышцу к сокращению.) Подобно $(Na^+ + K^+)$-насосу, Ca^{2+}-насос – это АТР-аза, которая фосфорилируется и дефосфорилируется в каждом цикле работы. Одна молекула белка может гидролизовать на своей цитоплазматической поверхности до 10 молекул АТР в 1 с, при этом в расчете на каждую гидролизованную молекулу АТР в саркоплазматический ретикулум перекачиваются два иона Ca^{2+}. Поскольку Ca^{2+}-АТР-аза является преобладающим белком в мембране саркоплазматического ретикулума (составляя около 90% всего белка данной структуры), ее было довольно легко очистить. Оказалось, что молекула этого белка состоит из одной полипептидной цепи, содержащей около 1000 аминокислотных остатков; после включения в фосфолипидные пузырьки (как было описано выше для $(Na^+ + K^+)$-АТР-азы), кальциевая АТР-аза осуществляет сопряженный с гидролизом АТР перенос ионов Ca^{2+}.

6.4.9. Мембраносвязанные ферменты, синтезирующие ATP,– это транспортные ATP-азы, действующие в обратном направлении [30]

В плазматических мембранах аэробных бактерий и во внутренних мембранах митохондрий и хлоропластов эукариотических клеток обнаруживаются ферменты, очень похожие на две обсуждавшиеся выше транспортные ATP-азы. Однако здесь они обычно действуют в обратном направлении: вместо гидролиза ATP, обеспечивающего транспорт ионов (как в случае ($Na^+ + K^+$)-ATP-азы и Ca^{2+}-ATP-азы), они катализируют синтез ATP из ADP и фосфата, осуществляемый благодаря наличию на этих мембранах градиента протонов. Поэтому такие ферменты называются *ATP-синтетазами*. Градиент H^+ возникает на отдельных этапах транспорта электронов в процессе окислительного фосфорилирования (у бактерий и в митохондриях) или фотосинтеза (в хлоропластах), а также с помощью фотоактивируемого протонного насоса (бактериородопсина) у *Halobacterium*. Во всех этих случаях ферменты могут работать в обоих направлениях в зависимости от условий: они могут гидролизовать ATP и качать H^+ через мембрану во внутреннее пространство или же могут синтезировать ATP при прохождении потока ионов H^+ через молекулы ферментов в обратном направлении. Эти ферменты более детально обсуждаются в гл. 9 (т. 3).

6.4.10. Активный транспорт может осуществляться с помощью ионных градиентов [24]

Многие системы активного транспорта приводятся в действие за счет энергии, запасенной в ионных градиентах, а не путем прямого гидролиза ATP. Все они работают как котранспортные системы: одни функционируют по принципу симпорта, а другие – по принципу антипорта. В животных клетках котранспортируемым ионом обычно оказывается Na^+. Например, активный транспорт некоторых сахаров и аминокислот внутрь животных клеток обусловливается градиентом Na^+ через плазматическую мембрану. Всасывание глюкозы в клетки кишечника и почек достигается с помощью системы симпорта, в которой глюкоза и ионы Na^+ связываются с различными участками на белке-переносчике глюкозы; Na^+ стремится войти в клетку по своему электрохимическому градиенту и как бы «тащит» глюкозу внутрь за собой. Чем выше градиент Na^+, тем больше скорость всасывания глюкозы. Наоборот, если концентрация Na^+ во внеклеточной жидкости заметно уменьшается, транспорт глюкозы останавливается. Ионы Na^+, проникающие в клетку

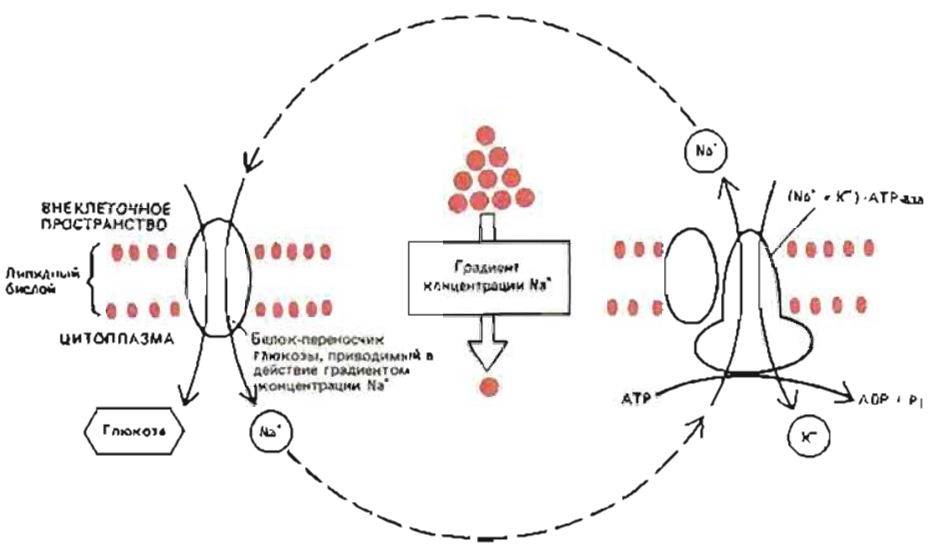


Рис. 6-57. Схема симпорта глюкозы, показывающая, каким образом активный транспорт глюкозы осуществляется за счет градиента Na^+, генерируемого и поддерживаемого ($Na^+ + K^+$)-ATP-азой.

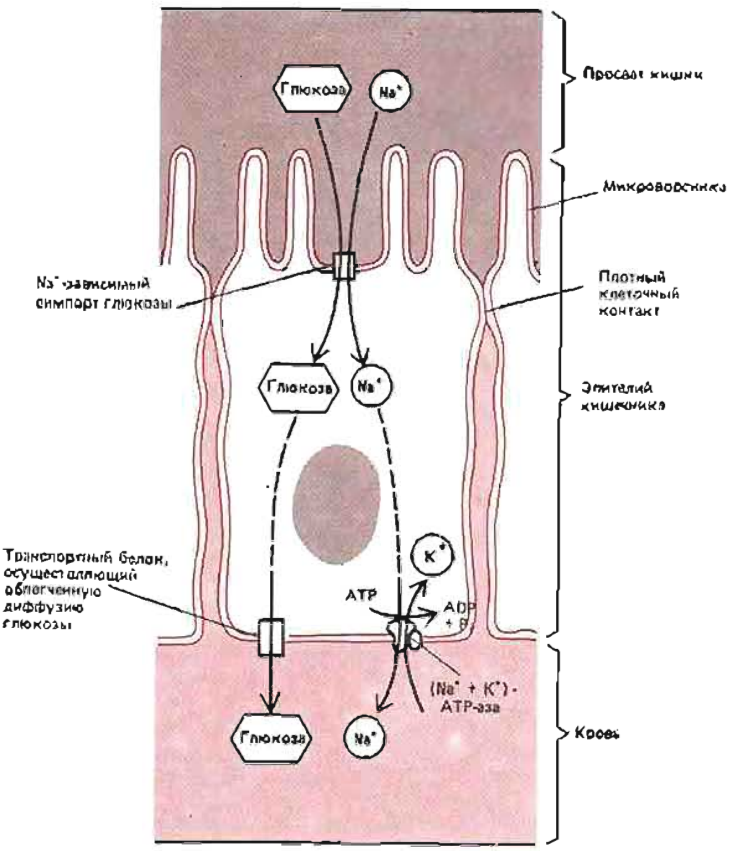


Рис. 6-58. Асимметричное распределение транспортных белков в клетке эпителия кишечника приводит к сквозному транспорту глюкозы из полости кишки через клетку в кровь. Глюкоза поступает в клетку через клеточную апикальную мембрану посредством Na^+-зависимого симпорта глюкозы и выходит из клетки (по градиенту своей концентрации) путем облегченной диффузии, опосредуемой другим белком-переносчиком глюкозы, располагающимся в базальной и латеральной мембранах. Градиент Na^+, который приводит в движение симпорт глюкозы, поддерживается $(Na^+ + K^+)$-АТР-азой, находящейся в базальной и латеральной плазматических мембранах; благодаря этому ферменту внутриклеточная концентрация Na^+ сохраняется на низком уровне.

вместе с глюкозой, выкачиваются обратно $(Na^+ + K^+)$-АТР-азой, которая, поддерживая градиент концентрации Na^+, косвенным путем контролирует транспорт глюкозы (рис. 6-57). Гипотетическая (и довольно упрощенная) схема функционирования подобной системы симпорта изображена на рис. 3-61 (т. 1).

В плазматических мембранах многих животных клеток существует по крайней мере пять различных белков-переносчиков аминокислот, которые действуют как системы симпорта, перенося одновременно ионы Na^+, причем каждый из этих белков специфичен для группы родственных аминокислот. Градиент концентрации Na^+ может также приводить в действие системы антипорта. Например, в оплодотворенном яйце морского ежа значительное повышение внутриклеточного pH активирует синтез белков и ДНК; это изменение pH вызывается потоком H^+ из клетки, возникающим благодаря потоку Na^+ в клетку.

Во многих клетках Na^+-зависимые белки-переносчики служат для доставки в клетку метаболитов, подобных сахарам и аминокислотам. В плазматической мембране некоторых эпителиальных клеток, например в тех, которые участвуют во всасывании питательных веществ в пищеварительном тракте, транспортные белки распределены асимметрично, что способствует сквозному транспорту через клетку поглощенных веществ. Как показано на рис. 6-58, белки, локализованные в плазматической мембране на апикальной (всасывающей) поверхности эпителиальной клетки, осуществляют Na^+-зависимый симпорт, перенося питательные вещества внутрь клетки. В то же время Na^+-независимые транспортные белки в базальной и латеральной мембранах позволяют питательным веществам выходить наружу по градиентам их концентраций. Градиент Na^+ на плазматической мембране таких клеток поддерживается $(Na^+ + K^+)$-АТР-азой, находящейся в базальной и латеральной мембранах. Сходные механизмы используются в эпителиальных клетках по-

чек и кишечника для перекачивания воды из одного внеклеточного пространства в другое.

Во многих эпителиальных клетках площадь плазматической мембраны намного увеличена за счет существования тысяч микроворсинок, выступающих с апикальной поверхности в виде тонких пальцевидных образований (рис. 6-58). Такие микроворсинки могут увеличивать общую площадь всасывающей поверхности в 25 раз, тем самым значительно повышая транспортные возможности клетки.

У бактерий большинство систем активного транспорта, приводящихся в действие ионными градиентами, использует в качестве котранспортируемого иона H^+, а не Na^+. В частности, активный транспорт большей части сахаров и аминокислот в бактериальные клетки обусловлен градиентом H^+ через плазматическую мембрану. Наиболее хорошо изученный пример такого рода – это трансмембранный *белок-переносчик лактозы* (пермеаза, или М-белок), состоящий из одной полипептидной цепи (30 000 дальтон). Этот белок осуществляет H^+-зависимый симпорт: с каждой транспортируемой в клетку молекулой лактозы переносится один протон.

6.4.11. Активный транспорт в бактериях может идти путем векторного переноса групп или с участием водорастворимых связывающих белков [24, 31]

Как мы теперь знаем, активный транспорт в клетках может приводиться в действие светом (например, в бактериородопсине), гидролизом АТР или же ионными градиентами. Четвертый путь в принципе мог бы заключаться в том, чтобы молекулу, вошедшую в клетку посредством пассивного транспорта, «поймать в капкан» с помощью химической модификации, которая не дала бы возможности молекуле выйти обратно через тот же канал. Некоторые бактерии действительно используют такой механизм. Он называется **векторным, или направленным, переносом групп**. В частности, активный транспорт сахаров внутрь некоторых бактерий осуществляется путем эффективного фосфорилирования молекул этих веществ при переносе их через плазматическую мембрану. В результате такой модификации сахара становятся заряженными и не могут выйти обратно; поэтому они начинают накапливаться в клетке. Более того, вследствие фосфорилирования транспортируемых сахаров концентрация нефосфорилированных сахаров внутри клетки остается очень низкой, так что градиент концентрации сахара продолжает «выталкивать» эти молекулы в клетку. Лучше всего такие системы изучены у бактерий, у которых механизм фосфорилирования достаточно сложен: в нем принимают участие по крайней мере четыре отдельных мембранных белка, а в качестве донора высокоэнергетического фосфата используется фосфоенолпируват, а не АТР (рис. 6-59).

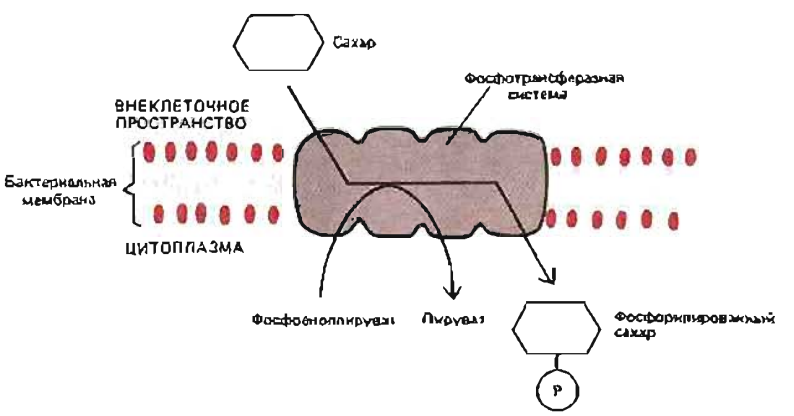


Рис. 6-59. Активный транспорт сахаров внутрь бактериальных клеток за счет направленного переноса групп. Специальная «фосфотрансферазная система» белков в бактериальной мембране фосфорилирует сахар во время переноса его через мембрану. Донором фосфата служит фосфоенолпируват, а не АТР.

Многие системы активного транспорта сахаров и аминокислот у бактерий включают в себя особый класс водорастворимых белков, локализованных в пространстве между плазматической мембраной и клеточной стенкой – *периплазматическом пространстве*. Эти белки имеют на своей поверхности специфические участки связывания для молекул определенного растворенного вещества и поэтому называются **периплазматическими связывающими белками**. Хотя для некоторых из таких белков известна не только полная аминокислотная последовательность, но даже и трехмерная структура, остается неясным, как подобные белки функционируют. Во всех случаях для осуществления транспорта помимо связывающего белка требуется по крайней мере еще один белок. Представляется вероятным, что каждый периплазматический связывающий белок передает связанное с ним растворенное вещество специфическому трансмембранному белку-переносчику, однако это еще не было продемонстрировано экспериментально.

Те же самые связывающие белки, которые участвуют в транспорте, служат, по-видимому, и как рецепторы в *хемотаксисе* – важном процессе, позволяющем бактериям перемещаться в направлении более высокой концентрации специфического питательного вещества. При хемотаксисе множество различных связывающих белков взаимодействует с меньшим числом мембранных белков, передающих сигналы внутрь клетки (т. 3, разд. 13.5.6). Можно было бы ожидать, что многие связывающие белки соблюдают точно такую же экономию и при осуществлении своей транспортной функции, распределяясь между небольшим числом трансмембранных транспортных белков.

6.4.12. Некоторые трансмембранные белковые каналы имеют «ворота», открывающиеся только на короткое время [32]

Мы видели, что в пассивном транспорте функционируют два класса мембранных белков: 1) белки-переносчики, обладающие свойствами мембраносвязанных ферментов, и 2) белки, формирующие трансмембранные гидрофильные каналы, через которые молекулы растворенных веществ соответствующих размеров и заряда могут проходить путем простой диффузии. В отличие от транспорта, опосредуемого переносчиками, пассивный транспорт через белковые каналы представляет собой процесс, не достигающий насыщения и не имеющий V_{max}. Он может осуществляться с гораздо большей скоростью, чем облегченная диффузия (см. рис. 6-50).

Одни каналы, сформированные транспортными белками, открыты постоянно, тогда как другие открываются только на короткое время. Про последние говорят, что они имеют «ворота». Некоторые из таких каналов открываются в ответ на связывание внеклеточного лиганда со специфическими поверхностными рецепторами клетки. Причиной открывания других является понижение мембранного потенциала (рис. 6-60). Третьи же открываются при изменении внутриклеточной концентрации определенных ионов (например, некоторые K^+-каналы открываются, когда концентрация свободного Ca^{2+} в цитозоле повышается).

Очень часто каналы, снабженные воротами, имеют механизмы самозакрывания, с помощью которых канал может быстро захлопнуться, несмотря на то что фактор, который вызвал их первоначальное открывание, еще действует. Рассмотрим нервно-мышечное соединение, в котором импульс, идущий по нерву, стимулирует мышцу к сокращению. Этот с виду простой ответ состоит из последовательного открывания и закрывания по крайней мере четырех различных наборов каналов, имеющих ворота, и все это происходит менее чем за 1 с (рис. 6-61).

1. Процесс начинается, когда нервный импульс достигает окончания нерва; снижение мембранного потенциала (*деполяризация*) вызывает временное открывание кальциевых каналов в плазматической мембране этого окончания. Поскольку концентрация Ca^{2+} снаружи клетки всегда более чем

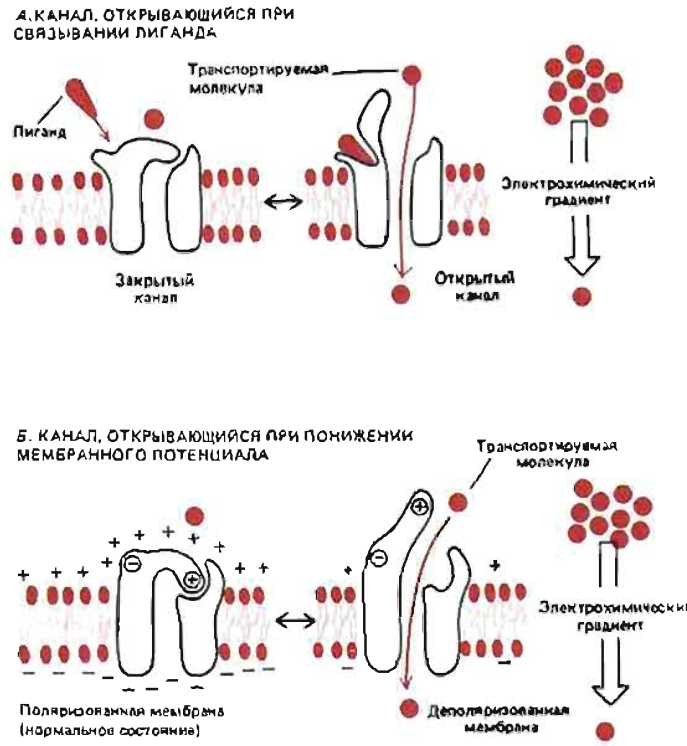


Рис. 6-60. Схема функционирования двух типов ионных каналов, имеющих «ворота». Подобная конструкция каналов позволяет ионам проходить через мембрану по электрохимическим градиентам только тогда, когда эти белки находятся в «открытой» конфигурации. *А.* Канал открывается, когда с ним (или с мембранным белком, ассоциированным с каналом) связывается внеклеточный лиганд. *Б.* Канал пропускает ионы при понижении мембранного потенциала (когда мембрана деполяризуется).

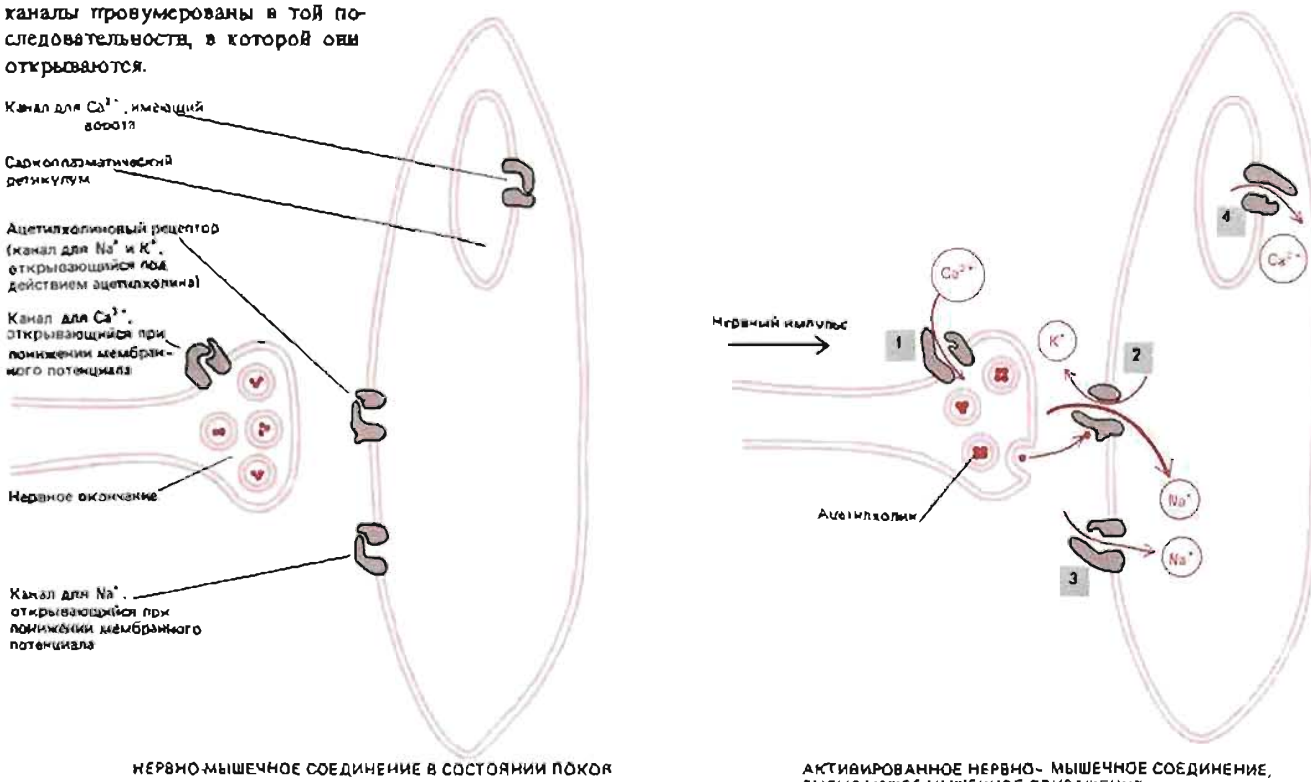


Рис. 6-61. Схема нервно-мышечного соединения, показывающая, как некоторые имеющие ворота каналы участвуют в стимуляции мышечного сокращения нервным импульсом. Снабженные воротами каналы пронумерованы в той последовательности, в которой они открываются.

НЕРВНО-МЫШЕЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ В СОСТОЯНИИ ПОКОЯ

АКТИВИРОВАННОЕ НЕРВНО-МЫШЕЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ, ВЫЗЫВАЮЩЕЕ МЫШЕЧНОЕ СОКРАЩЕНИЕ

в 1000 раз превышает концентрацию свободного Ca^{2+} в клетке, Ca^{2+} устремляется внутрь нервного окончания и стимулирует его к секреции нейромедиатора *ацетилхолина*.

2. Высвобожденный ацетилхолин связывается с белками-рецепторами ацетилхолина на плазматической мембране мышечной клетки, контактирующей с данным нервным окончанием. Эти рецепторы имеют снабженные воротами каналы, проницаемые для Na^+ и K^+, которые временно открываются при связывании ацетилхолина. Поскольку концентрация Na^+ снаружи клетки выше, чем внутри, а концентрация K^+, наоборот, ниже, ионы Na^+ устремляются внутрь мышечной клетки, а ионы K^+ – наружу. Это происходит до тех пор, пока канал открыт (около 1 мс). Поток Na^+ внутрь клетки сквозь активируемый ацетилхолином канал сильно превышает поток K^+ наружу, так как электрохимический градиент Na^+ через мембрану значительно круче, чем градиент K^+. В результате в области этого канала происходит локальная деполяризация мембраны мышечной клетки.
3. В той же самой мембране мышечной клетки имеются и другие белковые каналы, пропускающие главным образом Na^+ при понижении мембранного потенциала. Такие каналы вследствие локальной деполяризации мембраны открываются на короткое время, и ионы Na^+ устремляются внутрь клетки, что еще больше деполяризует мембрану. Это в свою очередь приводит к тому, что открываются следующие каналы и в конце концов возникает волна деполяризации (называемая *потенциалом действия*), которая распространяется до тех пор, пока не охватит всю мышечную мембрану.
4. Вследствие возникновения потенциала действия Ca^{2+}-каналы в мембране саркоплазматического ретикулума временно открываются, что позволяет Ca^{2+} проникнуть в цитозоль. В результате происходит повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+}, вызывающее сокращение миофибрилл в мышечной клетке.

Поскольку клетки, имеющие каналы для Na^+ и (или) Ca^{2+}, которые открываются при изменении мембранного потенциала, способны генерировать потенциал действия, они называются «электрически активными» клетками. С другой стороны, ионные каналы, открывающиеся в ответ на связывание лигандов, имеются не только в электрически активных клетках: подобные каналы существуют и в плазматических мембранах многих эукариотических клеток, где они служат для передачи сигналов из внешней среды внутрь клетки (т. 3, разд. 13.3.8).

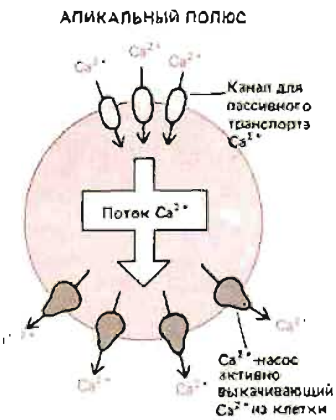


Рис. 6-62. Схема, показывающая, как асимметричное распределение транспортных белков в плазматической мембране яйцеклетки обычной бурой морской водоросли *Fucus* обусловливает возникновение внутриклеточного потока ионов. Этот поток, по-видимому, способствует поляризации яйцеклетки и, таким образом, влияет на последующее эмбриональное развитие.

6.4.13. Асимметрично распределенные ионные каналы могут генерировать потоки ионов, поляризующие клетки [33]

Большинство клеток обладает четко выраженной полярностью. Это означает, что их концы морфологически и функционально различаются, однако до сих пор остается загадкой, каким образом сами клетки «отличают» свою переднюю часть от задней. Есть данные, что асимметричное распределение в плазматической мембране ионных каналов вызывает образование внутриклеточных потоков ионов, способствующих установлению полярности клетки. Например, в яйцеклетке обычной бурой морской водоросли *Fucus* существует довольно сильный поток ионов Ca^{2+}, направленный от апикального полюса к базальному, который, по-видимому, генерируется и (или) поддерживается благодаря пассивному втеканию Ca^{2+} в клетку на апикальном полюсе и активному вытеканию его где-то в другом месте. Наличие подобного потока, вероятно, связано с асимметричным распределением кальциевых каналов и Ca^{2+}-насосов в плазматической мембране (рис. 6-62). Сквозной поток ионов Ca^{2+} через яйцеклетку мог бы перемещать внутриклеточные молекулы, имеющие большой заряд, за счет электрофореза. Существуют данные, что этот поток ориентирует цитоплазму таким образом, что это влияет на последующее эмбриональное развитие. Хотя типичная соматическая клетка значительно уступает в размерах яйцеклетке, не было бы неожиданным, если бы

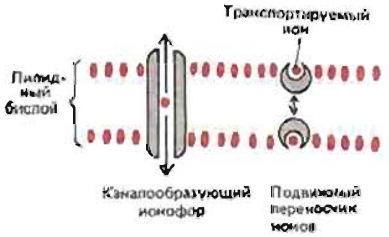


Рис. 6-63. Схематическое изображение подвижного переносчика ионов и каналообразующего ионофора. В обоих случаях поток ионов проходит через мембрану только по электрохимическому градиенту.

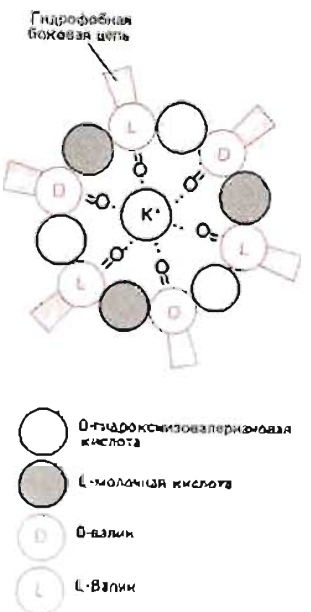


Рис. 6-64. Молекула валиномицина, связанная с расположенным в центре кольцевой структуры ионом K^+ при помощи шести атомов кислорода.

локализованные внутриклеточные потоки ионов, генерируемые асимметричным распределением мембранных транспортных белков, также участвовали в поляризации некоторых соматических клеток.

6.4.14. Ионофоры повышают ионную проницаемость искусственных и биологических мембран [23, 34]

Ионофоры – это небольшие гидрофобные молекулы, которые растворяются в липидных бислоях и повышают их проницаемость для ионов. Большинство ионофоров синтезируется микроорганизмами (вероятно, в качестве биологического оружия против своих конкурентов); некоторые из них используются как антибиотики. Ионофоры широко применяются для повышения проницаемости мембран по отношению к определенным ионам в исследованиях на синтетических бислоях, клеточных органеллах, а в последнее время и на интактных клетках. Существуют два класса ионофоров – **подвижные переносчики ионов** и **каналообразующие ионофоры** (рис. 6-63). Ионофоры обоих типов действуют, экранируя заряд транспортируемого иона так, чтобы последний мог пройти гидрофобную внутреннюю область липидного бислоя. Поскольку ионофоры не связаны ни с каким источником энергии, они лишь позволяют ионам двигаться по их электрохимическим градиентам.

Примером подвижного переносчика ионов может служить *валиномицин*. Он представляет собой полимер, повышающий проницаемость мембраны для ионов K^+. Валиномицин имеет кольцеобразную структуру. Наружная гидрофобная часть его молекулы состоит из боковых цепей валина и контактирует с углеводородной сердцевиной липидного бислоя. Во внутренней полярной области как раз может поместиться один ион калия (рис. 6-64). Валиномицин переносит K^+ по его электрохимическому градиенту; он захватывает этот ион с одной стороны мембраны, диффундирует с ним через бислой и высвобождает его на другой стороне. Такой перенос совершается в обоих направлениях, поэтому суммарный эффект будет иметь место только в том случае, если при движении переносчика в каком-то одном направлении с ним будет связываться больше ионов K^+, чем при движении в другом.

Еще один пример подвижного переносчика ионов – ионофор *A23187*, который транспортирует двухвалентные катионы, такие, как Ca^{2+} и Mg^{2+}. Функционируя, как правило, в условиях низких концентраций ионов, этот ионофор действует как ионообменный «челнок»: на каждый двухвалентный катион, вносимый им в клетку, он переносит два иона H^+ из клетки. Следовательно, в отличие от валиномицина, он не деполяризует мембрану. Если живые клетки подвергнуть действию ионофора A23187, ионы Ca^{2+} устремляются в цитозоль по крутому электрохимическому градиенту. Поэтому ионофор A23187 широко используется в клеточной биологии для повышения концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле.

Если температура мембраны опускается ниже точки ее замерзания, подвижные переносчики уже не могут диффундировать через липидный бислой, и транспорт прекращается. Наличие такой температурной зависимости свидетельствует о том, что данный ионофор – это подвижный переносчик. Если же транспорт ионов продолжается нормально даже в замороженном бислое, можно сделать вывод, что его осуществляет каналообразующий ионофор.

Примером ионофора такого типа является *грамицидин А*. Он представляет собой линейный пептид, состоящий из 15 аминокислот; все они имеют гидрофобные боковые цепи. Две молекулы грамицидина, по-видимому, объединяются в бислое и формируют трансмембранный канал, позволяющий моновалентным катионам перетекать по их электрохимическим градиентам. Подобные димеры нестабильны: они постоянно образуются и диссоциируют, так что время, в течение которого канал открыт, составляет в среднем 1 с. При наличии большого электрохимического градиента грамицидин А может пропустить около $2 \cdot 10^7$ катионов в расчете на один открытый канал за 1 с, что в 1000 раз больше, чем может перенести за то же время одна молекула подвижного переносчика.

Заключение

Липидные бислои в значительной степени не проницаемы для большинства полярных молекул. Для транспортировки таких молекул в клетку или из клетки в плазматических мембранах содержится большое число специфических транспортных белков, каждый из которых ответствен за перенос определенного вещества через мембрану. Эти белки формируют сквозные транспортные пути через бислой. Многие транспортные белки действуют подобно ферментам в том смысле, что у них есть специфические участки связывания для транспортируемых молекул; такие белки называются белками-переносчиками. Некоторые из них только катализируют облегченную диффузию соответствующего растворенного вещества через бислой. Другие испытывают ряд конформационных изменений, вызываемых гидролизом АТР или связыванием ионов, и в результате способны работать как насосы, активно качая связывающееся с ними растворенное вещество «вверх» против его электрохимического градиента. Один из важнейших насосов – это ($Na^+ + K^+$)-АТР-аза, присутствующая в плазматической мембране всех животных клеток. Этот белок-переносчик использует энергию гидролиза АТР для выкачивания Na^+ из клетки и накачивания K^+ в клетку.

Существуют транспортные белки другого типа, которые формируют открытые каналы в бислое. Через эти каналы небольшие молекулы могут двигаться посредством простой диффузии по их электрохимическим градиентам. Скорость прохождения растворенных веществ через мембрану в этом случае оказывается гораздо более высокой, чем при транспорте с помощью белков-переносчиков. Некоторые из таких каналов постоянно открыты, тогда как другие имеют ворота, открывающиеся лишь на короткое время либо в ответ на связывание клеточной поверхностью сигнальных лигандов, либо в ответ на изменение мембранного потенциала или внутриклеточной концентрации ионов.

6.5. Мембранный транспорт макромолекул и частиц: экзоцитоз и эндоцитоз

Транспортные белки опосредуют проникновение через клеточные мембраны многих полярных молекул небольшого размера, однако они не способны транспортировать макромолекулы, например белки, полинуклеотиды или полисахариды. Тем не менее в большинстве клеток определенные макромолекулы могут проходить в обоих направлениях через плазматические мембраны, а некоторые клетки даже способны поглощать большие частицы. Механизмы, с помощью которых клетки осуществляют эти процессы, сильно отличаются от механизмов, опосредующих транспорт небольших молекул и ионов. При переносе макромолекул происходит последовательное образование и слияние окруженных мембраной пузырьков (везикул). Например, для того чтобы секретировать инсулин, клетки, продуцирующие этот гормон, упаковывают его во внутриклеточные пузырьки, которые сливаются с плазматической мембраной и открываются во внеклеточное пространство, высвобождая при этом инсулин. Подобный процесс слияния называется **экзоцитозом** (рис. 6-65). Во всех эукариотических клетках имеются и другие пузырьки, переносящие посредством аналогичного процесса от аппарата Гольджи к плазматической мембране ее новосинтезированные компоненты.

Клетки способны также поглощать макромолекулы и частицы, используя сходный механизм, только в обратной последовательности. Поглощенное вещество постепенно окружается небольшим участком плазматической мембраны, который сначала впячивается, а затем отщепляется, образуя внутриклеточный пузырек, содержащий захваченный клеткой материал (рис. 6-65). Этот процесс называется **эндоцитозом**. В зависимости от размера образующихся пузырьков различают два типа эндоцитоза: **пиноцитоз** (от греч. pino – пью + kytos – клетка), предполагающий поглощение жидкости и (или)

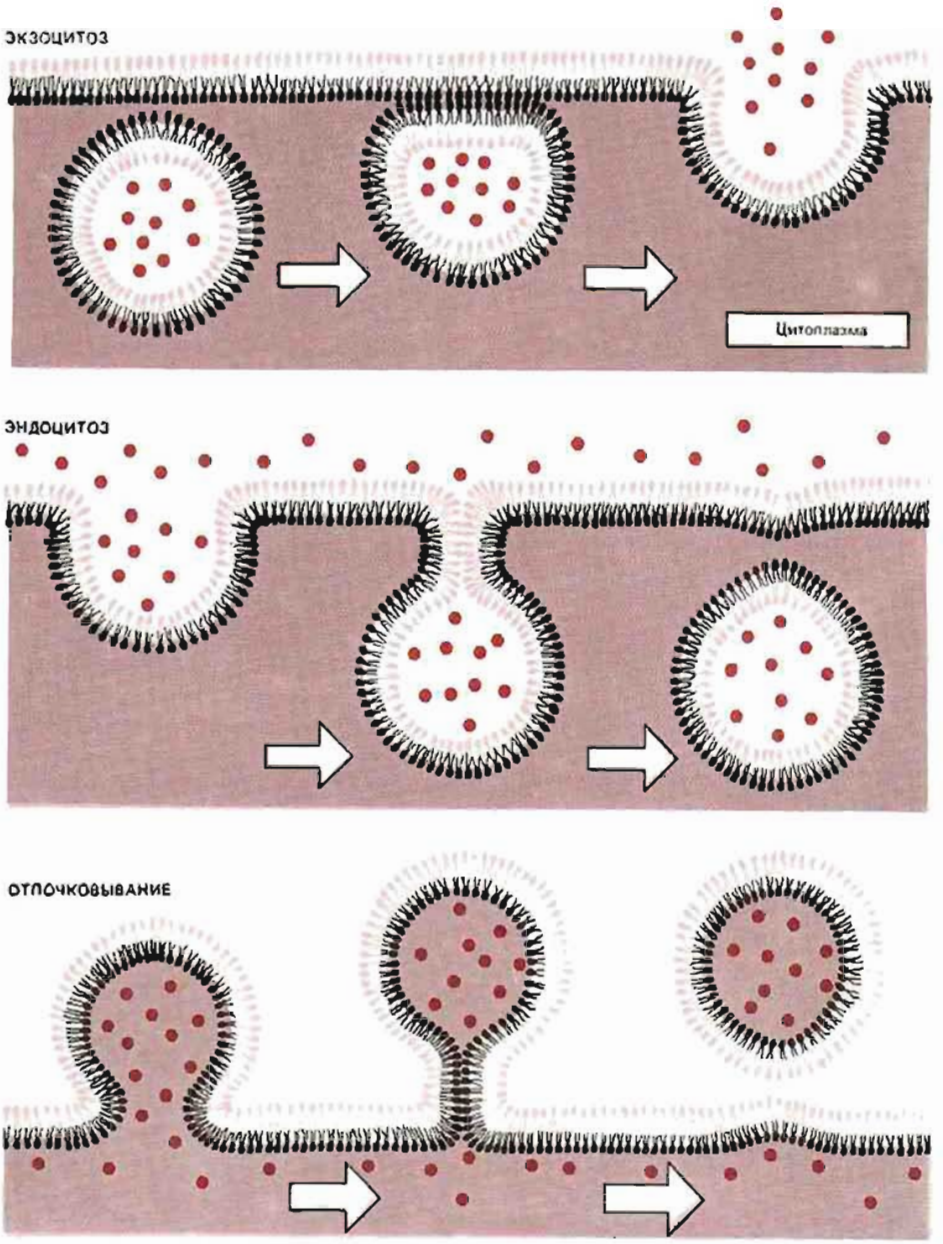


Рис. 6-65. Схема слияния и объединения бислоев в трех процессах, приводящих к слиянию мембран – экзоцитозе, эндоцитозе и отпочковывании. Экзоцитоз и эндоцитоз обсуждаются в этой главе. Отпочковывание, имеющее место при образовании внутриклеточных транспортных пузырьков, обсуждается в гл. 7. Обратите внимание, что из-за наличия стадии слипания бислоев эндоцитоз и экзоцитоз не повторяют друг друга в обратном порядке: при экзоцитозе слипаются два монослоя плазматической мембраны, обращенные к цитоплазме, тогда как при эндоцитозе – два наружных монослоя плазматической мембраны. Благодаря такому различию эндоцитоз и экзоцитоз, по-видимому, могут регулироваться независимо друг от друга.

растворенных веществ с помощью небольших пузырьков, и **фагоцитоз** (от греч. phágos – пожирающий + kytos – клетка), означающий поглощение больших частиц, таких, как микроорганизмы или обломки клеток. В этом случае образуются крупные пузырьки, часто называемые *вакуолями*. Жидкость и растворенные вещества непрерывно поглощаются большинством клеток посредством пиноцитоза, тогда как большие частицы поглощаются главным образом специализированными клетками – фагоцитами. По этой причине для большинства клеток термины «пиноцитоз» и «эндоцитоз» обычно употребляются в одном и том же смысле.

Важная особенность как экзоцитоза, так и эндоцитоза заключается в том, что секретируемые или поглощаемые макромолекулы локализуются в пузырьках и обычно не смешиваются с другими макромолекулами или органеллами клетки. С помощью неизвестного механизма каждый пузырек сливается только со специфическими мембранными структурами, что гарантирует пра-

вильный перенос макромолекул и их распределение между внеклеточным пространством и внутренностью клетки. Аналогичный процесс осуществляется во время переноса новосинтезированных макромолекул в различные компартменты в пределах клетки; в этом случае пузырьки отпочковываются (рис. 6-65) от эндоплазматического ретикулума или комплекса Гольджи, мигрируют и сливаются с другой мембраной внутри той же клетки. Хотя ясно, что быстрое и повсеместное образование и слияние пузырьков – это фундаментальная особенность всех эукариотических клеток, молекулярные механизмы, обеспечивающие приведение в действие и направление этого транспорта по специфическим путям, во многом еще требуют изучения.

6.5.1. Экзоцитоз происходит за счет слияния внутриклеточных пузырьков с плазматической мембраной [35]

Большинство клеток обладает способностью выделять наружу макромолекулы (а часто и менее крупные по размерам молекулы). В эукариотических клетках секреция почти всегда происходит за счет экзоцитоза. Одни секретируемые молекулы адсорбируются на поверхности клетки и становятся частью клеточной оболочки, другие включаются в межклеточный матрикс, а третьи попадают в интерстициальную жидкость и (или) в кровь, где они служат для других клеток в качестве питательных веществ или каких-то сигналов.

Как описано в гл. 7, секретируемые белки синтезируются на рибосомах, связанных с мембранами шероховатого эндоплазматического ретикулума (ЭР). Эти белки проходят в полость ЭР и транспортируются к комплексу Гольджи с помощью отпочковавшихся от ЭР транспортных пузырьков. В комплексе Гольджи белки модифицируются, концентрируются, сортируются и затем упаковываются в пузырьки, которые отшнуровываются от аппарата Гольджи и в конце концов сливаются с плазматической мембраной (рис. 6-66). В отличие от макромолекул секретируемые молекулы малых размеров активно транспортируются в уже сформированные секреторные пузырьки. Этот процесс часто приводится в действие ионным градиентом. Небольшие молекулы зачастую связываются со специфическими макромолекулами внутри пузырьков и в результате могут накапливаться в высокой концентрации, не создавая при этом чрезмерного осмотического градиента.

Одни вещества непрерывно секретируются производящими их клетками, тогда как другие запасаются в секреторных пузырьках и высвобождаются только после получения клеткой соответствующего сигнала извне. Этот сиг-

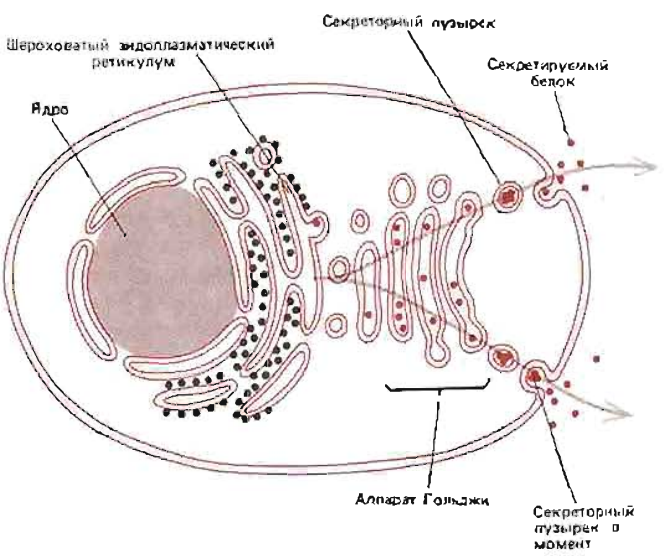


Рис. 6-66. Схема, показывающая путь, проходимый секретируемым белком.

нал к секреции часто представляет собой химический медиатор, например гормон, связывающийся с рецепторами на поверхности клетки. В результате происходит активация рецепторов, которая вызывает обычно кратковременное повышение концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле. Повышение концентрации Ca^{2+} в свою очередь инициирует процесс экзоцитоза, побуждая секреторные пузырьки к слиянию с плазматической мембраной и таким образом высвобождая их содержимое во внеклеточное пространство. Мембраны секреторных пузырьков объединяются с плазматической мембраной (см. рис. 6-65) и в дальнейшем посредством эндоцитоза возвращаются в первоначальное состояние, вероятно, для того чтобы войти в состав новых секреторных пузырьков. Общая площадь везикулярной мембраны, временно включающейся в состав плазматической мембраны, может быть огромной: в ацинарной клетке поджелудочной железы в состав апикальной плазматической мембраны (площадь которой составляет только 30 мкм^2) при стимулировании клетки к секреции включается около 900 мкм^2 везикулярной мембраны.

6.5.2. Индуцированный экзоцитоз – это локальный ответ плазматической мембраны и находящейся под ней цитоплазмы [36]

Представляется вероятным, что Ca^{2+} действует в *ограниченной области* секретирующей клетки, инициируя локальный ответ части цитоплазмы и располагающейся над ней плазматической мембраны. На этот вывод наводят эксперименты с тучными клетками, секретирующими гистамин в ответ на связывание специфических лигандов с рецепторами на их поверхности. Именно гистамин, секретируемый тучными клетками, ответствен за многие неприятные симптомы, такие, как зуд или чихание, сопровождающие аллергические реакции. Если тучные клетки проинкубировать в среде, содержащей растворенный стимулятор, то экзоцитоз наблюдается по всей клеточной поверхности (рис. 6-67). Если же стимулирующий лиганд связан с твердой гранулой, так что он может взаимодействовать только с небольшим участком поверхности тучной клетки, экзоцитоз ограничивается местом контакта с гра-

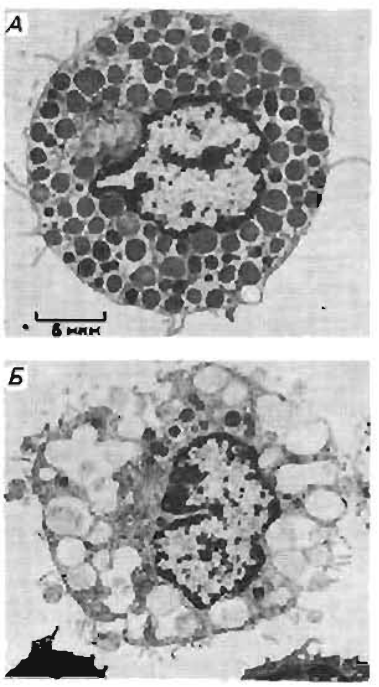


Рис. 6-67. Электронные микрофотографии, показывающие экзоцитоз в тучных клетках крысы. *А*. Клетка не подвергалась стимуляции. *Б*. Клетка активировалась внеклеточным лигандом с целью вызвать секрецию запасенного в ней гистамина. Пузырьки, содержащие гистамин, выглядят темными, а пузырьки, освободившиеся от него, – светлыми. То, что остается в пузырьках после секреции гистамина, представляет собой сеть макромолекул, с которыми в норме связывается запасаемый гистамин.
Если секреторный пузырек слился с плазматической мембраной, он может затем слиться и с некоторым числом других пузырьков, находящихся в клетке. В тучных клетках многие пузырьки способны открываться во внеклеточное пространство именно таким способом (т.е. не прямо, а через другие открытые пузырьки). В результате клетка, показанная на *Б*, имеет несколько больших полостей, сформированных слившимися друг с другом мембранами многих освободившихся от гистамина пузырьков, составляющих теперь с плазматической мембраной единое целое. Все подобные полости открыты во внеклеточное пространство, однако это не всегда очевидно, если рассматривать клетку только в одной плоскости сечения. (D. Lawson, C. Fewtrell, B. Gomperts, M. Raff, J. Exp. Med., 142, 391–402, 1975. С разрешения Rockefeller University Press.)



Рис. 6-68. Электронная микрофотография тучной клетки, активированной с целью вызвать секрецию гистамина. Активация проводилась с помощью стимулятора, прикрепленного к твердой грануле. Экзоцитоз идет только в той области клетки, которая контактирует с гранулой. (D. Lawson, C. Fewtrell, M. Raff, J. Cell Biol, 79, 394–400, 1978. С разрешения Rockefeller University Press.)

нулой (рис. 6-68). Ясно, что тучная клетка не отвечает на стимуляцию как нечто целое: активация рецепторов, поток Ca^{2+} в клетку в результате этой активации и последующий экзоцитоз, очевидно, происходят лишь в том участке клетки, который подвергся стимуляции. Это свидетельствует о важном свойстве плазматической мембраны: отдельные ее участки могут функционировать независимо от остальной мембраны.

Каким образом локальное повышение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле вызывает слияние находящихся поблизости секреторных пузырьков с плазматической мембраной? Известно, что слияние липосом, состоящих целиком из фосфолипидов с отрицательно заряженными полярными головами, можно стимулировать в присутствии очень высоких концентраций Ca^{2+} ($\geq 10^{-4}$ М). На основании этого факта была высказана гипотеза, что Ca^{2+} сам по себе может индуцировать слияние мембран в клетке. Однако во всех изученных случаях для экзоцитоза помимо потока Ca^{2+} внутрь клетки требуется еще и АТР. Более того, представляется маловероятным, чтобы концентрация Ca^{2+} в клетках когда-либо достигала такого высокого уровня, который непосредственно мог бы вызывать слияние. Каким бы ни был механизм слияния, кажется более правдоподобным, что какой-нибудь Ca^{2+}-связывающий белок, например *кальмодулин* (претерпевающий значительные конформационные изменения при связывании Ca^{2+}), каким-то образом связан с этим процессом (т. 3, разд. 13.4.5).

6.5.3. Слияние мембран происходит путем слипания бислоев и последующего их объединения [35]

Благодаря тому что клеточные мембраны состоят из двух слоев, на электронных микрофотографиях их структура в поперечном разрезе похожа на сэндвич: две параллельные плотные линии разделены светлым пространством. Процесс слияния двух мембран начинается с того, что эти мембраны приходят в близкое соприкосновение друг с другом (*слипание бислоев*). В результате на электронных микрофотографиях появляется изображение пятислойной структуры, в которой центральная плотная линия представляет собой слившиеся монослои двух мембран (рис. 6-69). Такие пятислойные структуры лишь изредка видны на электронных микрофотографиях клеток, зафиксированных в процессе экзоцитоза, по-видимому, из-за того, что их существование кратковременно. Слившиеся бислои быстро перестраиваются и объединяются (*объединение бислоев*), образуя одну непрерывную мембрану, вследствие чего секреторные пузырьки открываются во внеклеточное пространство (см. рис. 6-65). Слипание и объединение бислоев (представляющие собой две фазы **слияния мембран**) – это фундаментальные процессы, происходящие как при экзоцитозе и эндоцитозе, так и при делении и слиянии клеток (рис. 6-70).

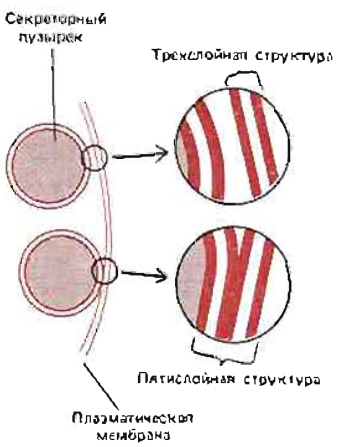


Рис. 6-69. Схематическое изображение пятислойной структуры, которая видна в электронный микроскоп, когда бислой секреторного пузырька слипается с плазматической мембраной непосредственно перед объединением бислоев.

6.5.4. В большинстве клеток эндоцитоз идет непрерывно [37]

Практически все эукариотические клетки непрерывно поглощают кусочки своих плазматических мембран в виде небольших эндоцитозных (пиноцитозных) пузырьков. Такие процессы, которые идут непрерывно (а не индуцируются), называются *конститутивными*. Внеклеточная жидкость (и все, что в ней растворено) также захватывается пузырьками и поглощается клеткой. Данный процесс, называемый **жидкофазным эндоцитозом**, можно сделать доступным для визуальных наблюдений и количественной оценки, если во внеклеточную жидкость добавить какое-нибудь вещество (например, выделенный из хрена фермент пероксидазу), судьбу которого можно затем проследить. Продукт реакции пероксидазы и ее субстрата приобретает значительную электронную плотность после фиксации клетки тетраоксидом осмия. Таким образом, если проинкубированные с пероксидазой клетки отмыть, зафиксировать глутаральдегидом, обработать субстратом и, наконец, опять зафиксиро-

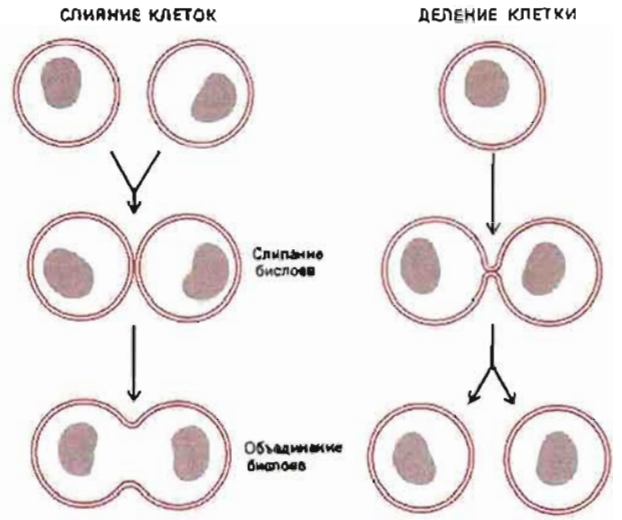


Рис. 6-70. Схема слияния мембран (включает два этапа: слипание бислоев и их объединение), происходящего при делении и слиянии клеток. В природе слияние клеток наблюдается в процессе оплодотворения (слияние сперматозоида с яйцеклеткой), а также при образовании многоядерных клеток скелетных мышц (слияние миобластов).

вать тетраоксидом осмия, то продукт реакции в эндоцитозных пузырьках можно легко увидеть на электронных микрофотографиях (рис. 6-71). Количество проникшей внутрь пероксидазы увеличивается линейно с возрастанием ее концентрации во внеклеточной жидкости и удлинением сроков инкубации.

Скорость конститутивного эндоцитоза варьирует в разных типах клеток, но обычно бывает очень большой. Например, макрофаг поглощает за 1 ч 25% собственного объема. Это означает, что он поглощает 3% своей плазматической мембраны в минуту, или 100% примерно за полчаса. В фибробластах эндоцитоз идет со скоростью, составляющей менее трети этой величины, тогда как некоторые амебы заглатывают свою плазматическую мембрану даже быстрее, чем макрофаг. Поскольку площадь поверхности и объем клетки остаются в процессе эндоцитоза неизменными, ясно, что мембрана возобновляется на клеточной поверхности за счет экзоцитоза с такой же скоростью, с какой удаляется посредством эндоцитоза. Учитывая большие скорости этих процессов и отсутствие данных о том, что деградация плазматической мембраны происходит со сравнимой скоростью, можно предположить, что липиды и белки подвергающейся эндоцитозу мембраны реутилизируются и вновь возвращаются в плазматическую мембрану, а не деградируют. Как происходит такая рециркуляция мембраны, пока не ясно; точно неизвестно также, какие компоненты плазматической мембраны проникают внутрь клет-

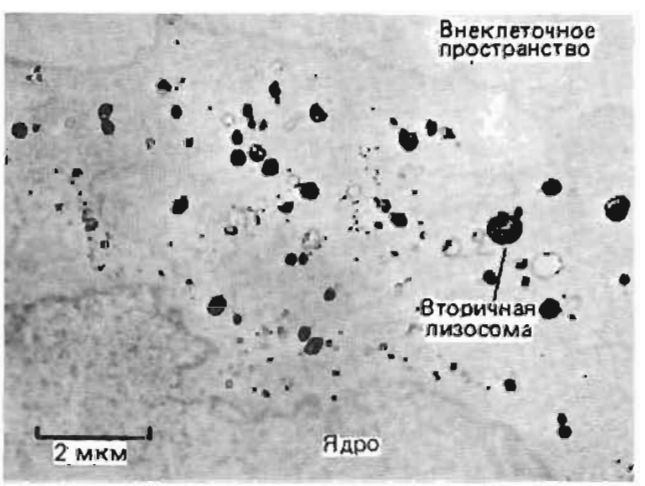


Рис. 6-71. Электронная микрофотография эндоцитозных пузырьков в фибробласте из культуры. Фибробласты инкубировали в среде, содержащей пероксидазу, в течение 60 мин. Наличие пероксидазы в эндоцитозных пузырьках выявляется по электроноплотному продукту реакции, образовавшемуся после фиксации клеток и обработки их субстратом, реагирующим с пероксидазой. (С любезного разрешения Ralph M. Steinman.)

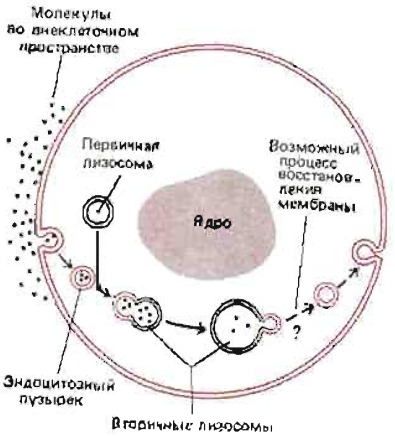


Рис. 6-72. Схема, на которой показан процесс слияния эндоцитозных пузырьков с первичными лизосомами, в результате чего образуются вторичные лизосомы. Большинство эндоцитозных пузырьков, по-видимому, сливается с другими пузырьками в цитоплазме прежде, чем слиться с лизосомами (на схеме не показано). Изображенное на схеме справа избирательное восстановление мембраны эндоцитозного пузырька из вторичной лизосомы и его прямое возвращение в плазматическую мембрану – это лишь один из возможных путей восстановления плазматической мембраны (альтернативный путь см. на рис. 6-77).

ки и участвуют в этом обширном процессе. Представление о широкомасштабном круговороте плазматической мембраны – это основное положение гипотезы «мембранного потока», предложенной для объяснения механизма кэпинга и перемещения клеток (разд. 6.2.13).

6.5.5. Большинство эндоцитозных пузырьков в конечном итоге сливается с лизосомами [37, 38]

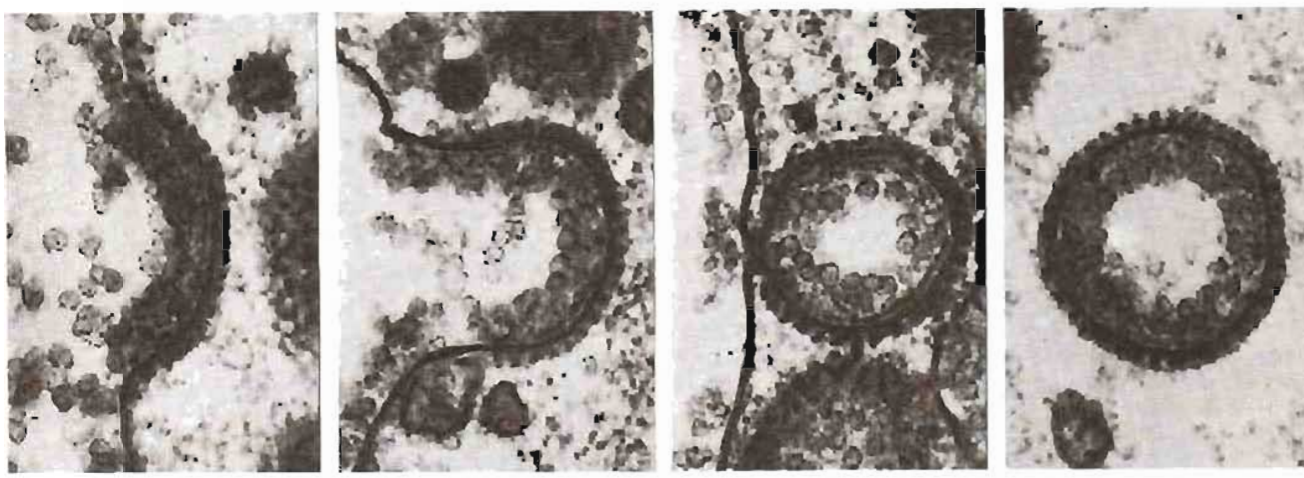
Эндоцитозные пузырьки различаются по размеру и форме (их диаметр, как правило, составляет 50–400 нм). Они обычно увеличиваются путем слияния друг с другом и (или) с другими внутриклеточными пузырьками. В большинстве клеток подавляющая часть эндоцитозных пузырьков (которые можно увидеть в электронный микроскоп, если использовать описанный выше пероксидазный метод) в конце концов сливается с небольшими пузырьками, называемыми **первичными лизосомами**. При этом образуются **вторичные лизосомы**, представляющие собой специализированные компартменты, предназначенные для внутриклеточного пищеварения (рис. 6-72). Поскольку в лизосомах имеются разнообразные гидролитические ферменты, бо́льшая часть макромолекулярного содержимого пузырьков, слившихся с лизосомами, быстро разрушается; низкомолекулярные продукты распада, такие, как аминокислоты, сахара и нуклеотиды, транспортируются через мембрану лизосомы в цитозоль, где они могут использоваться клеткой. С другой стороны, мембранные компоненты эндоцитозных пузырьков в основном избегают деградации; они исключаются из лизосомы с помощью неизвестного механизма (возможно, отпочковывания) и возвращаются (прямо или опосредованно через аппарат Гольджи) в плазматическую мембрану (рис. 6-72).

Однако не все эндоцитозные пузырьки сливаются с лизосомами. В некоторых клетках специальные эндоцитозные пузырьки проходят через всю цитоплазму, не взаимодействуя с лизосомами, и высвобождают свое содержимое путем экзоцитоза на противоположной поверхности, перенося таким образом материал с одной стороны клетки на другую. Такой транспортный механизм представляет собой один из способов, с помощью которых клетки эндотелия, выстилающие малые кровеносные сосуды, переносят вещества из кровотока в окружающую внеклеточную жидкость. В эндотелиальных клетках позвоночных этот процесс идет с участием небольших пузырьков (70 нм в диаметре), которые иногда сливаются одновременно друг с другом и с обеими клеточными поверхностями, формируя таким образом окруженные мембраной каналы, пересекающие всю клетку.

6.5.6. Многие эндоцитозные пузырьки имеют кайму [39]

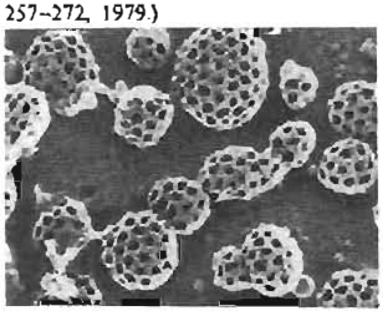
Большинство эукариотических клеток содержит особый класс пузырьков, диаметр которых варьирует от 50 до 250 нм и которые на обычных электронных микрофотографиях кажутся окруженными со стороны цитоплазмы щетиноподобной каймой (рис. 6-73). По-видимому, один из таких **окаймленных пузырьков** принимают участие во внутриклеточном транспорте веществ между органеллами клетки, тогда как другие непрерывно образуются путем впячивания и отщепления окаймленных участков плазматической мембраны. Такие участки, называемые **окаймленными ямками** (рис. 6-73 и 6-74), составляют около 2% клеточной поверхности фибробласта в культуре. За те секунды, в течение которых происходит формирование эндоцитозных окаймленных пузырьков, они теряют свою кайму и затем сливаются с другими внутриклеточными пузырьками. В конце концов большинство из них доставляет свое содержимое в первичные лизосомы.

После того как окаймленные пузырьки были выделены, обнаружилось, что их мембраны содержат несколько «мажорных» (количественно преобладающих) белков. Из них лучше всего охарактеризован **клатрин** – весьма консервативный фибриллярный белок (180 000 дальтон), который вместе с меньшим



0,1 мкм

Рис. 6-73. Электронные микрофотографии, иллюстрирующие вероятную последовательность событий при образовании окаймленного пузырька из окаймленной ямки. Показанные здесь окаймленные ямки и пузырьки участвуют в поглощении липопротеиновых частиц внутрь очень большого куриного ооцита при образовании желтка; они здесь несравненно больше, чем в клетках обычного размера. (С любезного разрешения M. M. Perry и A. B. Gilbert, из J. Cell Sci., 39, 257–272, 1979.)



0,2 мкм

Рис. 6-74. Электронная микрофотография многочисленных окаймленных ямок и пузырьков на внутренней поверхности плазматической мембраны фибробластов в культуре. Клетки были быстро заморожены в жидком гелии, подвергнуты скалыванию и затем глубокому травлению, чтобы сделать видимой цитоплазматическую поверхность плазматической мембраны. (J. Heuser, J. Cell Biol., 84, 560–583, 1980. С разрешения Rockefeller University Press.)

по размеру полипептидом (~ 35 000 дальтон) образует характерный многогранный чехол на поверхности окаймленных пузырьков. Основным структурным элементом чехла служит трехвалентный белковый комплекс (*трискелион*), состоящий из трех полипептидных цепей клатрина и трех меньших по размеру полипептидов. Трискелионы образуют на поверхности окаймленных пузырьков корзиноподобные сетки из шестиугольников и пятиугольников (рис. 6-75). Выделенные трискелионы при соответствующих условиях способны к спонтанной агрегации. При этом даже в отсутствие пузырьков формируются типичные многогранные корзинки. Остальные белки, входящие в состав мембраны окаймленных пузырьков, по-видимому, отвечают за связывание клатриновой оболочки с пузырьком и за улавливание рецепторов плазматической мембраны в окаймленные ямки и пузырьки (см. следующую главу).

В некоторых клетках (но не во всех) окаймленные ямки предпочтительно располагаются над пучками цитоплазматических актиновых филаментов (так называемых *напряженных нитей*). Это свидетельствует о возможности взаимодействия окаймленных участков плазматической мембраны с цитоскелетом. Подобные взаимодействия напоминают те, которые были постулированы в модели кэпинга, представленной на рис. 6-39.

6.5.7. Окаймленные ямки и пузырьки обеспечивают особый тип опосредуемого рецепторами эндоцитоза макромолекул [39, 40]

В большинстве животных клеток окаймленные ямки и пузырьки обеспечивают особый способ поглощения из внеклеточной жидкости специфических макромолекул в процессе, называемом **опосредуемым рецепторами эндоцитозом** (или *адсорбционным эндоцитозом*). Макромолекулы, которые связываются со специфическими рецепторами на поверхности клеток, проходят внутрь через окаймленные ямки со значительно большей скоростью, чем вещества, поступающие в клетки за счет жидкофазного эндоцитоза. Следовательно, опосредуемый рецепторами эндоцитоз представляет собой избирательный концентрирующий механизм, позволяющий клеткам захватывать большие количества специфических лигандов без поглощения соответственно большого объема внеклеточной жидкости.

Важный процесс, идущий, как известно, при помощи опосредуемого рецепторами эндоцитоза, – это поглощение животными клетками холестерола из внеклеточной среды. За счет этого обеспечивается бо́льшая часть потребности клеток в холестероле, необходимом для синтеза мембран. Если такое проник-

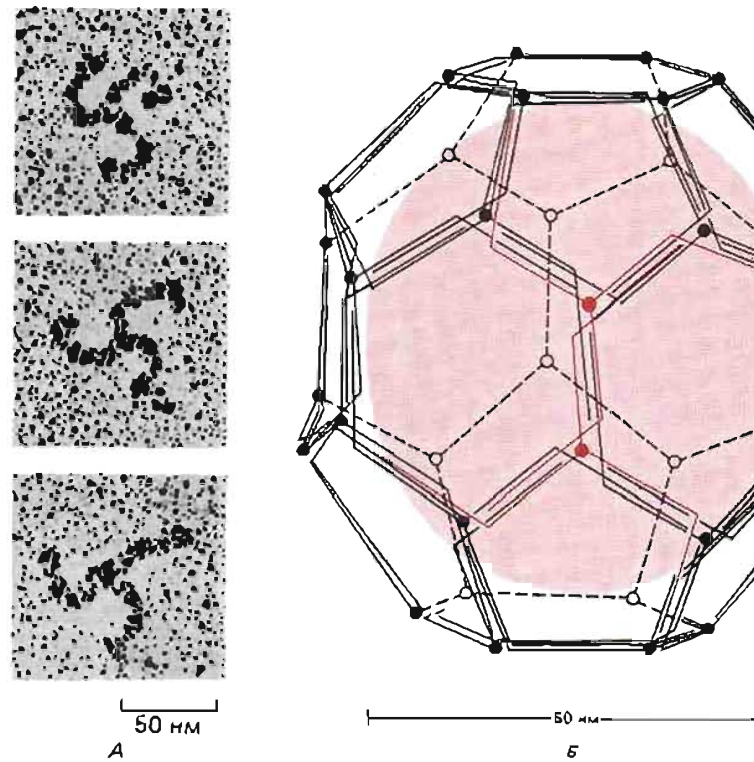


Рис. 6-75. Структура клатриновой оболочки окаймленного пузырька. *А*. Электронные микрофотографии клатриновых трискелионов, оттененных платиной. Каждый трискелион, по-видимому, состоит из трех полипептидных цепей клатрина и трех более коротких полипептидных цепей. *Б*. Схема возможного расположения трискелионов на цитоплазматической поверхности окаймленного пузырька. 36 трискелионов образуют сеть из 12 пятиугольников и 8 шестиугольников. Два трискелиона показаны в цвете. Другие окаймленные пузырьки, как полагают, сконструированы аналогичным образом из 12 пятиугольников и различного числа шестиугольников. То, что гибкие концы трискелионов перекрышаются друг с другом, обеспечивает как механическую прочность, так и подвижность всей структуры. (*А* – E. Ungewickell, D. Branton, Nature, 289, 420–422, 1981; *Б* – на основе R. A. Crowther, B. M. F. Pearse, J. Cell Biol., 91, 790–797, 1981.)

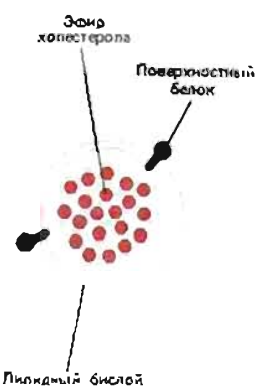


Рис. 6-76. Схематическое изображение липопротеиновой частицы низкой плотности (ЛНП) в поперечном разрезе. Каждая частица содержит две копии одного белка (250 000 дальтон), ответственного за связывание ЛНП с рецепторами на поверхности клетки.

новение холестерола в клетки заблокировать, то холестерол накапливается в крови и может способствовать образованию атеросклеротических бляшек на стенках кровеносных сосудов. Основная часть холестерола переносится кровью в виде комплексов с белком, которые известны под названием **липопротеинов низкой плотности** или ЛНП. Эти комплексы представляют собой большие сферические частицы (22 нм в диаметре), каждая из которых имеет сердцевину, заполненную 1500 молекулами холестерола, связанными сложноэфирными связями с длинными цепями жирных кислот. Сердцевина ЛНП окружена липидным бислоем, содержащим белок одного-единственного типа (рис. 6-76).

Когда животной клетке необходим холестерол для синтеза мембраны, она производит белки-рецепторы ЛНП и встраивает их в плазматическую мембрану. Большинство этих рецепторных белков самопроизвольно включается в состав окаймленных ямок, а включение в ямки остальных рецепторных белков индуцируется связыванием с ЛНП. Все ЛНП-частицы, связавшиеся с ЛНП-рецепторами, быстро проникают внутрь клетки, поскольку окаймленные ямки постоянно отщепляются, образуя окаймленные пузырьки. Эти пузырьки быстро теряют свою кайму и сливаются с другими пузырьками, образуя более крупные пузырьки, называемые *эндосомами*. Эндосомы в свою очередь сливаются с первичными лизосомами, в результате чего формируются вторичные лизосомы. Таким образом, через 10–15 мин после связывания с рецепторами на поверхности клетки ЛНП доставляются к лизосомам, где эфиры холестерола гидролизуются до свободного холестерола, который может использоваться клеткой при синтезе новых мембран. Если в клетке скопилось слишком много холестерола, то его синтез, а также синтез белков-рецепторов ЛНП подавляются, в результате чего холестерола и меньше производится, и меньше поглощается извне (рис. 6-77).

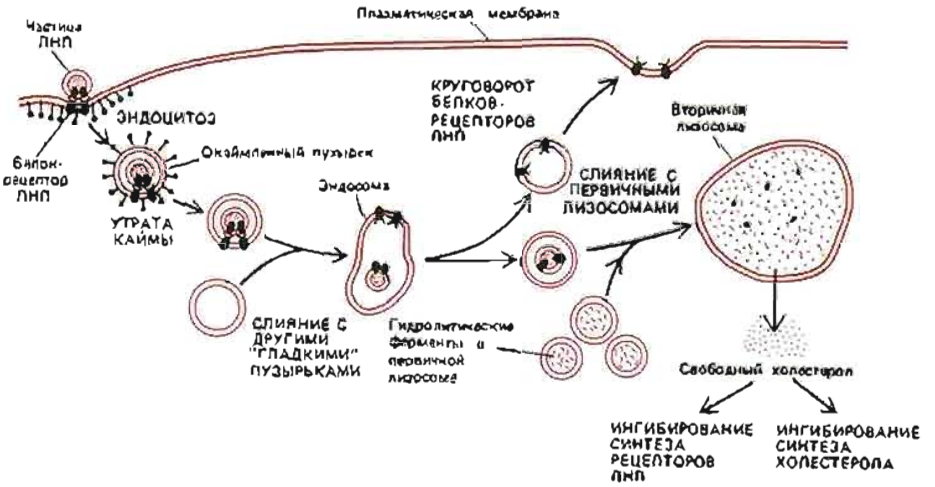


Рис. 6-77. Опосредуемый рецепторами эндоцитоз ЛНП регулирует уровень холестерола в клетке через окаймленные ямки и пузырьки. Обратите внимание, что, в то время как ЛНП разрушаются во вторичных лизосомах, белки-рецепторы ЛНП исключаются из эндосом и возвращаются опять в плазматическую мембрану.

Этот путь нарушается у некоторых индивидуумов, унаследовавших дефектные гены белков-рецепторов ЛНП: их клетки не способны поглощать ЛНП из крови. Обусловленный этим дефектом высокий уровень холестерола в крови создает у таких индивидуумов предрасположение к преждевременному атеросклерозу, так что большинство из них умирает в раннем возрасте от коронарной болезни сердца. Аномалия может быть связана с утратой рецепторами участка связывания либо с ЛНП, либо с окаймленной ямкой. В последнем случае имеется достаточное число белков-рецепторов ЛНП, но они не собираются в окаймленных участках плазматической мембраны (рис. 6-78). ЛНП связываются с поверхностью таких мутантных клеток, однако внутрь они не проникают. Это прямо доказывает важность окаймленных ямок в опосредуемом рецепторами эндоцитозе холестерола.

Как и другие рециркулирующие компоненты мембраны эндоцитозных пузырьков, белки-рецепторы ЛНП, входящие внутрь клетки, в основном не разрушаются в лизосомах, а быстро возвращаются в плазматическую мембрану, где вновь ассоциируют с окаймленными ямками и опять поступают в клетку (рис. 6-77).

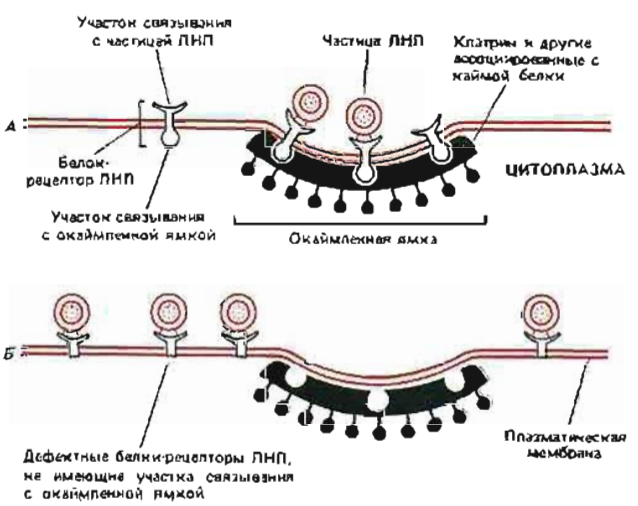


Рис. 6-78. Схема, показывающая как белки-рецепторы ЛНП связываются с участками окаймленных ямок в плазматической мембране нормальной клетки (*А*). Обратите внимание, что некоторые рецепторы ЛНП ассоциируют с окаймленными ямками, даже не будучи связанными с ЛНП. *Б*. Мутантная клетка: белки-рецепторы ЛНП дефектны вследствие отсутствия у них участков, которые дают им возможность связываться с окаймленными ямками. Такие клетки связывают ЛНП, но не могут поглощать их.

6.5.8. Многие рецепторы на поверхности клетки ассоциируют с окаймленными ямками только после связывания лиганда [40]

Многие поверхностные рецепторы клеток, проникающие внутрь через окаймленные ямки, ассоциируют с последними только после того, как свяжут лиганд. Например, белок-рецептор гормона инсулина диффузно распределен по поверхности фибробластов. После того как молекулы инсулина связались с рецепторами, образовавшиеся комплексы ассоциируют с окаймленными ямками и проникают внутрь клетки. Создается впечатление, что связывание инсулина изменяет конформацию белка-рецептора таким образом, что рецептор теперь узнается каким-то белковым компонентом окаймленной ямки. В данном случае многие проникшие внутрь рецепторы инсулина деградируют в лизосомах вместе с инсулином, и в результате концентрация инсулиновых рецепторов на поверхности клетки снижается. Посредством такого механизма регуляции, обеспечивающего уменьшение числа рецепторов при повышении уровня гормона (receptor down regulation), концентрация гормона во внеклеточной жидкости может регулировать концентрацию соответствующего рецептора на клеточной поверхности (т. 3, разд. 13.4.1).

Не весь эндоцитоз идет через окаймленные ямки: эндоцитозные пузырьки формируются также и в неокаймленных участках плазматической мембраны. Однако до сих пор неизвестно, в какой пропорции в жидкофазном эндоцитозе участвуют гладкие и окаймленные пузырьки.

6.5.9. Некоторые макромолекулы могут прямо проходить через клеточные мембраны [41]

Хотя большинство макромолекул транспортируется через клеточные мембраны посредством эндоцитоза или экзоцитоза, имеются особые случаи, когда большие молекулы проникают прямо через клеточные мембраны. У бактерий специальные каналы дают возможность молекулам ДНК проходить через клеточную мембрану и таким образом обеспечивают генетический обмен. Например, в процессе *генетической трансформации* геном бактерий некоторых типов может быть изменен, если эти бактерии поместить в среду, содержащую очищенную ДНК. В эукариотических клетках секретируемые белки непосредственно во время своего синтеза прямо проходят через мембрану шероховатого эндоплазматического ретикулума (разд. 7.3.7). Кроме того, некоторые бактериальные белковые токсины способны проникать через мембраны животных клеток и проявлять свое действие в цитозоле. Во всех этих примерах макромолекулы, видимо, проходят сквозь мембрану без образования пузырьков, однако ни в одном случае механизм проникновения не установлен.



Рис. 6-79. Полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа фотография полиморфноядерного лейкоцита, поглощающего посредством фагоцитоза дрожжевую клетку. (J. Boyles, D. F. Bainton, Cell, 24, 905–914, 1981.)

6.5.10. Специальные клетки-фагоциты поглощают частицы, связывающиеся со специфическими рецепторами на их поверхности [37, 42]

У простейших фагоцитоз – это форма питания: крупные частицы захватываются в фагоцитозные вакуоли, которые сливаются с лизосомами. Продукты переваривания проникают затем в цитозоль и используются в качестве пищи. В многоклеточных организмах большинство клеток не способно эффективно поглощать крупные частицы. Эту роль выполняют здесь «профессиональные» фагоциты. У млекопитающих существуют два класса лейкоцитов, осуществляющих фагоцитоз: **макрофаги** (широко распространенные как в тканях, так и в крови) и **полиморфноядерные лейкоциты** (называемые также полиморфами или нейтрофилами). Эти два типа клеток защищают нас от инфекции, поглощая вторгшиеся микроорганизмы (рис. 6-79). Макрофаги

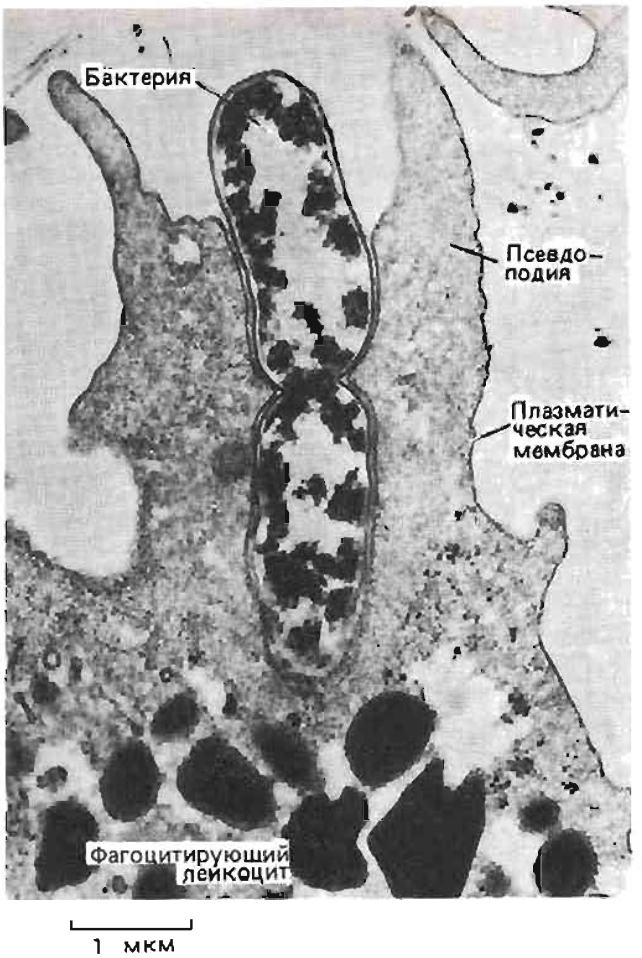


Рис. 6-80. Электронная микрофотография полиморфноядерного лейкоцита, поглощающего посредством фагоцитоза бактерию, которая находится в процессе деления. (С любезного разрешения Dorothy F. Bainton.)

играют важную роль также и в утилизации старых или поврежденных клеток и клеточных обломков. В количественном отношении последняя функция особенно важна: в каждом из нас макрофаги ежедневно поглощают посредством фагоцитоза более чем 10^{11} старых эритроцитов. Фагоцитозные вакуоли в фагоцитах так же, как и у простейших, сливаются с первичными лизосомами и формируют вторичные лизосомы, в которых захваченный материал деградирует. Неперевариваемые вещества остаются во вторичных лизосомах, образуя *остаточные тельца*.

Для того чтобы частица оказалась поглощенной посредством фагоцитоза, она сначала должна связаться на поверхности фагоцита. Однако не все связывающиеся частицы попадают внутрь клетки. Фагоциты имеют множество специализированных поверхностных рецепторов, функционально связанных с фагоцитозным аппаратом клетки. Наилучшим образом охарактеризованы те из них, которые узнают молекулы антител. Один из основных путей защиты от инфекционных микроорганизмов с помощью антител заключается в том, что антитела связываются с поверхностью микроорганизма и образуют оболочку, которая затем узнается специфическими рецепторами на поверхности макрофагов и полиморфноядерных лейкоцитов. Связывание частиц, имеющих оболочку из антител, с этими рецепторами вызывает образование в плазматической мембране клетки псевдоподий, которые обволакивают частицу и сливаются вместе, образуя фагоцитозную вакуоль (рис. 6-80).

Очень мало известно о рецепторах других типов, обеспечивающих фагоци-

тоз. Теперь уже ясно, что фагоциты могут узнавать и поглощать старые и поврежденные клетки и некоторые микроорганизмы, однако, что́ именно они узнают, когда в процессе не участвуют антитела, предстоит еще открыть.

6.5.11. Фагоцитоз – это локальная ответная реакция, осуществляющаяся путем «застегивания» мембраны по принципу застежки-молнии [43]

Эритроциты можно обработать таким образом, что они будут связываться на поверхности макрофагов, но не подвергнутся фагоцитозу. Если адсорбировавшим их макрофагам предоставить затем возможность осуществить фагоцитоз бактерий, имеющих оболочки из антител, то будут поглощаться лишь бактерии, а эритроциты, даже расположенные в непосредственной близости от места активного фагоцитоза, не будут захватываться. Это говорит о том, что фагоцитоз, как и экзоцитоз, представляет собой локальную ответную реакцию участка плазматической мембраны и лежащих под ней цитоплазматических структур.

Если макрофаг связывается с лимфоцитами, равномерно покрытыми антителами, он поглощает такие клетки. Однако если молекулы антител сосредоточены в результате кэппинга на одном полюсе клетки (разд. 6.2.12), то плазматическая мембрана макрофага сближается с поверхностью лимфоцита только на участке «колпачка», и фагоцитоза не происходит (рис. 6-81). Отсюда следует, что первоначального взаимодействия покрытых антителами клеток с рецепторами на поверхности макрофага не достаточно, чтобы вызвать поглощение этих клеток. Связывание лимфоцита с макрофагом лишь инициирует постепенно распространяющийся процесс соединения мембран, для осуществления которого требуется непрерывный контакт рецепторов с антителами: только при этом условии поглощаемая клетка оказывается полностью окруженной фагоцитозной вакуолью. Это свидетельствует о том, что фагоцитоз происходит путем «застегивания» мембран с помощью механизма, действующего наподобие застежки-молнии.

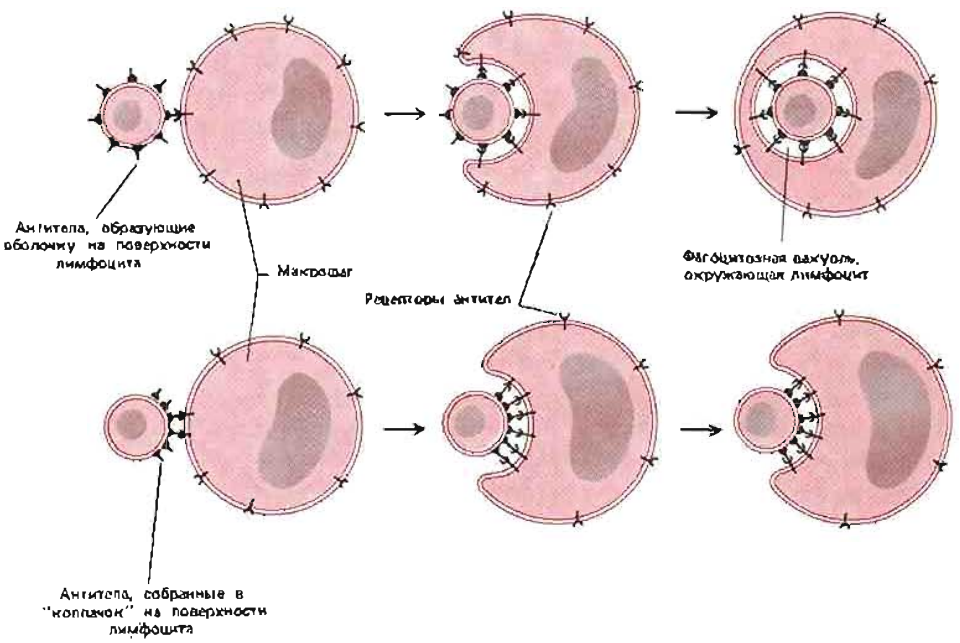


Рис. 6-81. Схема эксперимента, свидетельствующего о том, что фагоцитоз осуществляется путем «застегивания» мембран по принципу застежки-молнии (см. текст).

6.5.12. Транспорт через мембраны, осуществляемый посредством пузырьков: каким образом он приводится в действие, направляется и регулируется?

Пузырьки осуществляют транспорт различных веществ путем быстрого и непрерывного челночного перемещения между различными окруженными мембраной органеллами эукариотической клетки. Экзоцитоз и эндоцитоз через плазматическую мембрану – лишь наиболее известные примеры этого сложного процесса. Несмотря на важность везикулярного транспорта, поразительно мало известно о молекулярных механизмах, приводящих в действие, направляющих и регулирующих его. Очевидно, что для подобных процессов требуется метаболическая энергия, возможно, в виде гидролиза АТР, однако неизвестно, как эта энергия используется. Существуют данные, что актин и миозин (и некоторые связанные с ними белки) участвуют в формировании и движении псевдоподий при фагоцитозе, но неясно, играют ли эти белки какую-либо роль в жидкофазном и опосредуемом рецепторами эндоцитозе, а также в экзоцитозе и перемещении пузырьков от одной мембраны к другой в пределах клетки.

Как пузырьки узнают, куда им надо двигаться? На их цитоплазматических поверхностях, очевидно, имеются специальные молекулы, направляющие пузырьки к соответствующей мембране, однако о природе и разнообразии этих молекул ничего не известно. Можно предположить, что непрерывное слияние мембран, имеющее место при опосредуемом пузырьками транспорте, приводит к значительному перемешиванию мембранных компонентов, однако различные мембраны в клетке сохраняют свой характерный состав. Подобное постоянство означает, что в клетке должны существовать специальные механизмы, восстанавливающие мембраны после их перемешивания. Но каким образом специфические мембранные компоненты узнаются и селективно удаляются, например, из эндосомных и плазматической мембран после слияния с ними пузырьков? Эта проблема будет подробно обсуждаться в следующей главе.

Заключение

Большинство клеток секретирует и поглощает макромолекулы посредством соответственно экзоцитоза и эндоцитоза. При экзоцитозе содержимое особых внутриклеточных пузырьков (везикул) высвобождается наружу, когда они сливаются с плазматической мембраной. При эндоцитозе процесс идет в обратной последовательности: локальные участки плазматической мембраны впячиваются и отщепляются, в результате чего формируются мелкие (пиноцитозные) или крупные (фагоцитозные) пузырьки. Большинство эндоцитозных пузырьков в конце концов сливается с первичными лизосомами. При этом образуются вторичные лизосомы, в которых переваривается большая часть макромолекулярного содержимого пузырьков. Основная же часть мембранных компонентов пузырьков каким-то образом удаляется из вторичных лизосом и возвращается в плазматическую мембрану. Оба процесса – и экзоцитоз, и эндоцитоз – представляют собой локальные ответные реакции плазматической мембраны и находящейся под ней цитоплазмы.

Большинство животных клеток непрерывно осуществляет эндоцитоз фрагментов своей плазматической мембраны, формируя эндоцитозные пузырьки. Таким путем поглощается внеклеточная жидкость и растворенные в ней вещества – этот процесс называется жидкофазным эндоцитозом. Одни пузырьки образуются из гладких участков плазматической мембраны, тогда как другие – из окаймленных участков, называемых окаймленными ямками. Окаймленные ямки и пузырьки обеспечивают особый путь для концентрации и поглощения тех внеклеточных макромолекул, которые связываются со специфическими белками-рецепторами, локализованными в окаймленных ямках; этот процесс называется опосредуемым рецепторами эндоцитозом. Крупные

внеклеточные частицы, такие, как обломки клеток или инфекционные организмы, захватываются «профессиональными» фагоцитами – клетками, имеющими на своей поверхности специализированные рецепторы различных типов, обеспечивающие фагоцитоз.

Литература

Общая

Bretscher M.S., Raff M.C. Mammalian plasma membranes, Nature, **258**, 43–49, 1975.
Finean J.B., Coleman R., Michell R.H. Membranes and Their Cellular Functions, 2nd ed., pp. 42–67, London, Blackwell, 1978.
Harrison R., Lunt G.G. Biolodical Membranes, Glasgow, Blackie, 1980.
Quinn P.J. The Molecular Biology of Cell Membranes, Baltimore, University Park Press, 1976.
Singer S.J., Nicolson G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, Science, **175**, 720–731, 1972.
Weissmann G., Claiborne R., eds. Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology, New York, Hospital Practice, 1975.

Цитированная

1. *Gorter E., Grendel F.* On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood, J. Exp. Med., **41**, 439–443, 1925.
2. *Ansell G.B., Hawthorne J.N., Dawson R.M.C.* Form and Function of Phospholipids, 2nd ed., Amsterdam, Elsevier, 1973.
3. *Bangham A.D.* Models of cell membranes. In: Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology (G. Weissmann, R. Claiborne, eds.), pp. 24–34, New York, Hospital Practice, 1975.
   Kornberg R.D., McConnell H.M. Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68**, 2564–2568, 1971.
   Quinn A.J., ed. The Molecular Biology of Cell Membranes, pp. 47–75., Baltimore, University Park Press, 1976.
   Cantor C.R., Schimmel P.R. Biophysical Chemistry, Part III, pp. 1348–1377, San Francisco, Freeman, 1980.
4. *Chapman D.* Lipid dynamic in cell membranes. In: Cell Membranes, Biochemistry, Cell Biology and Pathology (G. Weissmann, R. Claiborne, eds.), pp. 13–22, New York, Hospital Practice, 1975.
   Quinn A.J., Chapman D. The dynamics of membrane structure, CRC Crit. Rev. Biochem., **8**, 1–117, 1980.
   Kimelberg H.K. The influence of membrane fluidity on the activity of membrane-bound ensymes. In: Dynamic Aspects of Cell Surface Organization, Cell Surface Reviews (G. Poste, G.L. Nicolson, eds.), Vol. 3, pp. 205–293, Amsterdam, Elsevier, 1977.
5. *Stryer L.* Biochemistry, 2nd ed., pp. 206–215, San Francisco, Freeman, 1981.
6. *Bretscher M.* Membrane structure: some general principles, Science, **181**, 622–629, 1973.
   Rothman J., Lenard J. Membrane asymmetry, Science, **195**, 743–753, 1977.
7. *Fishman P.H., Brady R.O.* Biosynthesis and function of gangliosides, Science, **194**, 906–915, 1976.
   Hakomori S. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis, Annu. Rev. Biochem., **50**, 733–764, 1981.
   Wiegandt H. The gangliosides, Adv. Neurochem., **4**, 149–223, 1982.
8. *Singer S.J., Nicolson G.L.*, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, Science, **175**, 720–731, 1972.
   Bretscher M.S., Raff M.C. Mammalian plasma membranes, Nature, **258**, 43–49, 1975.
   Helenius A., Simons K. Solubilization of membranes by detergents, Biochim. Biophys. Acta, **415**, 29–79, 1975
9. *Bretscher M.* Membrane structure: some general principles, Science, **181**, 622–629, 1973.
   Steck T.L. The organization of proteins in the human red blood cell membrane, J. Cell Biol., **62**, 1–19, 1974.
10. *Marchesi V.T.* Spectrin: present status of a putative cyto-skeletal protein of the red cell membrane, J. Membr. Biol., **51**, 101–131, 1979.

Branton D., Cohen C. M., Tyler J. Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane, Cell, **24**, 24–32, 1981.

11. *Marchesi V. T., Furthmayr H., Tomita M.* The red cell membrane, Annu. Rev. Biochem., **45**, 667–698, 1976.
12. *Steck T. L.* The band 3 protein of the human red cell membrane: a review, J. Supramol. Struct., **8**, 311–324, 1978.

Cabantchik Z. I., Knauf P. A., Rothstein A. The anion transport system of the red blood cell, The role of membrane protein evaluated by the use of "probes". Biochim. Biophys. Acta, **515**, 239–302, 1978.

13. *Henderson R., Unwin P. N. T.* Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy, Nature, **257**, 28–32, 1975.
14. *Branton D.* Fracture face of frozen membranes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **55**, 1048–1056, 1966.

McNutt N. S. Freeze-fracture techniques and applications to the structural analysis of the mammalian plasma membrane. In: Dynamic Aspects of Cell Surface Organization. Cell Surface Reviews (G. Poste, G. L. Nicolson, eds.), Vol. 3, pp. 95–126, Amsterdam, Elsevier, 1977.

15. *Juliano R. L.* Techniques for the analysis of membrane glycoproteins, Curr. Top. Memb. Transp., **11**, 107–144, 1978.
16. *Frye L. D., Edidin M.* The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons, J. Cell Sci., 7, 319–335, 1970.
17. *de Petris S., Raff M. C.* Normal distribution, patching and capping of lymphocyte surface immunoglobulin studied by electron microscopy, Nature New Biol., **241**, 257–259, 1973.

Raff M. C. Cell-surface immunology, Sci. Am., **234**(5), 30–39, 1976.

18. *Taylor R. B., Duffus W. P. H., Raff M. C., de Petris, S.* Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody, Nature New Biol., **233**, 225–229, 1971.

Schreiner G. F., Unanue E. R. Membrane and cytoplasmic changes in B lymphocytes induced by ligand-surface immunoglobulin interaction, Adv. Immunol, **24**, 38–165, 1976.

de Petris S. Distribution and mobility of plasma membrane components on lymphocytes. In: Dynamic Aspects of Cell Surface Organization, Cell Surface Reviews (G. Poste, G. L. Nicolson, eds.), Vol. 3, pp. 643–728, Amsterdam, Elsevier, 1977.

Abercrombie M., Heaysman J. E. M., Pegrum S. M. The locomotion of fibroblasts in culture. III. Movements of particles on the dorsal surface of the leading lamella, Exp. Cell Res., **62**, 389–398, 1970.

19. *Bretscher M. S.* Directed lipid flow in cell membranes, Nature, **260**, 21–23, 1976.

de Petris S. Distribution and mobility of plasma components on lymphocytes. In: Dynamic Aspects of Cell Surface Organization. Cell Surface Reviews (G. Poste, G. L. Nicolson, eds.), Vol. 3, pp. 643–728, Amsterdam, Elsevier, 1977.

20. *Poo M., Cone R. A.* Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane, Nature, **247**, 438–441, 1974.

Jacobson K., Elson E., Koppel D., Webb W. Fluorescence photobleaching in cell biology, Nature, **295**, 283–284, 1982.

21. *Hirano H., Parkhouse B., Nicolson G. L., Lennox E. S., Singer S. J.* Distribution of saccharide residues on membrane fragments from a myeloma-cell homogenate: its implications for membrane biogenesis, Proc. Natl. Acad. Sci USA, **69**, 2945–2949, 1972.

Luft J. H. The structure and properties of the cell surface coat, Int. Rev. Cytol., **45**, 291–382, 1976.

22. *Roseman S.* Sugars of the cell membrane. In: Cell Membranes: Biochßmistry, Cell Biology and Pathology (G. Weissmann, R. Claiborne, eds.), pp. 55–64, New York, Hospital Practice, 1975.

Kornfeld R., Kornfeld S. Structure of glycoproteins and their oligosaccharide units. In: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans (W. J. Lennarz, ed.), pp. 1–84, New York, Plenum, 1980.

Neufeld E. F., Ashwell G. Carbohydrate recognition systems for receptor-mediated pinocytosis. In: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans (W. J. Lennarz, ed), pp. 241–266, New York, Plenum, 1980.

23. *Gomperts B. D.* The Plasma Membrane: Models for Its Structure and Function, New York, Academic Press, 1976.
24. *Finean J. B., Coleman R., Michell R. H.* Membranes and Their Cellular Functions, 2nd ed., pp. 42–67, London, Blackwell, 1978.

Christensen H. N. Biological Transport, 2nd ed. Reading, Pa., Benjamin, 1975.
Wilson D. B. Cellular transport mechanisms, Annu. Rev. Biochem., **47**, 933–965, 1978.
25. *Singer S. J.* Termodynamics, the structure of integral membrane proteins and transport, J. Supramol. Struct., **6**, 313–323, 1977.
Hobbs A. S., Albers R. W. The structure of proteins involved in active membrane transport. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., **9**, 259–291, 1980.
26. *Kuffler S. W., Nicholls J. G.* From Neuron to Brain: A Cellular Approach to the Function of the Nervous System, pp. 88–98, Sunderland, Ma., Sinauer, 1977.
27. *Skou J. C., Norby J. G., eds.* $Na^+ - K^+$ ATPase: Structure and Kinetics, New York, Academic Press, 1979.
Racker E. Reconstitution and mechanism of action of ion pumps. In: A New Look at Mechanisms in Bioenergetics, pp. 127–152, New York, Academic Press, 1976.
28. *Sweadner K. J., Goldin S. M.* Active transport of sodium and potassium ions: mechanism, function and regulation, N. Engl. J. Med., **302**, 777–783, 1980.
29. *MacLennan D. H., Campbell K. P.* Structure, function and biosynthesis of sarcoplasmic reticulum proteins, Trends Biochem. Sci., **4**, 148–151, 1979.
de Meis L., Vianna A. L. Energy interconversion by the Ca^{2+}-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum, Annu. Rev. Biochem., **48**, 275–292, 1979.
30. *Racker E.* A New Look at Mechanisms in Bioenergetics, New York, Academic Press, 1976.
31. *Postma P. W., Poseman S.* The bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system, Biochim. Biophys. Acta, **457**, 213–257, 1976.
Oxender D., Quay S. Binding proteins and membrane transport, Ann. N. Y. Acad. Sci., **264**, 358–372, 1975.
32. *Stevens C. F.* The neuron. Sci. Am., **241** (3), 54–65, 1979.
33. *Jaffe L. F.* Control of development by steady ionic currents, Fed. Proc., **40**, 125–127, 1981.
34. *Pressman B. C.* Biological applications of ionophores, Annu. Rev. Biochem., **45**, 501–530, 1976.
35. *Palade G.* Intracellular aspects of the process of protein synthesis, Science, **189**, 347–358, 1975.
Rubin R. F. The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones, Pharmacol. Rev., **22**, 389–428, 1970.
36. *Lawson D., Fewtrell C., Raff M.* Localized mast cell degranulation induced by concanavalin A-sepharose beads: implications for the Ca^{2+} hypothesis of stimulus-secretion coupling, J. Cell Biol., **79**, 394–400, 1978.
37. *Silverstein S. C., Steinman R. M., Cohn Z. A.* Endocytosis, Annu. Rev. Biochem., **46**, 669–772, 1977.
38. *Simionescu N., Simionescu M., Palade G. E.* Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides: evidence for the existence of patent transendothelial channels, J. Cell Biol., **64**, 586–607, 1975.
39. *Roth T. F., Porter K. R.* Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito, *Aedas aegypti*, J. Cell Biol., **20**, 313–332, 1964.
Goldstein J. L., Anderson R. G. W., Brown M. S. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis, Nature, **279**, 679–685, 1979.
Pearse B. M. F., Bretscher M. S. Membrane recycling by coated vesicles, Annu. Rev. Biochem., **50**, 85–101, 1981.
Ungewickell E., Branton D. Assembly units of clathrin coats, Nature, **289**, 420–422, 1981.
40. *Pastan I. H., Willingham M. C.* Receptor-mediated endocytosis of hormones in cultured cells, Annu. Rev. Physiol., **43**, 239–250, 1981.
41. *Smith H. O., Danner D. B., Deich R. A.* Genetic transformation, Annu. Rev. Biochem., **50**, 41–68, 1981.
42. *Stossel T. P.* Phagocytosis, N. Engl. J. Med., **290**, 717–723, 774–780, 833–839, 1974 (in three parts).
43. *Griffin F. M., Jr., Silverstein S. C.* Segmental response of the macrophage plasma membrane to a phagocytic stimulus, J. Exp. Med., **139**, 323–336, 1974.
Griffin F. M., Jr., Griffin J. A., Silverstein S. C. Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived lymphocytes, J. Exp. Med., **144**, 788–809, 1976.

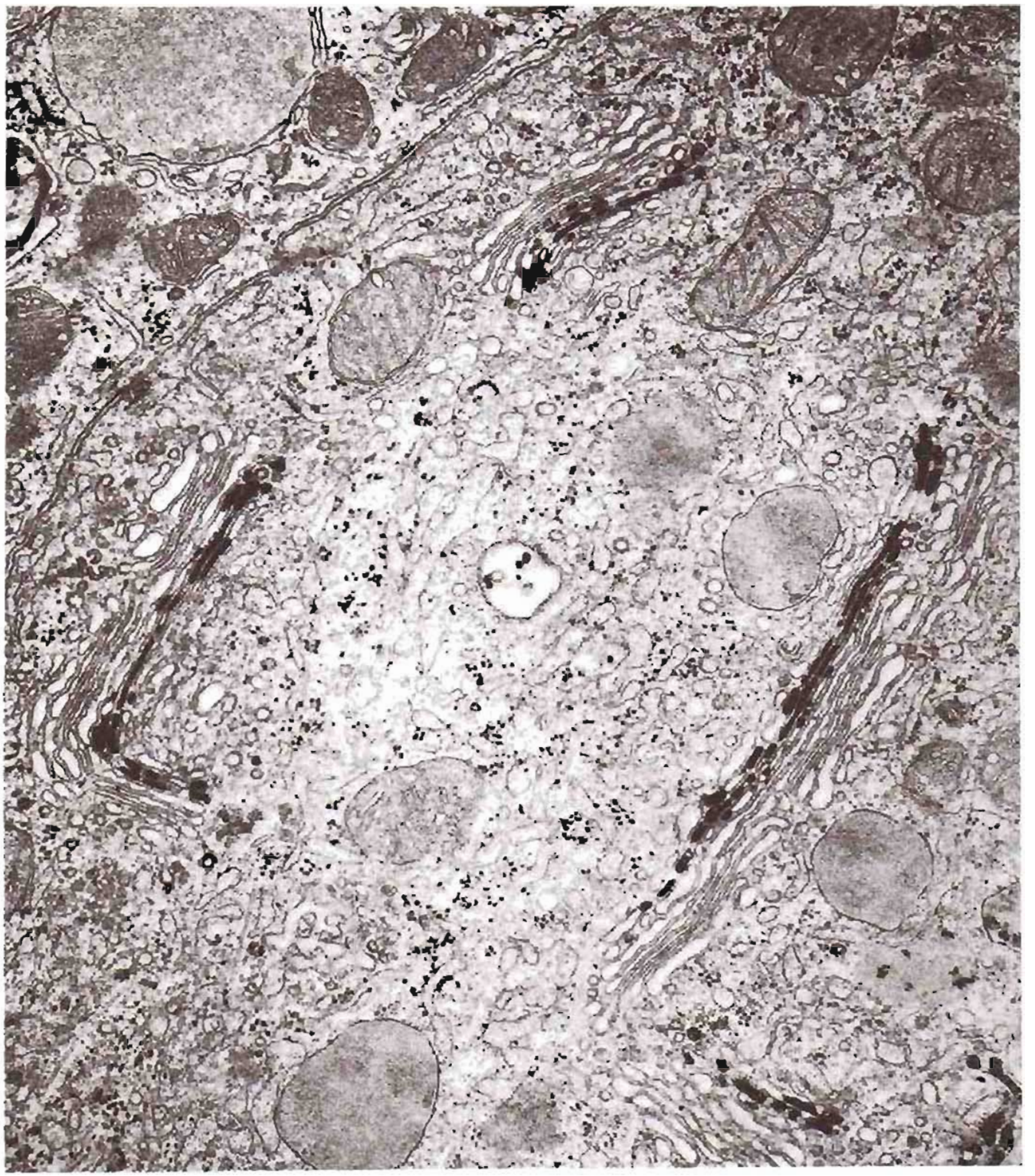
7 Внутренние мембраны и синтез макромолекул

Бо́льшая часть массы клетки приходится на цитоплазму. Она представляет собой чрезвычайно сложную смесь больших и малых молекул, в которой содержится приблизительно 70% воды и 15–20% белка (по весу), при этом в цитоплазме типичной животной клетки насчитывается около 10 млрд. белковых молекул, относящихся примерно к 10000 различных типов. Когда живую клетку рассматривают при большом увеличении под световым микроскопом, ее цитоплазма выглядит как довольно аморфное гелеподобное вещество, в котором рассеяны отдельные частицы, быстро перемещающиеся в разных направлениях. Однако цитоплазма гораздо более высоко организована, чем можно предположить, исходя из этого наблюдения. С помощью электронного микроскопа в ней обнаруживается множество разнообразных *органелл*, каждая из которых содержит специфический набор белков и выполняет определенную функцию. Цитоплазма, окружающая эти органеллы, называется *цитозолем*. Он пронизан густой сетью белковых филаментов, составляющих *цитоскелет*. Многие белки прямо или косвенно связаны с цитоскелетом. Кроме того, почти все белки обладают избирательным сродством к каким-либо другим белкам, так что группы белковых молекул соединяются друг с другом и образуют крупные кластеры, которые непрерывно то появляются, то исчезают. Поскольку при попытках исследовать организацию цитоплазмы ее структурно-функциональная целостность нарушается, детали ее сложного устройства пока еще плохо изучены. Тем не менее необходимо понять, как организована цитоплазма, чтобы выяснить, как устроена клетка. С чего же в таком случае следует начинать? Можно, например, "разобрать" цитоплазму белок за белком, определив для каждого из них детальную структуру и химические свойства. Альтернативный подход заключается в расчленении цитоплазмы на ее различные внутренние отсеки (компартменты) с целью исследовать их функции и химические особенности в изолированном состоянии. Именно этим подходом мы и будем руководствоваться в данной главе, рассматривая по очереди функции цитозоля, эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи, пероксисомы и лизосомы; две другие органеллы, участвующие в преобразовании энергии,–митохондрию и хлоропласт–мы подробно обсудим в гл. 9 (т. 3), а цитоскелет–в гл. 10 (т. 3).

7.1. Компартментализация в клетках высших организмов [1]

7.1.1. Крупным эукариотическим клеткам необходимы внутренние мембраны

Многие важные биохимические процессы протекают внутри мембран или на их поверхностях. Например, окислительное фосфорилирование и фотосинтез нуждаются в полупроницаемой мембране для сопряжения транспорта протонов с синтезом АТР. Более того, сами мембраны служат основой для синтеза новых мембранных компонентов. У прокариот, таких, как бактерии, все эти функции (и многие другие) выполняются плазматической мембраной – обычно единственной мембраной в клетке.



Электронная микрофотография участка цитоплазмы в клетке млекопитающих. Цистерны, расположенные на *транс*-стороне каждой стопки цистерн Гольджи, выглядят темными благодаря красителю, выявляющему определенный фермент. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

Наиболее характерной чертой эукариотических клеток помимо наличия у них ядра является существование множества различных внутриклеточных органелл и пузырьков, ограниченных мембраной. Считается, что клеткам больших размеров необходимы системы внутренних мембран (т. 1, разд. 3.4.6). Типичная эукариотическая клетка по своим линейным размерам в 10 раз крупнее типичной бактерии, такой, как *E. coli*. Это означает, что у эукариот гораздо меньше отношение между площадью поверхности наружной мембраны и объемом клетки, чем у прокариот. Очевидно, что в этом случае одной плазматической мембраны не достаточно, чтобы расположить в ней все молекулы мембраносвязанных ферментов, катализирующих жизненно важные процессы, требующие участия мембран. По этой причине внутри самой клетки должно содержаться значительное количество дополнительных мембран.

7.1.2. Внутренние мембраны разделяют клетку на специализированные компартменты

В принципе площадь поверхности мембран эукариотических клеток могла бы быть увеличена просто за счет многократных впячиваний (или выпячиваний) плазматической мембраны. Однако внутренние мембраны эукариот отличаются по своим физическим и химическим свойствам как от плазматической мембраны, так и друг от друга. Они расчленяют клетку на функционально различающиеся компартменты, каждый из которых имеет границы, образованные герметичными, избирательно проницаемыми мембранами. Любой компартмент представляет собой как бы изолированный субклеточный реакционный сосуд, который может выполнять специализированные функции, определяемые уникальным набором ферментов, сконцентрированных и удерживаемых внутри этого сосуда с помощью ограничивающей его мембраны.

7.1.3. Даже сложные эукариотические клетки имеют лишь несколько основных внутриклеточных компартментов [2]

Различают семь основных клеточных компартментов, существующих в большинстве эукариотических клеток (рис. 7-1). Ядро – это место синтеза ДНК

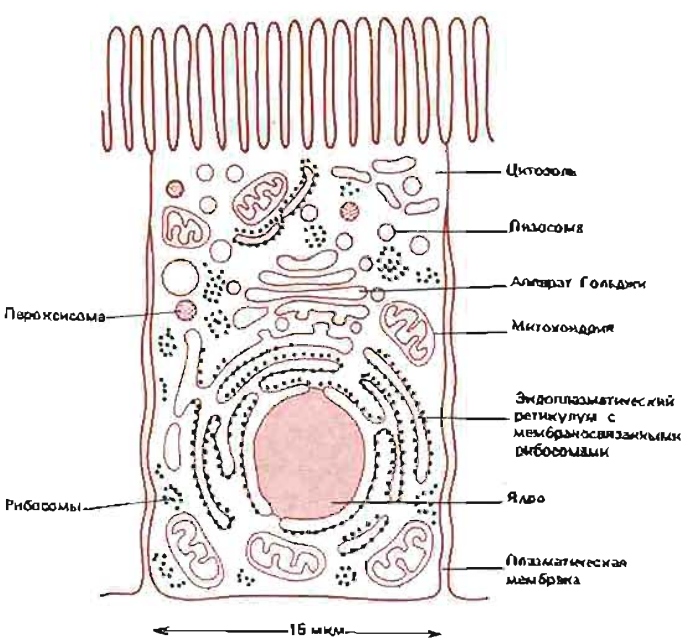


Рис. 7-1. Схематическое изображение основных внутриклеточных компартментов типичной животной клетки. Цитозоль, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, ядро, митохондрия, лизосома и пероксисома представляют собой индивидуальные компартменты, отделенные от остального содержимого клетки по крайней мере одной избирательно проницаемой мембраной.

Таблица 7-1. Относительные объемы, занимаемые основными внутриклеточными компартментами в типичной клетке печени (гепатоците)

Внутриклеточный компартмент	Проценты от общего объема клетки	Приблизительное число в одной клетке [1]
Цитозоль	54	1
Митохондрии	22	1700
Цистерны шероховатого эндоплазматического ретикулума	9	1
Цистерны гладкого эндоплазматического ретикулума и цистерны аппарата Гольджи	6	
Ядро	6	1
Пероксисомы	1	400
Лизосомы	1	300

[1] Все цистерны шероховатого и гладкого эндоплазматического ретикулума, как полагают, соединяются и образуют один крупный компартмент. Аппарат Гольджи представлен в каждой клетке рядом разрозненных групп собранных в стопки цистерн; в какой степени эти группы взаимосвязаны, окончательно не установлено.

и РНК. Окружающая его цитоплазма состоит из **цитозоля** и «суспендированных» в нем цитоплазматических органелл. Бо́льшая часть реакций промежуточного обмена клетки, включая синтез белка на свободных рибосомах, происходит в цитозоле. **Эндоплазматический ретикулум** (**ЭР**), несущий связанные с мембранами рибосомы, синтезирует все мембранные белки и белки, предназначенные для экспорта, равно как и мембранные липиды для всей клетки. **Аппарат Гольджи** ведет себя подобно регулировщику, направляя поток проходящих через него макромолекул в соответствующие внутриклеточные пункты назначения; при этом белки часто подвергаются ковалентным модификациям (например, избирательному расщеплению и гликозилированию). В **митохондриях** и (у растений) **хлоропластах** образуется большинство молекул АТР, необходимых для протекания энергетически невыгодных биосинтетических реакций. **Лизосомы** содержат множество пищеварительных ферментов, осуществляющих первичную деградацию макромолекул и частиц, захваченных клеткой извне. Наконец, **пероксисомы** (известные также под названием «микротельца») представляют собой маленькие пузырьки с ферментами, катализирующими разнообразные окислительные реакции. Следует отметить, что каждый ограниченный мембраной компартмент (органелла) кроме ряда общих свойств, не зависящих от типа клеток, обладает также дополнительными особенностями, варьирующими от одного типа клеток к другому. В совокупности все перечисленные органеллы занимают основную часть общего объема клетки (табл. 7-1). Другие виды органелл с более ограниченными функциями (такие, как пузырьки, в которых содержатся ферменты или гормоны, высвобождающиеся в ответ на определенный пусковой сигнал) имеются только в некоторых высокоспециализированных клетках.

На долю всех этих органелл приходится значительная часть общего количества внутриклеточных мембран. Например, в клетках млекопитающих двух разных типов (табл. 7-2) общая поверхность мембраны эндоплазматического ретикулума превышает поверхность плазматической мембраны соответственно в 25 и 12 раз. Как по площади, так и по массе плазматическая мембрана в подавляющем большинстве эукариотических клеток является лишь минорным мембранным компонентом (рис. 7-2).

Таблица 7-2. Значительная доля общего содержания мембран в эукариотической клетке приходится на внутриклеточные органеллы

Тип мембраны	Доля общего содержания клеточной мембраны, %	
	Гепатоцит печени[1]	Экзокринная клетка поджелудочной железы[1]
Плазматическая мембрана	2	5
Мембрана шероховатого ЭР	35	60
Мембрана гладкого ЭР	16	<1
Мембрана аппарата Гольджи	7	10
Митохондрии		
Наружная мембрана	7	4
Внутренняя мембрана	32	17
Ядро		
Внутренняя мембрана	0,2	0,7
Мембрана секреторных пузырьков	Не определено	3
Мембрана лизосом	0,4	Не определено
Мембрана пероксисом	0,4	Не определено

[1] Эти две клетки сильно различаются по величине, поскольку нормальный гепатоцит имеет объем около 5000 мкм^3, а экзокринная клетка – 1000 мкм^3. Общие площади клеточных мембран оцениваются соответственно в 110 000 и 13 000 мкм^2.

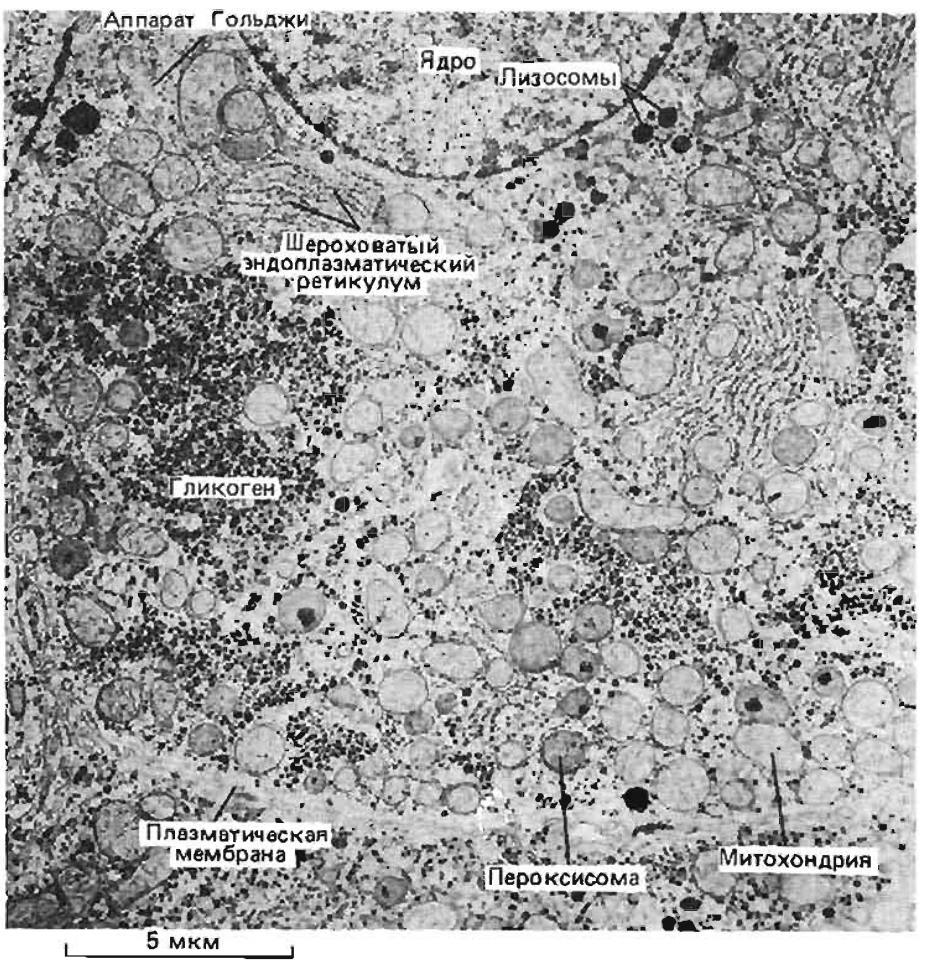


Рис. 7-2. Электронная микрофотография участка поперечного среза клетки печени. Показаны примеры основных внутриклеточных компартментов. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

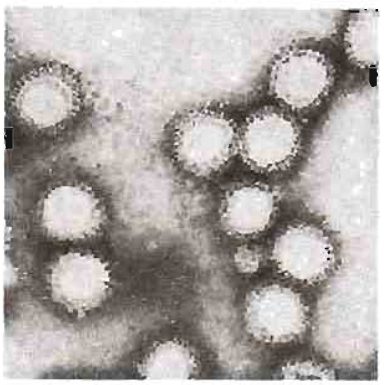
7.1.4. Внутриклеточные компартменты позволяют клетке осуществлять одновременно много несовместимых друг с другом химических реакций

Одна из функций внутриклеточных компартментов заключается в том, чтобы препятствовать «конкуренции» ферментативных реакций, способных помешать друг другу. К примеру, необходимые клетке белки синтезируются в цитозоле, а ненужные гидролизуются в лизосомах. Жирные кислоты, которые используются при биосинтезе мембран и служат в качестве энергетических резервов, также синтезируются в цитозоле, а расщепляются в митохондриях (как источник энергии). Как будет детально описано в этой главе, различные сахара присоединяются к белкам в эндоплазматическом ретикулуме, а удаляются или модифицируются позднее в аппарате Гольджи.

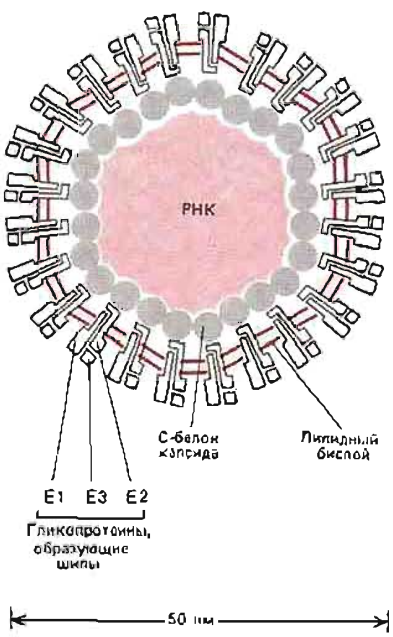
Пероксисомы служат наиболее ярким примером, иллюстрирующим значение компартментализации. Они представляют собой маленькие (0,1–1 мкм в диаметре) пузырьки, в которых находится ряд важных окислительных ферментов (разд. 7.5.8). Один из продуктов окислительных реакций – это перекись водорода (H_2O_2), образующаяся в реакциях типа

$$RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2,$$

где R – небольшая органическая молекула, которая подвергается окислению. Перекись водорода – чрезвычайно сильный окислитель, способный убить клетку. Однако пероксисомы содержат также фермент каталазу, расщепляющий H_2O_2 до H_2O и O_2. Таким образом, перекись водорода деградирует в том же месте, где и синтезируется и ничего не может разрушить в цитозоле.



А



Б

Рис. 7-3. Структура вируса леса Семлики. *А*. Электронная микрофотография нескольких целых вирусных частиц, полученная методом негативного контрастирования. (*С любезного разрешения Kai Simons.*) *Б*. Схематическое изображение вируса в поперечном разрезе. Каждая вирусная частица содержит около 240 копий С-белка капсида и приблизительно 240 копий гликопротеиновых комплексов, образующих шипы. Внешняя оболочка вируса состоит из гликопротеинов (шипов), встроенных в липидный бислой мембраны.

7.1.5. С помощью вирусов удается обнаружить, что между компартментами клетки-хозяина существуют высокоорганизованные пути сообщения [3]

В геноме многих вирусов животных содержится очень ограниченное количество нуклеиновой кислоты, достаточное для образования всего лишь 4–5 генов. В большинстве своем эти гены кодируют структурные белки зрелой вирусной частицы (или вириона). Из-за чрезвычайно низкой информационной емкости генома такие вирусы вынуждены паразитически использовать компоненты клетки-хозяина почти на всех этапах их репликации. На протяжении своего жизненного цикла эти вирусы, как правило, последовательно проходят по определенному пути через различные клеточные отсеки, выявляя тем самым как компартментализованы внутри самой клетки-хозяина важнейшие биосинтетические реакции. Вирусы животных, имеющие внешнюю оболочку и характеризующиеся тем, что их геном помимо белкового капсида окружен еще и липидной бислойной мембраной, особенно интенсивно эксплуатируют систему клеточной компартментализации.

Проследить за жизненным циклом такого вируса означает совершить путешествие по всей клетке. В качестве примера можно рассмотреть хорошо изученный *вирус леса Семлики*. Он состоит из РНК-содержащего нуклеокапсида, покрытого мембраной, в которой, как и в любой биологической мембране, имеются липидный бислой и белки (рис. 7-3). Симметрично построенная икосаэдрическая (20-гранная) оболочка из белка (называемого С-белком) образует **капсид**; внутри него заключена геномная РНК (разд. 5.4.2). Снаружи к капсиду тесно прилегает липидный бислой, в составе которого обнаруживаются только три белка (они обозначаются как E1, E2 и E3). Эти так называемые **белки внешней оболочки** представляют собой гликопротеины, пронизывающие липидный бислой и взаимодействующие с С-белком; благодаря этому они скрепляют мембрану с нуклеокапсидом. Гликозилированные части белков внешней оболочки всегда находятся на наружной стороне липидного бислоя; комплексы этих белков формируют «шипы», выступающие наружу

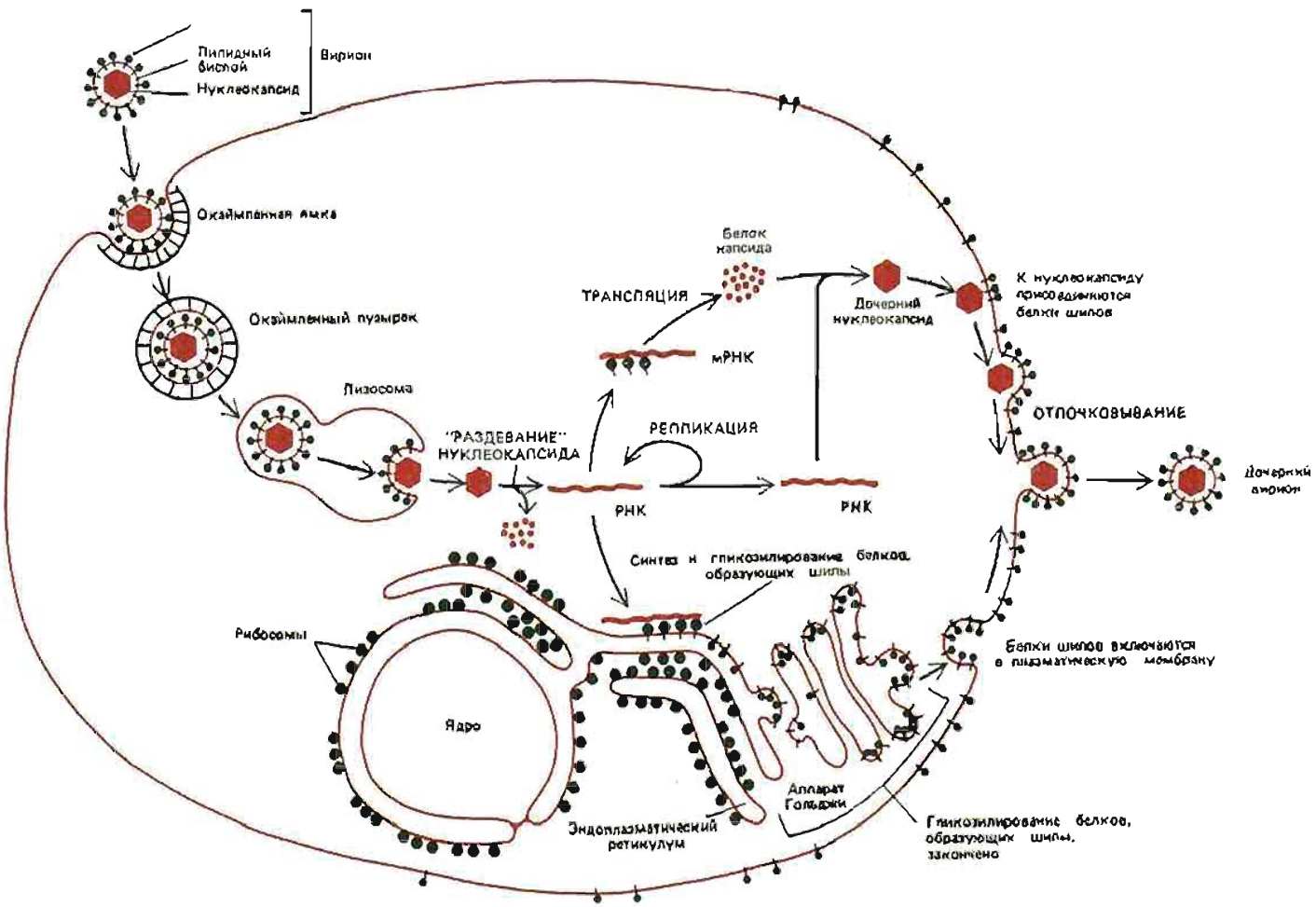


Рис. 7-4. Схема жизненного цикла вируса леса Семлики. Вирус паразитически использует клетку-хозяина на всех этапах своего биосинтеза.

с поверхности вируса, что хорошо видно на электронных микрофотографиях (рис. 7-3, *А*).

Как схематически изображено на рис. 7-4, заражение клетки начинается с присоединения вируса к белковым рецепторам, расположенным на плазматической мембране клетки-хозяина. В результате такого связывания вирионы избирательно включаются в окаймленные ямки на поверхности мембраны; затем эти ямки впячиваются внутрь клетки и образуют окаймленные пузырьки. Пузырьки, несущие поглощенные путем эндоцитоза вирионы, быстро сливаются с промежуточными пузырьками с гладкой поверхностью, называемыми *эндосомами*, которые в свою очередь сливаются с лизосомами.

Таким образом, для проникновения в клетку вирус использует специализированный путь: окаймленная ямка → окаймленный пузырек → лизосома (разд. 6.5.7); этим способом клетка в нормальных условиях «заглатывает» определенные белки и мелкие частицы, прикрепившиеся к ее наружной поверхности. Однако попавший в лизосому вирус избегает опасности быть переваренным благодаря особым свойствам белков своей внешней оболочки. Эти белки способствуют слиянию примыкающих друг к другу липидных бислоев при кислых значениях pH внутри лизосом. Следовательно, как только вирус оказывается в лизосоме, его внешняя оболочка «сплавляется» с мембраной лизосомы, что позволяет нуклеокапсиду выйти в клеточный цитозоль (рис. 7-4).

В цитозоле нуклеокапсид «раздевается», и освобожденная геномная РНК транслируется на рибосомах клетки-хозяина, в результате чего образуется ви-

русоспецифическая РНК-полимераза. Она в свою очередь производит много копий РНК. Некоторые из этих копий служат в качестве матриц, направляющих синтез четырех структурных белков вируса, а именно С-белка капсида и трех белков внешней оболочки – Е1, Е2 и Е3.

Капсидный белок и белки внешней оболочки синтезируются в различных компартментах и проходят сквозь цитоплазму обособленными путями. Синтез белков внешней оболочки, как и нормальных клеточных мембранных гликопротеинов, происходит на мембраносвязанных рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикулума, а белок капсида, подобно нормальным цитозольным белкам, синтезируется на свободных рибосомах в цитозоле.

Новосинтезированный капсидный белок присоединяется в цитозоле к только что реплицированным копиям геномной РНК, что приводит к образованию новых нуклеокапсидов. Белки же внешней оболочки включаются в мембрану эндоплазматического ретикулума и там гликозилируются. Оставаясь все время в мембраносвязанной форме, эти белки переносятся прежде всего к аппарату Гольджи (где они подвергаются дополнительному гликозилированию), а затем к плазматической мембране (рис. 7-4).

Плазматическая мембрана – это именно то место, где в конце концов «встречаются» вирусные нуклеокапсиды и белки внешней оболочки. В результате специфического взаимодействия с этими белками нуклеокапсид обволакивается участком плазматической мембраны, сильно обогащенным вирусоспецифическими белками внешней оболочки, которые встроены в липиды клетки-хозяина. Далее в ходе плохо понятного пока процесса нуклеокапсид отпочковывается от клетки, отделяясь от ее поверхности так, что оказывается окруженным замкнутой внешней оболочкой (рис. 7-4).

7.1.6. Различные вирусы перемещаются по клетке различными путями [4]

В ходе эволюции вирусы, имеющие внешнюю оболочку, такие как вирус леса Семлики, приобрели способность использовать в своих интересах систему компартментов клетки-хозяина. В этом отношении наблюдаются многочисленные вариации, поскольку те или иные компартменты используются или не используются вирусом в зависимости от его специфичности. К примеру, у большинства ДНК-содержащих вирусов процессы репликации и транскрипции происходят в ядре, а не в цитозоле. Другие вирусы, по-видимому, проникают в клетку путем слияния непосредственно с плазматической мембраной, а не через лизосомы. В специализированных клетках, имеющих четко различающиеся апикальную и базолатеральную мембраны (разд. 6.2.1б), одни вирусы отпочковываются исключительно от апикальной плазматической мембраны, тогда как другие – только от базолатеральной (рис. 7-5 и 7-6). Существуют вирусы, которые отпочковываются не от плазматической мембраны, а от мембран эндоплазматического ретикулума или аппарата Гольджи либо от внутренней ядерной мембраны. В таких случаях выход вируса из клетки осуществляется либо с помощью экзоцитоза, используемого для секреции (разд. 6.5), либо путем индукции клеточного лизиса.

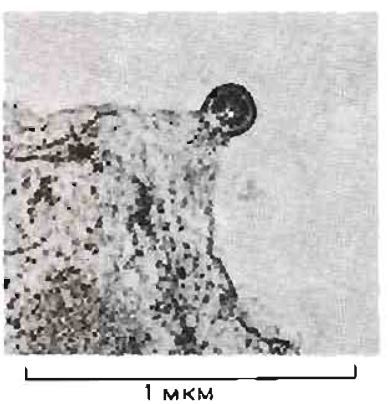


Рис. 7-5. Вирус, имеющий внешнюю оболочку, в момент отпочковывания от плазматической мембраны. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

Таким образом, вирусы с внешней оболочкой специфически отпочковываются только от определенных мембран клетки; это прямо показывает, что мембраны различаются по своим свойствам и что даже в пределах одной и той же мембраны могут существовать многочисленные отличающиеся друг от друга области. Кроме того, это наблюдение свидетельствует о том, что «сплавление» внешней оболочки вируса с той или иной мембраной специфически определяется индивидуальными особенностями белков, которые содержатся в вирусной оболочке. Из дальнейшего будет ясно, что программа такого же типа осуществляется при воспроизводстве самих клеточных компартментов. Следовательно, изучение вирусов, имеющих внешнюю оболочку, помогает понять механизмы организации и протекания биосинтетических реакций в клетке-хозяине.

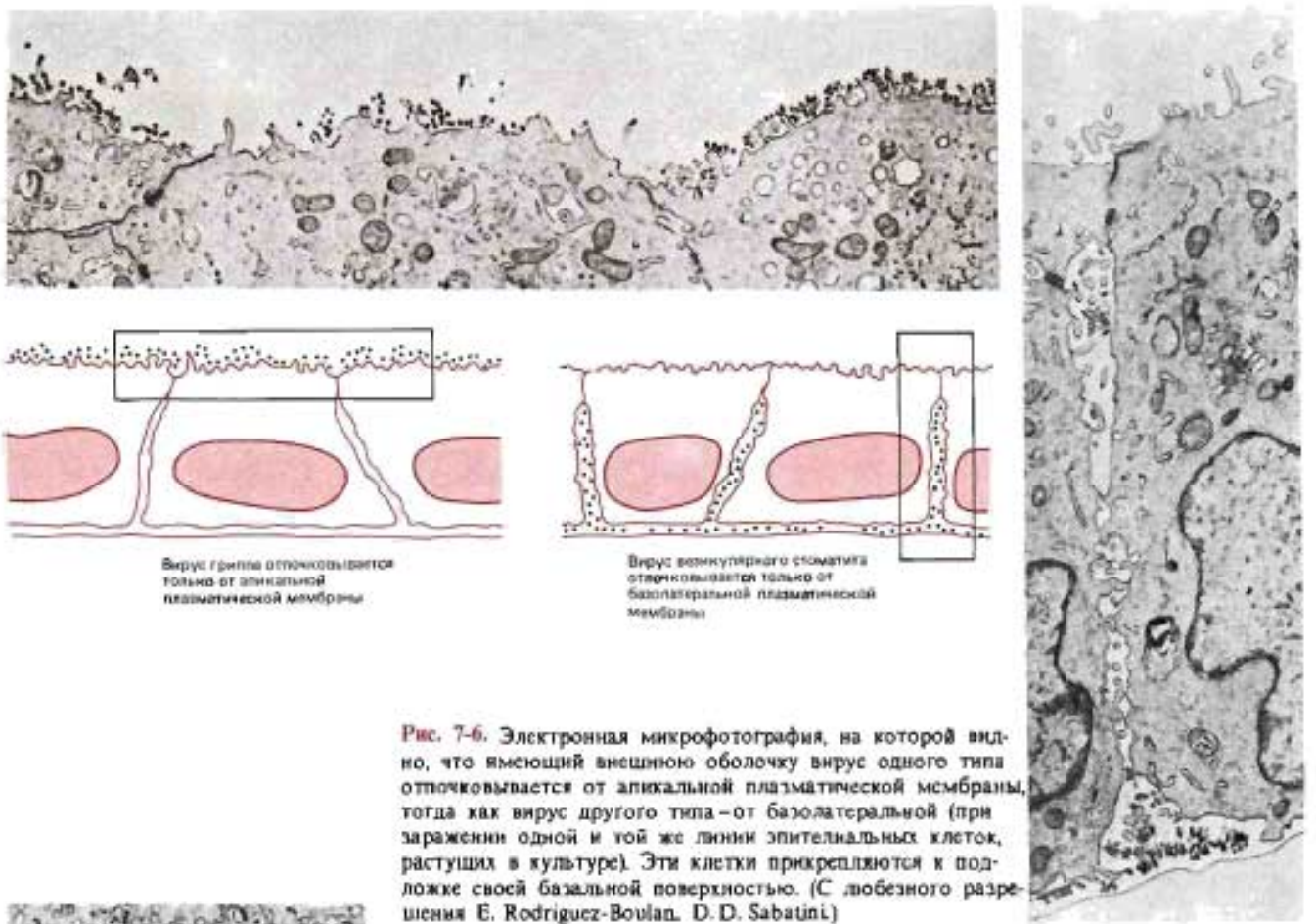


Рис. 7-6. Электронная микрофотография, на которой видно, что имеющий внешнюю оболочку вирус одного типа отпочковывается от апикальной плазматической мембраны, тогда как вирус другого типа – от базолатеральной (при заражении одной и той же линии эпителиальных клеток, растущих в культуре). Эти клетки прикрепляются к подложке своей базальной поверхностью. (С любезного разрешения E. Rodriguez-Boulan, D. D. Sabatini.)



Рис. 7-7. Электронная микрофотография липидной капли, содержащей триглицерид – основную запасную форму жира. Эти капли в клеточной цитоплазме служат в качестве источников запасенной энергии. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

Заключение

Эукариотические клетки содержат значительные количества внутриклеточных мембран, благодаря которым около половины всего объема этих клеток заключено в отдельные внутриклеточные компартменты, известные под названием «клеточные органеллы». Почти во всех клетках присутствуют органеллы шести основных типов: эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, ядро, митохондрии, лизосомы и пероксисомы. В клетках растений имеется еще одна важнейшая органелла – хлоропласт. Остальное внутриклеточное пространство занято компартментом, называемым цитозолем. При инфицировании эукариотической клетки вирусами последовательные этапы их биогенеза осуществляются в различных клеточных компартментах. Изучение жизненных циклов вирусов позволяет понять, каким образом в нормальных клетках компартментализованы важнейшие биосинтетические реакции.

7.2. Цитозоль [5]

7.2.1. Большинство реакций промежуточного обмена происходит в цитозоле

Термин «промежуточный обмен» относится к целому ряду химических реакций, посредством которых клетка расщепляет одни малые молекулы (запасая значительную часть их химической энергии главным образом в форме ATP

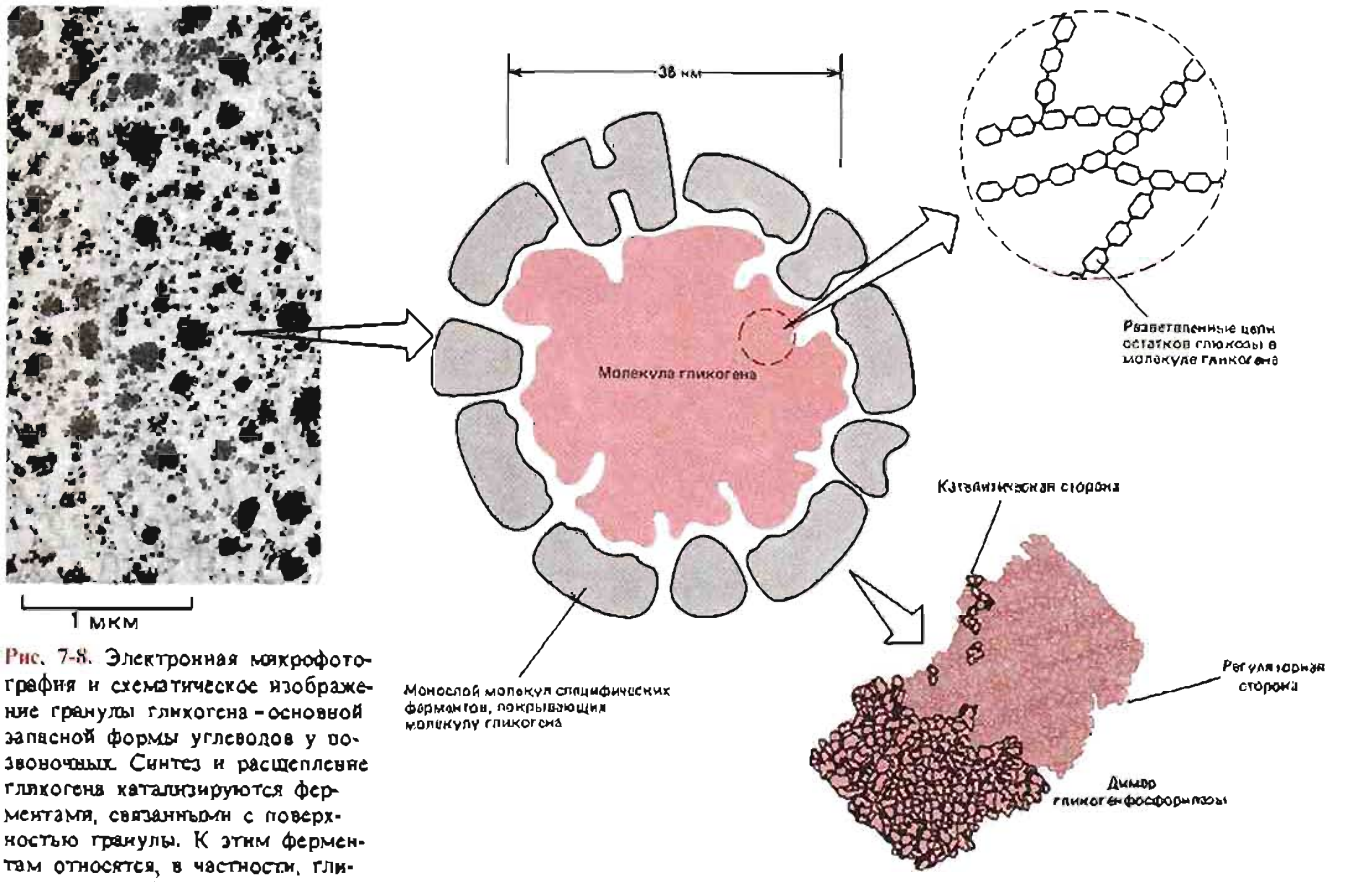


Рис. 7-8. Электронная микрофотография и схематическое изображение гранулы гликогена – основной запасной формы углеводов у позвоночных. Синтез и расщепление гликогена катализируются ферментами, связанными с поверхностью гранулы. К этим ферментам относятся, в частности, гликогенсинтаза (принимает участие в синтезе гликогена) и гликогенфосфорилаза (один из ферментов, участвующих в расщеплении гликогена). Показана трехмерная структура последнего фермента. (С любезного разрешения Robert Fletterick, Daniel S. Friend.)

или протонного градиента) и синтезирует другие, служащие предшественниками макромолекул, необходимых для функционирования и роста клетки. Весь промежуточный обмен происходит в цитоплазме, причем бóльшая его часть – в **цитозоле**. Цитозоль занимает, как правило, 55% общего объема клетки (табл. 7-1) и содержит тысячи ферментов, катализирующих реакции гликолиза и глюконеогенеза, а также биосинтеза сахаров, жирных кислот, нуклеотидов и аминокислот. Вдобавок в цитозоле содержится множество разнообразных белков цитоскелета, обеспечивающих сохранение формы клетки, поддерживающих направленные токи цитоплазмы и создающих общий каркас, который помогает организовать осуществление многих ферментативных реакций (см. гл. 10). Около 20 вес. % цитозоля приходится на белок, так что цитозоль представляет собой скорее высокоорганизованную желеобразную массу, чем просто раствор молекул ферментов, хотя на электронных микрофотографиях он выглядит довольно аморфным. Так, данные некоторых цитологических экспериментов показывают, что цитозоль, непосредственно окружающий аппарат Гольджи, не идентичен цитозолю, контактирующему с клеточным ядром. Однако мы почти ничего не знаем о механизмах, с помощью которых может быть достигнута организация подобного типа, поскольку ее очень трудно сохранить после разрушения клеток.

В результате перехода некоторых важных соединений из активной формы в запасную получаются продукты, хорошо видимые под микроскопом. Лучше всего различим жир (триглицериды) – запасная форма жирных кислот. Как показано на рис. 7-7, в цитозоле многих клеток нерастворимые в воде триглицериды объединяются с образованием крупных безводных капель (диаметром от 0,2 до 5 мкм). В адипоцитах – клетках, специально приспособленных для

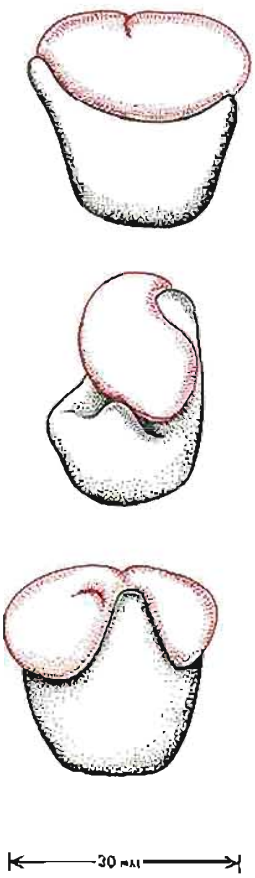


Рис. 7-9. Три проекции трехмерной модели бактериальной рибосомы, демонстрирующие взаимодействие малой (*красная*) и большой (*черная*) субчастиц. У эукариот большая субчастица содержит одну крупную и две небольшие молекулы рРНК, а также около 45 белков, тогда как малая субчастица – другую крупную молекулу рРНК и около 33 белков. Исходя из определения скоростей седиментации в центрифуге, большую и малую субчастицы принято называть соответственно 60S- и 40S-субчастицами (константа седиментации целой рибосомы равна 80S).
Типичная клетка печени содержит 10^7 рибосом. Молекулярная масса одной рибосомы равна $4{,}5 \cdot 10^6$ (приблизительно половина приходится на рРНК и половина – на белок). Рибосомы, следовательно, составляют около 5% общего сухого веса такой клетки. В клетках с менее активным синтезом белка содержится пропорционально меньше рибосом.

хранения жира,– эти капли могут достигать 80 мкм в диаметре, заполняя фактически весь цитозоль.

В качестве другого примера может служить гликоген – полимер глюкозы. Гликоген является основной запасной формой углеводов и на электронных микрофотографиях многих клеток обнаруживается в виде гранул, представляющих собой большие индивидуальные молекулы (диаметр некоторых из них составляет 10–40 нм). Ферменты, необходимые для синтеза и расщепления гликогена, располагаются на поверхности этих гранул (рис. 7-8).

7.2.2. Многие белки синтезируются на рибосомах в цитозоле [6]

Ферменты, катализирующие химические реакции промежуточного обмена, в числе многих других белков синтезируются в цитозоле. Один из наиболее существенных моментов в процессе биосинтеза любого белка заключается в связывании молекул *информационной (матричной) РНК (мРНК)*, экспортированных из ядра, с крупными рибонуклеопротеиновыми частицами, называемыми **рибосомами**. Именно на рибосомах последовательность мРНК транслируется в соответствующую последовательность аминокислот. Поскольку механизм белкового синтеза был уже детально описан в гл. 5, здесь будут упомянуты только те его особенности, которые в большей степени, чем другие, имеют отношение к организации цитоплазмы в эукариотической клетке.

Каждая рибосома состоит из большой и малой субчастиц, обратимо диссоциирующих после завершения синтеза одного полипептида. На рис. 7-9 в общих чертах показаны размеры и форма бактериальной рибосомы. Рибосомы эукариот крупнее, но, по-видимому, построены сходным образом и функционируют в целом примерно так же, как и рибосомы прокариот (см. рис. 5-14).

Рибосомы имеют сложную структуру, и их наибольший линейный размер равен приблизительно 30 нм. Они содержат по весу несколько больше РНК, чем белка. Молекулы *рибосомной РНК (рРНК)* образуют каркас, к которому спонтанно в определенном порядке присоединяются различные белки (принадлежащие к нескольким десяткам типов), причем каждый из них представлен одной молекулой на рибосому. Помимо того, что рРНК играет важную роль в процессе самосборки рибосомы, она обладает еще и способностью специфически связываться с определенными комплементарными участками *транспортной РНК (тРНК)* и мРНК, что составляет часть процесса взаимного узнавания компонентов комплекса рибосома—мРНК—тРНК (разд. 5.1.8). По сути, рибосому можно рассматривать как белок-синтезирующую машину, которая не только в правильном порядке объединяет в пространстве компоненты, необходимые для синтеза белка, но и предоставляет ферменты, катализирующие весь процесс образования пептидных связей.

7.2.3. В результате связывания многих рибосом с одной молекулой мРНК формируются полисомы [7]

Биосинтез белка можно разбить на три последовательных этапа: инициацию, элонгацию и терминацию (гл. 5). В структуре мРНК закодированы два разных сигнала, необходимые для инициации трансляции. Один из них, обеспечивающий присоединение молекулы мРНК к рибосоме, различается у эукариот и прокариот (как обсуждается в разд. 7.2.6). Другой сигнал – это инициирующий кодон AUG. Он «узнается» специальной инициаторной тРНК (переносящей метионин), которая должна связаться с ним при инициации биосинтеза каждой новой полипептидной цепи. Инициация завершается перемещением рибосомы за счет энергии гидролиза GTP вдоль цепи мРНК

в направлении от 5'- к 3'-концу[1]. На каждом этапе последующей элонгации происходит специфическое присоединение к рибосоме молекулы аминоацил-тРНК, антикодон которой комплементарен соответствующему кодону в мРНК (разд. 5.1.8). Аминокислота, связанная с этой тРНК, переносится затем на С-конец растущей полипептидной цепи. Синтез, следовательно, всегда идет от N-конца белка к его С-концу. Когда в мРНК на пути рибосомы встречается один из трех терминирующих кодонов, происходит терминация трансляции, сопровождающаяся высвобождением законченного продукта из комплекса с рибосомой. Новосинтезированные белки обычно становятся активными сразу же после отделения от рибосомы, поскольку в основном процесс укладки полипептидных цепей осуществляется во время их синтеза.

В полипептид включается около 20 аминокислот в 1 с, так что полный синтез белка среднего размера занимает от 20 до 60 с. Даже за такой короткий промежуток времени успевают произойти многочисленные акты инициации – новая рибосома «садится» на 5'-конец молекулы мРНК почти сразу же, как только предшествующая рибосома освободит ей место в результате трансляции достаточно длинной аминокислотной последовательности. По этой причине при физиологических условиях активно транслируемая мРНК находится в **полирибосомах**, или **полисомах**, образованных несколькими рибосомами, которые расположены на одной молекуле мРНК на расстоянии 80 нуклеотидов друг от друга (рис. 7-10 и 7-11). Полирибосомы обнаруживаются практически во всех клетках и могут быть выделены из лизированных клеток методом ультрацентрифугирования. В ходе этой процедуры полирибосомы отделяются от монорибосом, также присутствующих в цитозоле (рис. 7-12). Идентификация в таком препарате полисом специфических молекул мРНК, кодирующих определенные белки, служит лучшим доказательством того, что именно эти мРНК активно транслируются в тех клетках, из которых были изолированы полисомы. Подобную идентификацию мРНК можно проводить путем трансляции их смеси, выделенной из полисом, в бесклеточной системе синтеза белка с последующим определением полученных продуктов. Другой способ тестирования этих мРНК заключается в гибридизации их с известными клонированными фрагментами ДНК (т. 1, разд. 4.5.5).

7.2.4. Синтез белка блокируется специфическими ингибиторами

Существует множество лекарственных веществ и токсинов, специфически воздействующих на каждый из основных этапов белкового синтеза. Эти вещества оказались очень полезными для изучения механизмов функционирования клетки. В экспериментальных исследованиях чаще всего используют антибиотики – *хлорамфеникол, циклогексимид* и *пуромицин*. Первые два обратимо ингибируют *пептидилтрансферазу*, рибосомный фермент, катализирующий образование пептидной связи. Однако в эукариотической клетке хлорамфеникол блокирует синтез белка лишь в митохондриях (и в хлоропластах растений), тогда как циклогексимид воздействует только на рибосомы, находящиеся в цитозоле. Разная чувствительность рибосом этих двух классов к двум указанным веществам отражает различия в структуре этих рибосом и дает возможность точно определить, синтезируется ли данный белок в митохондриях (или хлоропластах; см. т. 3, разд. 9.5.1). Пуромицин представляет собой структурный аналог молекулы тРНК, связанной с аминокислотой: рибосома

[1] В настоящее время вопрос о роли гидролиза GTP в процессе инициации биосинтеза белка (как, впрочем, и элонгации) остается открытым. Наиболее распространена точка зрения, согласно которой энергия, высвобождающаяся при расщеплении GTP, расходуется не непосредственно на перемещение рибосомы, а на удаление из нее некоторых факторов инициации (и элонгации).–*Прим. перев.*

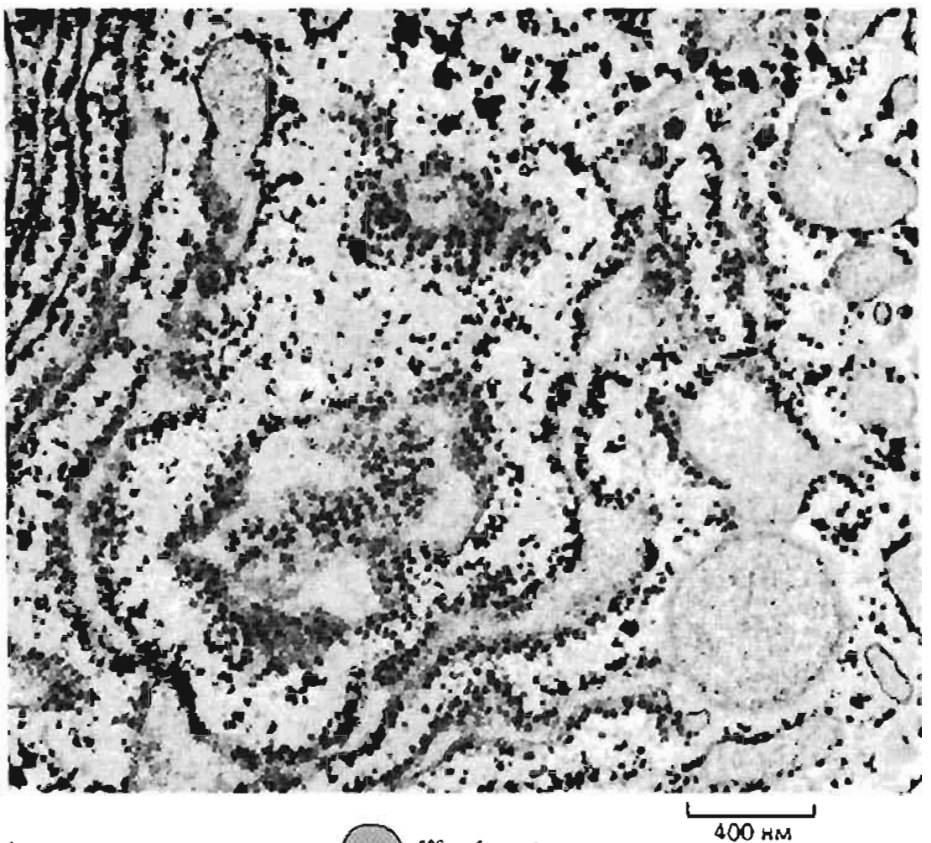


Рис. 7-10. Электронная микрофотография, показывающая типичные полирибосомы «в действии» во время синтеза белка. Цитоплазма клетки обычно заполнена такими полирибосомами, причем некоторые из них находятся в цитозоле в свободном состоянии, а некоторые связаны с мембранами. (С любезного разрешения George Palade.)

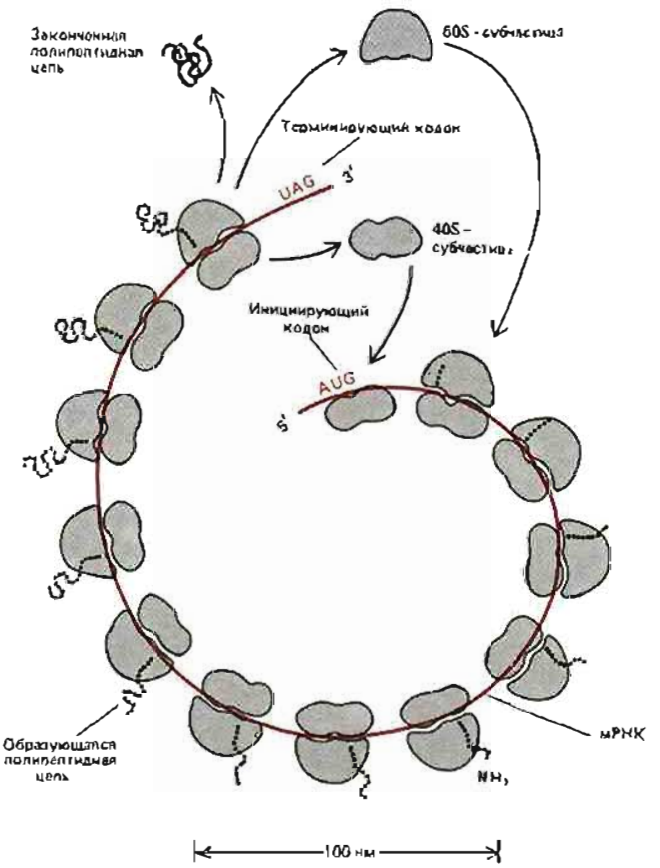


Рис. 7-11. Схематическое изображение полирибосомы. Синтез белка начинается со связывания малой субчастицы с соответствующим местом в молекуле информационной (матричной) РНК (мРНК). Когда образование полипептидной цепи заканчивается, субчастицы диссоциируют и таким образом освобождаются от мРНК (см. гл. 5).

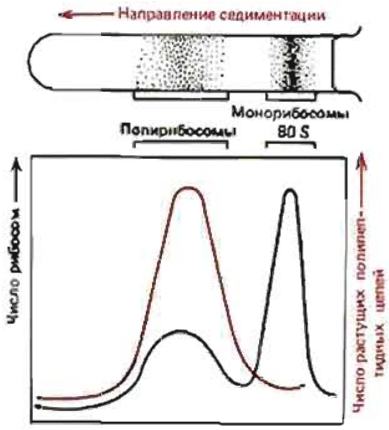


Рис. 7-12. Схема, иллюстрирующая, как полирибосомы отделяются от монорибосом и их субчастиц с помощью седиментации в центрифуге. Этот метод основан на том, что в сильном гравитационном поле большие молекулярные агрегаты движутся быстрее, чем частицы меньших размеров. Обычно седиментацию проводят в градиенте концентрации сахарозы, которая предотвращает возникновение в растворе конвекционных потоков.

путает его с подлинной аминокислотой и ковалентно присоединяет к С-концу растущей полипептидной цепи, что вызывает преждевременную терминацию трансляции и отделение полипептида от рибосомы (см. табл. 5-1).

7.2.5. Некоторые белки регулируют скорость своего собственного синтеза путем связывания с молекулами соответствующих мРНК [8]

Внутриклеточная концентрация некоторых белков должна контролироваться самым тщательным образом, поскольку появление их избыточных количеств может оказаться вредным для клетки. С этой точки зрения заслуживают внимания рибосомные белки, многие из которых непременно начали бы беспорядочным образом связываться с молекулами любых РНК, если бы этих белков стало больше, чем могут специфически присоединить к себе имеющиеся в наличии молекулы рРНК. Как же клетке удается сделать так, что все 80 или более рибосомных белков образуются приблизительно в равных количествах и в строгой координации с синтезом рРНК?

Этот вопрос был детально изучен на примере бактерий. Введение в *E. coli* множественных копий гена одного из рибосомных белков (с помощью плазмидного вектора; см. т. 1, разд. 4.5.2) приводит к резкому увеличению количества мРНК, кодирующей этот белок, но скорость синтеза самого белка изменяется при этом лишь незначительно. В других экспериментах было показано, что во многих случаях добавление какого-либо экзогенного рибосомного белка в бесклеточную белок-синтезирующую систему вызывает специфическое ингибирование трансляции соответствующей мРНК. Эти удивительные наблюдения говорят о том, что регуляция синтеза рибосомных белков у бактерий осуществляется по принципу обратной связи, т.е. белки, находящиеся в избытке, присоединяются к специфическим последовательностям или структурам вблизи 5′-концов молекул мРНК, кодирующих эти белки, и таким образом блокируют свой собственный синтез (рис. 7-13).

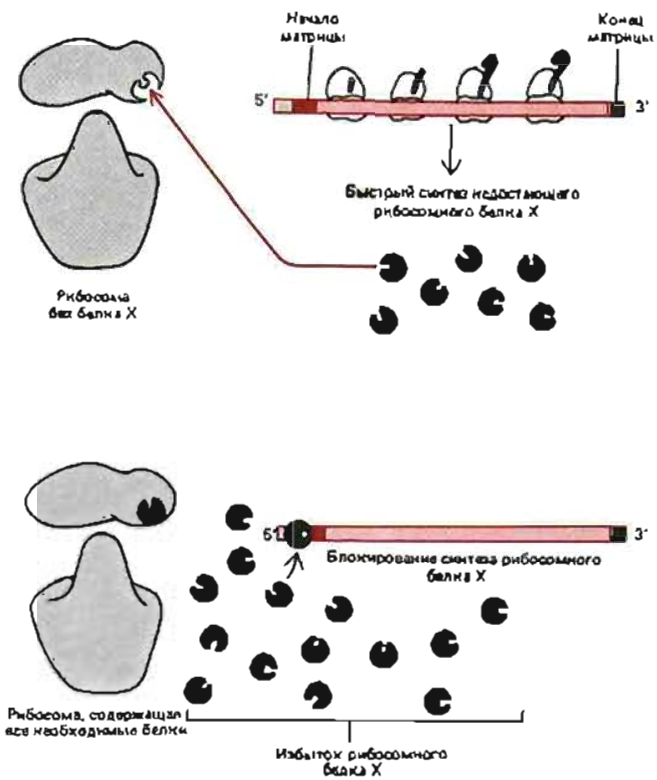


Рис. 7-13. Упрощенное изображение механизма координации синтеза рибосомных белков у бактерий. Это один из немногих хорошо изученных примеров специфической регуляции на уровне трансляции.

Хотя пока известно очень мало примеров трансляционной регуляции такого рода, было бы странно, если бы основной механизм, изображенный на рис. 7-13, не действовал также и у эукариот, координируя синтез взаимодействующих между собой белков, объединяющихся в специфические комплексы, например рибосомы.

7.2.6. У эукариот на каждой молекуле мРНК может синтезироваться полипептидная цепь только одного типа [9]

Эукариотические и прокариотические мРНК несколько отличаются друг от друга как в структурном, так и в функциональном отношении. Эукариотические мРНК (за исключением тех, которые синтезируются в митохондриях и (или) хлоропластах) модифицируются в ядре сразу же после завершения транскрипции (разд. 8.2.5). В результате они обычно содержат на своем 5'-конце особую группу – так называемый кэп, – состоящую из остатка 7-метилгуанозина, ковалентно связанного с 5'-концевым трифосфатом (рис. 7-14), а на 3'-конце – poly(A)-последовательность длиной около 200 остатков адениловой кислоты. Если poly(A) и играет какую-либо роль в процессе трансляции, нам об этом ничего неизвестно. Но 5'-кэп, который специфически узнается рибосомами как один из сигналов, необходимых для инициации синтеза белка, очень важен. С помощью изящных генетических экспериментов на дрожжах было показано, что трансляция у эукариот, как правило, обязательно начинается с ближайшего к 5'-концу мРНК кодона AUG и продолжается затем в данной «фазе» считывания до тех пор, пока на пути рибосом не встретится один из терминирующих кодонов. Ни один из многих других кодонов AUG, присутствующих в цепи мРНК, не может служить местом инициации синтеза белка. Поскольку последовательность мРНК, находящаяся за первым терминирующим кодоном (со стороны 3'-конца), не транслируется можно заключить, что на каждой молекуле мРНК может синтезироваться полипептидная цепь только одного вида.

По всем этим параметрам прокариотические мРНК очень сильно отличаются от эукариотических (рис. 7-15). У бактериальных матриц нет poly(A) на 3'-конце и кэпа на 5'-конце. Вместо этого они содержат специфические последовательности, определяющие места инициации белкового синтеза, причем таких последовательностей может быть несколько в пределах одной и той же

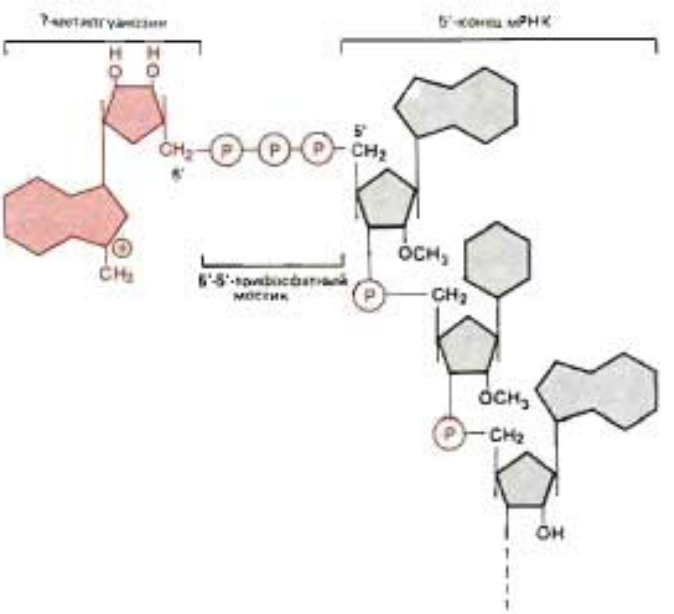


Рис. 7-14. Структура «кэпа», обнаруженного на 5'-конце молекул эукариотических мРНК. Обратите внимание на необычный способ присоединения положительно заряженного 7-метилгуанозина и метилирование 2'-OH-групп остатков рибозы. (Второй остаток рибозы метилируется не всегда.)

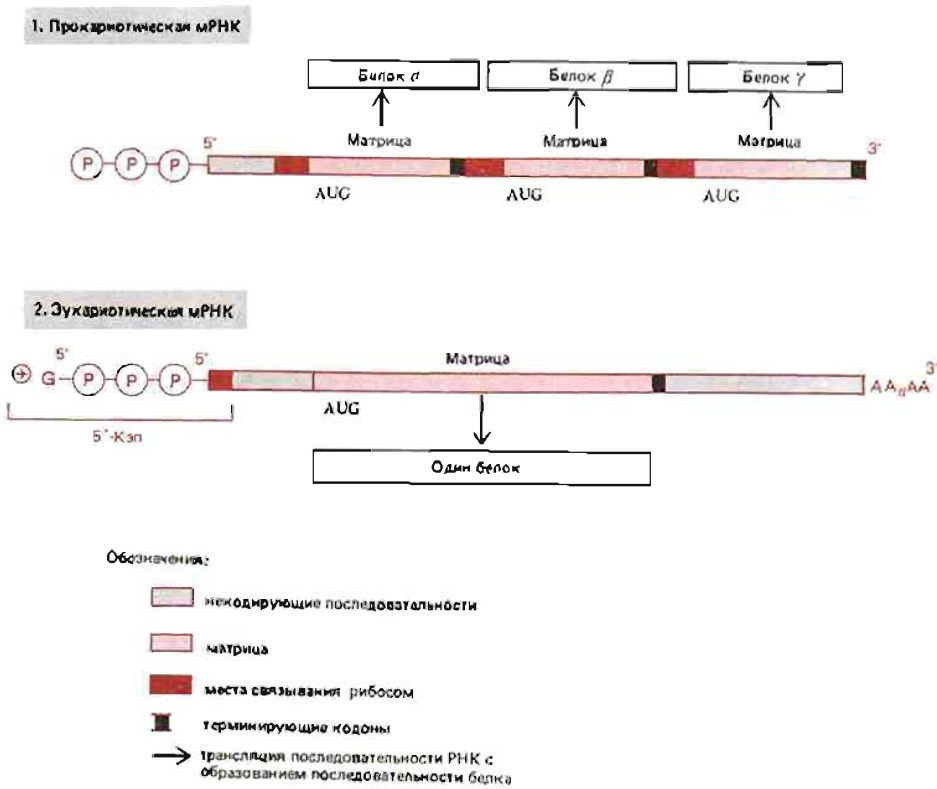


Рис. 7-15. Сравнение структур прокариотических и эукариотических молекул мРНК. Хотя и те и другие новосинтезированные мРНК содержат на 5'-конце трифосфатную группу, молекулы эукариотических мРНК немедленно приобретают 5'-концевой «кэп». Поскольку «кэп» необходим для инициации связывания рибосом, к молекулам эукариотических мРНК рибосомы присоединяются вблизи их 5'-конца, где и начинается синтез белка. В отличие от этого у прокариот может быть несколько мест связывания рибосом в пределах одной цепи мРНК.

молекулы мРНК. Эти последовательности спариваются со специальным участком рРНК в составе рибосомы, после чего с ближайшего к ним кодона AUG начинается синтез белка. Более того, хотя бактериальные рибосомы и узнают терминирующие кодоны как сигналы для окончания синтеза одной полипептидной цепи, они могут «проскользнуть» дальше по матрице и начать трансляцию второго полипептида с последующего кодона AUG. Таким образом, бактериальные мРНК обычно имеют *полицистронную* структуру, т.е. каждая из них кодирует несколько белков, синтезируемых отдельно на одной и той же молекуле мРНК. В отличие от бактериальных все эукариотические мРНК являются *моноцистронными* – на одной матрице синтезируется полипептидная цепь только одного вида.

7.2.7. В эукариотических клетках часто синтезируются полибелки [10]

Предыдущему утверждению не противоречит, однако, то, что одна и та же молекула мРНК у эукариот может кодировать несколько белков, обладающих взаимосвязанными ферментативными активностями. В результате трансляции такой мРНК образуется один длинный полифункциональный белок. В некоторых случаях этот *полибелок* расщепляется специфическими протеазами на различные ферменты. Однако иногда он остается целым и существует в виде единого полифункционального полипептида.

Как изображено на рис. 7-16, несколько взаимосвязанных ферментативных активностей могут быть объединены у эукариот в составе полибелка, тогда как у прокариот те же самые ферментативные активности присущи отдельным белковым субъединицам, которые часто в результате нековалентного связывания образуют комплексы. В некотором смысле это различие, вероятно, отражает то, что в эукариотической клетке, объем которой приблизительно в 1000 раз больше объема прокариотической клетки, сборка



Рис. 7-16. Трансляция некоторых молекул мРНК у эукариот и прокариот. Полагают, что белки, обладающие несколькими ферментативными активностями (полибелки), – довольно распространенное явление у эукариот. У бактерий аналогичные ферменты часто существуют в виде комплексов, состоящих из отдельных полипептидных цепей, которые, возможно, синтезируются на различных участках одной и той же длинной молекулы мРНК.

субъединиц представляет собой более сложный процесс. Однако это различие могло бы быть обусловлено и разными механизмами трансляции мРНК, показанными на рис. 7-15.

7.2.8. После завершения синтеза белков многие из них подвергаются ковалентной модификации [11]

После отделения от рибосомы многие (а, может быть, и все) белки подвергаются какой-либо ковалентной модификации. Известно более 100 типов модификаций боковых групп аминокислотных остатков. Зачастую эти модификации обратимы и служат для регуляции биологической активности белка (т. 3, разд. 13.4.4). Например, широко распространено избирательное фосфорилирование в белках свободных боковых ОН-групп остатков серина, треонина или тирозина (рис. 7-17); оно осуществляется ферментами, называемыми **протеинкиназами**, использующими АТР в качестве донора фосфата. В зависимости от вида белка его функциональная активность в результате такого фосфорилирования либо повышается, либо снижается. Активность киназ в свою очередь регулируется с помощью универсальных внутриклеточных сигналов, таких, как изменение концентраций циклического AMP или ионов Ca^{2+}. Фосфорилирование белков обратимо, поскольку в цитозоле присутствуют многочисленные фосфатазы. После «выключения» протеинкиназ фосфатазы отщепляют фосфат от фосфорилированного фермента, и его активность возвращается к первоначальному уровню. Аденилирование боковых групп тирозина (т. е. обратимое присоединение AMP из ATP к ОН-группе тирозина), равно как и обратимое метилирование боковых групп глутаминовой кислоты, служит примером еще одной важной системы регуляции.

Другие ковалентные модификации белков, необходимые для нормального функционирования некоторых белков, необратимы. Так, со многими ферментами ковалентно связаны коферменты (такие, как биотин, липоевая кислота и пиридоксальдосфат), играющие существенную роль в ферментативных реакциях (т. 1, разд. 3.4.1). Можно привести многочисленные примеры необратимых модификаций, точное функциональное назначение которых окончательно не выяснено. К их числу относятся ацетилирование («блокирование») N-концов многих белков в цитозоле и избирательное метилирование аминогрупп некоторых остатков лизина. Существует целый ряд необратимых ковалентных модификаций, затрагивающих только те белки, которые перемещаются из цитозоля в другие внутриклеточные или внеклеточные пункты назначения. Например, в эндоплазматическом ретикулуме почти половина всех остатков пролина секретируемого белка коллагена превращается в остатки гидроксипролина; в результате этой модификации прочность коллагеновой тройной спирали увеличивается (т. 3, разд. 12.3.3). В другом случае к остаткам глутаминовой кислоты в некоторых белках присоединяется еще одна карбоксильная группа с образованием γ-карбоксилглутамата – трикарбоновой кислоты, обладающей высоким сродством к ионам Ca^{2+}. Таким путем происходит формирование Ca^{2+}-связывающих участков в ряде Ca^{2+}-связывающих белков, играющих определенную роль в реакциях свертывания крови. Кроме того, большинство секретируемых белков представляет собой гликопротеины, в которых углеводы присоединены к остаткам аспарагина или реже серина либо треонина, тогда как мембранные белки могут быть ковалентно связаны с жирными кислотами. Одним модификациям белки подвергаются в эндоплазматическом ретикулуме, а другим – в аппарате Гольджи (см. ниже).

Специализированные секреторные клетки выделяют разнообразные белки; например, некоторые эндокринные клетки секретируют пептидные гормоны, а ацинарные клетки поджелудочной железы – пищеварительные ферменты. Многие из этих белков первоначально существуют в виде длинных полипептидов, которые, прежде чем стать активными, расщепляются специальными протеазами. В зависимости от вида белка расщепление происходит либо в ап-

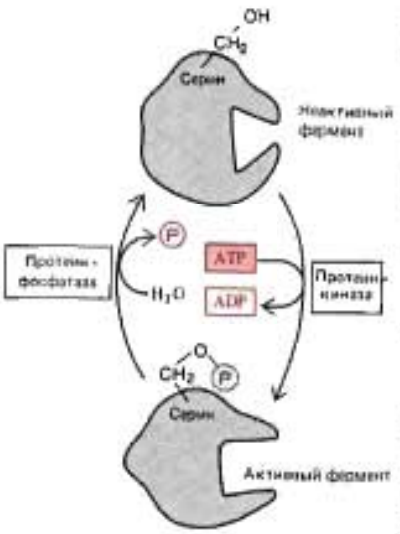


Рис. 7-17. Схема противоположно направленного действия протеинкиназы и протеинфосфатазы, первая из которых фосфорилирует, а вторая дефосфорилирует боковую гидроксильную группу остатка серина. Как показано здесь, фосфорилирование обычно приводит к аллостерическим изменениям конформации белка, что в свою очередь вызывает повышение или снижение его активности.

парате Гольджи, либо в образующихся секреторных пузырьках, либо после секреции. Некоторые из этих модификаций можно считать регуляторными. В частности, целый ряд секретируемых ферментов (включая пищеварительные протеазы) синтезируется и секретируется в форме неактивных предшественников, называемых **зимогенами**, поскольку эти ферменты были бы весьма опасны, если бы появились внутри клетки в активном состоянии. Поэтому они активируются вне клетки только после модификации, заключающейся в их специфическом протеолитическом расщеплении в одном или нескольких местах.

7.2.9. Некоторые белки деградируют вскоре после того, как они были синтезированы [12]

Концентрация какого-либо белка в клетке определяется соотношением между скоростью его синтеза и скоростью его деградации. В результате этих двух процессов происходит постоянное **обновление белка**. Скорость синтеза белка обычно регулируется путем изменения количества кодирующей его мРНК, активной в отношении трансляции. Кроме того, клетка может осуществлять контроль за концентрацией белка, регулируя скорость его разрушения.

Деградация белка, по-видимому, представляет собой случайный процесс, так как в течение данного промежутка времени старая и новая белковые молекулы могут быть разрушены приблизительно с равной вероятностью. Однако, поскольку различным видам белков в одной и той же клетке присуща разная чувствительность к протеолизу, скорости их обновления значительно отличаются друг от друга. «Типичная» белковая молекула разрушается в среднем приблизительно через два дня после того, как она была синтезирована, однако среднее время жизни индивидуальных белков колеблется от нескольких минут до нескольких месяцев и даже лет.

Большинство белков имеет компактную структуру, что в какой-то степени сообщает им устойчивость к протеолитической атаке и, следовательно, к разрушению. Весьма важная функция процесса деградации – избавить клетку от дефектных белков. Дефектные белки могут быть либо продуктами дефектных генов, либо результатом ошибок биосинтеза, либо следствием спонтанной денатурации ранее функционально активных полипептидов. Менее компактная конформация этих аномальных белков, возможно, делает их более доступными для протеолитических ферментов. Одной из стадий этого тонко регулируемого процесса является гидролиз ATP; освобождающаяся при этом энергия расходуется, по-видимому, на образование ковалентной связи между специальным полипептидом и белком, «предназначенным» для разрушения. Этот полипептид называется *убиквитином* из-за широкого распространения его в разнообразных организмах – от бактерии до человека. Он, очевидно, маркирует присоединенный к нему белок, облегчая узнавание последнего специфическими протеазами.

Среди «нормальных» белков, подвергающихся внутри клетки интенсивной деградации, встречается много ферментов, катализирующих реакции, которые лимитируют скорость того или иного метаболического пути. Скорости синтеза этих ключевых белков обычно регулируются в соответствии с условиями окружающей среды таким образом, чтобы обеспечить наиболее эффективное использование данного метаболического пути. Только в том случае, если эти ферменты непрерывно и интенсивно разрушаются, можно быстро довести их концентрацию до нового уровня, определяемого изменением скорости их синтеза (т. 3, разд. 13.4.8). До сих пор остается неясным, различаются ли механизмы деградации «нормальных» и дефектных белков.

7.2.10. Не все белки, синтезированные в цитозоле, остаются в нем

Как будет обсуждаться в следующем разделе, некоторые вовлеченные в процесс трансляции рибосомы присоединяются к эндоплазматическому ретикулуму, в результате чего образуются мембраносвязанные рибосомы. Многие из белков, предназначенных для разнообразных внутриклеточных органелл и их мембран, равно как и все известные секреторные белки, синтезируются на таких рибосомах.

Однако ряд белков, образующихся на свободных рибосомах в цитозоле, тоже покидает место своего синтеза. Например, гистоны так же, как и другие многочисленные белки хроматина, будучи синтезированными в цитоплазме, быстро проникают через крупные ядерные поры и связываются с компонентами ядра (разд. 8.3.3). Большинство белков, входящих в состав хлоропластов и митохондрий, и по крайней мере часть белков пероксисом синтезируются на свободных рибосомах в цитозоле и затем транспортируются через мембраны, окружающие соответствующие органеллы.

Заключение

Цитозоль представляет собой ту часть внутриклеточного пространства, которое не занято органеллами, и составляет у эукариот, как правило, 50–60% общего объема клетки. Большинство реакций промежуточного обмена и белковый синтез, необходимые для функционирования и роста клетки, происходят в цитозоле. Количество любого клеточного белка зависит от соотношения между скоростью его синтеза (она в значительной мере определяется скоростью синтеза соответствующей мРНК в ядре) и скоростью его деградации. Некоторые белки быстро и непрерывно разрушаются в клетках, что, вероятно, позволяет обеспечить быстрое изменение их концентрации в ответ на регуляторные сигналы. Регуляция активности специфических клеточных белков осуществляется посредством обратимых ковалентных модификаций этих белков. Например, активности многих клеточных белков регулируются с помощью циклического процесса фосфорилирования и дефосфорилирования.

7.3. Эндоплазматический ретикулум [13]

Все клетки содержат **эндоплазматический ретикулум** (ЭР), мембрана которого в типичном случае составляет более половины общего количества клеточных мембран (табл. 7-2). Полагают, что, хотя мембрана ЭР имеет многочисленные складки и изгибы, она образует одну непрерывную поверхность, ограничивающую единый замкнутый мешок. Это внутреннее пространство, называемое **полостью ЭР** или цистернальным пространством ЭР, часто занимает более 10% общего объема клетки (табл. 7-1). Полость ЭР отделяется от цитозоля одиночной мембраной (мембраной ЭР), служащей связующим звеном между этими двумя компартментами. Поскольку мембрана ЭР составляет единое целое с наружной ядерной мембраной, полость ЭР и внутриядерное пространство также разделены только одиночной мембраной – в данном случае внутренней ядерной мембраной. Наоборот, полости ЭР и аппарата Гольджи отделены друг от друга двумя мембранами; поэтому предполагается, что для осуществления интенсивного макромолекулярного движения между этими компартментами необходимы транспортные пузырьки (рис. 7-18).

С помощью ЭР в клетке происходит разделение новосинтезированных молекул между цитозолем и остальными компартментами. К тому же ЭР играет центральную роль в процессе биосинтеза макромолекул, используемых для сборки других клеточных органелл. Липиды, белки и сложные углеводы, транспортируемые в аппарат Гольджи, плазматическую мембрану, лизосомы или во внеклеточное пространство,– все они синтезируются в тес-

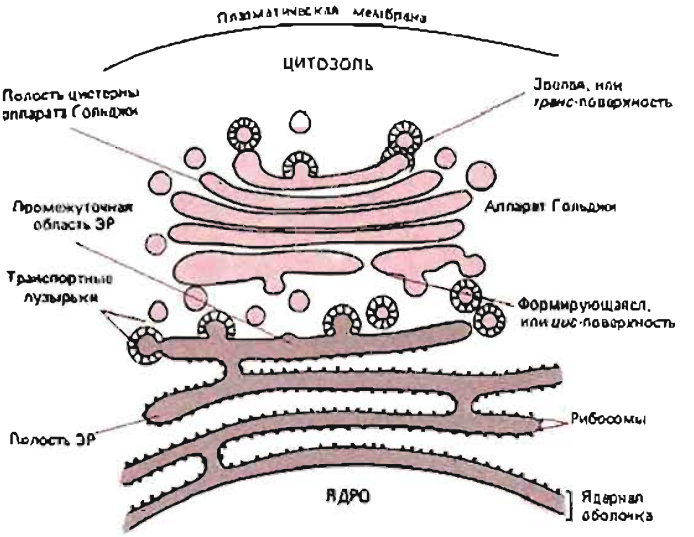


Рис. 7-18. Схема, показывающая, каким образом полость ЭР отделена от трех других внутриклеточных компартментов, с которыми взаимодействует ЭР. Обратите внимание на то, что полость ЭР отделяется как от цитозоля, так и от ядра с помощью одиночной мембраны, тогда как полости ЭР и аппарата Гольджи разделены двумя мембранами. Изображенная здесь относительная ориентация аппарата Гольджи характерна для секреторных клеток; во многих других клетках аппарат Гольджи перевернут; его *транс*-сторона обращена к клеточному ядру.

ной ассоциации с ЭР. По этой причине знание биохимических свойств ЭР имеет решающее значение для понимания природы многих других клеточных компонентов. Успехи в изучении биосинтетических реакций, осуществляемых ЭР, были достигнуты в последнее время благодаря использованию бесклеточных систем, с помощью которых определенные биохимические этапы можно исследовать in vitro.

7.3.1. Прикрепленные к ЭР рибосомы определяют границы его «шероховатых» областей

На электронных микрофотографиях некоторых клеток можно легко разглядеть две функционально различающиеся области ЭР: **шероховатый** (**гранулярный**) **ЭР**, усеянный рибосомами, расположенными на обращенной к цитоплазме стороне мембраны, и **гладкий** (**агранулярный**) **ЭР**, являющийся частью той же самой мембраны, но без прикрепленных к нему рибосом. Эти две области значительно различаются и по форме: шероховатый ЭР представляет собой стопки уплощенных мешочков, называемых *цистернами*, а гладкий ЭР состоит из сети тонких трубочек (рис. 7-19 и 7-20). Наружная мембрана ядерной оболочки всегда усеяна рибосомами и составляет единое целое с мембраной шероховатого ЭР. Тот факт, что рибосомы никогда не обнару-

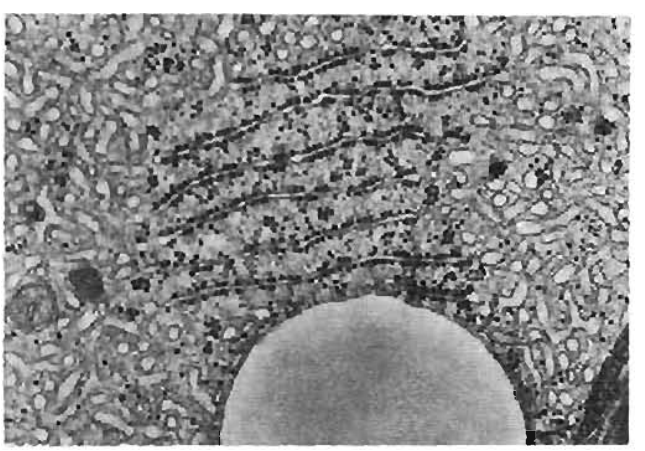


Рис. 7-19. Электронная микрофотография, демонстрирующая различную морфологию шероховатого и гладкого ЭР в клетке Лейдига. Эти клетки производят стероиды в семенниках и обладают обширным гладким ЭР. Видна также часть крупной сферической липидной капли. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

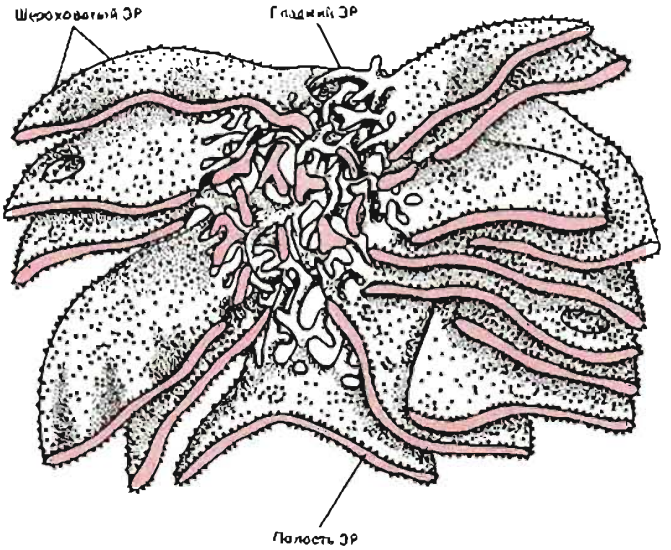
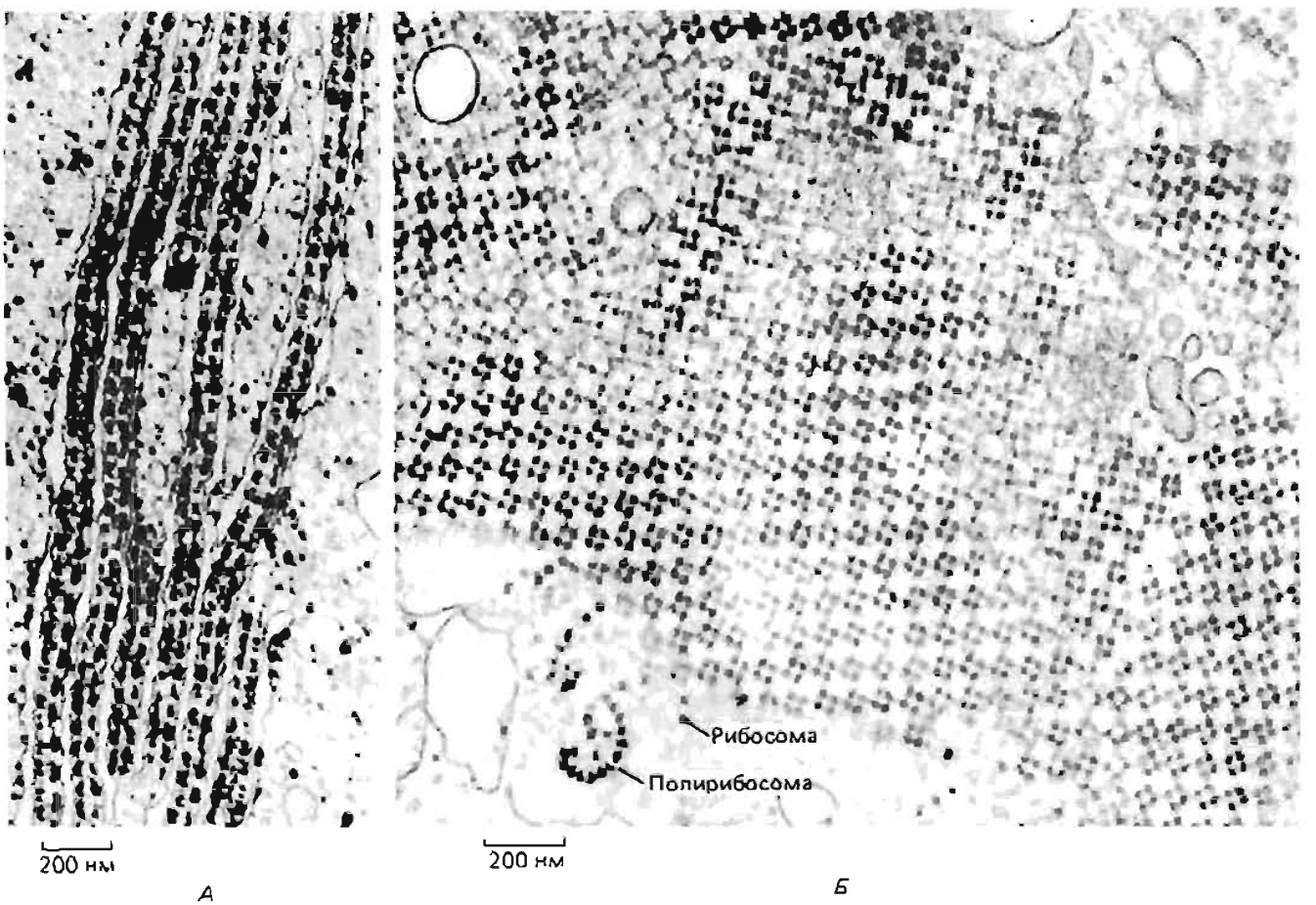


Рис. 7-20. Трехмерная реконструкция гладкой и шероховатой областей ЭР в клетке печени. Шероховатый ЭР образует ориентированные определенным образом стопки уплощенных цистерн, каждая из которых имеет толщину от 20 до 30 нм. С этими цистернами соединены мембраны гладкого ЭР, который представляет собой сеть тонких трубочек диаметром от 30 до 60 нм. Считается, что мембрана ЭР непрерывна и ограничивает единую полость. (Krstić R. V. Ultrastructure of Mammalian Cell. New York, Springer-Verlag, 1979.)

Рис. 7-21. Электронная микрофотография высокоупорядоченно расположенных рибосом, покрывающих обширный шероховатый ЭР в ооците (незрелой яйцеклетке) ящерицы. *А*. Вид среза, перпендикулярного стопке цистерн ЭР. *Б*. Поверхность цистерны. (С любезного разрешения Nigel Unwin.)



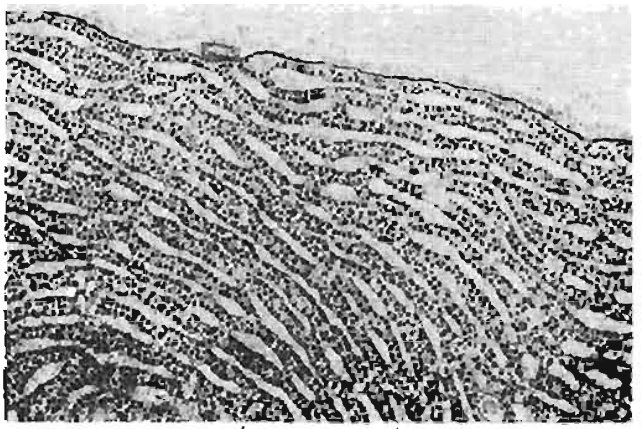


Рис. 7-22. Электронная микрофотография очень активного шероховатого ЭР ацинарной клетки поджелудочной железы; в этой специфической клетке, секретирующей белки, полость ЭР сильно расширена (ср. рис. 7-19). (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

живаются на обращенной к полости стороне ЭР, был первым свидетельством асимметричного распределения биосинтетических функций (в данном случае биосинтеза белка) на мембране ЭР.

Хотя шероховатый ЭР присутствует во всех клетках, содержащих ядро, за исключением сперматозоидов, он особенно сильно развит в специализированных клетках, секретирующих белки (таких, как ацинарные клетки поджелудочной железы и плазматические клетки, продуцирующие антитела) или интенсивно синтезирующих мембраны (таких, как незрелая яйцеклетка или палочка сетчатки глаза). В этих случаях чуть ли не половина всех клеточных рибосом связана с ЭР, а в клетках, секретирующих белки, полость ЭР зачастую чрезвычайно расширена вследствие того, что она заполнена белком, освободившимся от этих рибосом (рис. 7-21 и 7-22).

Гладкий ЭР не принимает участия в синтезе белка. Хотя им и изобилуют некоторые специализированные клетки (см. следующий раздел), в значительном большинстве клеток (включая существенную часть секреторных) гладкий ЭР – это в действительности не что иное, как небольшая свободная от рибосом область шероховатого ЭР (рис. 7-23). Такие области обычно называются **промежуточными ЭР** (а не гладким ЭР); они представляют собой специализированную зону ЭР, от которой отпочковываются пузырьки, содержащие новосинтезированные белки и липиды, утилизируемые внутри клетки (разд. 7.3.16).

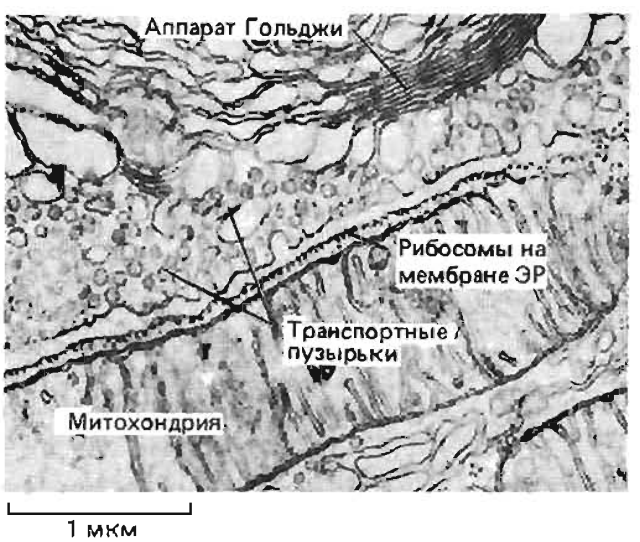


Рис. 7-23. Область промежуточного ЭР в клетке эпителия мыши. Видно, что от него отпочковываются транспортные пузырьки. См. также рис. 7-18. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

7.3.2. Гладким ЭР изобилуют некоторые специализированные клетки [14]

Иногда гладкий ЭР является преобладающей органеллой в клетках, связанных с метаболизмом липидов. Например, наиболее многочисленные клетки печени, *гепатоциты*,–это основное место, где производятся секретируемые липопротеиновые частицы. Ферменты, осуществляющие синтез липидных компонентов липопротеинов, локализованы в мембранах гладкого ЭР. Гладкий ЭР гепатоцитов содержит также ферменты, катализирующие ряд *реакций детоксикации*, в результате которых обезвреживаются как лекарственные вещества, так и вредные соединения, образующиеся в процессе метаболизма. Наиболее тщательно изученная реакция детоксикации катализируется ферментом, называемым *цитохромом P450*. Этот белок использует высокоэнергетические электроны, полученные от NADPH (и перенесенные к нему с помощью специальной редуктазы в ЭР), чтобы присоединить гидроксильные группы к любому из разнообразных, потенциально опасных, водонерастворимых углеводородов, попадающих в бислой. Другие ферменты, находящиеся в мембране ЭР, добавляют затем к этим гидроксильным группам отрицательно заряженные растворимые в воде молекулы (такие, как сульфат или глюкуроновая кислота). После нескольких подобных реакций нерастворимое в воде лекарственное вещество (или метаболит), которое в противном случае могло бы надолго остаться в клеточных мембранах, становится настолько хорошо растворимым в воде, что выходит из клетки и выделяется с мочой. Поскольку один только шероховатый ЭР не может вместить достаточного количества этих и других необходимых ферментов, основная часть мембраны в гепатоцитах обычно состоит из гладкого ЭР (см. табл. 7-2).

Когда в организме начинают циркулировать большие количества некоторых соединений, например лекарственного препарата фенобарбитала, в печени синтезируется необычайно много ферментов, осуществляющих детоксикацию, а площадь поверхности гладкого ЭР за несколько дней удваивается. После удаления лекарственного вещества избыток мембран гладкого ЭР специфически разрушается, очевидно, с помощью лизосом (при участии особых образований, называемых аутофагирующими вакуолями), и через пять дней гладкий ЭР возвращается к нормальному состоянию. Как происходит регуляция всех описанных событий, неизвестно.

Обширный гладкий ЭР имеется также в других типах клеток. Например, клетки, производящие стероидные гормоны, которые образуются из холестерола (такие клетки есть в семенниках), содержат расширенную систему гладкого ЭР для размещения ферментов, необходимых для синтеза и модификации холестерола (пример показан на рис. 7-19). Мышечные клетки характеризуются специализированным и хорошо развитым гладким ЭР, называемым *саркоплазматическим ретикулумом*,–он поглощает ионы Ca^{2+} из цитозоля. Ca^{2+}-АТР-аза, откачивающая Ca^{2+} (разд. 6.4.8),–главный мембранный белок гладкого ЭР этого типа. Удаление Ca^{2+} из цитозоля приводит к расслаблению миофибрилл, которое следует за каждым актом мышечного сокращения.

7.3.3. Шероховатая и гладкая области ЭР могут быть физически отделены друг от друга [15]

Чтобы изучить функции и биохимические свойства ЭР, необходимо сначала отделить его мембраны от других компонентов клетки. Интуитивно кажется очевидным, что эта задача невыполнима, поскольку ЭР как бы прослаивает все другие компоненты клеточной цитоплазмы. К счастью, когда ткани или клетки разрушаются при гомогенизации, ЭР фрагментируется на множество мелких (диаметром около 100 нм) замкнутых пузырьков, называемых **микросомами**, сравнительно легко поддающихся очистке.

Микросомы, получающиеся из шероховатого ЭР, усеяны рибосомами и носят название *шероховатые микросомы*. Рибосомы всегда располагаются

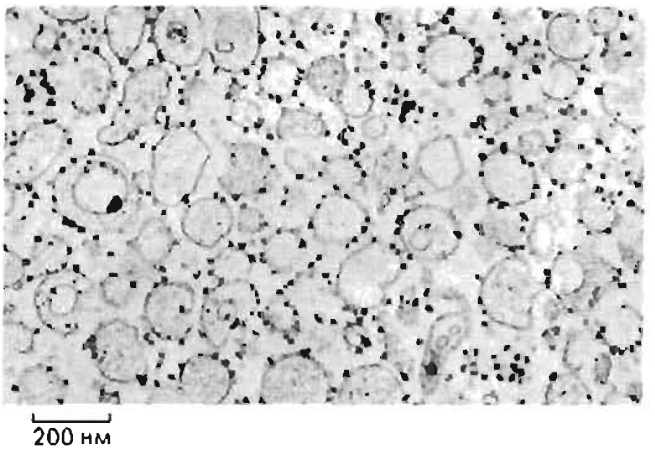


Рис. 7-24. Электронная микрофотография тонкого среза препарата очищенных шероховатых микросом, представляющих собой сферические пузырьки с прикрепленными к их наружной поверхности рибосомами. (С любезного разрешения George Palade.)

на их *наружной* поверхности; это свидетельствует о том, что пространство внутри этих микросом с биохимической точки зрения эквивалентно полости ЭР (рис. 7-24). В подобных гомогенатах обнаруживается также много пузырьков, сходных по размерам с шероховатыми микросомами, но не имеющих прикрепленных к ним рибосом. Такие *гладкие микросомы* образуются частично из гладкого ЭР, а частично из превратившихся в пузырьки фрагментов плазматической мембраны, аппарата Гольджи и митохондрий (в соотношении, зависящем от типа ткани). Таким образом, если шероховатые микросомы можно отождествить с шероховатым ЭР, то происхождение гладких микросом нельзя установить с такой же легкостью. Ткань печени заметно отличается в этом отношении от всех остальных тканей. Поскольку в гепатоцитах чрезвычайно много гладкого ЭР, источником большинства гладких микросом в гомогенатах печени служит гладкий ЭР.

Рибосомы, содержащие значительные количества РНК, придают шероховатым микросомам бо́льшую плотность по сравнению с гладкими. Поэтому шероховатые и гладкие микросомы можно отделить друг от друга путем седиментации их смеси в градиенте плотности сахарозы (рис. 7-25). Если провести сравнение шероховатых и гладких микросом из какой-либо ткани, например из печени, по таким параметрам, как ферментативная активность или полипептидный состав, то выясняется, что они удивительно похожи, хотя и не идентичны. Следовательно, большинство компонентов мембраны ЭР, по-видимому, может свободно перемещаться между ее шероховатыми и гладкими

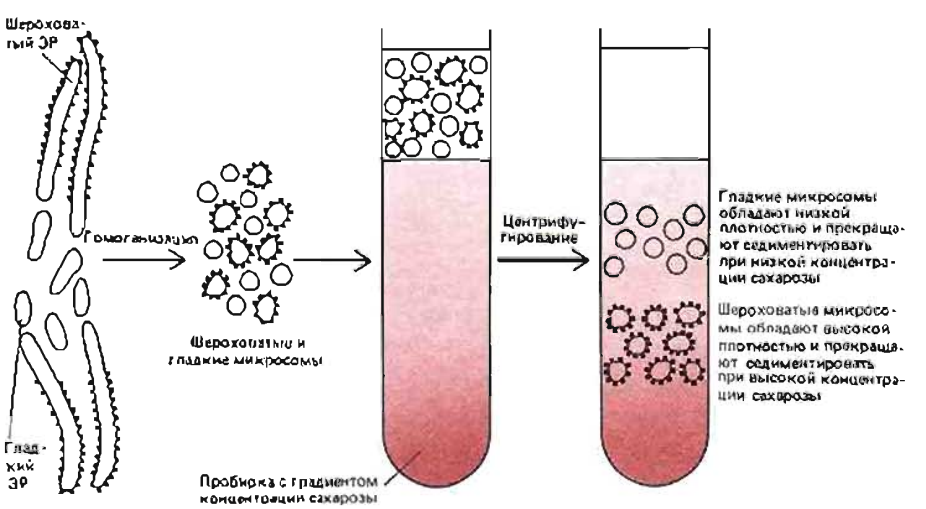


Рис. 7-25. Схема процедуры, используемой для выделения и очистки шероховатых и гладких микросом.

областями, как и следовало ожидать, принимая во внимание текучесть и непрерывность мембранной системы.

Вследствие того что шероховатые микросомы легко поддаются очистке и сохраняют при этом свою функциональную активность, они служат весьма удобным объектом для исследования множества различных процессов, протекающих в ЭР. Пузырьки топологически устроены таким же образом, как и шероховатый ЭР,–их поверхность, обращенная в сторону цитоплазмы, легко доступна для ингредиентов, которые могут быть добавлены in vitro. Для биохимика препарат шероховатых микросом есть не что иное, как уменьшенный аутентичный вариант эндоплазматического ретикулума, способный к синтезу белка, гликозилированию и синтезу мембран.

7.3.4. Шероховатые области ЭР содержат специфические белки, ответственные за связывание рибосом [16]

Поскольку мембрана ЭР, как и все другие мембраны, представляет собой двумерную жидкость, большинство белков и липидов должно свободно распределяться в ней между шероховатыми и гладкими областями, если нет каких-либо специальных ограничений. Тот факт, что при сравнении двух типов микросом, выделенных из клеток печени, в шероховатом ЭР обнаруживаются тем не менее некие компоненты, которых нет в гладком ЭР, говорит о существовании определенных ограничивающих механизмов. В частности, шероховатый ЭР, по-видимому, содержит в своей мембране особые, не распределяющиеся равномерно по всему ЭР белки, которые, с одной стороны, участвуют в связывании ЭР с рибосомами, а с другой – помогают ему принять уплощенную форму (см. рис. 7-20).

Рибосомы шероховатого ЭР удерживаются на мембране частично благодаря растущим полипептидным цепям, продвигающимся через мембрану ЭР по мере своего синтеза (см. ниже). Однако если образование полипептидных цепей прерывается под действием какого-либо ингибитора, подобного пуромицину, то рибосомы все равно остаются прочно ассоциированными с мембраной шероховатых микросом. Такие рибосомы можно отделить от микросом, суспендируя последние в растворе с высокой концентрацией соли, разрушающей взаимодействие между рибосомами и особыми мембранными белками шероховатых микросом. Кроме того, рибосомы могут реассоциировать с мембранами шероховатых микросом, от которых они были отделены. Рибосомы быстро и с высоким сродством связываются с ограниченным числом участков на мембране, так что «ободранная» мембрана естественным образом вновь приобретает то же число рибосом, что и было на ней после выделения из клеток.

Участок связывания с мембраной находится на большой субчастице рибосомы, которая в этом месте, по-видимому, и прикрепляется к двум специфическим гликопротеинам шероховатого ЭР. Эти два белка, называемые *рибофоринами*, пронизывают мембрану ЭР и обнаруживаются исключительно в шероховатых областях ЭР. Непонятно, что мешает рибофоринам диффундировать в мембрану гладкого ЭР. В принципе они могли бы удерживаться на месте либо за счет образования больших двумерных кристаллов в бислое, либо с помощью фибриллярных белков, локализованных на обеих сторонах бислоя (разд. 6.2.1б). Каков бы ни был этот механизм, он, вероятно, отвечает также за более уплощенную форму шероховатого ЭР по сравнению с гладким.

7.3.5. Белки, синтезируемые на мембраносвязанных рибосомах, в процессе трансляции проходят через мембрану [17]

Многие белки на некоторых этапах своего существования вынуждены преодолевать барьер проницаемости, создаваемый клеточной мембраной. Самым ярким из всех многочисленных примеров такого рода служат белки, выде-

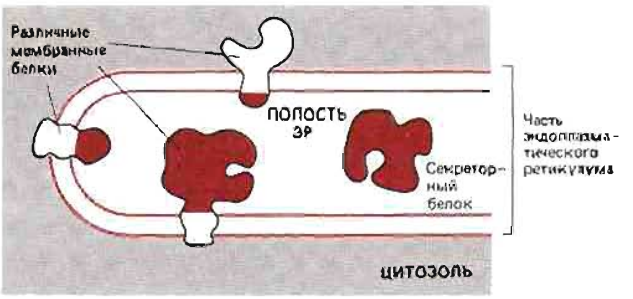


Рис. 7-26. Схематическое изображение четырех белков, у которых выделены цветом те их части, которые проходят через липидный бислой ЭР во время синтеза белка. Показаны три различных мембранных белка и один секреторный белок.

ляемые клеткой в окружающую среду (секреторные белки). В этом случае связывание рибосом с мембраной ЭР помогает решить проблему транспорта водорастворимых белков через гидрофобную мембрану: белки прокладывают путь через мембрану ЭР по мере того, как синтезируется их полипептидная цепь, но прежде, чем она сможет свернуться и принять конечную гидрофильную конформацию. Как только белки попадают внутрь полости шероховатого ЭР, они транспортируются через аппарат Гольджи и затем выходят из клетки. Таким образом, секреторные белки оказываются полностью изолированными от цитозоля сразу же после завершения своего синтеза.

Сходная, но более сложная ситуация имеет место в случае мембранных белков, пронизывающих липидный бислой в поперечном направлении. Большие гидрофильные части их полипептидных цепей часто выступают из бислоя либо с обращенной к полости стороны внутриклеточных мембран, либо с топологически эквивалентной внеклеточной стороны плазматической мембраны (рис. 7-26). В отличие от секреторных мембранные белки не производятся в значительных количествах, так что изучение способа их синтеза представляет собой более трудную задачу. Однако существует один мембранный белок, синтезируемый клетками в больших количествах. Это *G-белок вируса везикулярного стоматита* (ВВС), имеющего внешнюю оболочку. После заражения этим вирусом клетка начинает производить только один мембранный белок, а именно G-белок, вместо сотен и тысяч различных видов мембранных белков, которые образуются de novo в неинфицированных клетках. Это дает возможность сравнительно легко прослеживать за его синтезом. Было показано, что, как и в случае секретируемых белков, бóльшая часть полипептидной цепи G-белка проходит сквозь мембрану ЭР, пока он синтезируется. Однако вместо того, чтобы перейти в полость ЭР, этот белок удерживается в бислое с помощью короткого гидрофобного сегмента своей полипептидной цепи. Таким образом, G-белок остается связанным с мембраной, а 500 аминокислот, прошедших через мембрану ЭР, образуют внешний «шип», выступающий наружу из липидного бислоя, покрывающего зрелую вирусную частицу.

Принято говорить, что мембраносвязанные рибосомы, на которых транслируются продукты, проходящие через мембрану во время своего синтеза, заняты в процессе **направленного выведения** (vectorial discharge) белка. Это удачный термин, поскольку он подчеркивает две важные особенности этого процесса. Во-первых, рибосомы обнаруживаются только на обращенной к цитозолю стороне мембраны ЭР, и, значит, перенос полипептидной цепи сквозь мембрану должен быть «направленным» – от цитозоля к полости ЭР. Перенос можно считать направленным также в том смысле, что полипептид проходит через мембрану вперед N-концом, так как именно в этом направлении происходит белковый синтез (разд. 5.1.5). Во-вторых, термин «выведение» (discharge) подчеркивает, что это должен быть активный, энергозависимый процесс. Механизм, позволяющий растущему полипептиду проходить через мембрану, еще неизвестен, как неизвестен и источник необходимой энергии, но теперь эти спорные вопросы можно попытаться разрешить на биохимическом уров-

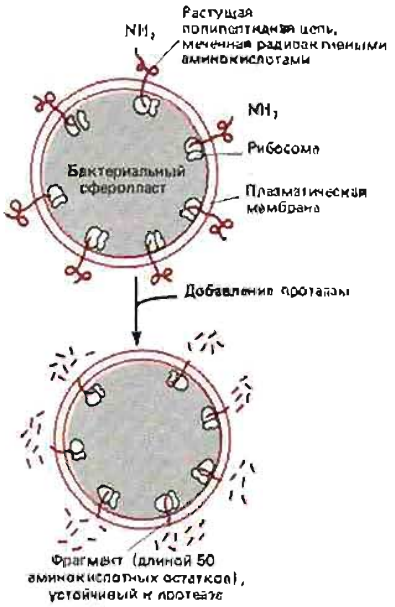


Рис. 7-27. Схематическое изображение направленного транспорта белков у бактерии. После удаления клеточных стенок (и образования сферопластов) клетки кратковременно инкубируют с радиоактивными аминокислотами, чтобы пометить растущие полипептидные цепи, синтезирующиеся на связанных с плазматической мембраной рибосомах. Ту часть растущей полипептидной цепи, которая прошла через мембрану, можно гидролизовать с помощью протеазы. Изображение дано не в масштабе – на самом деле диаметр рибосомы составляет только 1/40 часть диаметра бактериальной клетки.

не, используя бесклеточные системы. Вероятно, в процессе направленного выведения принимает участие некий транспортный белок неизвестного пока типа – что-то вроде энергозависимого полипептидного насоса.

7.3.6. Прямые доказательства в пользу концепции направленного выведения были получены из экспериментов, проведенных на бактериях [18]

Концепция направленного выведения была выдвинута на основе экспериментов, впервые проведенных в 1966 г. Эти эксперименты показали, что многие из новосинтезированных полипептидов, освободившихся от микросом под действием пуромицина, остаются заключенными в полости микросом. Однако самые убедительные опыты были проведены лишь в 1977 г., и, как это часто бывает, в них использовали бактериальные клетки. Грамположительные бактерии, такие, как *Bacillus subtilis*, секретируют большие количества ферментов. Поскольку у бактерий нет ЭР, эти ферменты синтезируются на рибосомах, прикрепленных к плазматической мембране. В эксперименте, схематически изображенном на рис. 7-27, было обнаружено, что один конец секретируемых полипептидных цепей можно избирательно гидролизовать с помощью протеолитических ферментов, добавленных к неповрежденным бактериальным клеткам, у которых предварительно были удалены клеточные стенки. Другой же конец, синтез которого на рибосомах внутри клетки еще продолжается, в таких условиях не гидролизуется. Это говорит о том, что один конец растущей полипептидной цепи должен выступать с наружной стороны клетки. Кроме того, почти вся законченная часть образующегося полипептида расщепляется протеолитическими ферментами – нерасщепленным остается только короткий сегмент длиной 50 аминокислотных остатков. Когда свободные рибосомы подвергаются мягкому протеолизу, обнаруживается, что с ними связан устойчивый участок синтезированного белка длиной 30 аминокислотных остатков; это означает, что в любой момент времени лишь 20 остатков каждого полипептида находится в мембране в процессе направленного выведения. Этой длины хватает, чтобы полипептид мог пересечь липидный бислой только один раз.

Нельзя поставить столь же убедительные эксперименты подобного типа с эукариотическими шероховатыми микросомами, хотя соответствующие попытки и делались. Основная трудность заключается в обратной топологии — растущий полипептид оказывается внутри микросомы, и в настоящее время не существует способа, который позволил бы ограничить действие добавленной протеазы исключительно внутренним пространством микросомы.

7.3.7. Мембраносвязанные рибосомы происходят от свободных рибосом, которые направляются к мембране ЭР с помощью специальных сигнальных последовательностей [19]

Хотя на мембраносвязанных рибосомах шероховатого ЭР и синтезируются белки определенного класса, предназначенные для направленного выведения, нет никаких данных о том, что эти рибосомы сами по себе чем-то отличаются от свободных цитоплазматических рибосом. Согласно современным представлениям, мембраносвязанные рибосомы – это не что иное, как обычные рибосомы, специфически направляемые к мембране ЭР той полипептидной цепью, которая синтезируется на них.

Важный вклад в понимание того, каким образом рибосомы направляются к ЭР, внесли детальные исследования синтеза антител (иммуноглобулинов). Легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов – это основные продукты секреции плазматических клеток иммунной системы (т. 5, гл. 17). Если мРНК, кодирующая легкую цепь какого-либо иммуноглобулина, транслируется in vitro в присутствии свободных рибосом, то легкая цепь образуется в форме предшественника, который содержит 20 дополнительных аминокислотных остат-

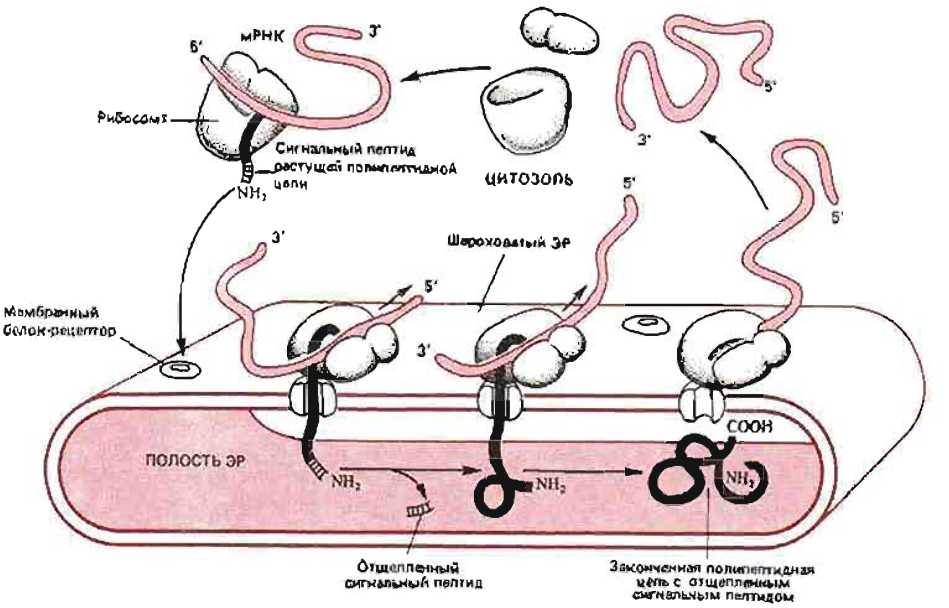


Рис. 7-28. Схема возможной последовательности событий, иллюстрирующая гипотезу сигнального пептида. Для простоты показана только одна рибосома, а не полирибосома. Как сейчас считают, связывание рибосомы цитозоля с шероховатым ЭР зависит от двух факторов: сродства самой рибосомы к специальным мембранным белкам ЭР (возможно, рибофоринам, см. разд. 7.3.4) и взаимодействия N-концевого сигнального пептида растущей полипептидной цепи с мембранным белком-рецептором. Однако, как только начинается перенос белка через мембрану, сама растущая полипептидная цепь помогает удерживать рибосому, заменяя таким образом второй необходимый фактор.

ков, не обнаруживаемых в секретируемом белке. Дополнительный «лидерный» пептид занимает в молекуле предшественника крайнее N-концевое положение. Цепи же, синтезированные in vitro на рибосомах, прикрепленных к шероховатым микросомам, лишены этого дополнительного N-концевого пептида. Описанные наблюдения подтвердили более раннее предположение, что *лидерная последовательность* служит «сигналом», направляющим рибосому к шероховатым областям ЭР (рис. 7-28). Следовательно, должен существовать определенный рецептор, узнающий белки, содержащие такой *сигнальный пептид*, причем этот рецептор должен присутствовать исключительно в шероховатых областях мембраны ЭР.

Эту точку зрения подтвердили последующие эксперименты, показавшие, что если основные секреторные белки поджелудочной железы синтезируются in vitro на свободных рибосомах, то в результате получаются полипептиды-предшественники («пресекреторные» белки), содержащие сходную N-концевую лидерную последовательность длиной 16 остатков, отсутствующую в белках, синтезируемых in vivo. С тех пор были описаны предшественники множества секреторных и интегральных мембранных белков прокариот и эукариот. Во всех случаях в составе N-концевых сигнальных пептидов обнаруживается большое число остатков гидрофобных аминокислот, хотя по аминокислотной последовательности эти пептиды сильно различаются. Недавно было продемонстрировано, что сигнальные последовательности на самом деле отщепляются на обращенной к полости стороне шероховатого ЭР под действием специфической протеазы, найденной только в шероховатых микросомах. Часто это происходит даже до завершения синтеза полипептида. N-концевые последовательности такого типа никогда не встречаются в белках, остающихся в цитозоле.

Рибосомы, начавшие синтезировать в цитозоле какой-либо белок, предназначенный для ЭР, должны быть перенесены на шероховатый ЭР, чтобы включиться в процесс направленного выведения. Каким же образом такие рибосомы специфически узнаются мембраной ЭР? Оказывается, в цитозоле присутствует белок, состоящий из нескольких субъединиц, который связывается с рибосомами вскоре после того, как на них образовался сигнальный пептид. Этот белок, который носит название *белок, узнающий сигнал*, останавливает трансляцию на рибосоме до тех пор, пока последняя не присоединится к мембране шероховатого ЭР. Возможно, этот белок узнает как N-конец

новосинтезированного полипептида, так и определенный рецептор на поверхности мембраны шероховатого ЭР, прикрепляя таким образом рибосому к ЭР. Как только начинается процесс направленного выведения, синтез белка на рибосоме возобновляется. Свойства рецептора, находящегося в мембране ЭР, неизвестны. Предполагают, что в стабилизации комплекса рибосома—ЭР участвуют рибофорины.

7.3.8. Существуют генетические данные в пользу гипотезы сигнальной последовательности [20]

Для проверки идеи о том, что лидерные последовательности служат сигналами для начала направленного выведения белков, были использованы методы генетического анализа, разработанные для прокариот. Исследования проводили двумя различными путями. 1) Было получено много мутантов по одному из мембранных белков *E. coli*: у всех мутантов этот белок не встроен в мембрану, а остается в цитоплазме. Оказалось, что большинство мутаций такого типа приводит к изменению крайней N-концевой области белка, включающей лидерную последовательность. 2) В специально созданных штаммах *E. coli* были объединены фрагменты ДНК, кодирующие полипептидные цепи интегральных мембранных белков и белков цитозоля, с целью получить новые гибридные белки. Было показано, что если существенная часть N-концевой области какого-либо мембранного белка *E. coli* соединяется с достаточно длинной С-концевой областью одного из белков цитозоля, то гибридный белок обнаруживается в мембране. Следовательно, для переноса в мембрану необходима, по-видимому, только N-концевая область полипептида.

С помощью гибридных белков *E. coli* удалось установить другой важный факт, касающийся сигнальных последовательностей: хотя эти последовательности необходимы для того, чтобы направить растущий полипептид к мембране, само по себе их присутствие не всегда достаточно, чтобы обеспечить включение белка в мембрану. Один из гибридных белков, содержащий очень короткий фрагмент N-концевой области мембранного белка (включающий тем не менее всю его лидерную последовательность), не встраивался в мембрану. Таким образом, лидерная последовательность, видимо, взаимодействует с соседними участками полипептидной цепи с образованием уникальной трехмерной структуры, и скорее всего именно эта структура, а не сама по себе лидерная последовательность необходима для специфического включения белка в мембрану.

7.3.9. Некоторые белки пересекают мембраны с помощью механизма посттрансляционного импорта, а не путем направленного выведения [21]

Некоторые белки могут пересекать определенные мембраны спустя много времени после того, как они синтезировались на рибосомах. Например, большинство белков митохондрий и хлоропластов кодируется ядерными генами (т. 3, гл. 9). Эти белки синтезируются и освобождаются от рибосом в цитозоле, а затем переносятся через мембрану соответствующей органеллы с помощью энергозависимого механизма (**посттрансляционный импорт**). Интересно, что бóльшая часть таких импортируемых белков также содержит N-концевые лидерные последовательности, отщепляющиеся сразу же после завершения транспорта через мембраны митохондрий и хлоропластов. В данном случае лидерные последовательности, как было показано, служат «сигналом», необходимым для того, чтобы направить белок в правильное место. В мембранах обеих упомянутых клеточных органелл должны быть, следовательно, специфические рецепторы, узнающие соответствующие N-концевые сигналы. Рецепторы, очевидно, функционально связаны с энергозависимым насосом, который перекачивает узнанный белок сквозь мембрану и при этом, возможно, осуществляет его кратковременное разворачивание (рис. 7-29).

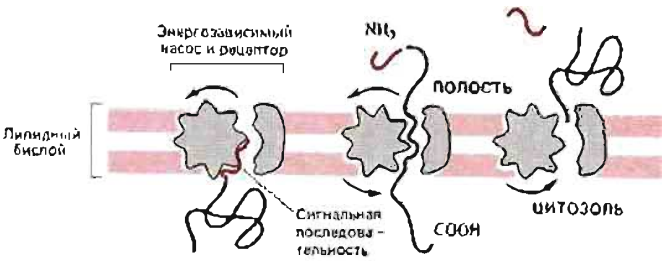


Рис. 7-29. Схема работы энергозависимого белкового насоса. После того как рецептор узнает какую-то особенность N-концевого пептида, активируется насос, проталкивающий через мембрану весь белок. По-видимому, для объяснения наблюдаемого переноса уже синтезированных белков из цитозоля в митохондрии и хлоропласты нужно предположить существование механизма такого типа.

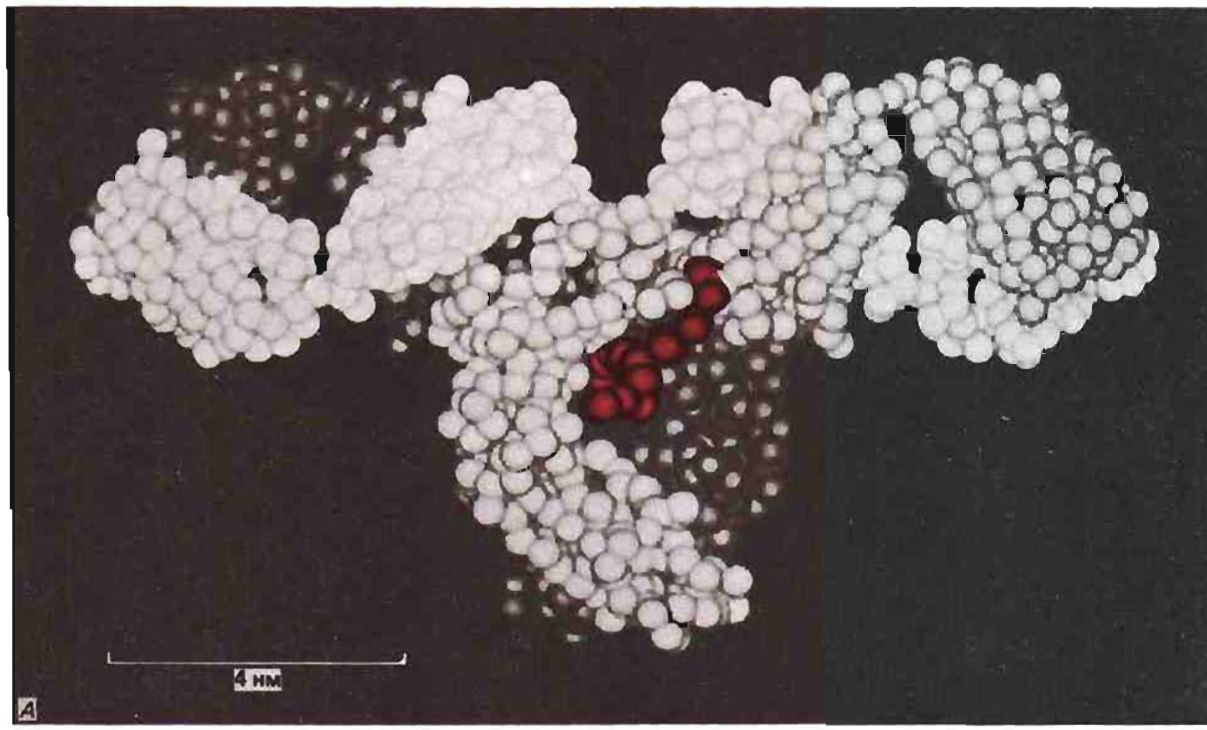
Некоторые мембранные белки могут входить в мембрану ЭР и частично пересекать ее с помощью механизма посттрансляционного импорта. Возможно, это имеет место в случае белков, у которых значительная доля их массы находится в липидном бислое и только небольшие участки молекул выступают с той стороны мембраны, которая не контактирует с цитоплазмой. Легко представить себе, как такой гидрофобный мембранный белок мог бы просто раствориться в липидном бислое после освобождения его в цитозоль или даже во время его синтеза. А энергетические расходы, связанные с переносом через липидный бислой относительно небольшой гидрофильной части этого белка, могли бы быть покрыты за счет выигрыша в свободной энергии, полученного при переносе его гидрофобной части из водной среды в гидрофобную внутреннюю область бислоя. Некоторые из белков, локализованных в наружной мембране митохондрий, видимо, входят в эту мембрану именно таким образом после того, как завершается их синтез на рибосомах в цитозоле (т. 3, разд. 9.5.12).

Даже из немногих только что рассмотренных примеров с очевидностью следует, что в белках должно существовать много различных типов сигнальных последовательностей. Одни сигналы направляют тот или иной белок в ЭР, другие – в митохондрию, а третьи – в хлоропласт (в растительной клетке). Системы узнавания, участвующие в этом процессе, должны обладать высокой степенью избирательности, поскольку белки, по-видимому, весьма надежно доставляются по своим внутриклеточным адресам.

7.3.10. Большинство белков, синтезированных в шероховатом ЭР, гликозилируется [22]

Гликозилирование – это одна из основных биосинтетических функций ЭР. Поразительно, что большинство белков, которые сосредотачиваются в полости ЭР перед секрецией или транспортировкой их в другие внутриклеточные пункты назначения (такие, как аппарат Гольджи, лизосомы или плазматическая мембрана), представляют собой **гликопротеины** (рис. 7-30). В отличие от них растворимые белки цитозоля не гликозилированы.

Существенный успех в понимании процесса гликозилирования был достигнут благодаря открытию, заключающемуся в том, что в большинстве случаев к белкам в ЭР присоединяется олигосахарид только одного типа (состоящий из N-ацетилглюкозамина, маннозы и глюкозы) и что этот олигосахарид связывается с NH_2-группой боковой цепи остатка аспарагина (рис. 7-31). Все обнаруженные в зрелых гликопротеинах разнообразные олигосахариды, связанные таким способом с аспарагином, образуются в результате различных модификаций этого олигосахарида-предшественника. Обычно его модификация происходит во время последующего перемещения гликопротеина через аппарат Гольджи (разд. 7.4.4). Связанные с аспарагином олигосахариды (**N-связанные олигосахариды**) чаще всего встречаются в гликопротеинах. Реже олигосахариды присоединяются к ОН-группе боковых цепей серина, треонина или гидроксилизина (**О-связанные олигосахариды**), и пока еще неясно, начинается ли гликозилирование подобного рода в ЭР или же имеет место



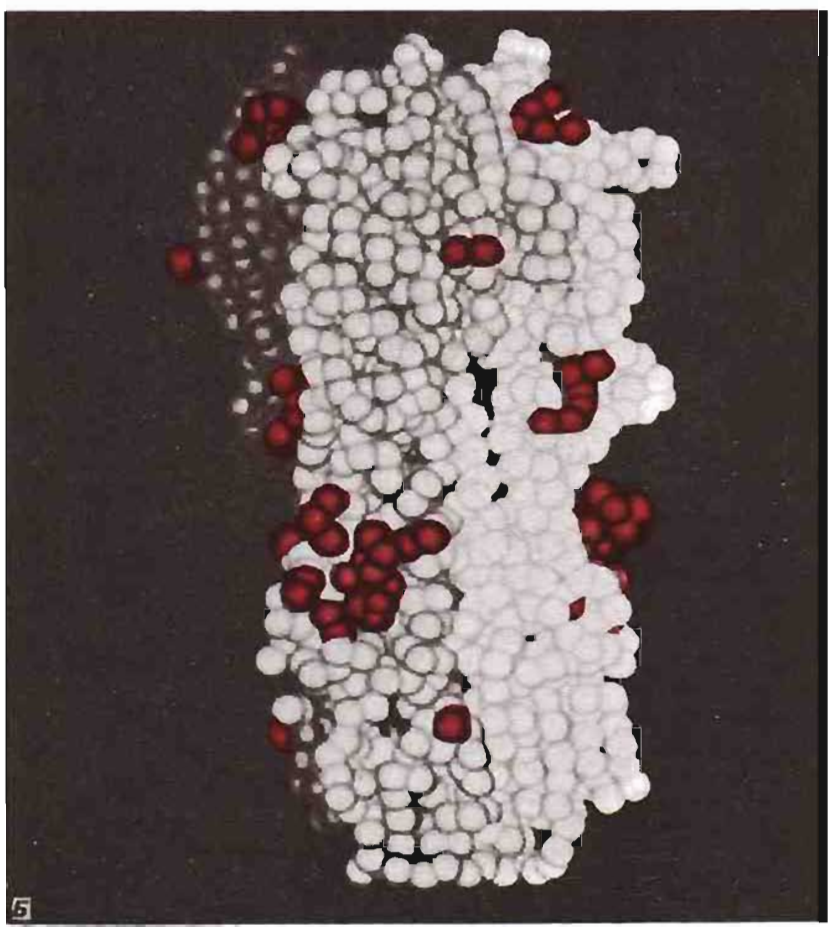


Рис. 7-30. Трехмерные модели двух гликопротеинов, демонстрирующие структуру и локализацию олигосахаридных цепей (*цветные атомы*), ковалентно связанных с белковыми частями молекул. *А.* Молекула иммуноглобулина (антитела). *Б.* Мембранный гликопротеин: гемагглютинин вируса гриппа. Гликопротеины либо встроены в клеточные мембраны, либо секретируются. Количество углеводов в них может составлять от 1 до 85% (по весу). Некоторые гликопротеины, богатые углеводами, содержат десятки и даже сотни олигосахаридных цепей на одну молекулу. (Фотографии любезно предоставил Richard J. Feldmann.)

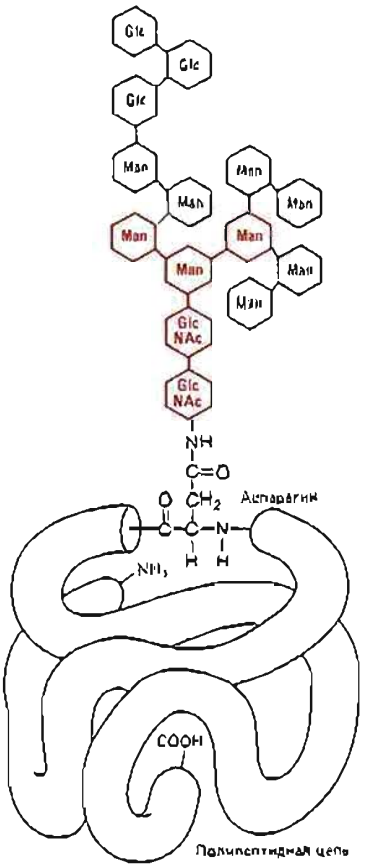


Рис. 7-31. Структура связанного с аспарагином олигосахарида, который присоединяется к большинству белков на стороне мембраны ЭР, обращенной к его полости. Изображенные в цвете сахара образуют кор (сердцевину) этого олигосахарида. После интенсивного «подрезания» олигосахаридов в аппарате Гольджи во многих гликопротеинах остаются только сахара, образующие кор (см. рис. 7-50).

только в аппарате Гольджи. Детали этого процесса тоже непонятны.

Места внутри клетки, где происходит гликозилирование, можно идентифицировать, используя метод радиоавтографии. Например, при непродолжительной инкубации срезов щитовидной железы с [^{3}H]-маннозой большое количество метки включается в олигосахарид, присоединенный к тиреоглобулину – главному гликопротеину, который синтезируется в клетках щитовидной железы. Чтобы определить, где протекает эта реакция, клетки метят с помощью [^{3}H]-маннозы, а затем готовят образцы для электронной микроскопии так, как показано на рис. 7-32. Тонкие срезы этих клеток покрывают тонким слоем фотографической эмульсии, и в образовавшейся пленке над теми местами среза, где происходит распад [^{3}H], формируются гранулы серебра (рис. 7-33). При электронно-микроскопическом исследовании среза можно определить локализацию [^{3}H] относительно известных клеточных компонентов. Результат этого эксперимента очень четкий. [^{3}H]-манноза включается только в ЭР (рис. 7-34).

7.3.11. Олигосахарид присоединяется к растущей полипептидной цепи на обращенной к полости стороне мембраны ЭР

Предполагается, что перенос олигосахарида на остаток аспарагина осуществляется на обращенной к полости стороне мембраны ЭР, и фермент, катализирующий эту реакцию, представляет собой мембраносвязанный белок, причем его активный центр выступает из мембраны именно с этой стороны. Этот факт объясняет, почему белки цитозоля, никогда не контактирующие с поверхностью ЭР, обращенной к его полости, не гликозилируются. Как показано на рис. 7-35, уже полностью сформировавшийся олигосахарид присоединяется к остатку аспарагина в данном белке в ходе одной ферментативной реакции почти сразу же после того, как этот остаток появляется на обращенной к полости стороне мембраны ЭР. Для реакции гликозилирования наиболее доступны остатки аспарагина (Asn), входящие в состав последовательностей Asn-X-Ser или Asn-X-Thr (где X – любая аминокислота). Эти две последовательности намного реже встречаются в гликопротеинах, чем в негликозилированных цитоплазматических белках. Очевидно, в процессе эволюции гликопротеинов давление отбора было направлено против таких последовательностей, поскольку гликозилирование во многих местах, несомненно, мешало бы правильной трехмерной укладке белковой цепи.

Если бы гликозилирование происходило на поверхности, обращенной к цитоплазме, то в процессе направленного выведения белка могли бы возникнуть серьезные трудности, поскольку в таком случае этот механизм должен был бы приспособиться к протаскиванию через мембрану массивных олигосахаридных цепей. Система, в которой олигосахарид и полипептид, прежде чем соединиться на обращенной к полости стороне ЭР, транспортируются через мембрану по отдельности с помощью различных механизмов, очевидно, упрощает дело.

7.3.12. Олигосахарид присоединяется к полипептиду при участии активированного липида и затем почти немедленно модифицируется [23]

Для протекания реакции, изображенной на рис. 7-35, необходимо, чтобы олигосахарид, который должен быть перенесен на остаток аспарагина, присутствовал на обращенной к полости стороне ЭР в активированной форме. Активация достигается соединением олигосахарида с молекулой-донором посредством высокоэнергетической связи. В начале 1970-х годов было показано, что активированный донор – это особая липидная молекула долихол, с которой олигосахарид связывается через пирофосфатный мостик.

Олигосахарид образуется путем последовательного присоединения углеводных остатков к этому мембраносвязанному липиду. Сахара сначала акти-

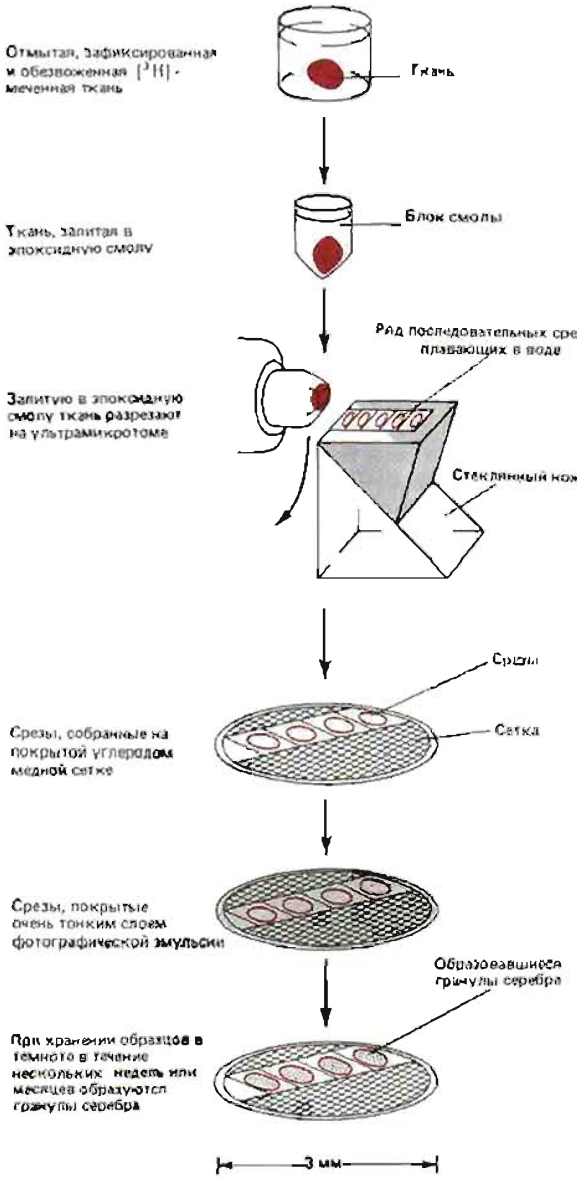


Рис. 7-32. Схема, показывающая, как приготавливают тонкие срезы тканей для того, чтобы локализовать внутриклеточные места включения радиоактивной метки с помощью электронной микроскопии в сочетании с радиоавтографией. Важно, чтобы вся радиоактивность, не включившаяся в продукт, была удалена во время фиксации и отмывки образца перед заливкой его в эпоксидную смолу, тогда как сам продукт должен остаться в ткани.

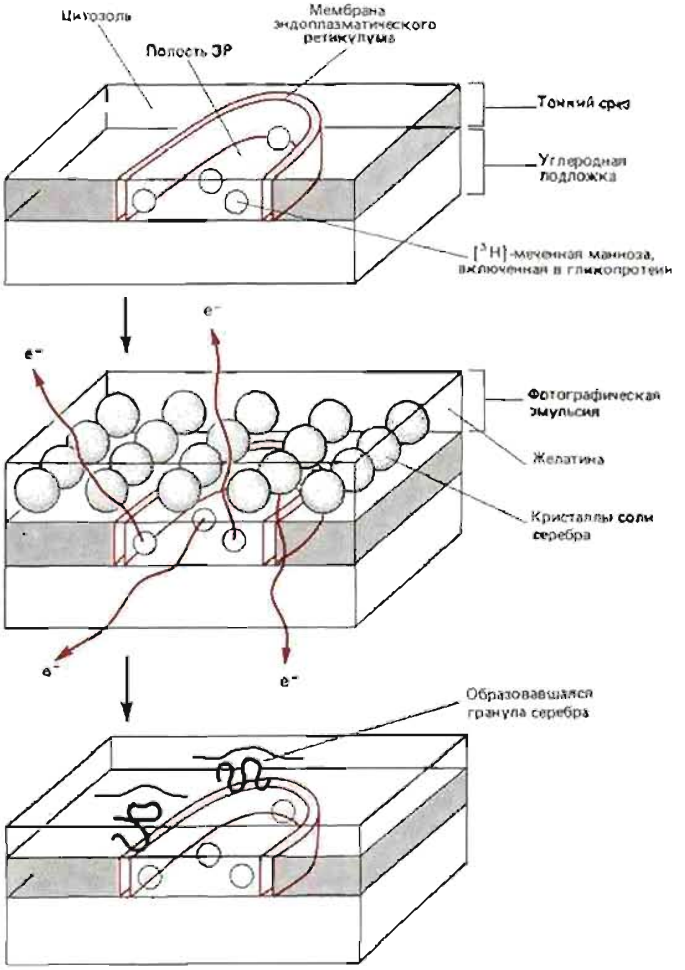


Рис. 7-33. Схема, объясняющая, на каких принципах основана радиоавтография. В данном случае положение гранул серебра относительно изображения клеточных компонентов на электронной микрофотографии показывает локализацию [³H]-маннозы, включенной в гликопротеин. Поскольку гранулы серебра, формирующиеся под действием электронов, испускаемых при распаде [³H], могут оказаться слегка смещенными по отношению к месту испускания электронов, локализация радиоактивной молекулы определяется менее точно, чем позволяет разрешение электронного микроскопа.



Рис. 7-34. Схема, показывающая места синтеза тиреоглобулина в клетке щитовидной железы, выявленные после инкубации ее с [³H]-маннозой. Использование методов, представленных на предыдущих рисунках, дает возможность определить, что гранулы серебра локализуются над шероховатым ЭР и, следовательно, именно там [³H]-манноза включается в тиреоглобулин. Однако разрешение метода (~140 нм) недостаточно, чтобы локализовать продукт в полости цистерн, хотя такое расположение и показано на схеме.

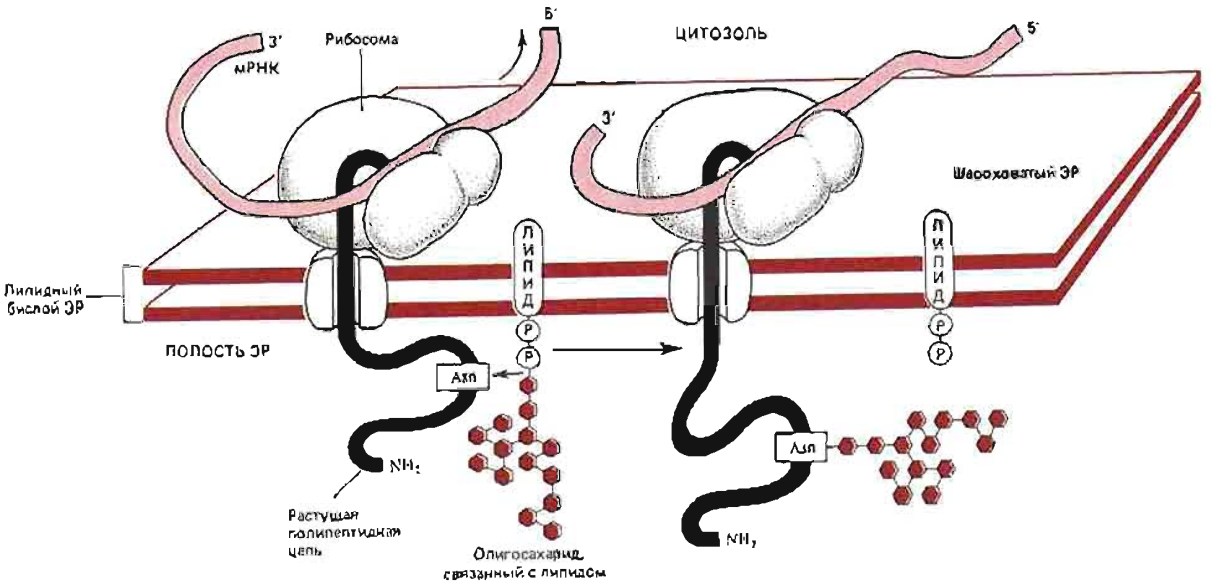


Рис. 7-35. Схема гликозилирования белков в ЭР. Как только полипептидная цепь входит в полость ЭР, доступные остатки аспарагина гликозилируются. Олигосахарид (изображенный на рис. 7-31) целиком переносится на остаток аспарагина в результате реакции, катализируемой мембраносвязанным ферментом – *гликозилтрансферазой*.

вируются в цитозоле с образованием *нуклеотид-сахарных промежуточных соединений*, а эти последние в определенном порядке отдают свои сахара (прямо или опосредованно) липиду (рис. 7-36). Долихол – очень длинная гидрофобная молекула: имея в своем составе 22 пятиуглеродные единицы, он может пронизывать толщу липидного бислоя более чем три раза. Поскольку долихол прочно встроен в мембрану, связанный с ним олигосахарид также прочно удерживается на обращенной к полости стороне ЭР, где должно происходить гликозилирование.

За начальным гликозилированием белка в ЭР следуют первые этапы процесса, который в конце концов приводит к значительному изменению структуры олигосахарида. Три остатка глюкозы быстро отщепляются от олигосахаридов большинства, но, вероятно, не всех гликопротеинов. Такое «подрезание», или «процессинг», олигосахаридов продолжается в аппарате Гольджи, поэтому мы отложим обсуждение данного вопроса до следующего раздела.

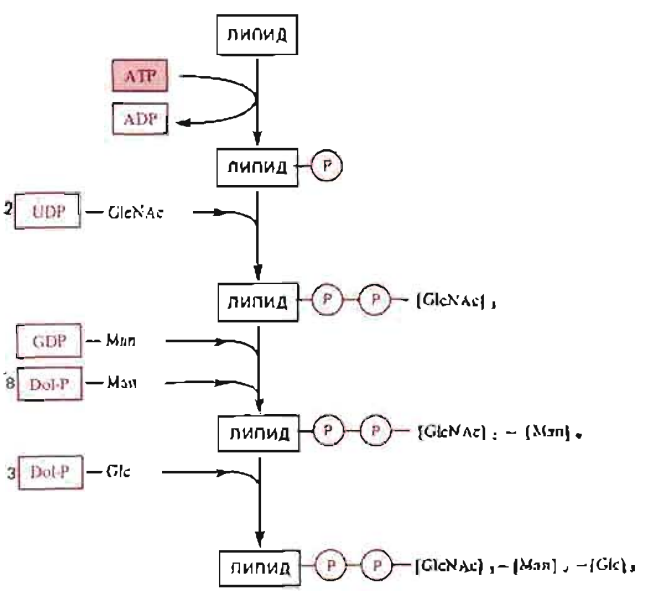


Рис. 7-36. Синтез связанного с липидом олигосахарида происходит в мембране ЭР. Показанные на схеме промежуточные продукты встроены в мембрану. Липид представляет собой долихол. Пирофосфат, присоединенный к липиду, активирует олигосахарид, что необходимо для последующего связывания его с белками.

7.3.13. Липиды синтезируются в мембране ЭР

И фосфолипиды, и холестерол, представляющие собой основные строительные блоки всех липидных бислоев, синтезируются на мембранах ЭР. Фактически все образующиеся в клетке липиды, за исключением жирных кислот и двух митохондриальных фосфолипидов (см. ниже), синтезируются на этих мембранах. Таким образом, одна из важнейших функций ЭР состоит в том, чтобы производить почти все липиды и белки, необходимые для формирования новых клеточных мембран.

Все принципы, лежащие в основе сборки липидных бислоев, можно проиллюстрировать, рассматривая биосинтез фосфолипидов. Главный фосфолипид, который образуется в ЭР,–это фосфатидилхолин (называемый также лецитином). Он синтезируется в три этапа из двух жирных кислот, глицеролфосфата и холина (рис. 7-37). Каждый этап катализируется ферментом, который растворен в липидном бислое ЭР, а его активный центр обращен к цитозолю. На первом этапе под действием ацилтрансферазы из жирных кислот и глицеролфосфата, поступающих из цитозоля, синтезируется фосфатидная кислота–соединение, в достаточной степени водонерастворимое и потому остающееся в липидном бислое после своего образования. Фосфатидная кислота в бислое служит субстратом для следующего фермента и т. д.

С точки зрения сборки мембраны самая важная часть метаболического пути, изображенного на рис. 7-37,–это включение новых липидов в бислой, что имеет место во время первого этапа. На последующих этапах модифицируются головы этих липидов и, следовательно, химические свойства бислоя, но не происходит собственно роста мембраны.

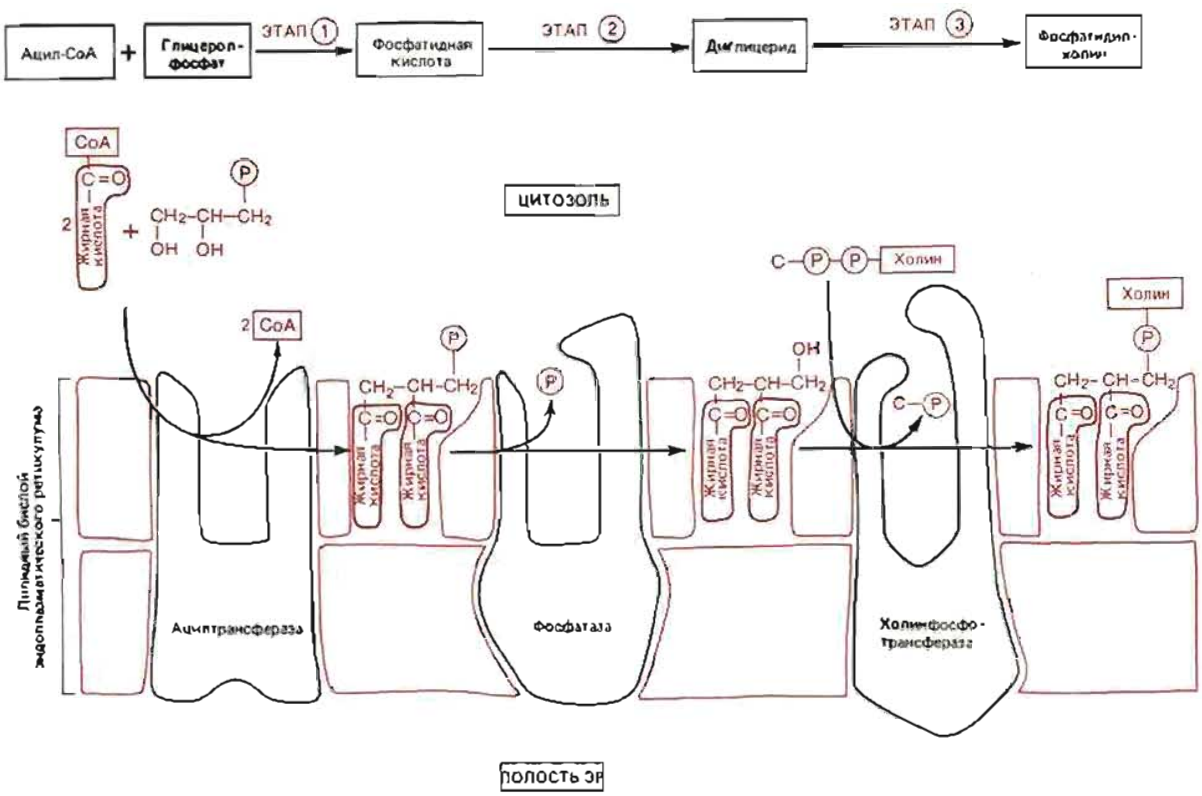


Рис. 7-37. Синтез фосфатидилхолина в мембране ЭР. Реакции протекают на обращенной к цитозолю стороне бислоя и катализируются мембраносвязанными ферментами. Промежуточные продукты быстро диффундируют в бислое от фермента к ферменту. Липидный бислой увеличивается только на этапе 1, когда из сравнительно хорошо растворимых в воде предшественников образуется гидрофобная липидная молекула. C-Ⓟ-Ⓟ-холин–это CDP-холин.

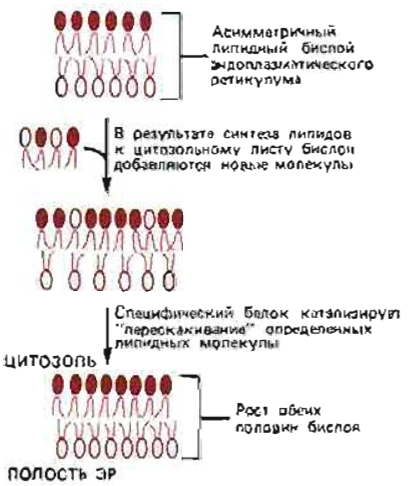


Рис. 7-38. Схема, иллюстрирующая процесс «перескакивания» липидных молекул из одного монослоя (листа) бислойной мембраны ЭР в другой. Поскольку новые липидные молекулы добавляются только к цитоплазматическому монослою, должен существовать некий специальный механизм (возможно, включающий мембраносвязанные транспортные белки), с помощью которого часть этих молекул переносится в монослой, обращенный к полости ЭР, так что мембрана растет как бислой. Два монослоя по крайней мере в большинстве бислойных мембран содержат различные виды липидов. Такие асимметричные бислои, естественно, должны возникать в ЭР, если транспортные белки предпочтительно узнают определенные виды липидов.

7.3.14. Биосинтез липидов асимметричен [24]

Вопрос о действительных взаимоотношениях между биосинтезом липидов и ростом липидного бислоя впервые прояснился благодаря экспериментам, проведенным на бактериях. У бактерий из-за отсутствия внутренних мембран синтез фосфолипидов происходят в плазматической мембране. Было обнаружено, что новосинтезированные молекулы фосфолипидов вначале присутствуют только в цитоплазматической половине (монослое) липидного бислоя плазматической мембраны.

На основании этих результатов легко представить, как осуществляется рост липидных бислоев в бактериальных и эукариотических клетках. Поскольку почти на каждом этапе синтеза фосфолипидов используются метаболиты, обнаруживаемые только в цитозоле (CoA-производные жирных кислот, глицеролфосфат, CDP-холин), активные центры ферментов, катализирующих эти этапы, также должны быть обращены к цитозолю. Таким образом, даже после первоначальной «фиксации» первичного продукта в бислое (что имеет место на этапе 1, рис. 7-37) все последующие модификации новосинтезированного липида, приводящие к образованию других липидов, происходят на той же самой стороне бислоя.

Такой механизм должен был бы, естественно, превращать любой бислой в монослой, так как включение новых липидов и, следовательно, увеличение мембраны ограничиваются цитозольной половиной бислоя. Очевидно, должен существовать механизм, с помощью которого фосфолипиды быстро перемещаются в противоположный монослой, так что он увеличивается параллельно с цитозольным. В синтетических липидных бислоях липиды не «перескакивают» подобным образом из одного монослоя в другой (разд. 6.1.2). Однако в ЭР и бактериальных мембранах равновесное распределение фосфолипидов по бислою – дело нескольких минут. Это время почти в 100 000 раз меньше теоретически рассчитанного для случая спонтанного перескока. Столь быстрое перемещение фосфолипидов из одного монослоя в другой наблюдали до сих пор только в мембранах, способных к биосинтезу липидов, – оно не происходит, например, в плазматической мембране животных клеток. Таким образом, можно заключить, что в мембранах ЭР (а также в плазматической мембране бактерий) должен существовать некий механизм, обеспечивающий такое перемещение молекул липидов. Одна привлекательная, но недоказанная идея заключается в том, что равновесное распределение липидных молекул катализируется специфическим транспортным белком, обнаруженным только в этих мембранах (рис. 7-38).

7.3.15. Специальные белки переносят фосфолипиды из ЭР в митохондрии [25]

Особая проблема, связанная с фосфолипидами, возникает в митохондриях, поскольку эти органеллы обладают ограниченной способностью к их синтезу. Большинство мембран, таких, как мембраны аппарата Гольджи, лизосом, а также плазматическая мембрана, получают свои белки вместе с липидами (и те и другие синтезируются в ЭР) в форме небольших пузырьков (см. следующий раздел). Однако рост митохондриальных мембран не может осуществляться путем присоединения уже готовых фрагментов, образованных где-то в другом месте. Липиды и белки, производимые вне митохондрий, включаются в митохондриальные мембраны по отдельности после их доставки в растворимой, а не в мембраносвязанной форме. Хотя некоторые белки синтезируются на специальных рибосомах внутри самих митохондрий (т. 3, разд. 9.5.4), большинство митохондриальных белков импортируется в форме водорастворимых полипептидных предшественников, синтезированных на свободных рибосомах в цитозоле (т. 3, разд. 9.5.12). Аналогично два отрицательно заряженных липида, обнаруженных в митохондриях, – фосфатидилглицерол и кардиолипин – образуются в митохондриальных мембранах. Другие

липиды, такие, как фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин, должны быть доставлены из ЭР (где они синтезируются) или из других клеточных мембран, которые получили эти липиды из ЭР. Каким же образом липидные молекулы транспортируются в митохондриальные мембраны?

Проблема, по-видимому, решается с помощью специальных водорастворимых белков, переносящих индивидуальные молекулы фосфолипидов из одной мембраны в другую,—так называемых *белков-переносчиков фосфолипидов*. Каждый такой белок узнает только определенные типы фосфолипидов и связывает одну молекулу. Перенос молекул между мембранными бислоями осуществляется следующим образом. Белок «экстрагирует» молекулу фосфолипида из какой-либо мембраны и удаляется с этим липидом, спрятанным в связывающем центре. Когда белок встречает другую мембрану с подходящими свойствами, он отдает связанную молекулу фосфолипида новому липидному бислою. В различных условиях in vitro транспортные белки распределяют фосфолипиды случайным образом между всеми имеющимися в наличии мембранами любого типа. Но даже в ходе случайного обмена может наблюдаться реальный перенос липидов из мембраны, обогащенной этими соединениями, в мембрану, содержащую мало липидов, так как липидные молекулы имеют тенденцию предпочтительно накапливаться в мембране, обладающей высоким сродством к липидам, и удаляться из мембран с более низким сродством к ним. Например, только с помощью одного этого процесса молекулы фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина могли бы перемещаться из ЭР, где они синтезируются, в митохондриальную мембрану. Способны ли транспортные белки переносить фосфолипиды более специфическим способом, пока еще неизвестно.

7.3.16. Обращенная к полости сторона любой внутренней органеллы топологически эквивалентна наружной поверхности клетки

Макромолекулы, переносимые из ЭР в другие места, упаковываются в мелкие **транспортные пузырьки**, которые отщепляются от промежуточной части ЭР (рис. 7-39). Эти пузырьки окружены липидным бислоем, состоящим из ли-

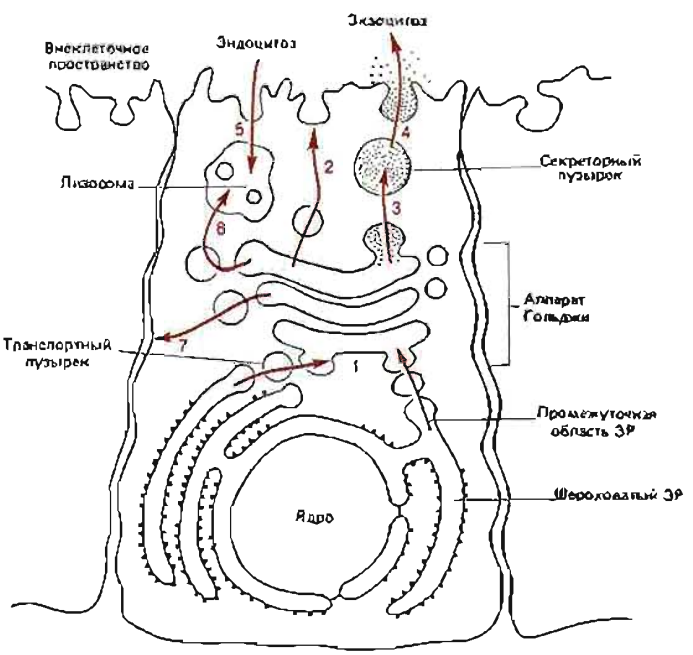


Рис. 7-39. Схематическое изображение транспорта мембраносвязанных и растворимых веществ из ЭР в другие места внутри клетки, осуществляемого с помощью пузырьков. Транспортные пузырьки отщепляются от промежуточной части ЭР и сливаются с цистернами аппарата Гольджи (1). Из аппарата Гольджи макромолекулы разносятся по всей клетке за счет следующих циклов отщепления и слияния пузырьков. Здесь показано семь различных путей перемещения пузырьков. По путям 2 и 7 доставляются различные наборы мембранных белков соответственно к апикальной и базолатеральной плазматическим мембранам. Кроме того, макромолекулы, синтезированные в ЭР и необходимые для его функционирования, избирательно остаются в ЭР.

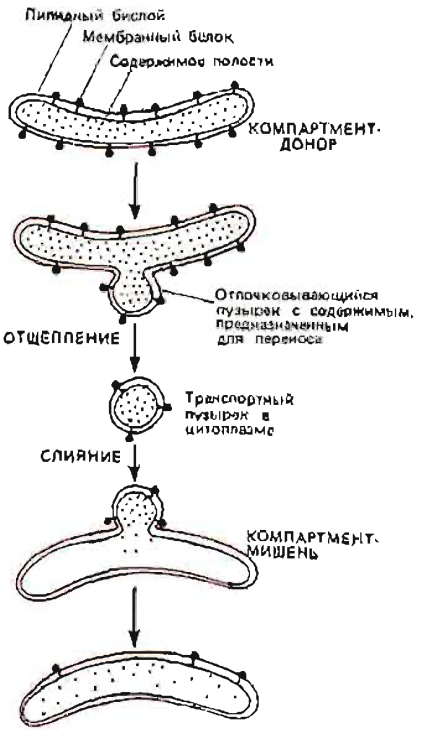


Рис. 7-40. Схема, демонстрирующая, каким образом в процессе транспорта, осуществляемого с помощью пузырьков, поддерживается асимметричность мембран. Обратите внимание на то, что первоначальная ориентация как белков, так и липидов в мембране компартмента-донора сохраняется в мембране компартмента-мишени и что растворимые вещества переносятся из одной полости в другую.

липидов и белков мембраны ЭР, и содержат растворимые белки, захваченные из полости ЭР. Когда такие пузырьки сливаются с той или иной мембраной-мишенью (это может быть либо мембрана какой-то внутренней органеллы, либо плазматическая мембрана), компоненты их мембран становятся частью этой мембраны-мишени (рис. 7-40). Одновременно растворимые белки, находящиеся внутри пузырьков, переходят в полость органеллы-мишени (или секретируются во внеклеточное пространство, если мишенью служит плазматическая мембрана). Хотя биохимические аспекты этого процесса изучены плохо, повторяющиеся циклы отпочковывания и слияния пузырьков играют, по-видимому, важную роль в транспорте макромолекул от одной клеточной органеллы к другой. Вероятно, транспортные пузырьки, участвующие в таком внутриклеточном переносе, относятся к числу окаймленных пузырьков, описанных ранее (разд. 6.5.6).

Как показано на рис. 7-40, в процессе отпочковывания и слияния пузырьков всегда сохраняется асимметричная ориентация мембранных поверхностей. Это означает, что во время внутриклеточного транспорта существующая в ЭР трансмембранная асимметрия любого типа сохраняется и передается мембранам-мишеням. Это в свою очередь значительно упрощает взгляд биолога, изучающего клетки, на взаимоотношения между различными органеллами. Поскольку при повторных циклах отпочковывания и слияния пузырьков та или иная частица, находящаяся на обращенной к полости стороне одной органеллы, может переместиться либо на обращенную к полости сторону другой органеллы, либо во внеклеточное пространство, можно заключить, что полости всех цитоплазматических органелл топологически эквивалентны внеклеточному пространству (рис. 7-41). Этот важный факт полезен также для понимания разнообразных процессов эндо- и экзоцитоза, протекающих в клетках (разд. 6.5).

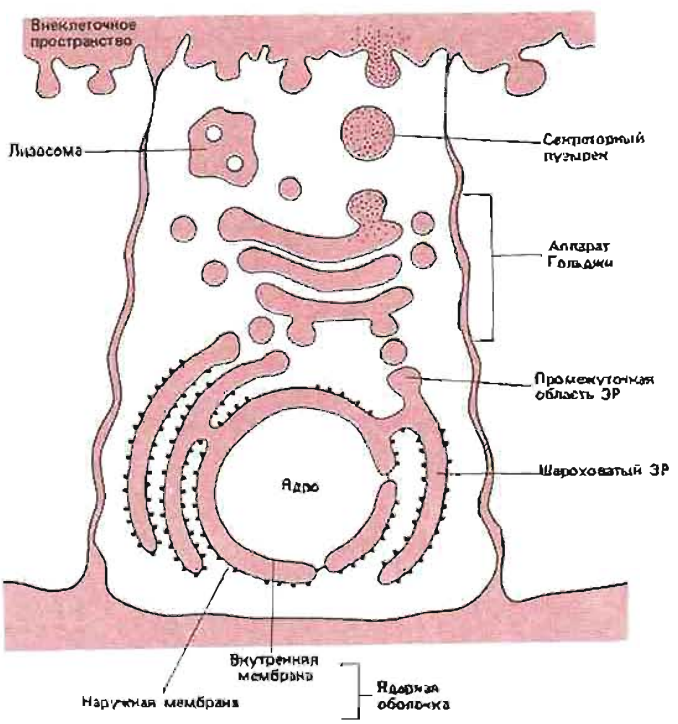


Рис. 7-41. Схематическое изображение клетки с топологически эквивалентными областями, показанными в цвете. В принципе циклы отщепления и слияния пузырьков позволяют каждой полости сообщаться с любой другой полостью и с внеклеточным пространством.

7.3.17. Рост мембран за счет непрерывного увеличения ЭР обеспечивает распространение трансмембранной асимметрии

ЭР поистине является фабрикой, производящей мембранные белки и липиды для экспорта в другие части клетки. Топография биосинтеза гликопротеинов на этой фабрике дает прямое объяснение происхождению их асимметричной ориентации в мембранах. К примеру, углеводы включаются в белки только на обращенной к полости стороне ЭР. Как указывалось выше, эта сторона ЭР топологически эквивалентна наружной поверхности клетки, и, поскольку все гликопротеины плазматической мембраны гликозилируются в ЭР, углеводы плазматической мембраны должны обнаруживаться только на той ее стороне, которая обращена к внеклеточному пространству, как оно и есть на самом деле (разд. 6.3.1). Никакие углеводы не должны обнаруживаться на цитоплазматической поверхности мембран.

Легко также понять, почему полипептидные цепи мембранных белков расположены асимметрично. Белки всегда встраиваются в мембрану ЭР со стороны, обращенной к цитозолю, где находятся рибосомы, на которых они синтезируются. Поскольку включенные в бислой мембранные белки не могут изменить в нем свою первоначальную асимметричную ориентацию, каждая копия полипептида данного вида обязательно будет иметь ту же самую ориентацию, что и любая другая копия полипептида того же вида.

Используя принцип топологической эквивалентности и зная, как ориентирован какой-либо белок в одной мембране, мы можем определить его ориентацию в любой другой мембране. Например, N-конец любого трансмембранного белка, встроенного в мембрану ЭР с помощью описанного ранее (см. рис. 7-28) механизма направленного выведения, будет находиться на обращенной к полости стороне ЭР, а С-конец – на поверхности, обращенной к цитозолю. В силу топологических соображений, проиллюстрированных на рис. 7-42, после внутриклеточного переноса такого белка в плазматическую мембрану его N-конец естественно попадет на наружную поверхность, а С-конец останется внутри клетки. Действительно, именно так в большинстве своем и ориентированы трансмембранные белки.

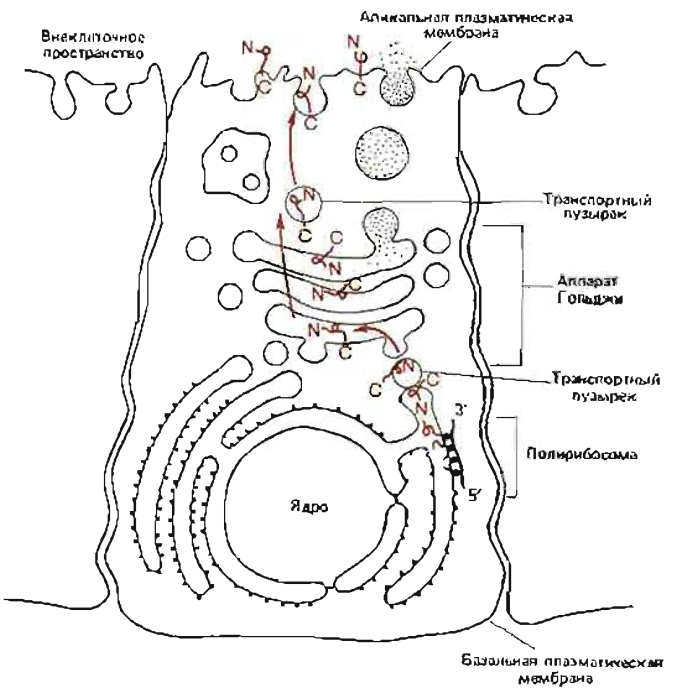


Рис. 7-42. Схема, иллюстрирующая, каким образом ориентация трансмембранного белка, встроенного в мембрану ЭР, сохраняется при переносе этого белка в другие мембраны.

По мере того как новые мембранные макромолекулы одна за другой включаются в предсуществующую асимметричную мембрану ЭР, они очень скоро становятся неотличимы от «старых» компонентов ввиду их быстрой латеральной диффузии. Таким образом, мембрана ЭР растет за счет непрерывного увеличения какого-либо замкнутого пузырька, имеющего только одну доступную для макромолекул сторону (обращенную к цитозолю); в результате возникает мембранная асимметрия, которая распространяется по всей клетке.

Заключение

ЭР служит фабрикой для производства белковых и липидных компонентов большинства клеточных органелл. Его обширные мембраны содержат много различных биосинтетических ферментов, включая ферменты, ответственные за протекание почти всех реакций синтеза клеточных липидов и за присоединение к большинству белков ЭР уникального, связывающегося с аспарагином олигосахарида. Новосинтезированные белки, как предназначенные для секреции, так и доставляемые в различные внутриклеточные органеллы, прежде всего должны быть перенесены в ЭР. Процесс отбора обычно осуществляется с помощью «сигнальной последовательности», расположенной вблизи N-конца растущей полипептидной цепи. Рибосомы цитозоля, на которых синтезируется полипептид, имеющий такую сигнальную последовательность, обычно связываются с соответствующими белками-рецепторами, находящимися в мембране ЭР. Затем весь полипептид или его часть активно переносится через мембрану ЭР в его полость. Белки, предназначенные для функционирования в полости ЭР, для секреции или для переноса в полости других клеточных органелл, целиком переходят в полость ЭР. Многие белки не высвобождаются в полость ЭР – часть их полипептидной цепи удерживается на обращенной к цитозолю стороне мембраны ЭР. Некоторые из таких трансмембранных белков остаются в мембране ЭР, другие же, как полагают, избирательно экспортируются и используются для построения мембран аппарата Гольджи, лизосом, пероксисом, плазматической и внутренней ядерной мембран. Асимметрия процессов встраивания белков в мембраны ЭР и их гликозилирования в этих мембранах обеспечивает также полярность расположения мембранных белков во всех других органеллах.

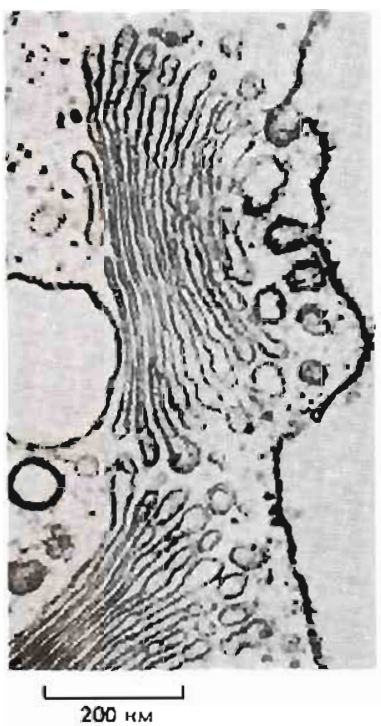


Рис. 7-43. Электронная микрофотография аппарата Гольджи растительной клетки (зеленая водоросль *Chlamydomonas*) в поперечном разрезе. В клетках растений аппарат Гольджи обычно более выражен и четко отделен от других внутриклеточных мембран по сравнению с клетками животных. (С любезного разрешения George Palade.)

7.4. Аппарат Гольджи [26]

7.4.1. Аппарат Гольджи состоит из стопок дисковидных цистерн, с которыми ассоциированы мелкие пузырьки

Аппарат Гольджи обычно локализуется вблизи клеточного ядра, а в животных клетках часто располагается вокруг пары центриолей, определяющей место клеточного центра. В нормальных условиях аппарат Гольджи состоит из многочисленных групп цистерн, которые ограничены мембранами, имеющими гладкую поверхность. Каждая группа уплощенных дисковидных цистерн образует структуру, напоминающую стопку тарелок, называемую **стопкой Гольджи** или **диктиосомой**, диаметр которой составляет приблизительно 1 мкм (рис. 7-43 и 7-44). Одна стопка в типичном случае содержит 6 цистерн, хотя у низших эукариот число их может быть больше 30.

Число стопок Гольджи на одну клетку сильно варьирует в зависимости от типа клетки – от одной до нескольких сотен. В некоторых специализированных клетках аппарат Гольджи может даже занимать значительную часть клеточного объема. Одним из таких примеров могут служить бокаловидные клетки кишечного эпителия, секретирующие в кишечник слизь; гликопротеины слизи в основном гликозилируются в аппарате Гольджи.

Со стопками Гольджи всегда ассоциирована масса мелких (диаметром

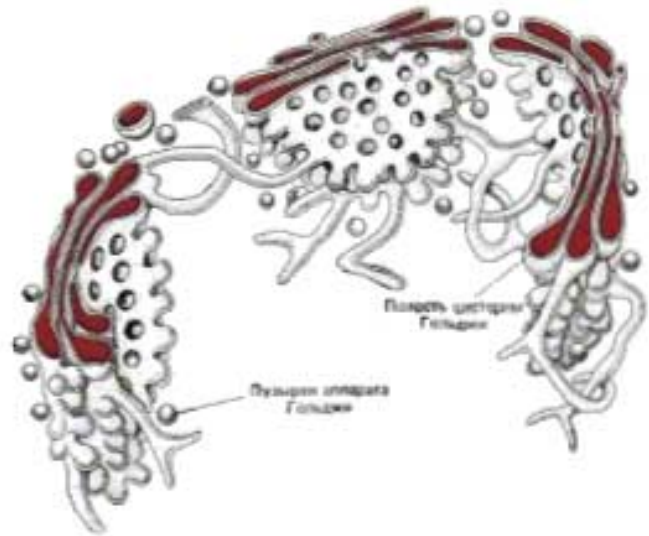


Рис. 7-44. Трехмерное изображение аппарата Гольджи, сделанное на основе электронных микрофотографий животной клетки. Обратите внимание, что стопки уплощенных цистерн имеют расширенные края, от которых, по-видимому, отпочковываются пузырьки. (Krstić R. V. Ultrastructure of the Mammalian Cell. New York, Springer-Verlag, 1979.)

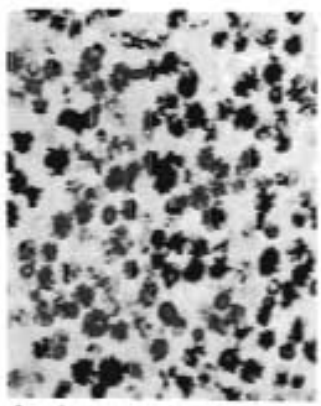


Рис. 7-45. Электронная микрофотография препарата очищенных окаймленных транспортных пузырьков, выделенных из мозга быка. Эти пузырьки, как полагают, курсируют во всех клетках в двух направлениях – к цистернам Гольджи и от них. (Из статьи Pfeffer S. R., Relly R. B., J. Cell Biol. 91, 385–395, 1981. С разрешения Rockfeller University press.)

приблизительно 50 нм), ограниченных мембраной пузырьков. Они группируются на стороне, примыкающей к ЭР, а также по периферии стопки вблизи расширенных краев каждой цистерны (рис. 7-44). Некоторые из этих «пузырьков Гольджи» покрыты многогранной решетчатой оболочкой (рис. 7-45, см. также разд. 6.5.6). Часто можно видеть, как также *окаймленные пузырьки* отпочковываются от цистерн Гольджи. Во многих специализированных клетках, вырабатывающих большие количества какого-либо секреторного продукта, помимо мелких пузырьков Гольджи присутствует множество крупных (диаметром около 1000 нм) *секреторных пузырьков*, называемых также секреторными гранулами или вакуолями (рис. 7-46). Эти значительно более крупные по размерам пузырьки локализованы на той стороне аппарата Гольджи, которая обращена к плазматической мембране, и содержат в концентрированном виде секретируемый продукт.

7.4.2. Аппарат Гольджи структурно и биохимически поляризован [27]

Аппарат Гольджи имеет две разные стороны: **формирующуюся**, или *цис*-**сторону**, и **зрелую**, или *транс*-**сторону**. *Цис*-сторона тесно связана с гладкой промежуточной частью (разд. 7.3.1) шероховатого ЭР. В секреторных клетках *транс*-сторона – это сторона, ближе всего расположенная к плазматической мембране; здесь крупные секреторные пузырьки обнаруживаются исключительно в ассоциации с *транс*-стороной какой-либо стопки Гольджи, и мембрана образующегося секреторного пузырька часто составляет единое целое с мембраной транс-стороны самой близкой к плазматической мембране цистерны. Наоборот, мелкие пузырьки Гольджи располагаются вдоль стопки более равномерно. Белки, как обычно считают, проникают в стопку Гольджи из ЭР с цис-стороны, а выходят из нее, чтобы попасть в многочисленные пункты назначения, с *транс*-стороны. Однако неизвестно, каков их точный путь через аппарат Гольджи и как они перемещаются из цистерны в цистерну вдоль каждой стопки.



Рис. 7-46. Электронная микрофотография очищенного препарата крупных секреторных пузырьков. Такие пузырьки обнаруживаются только в специализированных секреторных клетках. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

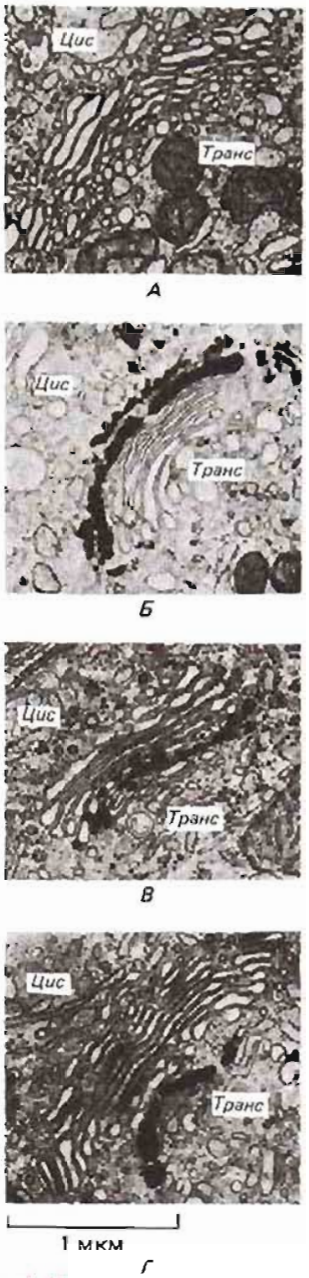


Рис. 7-47. С помощью гистохимического окрашивания удается наглядно показать, что аппарат Гольджи биохимически поляризован. *А.* Неокрашенный препарат. *Б.* Осмий предпочтительно восстанавливается цистернами на *цис*-стороне. *В.* Локализация фермента тиаминпирофосфатазы. *Г.* Локализация фермента кислой фосфатазы в самой крайней цистерне с *транс*-стороны стопки Гольджи. Более детально метод гистохимического окрашивания схематически представлен на рис. 7-57. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

Две стороны аппарата Гольджи отличаются друг от друга и по биохимическим свойствам. Например, в некоторых случаях удается обнаружить вариабельность толщины мембран Гольджи в пределах одной стопки – на *цис*-стороне мембраны тоньше, чем на *транс*-стороне (т.е. они сходны соответственно с мембранами ЭР и плазматической мембраной). Более поразительные результаты были получены при использовании определенных гистохимических тестов совместно с электронно-микроскопическими исследованиями в целях изучения локализации индивидуальных белков в аппарате Гольджи. С помощью ряда таких тестов показано, что в распределении активностей различных мембраносвязанных ферментов в стопке Гольджи обнаруживается четкая полярность (рис. 7-47). К наиболее интригующим биохимическим наблюдениям относится то, что ферменты лизосом, такие, как кислая фосфатаза, концентрируются в самой крайней цистерне с *транс*-стороны стопки Гольджи и в некоторых соседних окаймленных пузырьках. Это дает возможность предположить, что специфические пузырьки, направляющиеся в лизосомы, собираются в этой области (разд. 7.5.3).

Секреторные белки обнаруживаются с помощью гистохимических методов во всех цистернах стопки, несмотря на то что крупные секреторные пузырьки, в которых концентрируются эти продукты, ассоциированы только с самой крайней (на *транс*-стороне) цистерной Гольджи.

7.4.3. Аппарат Гольджи пока еще непонятен с точки зрения его биохимических свойств

Аппарат Гольджи – это, возможно, главный «регулировщик», управляющий движением макромолекул в клетке. Через некоторые его части проходят многие типы молекул, находящихся на определенных стадиях своего созревания, – обычно вскоре после того, как они были синтезированы в ЭР. К таким молекулам относятся секретируемые белки, гликопротеины и протеогликаны (т. 3, разд. 12.3.7), а также гликолипиды, гликопротеины плазматической мембраны, белки лизосом и, наконец, компоненты клеточной стенки у растений. Известно также, что во время переноса макромолекул через аппарат Гольджи происходит их ковалентная модификация, которая в большинстве случаев заключается в изменении олигосахарида, присоединенного в ЭР к остатку аспарагина ряда белков (см. ниже), в специфическом протеолизе, избирательном гликозилировании остатков серина и треонина или в присоединении сульфата и жирных кислот. Для некоторых из этих процессов известны конкретные биохимические реакции, протекающие при модификации макромолекул, и даже выделены соответствующие ферменты. Однако истинные взаимоотношения между биохимическими реакциями, механизмами молекулярного транспорта (с помощью которых макромолекулы сортируются для отправки их в различные клеточные компартменты) и характерной полярной морфологией аппарата Гольджи остаются тайной, бросающей дерзкий вызов сегодняшним биохимикам.

7.4.4. В аппарате Гольджи происходит модификация структуры углеводов [28, 29]

Хотя различные белки могут быть гликозилированы по-разному, копии полипептидной цепи какого-то одного типа обычно содержат на каждой стадии своего созревания один и тот же олигосахарид. В самом деле, зная, какой олигосахарид присоединяется к тому или иному новосинтезированному белку, можно проследить путь этого белка через внутриклеточные компартменты. Как описано в разд. 7.3.10, первый этап гликозилирования происходит в ЭР, где с белками связывается в основном олигосахарид одного типа. Большинство различий в структуре олигосахаридов, присоединившихся к разнообразным зрелым белкам, возникает в результате последующих модифика-

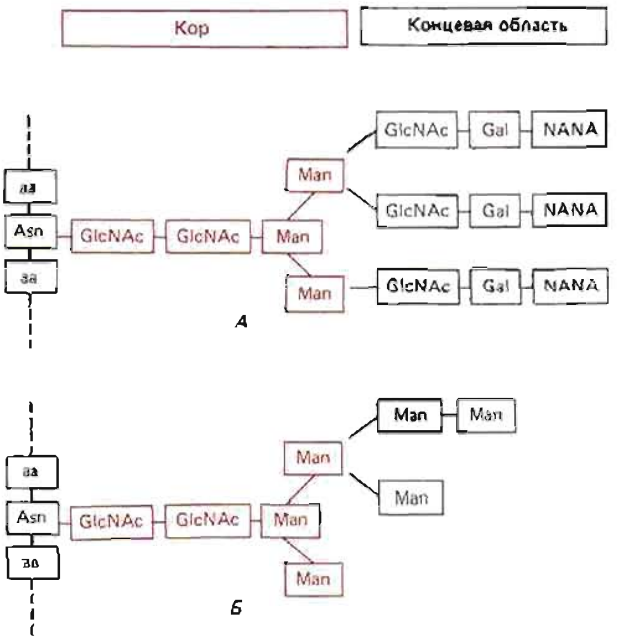


Рис. 7-48. Олигосахариды двух основных типов, связанные с остатком аспарагина: «сложный» олигосахарид (*А*) и олигосахарид «с высоким содержанием маннозы» (*Б*). Использованы следующие сокращения: Asn – аспарагин, Man – манноза, GlcNAc – N-ацетилглюкозамин, NANA – N-ацетилнейраминовая кислота (сиаловая кислота), Gal – галактоза, аа – аминокислота.

ций этих соединений, осуществляющихся во время прохождения последних через аппарат Гольджи.

В зрелых гликопротеинах с остатком аспарагина связаны олигосахариды двух типов: **сложные олигосахариды и олигосахариды с высоким содержанием маннозы** (рис. 7-48). Иногда олигосахариды обоих типов присоединяются (в различных местах) к одной и той же полипептидной цепи. Олигосахариды с высоким содержанием маннозы состоят только из остатков маннозы и N-ацетилглюкозамина. Сложные олигосахариды имеют вдобавок варьирующее число остатков галактозы и сиаловой кислоты, а также могут содержать фукозу. Сиаловая кислота представляет особый интерес как единственный углеводный остаток в гликопротеинах, несущий отрицательный электрический заряд (см. рис. 6-12).

Полезно различать так называемые сердцевинные и концевые области сложных олигосахаридов, поскольку они состоят из сахаров, присоединяющихся к белку соответственно в ЭР и аппарате Гольджи. Внутренняя *сердцевинная область (кор)*, связанная с аспарагином, содержит два остатка N-ацетилглюкозамина и три остатка маннозы. Хотя в зрелых гликопротеинах число углеводных остатков меньше по сравнению с тем, которое первоначально было присоединено к белку в ЭР, все эти сердцевинные сахара изначально присутствовали в связанном с липидом олигосахариде-предшественнике. *Концевая область* сложных олигосахаридов состоит из варьирующего числа трисахаридов (N-ацетилглюкозамин—галактоза—сиаловая кислота), присоединенных к сердцевинным остаткам маннозы. Часто концевая область как бы обрезана и содержит только дисахарид (N-ацетилглюкозамин—галактоза) или даже один лишь N-ацетилглюкозамин. Кроме того, к сложному олигосахариду может быть добавлен остаток фукозы, присоединенный обычно к сердцевинному N-ацетилглюкозамину. Ни одного из этих сахаров нет в связанном с липидом олигосахариде-предшественнике в ЭР, все они присоединяются к нему в аппарате Гольджи.

Наоборот, зрелые олигосахариды с высоким содержанием маннозы состоят только из двух остатков N-ацетилглюкозамина и многочисленных остатков маннозы. Число последних часто приближается к тому, которое первоначально присутствовало в связанном с липидом олигосахариде-предшественнике. Все эти сахарные остатки, обнаруживаемые в зрелых олигосахари-

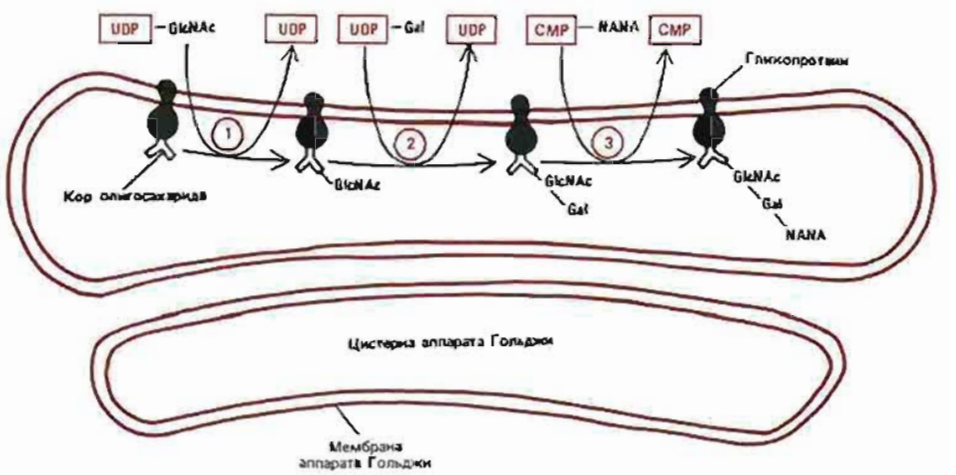


Рис. 7-49. Схема последовательного присоединения сахарных остатков. Эти реакции протекают в аппарате Гольджи и приводят к образованию сложных олигосахаридов. На каждом этапе действует одна из трех различных гликозилтрансфераз, использующих в качестве субстратов сахара, активированные за счет связывания их с нуклеотидами. Неизвестно, каким образом нуклеотидсахара транспортируются из цитозоля в полость аппарата Гольджи. Сокращения те же, что и на рис. 7-48.

дах с высоким содержанием маннозы, входят в состав связанного с липидом олигосахарида-предшественника, присоединяясь к нему в ЭР. Остатки маннозы как в олигосахаридах с высоким содержанием маннозы, так и в сложных олигосахаридах отщепляются специфическими маннозидазами в аппарате Гольджи.

Ясно, что для протекания реакций, в результате которых гликопротеин модифицируется и приобретает свою конечную структуру, требуется ряд специфических ферментов – маннозидаз и гликозилтрансфераз. С помощью дифференциального центрифугирования гомогенатов таких тканей, как печень и почки, можно выделить мембраны аппарата Гольджи в форме пузырьков, обладающих необычайно низкой плотностью. Было показано, что они действительно содержат эти ферменты. В качестве маркера, используемого обычно для идентификации пузырьков, образующихся из аппарата Гольджи, служит фермент *галактозилтрансфераза*.

С помощью гликозилтрансфераз трех типов, действующих в строго определенной последовательности, происходит присоединение к сердцевине трех концевых сахаров (сначала N-ацетилглюкозамина, затем галактозы и сиаловой кислоты), в результате чего образуются зрелые сложные олигосахариды (рис. 7-49). Все эти реакции протекают на обращенной к полости стороне аппарата Гольджи. Как туда попадают нуклеотидсахара, являющиеся субстратами гликозилтрансфераз, пока неизвестно.

Описанная система с участием нескольких гликозилтрансфераз иллюстрирует наиболее общий принцип синтеза олигосахаридов: где бы ни образовывались олигосахариды, сахара всегда присоединяются друг к другу в определенной последовательности в силу того, что на каждом этапе продукт гликозилирования узнается следующим ферментом данного ряда как специфический субстрат. Наоборот, последовательности структурных единиц, входящих в состав других важных макромолекул (ДНК, РНК и белков), образуются при обязательном участии матрицы с помощью повторяющихся реакций, катализируемых одним и тем же ферментом (или ферментами). На каждом этапе синтеза сложных углеводов необходим свой фермент, чтобы обеспечить, с одной стороны, нужную степень специфичности, а с другой – формирование множества различных ковалентных связей, обнаруживаемых в небольших олигосахаридах со сложной последовательностью. Хотя при синтезе длинных полимеров, состоящих из простых повторяющихся последовательностей сахарных остатков осуществляется та же самая общая стратегия, в этих случаях требуется гораздо меньше разных специфических ферментов (например, при синтезе гликогена или полисахаридов клеточной стенки растений).

7.4.5. Процессинг олигосахаридов осуществляется с помощью чрезвычайно сложного и точно запрограммированного механизма [29]

Зрелый гликопротеин (G-белок) вируса везикулярного стоматита (разд. 7.3.5) содержит сложный олигосахарид с тремя остатками маннозы в сердцевинной области (рис. 7-48, *А*). Следовательно, шесть из девяти первоначальных остатков маннозы были удалены в аппарате Гольджи. Однако если этот вирус заражает определенные мутантные клетки, у которых аппарат Гольджи лишен фермента, присоединяющего первый N-ацетилглюкозамин к кору (этап 3 на

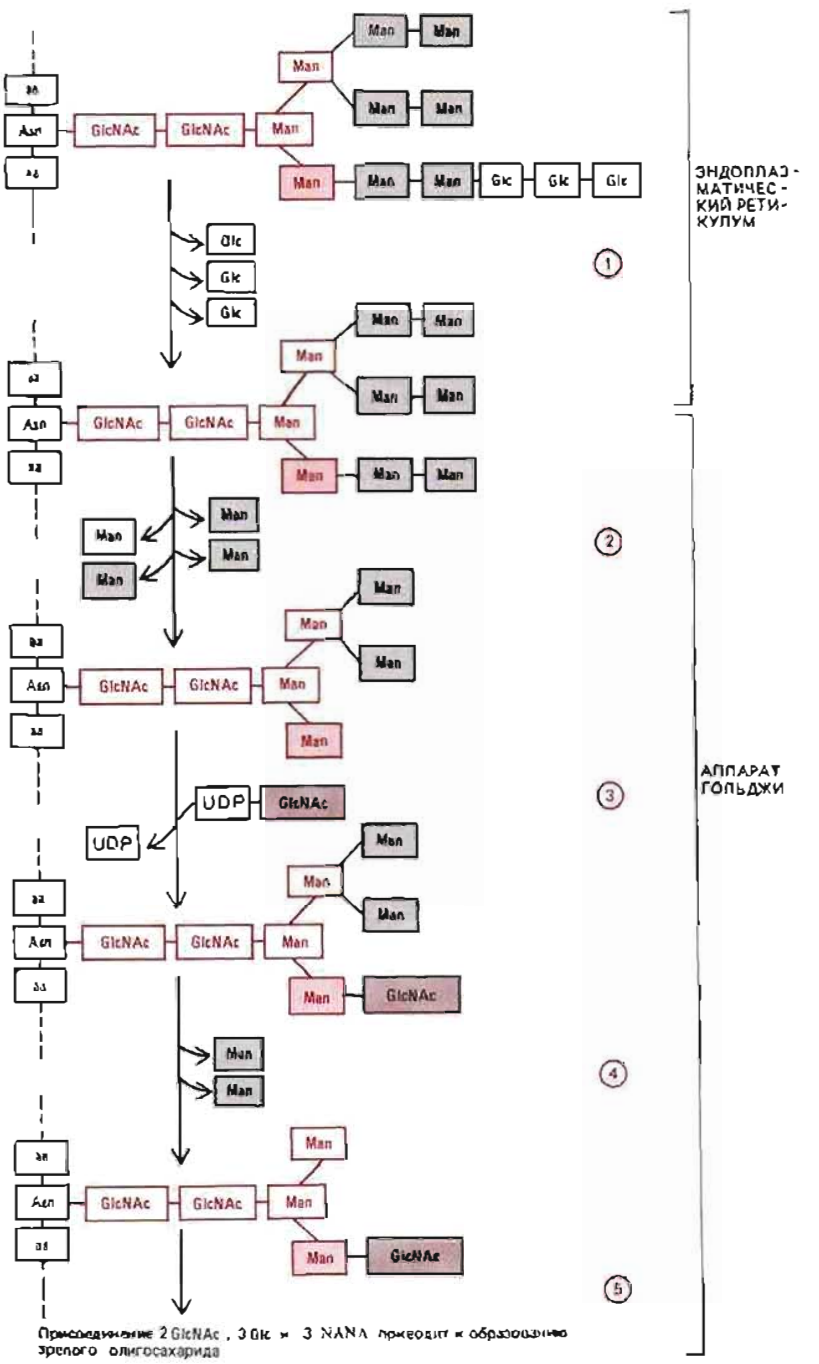


Рис. 7-50. Схема процессинга олигосахаридов, происходящего в ЭР и аппарате Гольджи. Этот процесс строго упорядочен – каждый следующий этап зависит от предыдущего. Поэтому в мутантных клетках, описанных в тексте, этапы 4 и 5 блокированы, так как отсутствует фермент, катализирующий этап 3. Этап 5 на самом деле представляет собой серию последовательных реакций, изображенных на рис. 7-49. Сокращения те же, что и на рис. 7-48.

рис. 7-50), то в таком случае кор олигосахарида в G-белке содержит пять остатков маннозы вместо трех. Это означает, что удаление последних двух остатков маннозы зависит от предварительного присоединения к сердцевинной области первого остатка N-ацетилглюкозамина. Последующие биохимические исследования показали, что процессинг олигосахаридов осуществляется в строго определенной последовательности, представленной на рис. 7-50; маннозидазы отщепляют два «лишних» остатка маннозы только в том случае, если сначала к определенному остатку маннозы (он показан на красном фоне) присоединится N-ацетилглюкозамин.

Эти важные данные показывают, насколько сложен процесс отщепления остатков сахаров от олигосахаридов; в этом процессе реализуется тот же самый общий принцип, что и при синтезе специфических последовательностей углеводных остатков. В точно запрограммированной серии реакций расщепления продукт одного этапа служит единственным субстратом следующего фермента в данной системе (рис. 7-50).

7.4.6. Точная программа отщепления углеводных остатков от олигосахаридов определяется на ранних стадиях их процессинга с помощью некоего необратимого «переключателя»

Исследование структур множества зрелых олигосахаридов показало, что, хотя все они и образуются в результате изменения одного исходного связанного с липидом олигосахарида-предшественника, отщепление сахарных остатков в процессе созревания олигосахаридов часто идет по взаимоисключающим путям, причем ни один из этих путей не может привести к образованию всех известных структур. Что же служит тем «переключателем», который определяет, какой из программ процессинга будет следовать определенный гликопротеин? В конечном счете информация об этом должна содержаться в полипептиде, поскольку вначале различные белки связаны с одним и тем же олигосахаридом, а зрелые гликопротеины – с разными. Детали процесса программирования вскоре, по-видимому, станут известны, так как сейчас выделяют и интенсивно изучают ферменты, участвующие в процессинге олигосахаридов.

7.4.7. Процесс модификации углеводов в аппарате Гольджи можно изучать с помощью метода радиоавтографии [30]

Электронно-микроскопические исследования клеток, подвергнутых кратковременной инкубации с [^{3}H]-маннозой, показали, что ЭР – это единственное место, где происходит включение этого сахара в гликопротеины (разд. 7.3.10). Подобные эксперименты были проведены также с другими сахарами. Например, короткая инкубация с [^{3}H]-N-ацетилглюкозамином приводит к одновременному мечению как ЭР, так и аппарата Гольджи, чего и следовало ожидать, зная о присутствии этого углевода и в сердцевинной, и в концевой областях сложных олигосахаридов (рис. 7-48). Однако в случае [^{3}H]-галактозы и [^{3}H]-сиаловой кислоты образовавшиеся гранулы серебра обнаруживаются исходно только над аппаратом Гольджи. В самом деле этот результат был первым (и до сих пор наиболее убедительным) доказательством того, что указанные углеводы присоединяются к гликопротеинам только в аппарате Гольджи.

Если за кратковременной инкубацией ("pulse") с [^{3}H]-маннозой следует некий период времени ("chase"), когда клетки находятся в нерадиоактивной среде, то наблюдается быстрое перемещение меченных [^{3}H] гликопротеинов из ЭР в аппарат Гольджи и затем во многие другие пункты назначения, в том числе во все участки плазматической мембраны, в лизосомы и внеклеточное пространство; все это свидетельствует о сложности молекулярного транспорта, управляемого аппаратом Гольджи. Скорость перемещения веществ тако-

ва, что типичному новосинтезированному белку требуется около 10 мин, чтобы перейти из ЭР в аппарат Гольджи, и от 30 до 60 мин, чтобы пройти через последний и достигнуть конечного пункта назначения.

7.4.8. Белки, предназначенные для секреции, упаковываются в ассоциированные с аппаратом Гольджи секреторные пузырьки, которые затем сливаются с плазматической мембраной [31]

Аппарат Гольджи есть во всех клетках. Эта важная органелла играет существенную роль на последних стадиях синтеза многих белков, когда исходная полипептидная цепь, синтезированная в ЭР, «созревает», претерпевая ковалентные модификации. Как мы увидим, аппарат Гольджи необходим также для процесса сегрегации, благодаря которому осуществляется последующий внутриклеточный перенос этих белков в определенные места в клетке. В дополнение к перечисленным функциям высокоспециализированные секреторные клетки используют свой аппарат Гольджи для концентрирования и хранения больших количеств одного или нескольких продуктов в ассоциированных с аппаратом Гольджи *секреторных* пузырьках. Эти пузырьки устроены таким образом, что их содержимое может быстро высвобождаться во внеклеточное пространство всякий раз, когда клетка получает специфический стимулирующий сигнал. Хотя во многих клетках нет подобных секреторных пузырьков, много сведений об этой функции аппарата Гольджи удалось получить при изучении специализированных секреторных клеток.

Для понимания процесса секреции весьма существенными оказались радиоавтографические исследования ацинарных клеток поджелудочной железы. Эти специализированные экзокринные клетки секретируют множество пищеварительных ферментов и зимогенов (неактивных ферментов, которые впоследствии активируются путем их специфического расщепления протеолитическими ферментами); к таким секретируемым белкам относятся трипсиноген, химотрипсиноген, амилаза, липаза, дезоксирибонуклеаза и рибонуклеаза. Изучение внутриклеточных путей процессинга и упаковки этих белков дает возможность понять, как осуществляются секреция и связанные с ней процессы, в широком биологическом смысле.

Поскольку основная масса белка, синтезируемого в ацинарных клетках поджелудочной железы, предназначена для секреции, можно проследить за внутриклеточным перемещением секретируемых белков от места их синтеза до высвобождения из клетки, используя метод радиоавтографии совместно с электронной микроскопией. (По существу, именно для этой цели я была разработана такая комбинация методов.) Клетки сначала кратковременно инкубируют с [^{3}H]-аминокислотами, а затем в течение различных периодов времени выдерживают в нерадиоактивной среде. Таким способом было обна-

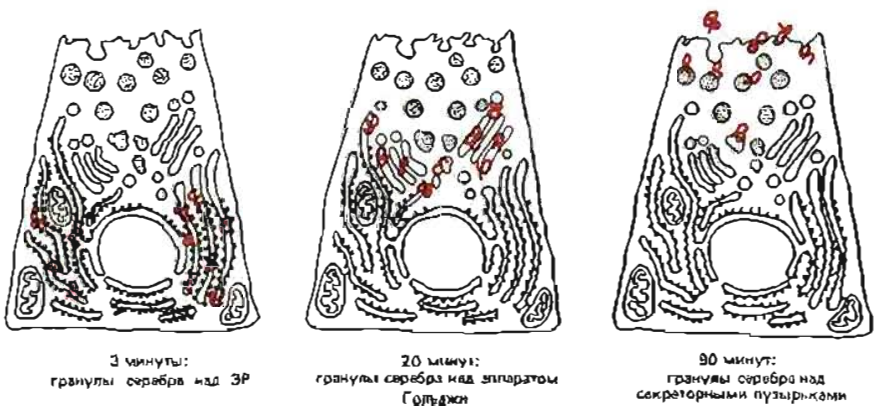


Рис. 7-51. Схематическое изображение результатов, полученных при исследовании с помощью радиоавтографии в сочетании с электронной микроскопией внутриклеточного перемещения секретируемых белков. Ацинарные клетки поджелудочной железы импульсно метили (pulse), кратковременно инкубируя их с [^{3}H]-аминокислотами, а затем выдерживали в нерадиоактивной среде в продолжении различных промежутков времени (chase). Окрашенные пятна представляют собой образовавшиеся гранулы серебра, которые с течением времени обнаруживаются все ближе и ближе к внеклеточному пространству, указывая тем самым путь следования новосинтезированных белковых молекул. Эти клетки необычны в том смысле, что большинство синтезируемых ими белков являются секреторными.

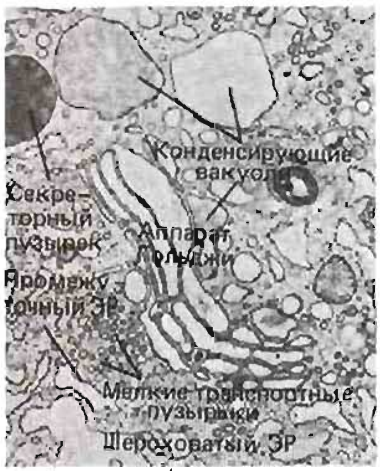


Рис. 7-52. Электронная микрофотография аппарата Гольджи ацинарной клетки поджелудочной железы, на которой видны конденсирующие вакуоли на разных стадиях созревания. (С любезного разрешения *George Palade*.)

ружено, что меченые белки движутся из шероховатого ЭР в гладкую промежуточную область шероховатого ЭР, а затем в аппарат Гольджи (рис. 7-51). Это энергозависимая часть внутриклеточного транспортного пути: секреторные белки не перемещаются из ЭР в аппарат Гольджи, если синтез АТР заблокирован какими-либо ингибиторами. Такая ситуация не удивительна, так как по крайней мере один этап любого направленного процесса должен быть энергозависимым (т. 1, разд. 3.4.11).

Позднее [^{3}H]-белки обнаруживаются в **конденсирующих вакуолях**, которые представляют собой незрелые секреторные пузырьки, ассоциированные с *транс*-стороной стопки Гольджи (рис. 7-52). В секреторных клетках некоторых типов конденсирующая вакуоль отделена от стопок Гольджи; в большинстве других секреторных клеток вакуоль составляет единое целое с расширенными краями самой крайней цистерны на *транс*-стороне стопки Гольджи, из которой, как считают, она и образуется. Секреторные белки поступают в конденсирующие вакуоли в виде разбавленного раствора. Со временем этот раствор концентрируется (отсюда и название – «конденсирующая» вакуоль), и конденсирующие вакуоли превращаются в зрелые **секреторные пузырьки** (называемые зимогеновыми гранулами в случае поджелудочной железы), которые можно легко различить на электронных микрофотографиях вследствие высокой плотности их содержимого (рис. 7-46 и 7-52). Процесс концентрирования секреторных белков в конденсирующих вакуолях не требует затрат энергии. В ацинарных клетках поджелудочной железы концентрирование белков, по-видимому, происходит в результате взаимодействия положительно заряженных панкреатических секреторных белков с отрицательно заряженным протеогликаном – связанным с белком крупным полисахаридом, содержащим сульфатные группы, присоединенные к нему в аппарате Гольджи. Это спонтанное электростатическое взаимодействие приводит к формированию осмотически неактивных преципитатов и, следовательно, к пассивному выходу воды из конденсирующей вакуоли. В других клетках аналогичное концентрирование белков достигается с помощью других средств. Например, в случае инсулина его осмотическая активность уменьшается за счет образования комплексов с ионами металла, что вызывает кристаллизацию этого белка.

Концентрированные секреторные белки хранятся в секреторных пузырьках, расположенных в апикальной области клетки между аппаратом Гольджи и полостью секреторного протока. Секреторные белки высвобождаются из клетки посредством экзоцитоза – процесса, в ходе которого секреторные пузырьки сливаются с плазматической мембраной и их содержимое выбрасывается наружу (разд. 6.5.1). Экзоцитоз – строго специфический и точно регулируемый процесс. Секреторные пузырьки сливаются только с апикальной частью плазматической мембраны, избегая таким образом бесполезного и опасного высвобождения своего содержимого в пространство между клетками и в другие внутриклеточные органеллы. Кроме того, экзоцитоз происходит только в ответ на соответствующий сигнал. Стимулами, вызывающими этот процесс в ацинарных клетках поджелудочной железы, служат либо ацетилхолин (нейромедиатор), либо холецистокинин (гормон). Эти сигнальные молекулы выделяются соответственно нервными клетками и клетками кишечника, когда для пищеварения нужны панкреатические ферменты.

7.4.9. Компоненты мембран непрерывно совершают круговорот

Когда секреторный пузырек сливается с плазматической мембраной, происходит не только освобождение из клетки ее содержимого, но и включение мембраны секреторного пузырька в состав плазматической мембраны. Это неизбежно влечет за собой увеличение площади поверхности плазматической мембраны. Однако площадь поверхности секреторной клетки лишь кратковременно увеличивается во время секреции. Очевидно, что компоненты мембраны должны удаляться с ее поверхности или совершать *круговорот*, причем

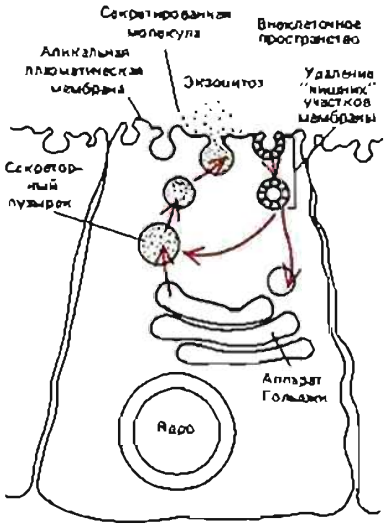


Рис. 7-53. Схематическое изображение секреторной клетки эпителия, иллюстрирующее постулированный процесс круговорота мембранных компонентов, который сопряжен с секрецией веществ на апикальной поверхности. В некоторых случаях в восстановлении мембраны, по-видимому, принимают участие окаймленные пузырьки, хотя точный механизм неясен.

со скоростью, приблизительно равной скорости экзоцитоза (рис. 7-53). Помимо того что подобный круговорот поддерживает постоянство в распределении мембранных компонентов среди различных клеточных компартментов, он еще и экономичен. Мембраны всех транспортных пузырьков (включая секреторные пузырьки) высоко специализированы, т.е. содержат уникальные полипептиды, необходимые для формирования и слияния пузырьков. Имело бы смысл, чтобы эти белки возвращались в оборот и использовались в нескольких транспортных циклах, а не утилизировались только один раз и после этого выбрасывались.

Можно предполагать, что внутриклеточному транспорту вообще свойственна цикличность процессов. Транспортные пузырьки скорее всего нужно рассматривать как челночные системы, перемещающиеся в двух противоположных направлениях: в первой половине цикла они освобождаются от «груза» посредством слияния со своей мишенью, а затем опять отпочковываются (уже без груза), чтобы вновь слиться с исходной органеллой (см. рис. 7-56). Такое предположение поднимает фундаментальный и нерешенный пока вопрос о том, каким образом груз необратимо переносится в пункт своего назначения вместо того, чтобы просто равномерно распределяться между двумя органеллами, связанными челночной системой. Ответ на этот вопрос имеет решающее значение для понимания механизма, с помощью которого осуществляется транспорт специфических белков внутри клеток.

7.4.10. Слияние и круговорот мембран можно продемонстрировать с помощью электронной микроскопии [32]

Используя метод электронной микроскопии, можно наблюдать за работой весьма четко синхронизированного цикла челночной системы из транспортных пузырьков, находящейся в нервно-мышечном соединении (рис. 7-54). Синаптический участок аксона нервной клетки (другими словами, нервное окончание) в нервно-мышечном соединении заполнен сотнями однородных (диаметром около 50 нм) пузырьков, содержащих нейромедиатор ацетилхолин. Стимуляция нерва вызывает «вспышку» синхронных экзоцитозов, в ходе которых пузырьки сливаются с плазматической мембраной нервного окончания, выделяют ацетилхолин и инициируют сокращение примыкающей мышечной клетки (т. 5, разд. 18.3.1). Такое слияние происходит в результате локального повышения концентрации ионов Ca^{2+} в нервном окончании, что в свою очередь индуцируется изменением мембранного потенциала. Нервное окончание устроено таким образом, что под действием этого пускового механизма скорость экзоцитоза увеличивается более чем в 10 000 раз, причем всего лишь в течение нескольких миллисекунд.

Путем очень быстрого замораживания ткани в жидком гелии перед приготовлением образцов для электронной микроскопии удалось проследить за событиями в синапсе, одновременно вызываемыми единственным нервным импульсом. Некоторые из полученных результатов показаны на рис. 7-55. В пределах пяти миллисекунд после стимуляции в плазматической мембране нервного окончания появляются отчетливые отверстия, каждое из которых представляет собой место слияния одного пузырька, содержащего нейромедиатор, с плазматической мембраной. Места слияния ограничены определенными областями плазматической мембраны (называемыми *активными зонами*), которые примыкают к выстроенным в две линии внутримембранным частицам. В пределах двух следующих миллисекунд слияние завершается, и экзоцитозные отверстия исчезают. Можно видеть, что мембранные белковые компоненты пузырьков оказываются погруженными в плазматическую мембрану, поскольку внутримембранные частицы в синаптических пузырьках имеют явно более крупные размеры по сравнению с частицами, которые первоначально обнаруживаются в плазматической мембране. В течение последующих нескольких сотен миллисекунд эти крупные частицы продвигаются все дальше и дальше от исходного места слияния. Значение коэффициента их

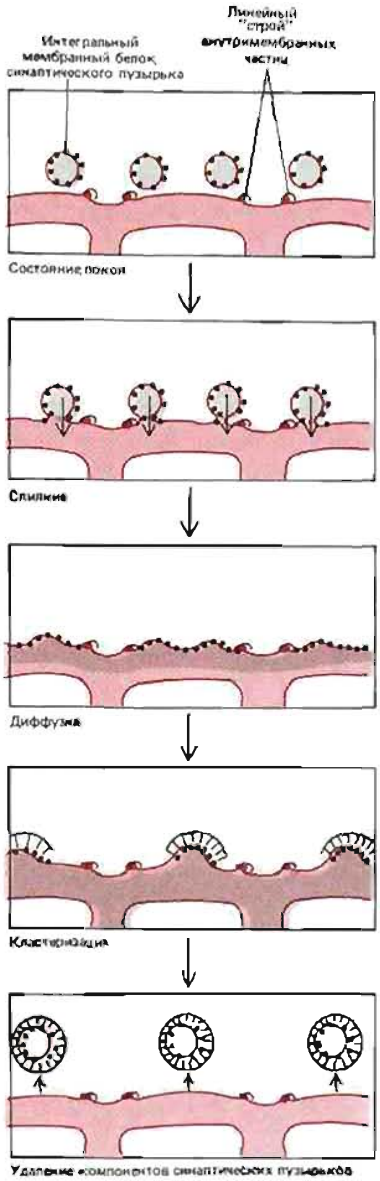
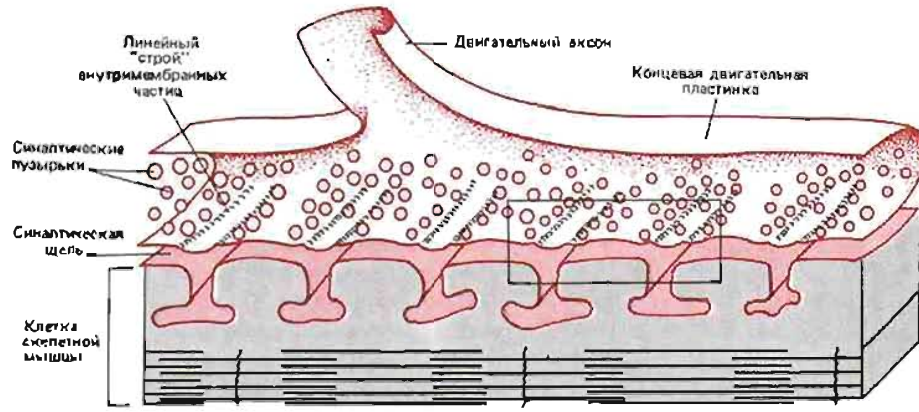


Рис. 7-54. Трехмерное изображение нервно-мышечного соединения – специализированного синапса между нервной клеткой и клеткой скелетной мышцы (*вверху справа*). Участок в рамке увеличен и показан в поперечном разрезе на пяти панелях (*слева*), где схематически представлены события, следующие за возбуждением нервного окончания (см. также рис. 7-55).



диффузии, определенное с помощью электронной микроскопии ($2 \cdot 10^{-10}$ см^2/с), позволяет предположить, что белки пузырьков беспорядочно перемещаются в бислое, свободно перемешиваясь с компонентами плазматической мембраны.

В это время начинается этап удаления из плазматической мембраны специфических белковых компонентов синаптических пузырьков (а именно крупных внутримембранных частиц). В пределах 10 с после секреции на поверхности плазматической мембраны нервного окончания появляются многочисленные окаймленные участки (или «окаймленные ямки»), в которых собираются крупные внутримембранные частицы. А в пределах 20 с после стимуляции окаймленные ямки отщепляются путем эндоцитоза с образованием окаймленных пузырьков (см. рис. 7-45). Окаймленные пузырьки содержат исходные белковые компоненты синаптических пузырьков, хотя всего несколько секунд назад эти белки были основательно перемешаны с другими компонентами плазматической мембраны. Цикл заканчивается, когда с окаймленных пузырьков «снимается» оболочка, а сами они вновь наполняются ацетилхолином и превращаются в регенерированные синаптические пузырьки с гладкой поверхностью. Эта схема, вероятно, объясняет удивительную однородность синаптических пузырьков в отношении размеров, которые определяются величиной решетчатой оболочки из клатрина (разд. 6.5.6).

Дополнительное подтверждение правильности описанной схемы можно получить путем стимуляции нерва в присутствии каких-либо электронноплотных внеклеточных маркеров, например ферритина. Такие маркеры быстро появляются внутри окаймленных пузырьков и в конце концов оказываются в синаптических пузырьках.

7.4.11. Полагают, что окаймленные пузырьки играют главную роль в процессах внутриклеточной сортировки белков [33]

Помимо участия в целом ряде процессов эндоцитоза (разд. 6.5.7) окаймленные пузырьки, по-видимому, отвечают за перемещение мембранных белков между ЭР и аппаратом Гольджи, а также между аппаратом Гольджи и плазматической мембраной. Очевидно, для осуществления столь разнообразных функций необходимы различные виды окаймленных пузырьков.

Как было подробно описано ранее (разд. 6.5.6), окаймленные пузырьки примечательны тем, что обладают почти правильной многогранной оболочкой, напоминающей по своему внешнему виду корзину. Оболочка построена главным образом из структурного белка *клатрина* и полипептида меньшего размера; оба эти компонента связаны со множеством вспомогательных белков, находящихся в мембране транспортных пузырьков. Вспомогательные белки должны выполнять по крайней мере две важные функции во внутриклеточном транспорте. Во-первых, они должны формировать участки связывания

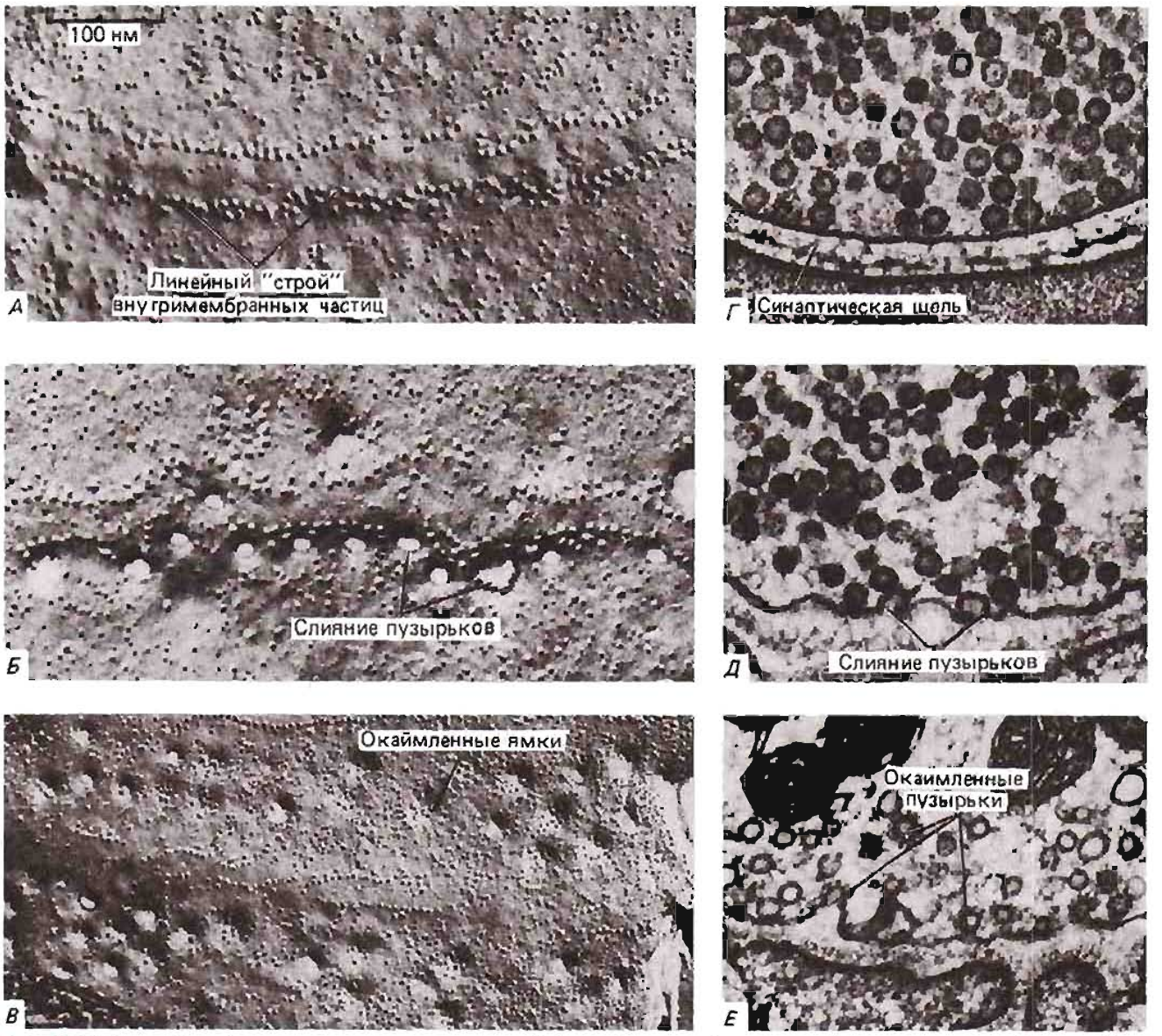


Рис. 7-55. Цикл событий, происходящих в мембране возбужденной нервной клетки в области нервно-мышечного соединения. Слева показаны электронные микрофотографии цитоплазматической половины (P-поверхности) пресинаптической мембраны, полученной методом замораживания–скалывания, а справа – электронные микрофотографии тонких срезов. *А, Г.* Состояние покоя. *Б, Д.* Слияние синаптических пузырьков вблизи линейного «строя» внутримембранных частиц. *В, Е.* Кластеризация и поглощение компонентов синаптических пузырьков путем образования окаймленных ямок и окаймленных пузырьков. Сравните с рис. 7-54. (С любезного разрешения John Heuser.)

на нецитозольной (т. е. обращенной к полости) поверхности окаймленной ямки, где происходит вылавливание специфических молекул «груза», и обеспечивать таким образом упаковывание этих молекул в окаймленные пузырьки. Во-вторых, поскольку известно, что содержимое каждого транспортного пузырька доставляется точно по правильному «адресу» к определенной внутриклеточной мембране, можно заключить, что должны существовать различные субпопуляции транспортных пузырьков, имеющих на своей поверхности уникальные вспомогательные белки, например так называемые маркеры стыковки ("docking markers"), которые опознаются комплементарными акцепторами на мембранах мишеней. Одна из возможных моделей, описывающая этот процесс, представлена на рис. 7-56.

Окаймленные пузырьки можно рассматривать как миниатюрные сортирующие машины. Их решетчатая оболочка, видимо, устроена так, что позволяет им отпочковываться от мембраны, несущей соответствующий груз. Избирательность окаймленных пузырьков должна быть обусловлена другими локализованными в мембране вспомогательными белками, которые захватывают специфические молекулы груза и в то же время исключают остальные

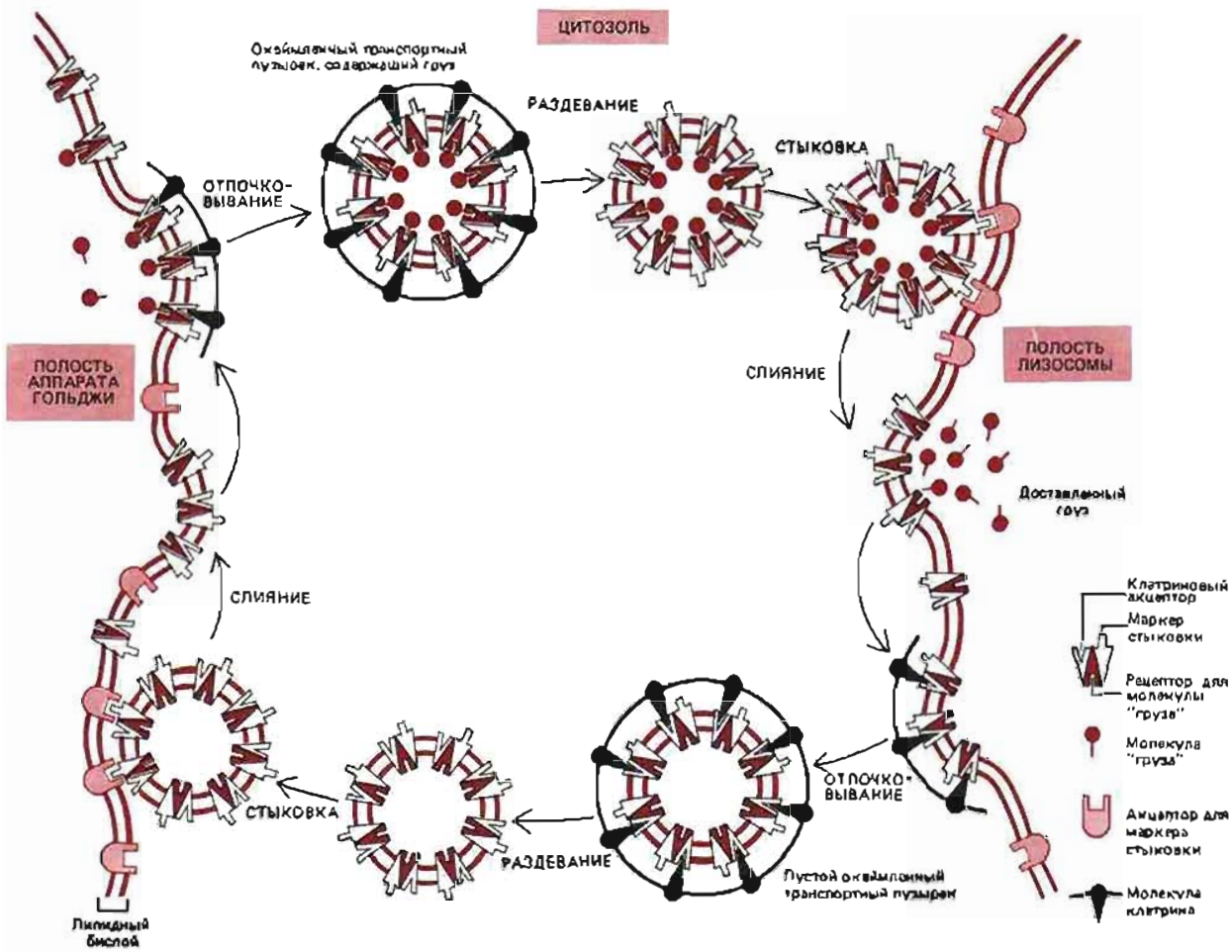


Рис. 7-56. Схематическое изображение одного из возможных механизмов, позволяющих направлять окаймленные транспортные пузырьки к определенной внутриклеточной мембране (см. текст). В данном случае показан перенос «груза» из полости аппарата Гольджи в полость лизосомы.

мембранные компоненты. Транспорт, осуществляемый с помощью окаймленных пузырьков, возможно, служит фактически основным средством, используемым клетками для сортировки молекул.

7.4.12. Почему существует аппарат Гольджи? [34]

На первый взгляд кажется очевидным, что в аппарате Гольджи нет особой необходимости. Разве все клеточные проблемы, связанные с сортировкой и упаковкой молекул, не могут быть решены с помощью ЭР, где синтезируются белки, отправляющиеся затем в аппарат Гольджи? Такая сортировка, несомненно, может происходить на уровне ЭР, поскольку многие из его мембраносвязанных белков (например, рибофорины и ферменты, участвующие в синтезе липидов и олигосахаридов) избирательно удерживаются на своих местах, а не экспортируются в другие компартменты.

Принимая во внимание важность проблемы сортировки новых макромолекул, можно предложить общий ответ на поставленный вопрос. Для сохранения функциональных (например, ферментативных) различий между разными клеточными компартментами необходимо, чтобы уровень ошибок при сортировке белков был очень низким. Этого, возможно, нельзя достигнуть за счет только одного этапа сортировки в ЭР. Поэтому предполагают, что аппарат Гольджи, находящийся между ЭР и конечными пунктами назначения белков, по всей вероятности, выполняет роль редактора, обеспечивая осуществле-

ние нескольких последовательных этапов сортировки и снижая таким образом общий уровень ошибок.

Стоит также обратить внимание на антагонистическую природу известных ферментативных реакций, протекающих в ЭР и аппарате Гольджи. Олигосахариды синтезируются в ЭР, тогда как значительная часть тех же самых соединений деградирует в аппарате Гольджи. Как мы увидим дальше, эти конкурирующие реакции имеют решающее значение для определения, в какой внутриклеточный компартмент должна быть послана та или иная новосинтезированная молекула.

Заключение

Аппарат Гольджи – это структурно поляризованная органелла, состоящая из ориентированных определенным образом стопок дисковидных цистерн, окруженных массой мелких пузырьков. Белки из полости и мембран ЭР входят в полость и мембраны уложенных стопкой цистерн Гольджи с ее цис-стороны. Вероятно, этот процесс осуществляется с помощью окаймленных пузырьков. Белки, поступающие в полость аппарата Гольджи, подвергаются разнообразным ковалентным модификациям, в результате которых они приобретают свои конечные зрелые формы. В частности, очень сильно модифицируются связанные с остатком аспарагина олигосахариды, присоединившиеся ранее к белкам в ЭР: некоторые сахарные остатки избирательно отщепляются, а некоторые новые добавляются. Реакции различных ковалентных модификаций следуют по одному из многочисленных строго упорядоченных путей, причем выбор пути определяется каким-то неизвестным свойством каждой индивидуальной полипептидной цепи.

Белки обычно выходят из аппарата Гольджи с транс-стороны стопки и направляются в многочисленные внутриклеточные и внеклеточные пункты назначения. Правильная сортировка белков перед избирательным экспортом – это одна из главных функций аппарата Гольджи. Такая сортировка, как полагают, в значительной степени осуществляется при непосредственном участии окаймленных пузырьков, окружающих цистерны, и определяется набором рецепторов в мембране аппарата Гольджи, которые узнают специфические маркеры в транспортируемых белках.

7.5. Лизосомы и пероксисомы [35]

7.5.1. Лизосомы – это основные места, где происходит расщепление макромолекул

В 1949 г. при изучении ферментов углеводного обмена в гомогенатах клеток печени было замечено несколько необычное поведение кислой фосфатазы (фермента, используемого в качестве контроля). Например, гидролазная активность экстрактов, приготовленных на дистиллированной воде, была выше, чем в тех случаях, когда экстракты готовили на осмотически сбалансированном растворе сахарозы. В старых препаратах ферментативная активность была выше, чем в свежих, и уже не обнаруживалась в осаждаемых частицах. Вскоре появились такие же сообщения, касающиеся других гидролитических ферментов. Все эти наблюдения привели к открытию новой органеллы, названной **лизосомой**; она представляет собой мембранный мешок, наполненный гидролитическими ферментами, которые служат для контролируемого внутриклеточного расщепления макромолекул. Повреждение мембраны, вызванное осмотическим лизисом или ее старением, приводит к высвобождению этих ферментов из лизосом в неосаждаемой форме. Но барьер проницаемости, создаваемый неповрежденной мембраной лизосомы,– это достаточно надежная преграда, препятствующая выходу ферментов в клетку.

Сейчас известно около сорока ферментов, содержащихся в лизосомах. Все это гидролитические ферменты, включающие протеазы, нуклеазы, гликозидазы, липазы, фосфолипазы, фосфатазы и сульфатазы. Кроме того, все они — **кислые гидролазы**, обладающие наибольшей активностью при значении pH приблизительно 5. Именно такой pH поддерживается внутри лизосомы. Хотя в нормальных условиях мембрана этой органеллы непроницаема для перечисленных ферментов, необходимость кислой среды для их оптимальной активности защищает цитоплазму от разрушения при возможной «утечке» ферментов.

Подобно другим внутриклеточным органеллам, лизосома не только содержит уникальную коллекцию ферментов, но и окружена необычной мембраной. Как и следовало ожидать, эта мембрана дает возможность конечным продуктам расщепления макромолекул легко выходить наружу, так что они могут потом либо выделяться из клетки, либо использоваться внутри нее. Кроме того, полагают, что в мембране лизосомы находится специальный транспортный белок, который утилизирует энергию гидролиза ATP для накачивания ионов H^+ в полость этой органеллы и тем самым поддерживает в полости значение pH около 5. Мембрана должна также содержать белки-акцепторы для маркеров «стыковки». Благодаря таким акцепторам лизосома становится мишенью, к которой направляются сливающиеся с ней специфические транспортные пузырьки (рис. 7-56).

Некоторые молекулы малых размеров проходят сквозь мембрану лизосомы в незаряженной форме, а затем, присоединив протон в кислой среде полости, заряжаются. В результате такие молекулы становятся более гидрофильными и, стало быть, в меньшей степени способными проникать через липидный бислой. Следовательно, они входят в лизосому быстрее, чем выходят, и таким образом накапливаются внутри нее. Примером вещества подобного рода служит антималярийный препарат *хлорохин*, добавление которого к интактным клеткам приводит в конечном итоге к повышению pH в лизосомах, что дает возможность использовать это соединение в лаборатории в качестве ингибитора лизосомных функций.

7.5.2. Гистохимическое окрашивание наглядно показывает, что лизосомы — гетерогенные органеллы [36]

Лизосомы удалось визуализировать методами цитохимии и электронной микроскопии примерно через 10 лет после того, как впервые были описаны их биохимические свойства. Ввиду чрезвычайного разнообразия форм и размеров лизосом часто приходится использовать электроноплотные преципитаты, образованные продуктом реакции, катализируемой какой-либо гидролазой (например, фосфатазой или сульфатазой), для того чтобы идентифицировать на электронных микрофотографиях ту или иную индивидуальную органеллу как лизосому (рис. 7-57). С помощью такого подхода лизосомы удается обнаружить во всех эукариотических клетках. В настоящее время лучше всего изучены лизосомы клеток печени. Они представляют собой сферические пузырьки диаметром около 0,5 мкм с электроноплотной сердцевиной, заполненной гидролазами (гидролазы составляют более 60% сердцевины по весу).

Морфологическая гетерогенность лизосом контрастирует с относительно однородной ультраструктурой всех других клеточных органелл. Эта гетерогенность отражает: широкий спектр функций лизосом, осуществляемых с помощью кислых гидролаз и включающих расщепление и обмен внутри- и внеклеточных компонентов; запрограммированную гибель клеток во время эмбриогенеза; переваривание фагоцитированных микроорганизмов и даже питание клетки (поскольку лизосомы — это основное место ассимиляции холестерола из поступающих в клетку путем эндоцитоза сывороточных липопротеинов; см. разд. 6.5.7). На этом основании лизосомы следует рассматривать как группу индивидуальных органелл, общим свойством которых является высокое содержание гидролитических ферментов. Полезно различать два ос-

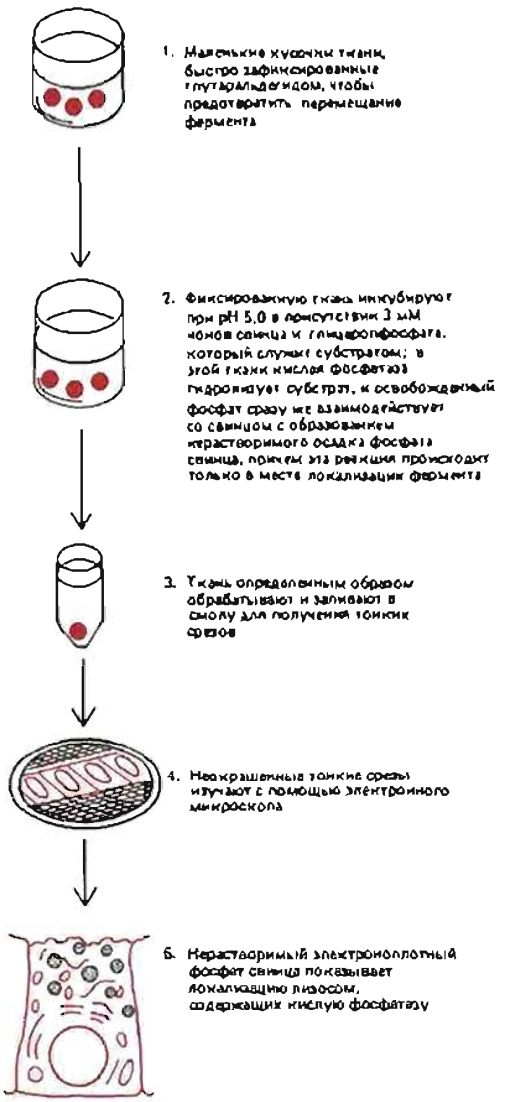


Рис. 7-57. Схема применения цитохимического метода, используемого обычно для выявления на электронных микрофотографиях фермента кислой фосфатазы – маркера лизосом.

новных класса лизосом: **первичные лизосомы** – только что образовавшиеся органеллы, еще не встретившие субстрата для расщепления, и **вторичные лизосомы** – мембранные мешки с гетерогенной морфологией, содержащие субстраты и гидролитические ферменты (рис. 7-58). Вторичные лизосомы возникают в результате повторяющихся слияний первичных лизосом с разнообразными субстратами, окруженными замкнутой мембраной (рис. 7-59). Морфология вторичных лизосом, следовательно, варьирует в той степени, в какой варьируют способы поглощения и упаковки различных субстратов: крупные субстраты заключаются в мембранную оболочку путем фагоцитоза, а мелкие – с помощью эндоцитоза и т. д.

В связи с морфологической гетерогенностью вторичных лизосом им часто дают специальные названия: 1) крупные *пищеварительные вакуоли*, которые образуются при фагоцитозе крупных частиц (подобных бактериям), 2) *мультивезикулярные тельца* – мембранные мешки, содержащие множество пузырьков диаметром около 50 нм, и 3) *аутофагирующие вакуоли (аутофагосомы)* – лизосомы, внутри которых находятся (и, по-видимому, расщепляются) внутриклеточные мембраны или органеллы, такие, как митохондрии или секре-

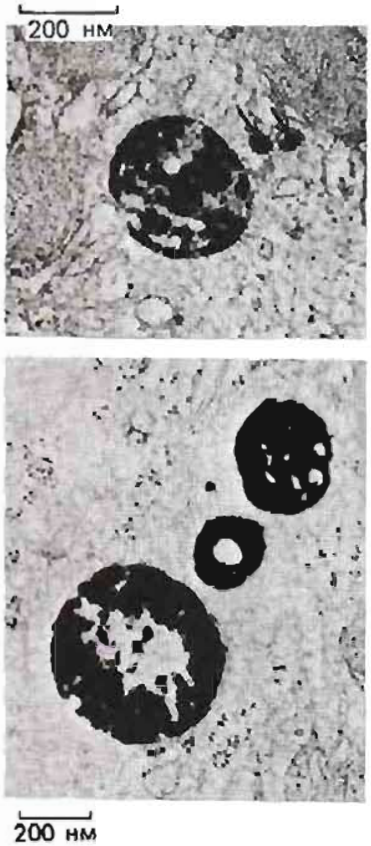


Рис. 7-58. Электронные микрофотографии двух клеточных срезов, окрашенных реактивом, выявляющим локализацию кислой фосфатазы. Крупные окруженные мембраной органеллы, содержащие электроноплотный преципитат, – это вторичные лизосомы, гетерогенность морфологии которых отражает различия в количестве и природе находящегося в них перевариваемого материала. Две первичные лизосомы показаны стрелками на верхней микрофотографии. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

торные пузырьки. Существует также много других видов вторичных лизосом (рис. 7-59).

Чтобы избежать путаницы, лучше всего сосредоточить наше внимание на первичных лизосомах. Как они формируются и за счет чего происходит их специфическое слияние с упакованными субстратами?

7.5.3. Первичные лизосомы формируются путем отпочковывания от аппарата Гольджи [37]

Существуют цитологические данные, свидетельствующие, что первичные лизосомы формируются путем отпочковывания от самой крайней цистерны, расположенной на *транс*-стороне аппарата Гольджи. В этой области локализуются многочисленные пузырьки (окаймленные и гладкие) диаметром около 50 нм, в которых обнаруживается активность кислой гидролазы. Если удается «уловить» момент, когда такие пузырьки отпочковываются от цистерн Гольджи, то можно заметить, что в это время они всегда, по-видимому, покрыты клатрином. Согласно самой простой точке зрения, первичные лизосомы происходят от окаймленных пузырьков, отщепившихся от аппарата Гольджи; считается, что клатриновая оболочка диссоциирует после отпочковывания. Если это представление правильно, то проблема биогенеза лизосом сводится к вопросу о том, каким образом кислые гидролазы специфиче-

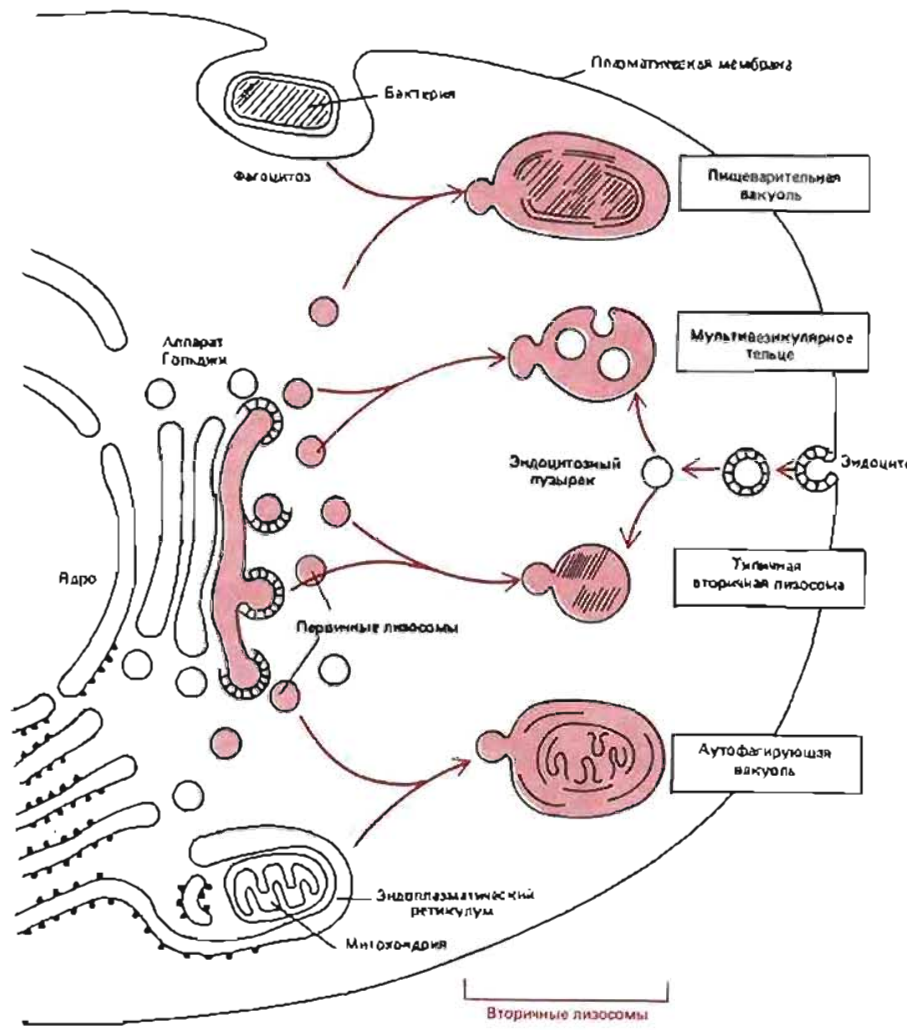


Рис. 7-59. Схематическое изображение некоторых возможных путей формирования вторичных лизосом посредством слияния пузырьков-мишеней с мелкими первичными лизосомами, содержащими новосинтезированные гидролитические ферменты. Точные пути и их отличия друг от друга неизвестны.

ски собираются и упаковываются в окаймленные пузырьки в одном участке аппарата Гольджи. Однако даже в самой крайней с *транс*-стороны области аппарата Гольджи только часть окаймленных и других мелких пузырьков обладает гидролазной активностью. Это отражает тот факт, что окаймленные пузырьки участвуют в переносе упакованных в них макромолекул по многим различным внутриклеточным маршрутам. Поэтому лизосомные ферменты должны каким-то образом отыскать нужную популяцию окаймленных пузырьков среди множества других субпопуляций, образующихся из аппарата Гольджи.

Три группы косвенных данных свидетельствуют в пользу того, что гидролазы лизосом синтезируются в ЭР и попадают в его полость прежде, чем переносятся в аппарат Гольджи:

1. С помощью гистохимического окрашивания можно обнаружить активность кислой гидролазы как в ЭР, так и в составных частях аппарата Гольджи.
2. Ферменты лизосом изначально синтезируются с теми же самыми N-концевыми лидерными пептидами (сигнальными последовательностями), какие необходимы секреторным белкам и белкам плазматической мембраны, чтобы войти в шероховатый ЭР путем направленного выведения.
3. Фактически все лизосомные гидролазы являются гликопротеинами, содержащими олигосахариды, которые должны быть приобретены в ЭР.

Дальнейшие исследования состава олигосахаридов в лизосомных ферментах дали ключ к пониманию того, каким образом эти белки упаковываются внутри клетки. Все очищенные до сих пор ферменты лизосом необычны в том отношении, что они содержат фосфорилированный остаток маннозы. На основе данных, обсуждаемых ниже, был сделан вывод, что мембранные рецепторы аппарата Гольджи узнают эти уникальные участки олигосахарида и отвечают за упаковывание специфических гидролаз в окаймленные пузырьки, которые становятся первичными лизосомами.

7.5.4. В культуре клеток, полученных от больных с недостаточностью какого-либо лизосомного фермента, нарушенную функцию лизосом можно восстановить, добавив недостающий фермент к культуральной среде [38]

У людей известны случаи разнообразных наследственных нарушений лизосомного метаболизма, причем многие из них сопровождаются тяжелыми клиническими проявлениями. Отличительным признаком таких нарушений служит отсутствие в лизосомах той или иной кислой гидролазы. В результате внутри лизосом накапливается значительное количество субстрата недостающего фермента либо в форме интактных макромолекул, либо в виде их частично расщепленных остатков. В зависимости от того, какой фермент отсутствует, может происходить накопление любого из целого ряда веществ, в том числе гликозаминогликанов (которые прежде назывались мукополисахаридами), гликопротеинов, гликогена, липидов и гликолипидов. Аномальное скопление в лизосомах подобного рода соединений представляет собой прямое доказательство того, что для нормального функционирования клетки необходим довольно высокий уровень лизосомной деградирующей активности. Такие чрезмерно наполненные тем или иным веществом лизосомы препятствуют нормальному осуществлению клеточных функций и вследствие этого вызывают определенные клинические проявления этих специфических заболеваний (рис. 7-60). Биохимические исследования таких генетических болезней послужили хорошим примером того, как изучение какой-либо медицинской проблемы на молекулярном уровне может внести важный вклад в понимание фундаментальных аспектов клеточной биологии.

Значительная часть наших современных представлений о биогенезе лизосом основана на серии изящных экспериментов, исходной целью которых было объяснить молекулярные дефекты, наблюдаемые при одной из лизо-

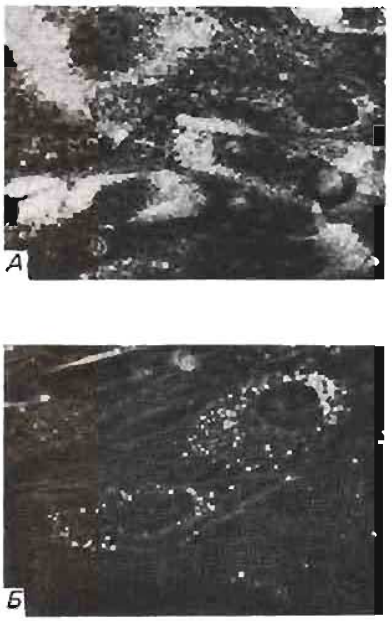


Рис. 7-60. Фотографии живых культивируемых фибробластов, полученные с помощью темнопольной микроскопии. Плотные цитоплазматические включения в лизосомах видны как белые пятнышки, окружающие темное клеточное ядро. *А*. Клетки, полученные от больного, страдающего одним из заболеваний, при которых в лизосомах накапливаются нерасщепленные макромолекулы (лизосомные болезни накопления). *Б*. Нормальные клетки. (С любезного разрешения George H. Thomas; Taylor H.A. et al., Clin. Genet., 4, 388–397, 1973.)

сомных болезней, называемой **мукополисахаридозом**. Эта болезнь характеризуется избыточным накоплением в лизосомах гликозаминогликанов (мукополисахаридов; см. т. 3, разд. 12.3.7). Примером мукополисахаридоза служит *болезнь Хёрлера*, при которой наблюдается деформация костей. Электронно-микроскопические исследования показали, что у людей, страдающих этим заболеванием, большинство клеток содержит крупные пищеварительные вакуоли, наполненные гликозаминогликанами, которые в норме входят в состав внеклеточного матрикса. Фибробласты, взятые из кожи таких больных, могут расти в тканевой культуре, причем имеют ту же самую лизосомную патологию, какая обнаруживается в клетках организма. Однако в смешанной культуре, состоящей из нормальных фибробластов и фибробластов людей с болезнью Хёрлера, аномальные клетки перестают накапливать гликозаминогликаны. «Корректирующий фактор» для дефектных клеток можно выделить из культуральной среды, в которой растут нормальные клетки; он идентифицирован как фермент α-L-идуронидаза – специфическая гидролаза, отсутствующая в лизосомах дефектных клеток.

Поскольку таким путем с помощью различных ферментов можно «исправить» целый ряд нарушений, связанных с недостаточностью лизосомных ферментов, ясно, что многие лизосомные гидролазы выделяются в небольших количествах нормальными клетками в среду и что они снова могут поглощаться теми же самыми или другими клетками. Пока еще неизвестно, как и почему происходит выделение этих гидролаз. Было только показано, что поглощение гидролаз из внешней среды зависит от специфических белков клеточной поверхности и осуществляется путем опосредованного рецепторами эндоцитоза (разд. 6.5.7). По-видимому, комплексы фермент—рецептор попадают внутрь клетки в составе окаймленных пузырьков, которые в конечном итоге сливаются с дефектными лизосомами, возмещая недостаток необходимой гидролазы. Так, фибробласты Хёрлера могут поглотить почти половину добавленной α-L-идуронидазы, тогда как одновременно с этим внутрь клеток попадают лишь следовые количества компонентов культуральной среды.

7.5.5. В клетки проникают только те лизосомные гидролазы, которые содержат олигосахарид с фосфорилированным остатком маннозы [39]

У всех лизосомных гидролаз должно быть какое-то одно общее свойство, ответственное за их высокоаффинное связывание со специфическими поверхностными рецепторами и, следовательно, за их эффективное проникновение внутрь клетки. Представление о таком специфическом «маркере узнавания» было в значительной степени развито на основе параллельных исследований другой лизосомной болезни – так называемой *I-клеточной болезни*. Лизосомы культивируемых фибробластов, взятых у больных, гомозиготных по этой единственной генной мутации, почти не содержат гидролаз, однако во внеклеточной жидкости эти ферменты обнаруживаются в очень высоких концентрациях. К числу весьма важных наблюдений относится тот факт, что ни одна из гидролаз, выделяемых I-клетками в среду, не узнается рецепторами нормальных клеток, поэтому эти гидролазы не могут проникать внутрь клеток. Например, α-L-идуронидаза, полученная из культуральной среды I-фибробластов, не «исправляет» культивируемые клетки Хёрлера: она не проникает в них, хотя вполне активна как гидролаза. Наоборот, I-фибробласты связывают, поглощают путем эндоцитоза и удерживают гидролазы, выделенные нормальными клетками. Простое объяснение заключается в том, что при I-клеточной болезни один-единственный генный дефект затрагивает какой-то фермент, присоединяющий маркер узнавания ко многим различным гидролазам. В результате гидролазы, выделяющиеся из I-клеток, не узнаются соответствующими поверхностными рецепторами на I-клетках, а также на нормальных клетках (рис. 7-61).

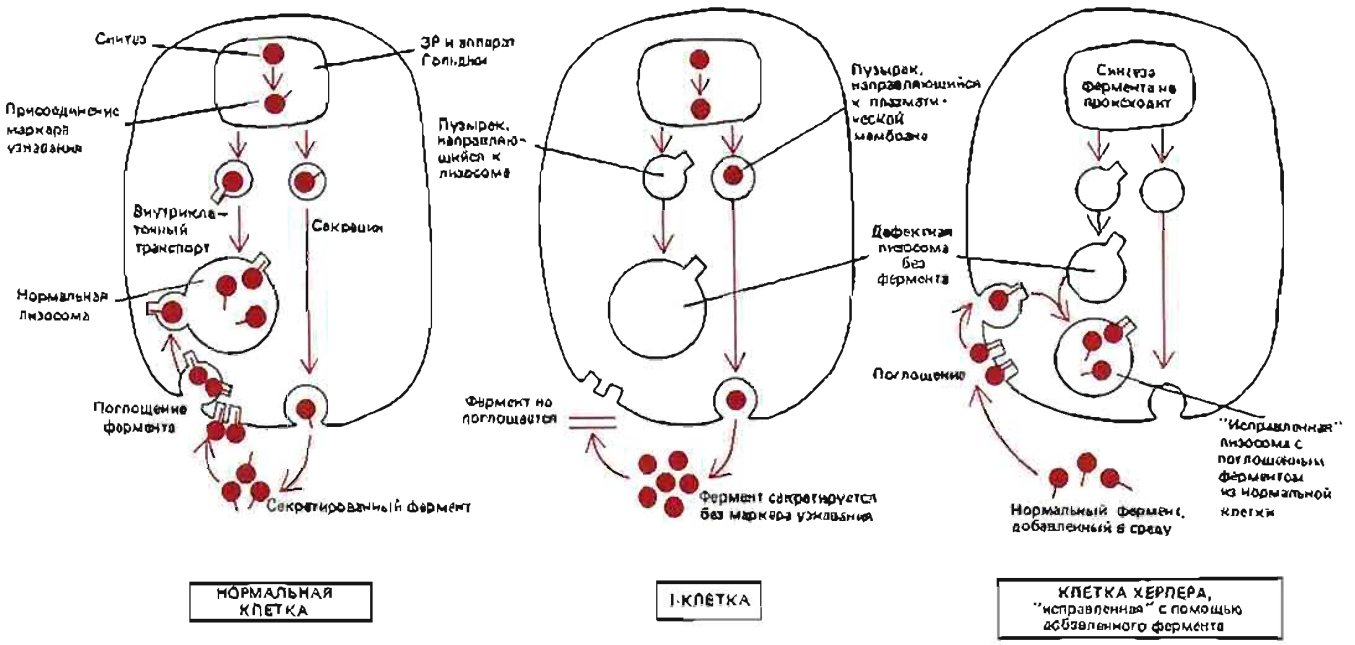


Рис. 7-61. Схема, иллюстрирующая процессы секреции и поглощения из среды лизосомных гидролитических ферментов, осуществляемые мутантными и нормальными клетками, растущими в культуре. Специфические белки-рецепторы, локализованные на плазматических мембранах всех трех изображенных здесь клеток, позволяют гидролитическим ферментам, добавленным в культуральную среду, проникать внутрь клеточных лизосом. Клетки Хёрлера не способны синтезировать α-L-идуронидазу – дефект может быть «исправлен» путем добавления в среду этого фермента (который выделяется нормальными клетками). В I-клетках образуется полный набор гидролитических ферментов, однако все они секретируются из-за отсутствия маркера узнавания, необходимого как для их поглощения из внеклеточного пространства, так и для их внутриклеточного переноса в лизосомы.

При сравнении гидролаз, выделяемых нормальными и I-клетками, было обнаружено, что маркером, узнаваемым поверхностным рецептором, служит необычный олигосахарид, содержащий *маннозо-6-фосфат*. Обработка нормальных гидролаз ферментом, отщепляющим концевые фосфаты, превращает их в так называемые «слабо проникающие» формы, неотличимые от тех, которые выделяются из I-клеток. Кроме того, если в культуральную среду добавляется маннозо-6-фосфат, он связывается с поверхностными клеточными рецепторами и вследствие этого действует как сильный конкурентный ингибитор, подавляющий проникновение внутрь клеток разнообразных нормальных лизосомных гидролаз.

7.5.6. Внутриклеточные гидролазы, вероятно, направляются в первичные лизосомы с помощью маннозофосфатного маркера [40]

Когда нормальные фибробласты на протяжении многих клеточных генераций выращивают в среде с достаточным количеством маннозо-6-фосфата, чтобы блокировать поглощение гидролаз из внеклеточного пространства, то лизосомы таких клеток функционируют нормально и содержат все обычные гидролазы. Это исключает возможность того, что новосинтезированные лизосомные ферменты в норме достигают новых лизосом с помощью внеклеточного «секреторно-возвратного» пути. Отсутствие гидролаз в лизосомах I-клеток должно, следовательно, означать, что олигосахарид, содержащий маннозо-6-фосфат, узнается как маркер каким-то специфическим рецептором внутри клетки. Действительно, как сейчас известно, в мембранах аппарата Гольджи и ЭР есть тот же самый маннозофосфатный рецептор, какой был обнаружен в плазматической мембране. Именно этот *внутриклеточный* рецептор должен управлять процессом специфического упаковывания гидролаз в первичные лизосомы. Если же, как в случае I-клеточной болезни, правильный маркер узнавания отсутствует, гидролазы вместо того, чтобы упаковываться, проходят через аппарат Гольджи и непрерывно секретируются во внеклеточное пространство.

Интересно, что, согласно экспериментальным данным, как только гидролазы достигают лизосом, они утрачивают свой маннозофосфатный маркер. Это, вероятно, помогает удерживать эти ферменты в лизосоме, предотвращая

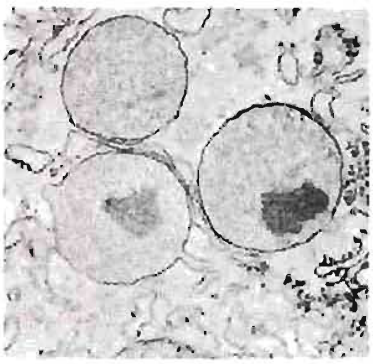


Рис. 7-62. Электронная микрофотография трех пероксисом клетки печени. В них часто видны кристаллоподобные электроноплотные включения; кроме того, нередко они обнаруживают тесную связь с мембранами ЭР. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

их удаление, которое могло бы происходить с помощью рецепторов, узнающих данный маркер в процессе круговорота мембранных компонентов (см. рис. 7-56).

7.5.7. Мембрана пероксисомы образуется путем отпочковывания от гладкого ЭР [141]

Пероксисомы – это органеллы, присутствующие почти во всех эукариотических клетках. Обычно они коседиментируют с лизосомами при центрифугировании в градиенте плотности. Вообще об их существования как отдельных внутриклеточных органеллах узнали только в начале 1960-х годов. Тогда с помощью совместных биохимических и электронно-микроскопических исследований удалось идентифицировать отличную от других органеллу диаметром около 0,5 мкм, окруженную одиночной мембраной. В клетках печени эта органелла служит концентрированным источником по крайней мере трех окислительных ферментов: *оксидазы D-аминокислот, уратоксидазы и каталазы*. Развитый позднее метод гистохимического окрашивания на каталазу – фермент, составляющий до 40% общего пероксисомного белка, позволил показать, что мелкие (0,15–0,25 мкм) пероксисомы («микропероксисомы») повсеместно встречаются в клетках млекопитающих. Распространение более крупных пероксисом ограничивается сравнительно немногими типами клеток. Эти пероксисомы выделяются на электронных микрофотографиях благодаря наличию у них «кристалловидной» сердцевины – трубчатой структуры, содержащей пероксисомные ферменты в чрезвычайно концентрированном виде (рис. 7-62); однако часто такая сердцевина отсутствует.

Подобно митохондрии, пероксисома – это один из главных центров утилизации кислорода (O_2) в клетке. Она представляет собой рудиментарный остаток древней органеллы, которая в примитивных прокариотических клетках выполняла все функции, связанные с метаболизмом кислорода, когда последний появился в атмосфере. Согласно этой точке зрения, образовавшиеся позднее митохондрии сделали пероксисому в значительной степени ненужной, так как многие из тех реакций, которые протекали в пероксисомах без производства энергии, теперь были сопряжены с синтезом ATP посредством окислительного фосфорилирования. Следовательно, все окислительные реакции, еще осуществляемые пероксисомами, должны быть полезны для клетки, несмотря на присутствие митохондрий.

В соответствии с этой гипотезой находится, по-видимому, и относительно примитивный механизм формирования новых пероксисом. Полагают, что некоторые интегральные мембранные белки, характерные только для пероксисомы, синтезируются в ЭР, а затем группируются в мембране ЭР с образованием проорганеллы, которая отпочковывается от гладкой области ЭР. Несколько главных пероксисомных ферментов, включая каталазу и уратоксидазу, синтезируются в цитозоле и транспортируются в формирующуюся пероксисому с помощью процесса, связанного со специфическим узнаванием пероксисомной мембраны. Поскольку зрелые пероксисомы часто можно видеть соединенными с гладким ЭР тонким рукавообразным отростком (рис. 7-62), предполагают, что многие из них так и остаются прикрепленными к ЭР, а не отпочковываются от него, чтобы превратиться в свободные органеллы.

7.5.8. Пероксисомы используют кислород для осуществления катаболических реакций [42]

В пероксисомах находится бо́льшая часть содержащейся в клетке каталазы. Кроме того, в их состав входит один или более ферментов, которые используют молекулярный кислород для отщепления атомов водорода от специфических субстратов, осуществляя при этом окислительную реакцию

$$RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2.$$

Каталаза утилизирует образующуюся H_2O_2 для окисления разнообразных субстратов, в том числе фенолов, муравьиной кислоты, формальдегида и спирта, с помощью «перекислительной» реакции: $H_2O_2 + R'H_2 \rightarrow R' + 2H_2O$. Кроме того, при низких концентрациях $R'H_2$ каталаза превращает H_2O_2 в H_2O:

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2.$$

Последнюю реакцию иногда рассматривают как спасательный механизм, предотвращающий опасное накопление сильного окислителя H_2O_2 при отсутствии достаточного количества доноров водорода ($R'H_2$). Для функционирования пероксисомы существенное значение имеет тот факт, что ее мембрана обладает необычно высокой проницаемостью, позволяющей неорганическим ионам и всем низкомолекулярным субстратам, которые своими размерами не превосходят молекулу сахарозы, с легкостью проходить через эту мембрану.

Крупные пероксисомы клеток печени и почек, как полагают, играют важную роль в обезвреживании различных веществ. Например, почти половина выпитого спирта (этанола) окисляется в организме таким способом до ацетальдегида. Обычно пероксисомы утилизируют по крайней мере 10% всего кислорода, поступающего в печень.

Помимо обезвреживающих реакций большинство пероксисом катализирует распад жирных кислот до ацетил-СоА – в этом процессе принимает участие специальный H_2O_2-продуцирующий фермент. Образующийся ацетил-СоА может либо транспортироваться через цитозоль в митохондрии, чтобы включиться там в цикл лимонной кислоты, либо использоваться в биосинтетических реакциях где-то в другом месте. По приблизительным подсчетам от одной четверти до половины жирных кислот расщепляется в пероксисомах, а остальная часть – в митохондриях (т. 3, разд. 9.1.3).

7.5.9. Пероксисомы в клетках разных типов различаются по своему ферментному составу [42]

Трудно сделать какие-либо общие заключения о метаболизме пероксисом, потому что состав этой органеллы очень широко варьирует. Так, пероксисомы различных клеток одного и того же организма часто содержат весьма отличающиеся друг от друга наборы ферментов. Кроме того, в некоторых клетках в зависимости от условий изменяются число и содержимое пероксисом. Например, клетки дрожжей, растущие в среде, содержащей сахар, имеют очень мало пероксисом; в присутствии же метанола в этих клетках появляется большое число специальных пероксисом, окисляющих метанол; а если в среде есть жирные кислоты, то в клетках можно обнаружить многочисленные пероксисомы, которые расщепляют жирные кислоты с образованием ацетил-СоА.

У растений детально изучены пероксисомы двух весьма разных типов. Пероксисомы одного типа обнаруживаются в листьях, где они катализируют окисление одного из побочных продуктов реакции, в которой CO_2 восстанавливается в углевод. Этот окислительный процесс называется *фотодыханием*, поскольку в ходе него поглощается O_2 и выделяется CO_2 (т. 3, разд. 9.3.5). В прорастающих семенах присутствуют пероксисомы совершенно другого типа. Они служат здесь для превращения жирных кислот, запасенных в липидах семян, в сахара, необходимые для протекающих в молодом растении биосинтетических реакций. Поскольку такое превращение осуществляется серией реакций, известных под названием **глиоксилатный цикл**, эти пероксисомы называются также **глиоксисомами**. В глиоксилатном цикле две молекулы ацетил-СоА, образовавшиеся в пероксисоме при расщеплении жирных кислот, используются для синтеза янтарной кислоты, которая выходит из перокси-

сомы и затем превращается в глюкозу. В животных клетках глиоксилатный цикл отсутствует, и, следовательно, они не могут превращать жиры в углеводы.

7.5.10. Механизм сортировки, подобный тому, который используется в лизосомах, может действовать и в других внутриклеточных компартментах [43]

Поразительные экспериментальные наблюдения, касающиеся процесса упаковки кислых гидролаз в лизосомы, позволили предположить, что внутриклеточная сортировка многих белков может осуществляться одним и тем же путем. Для описания этого пути, вероятно, применима следующая модель, в основе которой лежит представление о том, что для правильного выбора соответствующего класса окаймленных пузырьков, куда упаковываются те или иные белки, в качестве «адресующего маркера» используется либо какое-то общее свойство белковой структуры, либо какой-то олигосахарид (рис. 7-63):

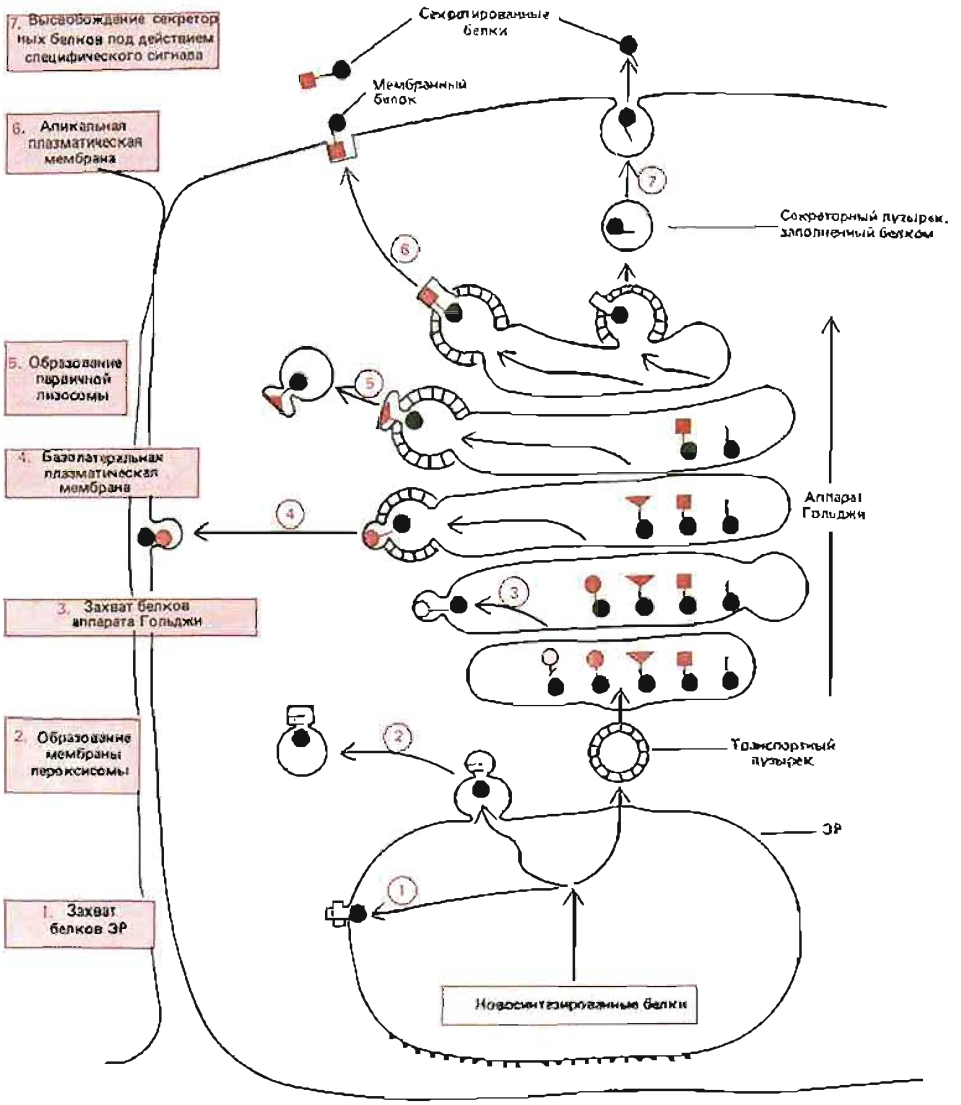


Рис. 7-63. Схема внутриклеточной сортировки белков, синтезирующихся в ЭР. Белки содержат различные «адресующие маркеры» и в зависимости от типа маркера направляются в то или иное место в клетке. За исключением маркеров, узнаваемых лизосомой, никакие другие не известны. Эксперименты с *туникамицином* — ингибитором гликозилирования белков по NH_2-группе аспарагина — показали, что во многих случаях для узнавания не нужны N-связанные олигосахариды. Обратите внимание, что мембрана пероксисомы образуется, по-видимому, путем прямого отпочковывания от ЭР (см. рис. 7-62). Эта мембрана выполняет функции транспортной системы, которая переносит в пероксисому определенные растворимые белки, синтезированные в цитозоле. Таким образом, пероксисомы получают многие из своих белков в значительной степени тем же самым путем, что и митохондрии.

1. Когда новосинтезированные белки (и другие макромолекулы) проходят через ЭР, олигосахариды, присоединенные к некоторым из них, подвергаются избирательному процессингу. Белки, содержащие олигосахариды определенных типов или другие маркеры, связываются с соответствующими рецепторами и остаются в мембране ЭР. Все другие белки автоматически экспортируются в аппарат Гольджи.
2. Многие белки, транспортированные в аппарат Гольджи, узнаются рядом олигосахарид-модифицирующих ферментов, которые в дальнейшем изменяют специфическим образом их углеводные боковые цепи. Некоторые из таких модифицированных олигосахаридных боковых цепей связываются со специфическими белками-рецепторами, локализованными в мембране аппарата Гольджи. Поскольку родственные белки имеют один и тот же олигосахаридный маркер, они захватываются рецепторами одного и того же типа. Аналогично рецепторы аппарата Гольджи других типов узнают и вследствие этого удерживают белки, маркированные иными способами.
3. Некоторые типы рецепторных молекул аппарата Гольджи оставляют захваченные ими белки в этой органелле. Другие же собираются группами в мембране аппарата Гольджи и упаковываются в специфические окаймленные пузырьки, транспортирующие эти рецепторы вместе с их грузом в определенный внутриклеточный компартмент.
4. Все макромолекулы, не сумевшие связаться с каким-либо специфическим рецептором в аппарате Гольджи, транспортируются во внеклеточное пространство.

Согласно этой модели, всякая макромолекула, случайно (или по какой-то другой причине) не захваченная специфическим рецептором в ЭР или аппарате Гольджи, пройдет через ЭР и аппарат Гольджи и в конце концов достигнет плазматической мембраны. Таким образом, для секреции любого растворимого белка требуется только решение «руки прочь», которое принимается обычным сортирующим механизмом в ЭР и аппарате Гольджи. Этим, возможно, объясняется, почему секретируются лизосомные гидролазы, у которых отсутствует олигосахаридный маркер (например, при I-клеточной болезни).

Только теперь, когда после открытия аппарата Гольджи прошло уже более 80 лет, начинают наконец выясняться молекулярные детали процесса сортировки, осуществляемого в этой важной органелле. Хотя схема, представленная на рис. 7-63, в достаточной степени спекулятивна, она отражает общие принципы работы сортирующего механизма, вытекающие из современных экспериментальных данных. Остается решить несколько основных проблем: 1) точно узнать, какие существуют адресующие маркеры; 2) понять, как они изменяются в процессе транспорта для того, чтобы удерживать определенный белок в соответствующем пункте назначения (например, закреплять какой-либо фермент в мембране ЭР или аппарата Гольджи) либо отправлять его дальше, и 3) определить, как адресный код расшифровывается окаймленными пузырьками, опосредующими транспорт.

Заключение

Пероксисомы – это органеллы, приспособленные для осуществления окислительных реакций с участием молекулярного кислорода. Они производят перекись водорода, которую либо используют, либо разрушают с помощью содержащейся в них каталазы.

Лизосомы – это органеллы, специализированные для внутриклеточного расщепления макромолекул. Они содержат много разнообразных гидролитических ферментов, называемых кислыми гидролазами, потому что эти ферменты лучше всего действуют при pH около 5, т.е. при том значении pH, которое поддерживается внутри лизосомы. Гидролазы синтезируются в ЭР и подвергаются процессингу, проходя через аппарат Гольджи, откуда транспортируются в лизосомы посредством специальных окаймленных пузырьков.

Отсутствие даже одной лизосомной гидролазы приводит к серьезным наследственным заболеваниям, что наглядно показывает важность процессов расщепления, происходящих в лизосомах, для нормального функционирования клетки. При одном из таких заболеваний – I-клеточной болезни – в лизосомах отсутствуют все гидролазы. Изучение клеток, взятых у людей, страдающих этим заболеванием, привело к открытию особого олигосахарида, содержащего маннозофосфат, присоединенный обычно к лизосомным гидролазам. Этот олигосахарид служит адресующим маркером, благодаря которому лизосомные гидролазы рассортировываются с помощью белка-рецептора, локализованного в мембранах аппарата Гольджи. По-видимому, в качестве адресующих маркеров в процессе внутриклеточной сортировки белков используются различные олигосахариды и некоторые другие особенности белковой поверхности.

7.6. Органеллы с двойными мембранами: ядро, митохондрии и хлоропласты

При обсуждении механизмов внутриклеточного транспорта мы до сих пор игнорировали особую проблему, связанную с переносом новосинтезированных белков в ядро, митохондрии и (у растений) хлоропласты. Все перечисленные органеллы окружены двумя отдельными мембранами, которые в совокупности составляют *оболочку* таких органелл. Обе мембраны содержат липидные бислои, но сильно различаются по белковому составу, что отражает их различные функции. Кроме того, наличие двух концентрических мембран создает внутри органеллы два отдельных пространства: *межмембранное пространство* между наружной и внутренней мембранами и более крупный компартмент, окруженный внутренней мембраной. В дальнейшем мы будем обозначать этот более глубоко лежащий компартмент как *полость* органеллы; полость митохондрий обычно называется *матриксом*, а полость хлоропластов – *стромой*. Внутриклеточные сортирующие механизмы должны не только обеспечивать доставку необходимых новосинтезированных белков в соответствующую органеллу с двойной мембраной, но и направлять их в один из четырех субкомпартментов каждой такой органеллы: наружную мембрану, внутреннюю мембрану, межмембранное пространство или полость.

Многие из белков, присутствующих в органеллах с двойной мембраной, синтезируются вне органеллы и затем транспортируются либо через обе (наружную и внутреннюю) мембраны, чтобы попасть в полость, либо через наружную мембрану, чтобы достигнуть своего конечного пункта назначения во внутренней мембране или в межмембранном пространстве. Специализированные *зоны слипания* между наружной и внутренней мембранами, как полагают, облегчают транспорт этих молекул.

7.6.1. Бактерии, обладающие внутренней и наружной клеточными мембранами, можно рассматривать как модели органелл с двойной мембраной [44]

В силу интенсивного развития методов генетического анализа в применении к бактериям, а также благодаря тому, что бактерии являются свободноживущими организмами, в настоящее время намного больше известно о двойной мембранной системе у *E. coli* и *Salmonella*, чем о двойных мембранах эукариотических органелл. Как показано на рис. 7-64 и 7-65, оболочка *E. coli* обладает сложной структурой. Она содержит слой, состоящий из протеогликана (который придает клетке жесткость) и расположенный между внутренней и наружной мембранами, в основе своей построенными из липидных бислоев. Внутренняя и наружная мембраны имеют разные наборы мембранных белков и выполняют весьма различные функции. Эти две мембраны сходятся вместе в некоторых участках, называемых **зонами слипания**,– их можно увидеть на

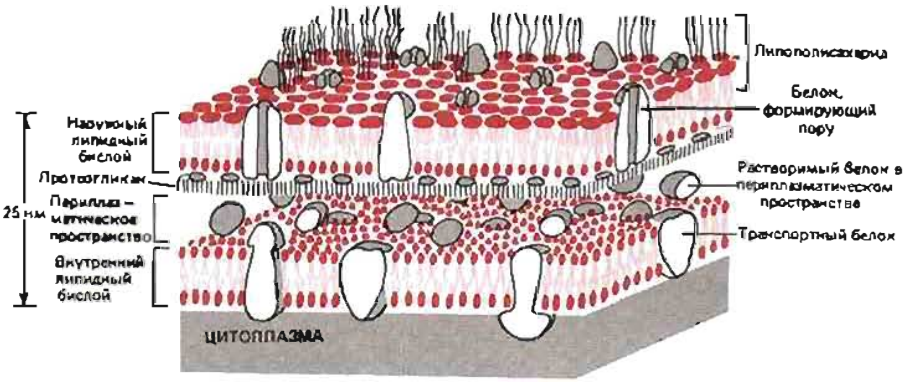


Рис. 7-64. Схематическое изображение небольшого участка оболочки *E. coli*. Обратите внимание, что цитоплазма клетки отделена от внеклеточного пространства двумя концентрическими мембранами, построенными из липидных бислоев. Жесткий слой пептидогликана, пронизанный множеством пор, ковалентно связан с молекулами небольшого белка, которые соединяют его с наружной мембраной. Черные нити – это олигосахаридные цепи, прикрепленные к молекулам специфических липополисахаридов, образующим внешний монослой наружной мембраны. Чтобы избежать путаницы, показано лишь несколько таких олигосахаридных цепей.

электронных микрофотографиях любых клеток *E. coli*, но особенно легко они обнаруживаются при вирусной инфекции в тех местах, где к бактериальной оболочке прикрепляются разнообразные вирусы бактерий (рис. 7-66).

Если не обращать внимания на средний жесткий слой, то бактериальная двойная мембрана может служить хорошей моделью для изучения транспорта через две мембраны, имеющего место в эукариотических органеллах с двойной мембраной. Однако в прокариотических и эукариотических клетках перенос белков направлен в противоположные стороны: у бактерий некоторые белки, синтезированные в полости (цитоплазме), движутся во внеклеточное пространство, тогда как в эукариотических клетках многие белки, синтезированные вне органеллы (в цитозоле), движутся по направлению к ее полости (рис. 7-67).



Рис. 7-65. Электронная микрофотография поперечного среза делящейся бактерии *E. coli*. Дочерние клетки находятся в процессе расхождения, при этом хорошо видно устройство двуслойной мембраны и слоя пептидогликана. (Burdett I. D. J., Murray R. G. E. J. Bacteriol., 119, 303–324, 1974.)

7.6.2. Мембранные белки, вероятно, перемещаются между внутренним и внешним бислоями в зонах слипания [20, 45]

Можно индуцировать синтез определенных, входящих в состав наружной мембраны бактериальных белков и затем с помощью специфических антител проследить за их появлением в наружной мембране. Исследования подобного рода показали, что по крайней мере некоторые из этих белков проникают в наружную мембрану прежде всего в особых зонах слипания или поблизости от них. Это означает, что такие зоны играют важную роль в переносе макромолекул между внутренним и наружным бислоями.

Мы уже обсуждали остроумные эксперименты, в которых были «сконструированы» клетки *E. coli*, синтезирующие гибридные белки, состоящие из N-концевой части мембранного белка *E. coli* и С-концевого участка одного из цитозольных белков (разд. 7.3.8). В том случае, если образуются гибридные молекулы с N-концевой последовательностью одного из белков *наружной* мембраны *E. coli*, некоторые из них оказываются погруженными главным образом во внутреннюю, а не в наружную мембрану. Это говорит о том, что в клетках *E. coli* белки, предназначенные для наружной мембраны, сначала встраиваются во внутреннюю мембрану и что для их последующего переноса в наружную мембрану необходим какой-то второй сигнал, дефектный у ряда гибридных белков.

Эти наблюдения дают возможность предположить, что транспорт мембранных белков через эукариотические двойные мембраны происходит в два этапа. Согласно этой точке зрения, новосинтезированные мембранные белки любой органеллы имеют сигнальную последовательность, позволяющую им связываться с наружной мембраной данной органеллы и затем встраиваться в нее. Диффундируя в плоскости бислоя, все белки наружной мембраны в конце концов должны натолкнуться на зоны слипания. Белки-рецепторы,



Рис. 7-66. Электронная микрофотография бактериальных вирусов, прикрепившихся к зонам слипания в двухслойной мембране *E. coli*. Вирус впрыскивает свою ДНК внутрь клетки, по-видимому, именно в этих местах. (Bayer M., Thurow H., Mayer M.H. Virology, 94, 95–118, 1979.)

Рис. 7-67. Сходство между бактерией *E. coli* и некоторыми эукариотическими органеллами. Внутреннее пространство (обозначенное здесь как полость) окружено оболочкой, состоящей из двух концентрических мембран, каждая из которых представляет собой липидный бислой с встроенными в него мембранными белками. Перенос белков в ту или другую мембрану (и через них) у бактерий и эукариот может осуществляться с помощью сходных механизмов.

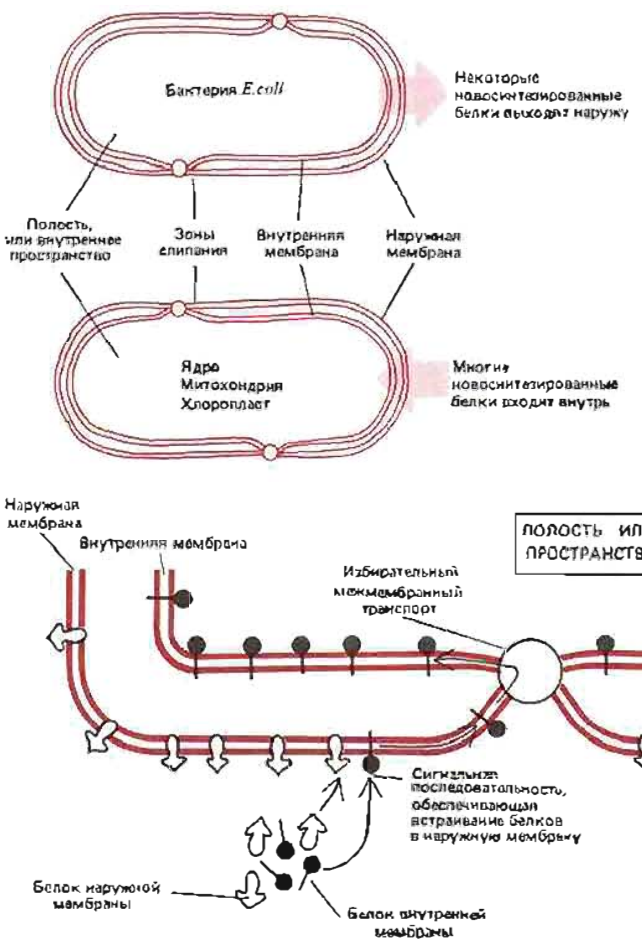
Рис. 7-68. Схема, иллюстрирующая, каким образом зоны слипания в органеллах с двуслойной мембраной могли бы опосредовать избирательный транспорт липидов и мембранных белков между внешним и внутренним бислоями.

локализованные в этих зонах, вероятно, избирательно переносят во внутреннюю мембрану белки, несущие некий специфический маркер (рис. 7-68). Этот перенос, по-видимому, должен быть энергозависимым и однонаправленным. В наружной мембране эукариотических органелл будут, следовательно, оставаться только те белки, у которых нет соответствующего маркера, необходимого для переноса. В настоящее время описанная модель избирательного межмембранного транспорта представляет собой лишь рабочую гипотезу, поскольку постулированные рецепторы в зонах слипания до сих пор не идентифицированы.

Органеллы с двойными мембранами должны переносить как растворимые, так и мембраносвязанные белки из цитозоля в свои полости. Сейчас мы рассмотрим, каким образом белки могут последовательно проходить через две мембраны.

7.6.3. Зоны слипания, вероятно, также принимают участие в транспорте водорастворимых веществ в полость органелл с двойными мембранами [46]

Липиды и другие гидрофобные молекулы малых размеров, растворимые в липидном бислое, могли бы следовать по тому же транспортному пути, какой изображен на рис. 7-68 для мембранных белков. Однако водорастворимые вещества не могут проникать в органеллу этим способом. Небольшие молекулы водорастворимых веществ обычно переносятся через мембраны с одним бислоем с помощью специфических транспортных белков



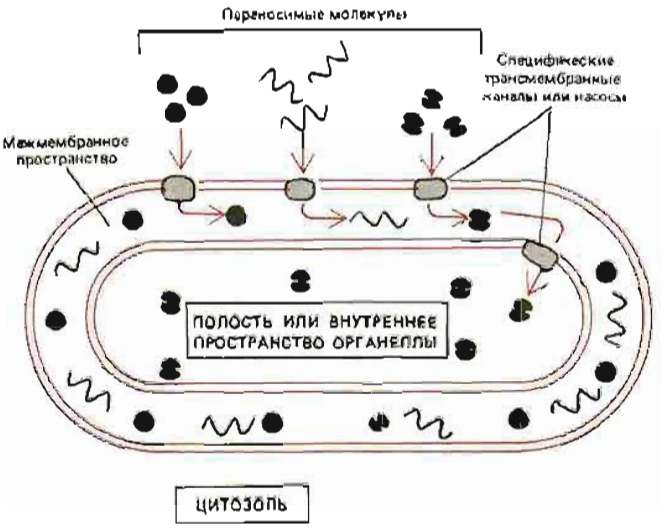


Рис. 7-69. Схема, показывающая один из способов транспортировки водорастворимых молекул внутрь органелл с двуслойной мембраной. Такие органеллы могут накапливать в своем межмембранном пространстве водорастворимые молекулы и избирательно переносить некоторые из них в полость. Любая молекула, для которой существует транспортный белок, может быть перенесена таким способом.

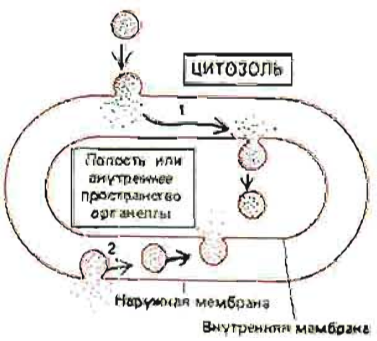


Рис. 7-70. Схема, показывающая, что транспортные пузырьки не могут быть использованы для переноса водорастворимых молекул из цитозоля в полость органелл с двуслойной мембраной. Хотя молекулы способны транспортироваться в межмембранное пространство с помощью транспортного пузырька и могли бы затем входить в полость другого пузырька (путь 1), они в этом случае никогда не освободились бы из этого пузырька. Однако, в принципе, водорастворимые молекулы могли бы прямо переноситься из цитозоля в полость (и обратно) за счет циклического чередования процессов отпочковывания и слияния пузырьков, полностью происходящих внутри межмембранного пространства (путь 2). Правда, о существовании опосредованного пузырьками транспорта такого типа ничего не известно.

(разд. 6.4.2), и в наружной мембране органелл с двойными мембранами имеются белковые поры, которые обеспечивают этим молекулам доступ в межмембранное пространство. Чтобы молекулы из межмембранного пространства могли попасть в полость, во внутренней мембране должен находиться другой набор транспортных белков (рис. 7-69). Поскольку эти два набора транспортных белков различны, молекулы, присутствующие в полости органеллы и в межмембранном пространстве, также сильно отличаются друг от друга (см. гл. 9).

Но как же в эти органеллы проникают растворимые вещества с такими крупными молекулами, как у белков? В принципе этот процесс мог бы осуществляться с помощью цитоплазматических транспортных пузырьков, но тогда транспортированные в полость органеллы молекулы, очевидно, оставались бы внутри пузырьков (путь 1 на рис. 7-70). Этим, по-видимому, и объясняется тот факт, что транспортные пузырьки не направляются в митохондрии или хлоропласты из аппарата Гольджи. Кроме того, эксперименты, проведенные с митохондриями, показывают, что белки, предназначенные для полости (матрикса), не обнаруживаются вначале в межмембранном пространстве (т. 3, разд. 9.5.12). В принципе крупные молекулы могли бы проникать в полость органеллы из цитозоля за счет цикла отпочковывания и слияния пузырьков, полностью происходящего внутри межмембранного пространства (путь 2 на рис. 7-70); однако ни на бактериях, ни на клеточных органеллах еще не было продемонстрировано, что между двумя мембранами действительно протекает опосредованный пузырьками транспортный процесс такого типа.

Пожалуй, наиболее вероятный механизм переноса растворимых белков в полость органелл с двойными мембранами должен быть связан с их перемещением по специальным белковым каналам, пересекающим обе мембраны в зонах слипания. Как известно, уникальные образования, соединяющие внутреннюю и наружную мембраны клеточного ядра – *ядерные поровые комплексы*,– непосредственно участвуют в транспортировке белков и нуклеиновых кислот в клеточное ядро и из него (разд. 8.3.3). Ситуация в митохондриях и хлоропластах более сходна с тем, что наблюдается у *E. coli*. Об этом свидетельствует тот факт, что многие бактериальные вирусы специфически связываются с *E. coli* в зонах слипания и инъецируют свою ДНК прямо в клетку сквозь эти участки. Хотя было показано, что зоны слипания в митохондриях и хлоропластах действительно существуют, до сих пор не получено прямого доказательства, что эти зоны выполняют функции избирательных пор. Кроме того, их очень трудно выделить для биохимических исследований. Полагают,

что, возможно, как и в случае *E. coli*, зоны слипания в митохондриях и хлоропластах лабильны, т.е. постоянно разрушаются и вновь образуются в различных местах.

Заключение

В отличие от ЭР, аппарата Гольджи и лизосом ядро, митохондрии и хлоропласты ограничены двумя отдельными бислойными мембранами. Хотя молекулы, транспортируемые в полость, могли бы проходить через каждую мембрану независимо от другой, вероятно, в таком транспорте принимают участие специальные зоны слипания, соединяющие оба бислоя. В митохондриях и хлоропластах этот транспортный процесс, очевидно, более специфичен по сравнению с тем, который происходит в ядерной оболочке, где крупные ядерные поровые комплексы обеспечивают быстрый перенос макромолекул в ядро и из него.

Литература

Общая

DePierre J.W., Ernster L. Enzyme topology of intracellular membranes, Annu. Rev. Biochem., **46**, 201–262, 1977.

Fawcett D. The Cell, 2nd ed., Philadelphia, Saunders, 1981. (Редкое собрание микрофотографий с кратким текстом и ограниченным числом литературных ссылок.)

Karp G. Cell Biology, New York, McGraw-Hill, 1979. (См. гл. 7.)

Krstić R.V. Ultrastructure of the Mammalian Cell, New York, Springer-Verlag, 1979. (Превосходный атлас рисунков, созданных на основе электронных микрофотографий.)

Lodish H.F., Rothman J.E. The assembly of cell membranes, Sci. Am., **240**(1), 48–63, 1979.

Цитированная

1. *Palade G.E., Farquhor M.G.* Cell biology. In: Pathophysiology: The Biological Principles of Desease (L.H. Smith, S.O. Thier, eds.), pp. 1–56, Philadelphia, Saunders, 1981.
2. *Weibel E.R., Stäubli W., Gnägi H.R., Hess F.A.* Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell, J. Cell Biol., **42**, 68–91, 1969.
   Bolender R.P. Stereological analysis of the guinea pig pancreas, J. Cell Biol., **61**, 269–287, 1974.
3. *Helenius A., Kartenbeck J., Simons K., Fries E.* On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells, J. Cell Biol., **84**, 404–420, 1980.
   Simons K., Garoff H., Helenius A. How an animal virus gets into and out of its host cell, Sci. Am., **246**(2), 58–66, 1982.
   Miller D., Lenard J. Antihistiminics, local anesthetics, and other amines as antiviral agents, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 3605–3609, 1981.
4. *Lenard J., Compans R.W.* The membrane structure of lipid-containing viruses, Biochem. Biophys. Acta, **344**, 51–94, 1974. (Обзор.)
   Rodriguez Boulan E., Sabatini D.D. Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for study of epithelial polarity, Proc. Natl. Acad. Sci USA, **75**, 5071–5075, 1978.
   Bergmann J.E., Tokuyasu K.T., Singer S.J. Passage of an integral membrane protein, the vesicular stomatitis virus glucoprotein, through the Golgi apparatus in route to the plasma membrane, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 1746–1750, 1981.
5. *Stryer L.* Biochemistry, 2nd ed., San Francisco, Freeman, 1981. (Главы 27 и 29).
   Fulton A.B. How crowded is the cytoplasm? Cell, **30**, 345–347, 1982.
6. *Lake J.A.* The ribosome, Sci. Am., **245**(2), 84–97, 1981.
   Wool I.G. The structure and function of eukaryotic ribosomes, Annu. Rev. Biochem., **48**, 719–754, 1979.
7. *Rich A.* Polyribosomes, Sci. Am, **209**(6), 44–53, 1963.
8. *Dean D., Nomura M.* Feedback regulation of ribosomal protein gene expression in *E. coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 3590–3594, 1980.
9. *Kozak M.* How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in mRNA? Cell, **15**, 1109–1123, 1978.
   Sherman F., Stewart J.W., Schweingruber A.M. Mutants of yeast initiating translation of iso-1-cytochrome *c* within a region spanning 37 nucleotides, Cell, **20**, 215–222, 1980.

Lewin B. Gene Expression, Vol. 2, Eucaryotic Chromosomes, 2nd ed., New York, Wiley, 1980. (В гл. 23 описывается структура эукариотической мРНК.)

10. *Steiner D. F., Quinn P. S., Chan S. J., Marsh J., Tager H. S.* Processing mechanisms in the biosynthesis of proteins, Ann. N. Y. Acad. Sci., **343**, 1–16, 1980.
Stark G. R. Multifunctional proteins: one gene–more than one enzyme, Trends Biochem. Sci., **2**, 64–66, 1977.
11. *Wold F.* In vivo chemical modification of proteins (post-translational modification), Annu. Rev. Biochem., **50**, 783–814, 1981.
Schlesinger M. J. Proteolipids, Annu. Rev. Biochem., **50**, 193–206, 1981.
Neurath H., Walsh K. A. Role of proteolytic enzymes in biological regulation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 3825–3832, 1976. (Обзор.)
Chock P. B., Rhee S. G., Stadtman E. R. Interconvertible enzyme cascades in cellular regulation, Annu. Rev. Biochem., **49**, 813–843, 1980.
12. *Hershko A., Ciechanover A.* Mechanisms of intracellular protein breakdown, Annu. Rev. Biochem., **51**, 335–364, 1982.
13. *DePierre J. W., Dallner G.* Structural aspects of the membrane of the endoplasmic reticulum, Biochim. Biophys. Acta, **415**, 411–472, 1975.
Fawcett D. The Cell, 2hd ed., Philadelphia, Saunders, 1981. (См. с. 303–352.)
14. *Jones A. L., Fawcett D. W.* Hypertrophy of the agranular endoplasmic reticulum in hamster liver induced by phenobarbital, J. Histochem., Cytochem., **14**, 215–232, 1966. (Включает обзор функций гладкого ЭР в печени.)
Mori H., Christensen A. K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis, J. Cell Biol., **84**, 340–354, 1980. (Гладкий ЭР составляет 60% всех мембран этой клетки, производящей стероидные гормоны.)
15. *de Duve C.* Tissue fractionation past and present, J. Cell Biol., **50**, 20d–55d, 1971.
Dallner G. Isolation of rough and smooth microsomes–general, Methods Enzymol., **31**, 191–201, –:
16. *Adelman M., Sabatini D., Blobel G.* Ribosome-membrane interaction, J. Cell Biol., 56, 206–229, 1973.
Kreibich G., Ulrich B., Sabatini D. Proteins of rough microsomal membranes related to ribosome binding, J. Cell Biol., **77**, 464–487, 1978.
17. *Sabatini D., Blobel G.* Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions: location of the polypeptides in rough microsomes, J. Cell Biol., **45**, 146–157, 1970.
Sabatini D., Kreibich G., Morimoto T., Adesnick M. Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles, J. Cell Biol., **92**, 1–22, 1982. (Обзор.)
18. *Redman C., Sabatini D.* Vectorial discharge of peptides released by puromycin from attached ribosomes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **56**, 608–615, 1966.
Smith W. P., Tai P. C., Davis B. D. Interaction of secreted nascent chains with surrounding membrane in *Bacillus subtilis*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 5922–5925, 1978.
19. *Milstein C., Brownlee G., Harrison T., Mathews M. B.* A possible precursor of immunoglobulin light chains, Nature New Biol., **239**, 117–120, 1972.
Devillers-Thiery A., Kindt T., Scheele G., Blobel G. Homology in amino-terminal sequence of precursors to pancreatic secretory proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 5016–5020, 1975.
Blobel G., Dobberstein B. Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components, J. Cell Biol., **67**, 852–862, 1975.
Walter P., Blobel G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes, J. Cell Biol., **91**, 557–561, 1981.
20. *Emr S. D., Hall M. N., Silhavy T. J.* A mechanism of protein localization: the signal hypothesis and bacteria, J. Cell Biol., **86**, 701–711, 1980.
Davis B. D., Tai P. C. The mechanism of protein secretion across membranes, Nature, **283**, 433–438, 1980.
21. *Wickner W.* Assembly of proteins into membranes, Science, **210**, 861–868, 1980.
Krell G. Transfer of proteins across membranes, Annu. Rev. Biochem., **50**, 317–348, 1981.
22. *Kornfeld R., Kornfeld S.* Comparative aspects of glycoprotein structure, Annu. Rev. Biochem., **45**, 217–238, 1976.
Gibson R., Kornfeld S., Schlesinger S. A role for oligosaccharides in glycoprotein biosynthesis, Trends Biochem. Sci., **5**, 290–294, 1980.
Wagh P. V., Bahl O. P. Sugar residues on proteins, CRC Crit. Rev. Biochem., **10**, 307–377, 1981.

23. *Struck D., Lennarz W.* The function of saccharide lipids in synthesis of glycoproteins. In: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans (W. J. Lennarz, ed.), Chapter 2, New York, Plenum, 1980.
24. *Rothman J. E., Kennedy E. P.* Rapid transmembrane movement of newly synthesized phospholipids during membrane assembly, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 1821–1825, 1977.
Coleman R., Bell R. M. Evidence that biosynthesis of phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, and triacylglycerol occurs on the cytoplasmic side of microsomal vesicles, J. Cell Biol., **76**, 245–253, 1978.
25. *Wirtz K. W. A.* Transfer of phospholipids between membranes, Biochim. Biophys. Acta, **344**, 95–117, 1974. (Обзор.)
26. *Whaley W. G.* The Golgi Apparatus, New York, Springer-Verlag, 1975.
Farquhar M., Palade G. The Golgi apparatus (complex)–(1954–1981) from artifact to center stage, J. Cell Biol., **91**, 77s–103s 1981.
27. *Novikoff A.* The endoplasmic reticulum: a cytochemist's view (a review), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 2781–2787, 1976.
28. *Schachter H., Roseman S.* Mammalian glycosyltransferases: their role in the synthesis and function of complex carbohydrates and glycolipids. In: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans (W. J. Lennardz, ed.), Chapter 3, New York, Plenum, 1980.
29. *Hubbard S. C., Ivatt R. J.* Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides, Annu. Rev. Biochem., **50**, 555–583, 1981.
Tabas I., Kornfeld S. The synthesis of complex-type oligosaccharides. III. J. Biol. Chem., **253**, 7779–7786, 1978.
30. *Leblond C., Bennett G.* In: International Cell Biology (B. Brinkley, K. Porter, eds.), pp. 326–336., New York, Rockfeller University Press, 1977.
31. *Palade G.* Intracellular aspects of the process of protein synthesis, Science, **189**, 347–358, 1975.
32. *Heuser J. E. et al.* Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release, J. Cell Biol., **81**, 275–300, 1979.
Heuser J., Reese T. Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction, J. Cell Biol., **88**, 564–580, 1981.
33. *Pearse B. M. F., Bretscher M. S.* Membrane recycling by coated vesicles, Annu. Rev. Biochem., **50**, 85–101, 1981.
Anderson R. G. W., Brown M. S., Goldstein J. L. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts, Cell., **10**, 351–364, 1977.
Rothman J., Fine R. Coated vesicles transport newly synthesized membrane glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma membrane in two successive stages, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 780–784, 1980.
34. *Rothman J.* The Golgi apparatus: two organelles in tandem, Science, **213**, 1212–1219, 1981.
35. *de Duve C.* Exploring cells with a centrifuge, Science, **189**, 186–194, 1975.
Bainton D. The discovery of lysosomes, J. Cell Biol., **91**, 66s–76s, 1981.
36. *Holtzman E.* Lysosomes: A Survey, New York, Springer-Verlag, 1976.
37. *Hasilik A.* Biosynthesis of lysosomal enzymes, Trends Biochem. Sci., **5**, 237–240, 1980.
Erickson A. H., Conner G. E., Blobel G. Biosynthesis of a lysosomal enzyme, J. Biol. Chem., **256**, 11224–11231, 1981.
Waheed A., Pohlmann R., Hasilik A., von Figura K. Subcellular location of two enzymes involved in the synthesis of phosphorylated recognition markers in lysosomal enzymes, J. Biol. Chem., **256**, 4150–4152, 1981.
38. *Neufeld E. F., Lim T. W., Shapiro L. J.* Inherited disorders of lysosomal metabolism, Annu. Rev. Biochem., **44**, 367–376, 1975.
39. *Kaplan A., Achord D. T., Sly W. S.* Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts, Proc. Natl. Acad. USA, **74**, 2026–2030, 1977.
Neufeld E. F., Ashwell G. Carbobydrate recognition systems for receptor-mediated pinocytosis. In: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans (W. J. Lennarz, ed.), Chapter 6, New York, Plenum, 1980.
Reitman M., Varki A., Kornfeld S. Fibroblasts from patients with I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy are deficient in uridine 5'-diphosphate-N-acetylglucosamine: glycoprotein N-acetylglucosaminylphosphotransferase activity, J. Clin. Invest., **67**, 1574–1579, 1981.
40. *von Figura K., Weber E.* An alternative hypothesis of cellular transport of lysosomal enzymes in fibroblasts, Biochem. J., **176**, 943–950, 1978.

Fischer H. D., Gonzalez-Noriega A., Sly W. S., Morré D. L. Phosphomannosyl-enzyme receptors in rat liver, J. Biol. Chem., **255**, 9608–9615, 1980.

Varki A., Kornfeld S. Structural studies of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides, J. Biol. Chem., **255**, 10847–10858, 1980.

Reitman M. L., Kornfeld S. Lysosomal enzyme targeting; N-acetylglucosaminylphosphotransferase selectively phosphorylates native lysosomal enzymes, J. Biol. Chem., **256**, 11977–11980, 1981.

41. *Novikoff A. B., Novikoff P. M.* Microperoxisomes, J. Histochem. Cytochem., **21**, 963–966, 1973.

de Duve C. Biochemical studies on the occurrence, biogenesis and life history of mammalian peroxisomes, J. Histochem., Cytochem., **21**, 941–948, 1973.

de Duve C. Evolution of the perozisome, Ann. N. Y. Acad., Sci., **168**, 369–381, 1969.

Goldman B. M., Blobel G. Biogenesis of peroxisomes: intracellular site of synthesis of catalase and uricase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 5066–5070, 1978.

42. *de Duve C., Baudhuin P.* Peroxisomes (microbodies and related particles), Physiol. Rev., **46**, 323–357, 1966.

Tolbert N. E., Essner E. Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes, J. Cell Biol., **91**, 271s–283s, 1981.

43. *Elbein A. D.* The tunicamycins–useful tools for studies on glycoproteins, Trends Biochem. Sci., **6**, 219–221, 1981.

Green R. F., Melss H. K., Rodrigues Boulan E. Glycosylation does not determine segregation of viral envelope proteins in the plasma membrane of epithelial cells, J. Cell Biol., **89**, 230–239, 1981.

44. *Inouye M., ed* Bacterial Outer Membranes: Biogenesis and Functions, New York, Wiley, 1980.

Osborn M. J., Wu H. C. P. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria, Annu. Rev. Microbiol., **33**, 369–422, 1980.

45. *Smit J., Nikaido H.* Outer membrane of gram-negative bacteria; electron microscopic studies on porin insertion sites and growth of cell surface of *Salmonella typhimurium*, J. Bacteriol., **135**, 687–702, 1978.

46. *Bayer M. E., Thurow H., Bayer M. H.* Penetration of the polysaccharide capsule of *E. coli* by bacteriophage K29, Virology, **93**, 95–118, 1979.

Neupert W., Schatz G. How proteins are transported into mitochondria, Trends Biochem. Sci., **6**, 1–4, 1981.

8 Клеточное ядро

Почти вся клеточная ДНК сосредоточена в ядре, которое отделено от остальной цитоплазмы двойной мембраной, называемой *ядерной оболочкой*. Наличие ядерной оболочки – характерный признак эукариотических клеток, отличающий их от клеток прокариот. Двойная ядерная мембрана изолирует центральные генетические процессы – репликацию ДНК и синтез РНК – от рибосом цитоплазмы, где в ходе трансляции наследственная информация реализуется в виде молекул белка. Такое пространственное разделение процессов биосинтеза РНК и белка в клетке, по-видимому, является основной функцией ядерной оболочки: иначе трудно объяснить ее происхождение и эволюцию. Между эукариотами и прокариотами наблюдается еще целый ряд существенных различий, которые, однако, носят вторичный характер. Так, прокариотический геном обычно гораздо меньше генома эукариот. Кроме того, эукариотическая ДНК в отличие от прокариотической тесно связана с особыми белками – *гистонами*, которые обеспечивают ее компактную упаковку и участвуют в регуляции ее функциональной активности. Однако ни большие размеры генома, ни присутствие гистонов не связаны неизбежно с наличием обособленного ядра. Например, крупные бактерии по величине генома не уступают мелким эукариотам, а представители одного из классов эукариотических организмов – одноклеточные динофлагелляты – имеют ядерную оболочку, но не имеют гистонов.

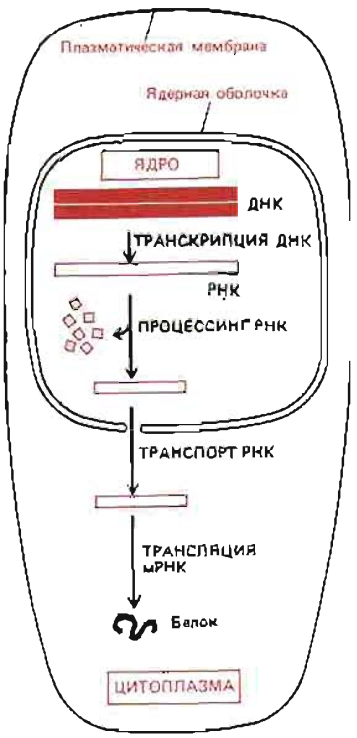


Рис. 8-1. Схема обобщенного процесса белкового синтеза («ДНК → РНК → белок») у эукариот. Благодаря наличию ядерной оболочки транскрипция ДНК и трансляция информационной РНК в белковый продукт разделены рядом промежуточных стадий, включающих процессинг РНК и транспорт зрелых молекул РНК в цитоплазму.

Получается, что выделение в клетке ядерной зоны и обособление ее от остальной цитоплазмы в виде самостоятельной органеллы создают определенные преимущества даже для клеток малых размеров с относительно небольшим содержанием ДНК. С чем это связано? Ведь мы знаем, что *центральный постулат* молекулярной генетики (ДНК → РНК → белок) в равной степени справедлив для всех живых клеток. Дело, по-видимому, в том, что для эукариотической клетки возможность разделить во времени и пространстве такие генетические процессы, как биосинтез РНК (*транскрипцию*) и биосинтез белка (*трансляцию*), имеет принципиальное значение.

В клетках прокариот транскрипция и белковый синтез протекают почти одновременно – рибосомы уже транслируют 5′-конец молекулы РНК, в то время как ее 3′-конец только синтезируется. Следовательно, практически невозможно внести какие-либо изменения в структуру РНК-транскриптов, прежде чем они начнут транслироваться в белковую цепь. Напротив, в ядре эукариотической клетки новосинтезированные РНК-транскрипты могут подвергаться существенной переделке, предшествующей их трансляции на рибосомах. Эта переделка, называемая *процессингом РНК*, представляет собой важнейшую промежуточную стадию переноса генетической информации у эукариот; за ней следуют выход РНК из ядра и связывание ее с цитоплазматическими рибосомами (рис. 8-1). Немного позже мы увидим, что по крайней мере один из типов процессинга РНК – так называемый *сплайсинг* – сообщает клетке вполне определенные селективные преимущества. Кроме того, сплайсинг обусловливает появление у эукариотических клеток генов, которые обладают прерывистой структурой и могут принимать участие в образовании совершенно новых белков. Так что не составляет особого труда ответить на вопрос: зачем эукариотической клетке понадобилось ядро?

Данная глава содержит весьма обширную информацию. В различных ее разделах обсуждаются вопросы, касающиеся упаковки эукариотической ДНК в составе хромосом, биосинтеза РНК и молекулярных механизмов, лежащих в основе ее процессинга. В разд. 8.3 описана структура ядерной оболочки, а в разд. 8.4 дан подробный анализ процессов, связанных с контролем экспрессии эукариотических генов. И наконец, завершает главу раздел, посвященный проблемам эволюции эукариотического генома.

8.1. Структурная организация ДНК в составе хромосом [1]

В течение первых 40 лет нашего столетия биологи не принимали всерьез предположения о том, что содержащаяся в хромосомах ДНК несет генетическую информацию. Отчасти это было следствием господствовавшего тогда ошибочного мнения, будто бы в нуклеиновых кислотах имеются лишь простые, регулярно повторяющиеся тетрануклеотидные последовательности (например, AGCTAGCTAGCT...). Сейчас мы знаем, что ДНК представляет собой чрезвычайно длинный неразветвленный линейный полимер, который может содержать много миллионов нуклеотидов, расположенных в нерегулярной, но отнюдь не случайной последовательности: эта последовательность нуклеотидов в полинуклеотидной цепи ДНК является кодовой формой записи наследственной информации. Линейный четырехбуквенный генетический код, словами-символами которого служат тройки нуклеотидов (т. 1, разд. 3.2.7), позволяет хранить огромное количество информации в очень малом объеме. В ДНК 1 млн. «букв» (нуклеотидов) умещается на отрезке прямой, длина которого равна $3{,}4 \cdot 10^5$ нм (0,034 см), и занимает объем, составляющий примерно 10^6 нм^3 (10^{-15} см^3). Иначе говоря, вся генетическая информация, заложенная в $3 \cdot 10^9$ нуклеотидов, содержащихся в гаплоидном геноме типичной клетки человеческого организма, имеющей в диаметре 20 мкм, теоретически может быть упакована в куб с ребром 1,5 мкм ($1{,}5 \cdot 10^{-4}$ см). Сравните: $3 \cdot 10^9$ букв заняли бы в этой книге около 1 млн. страниц.

Между тем известно, что у высших организмов (как у животных, так и у растений) только весьма небольшая часть всей ДНК действительно кодирует белки или важнейшие нетранслируемые РНК, такие, как транспортные или рибосомные РНК. Эту ДНК принято называть *кодирующей ДНК*. Функции некодирующих участков изучены пока недостаточно полно, однако не вызывает сомнения, что некоторые из них содержат последовательности, играющие весьма важную роль в жизнедеятельности клетки, в частности последовательности, обеспечивающие компактную укладку ДНК в составе хромосом.

Компактизация ДНК важна для эукариотических клеток по двум причинам. Во-первых, она позволяет упорядоченно расположить очень длинные молекулы ДНК в небольшом объеме клеточного ядра. Во-вторых, это один из способов функционального контроля генов: характер упаковки ДНК влияет на активность некоторых участков генома (разд. 8.5.2). В следующих разделах мы познакомимся со специфическими белками эукариотических клеток – гистонами, играющими центральную роль в структурной организации клеточной ДНК.

8.1.1. Гистоны – это самые консервативные из всех известных белков [2]

ДНК всех организмов тесно связана с множеством различных ДНК-связывающих белков. Это ферменты, обеспечивающие такие важные процессы, как биосинтез РНК. Это и структурные белки, участвующие в создании определенной структуры ДНК внутри клеточного ядра. Традиционно ДНК-связывающие белки эукариотических клеток разделяют на два класса – **гистоны** и **негистоновые белки**. Вторая группа включает сотни или тысячи различных

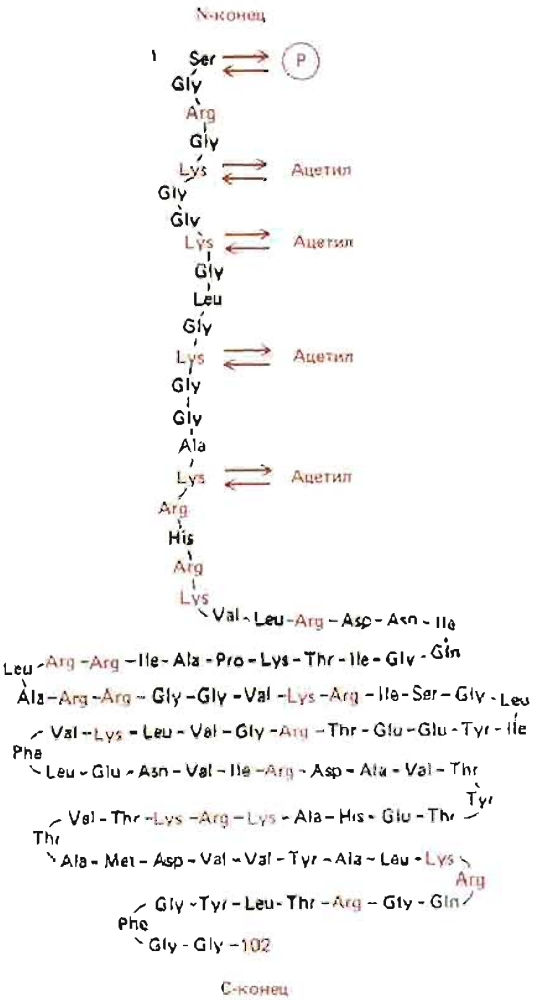


Рис. 8-2. Аминокислотная последовательность гистона H4 – одного из четырех нуклеосомных гистонов. Положительно заряженные аминокислоты выделены цветом. На примере гистона H4 (это справедливо также для остальных трех нуклеосомных гистонов) показано, что достаточно протяженная аминоконцевая последовательность молекулы обратимо модифицируется в клетке путем ацетилирования отдельных остатков лизина и фосфорилирования серина (см. рис. 8-9 и 8-10). Приведенная последовательность соответствует гистону H4 быка. У гороха гистон H4 имеет точно такую же аминокислотную последовательность, за исключением того, что в нем один остаток валина замещен на изолейцин, а один остаток лизина – на аргинин.

белков, выполняющих в клетке разнообразные функции, тогда как гистоны, напротив, составляют единый, хорошо охарактеризованный класс структурных белков. По сравнению с другими хромосомными белками гистоны присутствуют в клетке в очень больших количествах (до 60 млн. копий каждого типа). Их общее содержание по массе почти равно количеству клеточной ДНК. ДНК, ассоциированная с гистонами (а это, по-видимому, вся ядерная ДНК эукариотических клеток), в свое время получила название хроматин, которое сохраняется и поныне.

Гистоны – это небольшие белки с очень высоким содержанием положительно заряженных аминокислот (лизина и аргинина). Суммарный положительный заряд позволяет гистонам прочно связываться с ДНК независимо от ее нуклеотидного состава. Скорее всего, гистоны постоянно находятся в комплексе с ДНК и в таком случае, вероятно, играют существенную роль во всех процессах, связанных с функционированием генома.

Пять типов гистонов, присутствующих в эукариотических клетках, распадаются на две основные группы. Первая группа включает так называемые *нуклеосомные гистоны*, отвечающие за формирование специфических дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов – *нуклеосом* (этот вопрос подробно рассматривается в разд. 8.1.2). Они обозначаются как гистоны H2A, H2B, H3 и H4. Эти четыре гистона относятся к числу наиболее консервативных из известных белков; например, аминокислотные последовательности гистонов H4 у гороха и коровы различаются всего лишь двумя заменами аминокислотных

остатков (рис. 8-2). Такая эволюционная стабильность предполагает, что эти гистоны играют очень ответственную роль и что они наилучшим образом приспособлены к выполнению своих функций (см. гл. 5, табл. 5-2).

Вторая группа состоит из *гистонов H1*, которые в каждой клетке представлены несколькими очень сходными разновидностями. За исключением центрального участка, аминокислотная последовательность гистонов H1 в значительно большей степени подверглась изменениям в процессе эволюции, чем первичная структура четырех нуклеосомных гистонов.



Рис. 8-3. Электронные микрофотографии хроматиновых нитей до и после обработки, приводящей к деконденсации нативной структуры и образованию «бус на нитке». *А.* Нативная структура, характерная для основных хроматиновых фибрилл диаметром 30 нм. (Любезно предоставлена Barbara Hamkalo.) *Б.* Деконденсированная форма хроматиновой фибриллы («бусы на нитке»), показанная при том же увеличении. (Любезно предоставлена Victoria Foe.) Схематическое изображение обеих форм хроматина приведено на рис. 8-24. Электронные микрофотографии получены с помощью модифицированной процедуры, описанной на рис. 8-35.

8.1.2. Ассоциация гистонов с ДНК приводит к формированию нуклеосом – структурных единиц хроматина [3]

В растянутом состоянии длина двойной спирали ДНК, содержащейся в каждой хромосоме человека, составила бы в среднем около 5 см. С помощью гистонов такая длинная молекула упакована в клеточном ядре, диаметр которого равен лишь нескольким микрометрам. В настоящее время известно несколько уровней упаковки ДНК; начало же углубленному изучению структуры хроматина положило открытие в 1974 г. основной его структурной единицы – *нуклеосомы*. Благодаря наличию нуклеосом частично декомпактизованный хроматин на электронных микрофотографиях напоминает нитки бус (рис. 8-3, *Б*).

«Бусину»-нуклеосому можно отделить от длинной нити ДНК путем обработки препарата хроматина ферментами, расщепляющими ДНК. (Ферменты, вызывающие деградацию как ДНК, так и РНК, называются *нуклеазами*, а ферменты, действующие только на ДНК, – *дезоксирибонуклеазами* или *ДНКазами*.) Нуклеаза, с помощью которой выделяют индивидуальные нуклеосомы, является бактериальным ферментом и носит название «микрококковая нуклеаза». При непродолжительной обработке этим ферментом расщепляются только те участки ДНК, которые расположены между нуклеосомами; остальная ДНК защищена от действия фермента связанными с ней гистонами, вследствие чего вся молекула полимера распадается на двухцепочечные фрагменты длиной 146 пар оснований. Эти ДНК-гистоновые комплексы на электронных микрофотографиях выглядят как частицы дисковидной формы, имеющие диаметр около 11 нм. Каждая нуклеосома содержит набор из восьми молекул гистонов – по две молекулы каждого из четырех высококонсервативных нуклеосомных гистонов: H2A, H2B, H3 и H4. По сути, это ее белковая сердцевина, или гистоновый кор, на который накручивается фрагмент двухцепочечной ДНК (рис. 8-4).

В интактном хроматине ДНК тянется в виде непрерывной нити от нуклеосомы к нуклеосоме. Участки ДНК, расположенные между нуклеосомными частицами (так называемые *линкерные участки*), имеют различную длину, которая в среднем составляет 60 нуклеотидов. Нуклеосомная частица (нуклеосомный (гистоновый) кор, или минимальная нуклеосома) в совокупности с линкерной ДНК и образует повторяющуюся структурную единицу хроматина – собственно нуклеосому, которая, таким образом, включает фрагмент ДНК длиной около 200 пар оснований (рис. 8-4).

Молекула белка среднего размера содержит около 400 аминокислотных остатков и имеет мол. массу около 50 000. Для кодирования аминокислотной последовательности такого белка требуется последовательность ДНК длиной примерно 1200 нуклеотидов. Поскольку на каждые 200 пар оснований в ДНК хроматина приходится 1 нуклеосома, эти 1200 нуклеотидов кодирующей ДНК должны быть упакованы в 6 нуклеосом, а весь гаплоидный геном человека ($3 \cdot 10^9$ пар оснований) – в $1{,}5 \cdot 10^7$ нуклеосом.

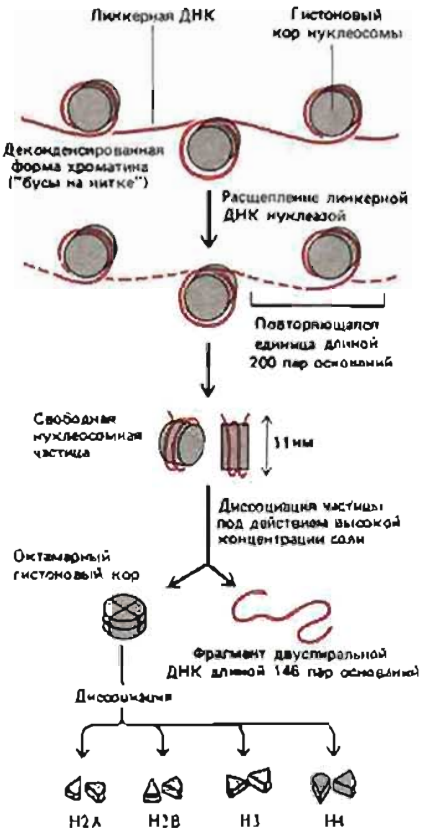


Рис. 8-4. Схема, иллюстрирующая строение нуклеосомной частицы. Нуклеосомы выделены из хроматина путем ограниченного гидролиза линкерных участков ДНК микрококковой нуклеазой. В каждой нуклеосомной частице фрагмент двойной спирали ДНК, имеющий в длину 146 пар оснований, закручен вокруг кора, представляющего собой гистоновый октамер. Этот белковый кор содержит по две молекулы каждого из гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Полипептидные цепи гистонов насчитывают от 102 до 135 аминокислотных остатков. В деконденсированной форме хроматина каждая «бусина» (нуклеосома) связана с соседней частицей нитевидным участком линкерной ДНК.

8.1.3. Дальнейшая компактизация ДНК в составе хроматина связана с образованием наднуклеосомных структур [3, 4]

В живой клетке хроматин находится в сильно конденсированном состоянии, и поэтому едва ли в нем имеются растянутые нуклеосомные нити: нуклеосомы являются результатом лишь первого этапа упаковки ДНК и служат основой для образования структур, определяющих более высокие уровни компактизации хроматина. Если ядра клеток очень осторожно подвергнуть лизису прямо на сеточке для электронной микроскопии, бо́льшая часть хроматина предстанет взору в виде фибрилл диаметром около 30 нм (рис. 8-3, *А*). Эти структуры получили название **30нм-хроматиновые фибриллы**.

На рис. 8-5 представлены две модели, объясняющие упаковку нуклеосомной нити в составе хроматиновой фибриллы. В обоих случаях хроматин одной хромосомы человека, содержащей молекулу ДНК длиной 5 см, в растянутом виде занял бы 1,2 мм, тогда как нуклеосомная нить имела бы в длину 2 см.

8.1.4. Гистон H1 обеспечивает укладку нуклеосомной нити [5]

Считается, что гистон H1 отвечает за укладку нуклеосомной нити в составе хроматиновой фибриллы. Молекула этого белка имеет центральную глобулярную часть и вытянутые N- и C-концевые участки (рис. 8-6). Центральная глобула гистона H1 присоединяется к специфическому участку на поверхно-

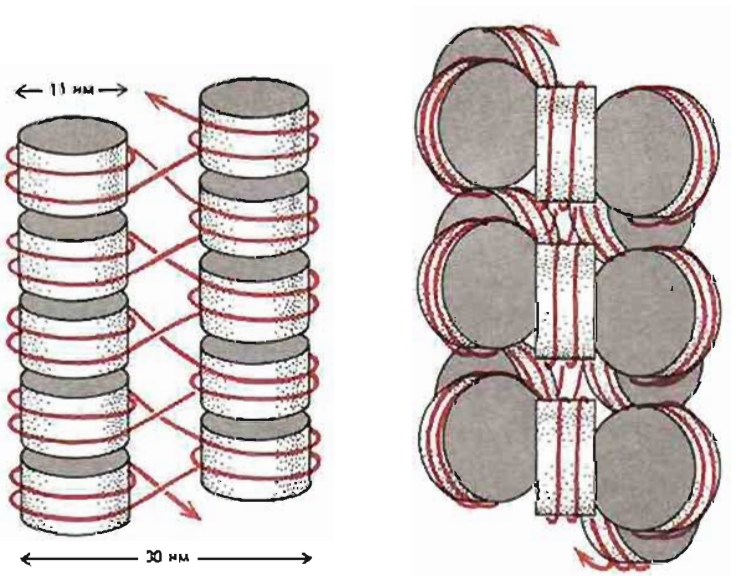


Рис. 8-5. Две модели, предложенные для объяснения упаковки нуклеосомной нити в составе 30нм-хроматиновой фибриллы. Детальная структура этой формы хроматина, представленной на рис. 8-3,*А*, не известна. Не исключено, что в различных участках хромосомы реализуются разные принципы упаковки генетического материала.

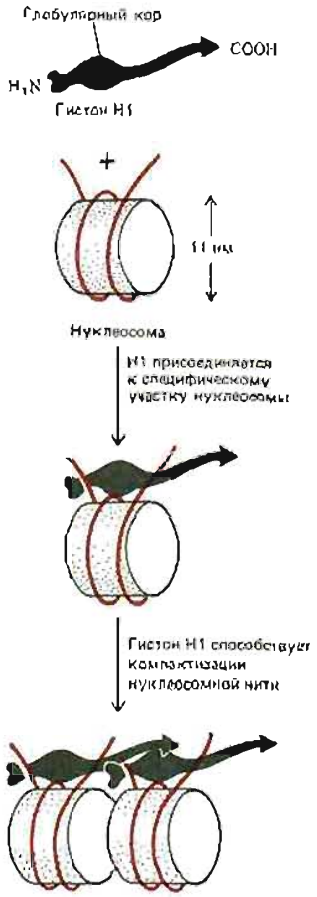


Рис. 8-6. Схема, иллюстрирующая, каким образом гистон H1 мог бы обеспечить взаимный контакт соседних нуклеосом. Структура гистона H1, равно как и участки взаимодействия с нуклеосомами его C- и N-концевых последовательностей, в точности не известна. Однако есть основания предполагать, что глобулярный кор H1 непосредственно связан с нуклеосомной частицей, как это показано здесь. Молекула гистона H1 содержит приблизительно 220 аминокислотных остатков.

сти нуклеосомы, а вытянутые «плечи» примыкают с одной стороны к линкерной ДНК в области ее контакта с нуклеосомной частицей, а с другой стороны к гистоновому кору соседней нуклеосомы. Таким образом, гистон H1 как бы стягивает соседние нуклеосомы друг с другом (рис. 8-6).

Важная особенность гистона H1 (не отмеченная на рис. 8-6) заключается в его склонности связываться с ДНК группами по восемь и более молекул. Взаимодействие этого типа, известное как **кооперативное связывание**, обусловлено тем, что каждая индивидуальная молекула H1 более охотно связывается с ДНК в непосредственной близости от другой, уже присоединившейся молекулы, чем отдельно от нее. Многие другие ассоциированные с геномом белки также обнаруживают кооперативное связывание с ДНК, располагаясь вдоль нее в виде протяженных кластеров, как показано схематически на рис. 8-7.

Далее мы увидим, что хроматин имеет блочное строение, причем каждый из блоков может изменять свою структуру, деконденсируясь при активации содержащихся в нем генов (разд. 8.4.14). Если структурная организация хроматина определяется кооперативными взаимодействиями между молекулами гистона H1, различные хроматиновые домены должны напоминать микрокристаллы, любой из которых в момент активации генов может внезапно «расплавиться», что будет сопровождаться перестройкой или удалением целого кластера молекул гистона H1 (рис. 8-8).

8.1.5. Не все нуклеосомы упакованы одинаково [2, 6]

Очищенные гистоны способны in vitro формировать нуклеосомы в любой ДНК, включая бактериальную, хотя последняя и не связана с ними в природе. Поэтому неудивительно, что нуклеосомы можно обнаружить, исследуя под электронным микроскопом практически любой участок хроматина. Однако не везде нуклеосомы расположены строго одинаково, поскольку небольшие изменения в нуклеосомной организации хроматина вызывают модуляцию некоторых важных функций геномной ДНК. Несмотря на то что сейчас лишь начинается изучение молекулярных основ этих малозаметных, но биологически очень важных различий в строении хроматина, кое-что о причинах его структурной гетерогенности нам уже известно. Некоторые из таких изменений, по-видимому, происходят преимущественно в тех областях хроматина, где находятся активные гены (см. также разд. 8.4.12).

Гетерогенность нуклеосомных гистонов. Нуклеосомные гистоны претерпевают целую серию ковалентных модификаций, например ацетилирование некоторых остатков лизина (рис. 8-9) и фосфорилирование определенных остатков серина (рис. 8-10). Подобной ковалентной модификации подвергается только часть гистонов каждого типа (см. рис. 8-2), поэтому одни нуклеосомы содержат модифицированные гистоны, а другие – немодифицированные. Поскольку модифицируются те аминокислоты, которые в процессе эволюции оказались наиболее консервативными, можно предположить, что эти структурные изменения играют важную роль в жизни клетки.

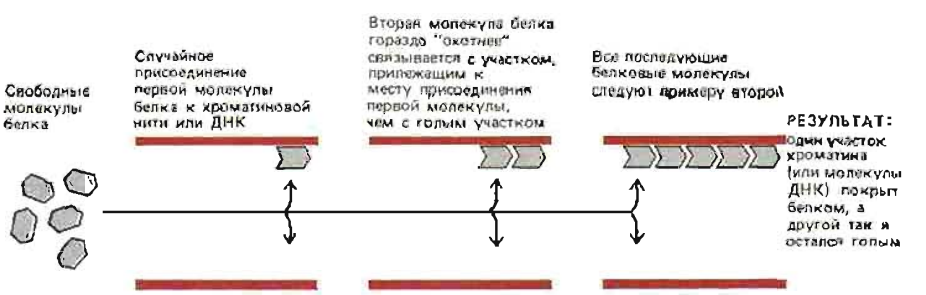
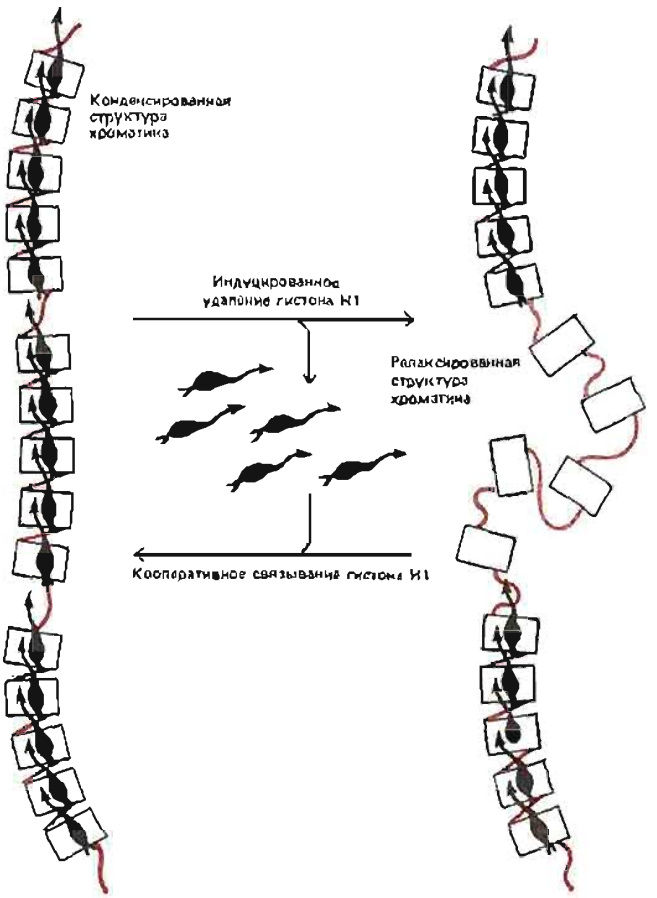
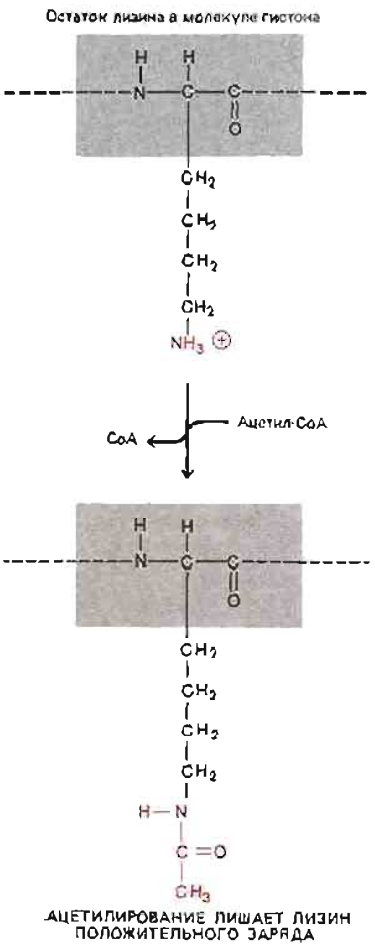


Рис. 8-7. Общая схема, объясняющая, почему любой белок, связывание которого с ДНК или белками хроматина носит кооперативный характер, имеет тенденцию образовывать большие кластеры, присоединяясь к данному участку хроматиновой нити по принципу «все или ничего».

Рис. 8-8. Отдельные участки хроматина должны вести себя как структурные единицы вследствие кооперативного характера упаковки нуклеосом с помощью гистона H1. Приведенная схема показывает момент внезапной деконденсации такой единицы, вызванной неким внешним регуляторным сигналом. Деконденсация хроматина подобного типа, по-видимому, лежит в основе процессов активации генов (см. рис. 8-93).





Некоторые ковалентные модификации гистонов легко обратимы. Например, ацетильные группы постоянно присоединяются к остаткам лизина с помощью фермента *гистонацетилазы*, а затем удаляются из них другим ферментом – *гистондеацетилазой*. В результате средняя продолжительность пребывания в молекуле гистона каждой ацетильной группы составляет около 10 мин. Это означает, что клетки в ответ на соответствующие сигналы могут быстро изменять картину ацетилирования нуклеосом (т. 3, разд. 13.4.7). Считается, что *ацетилирование гистонов* усиливается в тех участках хроматина, в которых находятся активные гены.

Еще одним примером обратимой модификации гистонов в клетке служит ковалентное связывание примерно 1/10 всех молекул гистона H2A с высококонсервативным белком, называемым *убиквитином* (его полипептидная цепь состоит из 74 аминокислотных остатков) (рис. 8-11). Предполагают, что такой модифицированный гистон (uH2A) свойствен интерфазному хроматину активных генов, а во время митоза при конденсации хромосом этот комплекс временно исчезает.

Между тем известны и необратимые модификации нуклеосомных гистонов. Так, многие клетки синтезируют обычно один или несколько минорных

Рис. 8-9. Обратимое ацетилирование остатков лизина в молекулах гистонов лишает их положительного заряда. Как уже было показано для гистона H1 (рис. 8-2), остатки лизина, подвергающиеся такой модификации, расположены в пределах первых 30 аминоконцевых остатков каждого из четырех нуклеосомных гистонов.

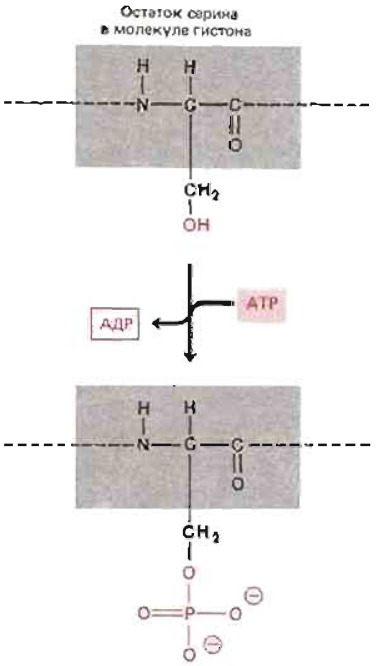


Рис. 8-10. Обратимое фосфорилирование остатков серина в молекулах гистонов сообщает им отрицательный заряд. Нуклеосомы, содержащие фосфорилированные или ацетилированные гистоны, отличаются от остальных.

«вариантных» гистонов, которые слегка отличаются по аминокислотной последовательности от своих основных аналогов. Биологическое значение вариантных гистонов неизвестно.

Гетерогенность гистона H1. Хотя на каждую нуклеосому приходится всего по одной молекуле гистона H1, не все эти молекулы идентичны. В некоторых клетках обнаружено по крайней мере пять подтипов молекул H1, которые могут специфически фосфорилироваться по определенным аминокислотным остаткам. Вполне вероятно, что ассоциация с нуклеосомами молекул гистона H1 разных подтипов служит одной из причин функциональной гетерогенности хроматина.

Гетерогенность, обусловленная связыванием мажорных негистоновых белков с отдельными нуклеосомами. Большинство негистоновых белков хроматина присутствует в клетке в очень небольших количествах. Например, некоторых известных *регуляторных белков* насчитывается лишь около 10 000 молекул на клетку, т.е. одна молекула такого белка приходится на 3000 нуклеосом. Выделение подобных белков в количествах, достаточных для их изучения,–очень непростая задача. Поэтому в настоящий момент исследованы главным образом богато представленные классы негистоновых белков, насчитывающие свыше 1 млн. молекул на клетку (приблизительно 1 молекула белка на 10 нуклеосом). Довольно трудно представить себе, чтобы белки, присутствующие в клетке в таких больших количествах, узнавали только специфические последовательности ДНК. Скорее всего в них отражены более общие закономерности структурной организации хроматина, связанные, например, с процессами транскрипции генов.

Мажорные (т.е. количественно преобладающие) негистоновые белки включают группу высокоподвижных белков – так называемые HMG-белки, характеризующиеся относительно малыми размерами и большим электрическим зарядом (что и обусловливает их высокую электрофоретическую подвижность). Особый интерес представляют два близкородственных белка, обозначаемых *HMG-14* и *HMG-17*, которые обнаруживаются во всех клетках млекопитающих. Подобно ацетилированным нуклеосомным гистонам, ассоциированным с убикитином, эти белки «предпочитают» нуклеосомы, содержащие активные гены; две молекулы любого из этих HMG-белков непосредственно присоединяются к нуклеосомной кор-частице.

8.1.6. Двойная спираль ДНК усеяна белками, узнающими специфические последовательности нуклеотидов [7]

К числу минорных негистоновых белков относятся и те, которые узнают специфические последовательности ДНК и связываются с соответствующими

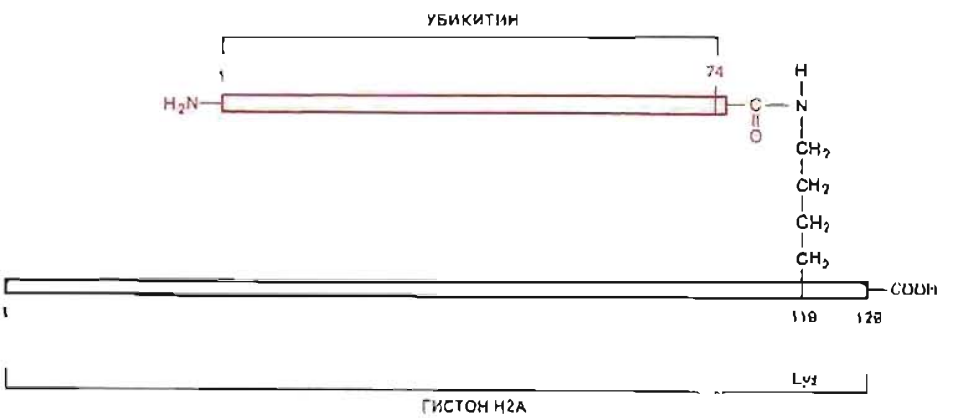


Рис. 8-11. Некоторые молекулы гистона H2A в составе нуклеосом ковалентно модифицируются путем присоединения боковой цепи остатка лизина к С-концу молекулы другого белка – убикитина. Нуклеосомы, содержащие этот так называемый uH2A-гистон, отличаются от остальных.

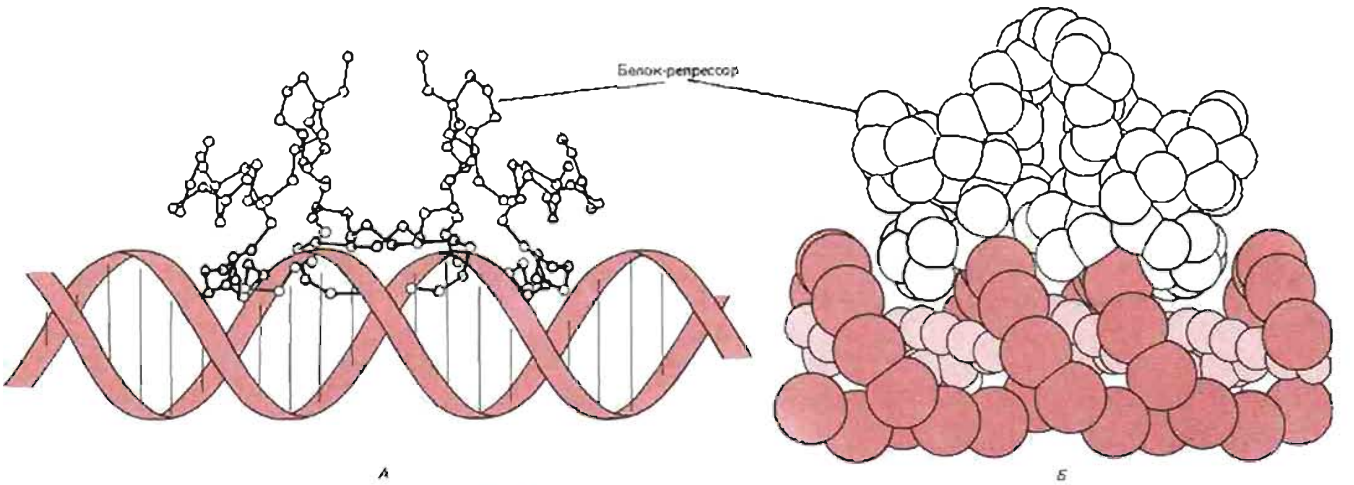


Рис. 8-12. Структура присоединенного к ДНК белка-регулятора генной активности. Изображенная белковая молекула – димер сго-белка бактериофага λ. Трехмерная конформация этого белка была определена методом рентгеноструктурного анализа; участок связывания с ДНК локализован путем анализа молекулярных моделей. *А.* Проволочная модель молекулы белка, совмещенная со схематическим изображением двойной спирали ДНК. *Б.* Пространственная модель ДНК-белкового комплекса, показанного на *А*. На этой модели каждая аминокислота в белковой цепи изображена в виде сферы; цветные шары представляют остов ДНК. (С любезного разрешения Brian W. Matthews, по Anderson W. F., Ohlendorf D. H., Takeda Y., Nature, 290, 754–758, 1981.)



Рис. 8-13. Связывание Т-антигена вируса SV-40 со специфическим участком вирусной ДНК. *А.* Узнаваемая последовательность ДНК длиной 36 нуклеотидов повторяется три раза в том участке, где начинается репликация вирусной ДНК и синтез вирусной РНК; кластер повторяющихся последовательностей связывает три тетрамерные молекулы Т-антигена. *Б.* Электронная микрофотография трех молекул Т-антигена, связанных с очищенной ДНК вируса SV-40. Кольцевая вирусная ДНК была разрезана с помощью рестриктирующей эндонуклеазы для получения небольшого фрагмента линейной ДНК, показанного на фотографии. Каждая белковая сфера – тетрамер с мол. массой 400 000. (С любезного разрешения Richard Myers, Robert Tjian, Robley Williams.)



Рис. 8-14. Схематическое изображение участка двойной спирали ДНК с прикрепленными к ней через определенные интервалы различными ДНК-связывающими белками, способными узнавать специфические последовательности нуклеотидов.

участками хромосомы. Некоторые из этих белков влияют на эффективность считывания ДНК в процессе транскрипции.

Впервые такой способ регуляции был выявлен в опытах с бактериями: специфический *белковый репрессор*, связываясь с ДНК, полностью ингибировал синтез РНК в области целого кластера генов, отвечающих за метаболизм лактозы, и отделялся от молекулы ДНК лишь тогда, когда возникала реальная потребность в белковых продуктах заблокированных генов (разд. 8.4.4). Этот регуляторный белок узнает определенную последовательность ДНК длиной 21 пара оснований. Были детально изучены еще несколько бактериальных белков, контролирующих активность генов путем специфического связывания с ДНК. Подобно белку-репрессору лактозных генов, они узнают определенные короткие последовательности в составе двойной спирали ДНК и присоединяются к ним, не нарушая комплементарного спаривания оснований (рис. 8-12).

Не так давно два белка-регулятора генной активности были выделены из эукариотических клеток. Оказалось, что один из них, получивший название *Т-антиген*, кодируется геномом обезьяньего вируса SV-40. Этот крупный белок связывается с последовательностью вирусной ДНК длиной 36 пар оснований, которая трижды повторяется в области начала репликации вирусного генома и синтеза вирусной РНК (рис. 8-13). Как и в случае репрессора лактозных генов, Т-антиген при связывании с ДНК также блокирует транскрипцию – на этот раз вирусных генов (разд. 8.4.4); в то же время это связывание имеет существенное значение для начала репликации вирусной ДНК в соседнем участке генома.

Другой хорошо известный ДНК-связывающий эукариотический белок – это так называемый *фактор транскрипции генов 5S-РНК*, который необходим для инициации синтеза малой рибосомной РНК – 5S-РНК. Этот белок в виде олигомера присоединяется к участку ДНК длиной 35 пар оснований, расположенному почти в середине гена 5S-РНК (см. рис. 8-34).

Надо полагать, что все перечисленные белки – это лишь отдельные представители сотен или тысяч других еще не открытых ДНК-связывающих белков, которые специфически узнают определенные нуклеотидные последовательности ДНК и участвуют в регуляции транскрипционной активности генов. В многоклеточном организме подобные регуляторные белки могут обеспечивать тканеспецифический характер белкового синтеза (разд. 8.4.8). Наряду с регуляцией транскрипции эти ДНК-связывающие белки, безусловно, вовлечены и в другие генетические процессы, такие, как инициация синтеза ДНК или формирование дискретных функциональных доменов в длинной полинуклеотидной цепи ДНК (к этим вопросам мы вернемся позже). Участок ДНК, освобожденный от гистонов, можно условно изобразить в виде схемы, представленной на рис. 8-14: специфические ДНК-связывающие белки прикреплены к двойной спирали ДНК через короткие интервалы, что дает им возможность контролировать функциональную активность определенных участков. Однако об этих белках у эукариот в настоящее время известно лишь очень немного.

8.1.7. Белки могут узнавать специфические последовательности ДНК благодаря тому, что они образуют водородные связи с определенными азотистыми основаниями и «чувствуют» геометрическую форму данного участка двойной спирали

Как же ДНК-связывающие белки узнают специфические последовательности нуклеотидов? Хотя двойная спираль в принципе может существовать в нескольких различных конформациях, наиболее стабильной является так называемая *В-форма*, структура которой показана на рис. 8-15, *А*. При закручивании двухцепочечной ДНК в двойную спираль В-типа на поверхности молекулы между двумя комплементарными цепями образуется *малая* (узкая)

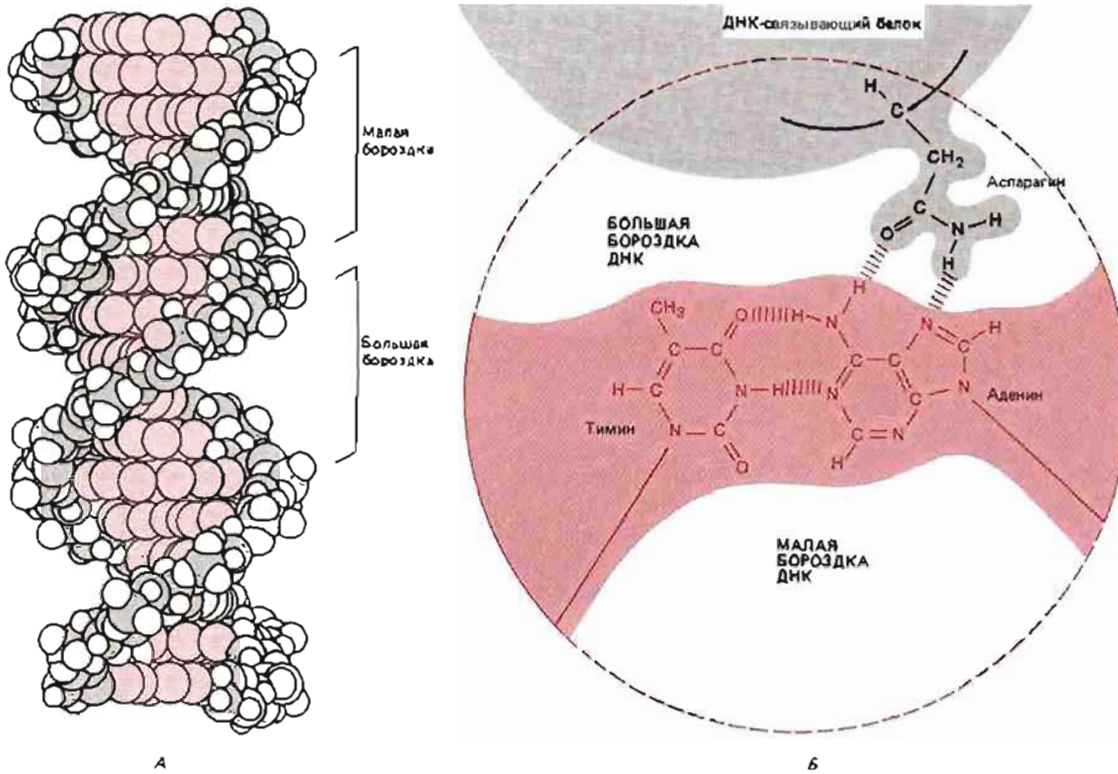


Рис. 8-15. Узнавание ДНК-связывающими белками определенных пар оснований в составе молекулы ДНК. *А*. Двойная спираль ДНК (B-форма); цветом выделены большая и малая бороздки. «Края» каждой пары оснований выступают в эти бороздки, что дает возможность ДНК-связывающим белкам опознавать различные последовательности нуклеотидов, образуя с ними водородные связи. Предполагаемое взаимодействие аминокислоты и А—Т-пары в большой бороздке схематически изображено на *Б* (вид вдоль оси спирали). B-форма ДНК имеет правозакрученную спираль.

бороздка, тогда как собственно витки оказываются разделенными *большой* (более широкой) бороздкой. Каждое азотистое основание в такой полинуклеотидной цепи «доступно» как со стороны малой, так и со стороны большой бороздки (рис. 8-15, *Б*), вследствие чего все четыре возможные комплементарные пары (A-T, T-A, C-G, G-C) могут однозначно распознаваться благодаря различиям в расположении атомных групп. Предполагается, что узнавание белком нуклеиновой кислоты осуществляется благодаря образованию максимального числа водородных связей между боковыми аминокислотными радикалами данного ДНК-связывающего белка и расположенными в определенной последовательности азотистыми основаниями. Пример такого взаимодействия показан на рис. 8-15, *Б*.

Однако это не единственно возможный способ распознавания специфических нуклеотидных последовательностей ДНК. Исследования низкомолекулярных синтетических ДНК с помощью дифракции рентгеновских лучей показали, что геометрия двойной спирали может варьировать в зависимости от нуклеотидной последовательности комплементарных цепей. Хотя чаще всего встречается B-форма ДНК, изображенная на рис. 8-15, *А*, отдельные участки полинуклеотидной цепи образуют спираль, известную как *A-форма* ДНК, которая по своим конформационным параметрам несколько отличается от B-

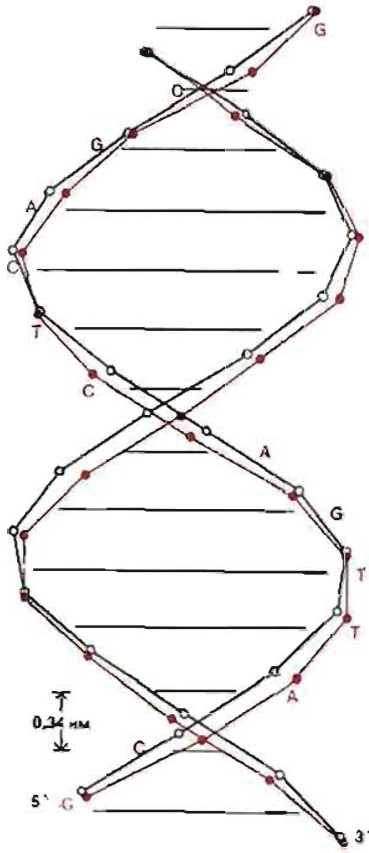


Рис. 8-16. Проекция фосфодиэфирного остова спирали ДНК в B-форме показывает, как конформация двойной спирали изменяется в зависимости от изменений угла поворота между соседними комплементарными парами оснований. Цветная линия изображает реальную «траекторию» фосфатов в последовательности 5'-GCATTGACTCAGCG-3'. Для сравнения показана траектория фосфатов в идеальной стереорегулярной B-спирали (черная линия). Углы поворота для различных комбинаций соседних пар оснований (различных динуклеотидов в составе полинуклеотидной цепи) в среднем составляют примерно 34°, однако для разных соседей они варьируются от 28 до 40°. (С любезного разрешения Edward Trifonow, по Kabsch W., Sander C., Trifonov E., Nucleic Acids Res., 10, 1097–1104, 1982.)

формы (см. т. 1, рис. 3-7). Более того, последовательности ДНК, состоящие из чередующихся пуринов и пиримидинов, например GCGCGCGC..., могут формировать принципиально иную, левозакрученную двойную спираль – так называемую *Z-форму* ДНК. В хромосоме общее число подобных участков, характеризующихся необычной конформацией двойной спирали ДНК, относительно невелико, однако весьма вероятно, что они служат сигнальными структурами для специфических регуляторных белков и, таким образом, играют важную роль в функционировании генетического аппарата клетки.

В B-форме ДНК наклон плоскости азотистых оснований, равно как и угол поворота спирали в каждой комплементарной паре оснований, зависит от того, какие именно нуклеотиды соседствуют в данном участке полинуклеотидной цепи. Небольшие колебания этих параметров вызывают смещение атомных группировок относительно расчетных позиций (в случае идеальной спирали) приблизительно на 0,1 нм (рис. 8-16). Предполагается, что все ДНК-связывающие белки, узнающие специфические нуклеотидные последовательности, способны «чувствовать» эти минорные сдвиги.

8.1.8. Гистоны ограничивают доступность ДНК для других ДНК-связывающих белков и тем самым участвуют в регуляции активности генов [8]

Вся ДНК, входящая в состав нуклеосом, может свободно контактировать с малыми молекулами, однако ее доступность для более крупных молекул заметно ограничена в участках, где она соприкасается с нуклеосомным кором. Иными словами, нуклеосомный кор препятствует взаимодействию ДНК и специфических регуляторных белков. В ряде случаев присоединение регуляторного белка происходит только тогда, когда его участок связывания в молекуле ДНК полностью свободен от нуклеосом. Другие регуляторные ДНК-связывающие белки в этом отношении менее требовательны; по-видимому, это свидетельствует о том, что их участки узнавания локализованы в относительно доступных линкерных областях между нуклеосомными частицами.

В связи с тем что нуклеосомные частицы в составе хроматина препятствуют свободному контакту ДНК с регуляторными белками и вследствие этого влияют на экспрессию генов и на некоторые другие генетические процессы, определенные области хроматина непременно должны обнаруживать неслучайный характер расположения нуклеосом. В частности, те участки ДНК, которые должны активно взаимодействовать с регуляторными белками, по-видимому, оказываются относительно более доступными для этих белков, чем другие последовательности нуклеотидов. Поскольку распределение нуклеосомных частиц вдоль цепи ДНК носит более или менее регулярный характер, положение каждой из них в какой-то степени определяет локализацию соседних частиц. Поэтому общая картина расположения нуклеосом, по всей видимости, характерна для каждой области хроматина и формируется таким образом, что функционально активные нуклеотидные последовательности находятся либо в местах, свободных от нуклеосом, либо в участках линкерной ДНК. Такое специфическое в отношении нуклеотидной последовательности ДНК распределение нуклеосом называют *фазированием*, а сами расположенные подобным образом нуклеосомы – *фазированными* (рис. 8-17).

Как мы увидим в дальнейшем, по крайней мере в некоторых случаях нуклеосомы действительно расположены на ДНК неслучайным образом и довольно часто можно наблюдать как характерное фазирование нуклеосом, так и нуклеосомные «бреши», т.е. участки свободной ДНК.



Рис. 8-17. Схема, иллюстрирующая различия между фазированными и случайно расположенными нуклеосомами. *А.* Фазирование нуклеосом в какой-либо области хроматина означает, что одни и те же специфические последовательности ДНК доступны для опознавания белками во всех клетках этого типа. *Б.* В другой области хроматина характер распределения нуклеосом варьирует.

8.1.9. Нуклеосомные частицы расположены на хромосомной ДНК неслучайным образом [9]

Области ДНК, свободные от нуклеосом, обнаруживаются при обработке клеточных ядер следовыми количествами фермента дезоксирибонуклеазы (ДНК-азы I), которая в низких концентрациях гидролизует свободную ДНК, но не действует на участки линкерной ДНК, ассоциированной с нуклеосомами. Подвергнутый такой обработке хроматин расщепляется преимущественно в коротких участках, связывающих между собой нуклеотидные последовательности длиной в несколько тысяч пар оснований. Наличие таких *гиперчувствительных к ДНК-азе I областей* хроматина свидетельствует о том, что 30нм-хроматиновые фибриллы на самом деле напоминают скорее цепочку хроматиновых глыбок, чем непрерывную структуру типа каната (рис. 8-18).

Указания на то, что участки, обладающие гиперчувствительностью к ДНК-азе I, могут играть важную роль в регуляции генной активности, были получены в экспериментах с вирусом SV-40, ДНК которого организована в содержащий нуклеосомы хроматин. В хроматине SV-40 обнаруживается единственный свободный от нуклеосом участок ДНК длиной 300 пар оснований, который легко гидролизуется ДНК-азой I. Этот участок локализуется в непосредственной близости от точек, где начинаются репликация и транскрипция вирусной ДНК (см. рис. 8-13). Аналогичным образом многие области клеточного хроматина, проявляющие гиперчувствительность к ДНК-азе I, располагаются на 5'-концевых участках активных генов, находящихся в пределах примерно 200 нуклеотидов от точки инициации транскрипции. По-видимому, в этих участках ДНК отсутствуют нуклеосомы, что позволяет присоединяться к ним различным регуляторным молекулам и (или) молекулам РНК-полимеразы, которые необходимы для инициации синтеза новых цепей РНК. Подтверждением данной точки зрения можно считать обнаружение подобного гиперчувствительного к ДНК-азе I участка у 5'-конца инсулинового гена в хроматине клеток, продуцирующих этот белок; в хроматине исследованных клеток других типов, в которых инсулин не синтезируется, этот специфический участок отсутствует. Каким образом в хроматине формируются области повышенной чувствительности к нуклеазе, остается пока неизвестным.

Неясно также, какую роль играет фазирование нуклеосом, которое можно наблюдать в экспериментах по обработке ядер микрококковой нуклеазой или более высокими дозами ДНК-азы I, расщепляющими преимущественно линкерную ДНК между соседними нуклеосомами. Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что нуклеосомы располагаются в ДНК специфическим образом по отношению к определенным нуклеотидным последовательностям, по крайней мере в некоторых участках хроматина. До сих пор неясно, как обеспечивается подобная специфичность и в чем заключается ее функциональное значение. Заманчивым кажется предположение о том, что в клетках различных типов нуклеосомы, расположенные в одном и том же гене, находятся в разных фазах, и это в конечном итоге определяет, будет экспрессироваться данный ген или нет.

8.1.10. Каждая хромосома содержит, вероятно, только одну очень длинную молекулу ДНК, имеющую петельную организацию [10, 11]

Каждая эукариотическая хромосома, по-видимому, содержит лишь одну-единственную молекулу ДНК. Если это предположение справедливо для всех 23 хромосом гаплоидного генома человека, соответствующие им молекулы ДНК в среднем должны содержать по $(3 \cdot 10^9) : 23 = 1{,}3 \cdot 10^8$ нуклеотидов; длина такой молекулы в растянутом состоянии составляет приблизительно 5 см. Возникает серьезная проблема, связанная с упаковкой этой ДНК в клеточном ядре, которое обычно не превышает в диаметре 5 мкм ($5 \cdot 10^{-4}$ см). Поскольку

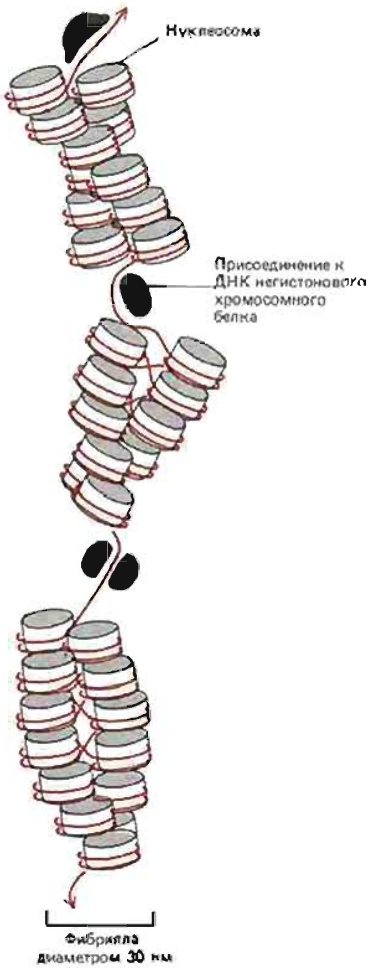


Рис. 8-18 Схематическое изображение участка хроматиновой фибриллы. Показаны нарушения регулярной нуклеосомной структуры, которые могут возникать вследствие присоединения к ДНК специфических негистоновых белков. Образующиеся при этом короткие сегменты свободной от нуклеосом ДНК обладают необычайно высокой чувствительностью к ДНК-азе I.

ку упаковка ДНК в хроматиновой фибрилле позволяет уменьшить ее линейные размеры с 5 см лишь до 1 мм, должны существовать другие, более высокие уровни компактизации ДНК. Один из принципов дальнейшей конденсации хроматина в клетке был подсказан внешним видом некоторых особых хромосом – так называемых *хромосом типа ламповых щеток*, характерных для ооцитов, а также *политенных хромосом* насекомых. Как мы увидим несколько позже, хромосомы этих двух типов обладают хорошо выраженной **петельной структурой**. В 1972 г. было показано, что хромосома бактерии *E. coli* (кольцевая молекула ДНК длиной около 1 мм, лишенная гистонов) также уложена в виде петель. Существующие в настоящее время данные позволяют считать петельную укладку ДНК в составе хромосом общим принципом структурной организации хроматина.

Была выдвинута гипотеза, предполагающая, что наблюдаемые гигантские петли хроматина формируются и поддерживаются с помощью ДНК-связывающих белков, которые узнают специфические нуклеотидные последовательности двух отдаленных друг от друга участков хроматиновой фибриллы и сближают их. В результате эти участки образуют устье петли (рис. 8-19). По косвенным оценкам у таких таксономически отдаленных организмов, как дрозофила и человек, средняя длина петель весьма сходна: хотя размеры петель могут варьировать довольно сильно, обычная длина собранной в петлю ДНК составляет от 20 000 до 80 000 пар оснований. Иначе говоря, типичная хромосома человека может содержать $(1{,}3 \cdot 10^8) : (5 \cdot 10^4) = 2600$ петель, каждая из которых образована участком хроматиновой фибриллы со средней длиной около 400 нм (0,4 мкм) (рис. 8-20).

Собранная в петли хромосомная ДНК человека будет иметь в длину уже около 100 мкм; однако для того, чтобы ДНК могла уместиться внутри клеточного ядра, она должна свернуться в еще более плотную структуру.

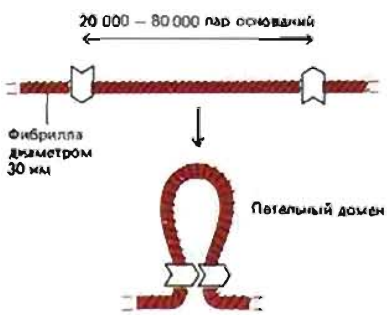


Рис. 8-19. Образование петельного домена на одном из участков 30нм-хроматиновой фибриллы.

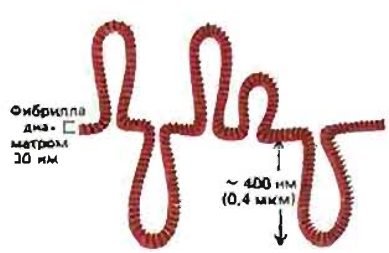


Рис. 8-20. Схематическое изображение участка хромосомы, имеющего петельную организацию. Каждая из петель содержит приблизительно от 20 000 до 80 000 пар оснований двуспиральной ДНК, входящей в состав 30нм-хроматиновой фибриллы.

8.1.11. Полосы в митотических хромосомах указывают на существование еще более высоких уровней структурной организации хроматина [11, 12]

Хромосомы типа ламповых щеток и политенные хромосомы являются интерфазными хромосомами, которые можно наблюдать лишь благодаря особенностям их строения, речь о которых будет впереди. В большинстве же своем хромосомы во время интерфазы слишком растянуты и тонки, чтобы можно было рассмотреть их устройство, а потому доступны для структурных исследований только в митозе, когда они спирализуются, конденсируются и приобретают четкие формы (рис. 8-21). Эта суперспирилизация, уменьшающая линейные размеры ДНК в конечном итоге с 5 см до 5 мкм, сопровождается фосфорилированием в клетке всех молекул гистона H1 по пяти различным остаткам серина. Поскольку гистон H1 связывает между собой нуклеосомные частицы (см. рис. 8-6), его фосфорилирование может играть ключевую роль в конденсации хромосом в процессе митоза (т. 3, разд. 11.4.4).

На рис. 8-22 изображена типичная митотическая хромосома на стадии метафазы. Две сестринские молекулы ДНК уложены и упакованы отдельно друг от друга в виде двух *хроматид*, которые соединены между собой с помощью специального образования – *центромеры* – и вместе образуют двухчленную структуру. Подобные митотические хромосомы обычно несут на своей поверхности множество других молекул, в том числе большое количество рибонуклеопротеинов (разд. 8.2.16). Если удалить эту оболочку, на электронных микрофотографиях можно отчетливо увидеть, что каждая хроматида построена из хроматиновых петель, отходящих от центральной оси (рис. 8-21 и 8-23). Эти микрофотографии служат убедительным свидетельством в пользу той точки зрения, что все хромосомы имеют петельную организацию. Детальная картина укладки ДНК в составе хроматид пока не совсем ясна, однако на рис. 8-24 мы привели одну из гипотетических схем, иллюстрирующих сложный и многоэтапный процесс компактизации ДНК; хроматида здесь изображена в виде плотно уложенных хроматиновых петель, свернутых в тугую спираль.

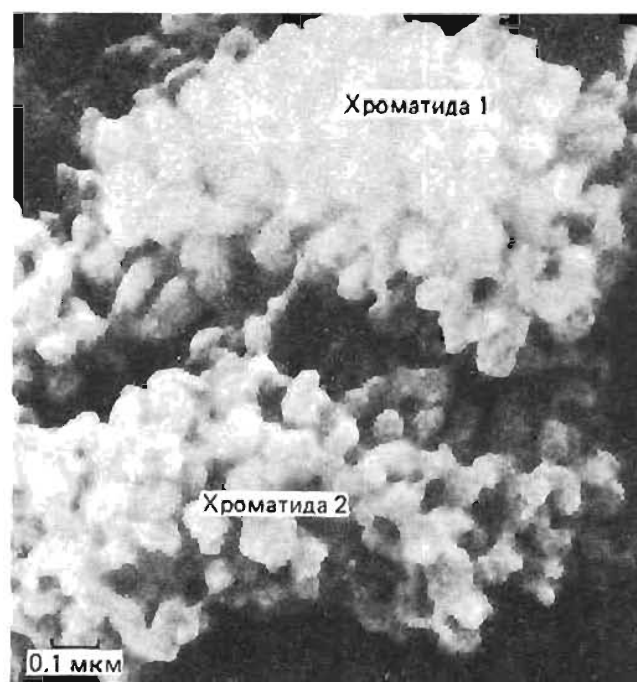


Рис. 8-21. Микрофотография участка типичной высококонденсированной хромосомы, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Такую структуру хромосомы приобретают во время митоза. Прежде чем начнется митоз, каждая хромосома удваивается, вследствие чего образуются две идентичные спаренные хроматиды (Marsden M. P., Laemmli U. K., Cell, 17, 849–858, 1979.)



Рис. 8-22. Схематическое изображение типичной метафазной хромосомы. Каждая хроматида содержит одну из двух идентичных дочерних молекул ДНК (одна из них выделена цветом), образующихся в процессе репликации на более ранней стадии клеточного цикла.

Геном человека состоит из 23 пар хромосом (включая одну пару половых хромосом), т.е. всего в диплоидной клетке содержится 46 хромосом, причем каждая из них в митозе имеет характерную форму. Весь набор конденсированных митотических хромосом носит название **кариотип**. Цитологические методы, разработанные в начале 1970-х годов, позволяют безошибочно идентифицировать каждую хромосому в кариотипе человека. Некоторые из этих методов включают окрашивание митотических хромосом с помощью специальных красителей, способных флуоресцировать только при связывании с определенными типами последовательностей ДНК. Несмотря на то что эти красители обладают очень низкой избирательностью (их использование позволяет в основном отличать участки ДНК, обогащенные АТ-парами, от участков с GC-богатыми последовательностями), обработка ими митотических хромосом выявляет в каждой из них характерную картину чередования темных и светлых полос (сегментов) (рис. 8-25). Распределение этих полос специфично для каждого типа хромосом, что делает возможной их однозначную идентификацию (рис. 8-26).

При анализе хромосом человека, проведенном с помощью флуоресцентных красителей на ранних стадиях митоза (когда хромосомы значительно менее компактны, чем в метафазе), удалось подсчитать, что весь гаплоидный набор содержит по меньшей мере 2000 четко выраженных полос, соответствующих АТ-богатым последовательностям ДНК.

В ходе митоза происходит дальнейшая конденсация хромосом и, как следствие, утолщение полос и уменьшение их числа (рис. 8-26).

Что собой представляют эти полосы, для нас загадка. Даже наиболее тонкие из тех, что изображены на рис. 8-26, содержат не менее 30 гигантских петель; суммарный нуклеотидный состав столь длинных последовательностей ДНК (более 1 млн. нуклеотидов, что соответствует размеру среднего бактериального генома), по-видимому, близок к среднестатистическому. Подозревают,

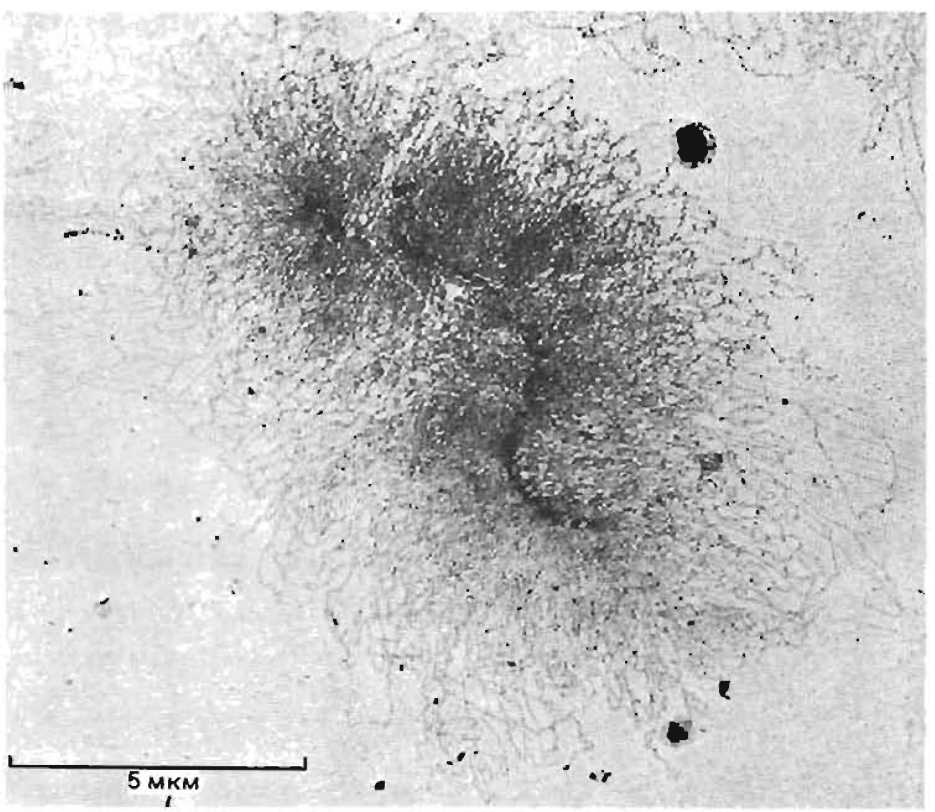


Рис. 8-23. Электронная микрофотография одиночной хроматиды митотической хромосомы насекомого (*Oncopeltus*). Специальная обработка позволяет визуализировать петли хроматина, отходящие от центральной оси хроматиды. (С любезного разрешения Victoria Foe.)

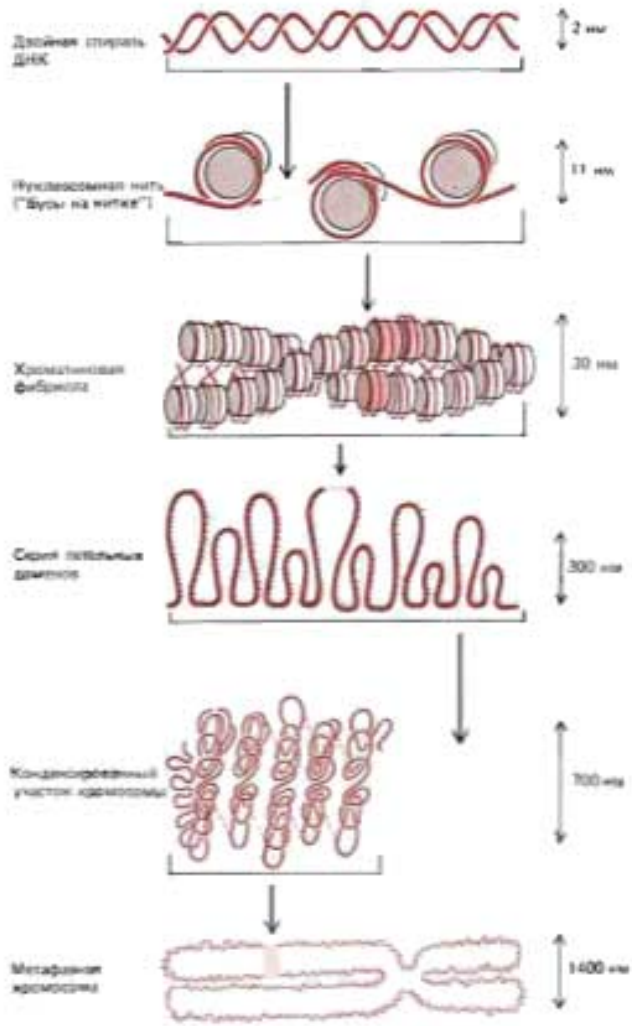
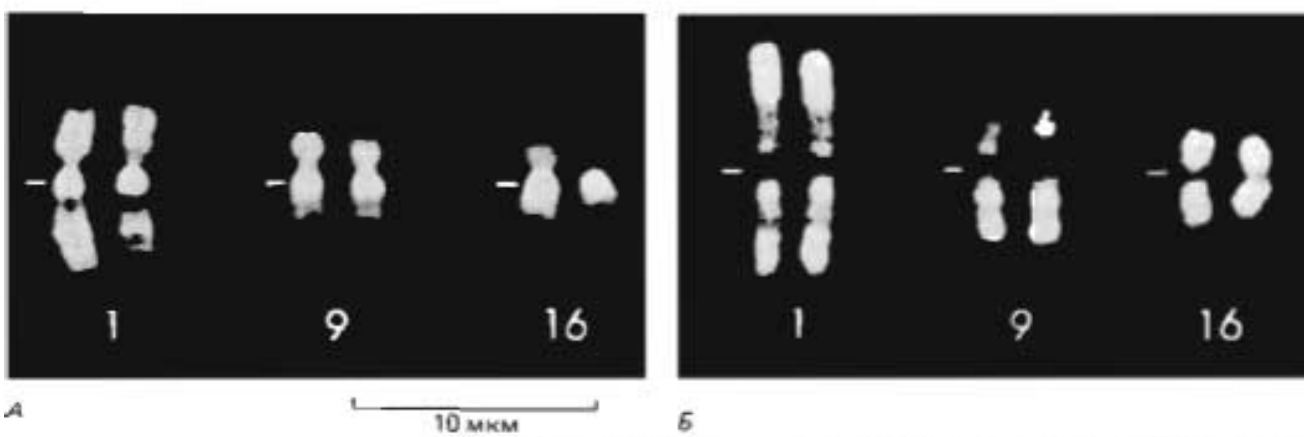


Рис. 8-24. Схема, иллюстрирующая различные уровни упаковки хроматина, которые, как предполагают, являются последовательными этапами формирования высококонденсированной метафазной хромосомы.

Рис. 8-25. Микрофотографии трех пар митотических хромосом человека, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа. *А*. Окрашивание хромосом A—T-специфическим красителем Hoescht 33258. *Б*. Окрашивание хромосом G—C-специфическим красителем оливомицином. Черта указывает положение центромеры. Обратите внимание на то, что картины распределения сегментов (полос) в хромосомах на обеих фотографиях комплементарны: полосы, ярко окрашенные на *А*, на *Б* затемнены и наоборот.



А *Б*

10 мкм

что с существованием таких структурных блоков связано функционирование эукариотического генома. Например, кластерирование соседних хроматиновых петель, имеющих сходное строение, могло бы привести, с одной стороны, к формированию полос на митотической хромосоме (рис. 8-27), а с другой – к созданию функциональной единицы в интерфазном хроматине (т. 3, разд. 11.3.5).

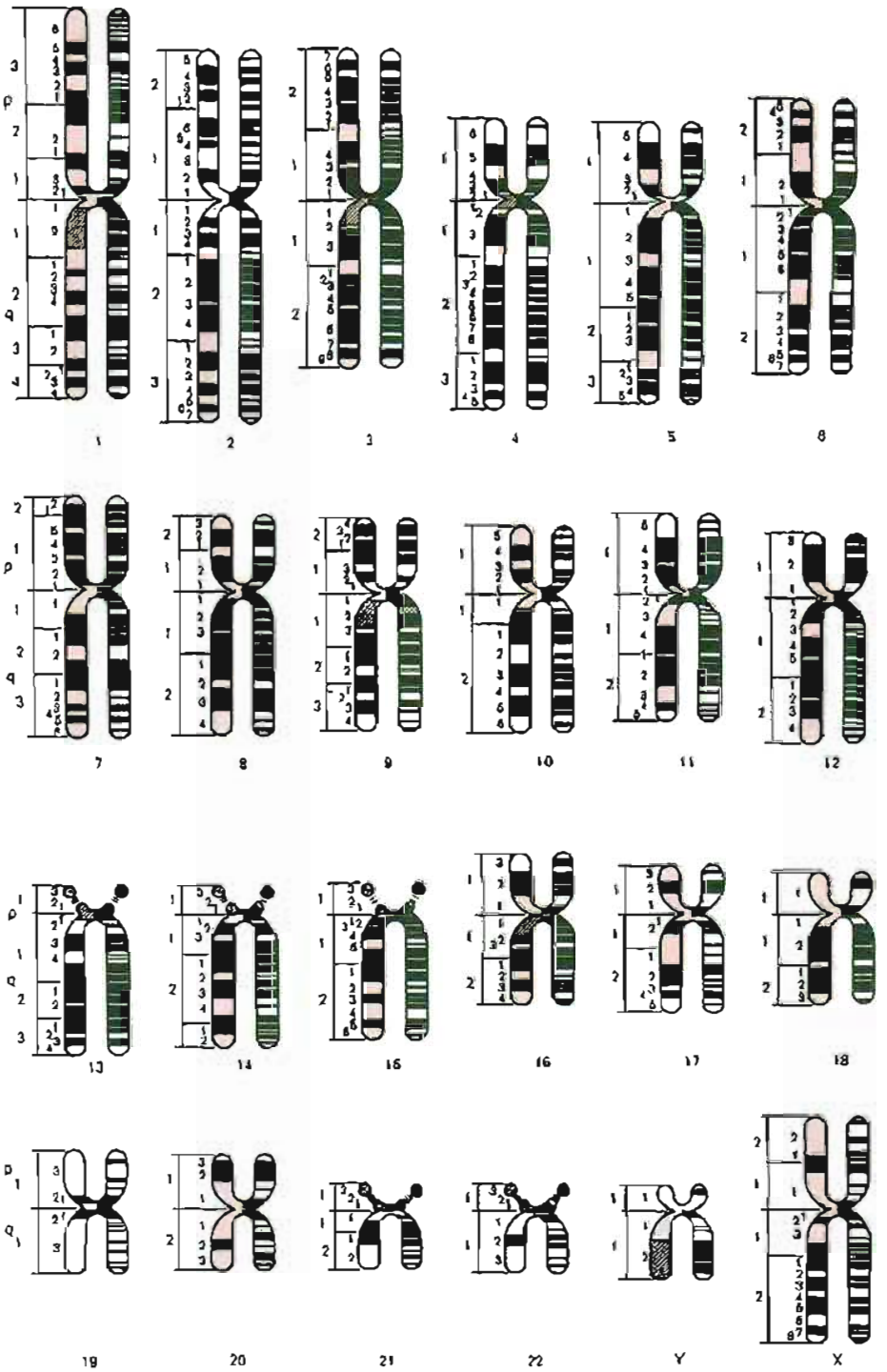


Рис. 8-26. Стандартная карта распределения сегментов в каждой из хромосом, составляющих человеческий кариотип, на стадии метафазы (эти хромосомы выделены цветом) и на стадии ранней профазы (черно-белые хромосомы) митоза. Хромосомы, наблюдаемые на стадии ранней профазы, гораздо длиннее и тоньше, чем метафазные хромосомы, поэтому в них можно различить намного больше сегментов. Все видимые на рисунке сегменты выявляются путем окрашивания препаратов красителем, связывающимся преимущественно с А—Т-богатыми последовательностями ДНК. Заметим, что на рисунке представлено только по одной хромосоме из каждой гомологичной пары, реально присутствующей в митозе. (Yunis J.J., Science, 191, 1268–1270, 1976.)

Наличие множественных полос составляет общую черту митотических хромосом даже таких далеких друг от друга видов, как человек и дрозофила. Более того, картина распределения полос в хромосомах почти не изменилась за долгие периоды эволюции. Например, почти каждая хромосома человека имеет своего аналога в кариотипе шимпанзе, гориллы и орангутана (хотя в результате слияния одной пары хромосом у человека имеется 46, а не 48

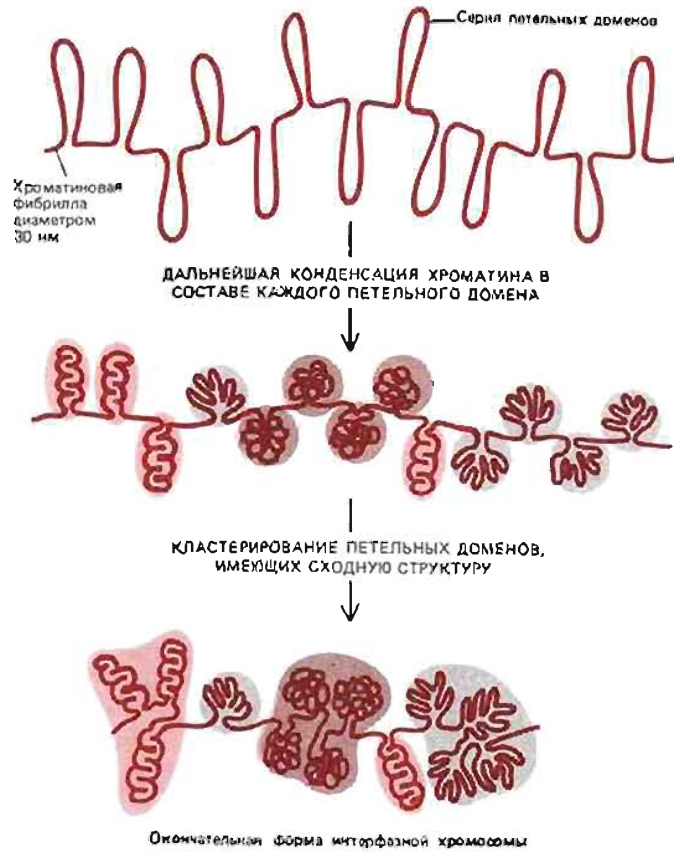


Рис. 8-27. Схема, показывающая, каким образом кластерирование соседних петельных доменов хроматина, имеющих сходную трехмерную конформацию, может быть причиной возникновения полос, наблюдаемых в митотических хромосомах. Как указывалось, эти полосы, по всей видимости, представляют собой отдельные структурные единицы еще в интерфазе, хотя ясно различимыми они становятся лишь на начальных стадиях митоза, когда хромосомы начинают конденсироваться.

хромосом, как у обезьян), причем картина распределения полос у них практически одинакова. Все это лишний раз указывает на большое значение пространственной организации ДНК в составе хромосом для экспрессии соответствующих генов, а само существование полос, возможно, отражает какие-то черты функциональной организации хроматина.

8.1.12. В политенных хромосомах можно увидеть интерфазные гены [13]

Сами по себе полосы на митотических хромосомах дают в основном лишь пищу для размышлений, но не позволяют сделать каких-либо конкретных выводов об организации или функционировании индивидуальных генов. Это объясняется тем, что даже в самой тонкой полосе, которую еще можно различить, находится от 10 до 100 генов. Чтобы уловить изменения в структуре хроматина на уровне индивидуальных генов, необходимо изучать растянутые интерфазные хромосомы. В обычных клетках это невозможно, потому что нити интерфазного хроматина слишком тонки и запутаны. Между тем в некоторых клетках насекомых благодаря явлению *политении* на интерфазных хромосомах отчетливо видны многочисленные поперечные полосы, частота чередования которых позволяет предположить, что они соответствуют индивидуальным генам. **Политенные хромосомы** характерны для некоторых секреторных клеток личинок насекомых. Эти клетки вырастают до необычайно большого размера, претерпевая несколько циклов репликации ДНК, которые не сопровождаются клеточным делением. В результате они содержат в несколько тысяч раз больше ДНК, чем обычная клетка. Такие гигантские клетки называются *полиплоидными* в том случае, если число хромосом у них превышает норму, и *политенными*, если гомологичные хромосомные пары не

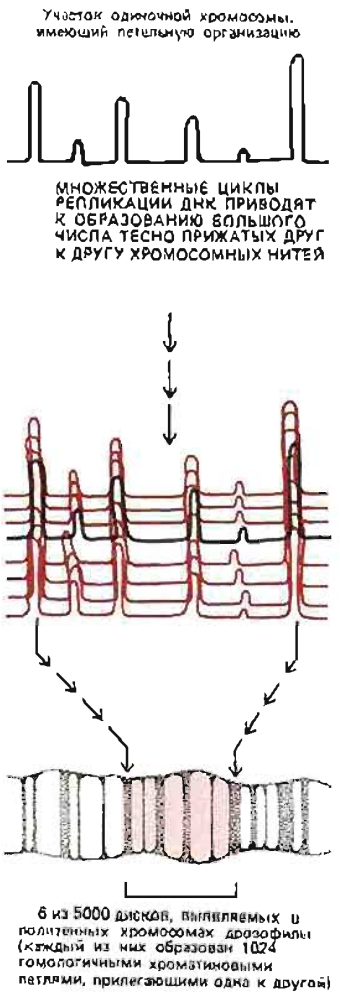


Рис. 8-28. Схема, показывающая, каким образом плотно прилегающие один к другому гомологичные петельные домены могут стать причиной появления дисков в политенных хромосомах. В составе каждого диска петли хроматиновых фибрилл находятся друг с другом в очень тесном контакте, формируя гораздо более конденсированную структуру, чем показанная на этом рисунке.

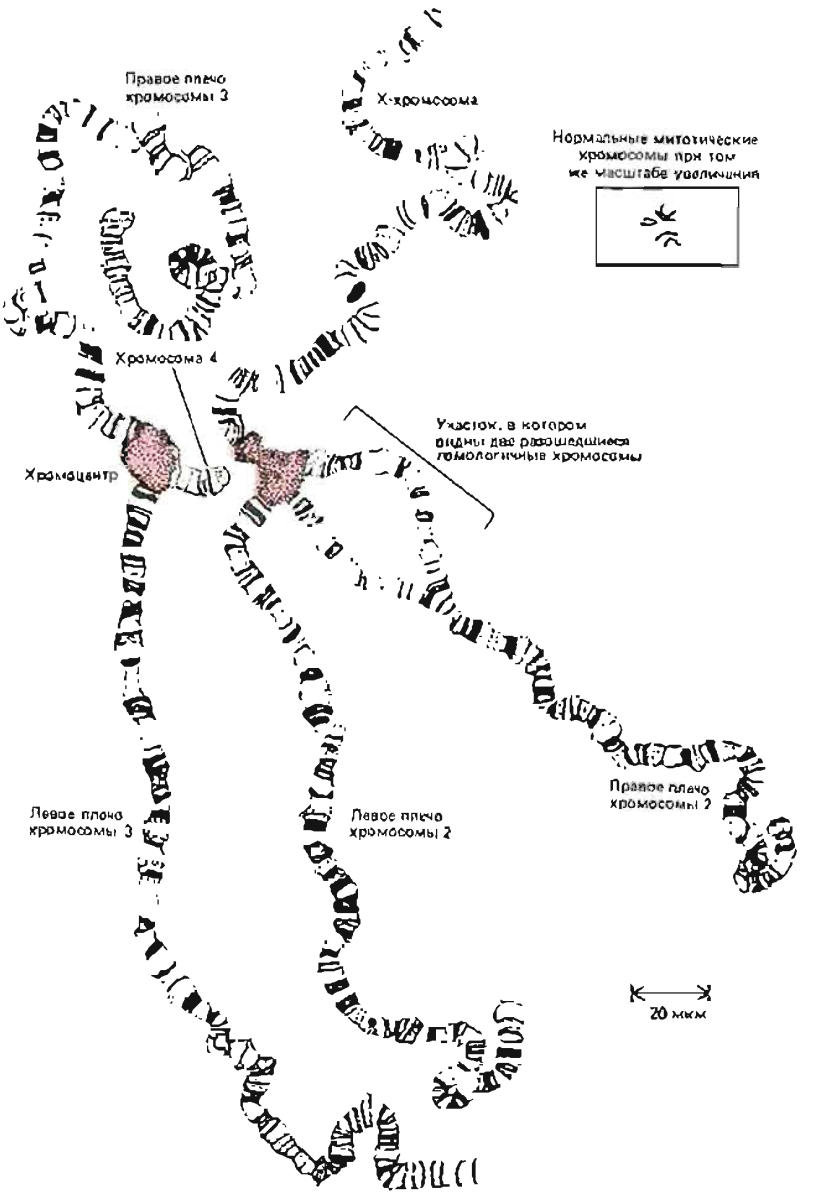


Рис. 8-29. Полный набор политенных хромосом из клетки слюнной железы дрозофилы. Эти хромосомы были расправлены и подготовлены для наблюдения путем «раздавливания» препарата на предметном стекле. Обратите внимание на то, что на рисунке представлены четыре пары хромосом. Каждая хромосома тесно спарена со своим гомологом, а сами хромосомные пары связаны друг с другом своими центромерными зонами, образующими один большой «хромоцентр». На данном препарате хромоцентр разделился на две части в процессе приготовления хромосом для микроскопии. (Painter T. S., J. Hered., 25, 465–476, 1934.)

отделяются друг от друга, а формируют единые огромные хромосомы. Тот факт, что отдельные гигантские клетки насекомых могут из политенных превращаться в полиплоидные, свидетельствуют о том, что эти два хромосомных статуса тесно связаны между собой и что структура политенных хромосом в принципе аналогична структуре нормальных хромосом.

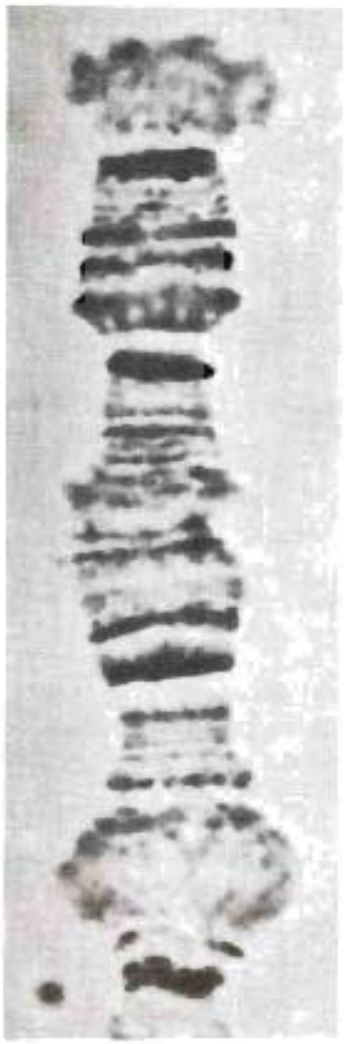


Рис. 8-30. Микрофотография участка политенной хромосомы из клетки слюнной железы дрозофилы, полученная с помощью светового микроскопа. Видна характерная картина распределения дисков. Эти диски обнаруживаются в интерфазных хромосомах и являются отличительной чертой гигантских политенных хромосом; их не следует отождествлять с гораздо более «грубыми» полосами, показанными на рис. 8-26, которые обнаруживаются в нормальных митотических хромосомах с помощью специальных красителей. (С любезного разрешения Joseph G. Gall.)

Благодаря своей большой величине, а также тому, что плотная и строго упорядоченная упаковка индивидуальных хроматиновых нитей в составе политенной хромосомы препятствует их запутыванию, эти хромосомы очень хорошо видны в световой микроскоп. Более того, в интерфазных политенных хромосомах индивидуальные хроматиновые петли располагаются в линейном порядке, тогда как в обычных хромосомах они свернуты в спираль. Явление политении наиболее глубоко было изучено на четырех хромосомах клеток слюнных желез личинки плодовой мухи *Drosophila*. В этих клетках ДНК реплицируется 10 раз подряд и дочерние хромосомы не разделяются, в результате чего образуются гигантские хромосомы, содержащие 1024 (2^{10}) тесно прилегающие друг к другу индивидуальные хроматиновые нити.

При наблюдении окрашенных политенных хромосом в световой микроскоп хорошо заметны перемежающиеся поперечные полосы: темные (*диски*) и светлые (*междисковые участки*). Предполагается, что каждый диск содержит 1024 плотно уложенные одна к другой гомологичные копии индивидуального петельного домена (рис. 8-28). Во всем геноме дрозофилы насчитывают около 5000 дисков, каждый из которых в зависимости от размера включает от 3000 до 300 000 нуклеотидных пар в расчете на гаплоидную хромосому. Поскольку каждый диск можно идентифицировать по его толщине и расположению в хромосоме (рис. 8-29 и 8-30), все они могут быть пронумерованы, что позволяет составить карту политенной хромосомы. Структурная организация и функция относительно небольшого количества ДНК, содержащегося в междисковых участках, нам неизвестны.

8.1.13. Каждый петельный домен хроматина, возможно, соответствует отдельной функциональной единице [14]

Изучение мутантных мух, имеющих явные хромосомные аномалии, позволило локализовать в политенных хромосомах дрозофилы индивидуальные гены и показало, что каждый диск представляет собой самостоятельную генетическую единицу. На основе других генетических исследований было установлено, что клетки дрозофилы производят около 5000 белков, т. е. практически столько, сколько дисков насчитывается в геноме. Так, на участке хромосомы *Drosophila melanogaster*, заключенном между двумя хорошо изученными генами – *zeste* и *white*, можно различить 14 индивидуальных дисков. Удалось выделить и прокартировать сотни мутантов по этому локусу, однако все они, как выяснилось, представляют собой лишь 18 генетически независимых групп (так называемых групп комплементации). Иными словами, на этом участке локализуется 18 генов. Аналогично в другой области хромосомы, содержащей около 50 видимых дисков, обнаружено около 50 генов. С помощью этих методов невозможно определить, где именно локализуется данный ген – в самом диске или в междисковом участке, однако можно утверждать, что ген у дрозофилы хотя бы в первом приближении соответствует индивидуальному петельному домену хроматина. Это означает, что в среднем каждый петельный домен содержит последовательности ДНК, которые могут обеспечить кодирование только одной молекулы белка.

Предположение о том, что каждый диск в политенной хромосоме дрозофилы представляет собой самостоятельную функциональную единицу, подкрепляется тем фактом, что отдельные диски частично декомпактизуются с началом транскрипции содержащихся в них генов (разд. 8.4.14). Такие как бы вздувшиеся диски, называемые *пуфами*, появляются и исчезают в определенной последовательности, которая отражает специфическую последовательность активации генов на разных стадиях развития дрозофилы (см. рис. 8-97).

Между тем, если мы разделим весь геном дрозофилы на 5000 частей, то окажется, что в среднем на каждый ген приходится 20 000 пар оснований, тогда как для кодирования белка среднего размера, состоящего из 400 аминокислотных остатков, требуется последовательность ДНК длиной всего 1200 пар

оснований. Как мы скоро увидим, геном большинства эукариотических организмов содержит гораздо больше ДНК, чем это необходимо для кодирования всех важнейших белков. Некоторые последовательности этой «избыточной» ДНК могут кодировать какие-то минорные белки, другие же вообще не кодируют никаких белков. Ряд таких некодирующих последовательностей ДНК, вероятно, выполняет структурную функцию, участвуя в формировании хроматиновых петель.

По аналогии с политенными хромосомами дрозофилы можно предположить, что петельные домены хроматина служат функциональными единицами генома также и у высших эукариот, в том числе у человека. Вероятно, и здесь каждый домен содержит лишь один или в крайнем случае несколько генов.

8.1.14. Разные хроматиновые домены содержат, по-видимому, различные по структуре нуклеосомы [15]

Как в электронном, так и в обычном световом микроскопе каждый диск в политенной хромосоме имеет характерную морфологию (рис. 8-30 и 8-31). Это свидетельствует о том, что разные диски (соответствующие разным петельным доменам хроматина) обладают несколько различной структурной организацией. Сходные выводы можно сделать и на основании экспериментов по окрашиванию политенных хромосом дрозофилы с помощью флуоресцирующих антител: антигистоновые антитела одинаково окрашивают все диски, тогда как антитела к некоторым негистоновым белкам проявляют в этом отношении определенную избирательность (рис. 8-32).

Наличие структурных различий между дисками было продемонстрировано также в опытах по обработке изолированных политенных хромосом растворами с высокими концентрациями неорганических ионов, вызывающими деконденсацию хроматина. Оказалось, что одни диски обладают повышенной чувствительностью к высоким концентрациям ионов K^+, а другие – к высоким концентрациям ионов Mg^{2+} и т. д.

Маловероятно, чтобы подобные различия были присущи только хроматиновым доменам насекомых, однако лишь насекомые имеют политенные хромосомы, которые можно изучать с помощью светового микроскопа. Структурные различия между участками хроматина, соответствующими разным генам у млекопитающих, можно выявить (хотя и с гораздо меньшей степенью разрешения) по их неодинаковой чувствительности к действию неко-

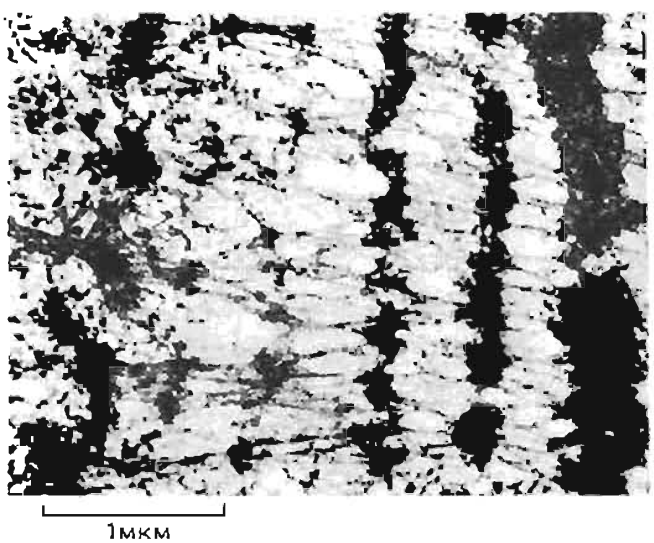


Рис. 8-31. Электронная микрофотография небольшого участка политенной хромосомы дрозофилы. На тонком срезе видно, что разные хромосомные диски отличаются друг от друга. Это может указывать на различный характер упаковки хроматина в каждом из дисков. (С любезного разрешения Viekko Sorsa.)

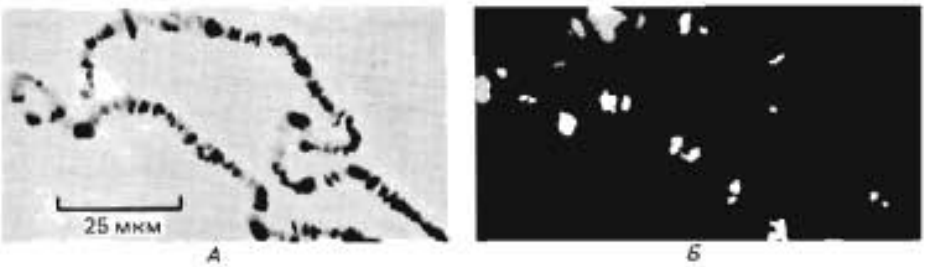


Рис. 8-32. Та же самая область политенной хромосомы, наблюдаемая в фазово-контрастный микроскоп (*А*) и с помощью флуоресцирующих моноклональных антител, специфичных к определенному негистоновому хромосомному белку (*Б*). Обратите внимание, что присутствие этого белка обнаруживается не во всех дисках. Предполагают, что он свойствен лишь потенциально активным областям хроматина. (Howard G. C., Ahmayr S. M., Shinefeld L. A., Sato V. L., Elgin S. C. R., J. Cell Biol., 88, 219–225, 1981.)

торых нуклеаз (разд. 8.4.12). Как мы убедимся в дальнейшем, особенности структурной организации генов млекопитающих отражают характер их экспрессии в клетке.

8.1.15. Бóльшая часть хромосомной ДНК не кодирует белки [16]

Существует целый ряд обстоятельств, указывающих на то, что бóльшая часть геномной ДНК высших организмов не кодирует белки. Еще задолго до того, как технология рекомбинантных ДНК дала в руки исследователей инструмент, с помощью которого можно непосредственно изучать первичную структуру хромосомной ДНК, обращали на себя внимание некоторые парадоксальные факты. Например, относительное количество ДНК в гаплоидном геноме различных организмов не связано с их положением на эволюционной лестнице. Так, клетки человека содержат в 800 раз больше ДНК, чем бактерия *Escherichia coli*, но в то же время количество ДНК в клетках некоторых амфибий и растительных организмов в 30 раз превышает эту величину (рис. 8-33). Этот парадокс можно было бы объяснить тем, что в некоторых организмах каждый индивидуальный ген представлен многими копиями; однако опыты по ренатурации ДНК (т. 1, разд. 4.5.5), проведенные для большого числа организмов, показывают, что последовательности ДНК, составляющие гаплоидный геном, в основном уникальны, т. е. представлены в единственном числе. Отсутствие корреляции между размером генома и эволюционной сложностью организма иллюстрирует также тот факт, что у некоторых близкородственных видов содержание ДНК в клетках очень сильно

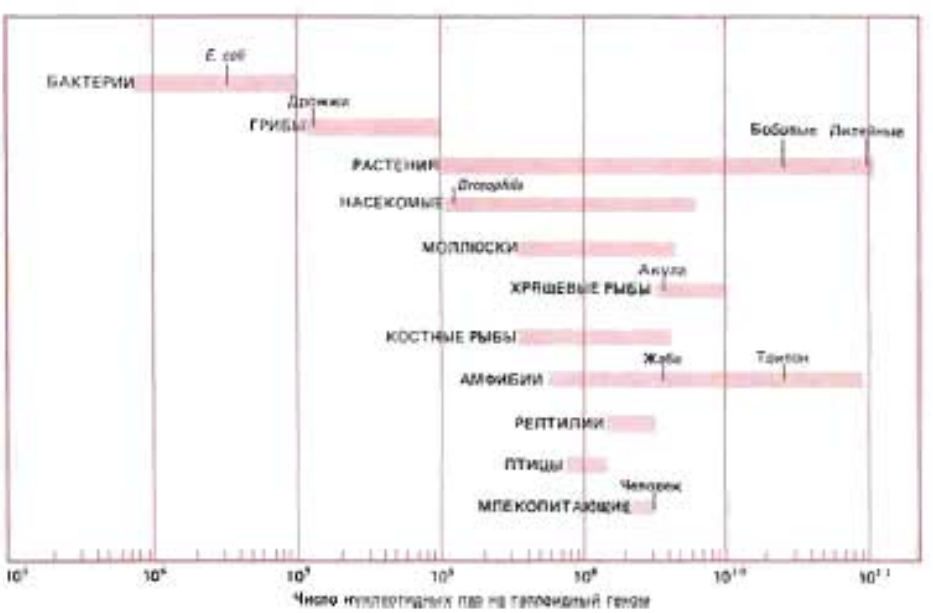


Рис. 8-33. Суммарное количество ДНК в гаплоидном геноме самой маленькой прокариотической клетки – микоплазмы и крупных клеток некоторых растений и амфибий различается более чем в 100 000 раз. Обратите внимание, что геном человека ($3 \cdot 10^9$ нуклеотидных пар) заметно уступает в размере геномам некоторых других организмов.

варьирует. Наиболее впечатляющий пример представляют собой амфибии, у которых в зависимости от вида количество геномной ДНК может различаться в 100 раз.

Биологи, изучающие генетику популяций, оценили количество ДНК у высших организмов, в которой закодирована информация о структуре всех важнейших белков и о регуляции их синтеза. Их рассуждения в общих чертах были следующими. Возникновение мутаций – случайный процесс, в результате которого те или иные нуклеотиды в последовательности ДНК изменяются хотя и медленно, но все-таки с измеримой скоростью. Поскольку в большинстве своем возникающие мутации оказываются для организма вредными, если они затрагивают жизненно важные последовательности ДНК, существует какое-то предельное число таких последовательностей (условно, генов), которое еще может обеспечить необходимую эволюционную стабильность генома. Исходя из наблюдаемой частоты мутаций, было подсчитано, что у млекопитающих не более 1% их генома приходится на долю ДНК, кодирующей существенно важные белки и принимающей участие в регуляции их синтеза.

На основании приведенных рассуждений можно сделать весьма важный вывод. Хотя геном млекопитающих в принципе имеет достаточную величину ($3 \cdot 10^9$ нуклеотидов), чтобы кодировать почти 3 млн. белков средних размеров, ни один организм не способен иметь более чем 30 000 реально кодирующих индивидуальных последовательностей. С этой точки зрения человек устроен лишь в 6 раз сложнее, чем плодовая муха дрозофила, имеющая около 5000 генов.

Для чего же нужна остальная ДНК, составляющая основную массу генома высших организмов? Мы уже упоминали о том, что по крайней мере часть ее, возможно, просто выполняет структурную роль, участвуя в организации хроматина. В последующих разделах данной главы мы подробно обсудим современные взгляды на природу и функцию некодирующей ДНК. Однако, каким бы ни был ответ на поставленный вопрос, данные, приведенные на рис. 8-33, с очевидностью указывают на то, что избыток ДНК не является для эукариотических клеток большим неудобством. Это в свою очередь свидетельствует о том, что, по всей видимости, существует довольно слабое давление отбора, направленное на уменьшение общего количества ДНК в клетке за счет сохранения лишь жизненно важных последовательностей.

Заключение

Геном млекопитающих содержит около $3 \cdot 10^9$ нуклеотидов, но лишь очень небольшая часть всей этой ДНК кодирует белки. Хотя функции остальной, некодирующей ДНК неизвестны, не исключено, что некоторые ее последовательности принимают участие в формировании у эукариот высших уровней организации хроматина. В первом приближении хромосому можно рассматривать как одну необычайно длинную молекулу ДНК, имеющую петельную структуру. Каждая петля, содержащая десятки тысяч пар оснований, представляет собой самостоятельный структурный домен и соответствует одному или в крайнем случае нескольким генам.

Практически вся ДНК эукариот прочно связана с равными ей по массе гистонами в форме цепочки дисковидных дезоксирибонуклеопротеиновых частиц, называемых нуклеосомами. Нуклеосомы разделены короткими участками свободной ДНК, которые могут служить местами связывания регуляторных белков. Некоторые из этих белков определяют конкретную локализацию нуклеосом в молекуле ДНК и обеспечивают их фазирование, так что специфические функционально значимые последовательности ДНК располагаются между нуклеосомными частицами и поэтому более доступны для регуляторных молекул.

В норме нуклеосомная цепочка компактизуется с образованием различных специфических структур, в формировании которых принимают участие многие вспомогательные белки. Комплекс ДНК со всеми ассоциированными с ней

белками называется хроматином. Разные участки генома обладают несколько различной структурной организацией. Не исключено, что по крайней мере некоторые из этих различий имеют функциональное значение с точки зрения экспрессии генов.

8.2. Синтез и процессинг РНК [17]

Синтез РНК впервые появился у прокариот, у которых транскрипционный аппарат устроен проще, чем у эукариот. В прокариотической клетке этот процесс катализируется одним-единственным ферментом – **РНК-полимеразой**. Специфическая последовательность ДНК (*промотор*) определяет, где должен начаться синтез РНК. Молекула полимеразы присоединяется к промотору и затем начинает двигаться вдоль ДНК-матрицы, удлиняя растущую цепь РНК в направлении 5′ → 3′ путем постепенного присоединения к ней по одному нуклеотиду (см. рис. 5-2). По достижении другого специфического участка ДНК – *сигнала терминации* – полимераза отделяется от матрицы и освобождает новосинтезированную молекулу РНК. Таким образом, каждая молекула РНК в клетке представляет собой однопепочную копию сравнительно небольшого участка нуклеотидной последовательности одной из цепей ДНК.

Хотя транскрипция эукариотической ДНК в принципе не отличается от таковой у прокариот, РНК-синтезирующий аппарат эукариотической клетки устроен значительно сложнее. Во-первых, он включает три различные РНК-полимеразы, каждая из которых считывает определенный тип генов и имеет гораздо более сложное строение, чем бактериальный фермент: в состав эукариотических РНК-полимераз входит от 9 до 11 полипептидных цепей, тогда как РНК-полимераза бактерий состоит из 5 полипептидных цепей. Во-вторых, в отличие от бактериального фермента, способного успешно осуществлять свои функции in vitro, для чего необходимо лишь добавить в среду очищенную ДНК, эукариотические ферменты не так-то просто заставить работать в пробирке. Отчасти по этой причине до 1979 г. не удавалось создать подходящую систему для изучения транскрипции у эукариот in vitro.

8.2.1. Синтез РНК у эукариот осуществляют три различные РНК-полимеразы [18]

Только одна из трех эукариотических РНК-полимераз, а именно *РНК-полимераза II*, транскрибирует гены, которые затем будут транслированы в белки. Две другие полимеразы катализируют образование различных типов РНК, которые составляют часть белок-синтезирующего аппарата: *РНК-полимераза I* синтезирует высокомолекулярную рибосомную РНК, а *РНК-полимераза III* – разнообразные низкомолекулярные стабильные РНК, в том числе тРНК и рибосомную 5S-РНК.

РНК-полимеразы эукариот обладают различной чувствительностью к α-аманитину – высокотоксичному веществу, получаемому из бледной поганки. Так, РНК-полимераза I не реагирует на присутствие этого токсина, РНК-полимераза II очень чувствительна к нему, а РНК-полимераза III занимает промежуточное положение. Все три фермента, как и их бактериальный аналог, имеют молекулярную массу, приблизительно равную 500 000.

Вполне естественно, что эти три фермента узнают в последовательности ДНК различные сигнальные участки, в частности последовательности, инициирующие синтез РНК. Как полимераза I, так и полимераза II узнают последовательности ДНК, которые предшествуют точке начала транскрипции (если смотреть на цепь ДНК в направлении считывания). Например, участок узнавания РНК-полимеразы II включает две короткие последовательности ДНК, одна из которых начинается за 50 нуклеотидов до точки инициации транскрипции, а другая – за 25. Весьма похожая организация участков узнавания свойственна и бактериальному ферменту (см. рис. 5-4). В отличие от этих

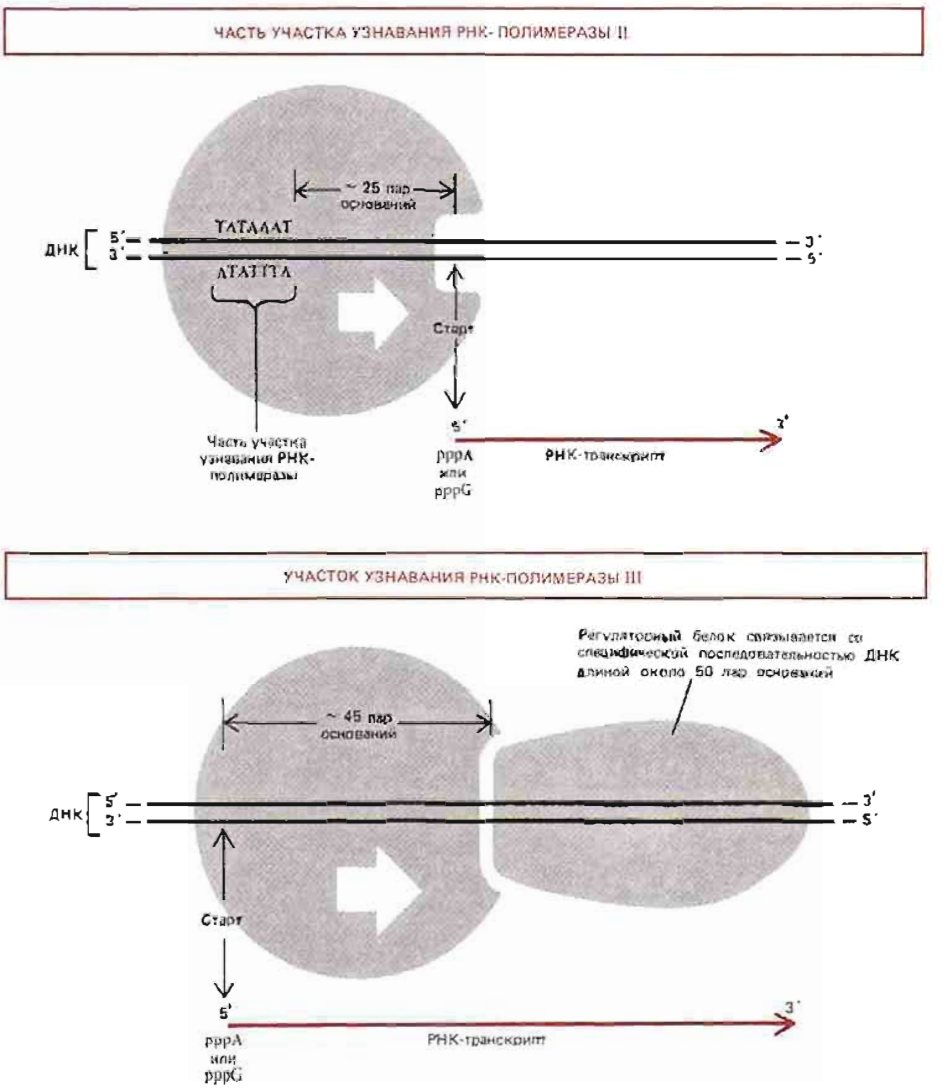


Рис. 8-34. Различные типы стартовых участков, опознаваемых эукариотическими РНК-полимеразами II и III. Подобно бактериальной РНК-полимеразе и РНК-полимеразе I эукариот, РНК-полимераза II, по всей видимости, узнает специфические последовательности ДНК, которые предшествуют (относительно направления транскрипции) точке начала синтеза РНК. При этом некоторые из таких последовательностей могут располагаться за 150 нуклеотидов до точки инициации цепи РНК (здесь показана лишь небольшая часть промоторной последовательности РНК-полимеразы II). Наоборот, отличительная черта РНК-полимеразы III заключается в ее взаимодействии с регуляторным белком (например, с фактором активации транскрипции 5S-РНК), который связывается с последовательностью ДНК, расположенной после точки начала синтеза РНК.

двух ферментов РНК-полимераза III, по-видимому, узнает специфические регуляторные белки, такие, например, как фактор транскрипции генов 5S-РНК (разд. 8.1.6). Присоединение этого белка в олигомерной форме к участку ДНК в *середине* последовательности гена 5S-РНК необходимо и достаточно для того, чтобы РНК-полимераза III начала синтезировать РНК в точке, расположенной на 45 нуклеотидов ближе к началу гена (рис. 8-34). Изображенная на схеме ситуация предполагает, что в процессе синтеза 5S-РНК РНК-полимераза III рано или поздно натолкнется на регуляторный белковый олигомер; однако последний, по-видимому, не служит препятствием для нормального хода транскрипции.

Клетки высших эукариот содержат около 40 000 молекул РНК-полимеразы II, примерно такое же число молекул РНК-полимеразы I и около 20 000 молекул РНК-полимеразы III, причем точное количество этих ферментов варьирует в зависимости от скорости роста клетки. Многое еще остается неизвестным об этих эукариотических ферментах, которые с трудом можно заставить начать синтез РНК in vitro лишь в присутствии каких-то других малоизученных белковых факторов. Нам еще предстоит узнать, почему все эукариоты, даже столь далекие в эволюционном плане, как дрожжи и человек, имеют именно три различные РНК-полимеразы.

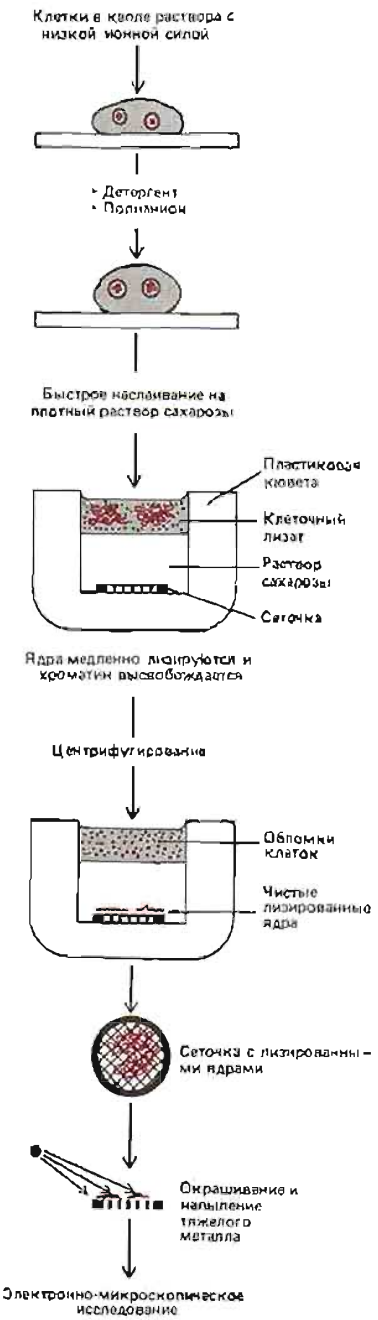


Рис. 8-35. Метод электронно-микроскопического исследования хроматина клеточного ядра, основанный на мягком лизисе последнего и дальнейшей очистке лизированного ядра от клеточных обломков.

Поскольку все молекулы-предшественники мРНК синтезируются РНК-полимеразой II, которая, таким образом, определяет, какие белки будут синтезироваться в клетке, мы сосредоточим свое внимание на биосинтезе и дальнейшей судьбе РНК-транскриптов, образованных именно этой РНК-полимеразой.

8.2.2. Некоторые последовательности ДНК транскрибируются РНК-полимеразой II гораздо чаще, чем другие [19, 20]

Эксперименты, проводимые с очищенными препаратами полимераз in vitro, безусловно, важны для изучения условий протекания транскрипционных процессов, однако они не могут дать целостной картины структуры и функциональной динамики транскрипционного аппарата живой клетки. Здесь может выручить электронная микроскопия хроматина, которая позволяет наблюдать РНК-полимеразу в действии.

Обычная электронная микроскопия тонких срезов выявляет лишь гранулированные глыбки хроматина, указывая на наличие развитой внутриядерной структуры (см. рис. 8-61), но дает очень мало информации о том, как именно транскрибируются гены. Гораздо более информативны в этом отношении снимки изолированного ядерного содержимого, непосредственно наносимого на электронно-микроскопическую сеточку после разрушения ядер (рис. 8-35). На достаточном удалении от центра разрушенного ядра концентрация хроматина относительно низка, что позволяет разглядеть индивидуальные хроматиновые фибриллы, имеющие характерный вид «бус на нитке» (рис. 8.3 и 8-36). Транскрипционно активные молекулы РНК-полимеразы выглядят как большие глобулярные частицы, за каждой из которых тянется длинная молекула новосинтезированной РНК (рис. 8-37). При этом молекулы РНК-полимеразы II, как правило, представлены одиночными частицами. Это свидетельствует о том, что большинство генов транскрибируется в предшественники мРНК относительно редко, так что одна РНК-полимераза успевает завершить транскрипцию до того момента, когда ее начнет следующая. Впрочем, в некоторых случаях можно увидеть множество РНК-полимеразных частиц (и РНК-транскриптов), собранных в одном месте. Подобные кластеры типичны лишь для относительно небольшого числа генов, транскрибирующихся с высокой частотой (рис. 8-38). Длина молекул РНК, одновременно синтезирующихся в такой «горячей точке», увеличивается в направлении движения молекул полимеразы, что придает всей структуре характерный вид «елочки». Каждый такой участок несет специфические сигналы начала и окончания транскрипции для РНК-полимеразы II и представляет собой **транскрипционную единицу** (рис. 8-39).

Всесторонние биохимические исследования подтвердили результаты, полученные с помощью электронной микроскопии, и позволили сформулировать три основных вывода.

1. Эукариотические РНК-полимеразы, как и прокариотические ферменты, начинают и оканчивают транскрипцию лишь в определенных точках хромосомы.
2. Средняя длина новообразованной молекулы РНК, синтезированной РНК-полимеразой II на транскрипционной единице, составляет около 8000 нуклеотидов, однако не редкость и молекулы РНК, насчитывающие от 10000 до 20000 нуклеотидов. Это намного превышает величину 1200 нуклеотидов, которая достаточна для синтеза средней белковой молекулы, содержащей 400 аминокислотных остатков; такая большая длина молекул РНК отражает особенности строения эукариотических генов, которые мы подробно обсудим в дальнейшем. Здесь, однако, следует заметить, что транскрипционная единица не обязательно является точным эквивалентом гена: некоторые РНК-транскрипты, возможно, вообще не имеют функций, а другие дают продукты более чем одного гена (разд. 8.2.9).
3. Различные инициирующие сигналы транскрипции, узнаваемые РНК-поли-



Рис. 8-36. Электронная микрофотография типичного препарата клеточного ядра, полученного с помощью метода, описанного на рис. 8-35. Видна невероятно сложная сеть из переплетенных нитей хроматина, высвободившегося из подвергнутого лизису ядра. Лишь на самом краю этой сети хроматин имеет достаточно низкую плотность, чтобы его можно было исследовать при большом увеличении. (С любезного разрешения Victoria Foe.)

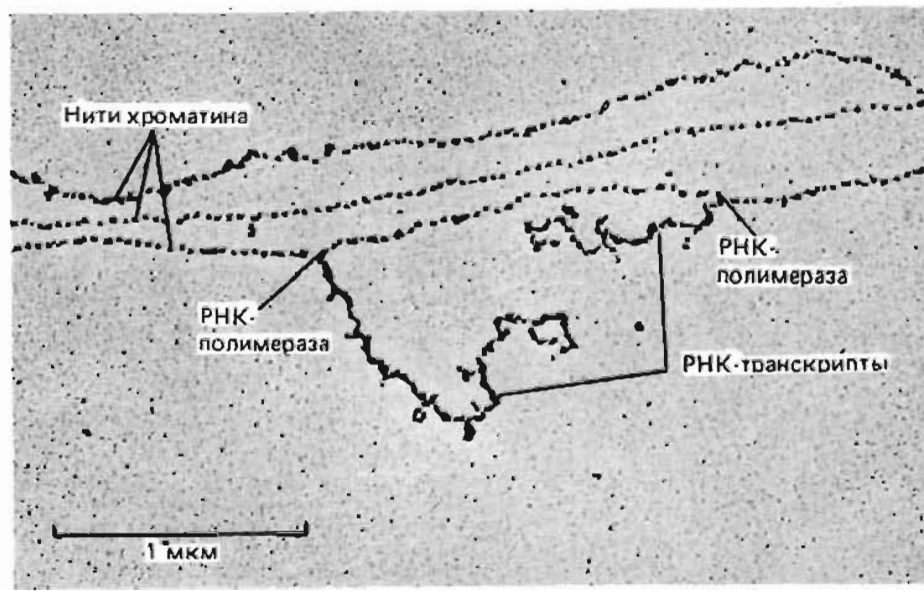


Рис. 8-37. Участок хроматина в форме нуклеосомной нити. Можно различить две молекулы РНК-полимеразы II, занятые транскрипцией ДНК. Бо́льшая часть хроматина в ядрах высших эукариот свободна от таких РНК-транскриптов: на клетку в среднем приходится около 40 000 молекул РНК-полимеразы II и, следовательно, одна молекула этого фермента примерно на 750 нуклеосом (150 000 пар оснований). (С любезного разрешения Victoria Foe.)

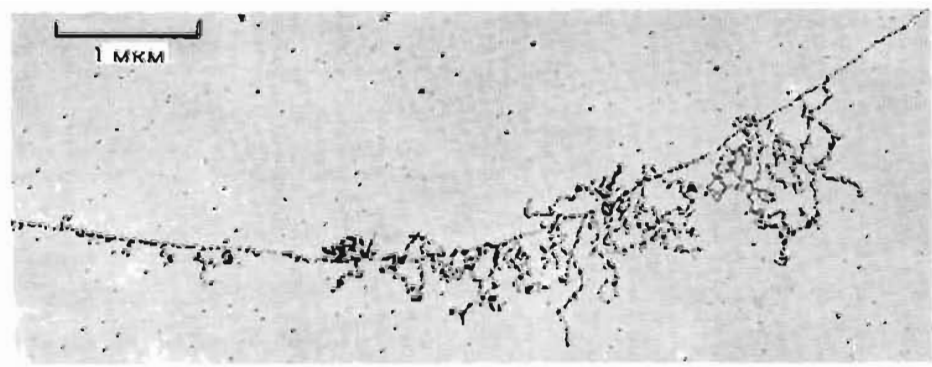


Рис. 8-38. Необычная область хроматина, в которой один из генов транскрибируется с высокой частотой, так что видно большое число молекул РНК-полимеразы II вместе с растущими цепями РНК-транскриптов. (Foe V. E., Wilkinson L. E., Laird C. D., Cell, 9, 131–146, 1976.)

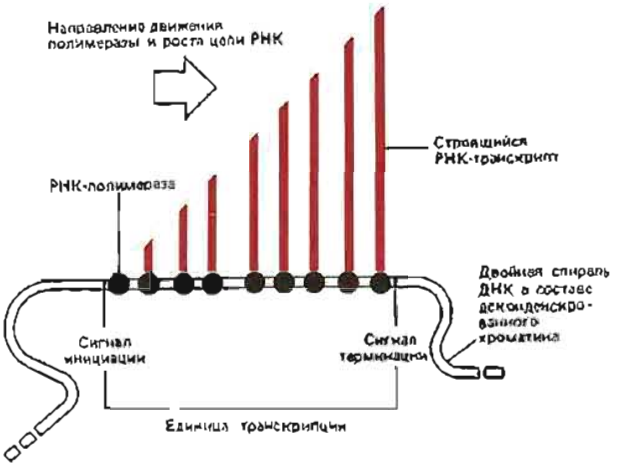


Рис. 8-39. Схематическое изображение идеальной транскрипционной единицы, показывающее, как на основе электронно-микроскопических данных можно определить направление синтеза цепи РНК.

меразой II, обладают неодинаковой эффективностью, и поэтому некоторые гены транскрибируются с гораздо большей частотой, чем все остальные. Картина транскрипции, наблюдаемая в электронный микроскоп, хорошо согласуется с данными биохимических исследований, которые показывают, что, хотя в клетке накапливается множество молекул мРНК различных типов, бо́льшая их часть представлена относительно малым числом копий (табл. 8-1).

Таблица 8-1. Популяция молекул мРНК в типичной клетке млекопитающих

Класс	Общее число копий каждой индивидуальной последовательности мРНК на клетку		Число индивидуальных последовательностей мРНК в каждом классе		Общее число молекул мРНК в каждом классе
Богатый	12000	×	4	=	48000
Средний	300	×	500	=	150000
Бедный	15	×	11000	=	165000

Подобное деление клеточной мРНК на три дискретных класса в известной степени искусственно: в ряде случаев наблюдается более плавное распределение различных молекул мРНК в соответствии с их содержанием в клетке. В сумме в каждой нормальной клетке насчитывается от 10000 до 20000 разных видов мРНК, большинство из которых представлено малым числом копий (от 5 до 15 молекул на одну клетку). Обычно от 95 до 97% общей цитоплазматической РНК составляет рРНК и лишь от 5 до 3% остается на долю мРНК (так что на одну молекулу мРНК приходится примерно 10 рибосом). Клетка данного типа содержит в сумме около 360000 молекул цитоплазматической мРНК.

8.2.3. В процессе транскрипции ДНК остается в составе нуклеосом [20]

Четыре нуклеосомных гистона (H2A, H2B, H3 и H4) образуют с ДНК столь прочный комплекс, что гистоновые октамеры (см. рис. 8-4) если и покидают связанные с ними участки ДНК, то крайне редко. Сейчас уже ясно, что нуклеосомная структура хроматина сохраняется даже во время транскрипции и репликации ДНК. Неудивительно поэтому, что на электронных микрофотографиях нуклеосомные частицы обычно выявляются как в транскрибируемых, так и в транскрипционно неактивных областях хроматина (см. рис. 8-37 и 8-38).

Тот факт, что матрицей для синтеза РНК у эукариот служит ДНК-гисто-

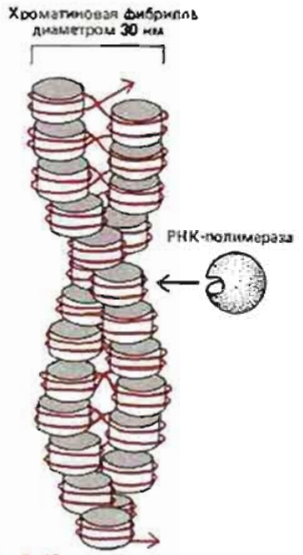


Рис. 8-40. Схематическое изображение молекул РНК-полимеразы, приближающейся к 30нм-хроматиновой фибрилле (масштаб не выдержан). Число нуклеосом на рисунке примерно соответствует их числу в составе средней транскрипционной единицы. Полимераза должна каким-то образом проникнуть к ДНК, не нарушая при этом взаимодействие гистоновых октамеров с хроматином. Это возможно только при условии значительной декомпактизации хроматина.

новый комплекс, а не свободная ДНК, как это имеет место у прокариот, влечет за собой немаловажные последствия с точки зрения регуляции активности эукариотических генов. Даже в случае растянутой нуклеосомной нити довольно трудно представить себе, что РНК-полимераза может транскрибировать ассоциированную с гистонами ДНК без каких-либо заметных изменений в структурной организации нуклеосом. И уже вовсе непостижимо, как может ДНК, находящаяся в еще более конденсированной форме (например, в составе хроматиновой фибриллы), транскрибироваться РНК-полимеразой без разрушения всей нуклеосомной структуры (рис. 8-40).

8.2.4. Новообразованная РНК упаковывается в рибонуклеопротеиновые частицы [21]

У эукариот в отличие от бактерий молекулы новообразованной РНК на электронных микрофотографиях имеют четко выраженную зернистую структуру (см. рис. 8-37). Эти зерна представляют собой РНК-белковые комплексы, сходные с нуклеосомными ДНК-белковыми комплексами; они также образуются вдоль цепи полинуклеотида, обеспечивая необходимую компактизацию РНК-транскриптов. Среди многих видов таких *рибонуклеопротеиновых комплексов* доминирует один, который можно охарактеризовать как короткий участок РНК, покрытый несколькими белками с мол. массой от 30 000 до 40 000. Белки, образующие эти РНП-частицы, составляют один из наиболее богато представленных в клеточном ядре классов белков.

Характер расположения частиц в молекуле РНК и их размер сильно варьирует, однако в структуре РНК-транскриптов, синтезированных на одной и той же транскрипционной единице, наблюдается заметное сходство. Это предполагает наличие определенной специфичности в упаковке и компактизации РНК. Подобно тому как укладка ДНК в хроматине призвана обеспечить ее нормальное функционирование в клетке, пока еще малоизученная конденсация РНК с ядерными белками вполне может оказаться необходимой для правильного процессинга первичных РНК-транскриптов и последующего их транспорта в цитоплазму, о чем и пойдет речь ниже.

8.2.5. Предшественники информационной РНК ковалентно модифицируются по обоим концам молекул [22]

Вся совокупность ядерных транскриптов РНК-полимеразы II известна как *гетерогенная ядерная РНК (гяРНК)*, поскольку одна из основных характеристик, отличающих эту фракцию ядерных РНК,–это чрезвычайно высокая вариабельность размеров входящих в нее транскриптов. Многие из этих транскриптов в конце концов покидают ядро, превращаясь в молекулы информационной, или матричной, РНК (мРНК). Однако, прежде чем выйти из ядра, молекулы мРНК претерпевают серию ковалентных модификаций, обусловливающих их функциональную специализацию и наделяющих эти молекулы свойствами, которые отличают их от транскриптов, синтезированных всеми другими РНК-полимеразами.

5'-конец молекулы РНК (который синтезируется первым в процессе транскрипции) прежде всего *кэпируется*, т.е. достраивается с образованием особой структуры, ответственной за последующее связывание молекулы мРНК с рибосомой (разд. 7.2.6). Кэпирование происходит еще до того, как синтез всей молекулы будет завершен. Тем временем строящаяся молекула РНК продолжает расти в длину в направлении 5' → 3' со скоростью 30 нуклеотидов в секунду, пока РНК-полимераза не достигнет сигнала терминации, закодированного в последовательности нуклеотидов ДНК. Здесь транскрипция останавливается. Затем специальный фермент – *poly(A)-полимераза* – присоединяет к 3'-концу каждого РНК-транскрипта, которому суждено стать молекулой мРНК, от 100 до 200 остатков адениловой кислоты [*poly(A)*], что завершает процесс образования *первичного РНК-транскрипта* (рис. 8-41). Полиаденили-

Таблица 8-2. Содержание различных видов РНК в типичной клетке млекопитающих

	Относительное содержание каждого вида РНК (в % от всей клеточной РНК)	«Удельный вес» биосинтеза каждого вида РНК, %
Ядерный предшественник рРНК	4	39
Цитоплазматическая рРНК	71	—
Гетерогенная ядерная РНК	7	58
Цитоплазматическая мРНК	3	—
Низкомолекулярные стабильные РНК (главным образом тРНК)	15	3

Приведенные данные получены на основе анализа культивируемых фибробластов мыши (L-клетки). Каждая такая клетка содержит 26 пг РНК ($5 \cdot 10^{10}$ рибонуклеотидов), причем 14% этого количества находится в ядре. (Таким образом, ядро клетки содержит вдвое больше ДНК, чем РНК.) Во время интерфазы в среднем $200 \cdot 10^6$ нуклеотидов полимеризуются каждую минуту с образованием РНК. Это приблизительно в 20 раз превышает среднюю скорость синтеза ДНК в S-фазе. Следует подчеркнуть, что, хотя гяРНК составляет большую часть всей синтезируемой в клетке РНК, лишь очень небольшая ее часть избегает деградации в ходе ядерного процессинга РНК. Поэтому образующаяся из гяРНК мРНК представляет собой минорную фракцию клеточной РНК. (По Brandhorst B., McConkey E., J. Mol. Biol., 85, 451–563, 1974.)

рование, т. е. присоединение poly(A), происходит либо непосредственно после терминации транскрипции, либо после специфического расщепления растущей цепи РНК. Конкретные функции poly(A) неизвестны, однако считается, что такой «хвост» способствует последующему процессингу РНК и экспорту зрелых молекул мРНК из ядра.

Поскольку 5′-кэп и 3′-poly(A) характерны только для транскриптов, синтезируемых РНК-полимеразой II, было высказано предположение, что кэпирование или присоединение poly(A) (или оба этих процесса) протекают с участием ферментов, которые взаимодействуют с РНК-полимеразой II, но не взаимодействуют с РНК-полимеразами I и III. Необходимость маркировать подобным образом концы молекул-предшественников мРНК может служить объяснением, почему эти молекулы синтезируются специальной РНК-полимеразой.

Хотя транскрипты РНК-полимеразы II составляют более половины всей РНК, синтезируемой клеткой (табл. 8-2), они, как мы увидим, нестабильны и быстро разрушаются. Следовательно, на гяРНК и происшедшую из нее цитоплазматическую мРНК приходится лишь небольшая доля общей клеточной РНК (табл. 8-2). К счастью для биохимиков, длинный poly(A)-хвост, расположенный на 3′-конце этих молекул, дает возможность выделять и очищать эту фракцию РНК, несмотря на ее относительно низкое содержание в клетке. Для этого общую клеточную РНК пропускают через колонку, содержащую иммобилизованные на твердом носителе фрагменты poly(dT). Благодаря комплементарному спариванию T и A на колонке происходит отбор молекул, имеющих poly(A)-хвосты; связавшиеся молекулы затем элюируют и подвергают дальнейшему анализу (рис. 8-42). Описанная процедура широко используется для отделения гяРНК и мРНК от рибосомной и транспортной РНК, которые количественно преобладают в клетке.

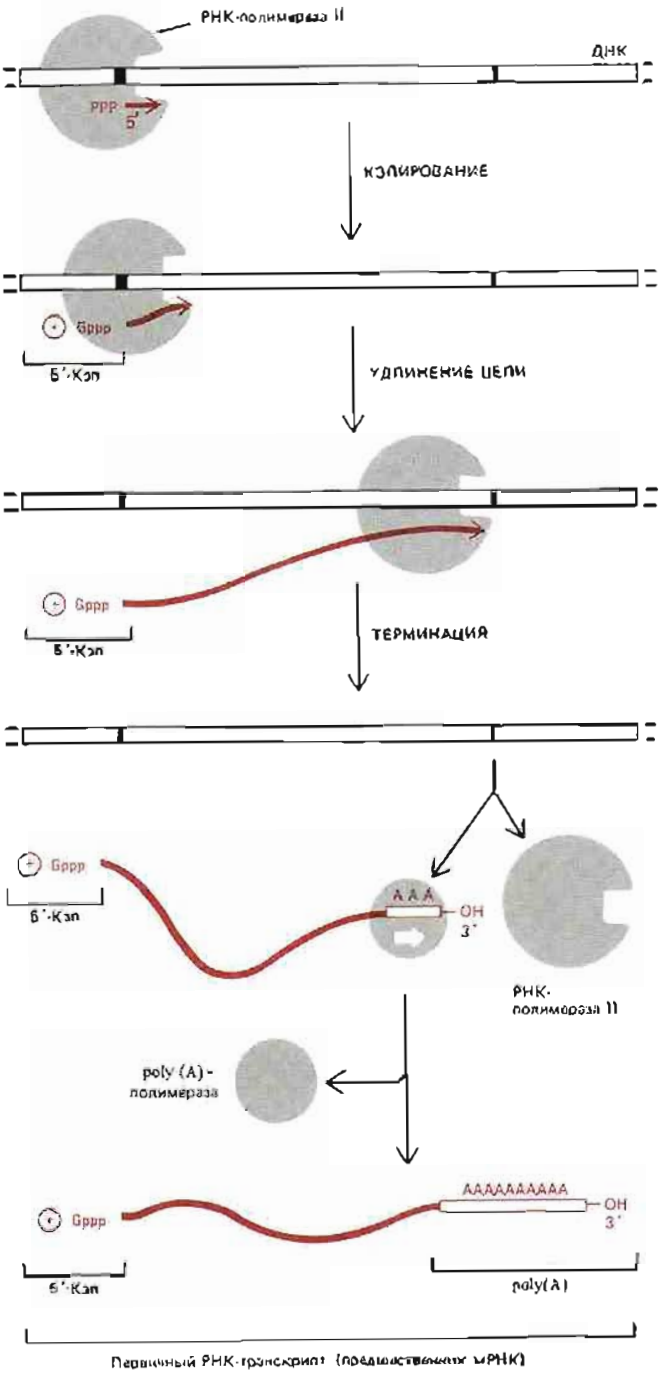


Рис. 8-41. РНК-транскрипты, образованные РНК-полимеразой II, ковалентно модифицируются путем кэпирования 5'-конца и присоединения poly(A)-последовательности к 3'-концу. Кэп несет положительный заряд, который возникает в результате метилирования атома азота в положении 7 гуанина; эта реакция протекает сразу после реакции переноса гуанила (не показано). Детальная структура кэпа приведена на рис. 7-14.

8.2.6. В ходе процессинга из середины молекул РНК удаляются длинные нуклеотидные последовательности [22]

Первые указания на нестабильность ядерных транскриптов РНК-полимеразы II были получены в экспериментах по кратковременному введению в клетки [^{3}H]-уридина, который включался в синтезируемые в данный момент молекулы гяРНК и давал таким образом возможность в течение длительного времени наблюдать за судьбой этих меченых молекул. В результате были сделаны два важных открытия:

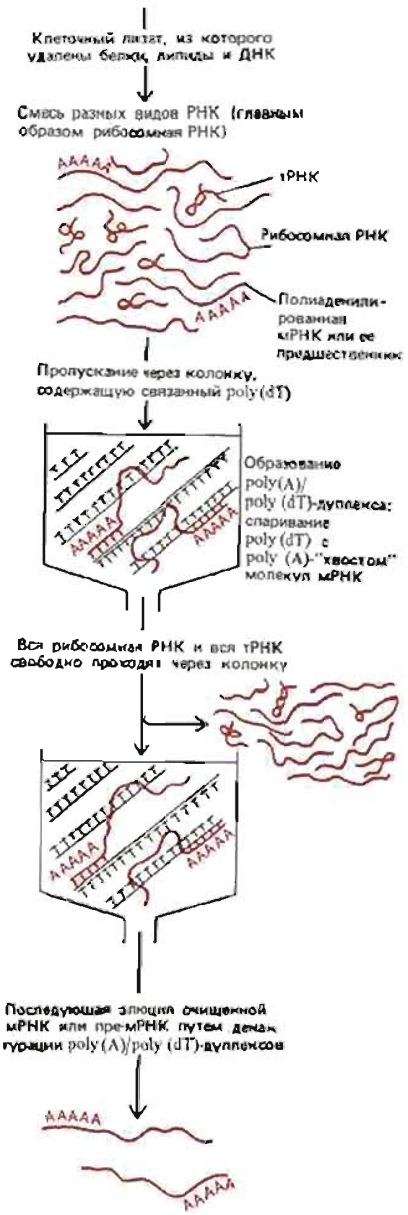


Рис. 8-42. Выделение и очистка молекул мРНК и их предшественников с помощью селективного отжига 3′-концевых poly(A)-последовательностей этих молекул на колонке, содержащей иммобилизованные синтетические полинуклеотиды poly(U) или poly(dT). Здесь изображена колонка с ковалентно связанной полидезокситимидиловой кислотой [poly(dT)].

1. Длина новосинтезированных молекул РНК быстро уменьшается, достигая размеров цитоплазматической мРНК по прошествии уже примерно 30 мин. В среднем первичные РНК-транскрипты, синтезируемые в культивируемых клетках, содержат около 6000 нуклеотидов, тогда как в состав зрелых молекул мРНК входит всего лишь около 1500 нуклеотидов.
2. Примерно через 30 мин радиоактивно меченные молекулы РНК начинают покидать ядро, превращаясь в мРНК. Однако цитоплазмы достигает не более 5% общей массы меченой РНК. Остальные последовательности рибонуклеотидов деградируют в ядре с образованием множества мелких фрагментов, что занимает около 1 ч.

Эти наблюдения выявили коренное отличие эукариот от прокариот, касающееся процессов реализации наследственной информации в рамках известной схемы: ДНК → РНК → белок. У прокариот, которые в ходе эволюции первыми приобрели основные генетические механизмы, каждая молекула РНК представляет собой непрерывную последовательность нуклеотидов, кодирующих аминокислоты молекулы белка: 5′-концевая область молекулы РНК кодирует N-конец белковой молекулы, а 3′-концевая область РНК – С-конец полипептидной цепи белка (рис. 8-43). Хотя эукариотические транскрипты обладают такой же полярностью, как и прокариотические (т.е. нуклеотиды в области 5′-конца молекулы мРНК всегда кодируют N-концевые аминокислоты белка), они часто содержат длинные вставки некодирующих последовательностей, транскрибированных с определенных участков гена и известных под названием **интроны**. Эти интронные последовательности РНК специфически вышепляются из каждого РНК-транскрипта в ходе его превращения в зрелую молекулу мРНК, способную направлять синтез белка (рис. 8-43).

Открытие в 1977 г. прерывистых, или расщепленных, генов оказалось большой неожиданностью. Поскольку кодирующие участки РНК, разделенные интронными областями, после вырезания последних соединяются друг с другом в стык и образуют единое целое (рис. 8-44), процессинг РНК, протекающий по такой схеме, получил название **сплайсинг** (от англ. splice – сращивать).

Сплайсинг РНК, происходящий в ядре и предшествующий выходу РНК в цитоплазму, – это достаточно крупномасштабный процесс, который обеспечивает превращение очень длинных молекул гяРНК (содержащих до 50 000 нуклеотидов) в гораздо более мелкие молекулы цитоплазматической мРНК, обычно насчитывающие от 500 до 3000 нуклеотидов. Таким образом, ядерная оболочка изолирует молекулы новосинтезированной РНК от цитоплазматических рибосом до тех пор, пока в результате процессинга не будут отобраны последовательности, которым надлежит транслироваться в белки.

Исследования, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот (т. 1, разд. 4.5.5), показали, что быстро деградирующие последовательности ядерной РНК отличаются от тех последовательностей, которые не подвергаются процессингу. Удаление интронов объясняет тот факт, что, хотя в ядре типичной клетки млекопитающих транскрибируется с образованием РНК от 7 до 10% геномной ДНК, цитоплазматические мРНК представляют лишь 1–2% нуклеотидных последовательностей генома. Указанная разница, по-видимому, обусловлена главным образом деградацией интронных участков молекул гяРНК.

Прежде чем пуститься в рассуждения о том, как и почему могла возникнуть столь сложная генетическая система, необходимо рассказать о том, что известно в настоящее время об интронных последовательностях и о механизме их вышепления.

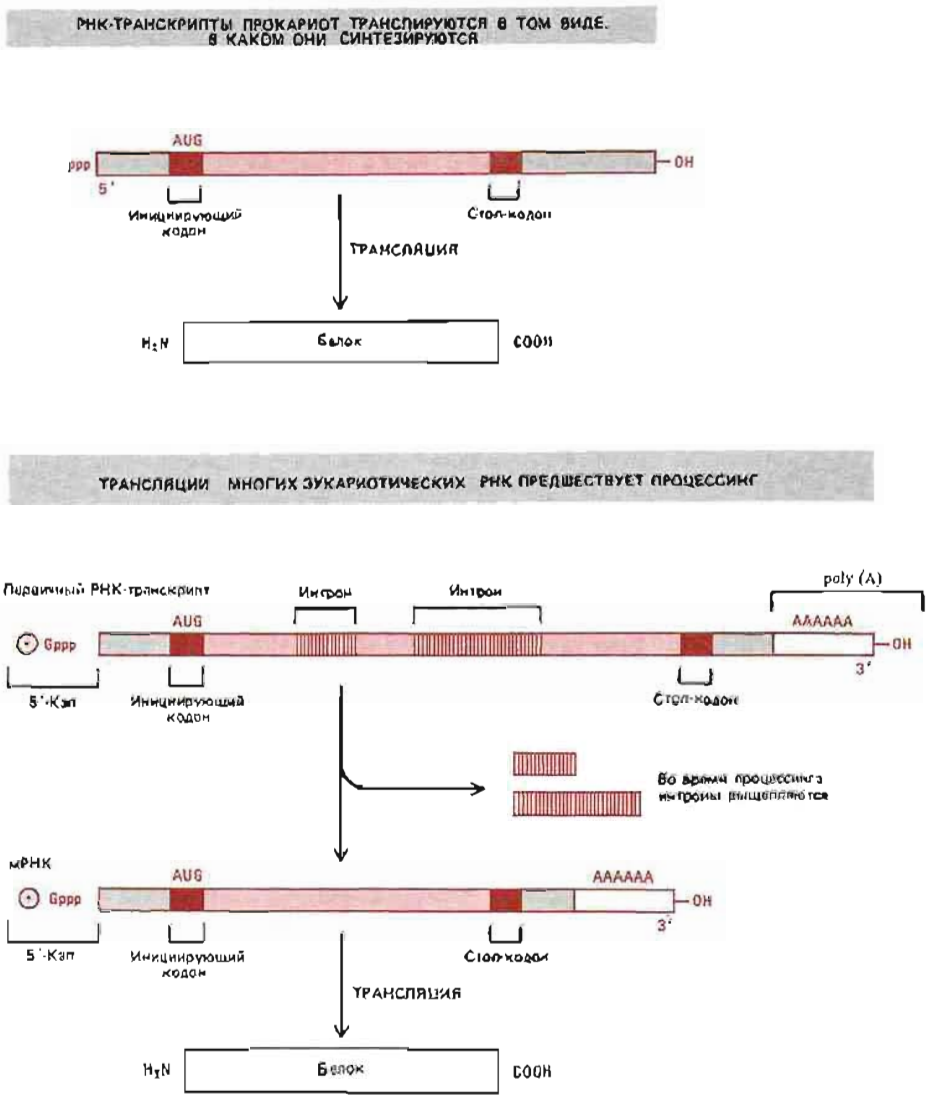


Рис. 8-43. Сравнение первичной структуры прокариотических и эукариотических РНК-транскриптов. Только эукариотические РНК-транскрипты содержат некодирующие (интронные) последовательности, которые должны вырезаться прежде, чем начинается трансляция молекулы мРНК в белковую цепь.

8.2.7. Малые ядерные рибонуклеопротеиновые частицы, возможно, участвуют в процессинге РНК [22, 23]

Размер интронов варьирует приблизительно от 100 до 10000 нуклеотидов и более. Основное их отличие от кодирующих последовательностей состоит в том, что бо́льшую часть нуклеотидной последовательности интрона можно искусственно изменить без каких-либо ощутимых последствий с точки зрения функционирования гена. Более того, в процессе эволюции в интронах произошло, по всей видимости, быстрое накопление мутаций; это можно расценить как свидетельство того, что интроны не имеют каких бы то ни было функций и в значительной мере представляют собой генетический «утиль» (это предположение мы обсудим позже). Тем не менее на каждом из концов интрона находится по нескольку нуклеотидов, которые нельзя изменять без риска нарушить всю работу гена. Эти короткие пограничные нуклеотидные последовательности почти одинаковы у всех исследованных интронов. Предполагают, что они служат сигналами для сплайсинга РНК. В настоящее время мы имеем в руках лишь одну нить, которая может привести к пониманию того, как работают эти сигналы: консервативные пограничные области ин-

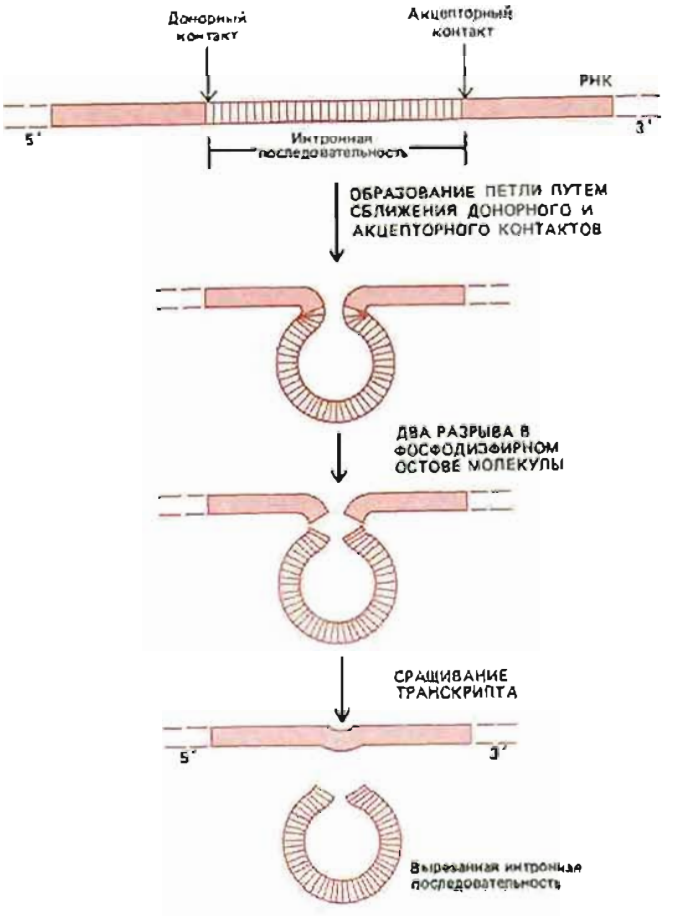


Рис. 8-44. Схема последовательных этапов сплайсинга, приводящих к формированию непрерывной кодирующей последовательности нуклеотидов в молекуле мРНК путем вырезания интронов из первичного РНК-транскрипта. Представленная здесь схема процессинга РНК предполагает вырезание определенного участка молекулы и сращивание образовавшихся концов, происходящее с участием специфических последовательностей РНК, называемых донорными и акцепторными контактами (сайтами) сплайсинга.

тронов оказались комплементарными определенным участкам молекул РНК, присутствующих в многочисленных *малых ядерных рибонуклеопротеиновых частицах (мяРНП)*. Эти частицы связываются с РНК-транскриптами в рибонуклеопротеиновый комплекс и, возможно, участвуют в сплайсинге РНК путем формирования дуплексов РНК—РНК между концевыми областями интронных последовательностей, в результате чего интрон образует замкнутую петлю (рис. 8-45). Формирование такой структуры сопровождается ферментативным расщеплением нуклеотидной последовательности РНК в области устья интронной петли, после чего интрон удаляется, а концы кодирующих участков воссоединяются с образованием непрерывной кодирующей последовательности (см. рис. 8-44). Процесс вырезания интрона должен происходить с необычайной точностью, так как ошибка, приводящая к появлению хотя бы одного неправильного нуклеотида, сместит рамку считывания и сделает бессмысленной всю нуклеотидную последовательность новообразованной молекулы мРНК.

Помимо мяРНП-частиц, о которых речь шла выше, существует много других классов рибонуклеопротеиновых частиц. Подобно мяРНП-частицам, участвующим, как предполагают, в сплайсинге РНК (их число в клетке составляет 10^6 копий), другие малые РНП-частицы также богато представлены в клетке, причем многие из них локализуются в ядре. Весьма вероятно, что некоторые из таких РНП-частиц играют какую-то роль в транспортировке различных молекул РНК из ядра в цитоплазму (разд. 8.2.12), тогда как другие принимают участие в процессинге РНК, а также в сборке рибосом в ядрышке (разд. 8.2.14).

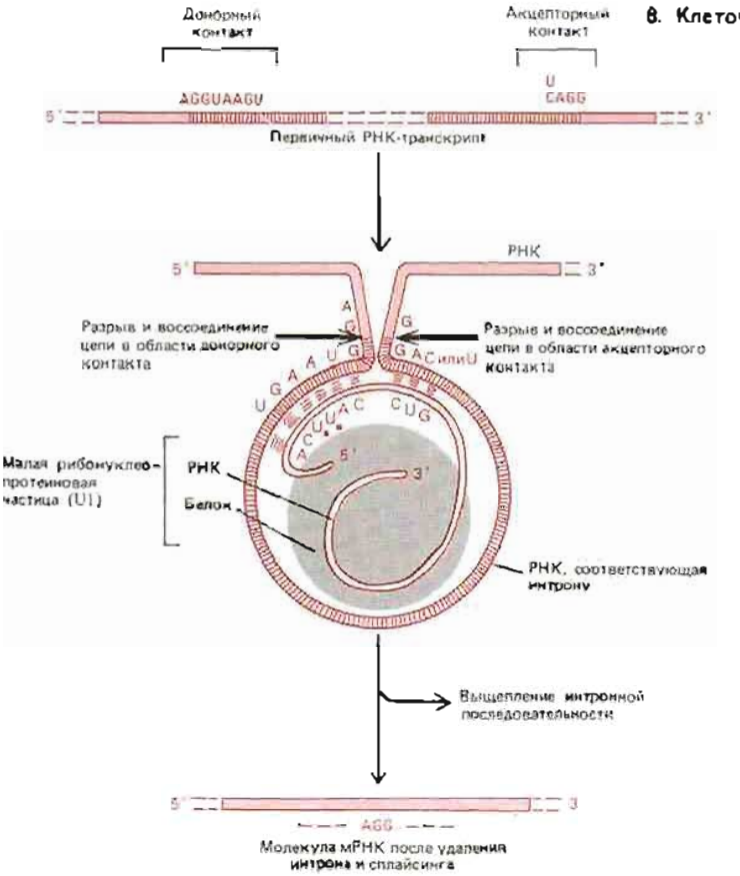


Рис. 8-45. Предполагаемая схема возможного участия специфической малой ядерной рибонуклеопротеиновой частицы, известной как U1, в сплайсинге РНК. Эта частица содержит небольшую молекулу РНК длиной 165 нуклеотидов, в составе которой имеются последовательности, комплементарные нуклеотидным последовательностям пограничных экзон-интронных и интрон-экзонных областей молекул гяРНК. Считается, что благодаря комплементарному спариванию оснований РНК U1 обеспечивает сближение донорного и акцепторного контактов (сайтов) на начальных этапах сплайсинга (см. рис. 8-44).

В определенном смысле все эти рибонуклеопротеиновые частицы напоминают рибосомы. Хотя по сравнению с последними эти частицы гораздо мельче (их молекулярная масса в среднем равна $2{,}5 \cdot 10^5$ против $4{,}5 \cdot 10^6$ у рибосом), все они содержат множество полипептидных цепей, ассоциированных со стабильными молекулами РНК. Подобно рибосомам, малые рибонуклеопротеиновые частицы, по-видимому, способны узнавать специфические нуклеотидные последовательности с помощью комплементарного РНК—РНК-спаривания и таким образом выводить на «стартовые» позиции белковые субъединицы, катализирующие различные сложные реакции.

8.2.8. Из одного РНК-транскрипта может выщепляться множество интронных последовательностей [22, 24]

Если схема, приведенная на рис. 8-45, отражает реальный процесс вырезания интронов, можно утверждать, что 5'-конец каждой интронной последовательности [названный для удобства *донорным сайтом* (*контактом*)] способен при образовании петли сомкнуться с 3'-концом любого другого интрона [названный его *акцепторным сайтом* (*контактом*)]. Это и было подтверждено в опытах, в которых соединили донорную и акцепторную части, взятые из разных интронов. Получившаяся гибридная интронная последовательность опознавалась ферментами сплайсинга и удалялась (рис. 8-46).

Ввиду предполагаемой эквивалентности всех донорных и акцепторных сайтов, участвующих в сплайсинге РНК, кажется удивительным, что многие гены позвоночных, которые были клонированы и детально изучены, содержат, как оказалось, большое число интронов (7 в гене овальбумина и более 50

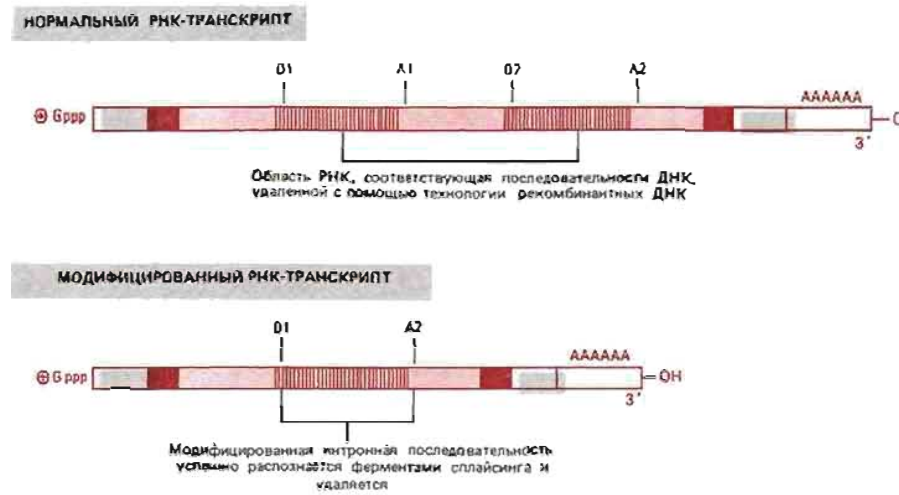


Рис. 8-46. Схема эксперимента, демонстрирующего, что донорный (D1) и акцепторный (A2) сайты сплайсинга, принадлежащие двум разным интронам, в принципе могут нормально «работать» в паре друг с другом.

в гене α-цепи проколлагена – наиболее впечатляющий пример). Если донорные и акцепторные сайты будут соединяться при сплайсинге случайным образом, это может привести к потере функциональных последовательностей мРНК, расположенных между интронами, что в свою очередь приведет к катастрофическим последствиям. Чтобы избежать этого, ферментный аппарат сплайсинга должен обеспечивать смыкание донорного сайта только с тем акцепторным сайтом, который находится ближе всего к нему со стороны 3'-конца линейной последовательности РНК (рис. 8-47). Как осуществляется подобный контроль, неизвестно, хотя можно предположить, что немаловажную роль в этом играет трехмерная конформация интронных участков в составе РНК-транскрипта. Вместе с тем, как мы скоро увидим, общая картина сплайсинга РНК в некоторых случаях гораздо сложнее, чем простое соединение 5'- и 3'-интронных сайтов. Эти исключения заслуживают особого внимания, поскольку они демонстрируют те преимущества, которые могут дать клетке прерывистые гены.

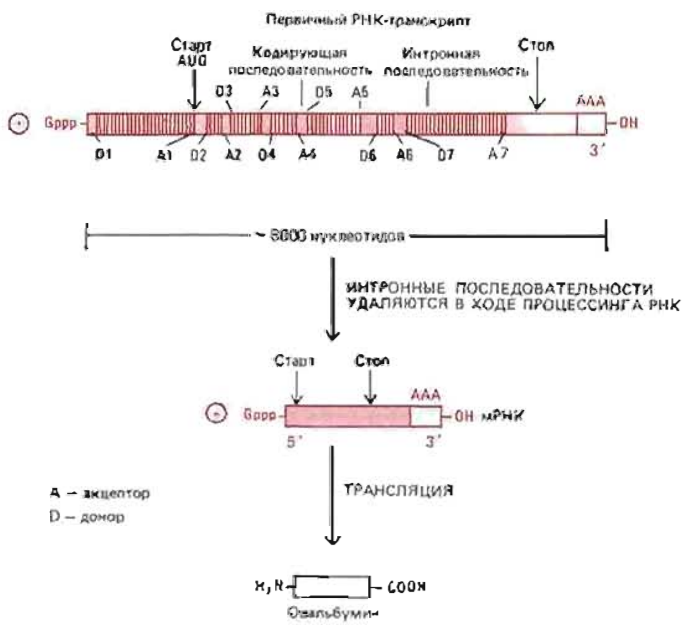


Рис. 8-47. Формирование зрелой молекулы мРНК в результате координированного выщепления семи интронов из первичного РНК-транскрипта овальбуминового гена курицы. Как и на рис. 8-46, донорные сайты сплайсинга обозначены D, а акцепторные – A.

8.2.9. Процессинг одного и того же РНК-транскрипта может осуществляться разными способами, давая тем самым начало нескольким мРНК, кодирующим разные белки [25]

Хотя большинство интронных последовательностей, по-видимому, не несет никаких специальных функций, постепенно накапливаются данные, указывающие на то, что само существование аппарата сплайсинга сообщает клетке дополнительную генетическую гибкость. В известной степени это связано с тем, что сплайсинг одного и того же первичного транскрипта, осуществляемый разными способами, может привести к образованию нескольких, отличающихся друг от друга молекул мРНК, кодирующих различные белки. Изменения в характере сплайсинга некоторых транскриптов, возможно, происходит в процессе клеточной дифференцировки. Иначе говоря, по мере развития клетки одна и та же последовательность ДНК используется для обеспечения синтеза различных белков.

Подобная неоднозначность сплайсинга была впервые обнаружена у аденовирусов – крупных вирусов, инфицирующих клетки животных. Геном аденовирусов направляет синтез нескольких очень длинных РНК-транскриптов, каждый из которых содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие целый ряд различных белков. Альтернативные пути сплайсинга приводят затем к тому, что из совершенно одинаковых первичных транскриптов образуются молекулы мРНК разных типов, имеющие одну и ту же 5′-концевую последовательность (5′-кэп), которая, таким образом, инициирует синтез нескольких разных белков. Как видим, правило последовательного смыкания донорных и акцепторных интронных контактов здесь попросту не соблюдается.

Напомним, что единственный кэпированный нуклеотид на 5′-конце транскриптов, синтезированных РНК-полимеразой II, служит впоследствии сигналом инициации белкового синтеза (разд. 7.2.6). Как правило, даже если молекула мРНК содержит несколько старт- и стоп-кодонов, последовательность после первого (т.е. ближайшего к 5′-концу молекулы мРНК) стоп-кодона уже не транслируется, поскольку мРНК автоматически отделяется от рибосомы, когда последняя достигает этого кодона. По этой причине каждый конкретный РНК-транскрипт, превратившись в молекулу мРНК, может обеспечить синтез лишь одного белка. Вместе с тем один и тот же первичный транскрипт благодаря альтернативному сплайсингу имеет возможность превратиться в несколько различных мРНК: 5′-концевой кэп может быть соединен с началом различных кодирующих последовательностей и выполнять функцию инициирующего сигнала для синтеза нескольких разных белков (рис. 8-48). Остается неясным, как осуществляется контроль альтернативного сплайсинга РНК-транскриптов.

Для вирусов альтернативный процессинг РНК, возможно, имеет определенные преимущества, а именно экономичность: повышение информационной емкости генома в этом случае не сопровождается увеличением его размеров, которые жестко детерминированы величиной вирусной частицы.

8.2.10. Одна и та же последовательность ДНК на разных стадиях развития клетки может направлять синтез различных белков [26]

В настоящее время известен по меньшей мере один тип кодирующей последовательности клеточной ДНК, которая, как и у аденовирусов, определяет синтез РНК-транскрипта, претерпевающего впоследствии процессинг, осуществляемый разными способами. Однако изменение схемы сплайсинга данного первичного транскрипта в процессе индивидуального развития клетки приводит не к образованию совершенно нового белка, а к синтезу его модифицированного аналога.

Подобные изменения имеют место при формировании молекул антител

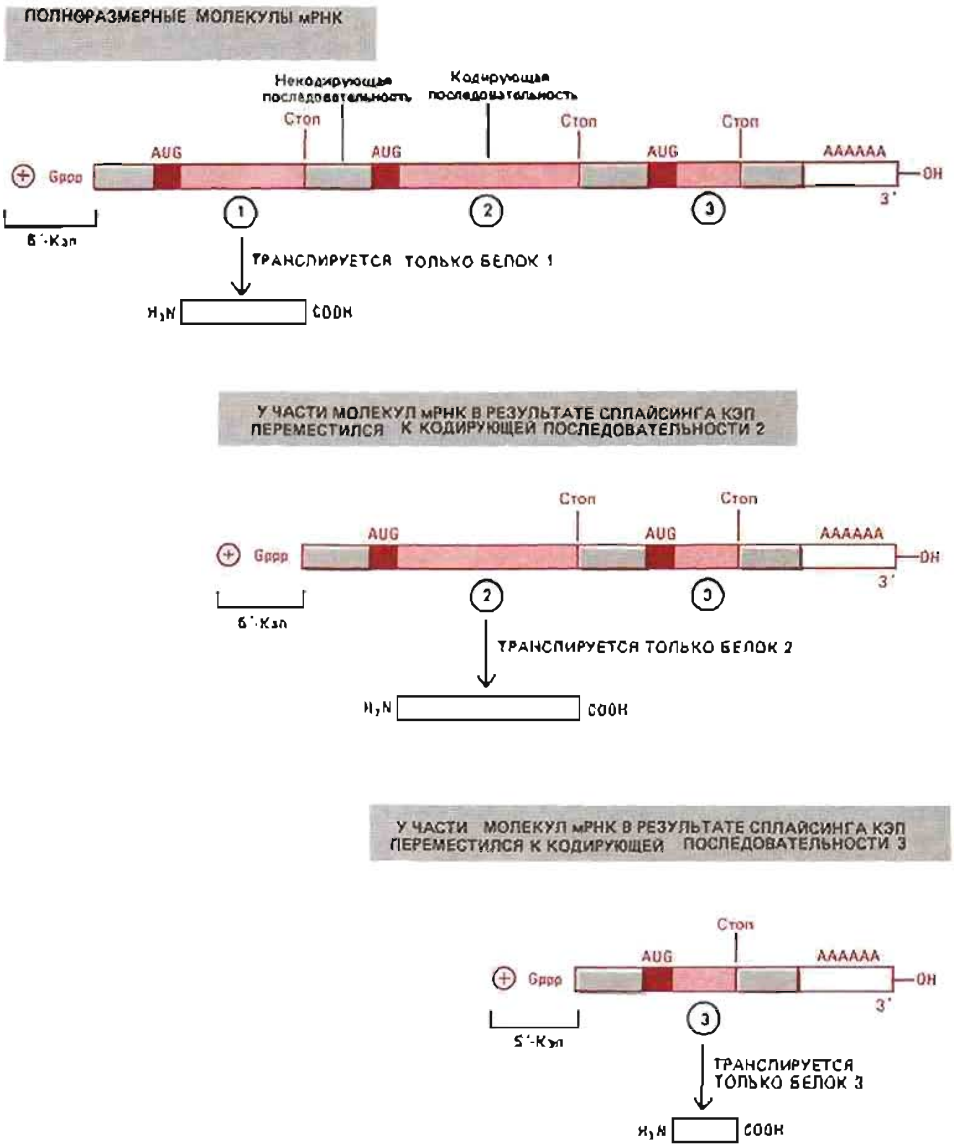


Рис. 8-48. У некоторых вирусов процессинг первичного РНК-транскрипта может протекать по нескольким схемам, так что в цитоплазму экспортируются три (или более) различных типа молекул мРНК, являющихся производными одного и того же предшественника: эти мРНК кодируют разные белки. В каждом случае транслируется лишь та кодирующая последовательность мРНК, которая ближе всего расположена к 5'-концу молекулы.

в лимфоцитах (т. 5, разд. 17.4.6). На ранних этапах жизнедеятельности лимфоцитов антитела закреплены в плазматической мембране; позже они секретируются. Секретируемая форма антител идентична мембранной, за одним исключением: на С-конце мембранной формы находится длинный «хвост» гидрофобных аминокислот, заякоривающий белок на мембране, тогда как С-конец секретируемой формы представлен гораздо более короткой цепочкой гидрофильных аминокислот. Переключение синтеза мембранной формы антитела на синтез секретируемой формы требует, таким образом, изменения нуклеотидной последовательности 3'-концевой области мРНК, кодирующей карбоксильный конец полипептидной цепи.

Мембранная форма антитела возникает в результате транскрипции всей кодирующей последовательности ДНК, приводящей к образованию длинного первичного транскрипта ядерной РНК. Нуклеотиды, кодирующие С-концевую последовательность гидрофобных аминокислот в молекуле мембраносвязанного белка, локализованы в концевой области для длинного транскрипта, сразу же после интронного акцепторного сайта (рис. 8-49). В результате про-

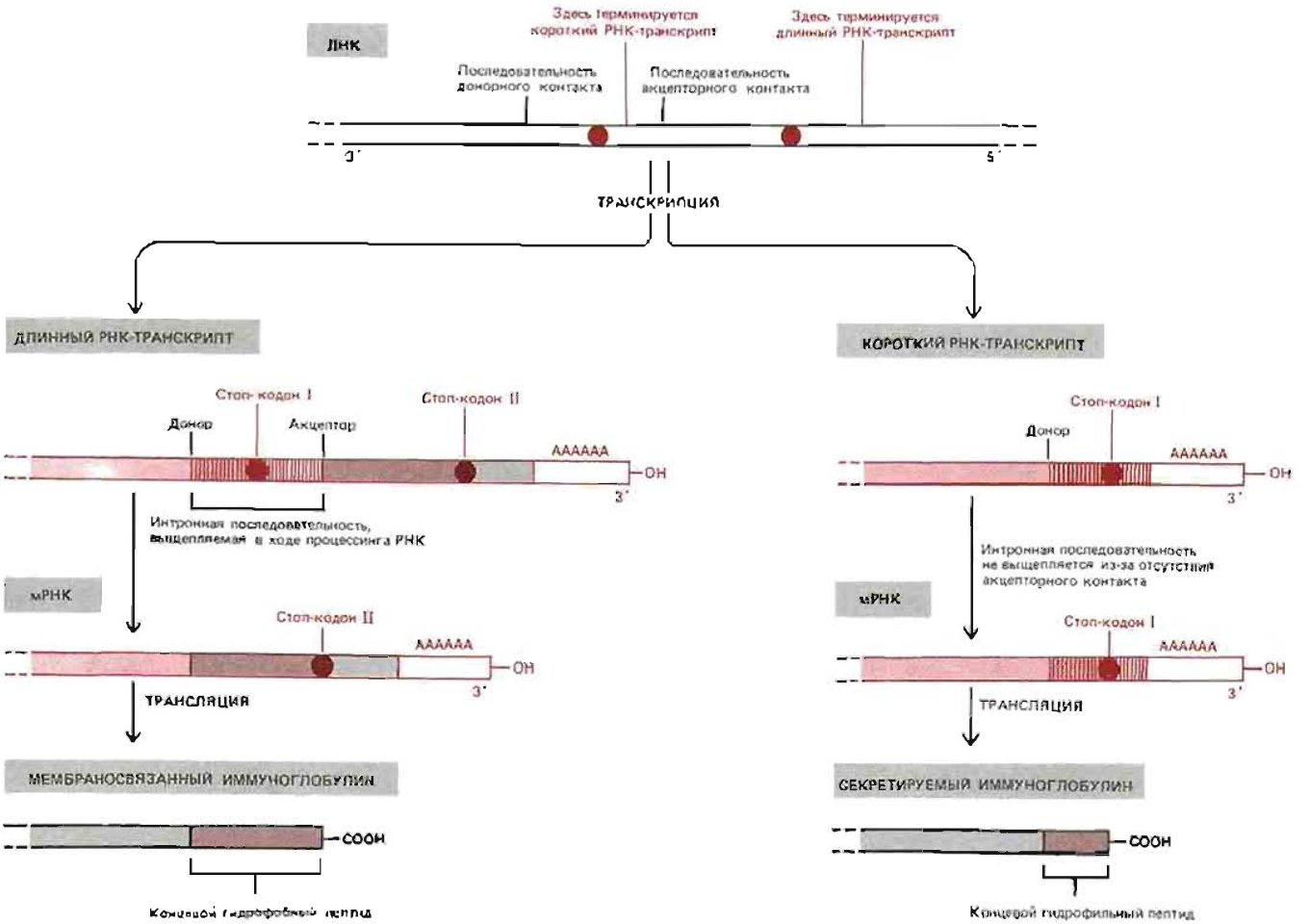


Рис. 8-49. Синтез двух близкородственных белков, направляемый одной и той же последовательностью ДНК. Интронная последовательность, расположенная у 3'-конца длинного первичного РНК-транскрипта гена, кодирующего антитела, удаляется в ходе процессинга РНК. Так образуется молекула мРНК, кодирующая мембранную форму антитела (иммуноглобулина). Наоборот, в ответ на антигенную стимуляцию синтезируется укороченный первичный транскрипт, у которого отсутствует указанный акцепторный контакт (сайт). Поэтому прилежащая интронная последовательность, удаляемая при сплайсинге длинного транскрипта, из короткого транскрипта не вырезается. В результате трансляции этой последовательности в составе мРНК образуется С-концевая гидрофильная часть молекулы секретируемой формы антитела.

цессинга эти нуклеотиды оказываются связанными с нуклеотидами, кодирующими остальную аминокислотную цепь. При таком способе сплайсинга нуклеотидная последовательность РНК, кодирующая гидрофильный хвост секретируемой молекулы, удаляется: непосредственно перед этой нуклеотидной последовательностью располагается последний донорный сайт длинного транскрипта, вследствие чего указанная последовательность становится как бы частью вырезаемого интрона (рис. 8-49).

В свою очередь секретируемая форма молекулы происходит от более короткого первичного транскрипта, который оканчивается перед последним акцепторным сайтом длинного транскрипта и поэтому не содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей гидрофобные аминокислоты мембранной формы. Поскольку из-за отсутствия акцепторного сайта вырезаемая в первом случае последовательность РНК не опознается ферментами сплайсинга как интронная, нуклеотиды, кодирующие гидрофильные аминокислоты, остаются в составе образующейся мРНК и транслируются на рибосомах (рис. 8-49).

Более короткий транскрипт, направляющий синтез секретируемой формы белка, может получаться либо в результате преждевременной терминации транскрипции, либо путем расщепления длинного первичного транскрипта и последующего пристраивания к новообразованному 3'-концу молекулы РНК poly(A)-хвоста. Эксперименты, проведенные на вирусах, показали, что у них различные 3'-концы РНК-транскриптов образуются именно в результате расщепления первичного транскрипта в разных точках и последующего на-

ращивания здесь poly(A). В случае же лимфоцитов вопрос о том, как контролируется длина транскриптов, направляющих синтез мембранной и секретируемой формы антител, остается открытым.

8.2.11. Что такое ген? [27]

Обнаружение того, что эукариотические гены содержат интроны и что их кодирующие последовательности могут соединяться более чем одним способом, вновь поднимает вопрос о точном определении понятия «ген». Впервые этот термин получил толкование на молекулярном уровне в начале 40-х годов нашего века в работах, посвященных биохимической генетике гриба *Neurospora*. До этого долгое время **ген** определяли как участок генома, ведущий себя в мейозе как самостоятельная единица и обеспечивающий развитие какого-либо определенного фенотипического признака, например красный или белый цвет глаз у дрозофилы или гладкую либо морщинистую форму семян у гороха. Эксперименты, выполненные на нейроспоре, привели к выводу, что большинство генов соответствует участкам генома, определяющим синтез одного-единственного белка; следствием этого явилась известная формула: *один ген – одна полипептидная цепь*. Эта гипотеза оказалась чрезвычайно плодотворной с точки зрения всех последующих исследований в данной области. Так, по мере дальнейшего углубления наших знаний о механизмах экспрессии генов в 60-х годах геном стали называть отрезок ДНК, транскрибирующийся в виде молекулы РНК, которая кодирует одну полипептидную цепь или имеет самостоятельное функциональное значение (например, тРНК или рРНК). Открытие в конце 70-х годов прерывистых генов, казалось, не опровергало это определение, так как было показано, что каждая полипептидная цепь действительно синтезируется на РНК-матрице, транскрибированной в конечном счете с какого-то одного участка ДНК. Однако сейчас мы знаем, что некоторые участки ДНК благодаря альтернативному сплайсингу первичных РНК-транскриптов могут обеспечивать синтез по меньшей мере двух различных мРНК, т.е. двух различных белков, обладающих каждый своей функцией. Так что же такое ген?

По-видимому, в настоящий момент наиболее приемлемым следует считать определение, вытекающее из формулы «один ген – одна полипептидная цепь». Это значит, что ситуацию, когда одна и та же последовательность ДНК определяет синтез более чем одного полипептида, можно рассматривать как перекрывание двух или более генов в хромосоме. Насколько часто случается такое перекрывание генов у эукариот, станет ясно только тогда, когда будет изучена структурно-функциональная организация большого числа генов высших организмов.

Между тем существование интронов имеет значение для другого важного процесса.

8.2.12. Экспорт РНК из ядра в цитоплазму предполагает наличие соответствующих молекулярных сигналов [28]

Для того чтобы предотвратить связывание новосинтезированной РНК с рибосомами прежде, чем завершится ее процессинг, необходим специальный механизм, обеспечивающий отбор ядерных транскриптов, экспортируемых в цитоплазму. В самом деле, только около 5% общей массы РНК-транскриптов покидает клеточное ядро. Специфические сигналы, которые могли бы служить «пропуском» на выход из ядра различных РНК, пока не идентифицированы, однако существуют указания на то, что они возникают в процессе сплайсинга РНК. В настоящее время мы владеем методами, позволяющими удалить из индивидуального эукариотического гена отдельные интронные последовательности и ввести такой модифицированный ген в ядро культивируемой клетки, где он будет транскрибироваться. Такая процедура была проведена с несколькими генами, у которых удалили разное число интронов.

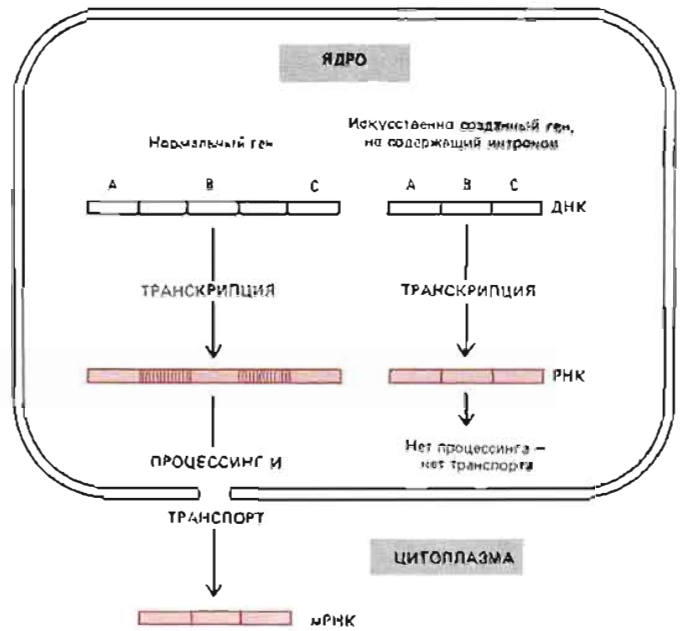


Рис. 8-50. Схема эксперимента, демонстрирующего, что для транспорта некоторых молекул мРНК в цитоплазму необходимо не просто отсутствие в них интронных последовательностей, а действительное вырезание этих последовательностей в ходе процессинга РНК.

Удивительным оказалось то, что при полном отсутствии интронов в нуклеотидной последовательности гена его РНК-транскрипты остаются в ядре. По-видимому, для экспорта транскриптов в цитоплазму необходимо их взаимодействие с ферментами сплайсинга (рис. 8-50).

В то же время должны существовать и какие-то другие пути возникновения сигналов экспорта в молекулах мРНК, потому что не все эукариотические гены содержат интроны.

8.2.13. Рибосомные и транспортные РНК синтезируются на тандемно повторяющихся идентичных генах [29]

До сих пор мы обсуждали фундаментальные механизмы транскрипции генов и последующего процессинга образующихся РНК. Теперь мы рассмотрим, как синтезируются некоторые конкретные генные продукты, необходимые клетке в больших количествах. Оказывается, что многие из наиболее богато представленных в клетке белков, включая гемоглобин эритроцитов и миоглобин мышечных клеток, кодируются генами, присутствующими в гаплоидном геноме в единственном числе. Высокое содержание в клетке этих белков объясняется тем, что каждая из многих молекул мРНК, транскрибированных с соответствующих генов, активно транслируется, давая начало десяти молекулам белка каждую минуту. Получается, что за один оборот клеточного цикла на каждую молекулу мРНК приходится более 10000 молекул белка. Между тем растущие клетки за один оборот клеточного цикла должны синтезировать по 10 млн. молекул рибосомной РНК каждого типа, чтобы можно было осуществить сборку 10 млн. рибосом, присутствующих в каждой клетке. Следует учесть, что здесь нет стадии трансляции, на которой могло бы произойти резкое увеличение выхода продукции, поскольку РНК является конечным продуктом данных генов. В этом случае синтез необходимого числа молекул рРНК обеспечивается тем, что гены, кодирующие эти РНК, (**гены рРНК**), представлены в геноме клетки большим числом копий.

Гаплоидные клетки человека содержат около 200 генов рРНК, которые распределены в виде небольших кластеров по пяти хромосомам (см. рис. 8-56), тогда как гаплоидные клетки лягушки *Xenopus* имеют около 600 таких генов, сосредоточенных в одной хромосоме. Однако общая картина ор-

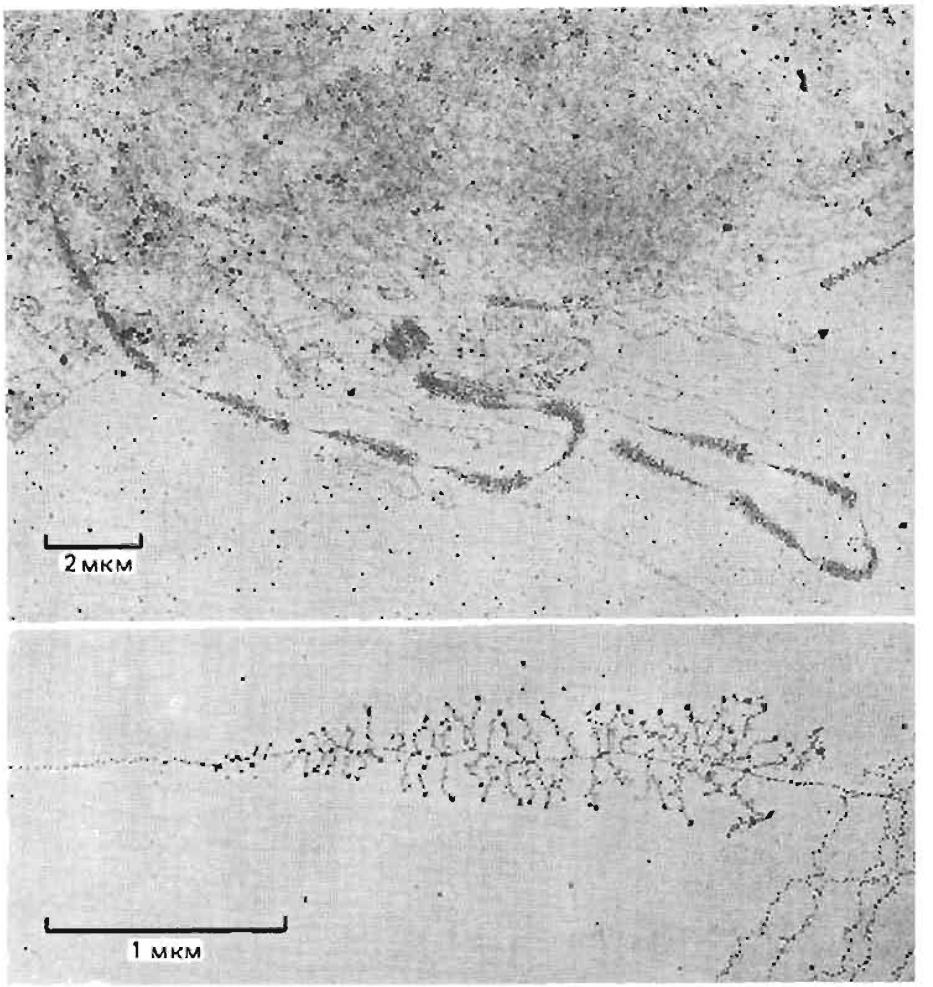


Рис. 8-51. Транскрипция предшественника рибосомных РНК (45S-РНК) на тандемно повторяющихся генах рРНК, визуализированная с помощью электронного микроскопа. Обратите внимание на характерное чередование транскрибирующихся генов и нетранскрибируемых спейсеров, видимое при меньшем увеличении (верхний снимок). (Foe V. E., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 42, 723–740, 1978.)

ганизации генов рРНК и биосинтеза рибосомных РНК-транскриптов одинакова у всех эукариот. Множественные копии высококонсервативных генов рРНК в любой хромосоме расположены в виде серии тандемных повторов, отделенных друг от друга нетранскрибируемым участком ДНК, который называется *спейсером*. Длина и нуклеотидная последовательность спейсерных участков варьируют в широких пределах. Благодаря тому что кластеры тандемно повторяющихся генов рРНК сгруппированы и очень активно транскрибируются, они хорошо видны на электронно-микроскопических препаратах хроматина (рис. 8-51). В этих активно транскрибируемых участках ДНК плотно упакованы молекулы РНК-полимеразы и ассоциированные с ними новообразованные транскрипты (на один ген их приходится до 100 и более); они веером расходятся от нити ДНК, и вследствие этого вся структура приобретает вид «елочки». Как уже говорилось выше (см. рис. 8-39), верхушка каждой такой елочки представляет собой точку инициации транскрипции; конец же гена рРНК четко определяется по нижней границе «кроны».

Гены рРНК транскрибируются РНК-полимеразой I с образованием идентичных транскриптов. В клетках человека такие первичные транскрипты генов рРНК, известные как *45S-РНК*, имеют в длину около 13000 нуклеотидов. Прежде чем покинуть ядро в составе собранной рибосомной частицы, молекула 45S-РНК подвергается специфическому расщеплению, в результате чего образуется по одной копии 28S-РНК (около 5000 нуклеотидов), 18S-РНК (около 2000 нуклеотидов) и 5,8S-РНК (около 160 нуклеотидов), которые соб-

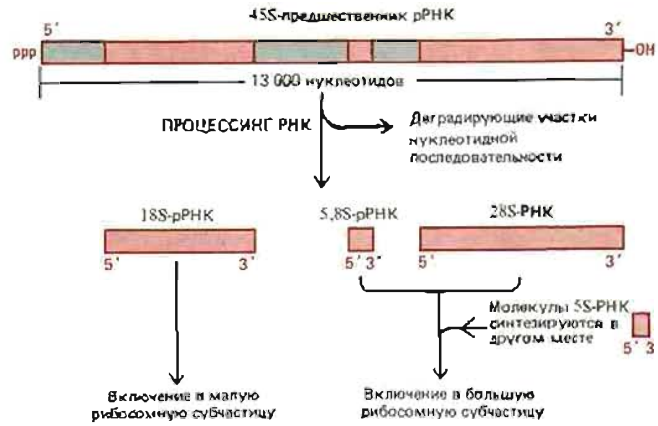


Рис. 8-52. Процессинг 45S-предшественника рибосомных РНК с образованием молекул рРНК трех типов. Обратите внимание, что почти половина нуклеотидной последовательности пре-рРНК деградирует в ядре.

ственно и являются компонентами рибосом (см. рис. 5-14). Общее происхождение всех трех типов рРНК из одного и того же первичного транскрипта служит гарантией того, что они образуются в равных количествах. Остальная часть этого транскрипта (около 6000 нуклеотидов) деградирует в ядре (рис. 8-52). Не исключено, что эти «излишние» последовательности молекулы-предшественника рРНК играют определенную роль на ранних этапах сборки рибосом, происходящих непосредственно по завершении синтеза 45S-РНК.

Другие тандемно повторяющиеся гены, также разделенные нетранслируемыми спейсерами, представлены генами 5S-РНК большой рибосомной субчастицы (это единственная рРНК, которая транскрибируется отдельно от других) и генами различных тРНК. Все эти гены транскрибируются РНК-полимеразой III. Гистоновые гены можно отнести к тем немногочисленным примерам тандемно повторяющихся генов, которые кодируют белки; они транскрибируются РНК-полимеразой II.

8.2.14. Ядрышко – это центр образования рибосом [30]

Непрерывная транскрипция дуплицированных генов обеспечивает клетку достаточным количеством рРНК. Новосинтезированные транскрипты незамедлительно связываются с рибосомными белками с образованием рибосом. Сборка рибосом происходит в ядре, а именно в той его специфической области с диффузной структурой, которая называется **ядрышком**. В составе ядрышка выявляются большие петли ДНК, содержащие гены рРНК, которые с необычайно высокой скоростью транскрибируются РНК-полимеразой I. Эти петли носят название **ядрышковые организаторы**. Самое начало процесса сборки рибосомы можно увидеть в электронный микроскоп: 5'-концы рРНК-транскриптов, составляющих крону «елочек», компактизуются с образованием белоксодержащих гранул (см. рис. 8-51). Подобные гранулы не образуются на РНК-транскриптах других типов; по-видимому, они отражают первые стадии РНК-белкового взаимодействия, происходящего в ядрышке.

Биосинтетические функции ядрышка можно изучать с помощью кратковременного радиоактивного мечения новосинтезированной РНК. Через различные промежутки времени, прошедшие с момента включения метки, клеточное содержимое фракционируют и выделяют меченые ядрышки. Эти эксперименты показали, что интактные 45S-транскрипты сначала образуют крупные комплексы, связываясь с большим количеством различных белков, импортируемых из цитоплазмы, где синтезируются все клеточные белки (рис. 8-53). Эти белки включают бо́льшую часть из тех 70 полипептидных цепей, которые составляют рибосому. Кроме того, в состав комплексов входят другие белки и малые молекулы РНК; как предполагают, они катализируют сборку рибосом и остаются в ядрышке после того, как зрелые рибосомные субчастицы выходят в цитоплазму.

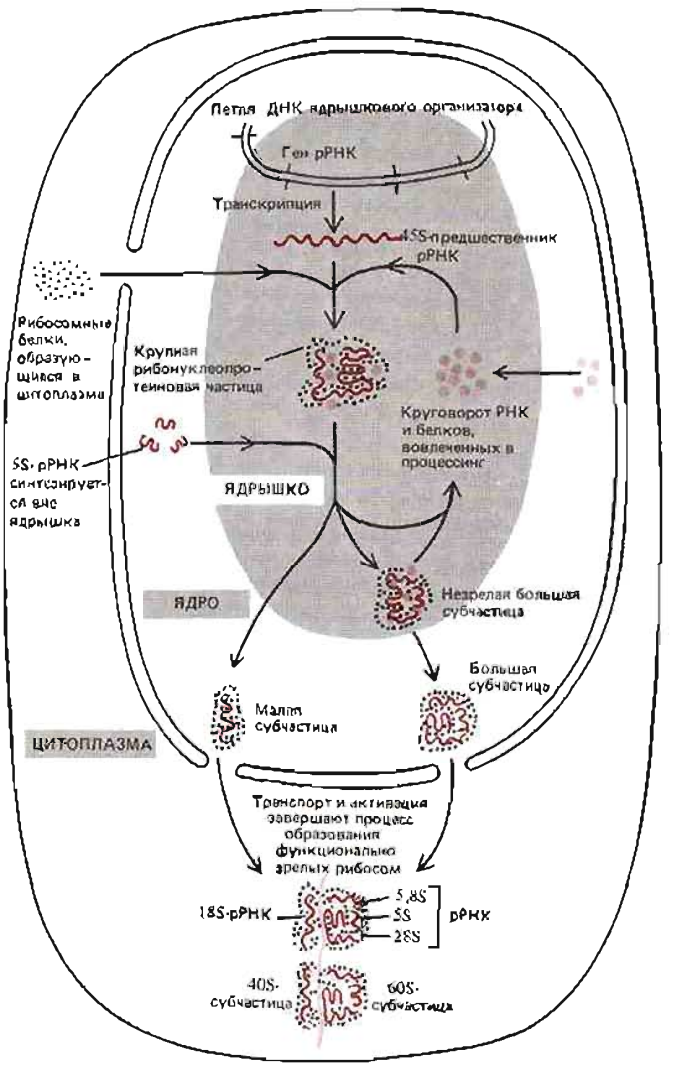


Рис. 8-53. Схема, иллюстрирующая функции ядрышка в биосинтезе рибосом. Гигантский 45S-рРНК-транскрипт упакован в составе крупной рибонуклеопротеиновой частицы, содержащей много рибосомных белков, импортированных из цитоплазмы. В ходе процессинга этой РНП-частицы, протекающего в ядрышке, формируются предшественники малой и большой рибосомных субчастиц; часть гигантского РНП-комплекса при этом деградирует. Предполагается, что окончательное созревание рибосомных субчастиц происходят лишь после того, как они (каждая индивидуально) транспортируются через ядерные поры в цитоплазму.

Во время процессинга 45S-РНК этот гигантский рибонуклеопротеиновый комплекс постепенно теряет часть белков и последовательностей РНК и затем специфически расщепляется, образуя самостоятельные предшественники большой и малой рибосомных субчастиц. Через 30 мин после введения радиоактивной метки первые зрелые малые субчастицы рибосом, содержащие меченую 18S-рРНК, выходят из ядрышка и появляются в цитоплазме. Сборка больших рибосомных субчастиц, содержащих 28S-, 5,8S- и 5S-РНК, требует несколько больше времени (около 1 ч); поэтому в ядрышке накапливается гораздо больше недостроенных больших субчастиц, чем малых.

Заключительные стадии созревания рибосом осуществляются только после выхода рибосомных субчастиц из ядра в цитоплазму. Этим достигается изоляция функционирующих рибосом от незрелых ядерных транскриптов, которым еще предстоит претерпеть процессинг и подготовиться к трансляции.

8.2.15. Ядрышко имеет весьма сложную структуру [31]

Обсуждая функции ядрышка, имеет смысл вспомнить, что́ сейчас известно о его строении. По данным световой микроскопии сфероидальное ядрышко — наиболее легко выявляемая структура в ядре немитотической клетки. Неуди-

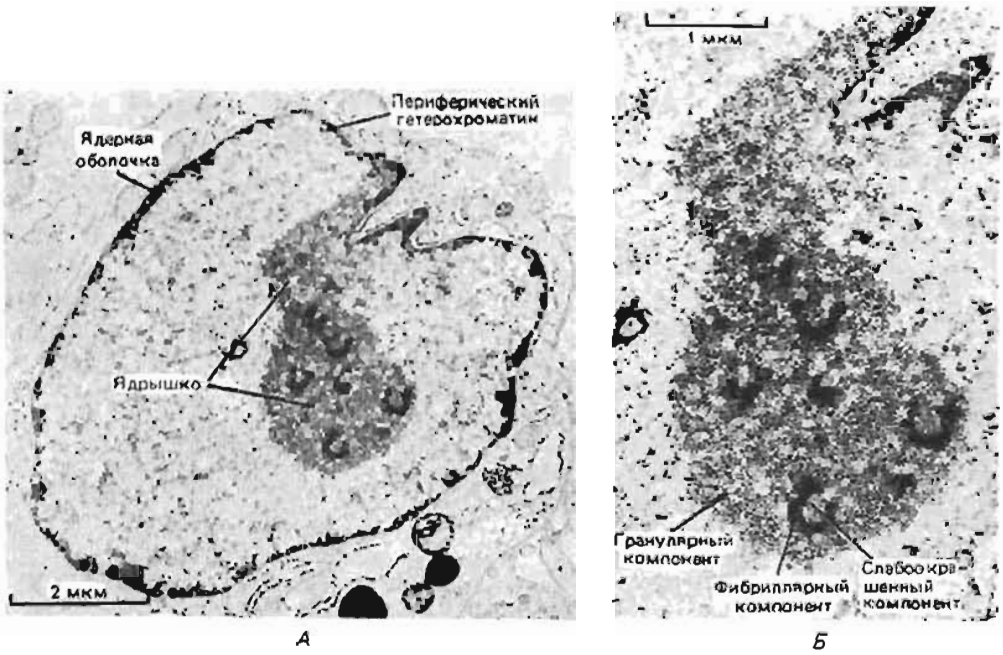


Рис. 8-54. Электронная микрофотография тонкого среза ядрышка в фибробласте человека, демонстрирующая его три дискретные зоны. *А*. Общий вид ядрышка. *Б*. Детализация. (С любезного разрешения E. G. Jordan, J. McGovern.)

вительно поэтому, что оно было столь скрупулезно изучено ранними цитологами: обзор по данной теме, датированный 1898 г., содержал около 700 ссылок. К 1940 г. выяснилось, что в ядрышке находится большое количество РНК и белков, однако его биологическая роль, связанная с синтезом рибосомных РНК и сборкой рибосом, оставалась неизвестной вплоть до 60-х годов.

Некоторые детали строения ядрышка можно увидеть с помощью электронной микроскопии. В отличие от цитоплазматических органелл ядрышко не имеет мембраны, которая окружала бы его содержимое; похоже, что оно образовано недозрелыми предшественниками рибосом, специфически связанными друг с другом неизвестным способом. На типичной электронной микрофотографии ядрышка можно различить три дискретные зоны (рис. 8-54): 1) *слабоокрашенный компонент*, содержащий ДНК из области ядрышкового организатора хромосомы, 2) *гранулярный компонент*, в состав которого входят частицы диаметром 15 нм, представляющие наиболее зрелые предшественники рибосомных частиц, и 3) плотный *фибриллярный компонент*, состоящий из множества тонких (5 нм) рибонуклеопротеиновых фибрилл, представляющих собой РНК-транскрипты.

Размер ядрышка отражает степень его функциональной активности, которая широко варьирует в различных клетках и может изменяться в индивидуальной клетке. Так, в некоторых покоящихся клетках растений ядрышко очень мало, тогда как в клетках, продуцирующих большое количество белков, оно может занимать до 25% всего объема ядра. Изменение размеров ядрышка связано главным образом с уменьшением или увеличением доли гранулярного компонента, что в свою очередь, вероятно, контролируется на уровне транскрипции рибосомных генов: по данным электронной микроскопии доля активных рибосомных генов, равно как и эффективность транскрипции каждого гена, изменяется в зависимости от обстоятельств.

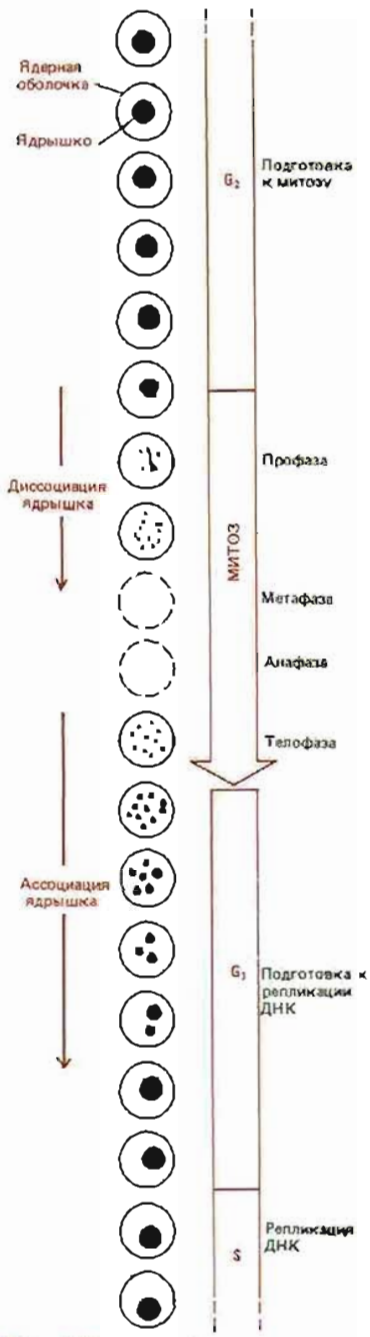


Рис. 8-55. Внешний вид ядрышка в клетках человека изменяется на разных стадиях клеточного цикла. На схеме изображено только клеточное ядро.

8.2.16. После каждого митоза ядрышко образуется заново из специфических участков хромосом [32]

Внешний вид ядрышка заметно изменяется в зависимости от фазы клеточного цикла (рис. 8-55). С началом митоза ядрышко уменьшается в размерах и затем вовсе исчезает по мере того, как происходит конденсация хромосом и прекращается синтез всех типов РНК; как правило, в метафазной клетке ядрышко не обнаруживается. В конце митоза (в телофазе), когда возобновляется синтез рибосомных РНК, участки хромосом, содержащие рибосомные гены, вновь образуют миниатюрные ядрышки.

В клетках человека гены рРНК локализуются на концах пяти пар хромосом, т. е. на 10 хромосомах из имеющихся 46 (рис. 8-56). Поэтому сразу после митоза в клетке образуется 10 маленьких ядрышек; их редко удается увидеть, так как они быстро растут и сливаются друг с другом в одно большое ядрышко, типичное для интерфазной клетки (рис. 8-57). Таким образом, диплоидная клетка человека на стадии, предшествующей синтезу ДНК, имеет одно ядрышко, в состав которого входят 10 индивидуальных петель ДНК – по одной от каждой из 10 хромосом. Процедура выделения ядрышек из клетки сопровождается обрывом этих петель (рис. 8-58).

Что же происходит с РНК и белковым компонентом дезагрегировавшего в процессе митоза ядрышка? По-видимому, какая-то часть их распределяется по всем метафазным хромосомам и переносится в ядра дочерних клеток; в телофазе митоза при деконденсации хромосом эти старые ядрышковые компоненты могут участвовать в построении новых ядрышек.

Заключение

Образование мРНК в клетке – сложный процесс, начинающийся с происходящих в ядре синтеза и процессинга гетерогенной ядерной РНК (гяРНК), после чего следует селективный транспорт РНК-транскриптов из ядра в цитоплазму. Первичный транскрипт гяРНК является продуктом деятельности РНК-полимеразы II; он кэпируется путем присоединения особого нуклеотида к его 5'-концу и, как правило, полиаденилируется на 3'-конце. Затем следует один или несколько этапов сплайсинга, в ходе которых из середины молекулы гяРНК вырезаются и удаляются участки, называемые интронами. В целом сплайсинг РНК ответствен за удаление и деградацию в ядре основной части первичного ядерного транскрипта. Поэтому хотя на долю гяРНК обычно приходится около половины общей массы новосинтезированной клеточной РНК, зрелая мРНК составляет лишь около 3% всей РНК в клетке.

В отличие от большинства генов, кодирующих белки, гены, которые кодируют РНК, имеющие самостоятельное функциональное значение, транскрибируются РНК-полимеразами I и III; обычно эти гены представлены в геноме большим числом копий, часто образующих кластеры тандемных повторов. РНК-полимераза III синтезирует молекулы тРНК, а также входящую в состав рибосом 5S-РНК. Синтез гигантского предшественника рибосомных РНК осуществляется РНК-полимеразой I в специализированной внутриядерной органелле, называемой ядрышком, в котором находятся гены рибосомных РНК (рДНК). рДНК представляет собой специализированные участки (так называемые ядрышковые организаторы) нескольких хромосом. Ядрышко служит местом сборки всех клеточных рибосом.

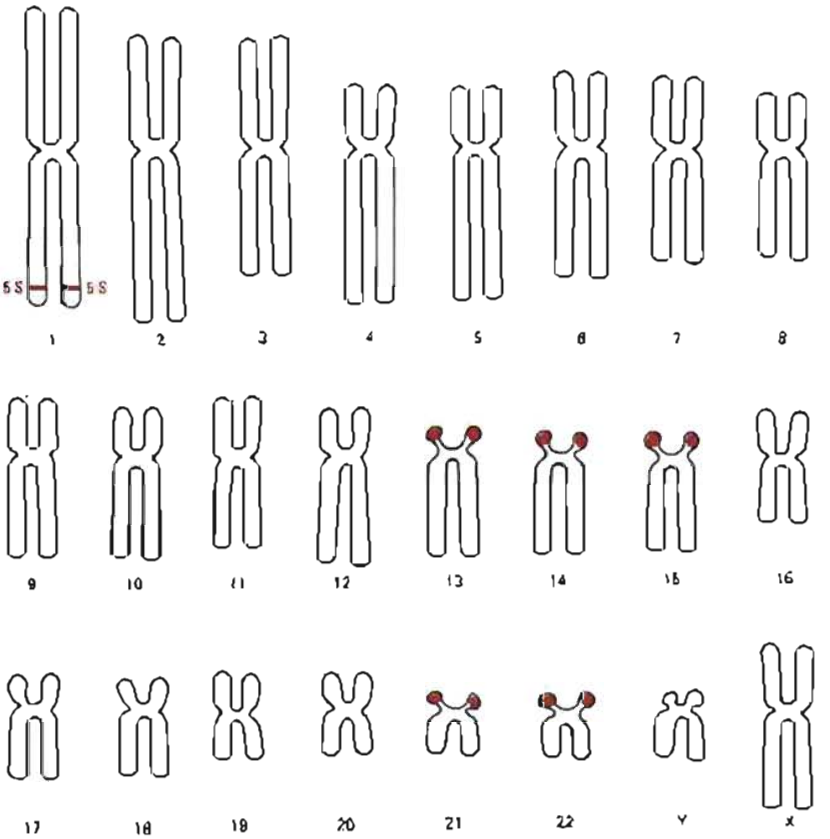


Рис. 8-56. Набор митотических хромосом человека. Цветом выделены участки, где находятся рибосомные гены в хромосомах 13, 14, 15, 21 и 22 (эти участки входят в состав ядрышкового организатора) и гены 5S-рРНК в хромосоме 1. Данные получены в экспериментах по гибридизации in situ митотических хромосом с соответствующими, радиоактивно мечеными молекулами РНК (разд. 4.5.6). Из каждой пары гомологичных хромосом показана только одна хромосома, состоящая из двух хроматид. На самом деле во всех диплоидных клетках, находящихся на стадии митоза, присутствует по две копии каждой из показанных здесь пронумерованных хромосом, а также либо две Х-хромосомы (у женщин), либо одна Х- и одна Y-хромосома (у мужчин); каждая хромосома состоит из пары идентичных хроматид (см. рис. 8-22).

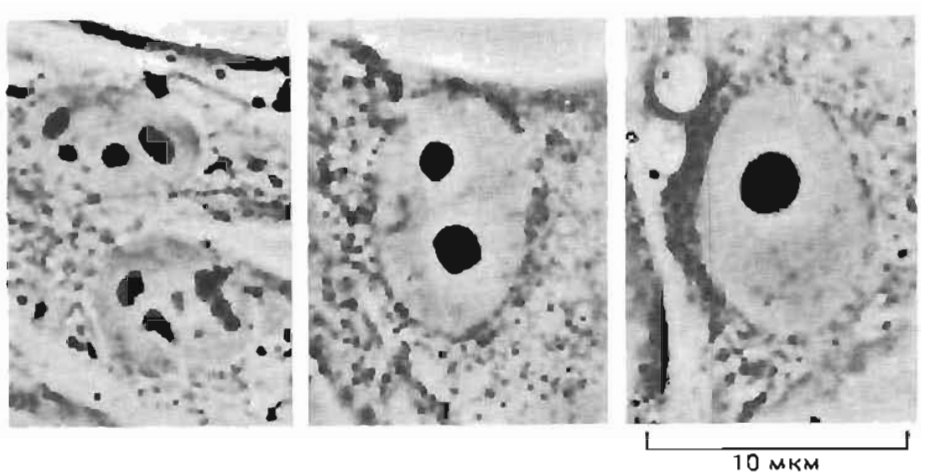


Рис. 8-57. Микрофотографии культивируемых фибробластов человека, демонстрирующие различные стадии ассоциации ядрышка. (С любезного разрешения E. G. Jorden и J. McGovern.)

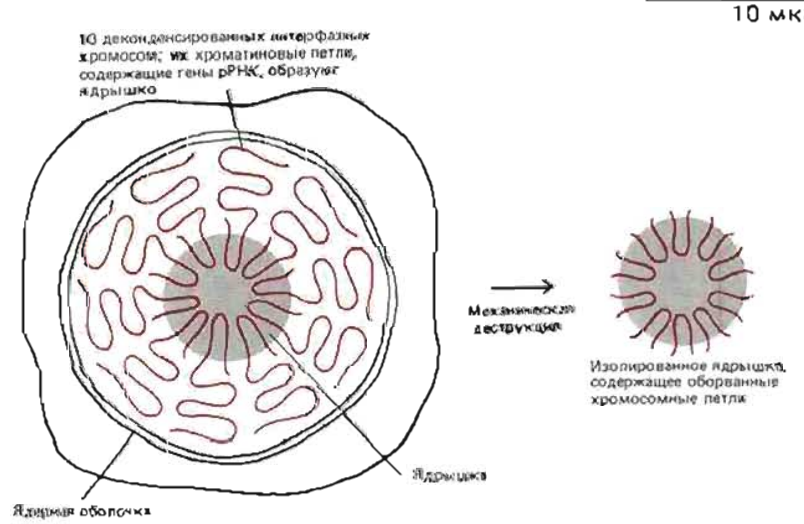


Рис. 8-58. Упрощенная схема клетки человека, иллюстрирующая участие хроматиновых петель, принадлежащих 10 отдельным хромосомам и содержащих гены рРНК, в образовании одного большого ядрышка. Препараты очищенных ядрышек весьма полезны в биохимических исследованиях функций ядрышка; получают такие препараты путем механического отделения образующих ядрышко хроматиновых петель от хромосом, как показано на рисунке.

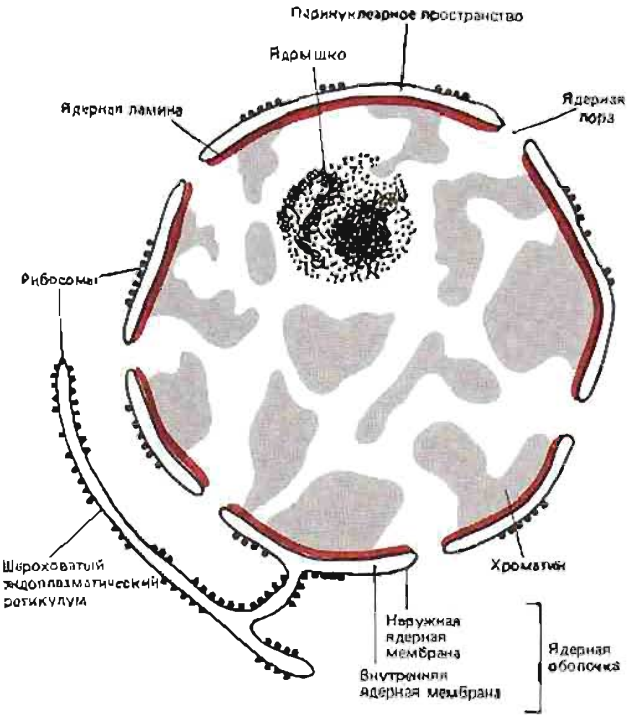


Рис. 8-59. Схематическое изображение поперечного среза типичного клеточного ядра. Ядерная оболочка представляет собой двойную мембрану. Наружная мембрана является продолжением мембраны эндоплазматического ретикулума. Липидные бислои внутренней и наружной ядерных мембран сливаются друг с другом в стенках ядерных пор.

8.3. Ядерная оболочка [33]

8.3.1. Ядро окружено двойной мембраной [34]

Содержимое клеточного ядра (**нуклеоплазма**) отделено от цитоплазмы **ядерной оболочкой**. Ядерная оболочка образована двойной мембраной, представляющей собой два липидных бислоя, которые разделены полостью шириной от 20 до 40 нм, называемой **перинуклеарным пространством** (рис. 8-59 и 8-60). На электронных микрофотографиях хорошо видно, что **наружная ядерная мембрана** составляет единое целое с мембранной системой эндоплазматического ретикулума (ЭР); подобно мембранам шероховатого эндоплазматического ретикулума (ШЭР), внешняя (обращенная к цитоплазме) поверхность наружной ядерной мембраны часто бывает усеяна функционирующими рибосомами (рис. 8-61). Поскольку полость ЭР сообщается с перинуклеарным пространством (рис. 8-60), последнее вместе с наружной ядерной мембраной может рассматриваться как небольшой специализированный отдел эндоплазматического ретикулума (см. табл. 7-2).

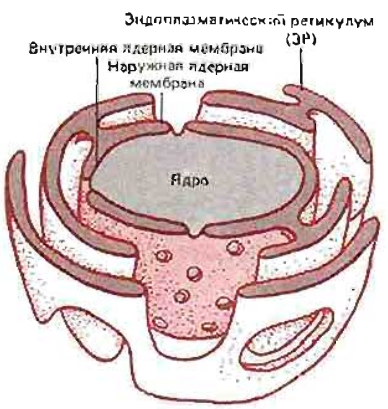


Рис. 8-60. Трехмерная модель, иллюстрирующая взаимосвязь эндоплазматического ретикулума и ядерных мембран.

В определенных участках ядерной оболочки, называемых *ядерными порами*, наружная мембрана смыкается с **внутренней ядерной мембраной**. Таким образом, обе мембраны являются составными частями единой мембранной системы (рис. 8-62), хотя, как мы увидим в дальнейшем, они довольно сильно разнятся по биохимическим свойствам и функциям. Благодаря тому, что ядерная оболочка неразрывно связана с ЭР, как внутренняя, так и наружная ядерные мембраны могут расти, а также быстро сокращать или увеличивать свою поверхность за счет мембран ЭР (рис. 8-62). В частности, этим обеспечивается возможность быстрой дезинтеграции и последующей реорганизации ядерной оболочки в процессе митоза (т. 3, разд. 11.5.11). Площадь поверхности ядерных мембран также резко увеличивается, когда ядро, прежде находившееся в состоянии покоя, начинает активно синтезировать РНК или ДНК.

Одно из преимуществ бинарной мембранной системы заключается в том, что внутренняя и наружная мембраны ядра по-разному специализированы

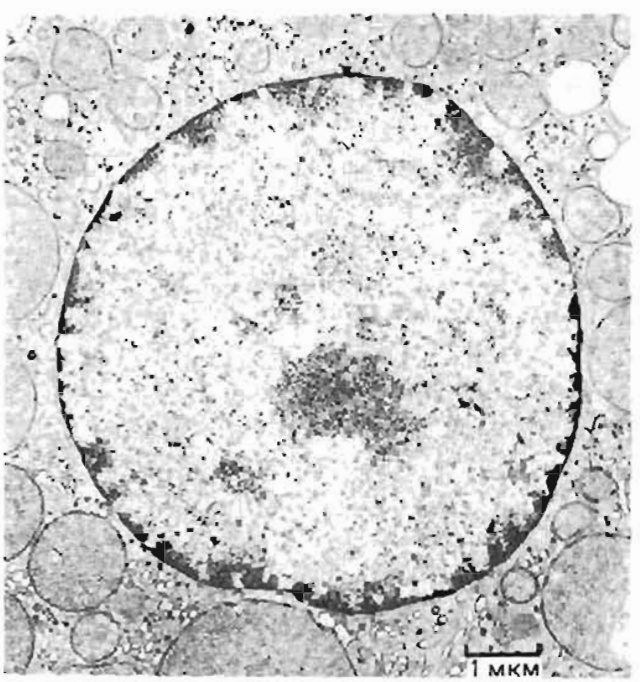


Рис. 8-61. Электронная микрофотография тонкого среза ядра клетки из коры надпочечника. Поскольку бо́льшая часть хроматина находится в деконденсированной интерфазной форме, индивидуальные хромосомы неразличимы. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

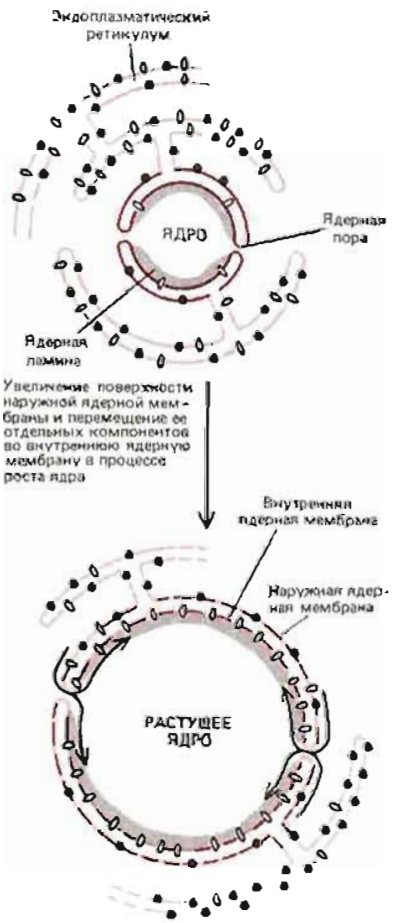


Рис. 8-62. Схема, иллюстрирующая быстрое увеличение площади ядерной оболочки в конце телофазы нормального клеточного цикла или при активации синтеза РНК или ДНК в ядре покоившейся клетки.

в плане взаимодействия их с ближайшим окружением: в одном случае это компоненты нуклеоплазмы, а в другом – компоненты цитоплазмы. Например, некоторые интегральные белки внутренней ядерной мембраны, как предполагают, специфически взаимодействуют с нижележащим белковым слоем, называемым *ядерной ламиной (пластинкой)*.

8.3.2. Ядерная ламина способствует поддержанию формы ядра [35]

К внутренней мембране ядерной оболочки со стороны нуклеоплазмы примыкает электроноплотный слой (рис. 8-63), который называется **фибриллярной**



Рис. 8-63. Электронная микрофотография ядра клетки млекопитающего. Отчетливо видна ядерная ламина толщиной около 40 нм. Во многих клетках ламина намного тоньше и потому обычно неразличима на электронных микрофотографиях подобного типа. (С любезного разрешения L. Gerace.)

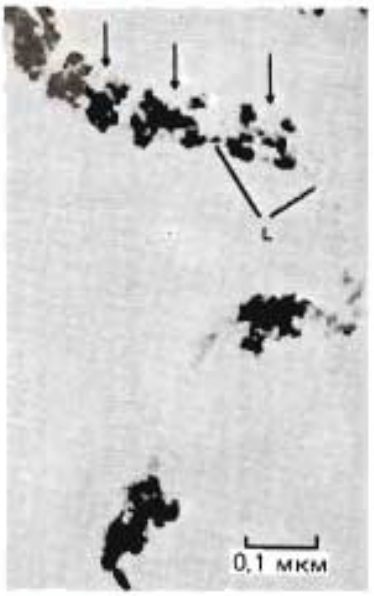


Рис. 8-64. Электронная микрофотография участка изолированной ядерной ламины (L) с прикрепленными к ней ядерными поровыми комплексами (показаны стрелками). (Dwyer N., Blobel G., J. Cell Biol., 70, 581–591, 1976.)

(или ядерной) ламиной (пластинкой). Она имеет различную толщину в разных клетках; в отдельных случаях ее даже не удается различить под микроскопом. Однако результаты биохимических исследований указывают на то, что ядерная ламина присутствует практически во всех эукариотических клетках и, по всей видимости, играет ключевую роль как в формировании ядерной оболочки, так и в организации нижележащего хроматина.

Ядерная ламина имеет волокнистую сетеподобную структуру и может быть выделена из клетки как единое целое в свободном от мембран виде. При этом она остается связанной со специализированными белками, выстилающими поры ядерной мембраны (рис. 8-64). В клетках позвоночных ламина формируется в основном в результате спонтанной ассоциации трех главных полипептидов, которые, как предполагают, присоединяются к специфическим интегральным белкам липидного бислоя внутренней мембраны. Некоторые другие компоненты, входящие в состав ламины, по-видимому, связываются с определенными участками хроматина, обеспечивая таким образом его взаимодействие с ядерной оболочкой. На рис. 8-65 показана микрофотография клеток, окрашенных флуоресцирующими антителами к белкам ядерной ламины. Схематически строение ламины и ее взаимоотношение с хроматином изображены на рис. 8-66.

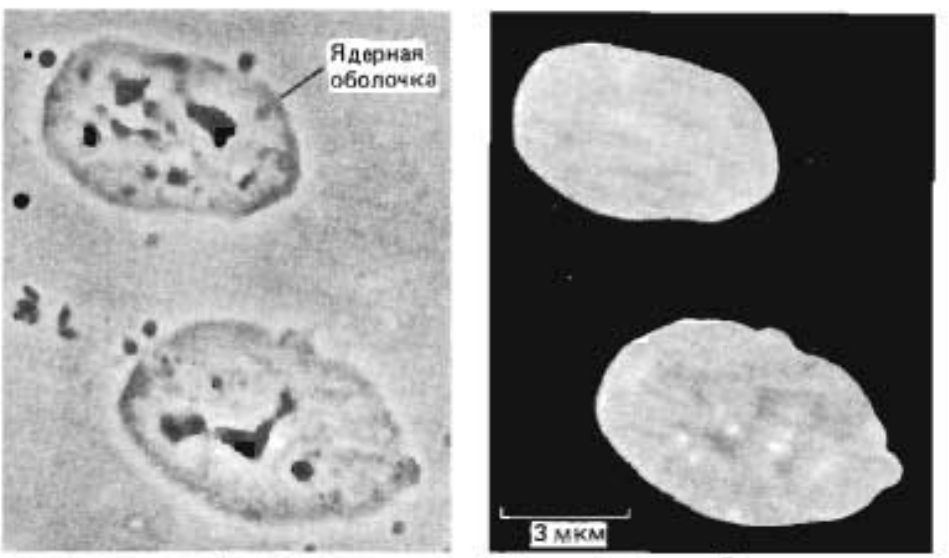


Рис. 8-65. *А*. Микрофотография двух выращенных в культуре клеток млекопитающего, полученная с помощью обычного светового микроскопа. *Б*. Флуоресцентная микрофотография тех же клеток, полученная после окрашивания белков ламины иммунофлуоресцентным красителем. Видны только ядра клеток. (С любезного разрешения F. McKeon и M. Kirschner.)

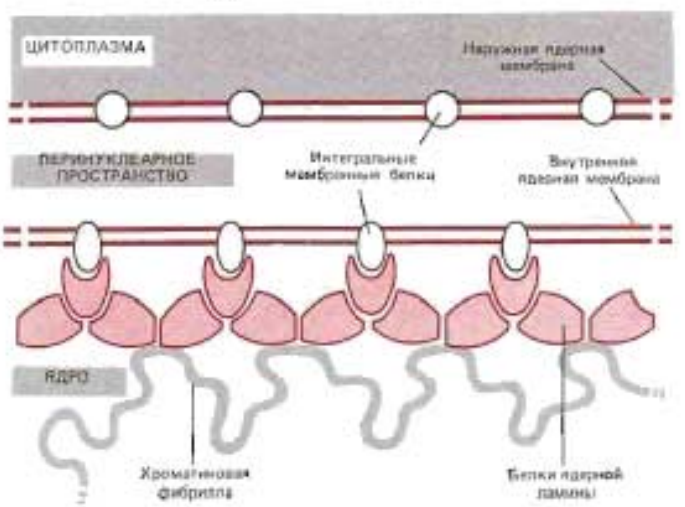


Рис. 8-66. Упрощенная схема строения ядерной ламины, представляющей собой разветвленную сеть белковых фибрилл, имеющих субъединичное строение. Ламина является структурным каркасом ядерной оболочки и содержит участки специфического связывания хроматина. Три главных полипептида, составляющих ламину в клетках позвоночных, имеют мол. массу от 60 000 до 70 000.

Полипептиды, образующие ламину, по-видимому, ответственны за дезинтеграцию и реорганизацию ядерной оболочки в процессе митоза. В прометафазе бо́льшая часть этих белков отделяется от мембраны и переходит в цитоплазму. Предполагается, что эта обратимая дезагрегация контролируется путем обратимого фосфорилирования трех главных белков ядерной ламины и в конечном итоге служит причиной разрушения ядерной оболочки во время митоза (т. 3, разд. 11.5.11).

8.3.3. Ядерный транспорт осуществляется через ядерные поры [36]

В силу определенных причин, уже обсуждавшихся ранее (разд. 7.6), бинарные мембранные системы, подобные ядерной оболочке, представляют серьезное препятствие для молекулярного транспорта. Эта проблема разрешена благодаря существованию **ядерных пор**, пронизывающих ядерную оболочку всех эукариотических клеток – от дрожжей до человека. Поры окружены большими кольцевыми структурами (их внутренний диаметр составляет приблизительно 80 нм), которые называются **ядерными поровыми комплексами**. По обе стороны ядерной оболочки каждый поровый комплекс представлен восемью белковыми гранулами, равномерно распределенными по окружности поры (рис. 8-67, *А* и 8-68). На поперечных срезах ядерной оболочки видно, что поровый комплекс пронизывает перинуклеарное пространство, выстилая канал поры в зоне контакта внутренней и внешней ядерной мембраны (рис. 8-67). По всей видимости, эти участки соприкосновения двух мембран дают возможность жирорастворимым молекулам (липидам и мембранным белкам) перетекать из мембраны эндоплазматического ретикулума, где они синтезируются, во внутреннюю ядерную мембрану (см. рис. 8-62).

Отверстие, видимое в центре каждого комплекса, – это скорее всего собственно поровый канал, посредством которого обеспечивается обмен водорастворимыми молекулами между ядром и цитоплазмой. Просветы пор часто бывают закупорены крупными гранулами (это так называемые гранулы порового комплекса), которые, как предполагают, представляют собой новообразованные рибосомы или какие-то другие частицы, зафиксированные на данных препаратах в момент их продвижения по поровому каналу (рис. 8-67). Хотя прямые экспериментальные доказательства молекулярного транспорта через ядерные поры отсутствуют, существует много косвенных указаний на

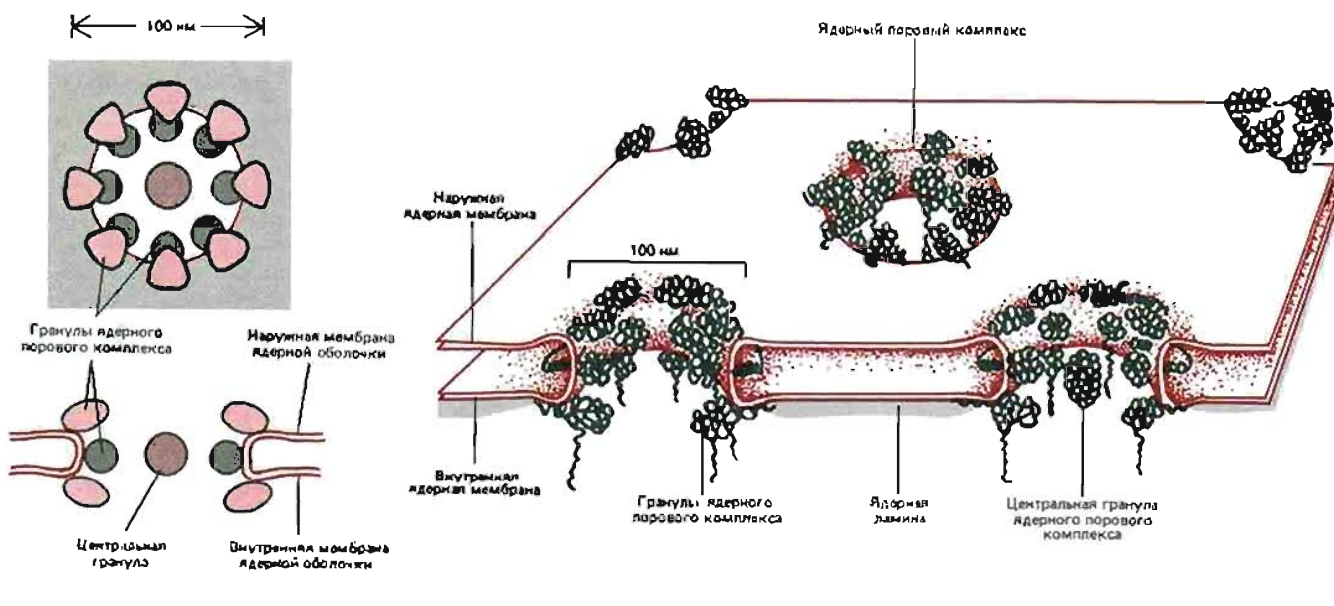


Рис. 8-67. Схема, показывающая расположение ядерных поровых комплексов в ядерной оболочке. *А.* Вид сверху и разрез по диаметру. Центральная гранула, выделенная коричневым цветом, в некоторых порах отсутствует; возможно, эти гранулы являются составной частью пор, однако не исключено, что они представляют собой просто крупные частицы, зафиксированные в момент прохождения порового канала. *Б.* Трехмерная модель небольшого участка ядерной оболочки.

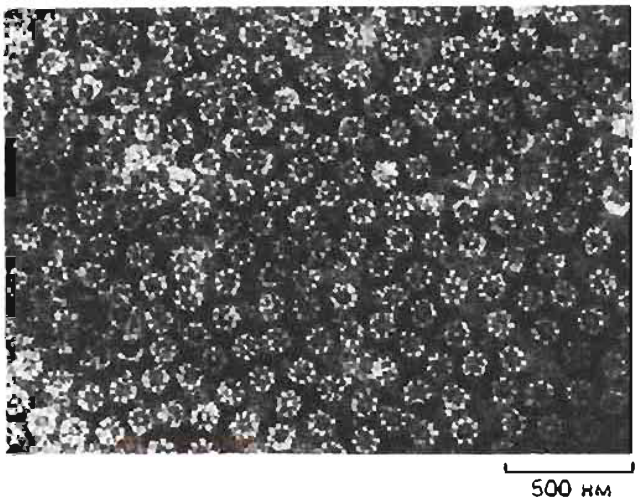


Рис. 8-68. Электронная микрофотография негативно контрастированного препарата ядерных поровых комплексов. Хорошо видны расположенные по окружности каждой поры восемь крупных гранул; по своим размерам эти гранулы превосходят рибосомы. (С любезного разрешения A. C. Fabergé.)

то, что он все-таки имеет место. Например, введенные в клетку небольшие молекулы (с мол. массой до 5000) столь быстро проникают в ядро, что ядерную оболочку следует считать для них полностью проницаемой. В то же время для белков с мол. массой 17 000 выравнивание концентраций между цитоплазмой и ядром происходит за 2 мин. В случае же белков с мол. массой 44 000 этот процесс занимает уже 30 мин. Введенные в клетку глобулярные белки с мол. массой, превышающей 60 000, оказались практически неспособными проникнуть в ядро. Количественный анализ результатов этих экспериментов показал, что описанными свойствами обладает двойная мембрана, поровые комплексы которой формируют заполненные водой цилиндрические каналы диаметром 9 нм и длиной 15 нм (рис. 8-69). Эти размеры не так уж плохо согласуются с размерами небольших, нерегулярно расположенных открытых каналов, обнаруживаемых на некоторых электронных микрофотографиях.

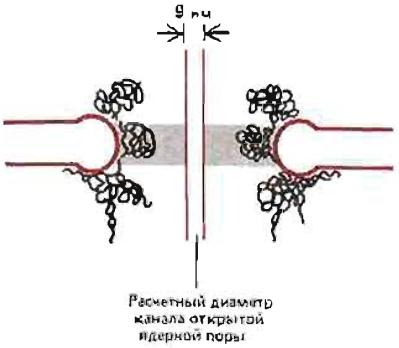


Рис. 8-69. Продольный разрез ядерного порового комплекса. Воображаемый цилиндр, изображенный в центре поры, показывает эффективный размер открытого порового канала, рассчитанный на основе данных, полученных при изучении ядерного транспорта. На некоторых электронных микрофотографиях можно различить едва видимые нити, заполняющие внутреннее пространство поры; не исключено, что именно присутсвие этих нитей приводит к уменьшению просвета поры до 9 нм.

Ядерная оболочка изолирует нуклеоплазму от множества частиц, филаментов и макромолекул, функционирующих в цитоплазме. Например, зрелая цитоплазматическая рибосома слишком велика, чтобы проникнуть в ядро сквозь гипотетический канал, диаметр которого составляет 9 нм, и это служит гарантией того, что весь белковый синтез происходит исключительно в цитоплазме.

8.3.4. Ядерные поры, вероятно, обеспечивают избирательный транспорт крупных частиц [36]

Определенные выводы, касающиеся количества переносимого через ядерные поры материала, можно сделать, приняв во внимание тот факт, что ядерная оболочка типичной животной клетки содержит от 3000 до 4000 поровых комплексов (примерно 11 пор на 1 мкм^2 поверхности ядерной мембраны; сравните: если бы поры были расположены в ядерной оболочке с максимальной плотностью, то на 1 мкм^2 поверхности ядра приходилось бы 60 пор). Клетка, синтезирующая ДНК, должна обеспечить перенос из цитоплазмы в ядро примерно по 10^6 молекул гистонов каждые 3 мин для упаковки новосинтезированной ДНК в нуклеосомы. Это значит, что за 1 мин через каждую пору должно пройти около 100 гистоновых молекул. Если это быстрорастущая клетка, то за 1 мин через каждую пору в цитоплазму переносятся три новообразованные рибосомы. И это лишь малая часть всего молекулярного транспорта, осуществляемого через ядерные поры.

Транспортировка из ядра в цитоплазму новообразованных рибосомных субчастиц – особенно трудная проблема. Диаметр этих частиц составляет около 15 нм, т.е. они слишком велики, чтобы иметь возможность свободно

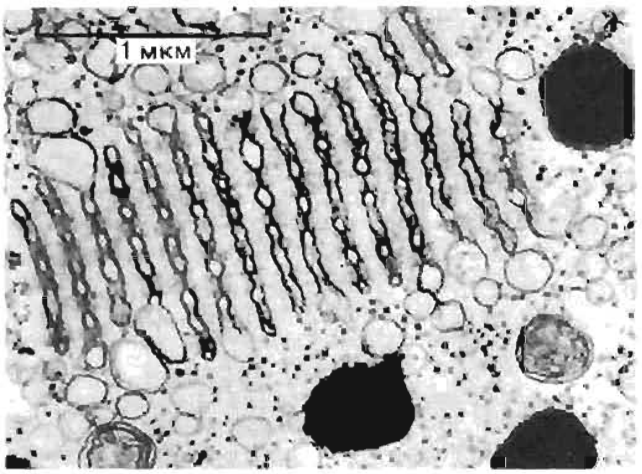


Рис. 8-70. Стопка окончатых мембран в цитоплазме зрелого ооцита лягушки (поперечный срез). (С любезного разрешения Kessel R. J., Ultrastruct. Res., Supplement 10, 1968.)

проходить через каналы в ядерных порах диаметром 9 нм. Общепринятой считается точка зрения, согласно которой эти частицы транспортируются через ядерные поры с помощью системы избирательного активного переноса; активный транспорт с участием ядерных комплексов, по-видимому, сопряжен с изменением ряда конформационных параметров переносимой частицы. Подтверждением этому могут служить электронные микрофотографии частиц, которые, как предполагают, были зарегистрированы в момент прохождения первого канала, а также тот факт, что ядерные поровые комплексы дают четкую положительную реакцию при окрашивании на рибонуклеопротеины. По всей видимости, молекулы мРНК, которые в комплексе со специфическими белками образуют рибонуклеопротеиновые частицы, также экспортируются в цитоплазму с помощью системы избирательного активного переноса.

Аналогичные проблемы возникают и в связи с необходимостью импорта в ядро крупных макромолекул, например ДНК- и РНК-полимераз, имеющих мол. массы от 100 000 до 200 000. Можно допустить, что эти белки принимают вытянутую палочкообразную форму и в таком виде как-то втискиваются концом вперед в просвет порового канала. Альтернативный способ состоит в том, что указанные белки взаимодействуют со специфическим белком-рецептором, входящим в состав порового комплекса; этот белок переносит молекулу субстрата через ядерную пору, увеличивая диаметр ее канала.

В некоторых (но не во всех) клетках белковые комплексы, идентичные ядерным поровым комплексам, обнаруживаются в цитоплазме в составе отдельных, собранных в стопки мембранных образований, называемых **окончатыми мембранами** (рис. 8-70). Эти структуры наиболее часто встречаются в зародышевых клетках, а также в клетках с высокой белок-синтетической активностью, в том числе в большинстве опухолевых клеток. Возможно, они представляют собой резервный материал ядерной оболочки; с другой стороны, их присутствие в клетке, может быть, служит указанием на то, что ядерные поровые комплексы имеют и другую функцию, отличную от транспортной. Например, они могли бы принимать непосредственное участие в процессинге РНК и сборке рибосом. Однако пока ядерные поровые комплексы остаются в числе важных клеточных структур, тайны которых еще предстоит раскрыть современной биохимии.

8.3.5. Внутренняя поверхность ядерной ламины выполняет функцию структурного организатора хромосом [37]

Внешняя поверхность ядерной ламины, вероятно, играет важную роль в формировании ядерных поровых комплексов, а также в поддержании формы



Рис. 8-71. Электронная микрофотография препарата ядерной оболочки споры папоротника, полученная методом замораживания — скалывания. Видно строго упорядоченное расположение ядерных поровых комплексов в виде параллельных рядов. (С любезного разрешения Don H. Northcote по Roberts K., Northcote D., Microsc. Acta, 71, 102–120, 1971.)

ядра; внутренняя же ее поверхность контактирует со специфическими участками интерфазных хромосом и обеспечивает их связь с внутренней ядерной мембраной. Все эти структурные функции ламины проявляются в тесной взаимосвязи. Так, хроматин, который находится на самой периферии ядра – под внутренней ядерной мембраной (сильно конденсированный хроматин, хорошо видимый на электронных микрофотографиях), очевидно, не случайно отсутствует в области ядерных пор и вокруг них (см. рис. 8-63): это обеспечивает свободу сообщения между цитоплазмой и нуклеоплазмой и отражает наличие определенных изменений в структурной организации ламины в этих участках.

Возможно, у читателя сложилось впечатление, что ядерная оболочка представляет собой относительно малоупорядоченную структуру: на ее поверхности случайным образом разбросаны поры, а к внутренней поверхности так же случайно там и тут прикреплены гранулы хроматина. Однако было бы почти заведомой ошибкой предполагать, что какая-нибудь важная внутриклеточная органелла может быть построена по законам случая. И ядро здесь не исключение. К тому же довольно часто ядерные поры располагаются в строгом порядке. Например, на рис. 8-71 видны параллельные ряды ядерных пор, которые удалось наблюдать на удлиненном ядре споры папоротника. В некоторых клетках встречаются поры, сконцентрированные в отдельных участках ядерной оболочки, а также необычные районы ядерной поверхности, совершенно лишенные пор. Все эти специфические области ядерной оболочки в свою очередь имеют неслучайную ориентацию относительно самой клетки (рис. 8-72). Характер их распределения, как предполагают, отражает особенности организации ядерной ламины.

В клетках некоторых типов отдельные специфические участки хромосом без труда обнаруживаются в интерфазном ядре благодаря своей необычной структуре или характерным цитохимическим свойствам. Так, у дрозофилы каждая из четырех хромосом участвует в образовании *хромоцентра*, который чрезвычайно эффективно окрашивается ДНК-специфическими флуоресцентными красителями. Если исследовать клетки дрозофилы на ранних стадиях ее эмбрионального развития, то можно заметить, что хромоцентр каждой клетки эмбриона ориентирован строго по направлению к его внешней поверхности (рис. 8-73). Аналогично гигантские интерфазные хромосомы, характерные для политенных клеток личинок дрозофилы, обнаруживают одинаковую трехмерную структуру и пространственную ориентацию в соседних клетках (рис. 8-74). Подобные наблюдения наводят на мысль, что в ядрах по крайней мере некоторых клеток имеет место специфическое связывание хромосом с определенными участками ядерной ламины. Таким образом, внутренняя поверхность ядерной оболочки может выполнять функцию дополнительного организатора хромосом.



Рис. 8-72. Электронная микрофотография одного из участков ядерной оболочки сперматозоида, полученная методом замораживания–скалывания. Показано кластерированное расположение ядерных пор.

Заключение

Клеточное ядро окружено оболочкой, состоящей из двух концентрических мембран. Наружная ядерная мембрана является частью мембранной системы ЭР, а перинуклеарное пространство между наружной и внутренней ядерными мембранами сообщается с полостью ЭР. Клеточная РНК всех типов, а также рибосомы производятся в ядре и затем экспортируются в цитозоль, тогда как все белки, функционирующие в ядре, синтезируются в цитозоле и должны импортироваться в ядро. Обмен веществом между ядром и цитозолем, по всей видимости, осуществляется посредством ядерных пор, которые, по сути, представляют собой каналы, образующиеся в местах соприкосновения внутренней и внешней ядерных мембран. Ядерный поровый комплекс, выстилающий канал поры,–это крупная белковая надмолекулярная структура, в организации и поддержании которой важную роль, вероятно, играет ядерная

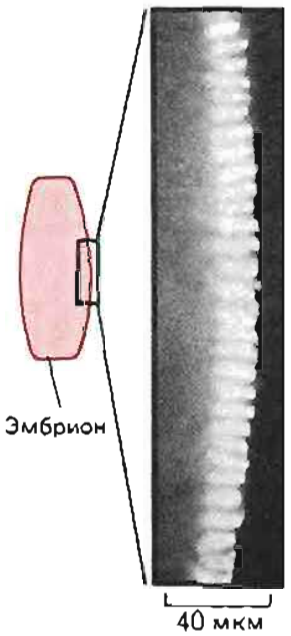


Рис. 8-73. Полученная при небольшом увеличении микрофотография флуоресцентно окрашенных хромосом в интерфазных клетках эмбриона дрозофилы на стадии бластулы. Обратите внимание, что наиболее ярко окрашенная область – это хромоцентр, который образован специфическими участками всех четырех хромосом (см. рис. 8-29). В каждой клетке он расположен так, что находится у внешней поверхности эмбриона. (С любезного разрешения J. Sedat.)

ламина – густая сеть белковых фибрилл, выстилающих изнутри внутреннюю ядерную мембрану. Ядерная ламина способствует поддержанию формы ядра и выполняет функцию структурного организатора хромосом.

8.4. Основные элементы контроля экспрессии генов [38]

Многие индивидуальные клетки высших организмов довольно сильно отличаются друг от друга как по морфологии, так и по функциям (т. I, схема II). Поскольку высокоспециализированные клетки обычно производят большие количества белков лишь одного или в крайнем случае всего нескольких типов, нельзя исключить возможность того, что клеточная дифференцировка связана с амплификацией определенных последовательностей ДНК, кодирующих эти белки. С другой стороны, тот факт, что клеточная дифференцировка практически всегда необратима, дает основания некоторым биологам считать, что в этот процесс вовлечена избирательная элиминация некоторых последовательностей ДНК (или генов). Однако ни одно из этих предположений не нашло экспериментального подтверждения. Лишь за очень небольшим исключением (мы подробно обсудим это несколько позже), клеточная дифференцировка, по-видимому, обусловлена изменением спектра экспрессирующихся последовательностей ДНК в клетке и не сопровождается какими-либо необратимыми изменениями в структуре самих последовательностей.

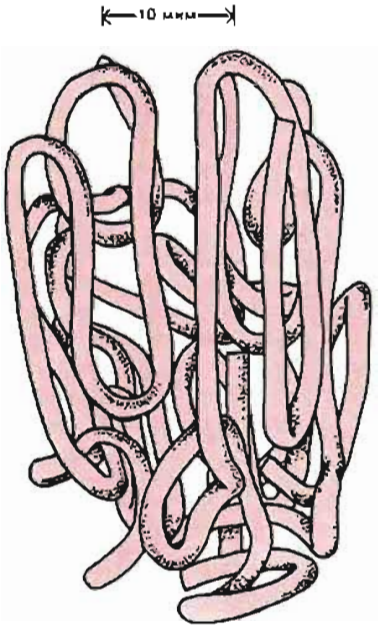


Рис. 8-74. Гигантские политенные хромосомы из клеток слюнных желез дрозофилы уложены в ядре каждой клетки весьма сложным, но вполне определенным способом. Создание приведенной на рисунке трехмерной модели их укладки потребовало кропотливого анализа большой серии срезов флуоресцентно окрашенных хромосом индивидуальной клетки. (Рисунок сделан по фотографии, любезно предоставленной D. Agard и J. Sedat.)

8.4.1. Все клетки многоклеточного организма содержат одинаковые последовательности ДНК [39]

Лучшим свидетельством того, что все клетки, составляющие данный животный организм, имеют совершенно одинаковый геном, служат результаты экспериментов, описанных в гл. 15. В этих опытах ядро, изолированное из полностью дифференцированной клетки лягушки, вводили в лягушачью яйцеклетку, собственное ядро которой было удалено. При этом донорное ядро оказалось способным «руководить» развитием реципиентной яйцеклетки, которая в конце концов превратилась в нормального головастика. Таким образом, ядро исходной дифференцированной донорной клетки обеспечило развитие всего множества дифференцированных клеток, составляющих тело головастика. Следовательно, геном индивидуальной дифференцированной клетки сохраняет потенциальную возможность обеспечивать и другие пути клеточной дифференцировки, а это в свою очередь означает, что в процессе дифференцировки не происходит утраты каких-либо функционально важных последовательностей ДНК. Аналогичные выводы можно сделать и на основе экспериментов с растительными организмами. Кусочки дифференцированных тканей культивировали в искусственной среде и затем диссоциировали на отдельные клетки. Часто одна из таких клеток давала начало целому растению (рис. 8-75).

Дополнительным указанием на то, что при дифференцировке клеток позвоночных не происходит ни потери, ни какой-либо заметной перестройки отдельных участков геномной ДНК, могут служить картины распределения по-

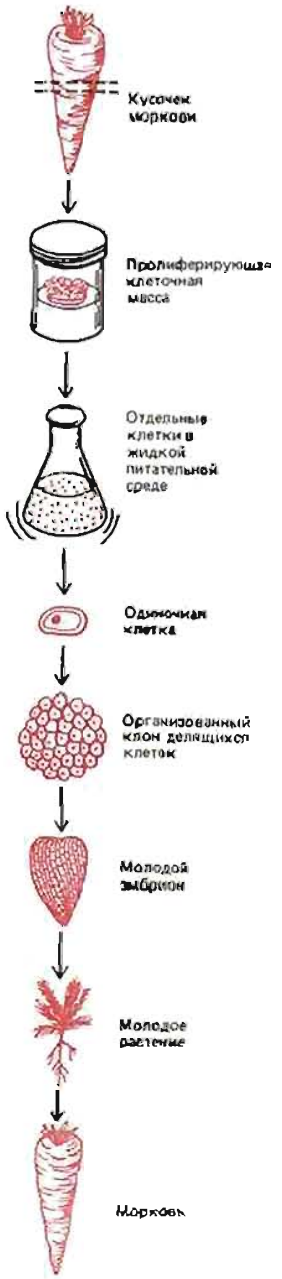


Рис. 8-75. Схема эксперимента, который может быть выполнен на различных растениях. Многие дифференцированные растительные клетки сохраняют способность к «дедифференцировке»: в определенных условиях они дают начало клону клеток, который может развиться в целый организм (см. гл. 19).

лос (сегментов) на конденсированных метафазных хромосомах в клетках различных типов (см. рис. 8-25 и 8-26). По этому критерию хромосомные наборы всех дифференцированных клеток человека, вероятно, идентичны.

Гораздо более чувствительные тесты, основанные на методах с использованием рекомбинантных ДНК (т. 1, разд. 4.5), позволили исключить также и амплификацию ДНК из числа предполагаемых механизмов клеточной дифференцировки. Полученные данные свидетельствуют, что количественно преобладающие белки, характерные для каждого данного типа дифференцированных клеток, кодируются генами, представленными в геноме лишь единичными копиями; это имеет место даже в тех случаях, когда клетка всецело посвящает себя производству какого-то одного белка. Например, в эритроцитах цыпленка функционально активные гены гемоглобиновых субъединиц представлены в единственном числе. Аналогичная ситуация наблюдается в случае фиброина шелка, синтезируемого клетками шелкоотделительных желез шелкопряда, и овальбумина куриного яйца, синтезируемого клетками яйцевода курицы. Более того, все эти гены, равно как и окружающие их нуклеотидные последовательности, оказались идентичными во всех исследованных животных клетках независимо от того, производят клетки данные белки или нет. Проведенные исследования показали, что большинство других последовательностей ДНК, кодирующих белки, одинаковы во всех дифференцированных клетках.

8.4.2. Клетки различных типов синтезируют разные наборы белков [40]

В многоклеточном организме клетки различных типов отличаются друг от друга прежде всего тем, что синтезируют разные наборы белков. Но сколь велики должны быть эти различия в свойствах белков, для того чтобы создать две такие разные клетки, как мышечное волокно и фибробласт? Мы пока еще не знаем ответа на этот фундаментальный вопрос и вынуждены довольствоваться некоторыми общими рассуждениями.

1. Поскольку многие функции являются общими для всех клеток, любые две клетки одного и того же организма синтезируют множество одинаковых белков. К ним относятся ряд богато представленных (мажорных) белков, таких, как белки цитоскелета, гистоны и негистоновые белки хромосом, некоторые мембранные белки эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, белки ядерной ламины, компоненты различных РНК-белковых комплексов, рибосом и т. д. Мажорные клеточные белки охарактеризовать сравнительно легко; многие из них идентичны в различных типах клеток. Значительная часть ферментов, катализирующих центральные реакции метаболизма (т. 1, рис. 2-35), также идентична во всех клетках многоклеточного организма.
2. Некоторые мажорные белки высокоспецифичны: эти белки не выявляются даже с помощью высокочувствительных методов ни в каких других клетках, кроме тех, в которых они функционируют. Например, гемоглобин присутствует лишь в эритроцитах, хотя последовательности ДНК, кодирующие различные цепи этого белка, имеются в геноме всех клеток млекопитающих.
3. Уникальные особенности морфологии и физиологии различных специализированных клеток предполагают существование большого числа белков, специфичных для клеток данного типа, однако с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле (т. 1, разд. 4.3.6) мы можем различить, а следовательно, и сравнить всего около 2000 наиболее изобильно представленных белков (по 50 000 копий или больше на клетку). Этот метод дает сходные результаты, если сравнивать две различные клеточные линии, выращенные в культуре (например, мышечные и нервные клетки), или же клетки двух дифференцированных тканей (например, печени, почек или легких) у молодых грызунов. Подавляющее большинство выявленных

белков синтезируется во всех исследованных типах клеток, причем эффективность синтеза различается в зависимости от типа клетки не более чем в 5 раз. Лишь небольшой процент белков синтезируется либо в клетках только какого-нибудь одного типа, либо в различных клетках, но с очень разной эффективностью.

Судя по имеющемуся числу различных последовательностей мРНК, типичная клетка высших организмов синтезирует от 10 000 до 20 000 разных белков (см. табл. 8-1), многие из которых присутствуют в настолько низкой концентрации, что их не удается обнаружить даже с помощью двумерного гель-электрофореза. Если эти минорные белки в разных клетках различаются (или, наоборот, сходны между собой) в такой же степени, как и белки, относящиеся к более обильным классам, следует признать, что относительно небольшие изменения в спектре синтезируемых клеткой белков способны очень сильно изменять все ее поведение и структуру. Вместе с тем даже в этом случае можно утверждать, что у высших организмов клетки различных типов синтезируют существенное число различающихся белков, несмотря на, казалось бы, очевидную идентичность их геномов.

8.4.3. В клетках различных типов транскрибируются разные наборы генов [41]

Выяснив, что различия между клетками разных типов обусловлены присутствием определенных, специфичных для данных клеток белков, остается определить, на каком уровне осуществляется контроль белкового синтеза. На пути, ведущем от ДНК к белку, этот контроль может реализоваться практически на любой стадии (рис. 8-76). В принципе мы выделяем следующие контрольные точки: 1) время и характер транскрипции данного гена (**контроль на уровне транскрипции**); 2) характер процессинга первичного РНК-транскрипта (**контроль на уровне процессинга**); 3) отбор в ядре зрелых мРНК, предназначенных для экспорта в цитоплазму (**контроль на уровне транспорта**); 4) отбор в цитоплазме мРНК для трансляции на рибосомах (**контроль на уровне трансляции**); 5) избирательная стабилизация определенных типов мРНК в цитоплазме (**контроль на уровне деградации мРНК**). Хотя удельный вес разных уровней регуляции белкового синтеза может варьировать в зависимости от типа клетки и от конкретного белка, не вызывает сомнения, что один из важнейших элементов этого регуляторного механизма функционирует на первой из перечисленных выше стадий – на стадии образования первичного РНК-транскрипта.



Рис. 8-76. Схема, иллюстрирующая пять предполагаемых уровней, на которых может осуществляться контроль экспрессии генов у эукариот.

Наиболее убедительные результаты, свидетельствующие о важности контроля на уровне транскрипции, были получены при проведении экспериментов, в которых сравнивали ядерную РНК, синтезированную в клетках печени, с ядерной РНК, образующейся в клетках мозга. В таких экспериментах предусматривается использование клонированных кДНК-зондов, синтезированных на суммарной мРНК клеток печени (т. I, разд. 4.5.3). Сначала ядра, выделенные из клеток печени и мозга, инкубируют с высокомеченным радиоактивным предшественником РНК – рибонуклеозидтрифосфатом (см. рис. 5.1), в результате чего все РНК-транскрипты, синтезированные в этих ядрах, оказываются радиоактивно мечеными. Дальнейшие экспериментальные процедуры схематически изображены на рис. 8-77 и 8-78.

Целью данных опытов было выяснение вопроса о том, содержит ли гяРНК из клеток мозга нуклеотидные последовательности, входящие в состав цитоплазматической мРНК из клеток печени, но отсутствующие в цитоплазматической мРНК из клеток мозга. В этих опытах гяРНК из клеток печени служила положительным контролем, поскольку она заведомо содержит такие последовательности. В той мере, в какой позволяет ограниченная чувствительность данного метода, удалось достоверно показать, что в гяРНК клеток мозга нет участков гомологии с какой-либо из 11 различных мРНК, специфичных для клеток печени. Отсутствие этих мРНК, а значит, и кодируемых

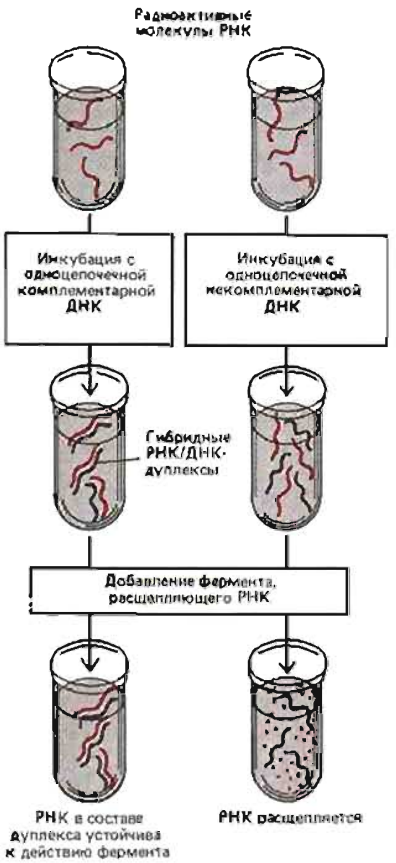


Рис. 8-77. Схема стандартного метода выявления радиоактивно меченных молекул РНК, имеющих определенную нуклеотидную последовательность. В том случае, если молекулы РНК могут образовать гибридный РНК/ДНК-дуплекс с одноцепочечным фрагментом ДНК, используемым в качестве специфического зонда, эти молекулы остаются неповрежденными в процессе нуклеазной обработки и легко обнаруживаются по радиоактивной метке. В экспериментах, описанных в тексте, очищенные сегменты ДНК, соответствующие различным генам, были получены с помощью клонирования молекул кДНК, которые в свою очередь были синтезированы путем обратной транскрипции суммарной мРНК печени (разд. 4.5.3). Каждый из этих фрагментов ДНК использовался в качестве зонда в отдельном эксперименте (см. рис. 8-78).

ими белков в цитоплазме клеток мозга можно отнести в первую очередь на счет блокирования транскрипции соответствующих генов в этих клетках. Иными словами, данные об 11 случайно отобранных специфичных для печени мРНК свидетельствуют о том, что различия между клетками печени и мозга контролируются в основном на уровне транскрипции.

Чувствительность описанного теста была не очень высока: если в клетках мозга уровень транскрипции специфичных для печени генов снижался в 10–50 раз (в зависимости от конкретных условий), то это оценивалось как полное ее отсутствие. Однако в некоторых особо благоприятных случаях удавалось с гораздо большей точностью определить, насколько активно транскрибируется данная последовательность ДНК в клетках различных типов. Эти исследования показали, что интенсивность транскрипции индивидуальной последовательности ДНК в разных клетках может различаться в 1 000 000 раз.

В целом эти данные указывают на то, что подавление транскрипции неэкспрессирующихся генов происходит значительно полнее у эукариот, чем у бактерий (у которых максимальная разница в уровнях транскрипции индивидуального гена, находящегося в активном и неактивном состояниях, оценивается как 1000-кратная). Отсюда следует вывод, что механизмы, выключающие транскрипцию неэкспрессирующихся генов у высших эукариот, по крайней мере в некоторых случаях отличаются от бактериальных (в первую очередь существенно более высокой эффективностью).

Разговор о контроле на уровне транскрипции мы начнем с обсуждения общей схемы генетического контроля, приложимой и к бактериям, и к эукариотам. У бактерий регуляторные белки, присоединяясь к специфическим последовательностям ДНК, могут включать или выключать транскрипцию генов. Функционирование таких *белков-репрессоров* и *белков-активаторов* в составе бактериальных регуляторных систем изучено довольно хорошо и может, по всей видимости, служить рабочей моделью при исследовании гораздо более сложных механизмов, регулирующих активность генов у эукариот.

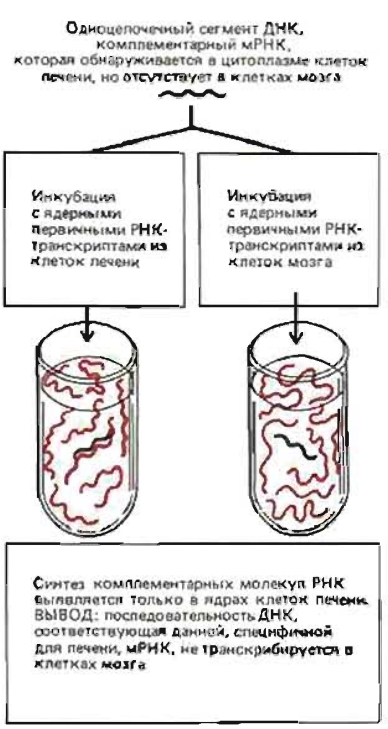


Рис. 8-78. Схема эксперимента, демонстрирующего, что экспрессия генов в клетках млекопитающих контролируется главным образом на уровне транскрипции (см. также рис. 8-77).

8.4.4. Белки-репрессоры ингибируют транскрипцию некоторых бактериальных генов [42]

Хромосома *E. coli* представляет собой единственную кольцевую молекулу ДНК, которая содержит около $3 \cdot 10^6$ пар оснований. В принципе такого количества достаточно для кодирования приблизительно 2500 различных белков,

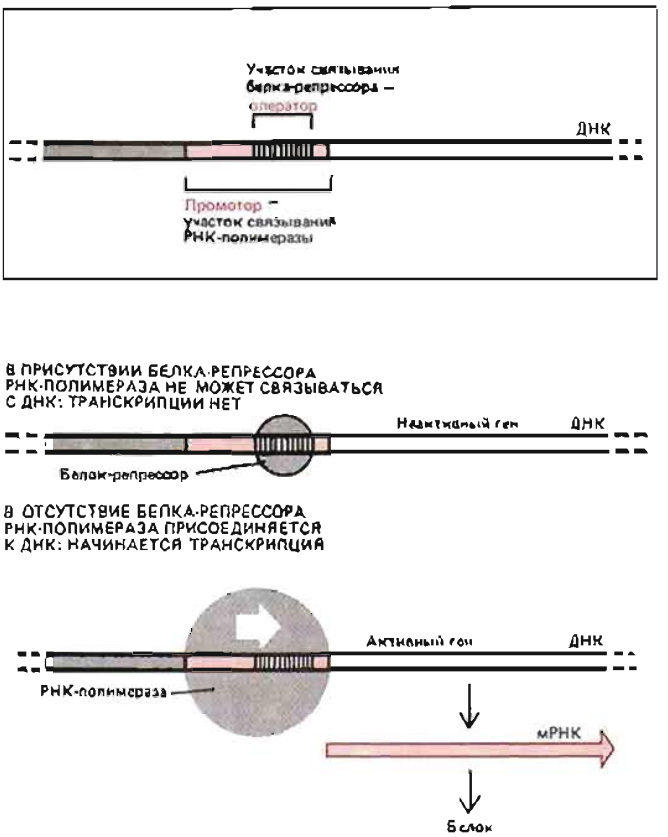


Рис. 8-79. Схема, иллюстрирующая, каким образом специфические белки-репрессоры контролируют транскрипцию генов у прокариот. Белок-репрессор и РНК-полимераза прочно связываются с разными последовательностями ДНК, которые называются соответственно оператором и промотором.

однако в каждый данный момент времени синтезируется лишь определенная часть всех этих белков. Экспрессия многих генов *E. coli* зависит от внутриклеточного уровня специфических метаболитов.

Регуляция генной активности у прокариот практически полностью осуществляется на уровне транскрипции. Первые работы, направленные на выяснение механизмов генетического контроля, были проведены в 50–60-е годы на *E. coli*. Это были исследования, посвященные синтезу ферментов, которые в бактериальной клетке осуществляют гидролиз дисахарида лактозы до моносахаридов глюкозы и галактозы. В конечном итоге эти опыты привели к открытию **белка-репрессора лактозного оперона**, связывание его со специфическими участками ДНК уже обсуждалось ранее (разд. 8.1.6). Этот белок выключает транскрипцию индивидуального гена путем связывания с так называемым **оператором** – последовательностью ДНК длиной 21 нуклеотид, которая представлена в геноме *E. coli* одной копией и перекрывается с последовательностью, служащей участком связывания РНК-полимеразы (так называемым **промотором**). До тех пор пока репрессор остается связанным с оператором, доступ для РНК-полимеразы к ее участку связывания оказывается закрытым; в результате транскрипции прилежащего района ДНК не происходит (рис. 8-79).

Лактозный репрессор в свою очередь находится под контролем небольшой углеводной молекулы аллолактозы, которая образуется в клетке в присутствии лактозы. Когда внутриклеточное содержание аллолактозы достигает достаточно высокого уровня, она, выполняя функцию аллостерического регулятора, индуцирует конформационные изменения в молекуле репрессора (т. 1, разд. 3.4.8). При этом его связь с ДНК ослабляется настолько, что он отделяется от нее, освобождая промотор и давая возможность РНК-полимеразе транскрибировать прилежащие области ДНК. В этом случае говорят о *дерепрессии* гена. Такая система регуляции позволяет *E. coli* производить фер-

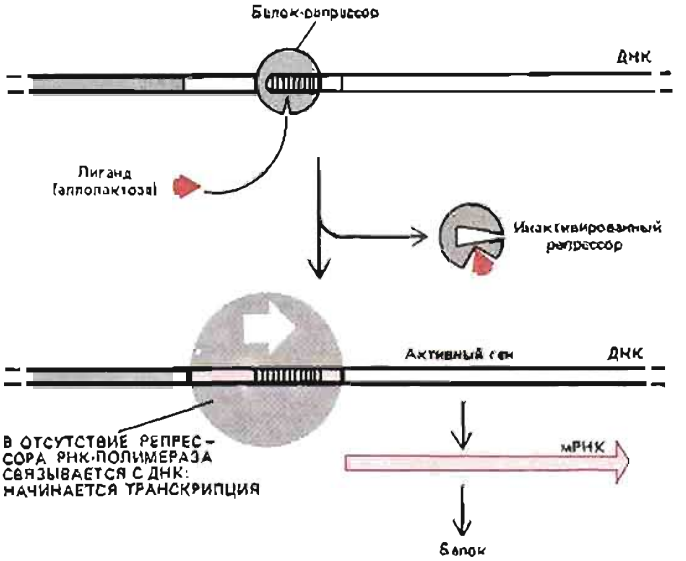


Рис. 8-80. Схема дерепрессии генов у бактерий. Специфическая небольшая молекула (в данном случае аллолактоза) выполняет роль лиганда, присоединяющегося к белку-репрессору (здесь белок-репрессор лактозного оперона) и вызывающего отделение последнего от ДНК, в результате чего происходит активация определенных генов. В описываемом случае один РНК-транскрипт кодирует три различных белка, вовлеченных в метаболизм лактозы; поскольку три гена, кодирующие эти белки, расположены один за другим и регуляция их осуществляется строго координированно, каждый из этих генов рассматривается как часть лактозного *оперона*.

менты, необходимые для расщепления лактозы только тогда, когда в клетке присутствует лактоза (рис. 8-80).

Такого рода специфическая репрессия генов широко распространена у бактерий. В каждом случае существует специальный сигнальный лиганд (например, та же аллолактоза), который служит аллостерическим эффектором в отношении определенного **белка-репрессора**, обладающего сродством к специфическому операторному участку ДНК. При связывании лиганда с белком-репрессором его сродство к ДНК снижается и благодаря этому включается транскрипционная единица, прилежащая к последовательности оператора. Поэтому повышение концентрации лиганда активирует транскрипцию данного гена. Сигнальные лиганды могут с равным успехом использоваться и для выключения транскрипционных единиц. В этом случае вызываемые аллостерическим эффектором конформационные изменения в молекуле белка-репрессора не снижают, а, наоборот, *повышают* его сродство к ДНК. Естественно, что повышение концентрации такого лиганда приведет к подавлению транскрипции соответствующего гена. Следует, однако, подчеркнуть, что оба описанных механизма в принципе одинаковы: и в том и в другом случае транскрипция осуществляется с большей эффективностью в отсутствие регуляторного белка. Поэтому генетический контроль такого типа называется **негативной регуляцией**.

8.4.5. В клетках высших эукариот, по-видимому, более распространены белки-активаторы генной активности [43]

Альтернативным способом генетического контроля является регуляция с помощью **белков-активаторов** (рис. 8-81). Некоторые транскрипционные единицы *E. coli* имеют относительно слабые участки связывания РНК-полимеразы, которые, однако, могут в значительной степени активироваться благодаря присоединению к прилежащим специфическим последовательностям ДНК определенных регуляторных белков. В отличие от белков-репрессоров, присоединяющихся к ДНК в области промотора таким образом, что при этом блокируется участок связывания РНК-полимеразы, белки-активаторы, наоборот, облегчают «посадку» РНК-полимеразы, так как присоединяются к ДНК у самой границы промотора. Однако во всех других отношениях белки-активаторы очень похожи на репрессоры. Подобно этим последним, они часто обладают способностью соединяться со специфическими сигнальными лигандами, которые либо повышают, либо понижают их

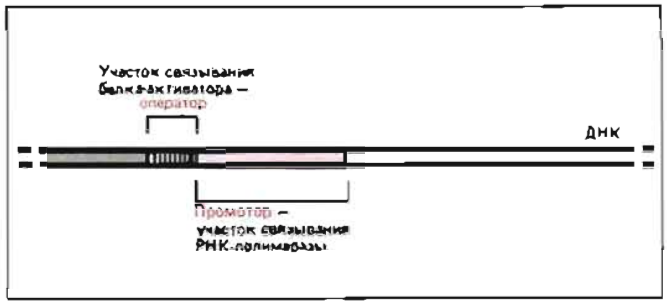


Рис. 8-81. Схема, иллюстрирующая, каким образом специфические белки-активаторы контролируют транскрипцию генов у прокариот. В данном случае промоторная последовательность ДНК имеет довольно слабое сродство к РНК-полимеразе, и прочное связывание последней достигается только в присутствии белка-активатора, присоединяющегося к расположенной по соседству с промотором операторной последовательности. Сравните этот механизм со схемой репрессии генов (рис. 8-79).

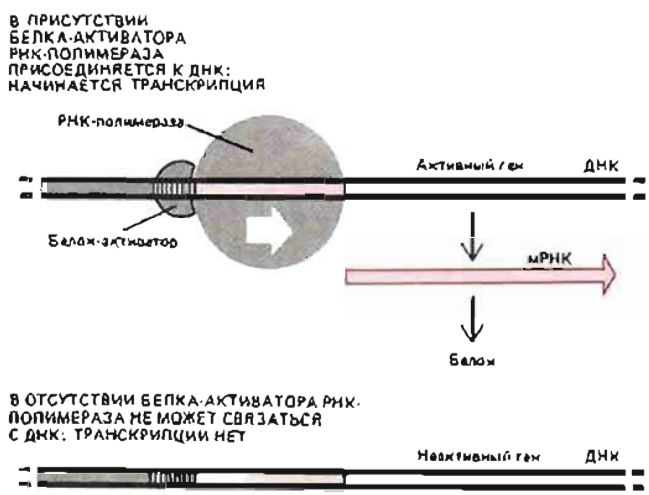
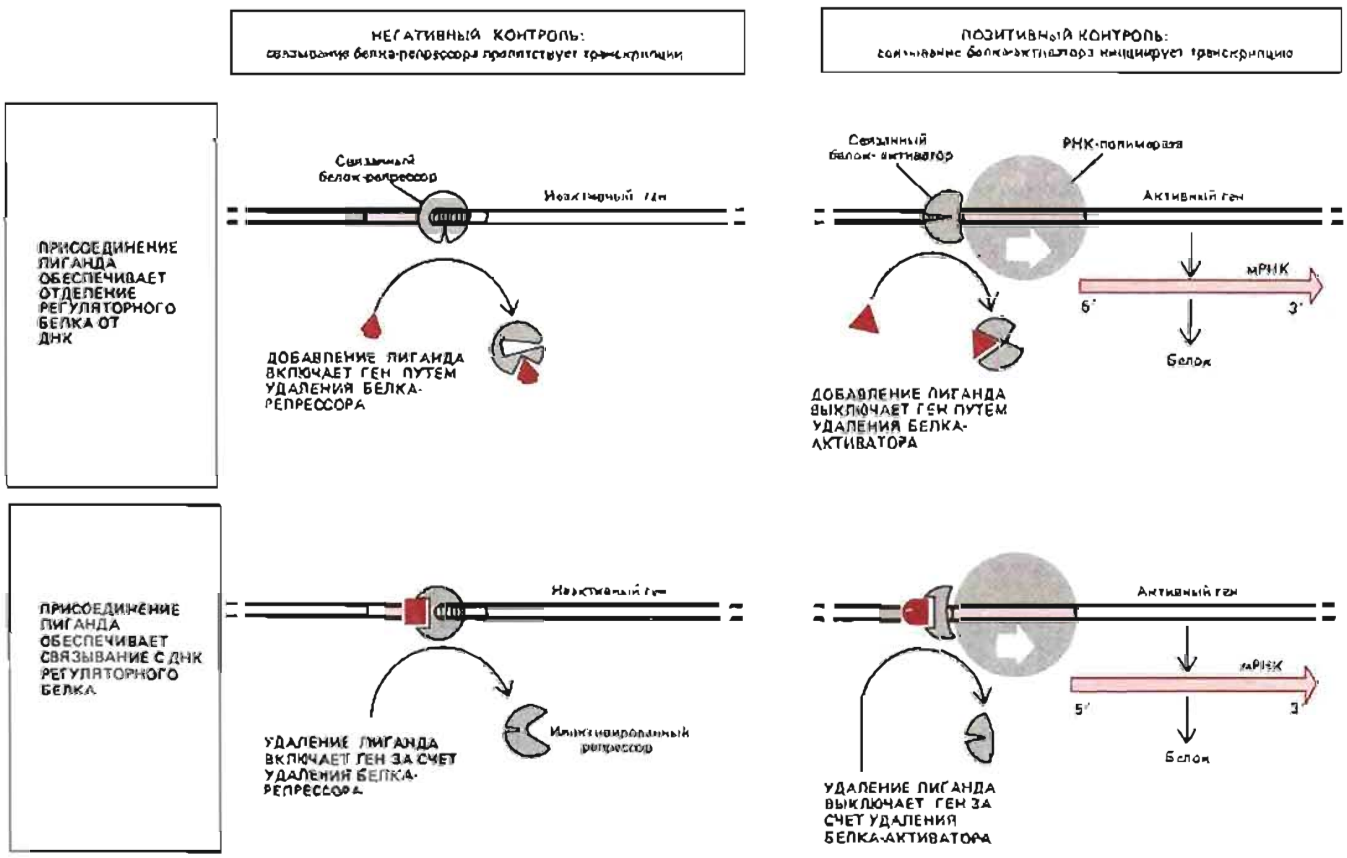


Рис. 8-82. Обобщенная схема различных механизмов, с помощью которых специфические регуляторные белки контролируют транскрипцию генов у прокариот. Обратите внимание, что лиганд-индуктор может включить ген, либо обеспечивая удаление белка-репрессора (*слева вверху*), либо способствуя присоединению к ДНК белка-активатора (*справа внизу*). Аналогично, лиганд-ингибитор может выключить ген как путем удаления белка-активатора (*справа вверху*), так и путем связывания белка-репрессора с ДНК (*слева внизу*).



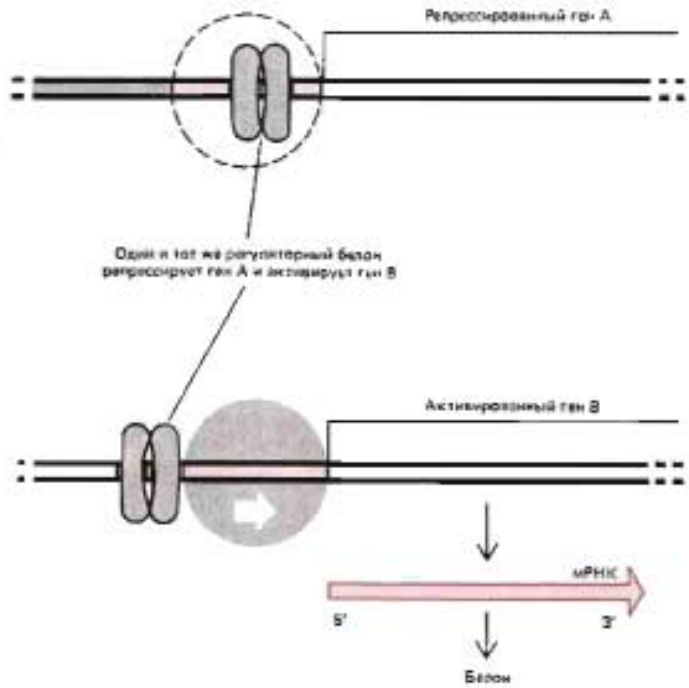


Рис. 8-83. Схема, иллюстрирующая, каким образом присоединение к ДНК одного регуляторного белка может вызвать репрессию транскрипции гена А и в то же время активировать транскрипцию гена В. Некоторые бактериальные белки-регуляторы генной активности характеризуются подобным функциональным дуализмом.

сродство к ДНК и таким путем соответственно включают или выключают гены. Такая регуляция транскрипционной активности генов носит название **позитивной регуляции**, поскольку эффективность синтеза РНК повышается в присутствии регуляторного белка. Принципы позитивного и негативного генетического контроля схематически изображены на рис. 8-82.

Некоторые бактериальные белки-регуляторы способны связываться с геномной ДНК не в одном, а в нескольких участках ее молекулы; причем в зависимости от того, где расположен конкретный участок связывания, данный белок может выступать как в роли репрессора, так и в роли активатора транскрипции. Такая двойственность функции обусловлена различным взаимным расположением в хромосоме участков связывания белка-регулятора и промотора РНК-полимеразы (рис. 8-83). Существует ряд косвенных указаний на то, что некоторые регуляторные белки эукариот также могут функционировать в качестве либо позитивных, либо негативных регуляторов генной активности (это зависит от особенностей конкретного гена). Между тем в типичной эукариотической клетке вообще транскрибируется только 7% всех последовательностей ДНК. Весьма маловероятно, чтобы остальные 93% ДНК были заблокированы десятками тысяч различных высокоспециализированных белков-репрессоров. Из соображений здравого смысла следует, что клетки высших организмов должны использовать вместо этого какие-то общие механизмы репрессии генов. Например, логично допустить, что в большинстве своем регуляторные белки действуют как активаторы транскрипционной активности генов, включая при необходимости те или иные транскрипционные единицы.

8.4.6. Благодаря взаимодействию двух регуляторных белков, каждый из которых блокирует синтез другого, бактериальная клетка обладает устойчивой «памятью» [43]

Эукариотические клетки реагируют на внешние сигналы (например, гормоны) в принципе так же, как бактериальные клетки реагируют на изменения концентрации питательных веществ в окружающей среде, а именно путем обратимой активации или репрессии отдельных генов (т. 3, разд. 13.2.1). Однако

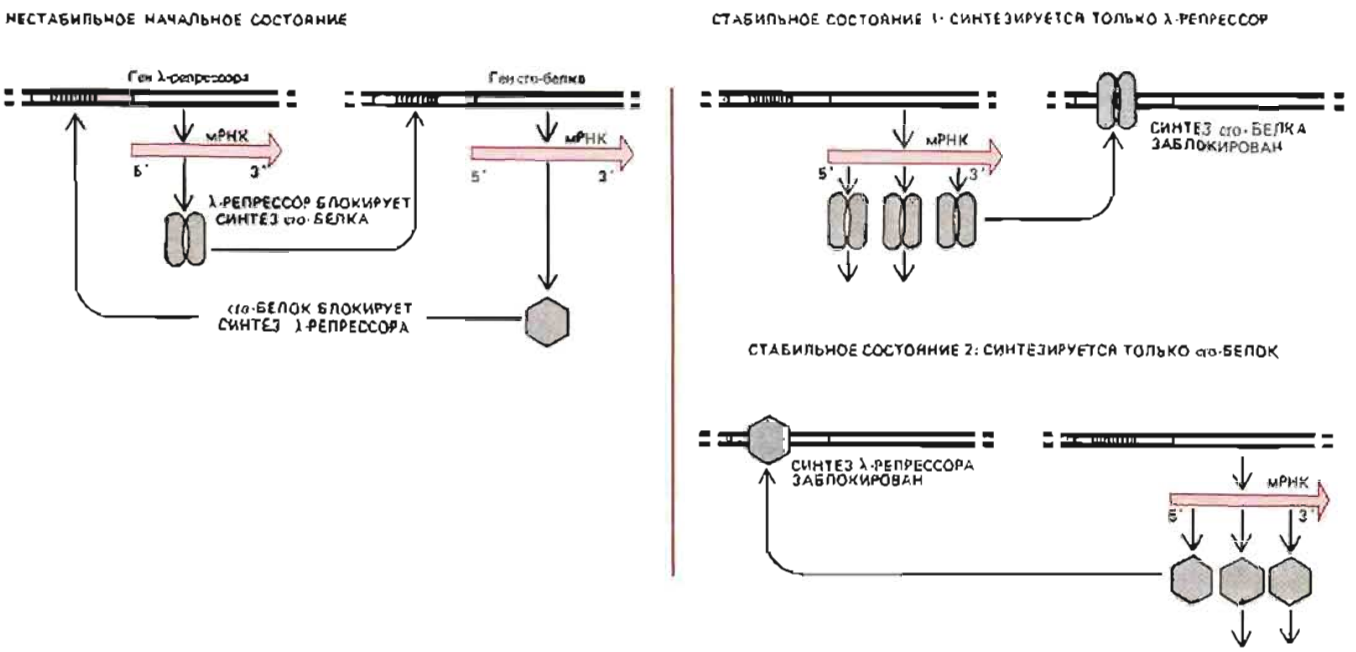


Рис. 8-84. Упрощенная схема регуляторной системы, определяющей характер развития бактериофага лямбда в клетке *E. coli*. В состоянии 1 (лизогенная инфекция) в большом количестве синтезируется λ-репрессор. Этот регуляторный белок подавляет синтез нескольких фаговых белков, в том числе и синтез cro-белка. В результате вирусная ДНК встраивается в хромосому *E. coli* и в ее составе автоматически дуплицируется при делении клетки-хозяина. В состоянии 2 (литическая инфекция) в большом количестве синтезируется cro-белок, который подавляет синтез λ-репрессора. В результате синтезируются многочисленные фаговые белки и вирусная ДНК реплицируется в клетке *E. coli* независимо от хозяйской хромосомы; в конце концов возникает множество фаговых частиц, и бактериальная клетка погибает.

общая картина генной экспрессии, т. е. специфический для каждой клетки набор активных генов, постепенно формируется в процессе индивидуального развития эукариотического организма и, раз установившись, уже не изменяется при любых изменениях, происходящих в клеточном окружении (т. 4, разд. 15.4.1). Специфический характер генной экспрессии передается клетками из поколения в поколение и обусловливает возникновение настолько больших различий в поведении и свойствах клеток, что многие типы клеток одного организма отличаются друг от друга так, как будто они относятся к генетически различным видам, хотя геномы их идентичны.

У бактерий подобная стабильность в наследовании характерных особенностей генной экспрессии составляет скорее исключение, чем правило; однако один довольно хорошо изученный и весьма любопытный пример, по-видимому, может пролить свет на некоторые аспекты регуляции эукариотических генов. Речь идет о специфическом механизме, регулирующем поведение бактериального вируса – *бактериофага лямбда* (λ) – при попадании его в клетку *E. coli*. Этот механизм, действующий как своего рода переключатель, определяет, будет ли фаг размножаться в цитоплазме *E. coli*, что приведет к гибели клетки, или же он встроится в ее геном и будет пассивно реплицироваться в составе бактериальной ДНК всякий раз, когда клетка готовится к делению. Выбор между этими двумя формами вирусной инфекции осуществляется с помощью белков, кодируемых маленьким геномом бактериофага – он содержит всего около 50 генов. Это означает, что как один, так и другой тип инфекции обусловлен определенным, присущим лишь ему характером транскрипции вирусных генов – ведь интегрированному вирусу, например, ни к чему синтезировать белки, ответственные за летальное для клетки-хозяина размножение вирусных частиц. Однажды установившийся характер транскрипции вирусных генов в дальнейшем остается неизменным: интегрированный бактериофаг может скрыто существовать в геноме клетки *E. coli* на протяжении многих тысяч поколений.

Читателя, желающего более подробно познакомиться с интересной, но весьма сложной системой регуляции генной активности бактериофага λ, мы вынуждены отослать к специальной литературе, поскольку здесь мы коснемся лишь основных принципов этой регуляторной системы. В центре ее находятся два регуляторных белка, кодируемых вирусным геном: **λ-репрессор** и **cro-белок**, каждый из которых блокирует синтез другого, если связывается с опера-

торным участком гена, кодирующего этот другой белок. Существует только два устойчивых состояния: состояние 1 – *лизогенная инфекция*, при которой доминирует λ-репрессор, а синтез cro-белка выключен, и состояние 2 – *литическая инфекция*, при которой, наоборот, выключен синтез λ-репрессора, т.е. доминирует cro-белок (рис. 8-84). Доминирование того или иного белка в свою очередь определяет характер транскрипции остальных вирусных генов. Так, в состоянии 1 бо́льшая часть ДНК интегрированного бактериофага находится в транскрипционно неактивной форме, тогда как в состоянии 2 эта ДНК эффективно транскрибируется, реплицируется и упаковывается в новые вирусные частицы, высвобождающиеся из клетки-хозяина после ее лизиса.

Следует отметить, что конкретная форма, в которой протекает инфекционный процесс, когда в клетку *E. coli* внедряется бактериофаг λ, определяется неслучайным образом. Например, если вирус попадает в здоровую, быстро делящуюся клетку, предпочтительным оказывается состояние 1, при котором фаговая ДНК размножается, реплицируясь в составе хозяйской хромосомы. Если же бактерия ослаблена, происходит переключение на состояние 2, обеспечивающее быстрое размножение вируса в цитоплазме клетки-хозяина и выход из нее новообразованных фаговых частиц (разд. 5.4.6).

8.4.7. У эукариот регуляторные белки, одновременно контролирующие активность большого числа генов, могут использоваться в различных комбинациях, для того чтобы обеспечить развитие разных тканей

Пример бактериофага λ показывает, что чрезвычайно сложная система регуляции генной активности может сформироваться в результате взаимодействия всего нескольких регуляторных белков, реципрокно влияющих на синтез и функциональную активность друг друга. Если учесть, что у эукариот число регуляторных элементов значительно больше, становится ясно, сколь велики у них возможности для эффективного контроля деятельности генов.

К сожалению, мы не знаем ничего более или менее определенного о тех молекулярных механизмах, которые в строгом порядке включают и выключают целые группы генов в процессе развития сложного многоклеточного организма. Тем не менее кое-какие сведения на этот счет можно извлечь, изучая некоторые мутации, оказывающие сильное влияние на ход эмбриогенеза. Особенно интересны мутации индивидуальных генов у плодовой мухи дрозофилы, приводящие к тому, что одна часть тела мухи превращается в другую (эти мутации подробно обсуждаются в гл. 15). Например, мутация, называемая Antennapedia, приводит к тому, что целая группа клеток, в норме образующих антенну, коренным образом изменяет свое поведение и формирует ногу, в результате чего на свет появляется муха с растущей на голове ногой (т. 4, разд. 15.4.7). Подобные мутации, вызывающие в организме глубокие изменения, называются *гоме́отическими*, или *гомеозисными, мутациями*. Белки, кодируемые такими мутантными генами, вероятно, представляют собой ключевые регуляторные белки, которые контролируют активность большого числа других генов подобно тому, как это имеет место в случае λ-репрессора и cro-белка, но только в значительно более крупном масштабе (рис. 8-85).

Характерная и весьма примечательная черта гомеотических мутаций у дрозофилы состоит в том, что нарушение нормального функционирования данного генного продукта приводит к формированию сложной альтернативной структуры, а не к образованию аморфной тканевой массы. Этот факт позволяет предположить, что многие дифференцированные ткани дрозофиллы развиваются в результате взаимодействия сравнительно малого числа ключевых регуляторных белков (т. 4, разд. 15.4.7). На возможность того, что аналогичная система регуляции имеет место у млекопитающих, в том числе у человека, указывает наблюдение, согласно которому отсутствие единственного

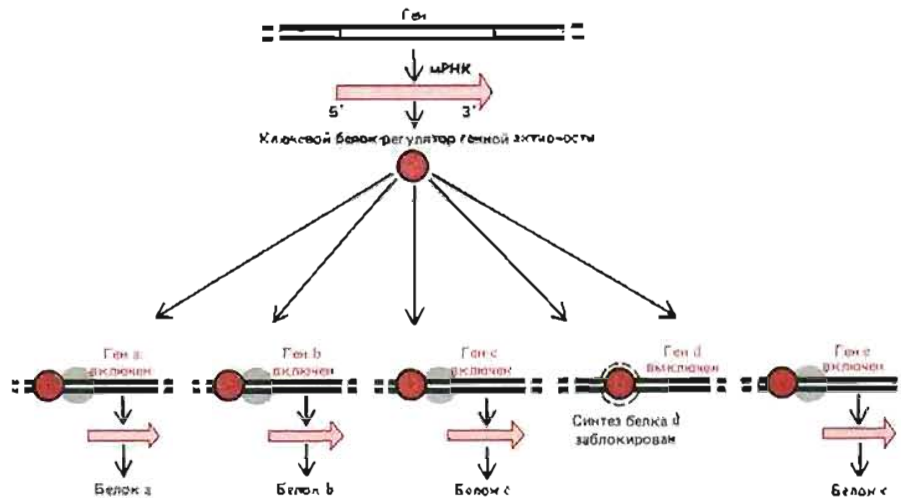


Рис. 8-85. Схема, показывающая, каким образом «решение» клетки синтезировать один-единственный ключевой белок-регулятор генной активности оказывает влияние на производство большого числа разнообразных клеточных белков.

регуляторного белка (белка-рецептора гормона тестостерона) приводит к появлению индивидуумов с мужским (XY) генотипом, имеющих женские вторичные половые признаки (т. 3, разд. 13.2.3). Как будет показано ниже, подобная комбинационная генетическая регуляция может обеспечить развитие сложного многоклеточного организма благодаря взаимодействию даже относительно небольшого числа ключевых белков-регуляторов генной активности.

8.4.8. В принципе развитие многих типов дифференцированных клеток может эффективно определяться различными комбинациями всего нескольких регуляторных белков, контролирующих активность генов [44]

Принципиальная схема **комбинационной генетической регуляции** приведена на рис. 8-86, где каждый пронумерованный элемент представляет регуляторный белок – продукт того или иного контролирующего гена. На этой чисто гипотетической схеме одна материнская клетка дает начало двум клеткам различных типов, обозначенным буквами A и B, которые отличаются друг от друга только тем, что в одной из них происходит синтез регуляторного белка 1, а в другой – нет. Здесь наблюдается аналогия с бактериофагом λ, характер развития которого в инфицированной клетке зависит от того, синтезируется в ней λ-репрессор или не синтезируется. Дальнейшее развитие клеток каждого типа предполагает сначала образование в них регуляторных белков 2 или 3, а затем регуляторных белков 4 или 5. В результате формируются восемь типов клеток (они обозначены буквами от G до N), характеризующихся различными сочетаниями пяти регуляторных белков. Добавление к приведенной схеме еще двух регуляторных белков повлечет за собой образование на следующей стадии 16 типов клеток. Еще 10 подобных стадий в сумме приведет к возникновению приблизительно 10 000 различных клеточных типов – и все это за счет взаимодействия только 25 регуляторных белков. Значит, комбинационная регуляция высокоэффективна. Кроме того, она в состоянии объяснить природу гомеотических мутаций у дрозофилы. Допустим, что одна из таких мутаций элиминирует какой-то белок-регулятор, который в норме появляется на ранних стадиях онтогенеза. Тогда развитие целой группы клеток пойдет по альтернативному пути: эти мутантные клетки будут содержать точно такой же набор регуляторных белков, как и некоторые нормальные клетки, ответственные за формирование какого-то другого органа или другой ткани, и, следовательно, также дадут начало аналогичной структуре. Например, у дрозофилы антенна превратится в ногу в результате элиминации белка, который на схеме (рис. 8-86) условно обозначен как белок 1.

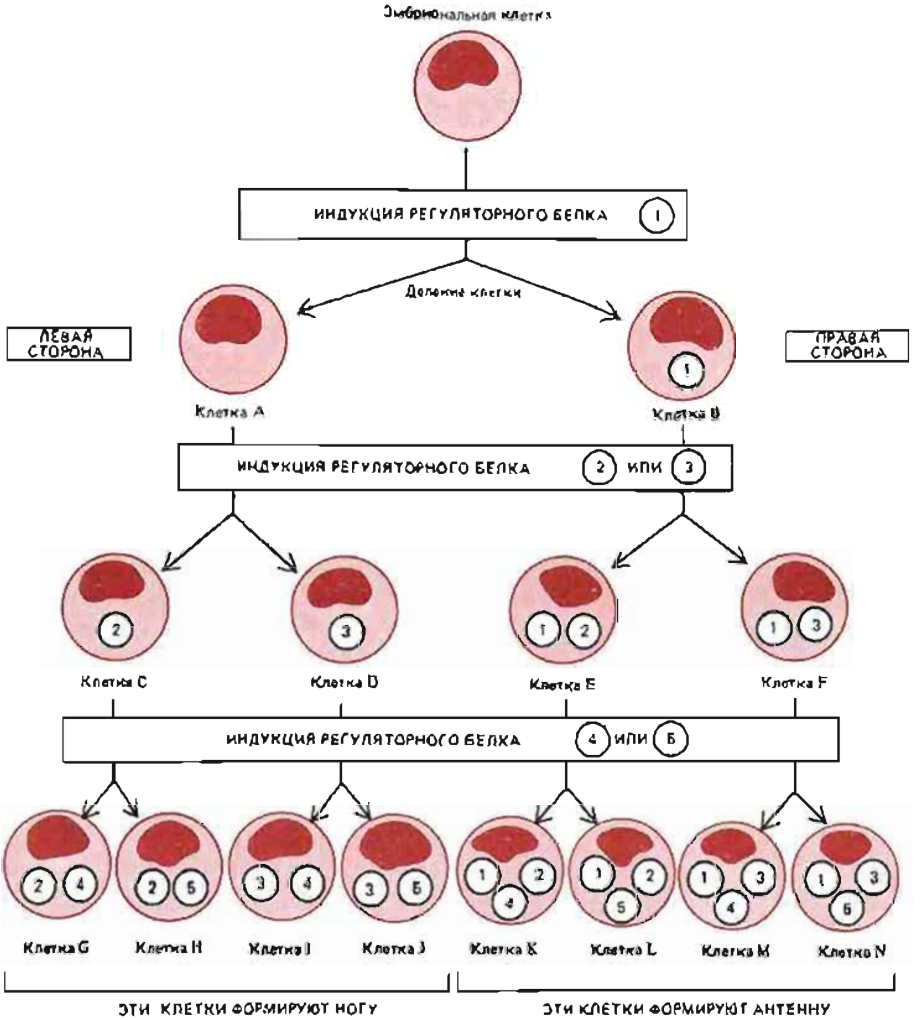


Рис. 8-86. Упрощенная схема дифференцировки клеток эмбриона, иллюстрирующая, каким образом разные комбинации нескольких ключевых регуляторных белков могут обеспечивать развитие в эмбриогенезе клеток различных типов.
Эта предельно упрощенная схема предполагает, что после каждого клеточного деления происходит выбор в пользу синтеза какого-либо одного из двух ключевых регуляторных белков (обозначенных пронумерованными кружочками). При этом сообразно занимаемой условной позиции дочерние клетки, отходящие влево относительно общего плана строения эмбриона (и относительно страницы этой книги), всегда индуцируют синтез белков с четными номерами, тогда как дочерние клетки, отходящие вправо, – синтез белков с нечетными номерами. Здесь мы видим аналогию с фагом лямбда, который в каждом конкретном случае «решает», какой из двух основных регуляторных белков – λ-репрессор или cro-белок – будет синтезироваться в клетке-хозяине (рис. 8-84). Как и в случае бактериофага λ, предполагается, что однажды сделанный выбор в пользу синтеза того или иного ключевого регуляторного белка остается неизменным и в дальнейших поколениях клеток. Таким образом, клетки разрастающегося клона будут содержать все увеличивающееся число различных регуляторных белков, каждый из которых контролирует «батарею» генов (рис. 8-85).

8.4.9. Для того чтобы включить один-единственный ген, может понадобиться сразу несколько различных регуляторных белков [45]

На первый взгляд вышеописанная схема комбинационной регуляции позволяет предположить, что клетка E отличается от клетки B наличием в ней того же самого белка, по которому клетка C отличается от клетки A: в обоих случаях дочерние клетки содержат дополнительный регуляторный белок 2, отсутствующий в материнских клетках (см. рис. 8-86). Однако следует подчеркнуть, что даже в бактериальных системах регуляторные белки далеко не всегда функционируют независимо друг от друга. Во многих случаях для включения одного бактериального гена необходимо взаимодействие двух различных регуляторных белков. У эукариот один и тот же белок-активатор (белок-рецептор стероидного гормона) в разных клетках запускает синтез нескольких наборов регуляторных белков (т. 3, разд. 13.2.3). Следовательно, изменения в характере экспрессии генов, обусловленные синтезом определенного регуляторного белка в развивающихся клетках, различаются в зависимости от того, какой путь развития уже прошла данная клетка (т. е. им присуща видовая специфичность).

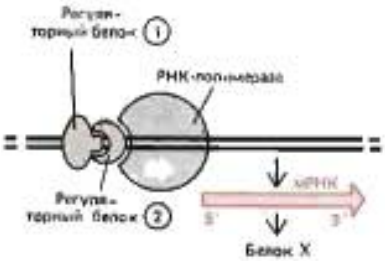


Рис. 8-87. Схема, поясняющая, почему транскрипция гена, кодирующего белок X, происходит лишь при участии двух регуляторных белков. В данном случае для связывания с ДНК белка 2 необходимо предварительное связывание белка 1. Вполне вероятно, что в случае каких-нибудь других генов белок 1 (или 2) мог бы самостоятельно выполнять роль активатора транскрипции. Примеры подобной двойной регуляции известны у прокариот.

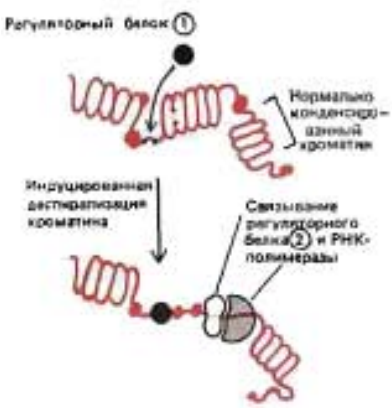


Рис. 8-88. Схема, иллюстрирующая еще один вероятный механизм, с помощью которого контроль транскрипции гена X осуществляется при участии двух регуляторных белков. Здесь связывание с ДНК белка 1 вызывает локальную деконденсацию хроматина (или какие-то другие изменения в его структуре), что делает возможным последующее присоединение белка 2. Существуют указания на то, что структурные изменения хроматина играют важную роль в регуляции активности генов у эукариот (см. рис. 8-93).

На рис. 8-87 и 8-88 схематически изображены два из множества вероятных способов взаимодействия регуляторных белков. Подобные взаимодействия придают необычайную гибкость генетическим регуляторным механизмам.

8.4.10. У бактерий суперспирализация ДНК облегчает транскрипцию генов [46]

До сих пор в центре нашего внимания были вопросы, связанные с тем, как в бактериальной клетке работают белки-репрессоры и белки-активаторы генной активности и как подобные белки могут функционировать в клетках эукариот. Теперь мы перейдем к рассмотрению совершенно другого типа генетического контроля, также изученного на бактериальных объектах. В основе этого регуляторного механизма лежит тот факт, что РНК-полимераза может начать синтез новой цепи РНК на ДНК-матрице только в том случае, если в промоторной области гена две комплементарные цепи ДНК разойдутся на участке протяженностью примерно 10 пар нуклеотидов, чтобы дать возможность образоваться комплементарным парам РНК—ДНК (см. рис. 5-2). Для этого двойная спираль ДНК должна раскрутиться на один оборот. Иными словами, необходимо, чтобы два сегмента ДНК, расположенные по обе стороны промотора, повернулись один относительно другого на 180° (рис. 8-89, *А*). Между тем известно, что в бактериальных клетках двойная спираль ДНК образует серии петельных доменов (разд. 8.1.10), причем концы петель фиксированы и поэтому не могут вращаться относительно друг друга. Это означает, что всякий раз, когда молекула РНК-полимеразы начинает синтез РНК, в двойной спирали ДНК должен образоваться один **супервиток**, компенсирующий ее раскручивание (рис. 8-89, *Б*). Поскольку из-за суперспирализации двойная спираль ДНК изгибается, возникающие в ней механические напряжения делают процесс, изображенный на рис. 8-89, *Б*, энергетически невыгодным (в отличие от процесса, изображенного на рис. 8-89, *А*). Таким образом, в отсутствие компенсирующих факторов синтез РНК на ДНК-матрице, имеющей петельную организацию, будет происходить значительно менее эффективно, чем на ДНК-матрице, обладающей способностью свободно вращаться.

Однако бактерии умеют использовать отсутствие свободного вращения ДНК в петельных доменах для того, чтобы контролировать эффективность синтеза различных РНК. Бактериальный фермент, называемый **гиразой**, используя энергию гидролиза АТР, непрерывно образует в ДНК супервитки и тем самым создает и поддерживает в петельных доменах постоянные механические напряжения. Это так называемые *отрицательные супервитки*: они закручены в противоположную сторону по сравнению с *положительными супервитками*, которые образуются в ДНК при связывании РНК-полимеразы. В результате локальное расплетание двойной спирали ДНК, связанное с началом ее транскрипции, обычно сопровождается *исчезновением* отрицательного супервитка (а не возникновением положительного). Благодаря тому что при этом происходит ослабление предсуществующих механических напряжений, синтез РНК в данном случае оказывается энергетически более выгодным, чем синтез РНК на ДНК-матрице, в которой нет супервитков (рис. 8-90).

Единичный разрыв или брешь в одной из цепей ДНК, формирующей петельный домен, приводит к возникновению своего рода шарнира, который снимает внутренние напряжения на данном участке ДНК (см. рис. 5-40). Поскольку многие бактериальные промоторы оказываются весьма неэффективными в отсутствие механических напряжений, обусловленных формированием отрицательных супервитков, подобное нарушение целостности петли приводит к угнетению ее транскрипции, которая может возобновиться только при условии полного восстановления интактной структуры двойной спирали. Эти ограничения, по всей видимости, имеют для клетки определенное положительное значение; в частности, они препятствуют нежелательному контакту РНК-полимеразы с ДНК в ходе некоторых генетических процессов, свя-

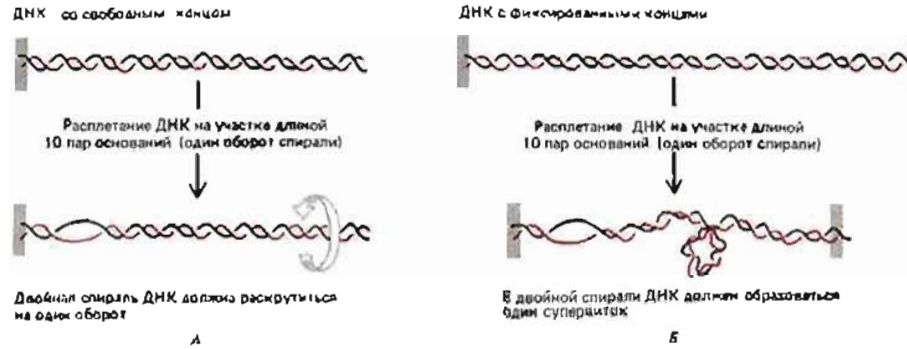


Рис. 8-89. Топологические изменения, сопровождающие необходимое для начала транскрипции расплетание двойной спирали ДНК. *А*. Спираль ДНК раскручивается на один оборот в расчете на каждые 10 неспаренных нуклеотидов. *Б*. Если раскручивание невозможно, на каждые 10 неспаренных нуклеотидов в двойной спирали ДНК формируется один супервиток. Такой супервиток считается «положительным».

занных с образованием разрывов или брешей в цепях ДНК, таких, как репарация и репликация ДНК, а также генетическая рекомбинация (см. гл. 5).

В бактериальной клетке бóльшая часть ДНК в норме находится в «напряженном» состоянии благодаря наличию отрицательных супервитков, тогда как у эукариот дело, по-видимому, обстоит иначе. Тем не менее вполне возможно, что внутренние напряжения, обусловленные существованием супервитков (как отрицательных, так и положительных), возникают в отдельных петельных доменах эукариотического хроматина в определенных условиях, например при активации гена или изменении структурной организации хроматина. Как бы то ни было, углубленное изучение регуляторного аппарата эукариот только начинается.

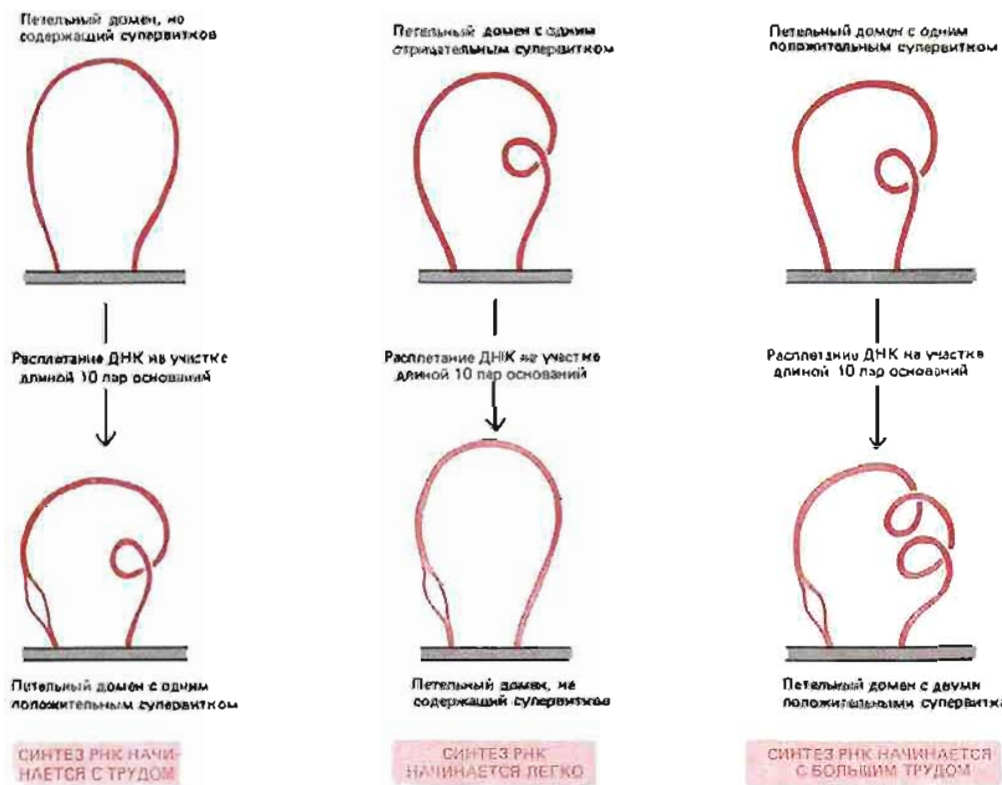


Рис. 8-90. Влияние напряжений, возникающих в суперспирали, на процесс расплетания ДНК в составе петельного домена. Петельные домены, образуемые бактериальной ДНК, несут «отрицательные» супервитки, что значительно облегчает инициацию синтеза РНК по сравнению с его инициацией в несуперспирализованной хромосомной ДНК (см. текст).

8.4.11. Регуляция экспрессии генов в эукариотических клетках осуществляется с помощью механизмов, не свойственных бактериям

В принципе все обсуждавшиеся здесь регуляторные механизмы экспрессии генов с равным успехом могут функционировать как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. Однако, как мы уже знаем, эукариотические гены и эукариотические хромосомы устроены несколько иначе, чем гены и хромосомы прокариот. С точки зрения регуляции генной активности эукариот отличают две важные особенности: плотная упаковка ДНК в составе ДНК-гистонового комплекса – хроматина и пирокомасштабный сплайсинг РНК при созревании молекул мРНК.

Сначала мы обсудим, какую роль в регуляции активности эукариотических генов играют хромосомные белки. ДНК эукариот находится в комплексе с гистонами, которые никогда не покидают «свои» молекулы ДНК. Это значит, что эукариотическая РНК-полимераза должна уметь транскрибировать ДНК, сохраняющую нуклеосомную организацию. Однако бóльшая часть хроматиновых фибрилл в ядре находится в высококонденсированном состоянии и потому практически недоступна для считывания (см. рис. 8-40). Имеющиеся данные указывают на то, что индивидуальные хроматиновые домены не могут транскрибироваться до тех пор, пока не будут переведены в деконденсированное состояние. Таким образом, в системе регуляции активности генов у эукариот появляется дополнительная ступень, отсутствующая у бактерий

8.4.12. Механизмы активации эукариотических генов, по-видимому, вызывают декомпактизацию хроматина на протяжении всей нуклеотидной последовательности данного гена [47]

Убедительное свидетельство в пользу того, что при активации эукариотических генов происходит избирательная деконденсация хроматина, получено в экспериментах по обработке изолированных ядер панкреатической ДНК-азой I. Этот фермент в достаточно больших концентрациях способен гидролизовать ДНК даже в составе нуклеосом. Более низкие концентрации ДНК-азы I вызывают деградацию не всей ДНК, а главным образом тех последовательностей, которые составляют транскрибируемую часть генома (около 7%). Кроме того, в разных клетках одного и того же организма преимущественной деградации подвергаются различные последовательности ДНК, что хорошо согласуется с различиями в общей картине транскрипции в этих клетках. Интересно, что чувствительностью к ДНК-азе I обладают даже те гены, которые в каждом поколении клеток транскрибируются всего несколько раз. Отсюда можно сделать вывод, что последовательности ДНК оказываются доступными для действия фермента не под влиянием их транскрибирования, а благодаря структурным особенностям самого хроматина (рис. 8-91).

Как правило, различия между транскрипционно активными и неактивными нуклеосомами не выявляются под электронным микроскопом. Исключение составляют лишь эмбрионы некоторых насекомых, у которых в области активированных генов рРНК можно наблюдать четко выраженные тандемно повторяющиеся участки хроматина, где нуклеосомы, по-видимому, отсутствуют (рис. 8-92). Поскольку эти гены остаются связанными с гистоноподобными белками, было высказано мнение, что они представляют собой сегменты декомпактизованного хроматина, в котором все нуклеосомы находятся в растянутом состоянии: образующие каждую нуклеосому два витка двойной спирали ДНК, в норме закрученные вокруг гистонового кора, разворачиваются и тем самым облегчают транскрипцию.

Какова же биохимическая основа структурных различий между активным и неактивным хроматином? Мы уже обращались к этому вопросу в разделах,

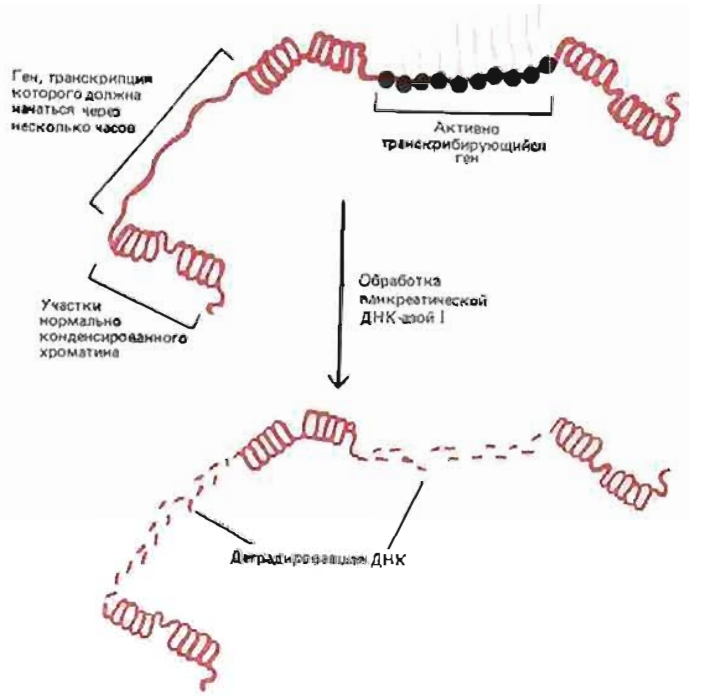


Рис. 8-91. Схема, иллюстрирующая мягкий гидролиз хроматина панкреатической ДНК-азой I, которая избирательно расщепляет ДНК как активно транскрибируемых генов, так и потенциально активных в этом отношении участков генома.

посвященных нуклеосомам. Гистон H1, который присоединяется к нуклеосомам и обеспечивает их надлежащую упаковку в составе хроматиновых фибрилл, по всей видимости, в активном хроматине связан гораздо менее прочно (остальные четыре гистона присутствуют в одинаковых количествах и в активном и в неактивном хроматине). Другое различие состоит в том, что гистоны в транскрипционно активных нуклеосомах обнаруживают довольно высокую степень ацетилирования (разд. 8.1.5). Оказалось, что ацетилирование нуклеосом заметно снижает их сродство друг к другу и уменьшает их способность агрегировать in vitro. Таким образом, понижение содержания гистона H1 в активном хроматине в сочетании с более высокой степенью ацетилирования последнего приводит к тому, что компактные хроматиновые фибриллы превращаются в «бусы на нитке». Наконец, нуклеосомы активных генов избирательно связывают два небольших, богато представленных в ядре негистоновых белка – HMG 14 и HMG 17 (разд. 8.1.5); следует также отметить, что эти нуклеосомы значительно обогащены гистоном H2A, ковалентно связанным с убихитином. Все эти изменения, возможно, играют существенную роль в декомпактизации хроматина активных генов.



Рис. 8-92. Электронная микрофотография участка растянутого хроматина из эмбриональных клеток насекомого. Видны изменения в структуре двух тандемно повторяющихся генов рРНК. По всей вероятности, в данных эмбриональных клетках инициация синтеза рРНК предшествует переход нуклеосомной формы хроматина (имеющей характерный вид «бус на нитке») в другую, лишенную оформленных нуклеосом развернутую форму. Предполагают, что развернутый хроматин соответствует тем участкам, в которых ДНК в процессе подготовки к транскрипции «размоталась» с нуклеосомных частиц. (Foe V. E., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 42, 723–740, 1978.)

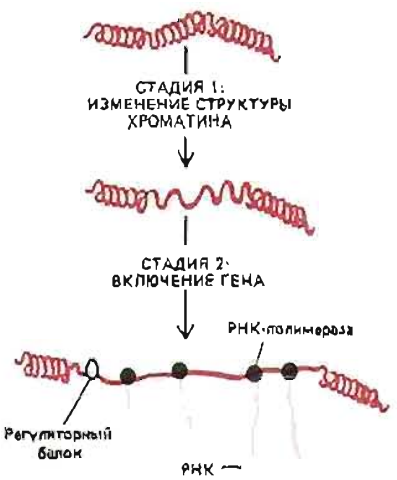


Рис. 8-93. Схема, поясняющая смысл двух предполагаемых стадий активации генов у эукариот. На стадии 1 происходит локальное изменение структуры готовящегося к транскрипции участка хроматина. На стадии 2 к специфическим участкам модифицированного хроматина присоединяются регуляторные белки, обеспечивающие инициацию синтеза РНК. Данная точка зрения предполагает, что регуляция транскрипции генов у прокариот осуществляется только в рамках стадии 2 эукариотической схемы.

8.4.13. Активация эукариотических генов, по-видимому, происходит в две стадии

Все нуклеосомы, входящие в состав транскрипционной единицы, переводятся в активную форму в тех клетках, где данная транскрипционная единица функционально активна. Хотя мы ничего не знаем о том, как осуществляется регуляция этого процесса, можно предположить, что здесь задействован набор специфических белков-регуляторов, не имеющих аналогов у прокариот. Эти белки должны не только узнавать специфические участки хроматина (скорее всего последовательности ДНК), но и вызывать определенные структурные изменения в прилежащих областях; в среднем эти изменения распространяются от участка узнавания по меньшей мере на 40 нуклеосом (8000 пар оснований), хотя могут охватывать и целиком петельный домен хроматина (см. ниже). Регуляторные белки более знакомого нам типа, напоминающие белки-активаторы и белки-репрессоры бактерий, по-видимому, участвуют в регуляции последующей транскрипции отдельных генов в районах активированного хроматина. Таким образом, активация эукариотических генов, по всей видимости, происходит в два этапа: сначала хроматин претерпевает определенные структурные модификации, вследствие чего происходит его частичная деконденсация, а затем в отдельных участках деконденсированного хроматина инициируется транскрипция (рис. 8-93).

8.4.14. На политенных хромосомах можно наблюдать разворачивание петельных доменов хроматина в процессе их транскрипции [13, 48]

Задолго до того, как нам стала понятна структурная организация хроматина, в исследованиях, проводимых на политенных хромосомах гигантских клеток слюнных желез личинок дрозофилы, были получены указания на то, что транскрипция генов сопровождается весьма существенными изменениями в характере упаковки ДНК. Мы уже говорили, что эти необычные хромосомы состоят из 1024 параллельно расположенных хроматид, образовавшихся в результате многократной репликации исходных нормальных хромосом (разд. 8.1.12). Мы также обсуждали вопрос о том, что диски, видимые в политенных хромосомах, структурно соответствуют петельным доменам хроматина, а функционально – индивидуальным генам. Давайте рассмотрим теперь, как изменяются внешний вид и биохимическое содержание хромосомных дисков в процессе транскрипции генов.

Одним из основных факторов, контролирующих активность генов в политенных хромосомах дрозофилы, служит гормон насекомых *экдизон*. Его уро-

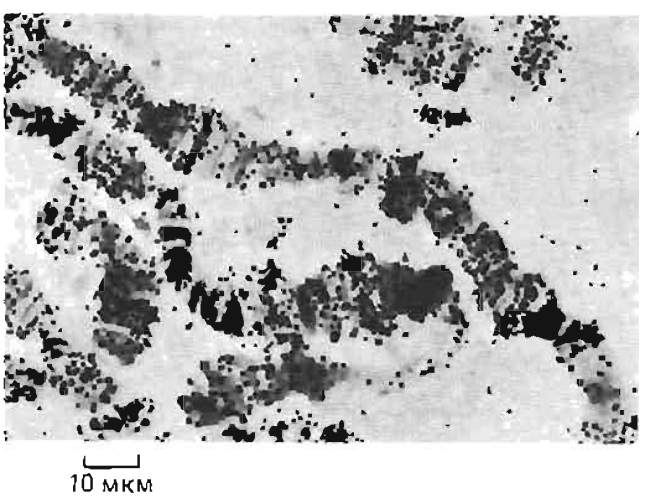


Рис. 8-94. Радиоавтограмма, на которой видны места включения [^{3}H]-уридина в политенные хромосомы. Наибольшая плотность гранул серебра обнаруживается в тех участках эмульсии, которые находились над хромосомными пуфами; это свидетельствует о том, что именно здесь наиболее активно происходит синтез РНК. (Bonner J.J., Pardue M., Cell, 12, 227–234, 1977.)

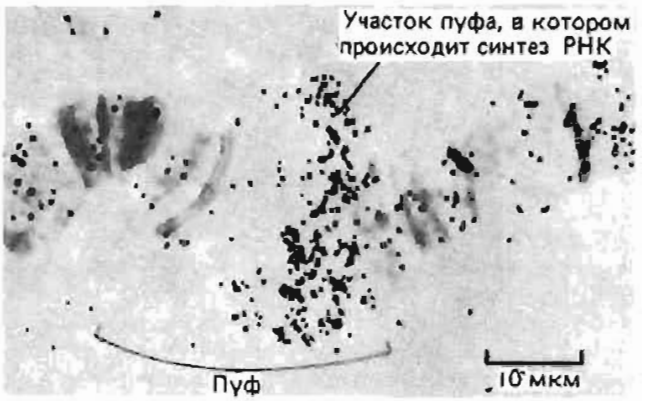


Рис. 8-95. Радиоавтограмма крупных пуфов, меченных [^{3}H]-уридином (см. рис. 8-94), показывающая, что в некоторых случаях РНК синтезируется только в определенной области пуфа, тогда как остальная его часть содержит деконденсированный хроматин, который, по-видимому, не транскрибируется. Любезно предоставлена Jose Bonner.)

вень в организме подвержен периодическим колебаниям, обусловленным индуцированием транскрипции различных генов, которые кодируют белки, необходимые личинке насекомого для каждой линьки и окукливания. Транскрибируемые в любой данный момент участки хромосомы можно идентифицировать путем кратковременного введения в клетку радиоактивно меченного предшественника РНК [^{3}H]-уридина с последующей локализацией новообразованных РНК-транскриптов при помощи радиоавтографии (рис. 8-94 и 8-95). Эти эксперименты показывают, что наиболее активные в отношении транскрипции участки хромосомы находятся в декомпактизованном состоянии и образуют хорошо выраженные хромосомные пуфы, о которых мы вкратце уже упоминали. Электронно-микроскопические исследования тонких срезов таких пуфов (рис. 8-96) свидетельствуют о том, что образующая их ДНК упакована гораздо менее плотно, чем ДНК в составе типичных хромосомных фибрилл.

По мере развития организма на различных стадиях онтогенеза возникают новые пуфы, а старые исчезают в результате того, что постепенно активируются и инактивируются транскрипционные единицы, кодирующие различные мРНК и, следовательно, белки (рис. 8-97). Если рассматривать пуфы на ранних этапах их развития, когда они еще достаточно малы и картина распределения дисков в хромосоме легко различима, то можно заключить, что бóльшая их часть возникает вследствие деконденсации индивидуальных хромосомных дисков (рис. 8-98). Отсюда ясно, что петельные домены, которые, как предполагают, в конденсированном состоянии образуют диски (см. рис. 8-28), функционируют как единицы транскрипции.

Экдизон связывается со специфическим белком-рецептором, а этот последний в свою очередь присоединяется к специфическому участку хроматина и индуцирует транскрипцию (т. 3, разд. 13.2.1). Иммунофлуоресцентный анализ показывает, что большинство дисков, образующих пуфы под воздействием экдизона, содержат как минимум один общий негистоновый белок. Весьма вероятно, что этот белок способствует приданию хроматину определенной конформации, в которой ДНК узнается белком-рецептором экдизона, и, следовательно, действует на самой первой стадии активации эукариотиче-

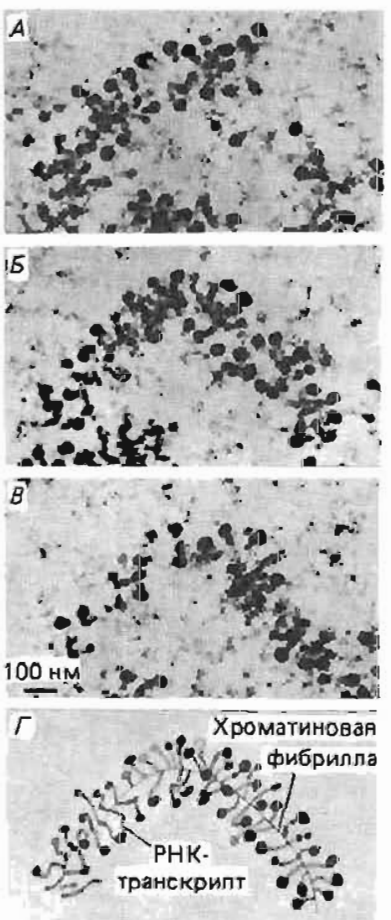


Рис. 8-96. Электронные микрофотографии серии тонких срезов крупного хромосомного пуфа, показывающие конформацию необычно длинной транскрипционной единицы. Длина черточки на *В* равна 100 нм. На схеме *Г* изображена пространственная модель исследуемого участка данной транскрипционной единицы: видны прикрепленные к одиночной хроматиновой фибрилле РНК-транскрипты с утолщенными концами. (Andersson K., Björkroth B., Daneholt B., Exp. Cell Res., 130, 313–326, 1980.)

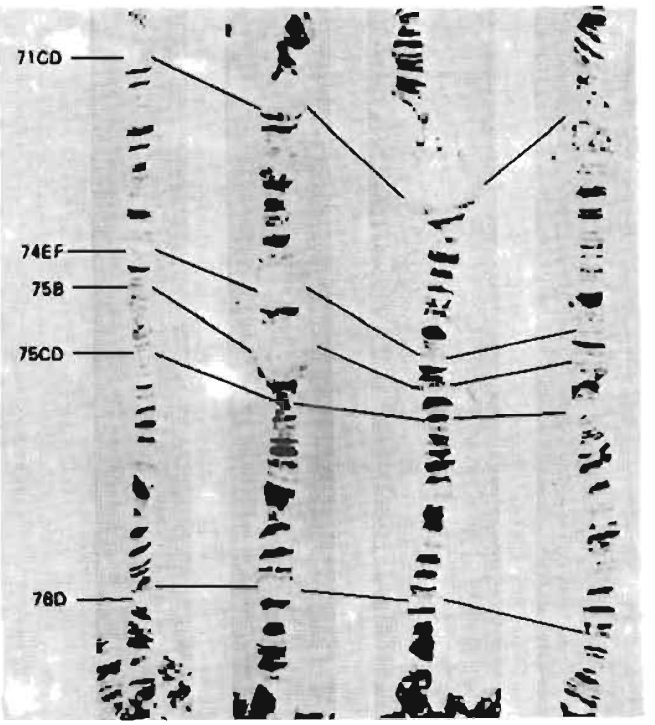


Рис. 8-97. Серия фотографий, иллюстрирующая последовательные стадии возникновения и регрессии пуфов в политенных хромосомах *Drosophila melanogaster*. Показан содержащий пять крупных пуфов участок левого плеча хромосомы 3. Каждый из этих пуфов активен лишь в течение короткого периода развития; зафиксированная на фотографиях последовательность событий занимает 22 ч и повторяется в каждом поколении мух. (С любезного разрешения M. Ashburner.)

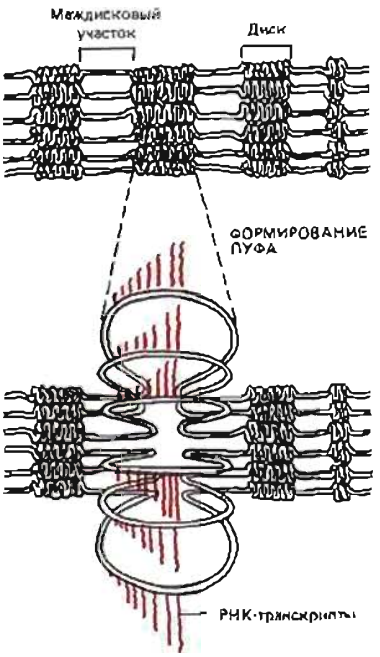


Рис. 8-98. Упрощенная схема процесса образования пуфа на политенной хромосоме.

Рис. 8-99. Явление «(и)нфекционности» пуфа, наблюдаемое в политенных хромосомах дрозофилы.

ских генов (стадия 1 на общей схеме генетического контроля, приведенной на рис. 8-93); согласно этой схеме, белок-рецептор экдизона действует на стадии 2.

Весьма любопытное явление, которое может пролить свет на механизмы локальной деконденсации хромосом, представляет собой «инфекционность» пуфов. Дело в том, что в клетке две гомологичные политенные хромосомы находятся в очень тесной ассоциации друг с другом. В ряде случаев один из двух гомологов содержит дефектный ген, у которого отсутствует способность образовывать пуф в ответ на действие экдизона. Некоторые из таких дефектных генов могут, однако, формировать пуфы под влиянием контакта с нормальным активированным гомологом (рис. 8-99). Для того чтобы объяснить эти результаты, было высказано предположение, что каждый хромосомный диск по своей структуре напоминает миниатюрный кристалл в том смысле, что характер упаковки хроматина в данном диске, по-видимому, влияет на характер упаковки хроматина в его гомологичном партнере подобно тому, как затравочный кристалл направляет формирование более крупных кристаллов. Возможно, что локальные изменения в структуре хроматина, индуцированные тем или иным регуляторным белком, распространяются по всему хромосомному диску аналогичным образом.



8.4.15. Хромосомы типа ламповых щеток: транскрипционные единицы представляют собой растянутые петельные домены [49]

Незрелые яйцеклетки, или ооциты, представляют собой еще один пример клеток, в которых хорошо различимы транскрипционно активные хромосомы. На ранней стадии дифференциации ооцитов в начале мейоза каждая хромосома реплицируется и гомологичные удвоенные хромосомы объединяются, образуя структуру, состоящую уже из четырех хроматид. Эти структуры могут сохраняться на протяжении нескольких месяцев или даже лет до тех пор, пока ооцит не создаст необходимого запаса мРНК и других компонентов, требуемых для его последующего развития в новый организм (т. 4, рис. 14-21). За это время спаренные мейотические хромосомы часто увеличиваются в размерах и их транскрипционная активность сильно повышается. Усиленный синтез РНК сопровождается растяжением длинных хроматиновых петель, к которым присоединены многочисленные новообразованные транскрипты, упакованные в плотные РНП-комплексы. Эти так называемые **хромосомы типа ламповых щеток** хорошо видны в световой микроскоп, хотя они не являются ни политенными, ни очень конденсированными хромосомами (рис. 8-100). Со времени их открытия (в конце XIX в.) наиболее тщательно изучались и изучаются необычайно большие хромосомы типа ламповых щеток амфибий. Структурная организация таких хромосом схематически показана на рис. 8-101.

Характер транскрипции разных петель неодинаков. Многие петли непрерывно транскрибируются по всей длине, вследствие чего их толщина постепенно изменяется от одного конца к другому: тонкий конец соответствует области начала транскрипции и содержит самые короткие РНК-транскрипты. Другие петли транскрибируются лишь на отдельных участках, и поэтому их толщина варьирует по всей длине в соответствии с тем, где начинается и где кончается та или иная транскрипционная единица. Некоторые петли содержат протяженные участки, которые вообще не транскрибируются (рис. 8-102). Между тем бóльшая часть хроматина, образующего хромосому, не входит в состав растянутых петель, а остается в конденсированном виде в хромомерах; как правило, этот хроматин не транскрибируется.

Петли хромосом типа ламповых щеток, подобно дискам, образующим пуфы на политенных хромосомах, по-видимому, соответствуют определенным структурным единицам хроматина, которые декомпактизовались и стали транскрипционно активными. Опыты по гибридизации нуклеиновых кислот показали, что данная петля всегда содержит одну и ту же последовательность ДНК и остается одинаковым образом растянутой на разных стадиях роста ооцита.

По ряду причин характер транскрипции хромосом типа ламповых щеток нельзя считать типичным для обычной соматической клетки. Во-первых, все петли этих хромосом транскрибируются с чрезвычайно высокой интенсивностью, и многие из них образуют необычно длинные первичные транскрипты. Во-вторых, высокоповторяющиеся последовательности ДНК, которые, как считается, не транскрибируются в нормальных клетках, транскрибируются в составе некоторых петель хромосом типа ламповых щеток (рис. 8-103). И наконец, повышенная транскрипционная активность хромосом этого типа, по-видимому, не связана с образованием мРНК (по крайней мере у ксенопуса), так как вся запасенная в яйцеклетке мРНК образуется еще до того, как хромосомы типа ламповых щеток достигнут стадии максимальной транскрипционной активности. Значение описанных фактов остается пока неясным; возможно, эти особенности транскрибции свойственны только ооцитам. Однако даже в этом случае избирательная деконденсация индивидуальных петель, сопровождающая их транскрипционную активацию, служит хорошим свидетельством в пользу гипотезы, предполагающей, что петельные домены хроматина представляют собой функциональные единицы хромосом.

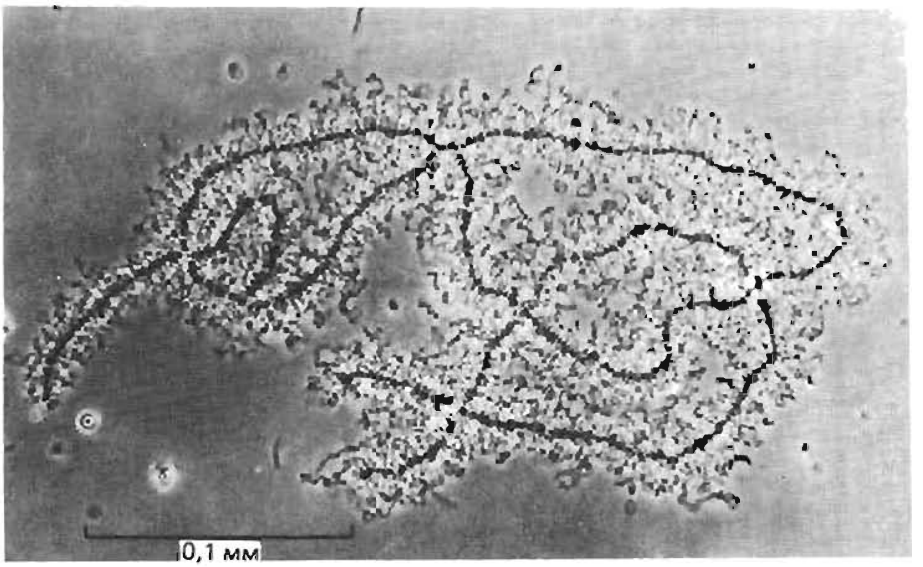


Рис. 8-100. Микрофотография сильно растянутой хромосомы типа ламповой щетки из ооцита амфибии, полученная с помощью светового микроскопа. (С любезного разрешения Joseph G. Gall.)

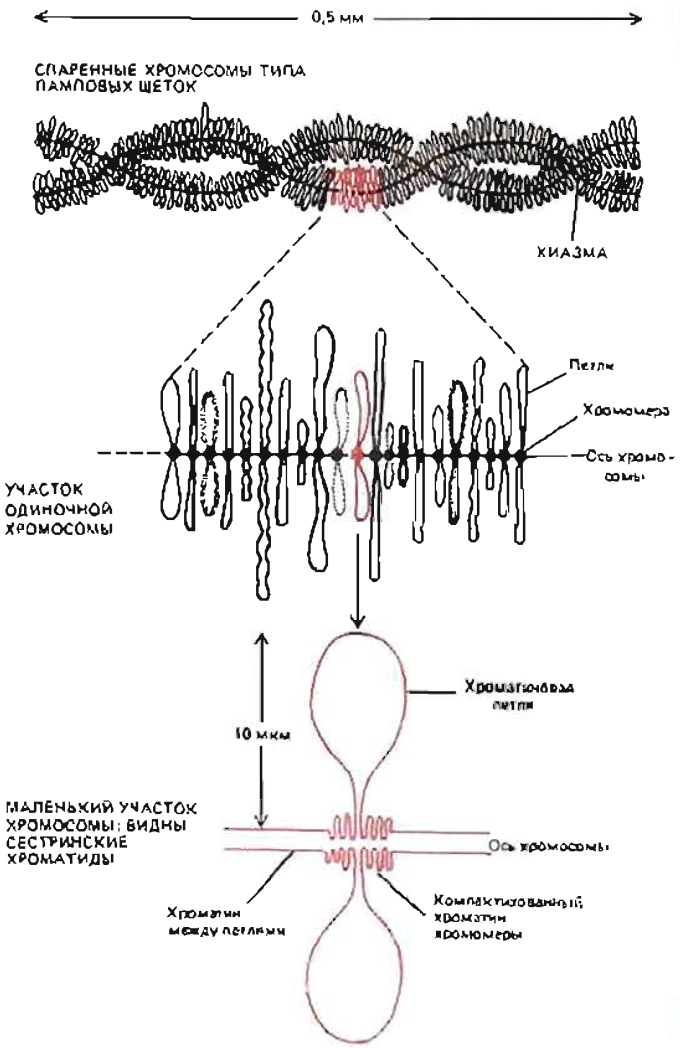


Рис. 8-101. Схема строения хромосомы типа ламповой щетки. Расчеты показывают, что у многих амфибий набор таких хромосом содержит в сумме около 10 000 различных хроматиновых петель; остальная ДНК в сильно конденсированном состоянии сосредоточена в хромомерах. Следует отметить, что каждая петля соответствует определенной последовательности ДНК и представлена в клетке четырьмя копиями: структура, изображенная в верхней части рисунка, состоит из двух спаренных гомологичных хромосом, а каждая хромосома в свою очередь состоит из двух тесно прилежащих друг к другу сестринских хроматид. Такая четырехнитчатая структура характерна для определенной стадии развития ооцита (диплотенной стадии мейоза – см. т. 4, рис. 14-21).

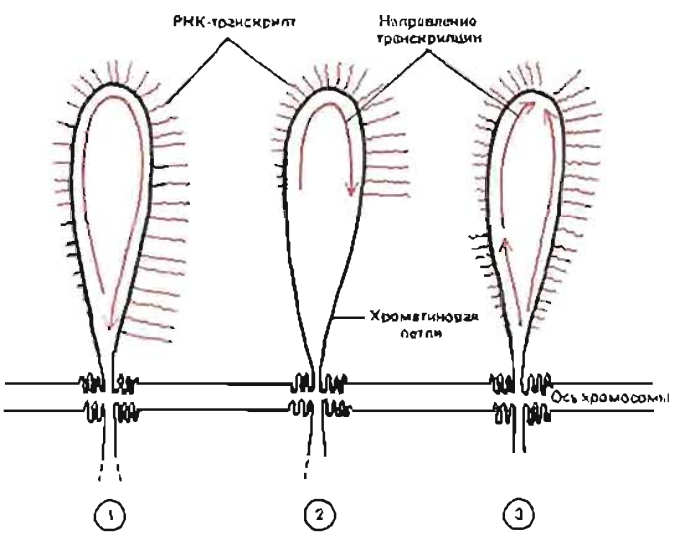
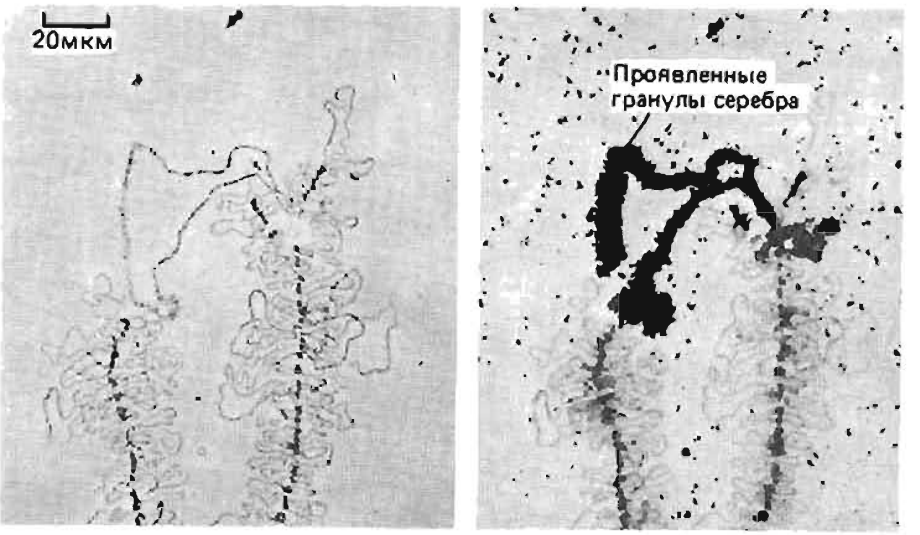


Рис. 8-102. Различные типы морфологии хроматиновых петель, выявляемые в составе хромосомы типа ламповой щетки с помощью электронной микроскопии.



А. ДО КОНТАКТА С ФОТОГРАФИЧЕСКОЙ ЭМУЛЬСИЕЙ

Б. ПОСЛЕ КОНТАКТА С ФОТОГРАФИЧЕСКОЙ ЭМУЛЬСИЕЙ, СООТВЕТСТВУЮЩЕЙ ЭКСПОЗИЦИИ И ПРОЯВЛЕНИЯ

Рис. 8-103. Результаты гибридизации нуклеиновых кислот, показывающие необычный характер транскрипции хромосом типа ламповых щеток у амфибий. Была приготовлена проба радиоактивной одноцепочечной ДНК, соответствующей некой высокоповторяющейся последовательности геномной ДНК. Хромосомы гибридизовали с этой пробой, после чего их подвергли интенсивной отмывке (*А*) и затем радиоавтографии (*Б*). Вытянутая петля, по всей длине которой произошло связывание радиоактивной метки, служит матрицей для образования необычно длинных РНК-транскриптов, содержащих копии нескольких сгруппированных гистоновых генов. Тот факт, что данная РНК гибридизуется с использованной пробой ДНК, свидетельствует о том, что соответствующая повторяющаяся последовательность геномной ДНК эффективно транскрибируется. Интересно, что в других клетках эта последовательность служит *нетранскрибируемым* спейсером, разделяющим гистоновые гены. (Diaz M. O., Barsacchi-Pilone G., Mahon K. A., Gall J., Cell, 24, 649–659, 1981.)

8.4.16. Изменение концевых участков первичных РНК-транскриптов приводит к изменению структуры синтезируемого белка [26, 50]

Рассмотрев некоторые аспекты влияния структурной организации хроматина на активность генов в эукариотической клетке, обратимся теперь к вопросу о той важной роли, которую играет в системе генетической регуляции сплайсинг РНК – явление, также присущее только эукариотам. Мы уже рассказывали, как изменения в характере процессинга РНК приводят к переключению синтеза мембранной формы антитела на синтез его секретируемой формы (см. рис. 8-49). В этом случае происходит замена С-концевого участка полипептидной цепи молекулы антитела на совершенно иную аминокислотную последовательность. Это обусловлено изменением схемы сплайсинга, что в свою очередь связано с изменением точки, в которой poly(A) присоединяется к 3′-концу первичного транскрипта. N-концевой участок полипептида также может быть изменен аналогичным образом – путем изменения точки инициации транскрипции, в результате чего изменяется схема сплайсинга 5′-концевой области транскрипта.

Регуляция, основанная на изменении схемы процессинга РНК, используется не только при синтезе антител. Известно, что в ряде случаев в клетках различных типов одного и того же организма с одних и тех же генов считываются разные первичные РНК-транскрипты. Даже в одной и той же клетке некоторые первичные транскрипты, синтезируемые на данном участке генома, могут отличаться по длине от остальных благодаря тому, что они образуются с различными 5′- или 3′-концами. Можно ожидать, что во всех этих случаях сплайсинг РНК приводит к образованию различных мРНК, которые в свою очередь кодируют разные белки.

Подобные наблюдения свидетельствуют о том, что система генетической регуляции не только контролирует интенсивность транскрипции индивидуальных последовательностей ДНК в зависимости от стадии развития организма, но и определяет локализацию 5′-концевого кэпа и 3′-концевой poly(A)-последовательности в первичном транскрипте. Различное расположение точек

начала и конца транскрипции данного сегмента ДНК оказывает влияние на характер процессинга соответствующего первичного транскрипта и тем самым может приводить к синтезу различающихся по своей структуре белков. Таким образом, точное определение точек начала и конца транскрипции столь же важно для функционирования данной транскрипционной единицы, как и интенсивность ее транскрипции.

8.4.17. Может ли генетический контроль осуществляться путем изменения специфичности ядерного процессинга РНК и экспорта зрелых молекул мРНК в цитоплазму?

Как правило, первичный транскрипт примерно в 10 раз длиннее зрелой молекулы мРНК, образующейся из него в результате сплайсинга. Однако за пределы ядра выходит приблизительно лишь 1/20 общей массы синтезируемой в клетке гяРНК (разд. 8.2.6). Простой расчет указывает на то, что довольно значительная доля первичных транскриптов (может быть, половина общего их числа), по-видимому, полностью деградирует в ядре, не давая начала каким-либо экспортируемым в цитоплазму молекулам мРНК. Весьма вероятно, что такой полной деградации подвергаются те транскрипты, которые не способны превратиться в зрелые мРНК. Вместе с тем некоторые из этих транскриптов, возможно, составляют популяцию потенциальных мРНК: они претерпевают соответствующий процессинг с образованием зрелых мРНК только в клетках каких-то других типов. В таком случае контроль специфичности ядерного процессинга РНК и экспорта зрелых молекул в цитоплазму мог бы играть важную роль в развитии клетки и ее дифференцировке. Не исключено, например, что в клетках различных типов функционируют разные ферментные системы сплайсинга РНК, которые обеспечивают образование различных мРНК из одних и тех же первичных транскриптов. Однако мы уже упоминали об отрицательных результатах, полученных при попытке подтвердить эту гипотезу в экспериментах на клетках печени и мозга (разд. 8.4.3), так что этот вопрос остается пока открытым.

Заключение

Различия между специализированными клетками высших эукариот обусловлены в первую очередь тем, что они синтезируют разные наборы белков. Ответственная за эти различия система контроля генной экспрессии действует главным образом на уровне транскрипции ДНК. У прокариот белки-регуляторы генной активности связываются со специфическими последовательностями ДНК в окрестности участка связывания РНК-полимеразы и тем самым либо репрессируют, либо активируют транскрипцию прилежащих генов. Контроль экспрессии генов у высших эукариот осуществляется с участием относительно небольшого числа ключевых регуляторных белков, которые, взаимодействуя друг с другом в различных комбинациях, определяют развитие клеток и тканей самых разнообразных типов. Система взаимодействующих белков-регуляторов генной активности прокариотического типа в принципе может привести к возникновению самоподдерживающихся моделей дифференциальной транскрипции генов и, таким образом, объяснить типичную для эукариотических клеток наследственную клональную специфичность экспрессии генов. Однако реальные механизмы функционирования большинства эукариотических белков-регуляторов остаются неизвестными; многие из них гораздо более сложны, чем прокариотические. В частности, хроматин эукариотических генов может транскрибироваться только после того, как он деконденсировался, причем регуляторные белки, ответственные за изменение структуры хроматина, по-видимому, служат основой дополнительного важного уровня, на котором осуществляется контроль экспрессии эукариотических генов.

8.5. Механизмы генетического контроля и клеточная «память»

Однажды установившийся общий тип регуляции активности генов в клетках высших эукариот обычно не изменяется во всех последующих поколениях данной клетки. Иначе говоря, выключенные, т. е. неактивные, гены, как правило, остаются выключенными, а активные гены продолжают активно действовать во всех дочерних клетках клона. Такого рода клеточная «память» не может обеспечиваться просто тем, что некие регуляторные элементы постоянно присоединены к соответствующим сигнальным последовательностям ДНК, так как подобный механизм трудно увязать со сменой многих поколений клеток. Если дифференцированный статус клетки устойчиво наследуется, дочерние клетки должны получать новые копии регуляторных элементов, присутствовавших в родительских клетках. Поэтому регуляторные элементы должны полностью воспроизводиться в каждом следующем поколении клеток. Общее правило для клеток должно быть таким: «если регуляторный элемент уже имеется, то делай еще один такого же типа; если же этого элемента изначально нет, не делай его». Таким образом, получается, что элемент, контролирующий экспрессию гена, должен также контролировать свое собственное воспроизведение по принципу положительной обратной связи. Именно эта положительная обратная связь и обеспечивает возникновение клеточной памяти.

Мы уже встречались с одной из подобных «мнемонических» систем при рассмотрении бактериофага λ, у которого имеются два регуляторных белка, связывающиеся с операторными участками ДНК и подавляющие синтез друг друга (разд. 8.4.6). В этом разделе мы коснемся некоторых других типов генетических регуляторных систем, которые, по всей видимости, играют определенную роль в установлении устойчиво наследуемых специфических моделей экспрессии генов в различных клетках высших эукариот. Для начала нам придется вновь обратиться к тому влиянию, которое структура хроматина оказывает на регуляцию экспрессии эукариотических генов.

8.5.1. В высококонденсированной фракции интерфазного хроматина находятся «выключенные» гены

Мы уже убедились в том, что петли хроматина скорее всего представляют собой его отдельные функциональные единицы, транскрипционная активность которых зависит от работы некоторых форм гистонов и негистоновых белков, способствующих деконденсации хроматина и обеспечивающих доступ к ДНК другим регуляторным белкам или молекулам РНК-полимеразы. Методами микроскопии изменения в характере упаковки хроматина на уровне индивидуальных петель выявляются лишь в политенных хромосомах или в хромосомах типа ламповых щеток. В обычных хромосомах, свойственных всем другим типам клеток, подобные изменения также обнаруживаются, но только на уровне гораздо более протяженных областей хроматина. На основании того, как выглядит хроматин под микроскопом, в клетках высших эукариот различают два класса хроматина: конденсированный хроматин, или **гетерохроматин**, и менее компактный **эухроматин**.

Гетерохроматин был первоначально идентифицирован с помощью световой микроскопии благодаря тому, что он остается конденсированным на протяжении всей интерфазы, сохраняя при этом структуру, которую остальной хроматин, по-видимому, принимает лишь во время митоза. Позже обнаружилось, что, подобно митотическому хроматину, гетерохроматин не участвует в транскрипции: радиоавтография клеток, инкубированных с радиоактивными предшественниками РНК, показала, что практически вся масса новообразованной клеточной РНК синтезируется в районах эухроматина – в гетерохроматиновых участках радиоактивная метка отсутствовала (рис. 8-104).

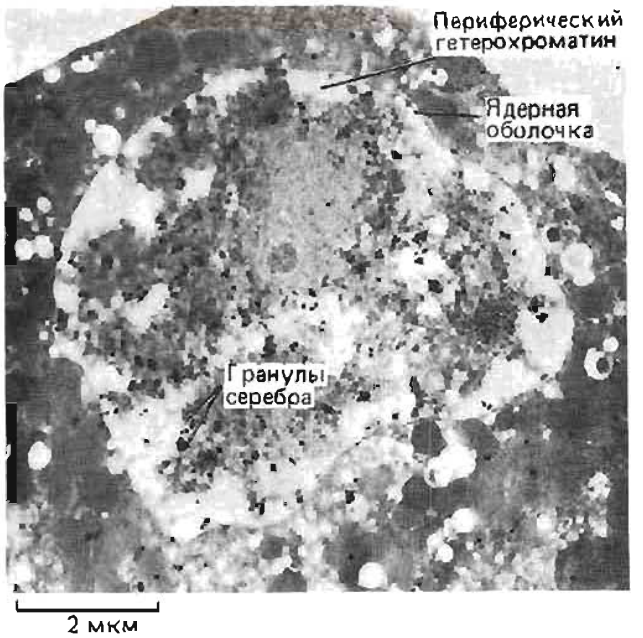


Рис. 8-104. Радиоавтограф тонкого среза ядра клетки, подвергнутой импульсному мечению [^{3}H]-уридином для выявления областей активного синтеза РНК (гранулы серебра). Светлые участки – области гетерохроматина, который обычно концентрируется вдоль внутренней поверхности ядерной оболочки. Светлая окраска участков гетерохроматина обусловлена особенностями метода приготовления препарата. Синтез РНК наблюдается главным образом в эухроматиновых участках, окружающих области гетерохроматина. (С любезного разрешения Stan Fakan.)

ДНК в составе гетерохроматина реплицируется в позднем периоде S-фазы клеточного цикла (т. 3, разд. 11.3.1). Это, вероятно, отражает ее чрезвычайно высокую степень компактизации, осложняющую процесс образования репликационной вилки. Биохимические основы наблюдаемых различий между гетеро- и эухроматином неизвестны.

8.5.2. Различают два подкласса гетерохроматина [51]

В большинстве клеток приблизительно 90% общей массы хроматина не транскрибируется (разд. 8.2.6). Хотя этот неактивный хроматин отличается более конденсированной структурой, чем остальные 7–10% транскрипционно активного хроматина, только некоторая его часть формирует области с чрезвычайно высокой плотностью упаковки, называемые гетерохроматином. Таким образом, гетерохроматин представляет собой особый класс транскрипционно неактивного хроматина, который, как предполагают, содержит гены, находящиеся в постоянно заблокированном состоянии в данной клетке и в ее потомстве. Некоторые участки хромосом конденсируются в гетерохроматин во всех клетках организма – эти области называют **конститутивным** гетерохроматином. Другие участки хромосом формируют гетерохроматин лишь в определенных клетках. В этом случае говорят о **факультативном** гетерохроматине.

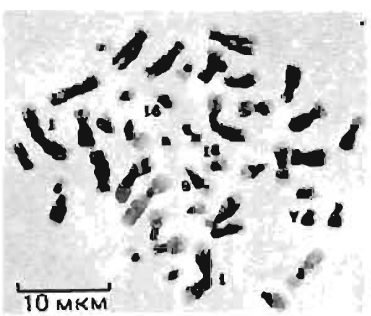


Рис. 8-105. Хромосомы человека в метафазе. Специальная техника окрашивания позволяет выявить области конститутивного гетерохроматина (темные участки). Некоторые хромосомы помечены цифрами и буквой. (С любезного разрешения James German.)

Конститутивный гетерохроматин, содержащий ДНК, которая, по всей видимости, никогда ни в одной клетке не транскрибируется, – это единственная форма гетерохроматина, отличающаяся от нормального хроматина даже в составе высококонденсированных митотических хромосом. Так, в митотических хромосомах человека он локализуется вокруг центромер и с помощью специальной методики окрашивания легко обнаруживается в виде темноокрашенной зоны (рис. 8-105). У некоторых других млекопитающих конститутивный гетерохроматин рассеян по хромосомам, в которых образует отдельные полосы, а в ряде случаев он занимает даже целое плечо хромосомы.

В интерфазе участки конститутивного гетерохроматина обычно агрегируют с образованием *хромоцентров*. У млекопитающих число и характер распределения хромоцентров варьируют в зависимости от типа клетки и стадии развития организма.

Бóльшая часть районов конститутивного гетерохроматина содержит серии сравнительно простых, многократно повторяющихся последовательностей

ДНК. На ранних этапах изучения этих высокоповторяющихся последовательностей они получили название *сателлитной ДНК* (разд. 8.6.3). Предполагается, что некоторые сегменты сателлитной ДНК играют определенную роль в спаривании хромосом в мейозе, однако в целом их функция, равно как и функция формируемых ими в интерфазе конденсированных структур, остается неясной.

Функциональное значение факультативного гетерохроматина более очевидно. Почти не вызывает сомнения, что он отражает устойчивые различия в характере генетической активности клеток разных типов. Общее количество факультативного гетерохроматина заметно варьирует в различных клетках: в эмбриональных клетках его совсем немного, тогда как высокоспециализированные клетки отличаются чрезвычайно высоким его содержанием. Можно предположить, что по мере развития клетки все больше и больше генов становятся неактивными благодаря тому, что соответствующая ДНК приобретает специфическую конденсированную конформацию, которая не позволяет генам более взаимодействовать с регуляторными белками-активаторами. Факультативный гетерохроматин не содержит заметных количеств ДНК с высокоповторяющимися последовательностями и ничем не обнаруживает себя при окрашивании митотических хромосом. Большинство из того, что мы знаем о факультативном гетерохроматине,—это результаты, полученные при изучении инактивации одной из двух Х-хромосом в клетках женских особей млекопитающих.

8.5.3. Инактивация Х-хромосомы наследственно предопределена [52]

Все клетки женских особей млекопитающих имеют две Х-хромосомы, тогда как клетки мужских организмов—одну Х- и одну Y-хромосому. Известно, что двойная доза генных продуктов Х-хромосомы оказывается летальной для ор-

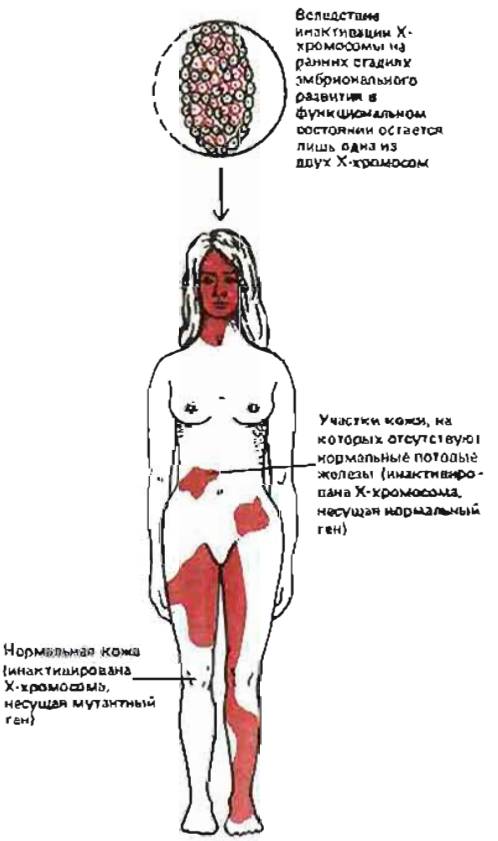


Рис. 8-106. Общая картина экспрессии генов в клетках кожи у женщины, имеющей одну нормальную и одну мутантную Х-хромосому. В каждой конкретной клетке активна либо нормальная, либо мутантная Х-хромосома. Мутантная Х-хромосома несет ген, ответственный за возникновение кожного заболевания—ангидротической эктодермальной дисплазии, характеризующейся отсутствием потовых желез. Дефектные клетки группируются в коже в виде отдельных областей, что указывает на клоиальную природу тех клеток, в которых произошла инактивация Х-хромосомы, несущей нормальный аллель данного гена. Формирование таких клонов происходит благодаря тому, что инактивированная Х-хромосома устойчиво наследуется во всех дочерних клетках (см. рис. 8-107).

ганизма; возможно, именно поэтому в женских клетках возник специальный механизм, ответственный за то, что одна из двух Х-хромосом постоянно находится в инактивированном состоянии. У мышей такая инактивация происходит в период между третьим и шестым днем эмбрионального развития: в каждой клетке женской особи с равной вероятностью одна или другая Х-хромосома конденсируется и образует гетерохроматин. Такие конденсированные хромосомы можно увидеть в световой микроскоп: в интерфазе они представляют собой четко оформленные структурные образования, называемые *тельцами Барра*, которые локализованы в окрестностях ядерной мембраны. Они реплицируются в поздней S-фазе; бо́льшая часть составляющей их ДНК не транскрибируется ни в одной из дочерних клеток. Поскольку инактивированная Х-хромосома устойчиво наследуется, каждый женский организм имеет мозаичное строение в том смысле, что он образован клональными группами клеток: примерно в половине групп активна Х-хромосома, унаследованная по материнской линии ($X_м$), а в другой половине – Х-хромосома, унаследованная по отцовской линии ($X_о$). Иными словами, клетки, в которых экспрессируется $X_м$ или, наоборот, $X_о$, расположены во взрослом организме кластерами, что отражает стремление сестринских клеток оставаться в тесном контакте друг с другом в процессе эмбрионального развития и роста организма. Особенно наглядно это проявляется в строении кожного покрова, где имеются обширные дискретные области, образованные клетками-потомками той или иной клетки раннего эмбриона (рис. 8-106).

Остается неясным, как именно происходит конденсация Х-хромосомы, однако известно, что этот процесс обычно распространяется вдоль хромосомы

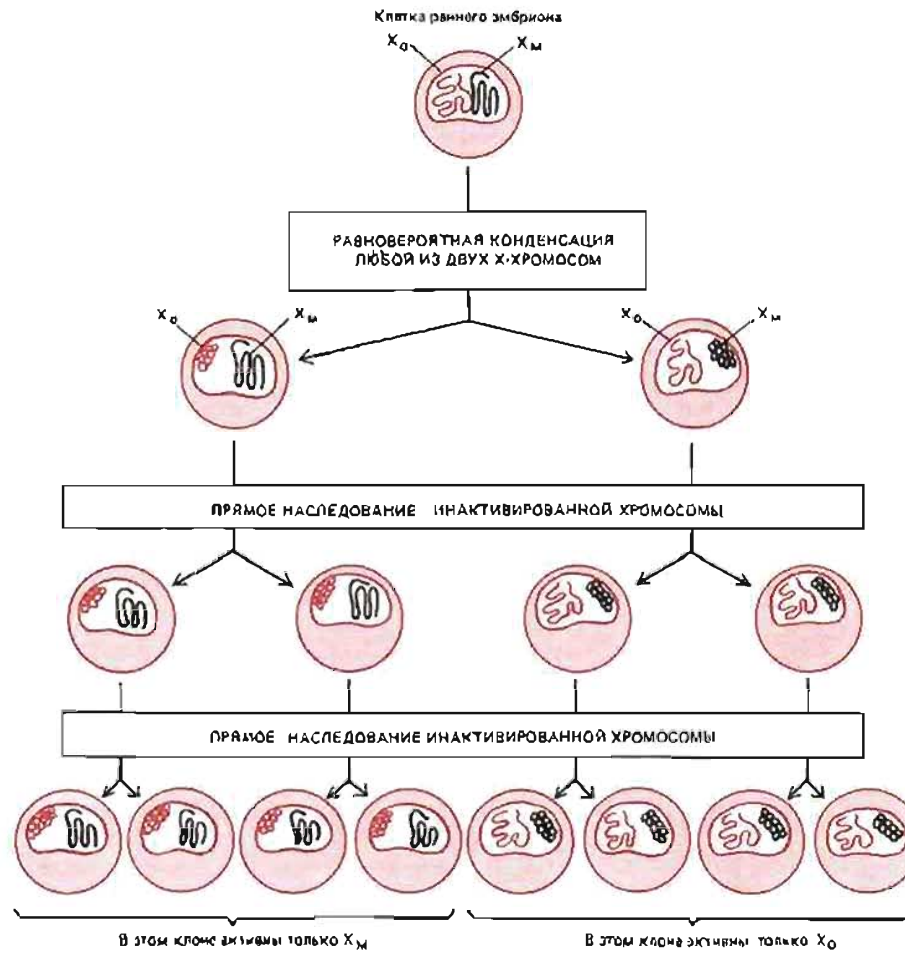


Рис. 8-107. Схема, иллюстрирующая клональное наследование конденсированной неактивной Х-хромосомы, которое имеет место у женских особей млекопитающих.

от одного ее участка к другому. Это было продемонстрировано в экспериментах с мутантными особями, в клетках которых одна из Х-хромосом была присоединена к концу *аутосомы* (неполовой, соматической, хромосомы). В таких мутантных хромосомах участки аутосом, граничащие с инактивированной Х-хромосомой, часто конденсировались в гетерохроматин, что сопровождалось наследственной инактивацией содержащихся в них генов. Эти факты служат указанием на то, что феномен инактивации Х-хромосомы обусловлен процессами, которые можно представить как кристаллизацию хроматина, распространяющуюся из определенной точки Х-хромосомы – своего рода центра нуклеации. После того как с равной вероятностью одна из двух Х-хромосом инактивируется и приобретает конденсированную конформацию, это ее состояние устойчиво наследуется во всех последующих циклах репликации (рис. 8-107).

8.5.4. Эукариотические гены могут выключаться благодаря особому наследуемому механизму [52, 53]

Знакомые нам механизмы генетического контроля, например, те, которые встречаются у бактерий (в них участвуют различные способные к диффузии белки-регуляторы генной активности), не могут объяснить наследственную инактивацию Х-хромосомы, поскольку в этом случае идентичные последовательности ДНК активной и неактивной Х-хромосом функционируют совершенно различным образом в ядре одной и той же клетки. Один из вариантов осуществления подобного рода контроля заключается в том, что необычная пространственная структура, характерная для хроматина инактивированной Х-хромосомы, прямо передается от родительских к дочерним молекулам ДНК путем непосредственного считывания в процессе репликации структурной информации, заложенной в родительских нуклеосомах (т. 3, разд. 11.3.3). Далее мы увидим, что любой хромосомный белок, взаимодействующий с хроматином по принципу кооперативного связывания и находящийся в постоянном контакте с ДНК, вполне может взять на себя обеспечение этого процесса. Мы также рассмотрим ряд других возможных объяснений случаев прямого наследования определенных функциональных состояний эукариотических генов.

Упаковка отдельных участков генома в гетерохроматин (независимо от того, каковы молекулярные механизмы этого процесса) представляет собой такой способ генетической регуляции, который недоступен бактериям. Существенный момент этой свойственной лишь эукариотам формы генетического контроля состоит в том, что прямая наследственная передача информации о функциональном статусе тех или иных генов осуществляется в виде структурной информации, заложенной в хроматине, а не с помощью петли обратной связи, в которой действуют саморегулирующиеся белки-активаторы генной активности, способные перемещаться в ядре с одного места на другое. Функционирует ли данный механизм, переводящий в активное состояние обширные районы хроматина, также и на уровне индивидуальных петельных доменов, пока неизвестно.

8.5.5. Кооперативно связанные кластеры белков-регуляторов генной активности могут в принципе непосредственно передаваться от родителей потомству

Несколько относительно простых схем генетической регуляции, предложенных для объяснения устойчиво наследуемой картины экспрессии генов у высших эукариот, вполне приложимы и к обсуждаемому нами случаю наследования конденсированного неактивного хроматина.

В центре одной из таких схем находится регуляторный белок, множественные копии которого кооперативно связываются со специфическими участками хроматина (для примера см. рис. 8-7). Если весь этот белковый

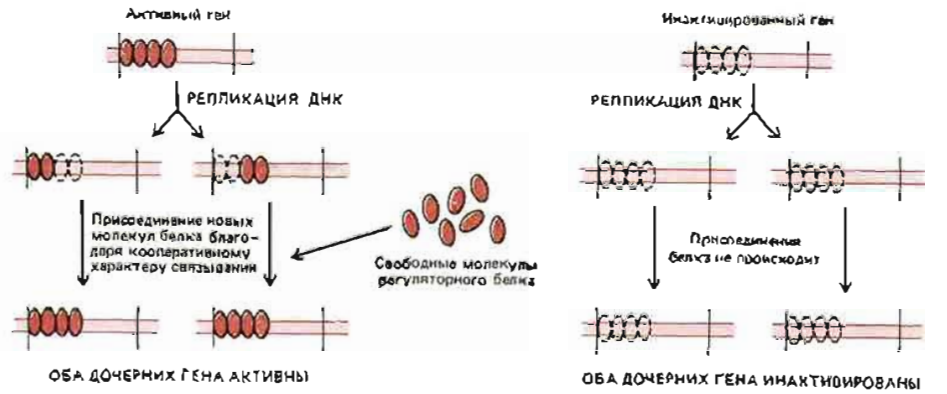


Рис. 8-108. Схема, иллюстрирующая один из вероятных механизмов прямого наследования функционального статуса генов в процессе репликации ДНК. Согласно этой гипотетической модели, часть кластера кооперативно связанных с ДНК регуляторных белков непосредственно переносится с родительской молекулы ДНК на дочерние молекулы. Унаследованная дочерней клеткой часть белкового кластера индуцирует реконструкцию всего кластера путем присоединения к ДНК недостающих белковых молекул. Поскольку связывание регуляторных белков носит кооперативный характер (см. рис. 8-7), молекулы ДНК, образующиеся на родительской матрице, лишенной таких связанных белков, также остаются свободными от белка. В том случае, если присоединение регуляторных белков блокирует транскрипцию ДНК, инактивированное состояние гена будет непосредственно передаваться от родителей к потомству, как это происходит с инактивированной Х-хромосомой (см. текст). С другой стороны, регуляторные белки такого типа могли бы выполнять функцию включателей генов; тогда, как показано на схеме, прямо наследовалось бы активное состояние гена.

кластер остается связанным с ДНК во время ее репликации, то часть его получает «в наследство» каждая из дочерних молекул ДНК. Поскольку связывание данного белка с ДНК носит кооперативный характер, унаследованная часть белкового кластера будет инициировать присоединение дополнительных белковых субъединиц, что в результате обеспечит реконструкцию всего кластера. Таким образом, данный функциональный статус гена наследуется прямо и непосредственно с помощью прочно связанных с ДНК хромосомных белков (рис. 8-108). В принципе подобные непосредственно наследуемые белковые кластеры могут поддерживать индивидуальные гены в постоянно включенном или постоянно выключенном состоянии. Однако в настоящее время еще нет никаких доказательств в пользу описанного здесь механизма генетической регуляции: соответствующие экспериментальные тесты очень сложны и предложенная схема пока не выходит за рамки гипотезы.

8.5.6. Непосредственно наследуемая схема метилирования ДНК определяет функциональное состояние некоторых генов [54]

Единственный механизм регуляции генной активности, способный объяснить природу клеточной памяти (существование его в клетках млекопитающих подтверждается реальными фактами), связан с метилированием ДНК. ДНК многих высших эукариот, включая человека, содержит небольшое количество 5-метилцитозина, образующегося в результате метилирования остатков цитозина в двойной спирали ДНК (рис. 8-109). Известно, что общая схема метилирования ДНК устойчиво наследуется благодаря особым свойствам фермента, осуществляющего этот процесс в клетках млекопитающих. По-видимому, деятельность этого фермента ограничена двумя параметрами. Во-первых, остатки С метилируются только в последовательности CpG. Во-вторых, последовательность CpG должна быть спарена с уже метилированной последовательностью CpG. Таким образом, предсуществующая схема метилирования ДНК восстанавливается в новообразованных молекулах непосредственно по завершении процесса репликации (рис. 8-110), вследствие чего функционально

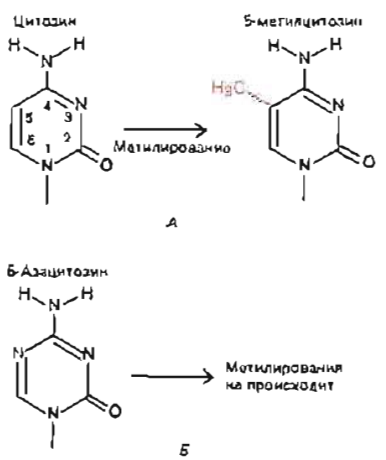


Рис. 8-109. *А.* Образование 5-метилцитозина путем метилирования цитозина в составе двойной спирали ДНК. В этой реакции метилируются только те остатки С, которые являются составной частью последовательностей CpG. *Б.* Синтетический нуклеотид (5-аза-С), содержащий основание 5-азацитозин, не может метилироваться. Кроме того, включение в ДНК небольшого количества 5-аза-С ингибирует метилирование нормальных остатков С.

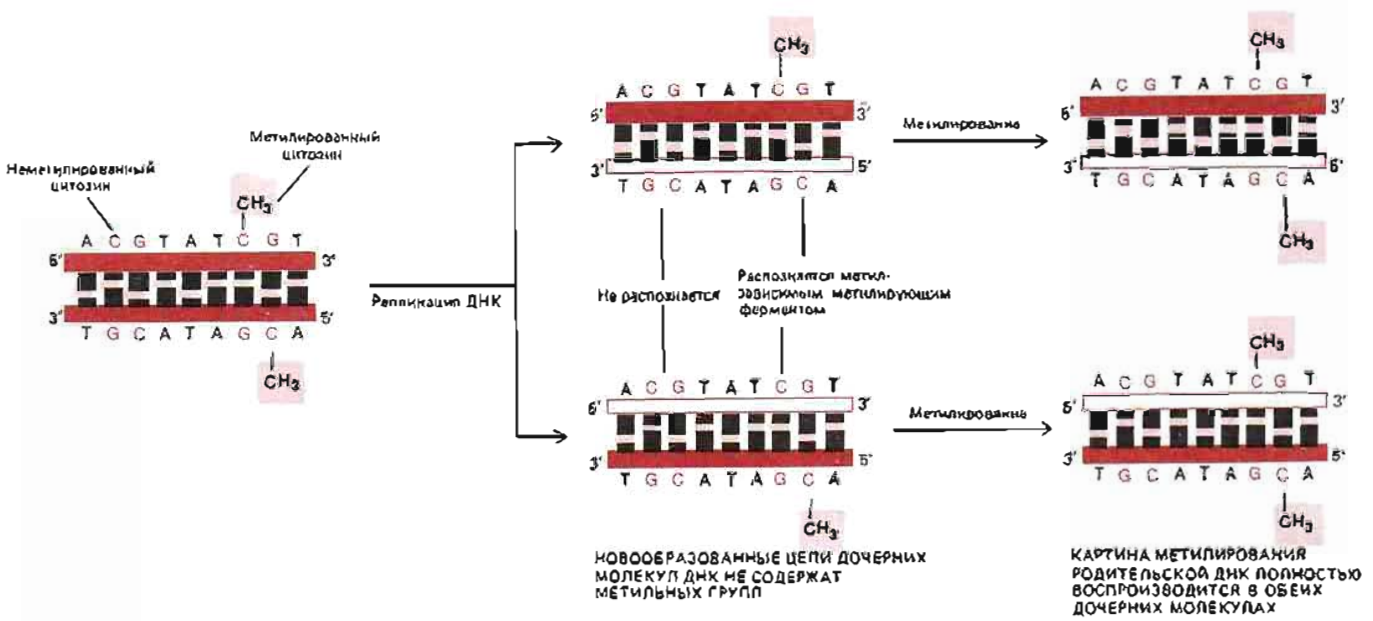


Рис. 8-110. Схема, иллюстрирующая предполагаемый механизм устойчивого наследования общего типа метилирования ДНК. В геноме эукариот значительная часть всех остатков цитозина в составе последовательностей CpG метилирована (см. рис. 8-109). Благодаря наличию метил-зависимых метилирующих ферментов однажды установившийся тип метилирования ДНК имеет тенденцию стойко наследоваться, т. е. метилированные участки точно воспроизводятся в молекулах ДНК последующих поколений. Это означает, что направленные изменения в общем типе метилирования ДНК могут быть использованы для включения или выключения определенных генов по клональному принципу. Существуют указания на то, что в клетках млекопитающих некоторые гены контролируются именно таким образом, причем ДНК неактивных генов метилируется в гораздо большей степени, чем ДНК активных генов.

важные участки ДНК могут стабильно находиться как в метилированной, так и в неметилированной форме на протяжении многих клеточных генераций.

В целом можно заключить, что ДНК неактивных генов обычно метилирована в большей степени, чем ДНК активно экспрессирующихся генов. В ряде случаев метилированная ДНК инактивированных генов, как было показано, деметилируется в процессе активации последних. Эти наблюдения не исключают возможность того, что пониженный уровень метилирования ДНК служит причиной, а не следствием активации генов. Наиболее убедительное свидетельство того, что изменение характера метилирования ДНК играет причинную роль в регуляции генной активности, получено в экспериментах по кратковременной инкубации культивируемых животных клеток с 5-азацитидином – синтетическим аналогом соответствующего нуклеотида (рис. 8-109). 5-азаС, который неподвержен метилированию, включается в состав ДНК и понижает общий уровень метилирования последней. В обработанных таким образом клетках отдельные, прежде неактивные гены начинают активно транскрибироваться, что, как было показано, сопровождается приобретением этими генами неметилированных остатков С. Поскольку новый активный функциональный статус этих генов в отсутствие 5-азаС обычно устойчиво сохраняется на протяжении многих поколений клеток, представляется весьма вероятным, что их инактивацию вызывает первоначальное метилирование соответствующих последовательностей ДНК.

Пока что неизвестно, насколько широко осуществляется регуляция активности генов путем метилирования ДНК. Например, неясно, играет ли этот процесс какую-нибудь роль в инактивации Х-хромосомы у женских особей млекопитающих. В некоторых хорошо изученных случаях изменение функционального состояния генов не сопровождается ожидаемыми изменениями в характере метилирования их ДНК. Более того, у дрозофилы – сложноорганизованного многоклеточного эукариотического организма – в ДНК, по-видимому, вообще не содержится метилированных остатков С. Таким образом, метилирование ДНК, вероятно, представляет собой лишь один из возможных механизмов, призванных обеспечивать прямое наследование функционального статуса генов в клетках высших эукариот.

8.5.7. В некоторых случаях происходят локальные перестройки последовательностей ДНК, сопровождающиеся включением или выключением соответствующих генов [55]

В некоторых одноклеточных организмах существует гораздо более радикальный механизм, обеспечивающий устойчиво наследуемую схему генетической регуляции. Нуклеотидная последовательность ДНК некоторых прокариот и низших эукариот может подвергаться локальным перестройкам, при этом соответствующие гены переходят в активное или, наоборот, неактивное состояние. Поскольку все изменения в нуклеотидной последовательности ДНК точно копируются во всех последующих циклах репликации, функциональное состояние генов, определяемое такими перестройками, будет унаследовано всеми потомками той клетки, в которой эти перестройки произошли. Хотя подобные перестройки устойчиво наследуются на протяжении ряда клеточных генераций, они в принципе обратимы, вследствие чего по прошествии достаточно длительного промежутка времени картина генной активности изменяется.

Самым простым из известных механизмов этого типа обладает бактерия *Salmonella*, в геноме которой участок ДНК длиной около 1000 нуклеотидов время от времени приобретает инвертированную ориентацию (рис. 8-111). Можно сказать, что этот сегмент ДНК выполняет «сальто-мортале» (flip-flop), переходя либо в (+)-, либо в (−)-положение. Влияние подобной инверсии на экспрессию генов обусловлено изменением положения промоторного участка, локализованного в пределах этого сегмента ДНК длиной около 1000 нуклеотидов: в (+)-положении промотор инициирует синтез белков оболочки бактериальной клетки одного типа, а в (−)-положении – другого. Поскольку «сальто» случается все-таки достаточно редко, появляются целые бактериальные клоны, имеющие оболочку какого-либо одного из этих двух типов. Описанный феномен, известный как *переключение фаз*, почти наверняка закрепился в эволюции благодаря тому, что обеспечил данному виду бактерий защиту против иммунной системы организма-хозяина. Если в данном организме производятся антитела, специфичные к бактериальной поверхности одного типа, популяция бактерий может сохраниться и размножиться благодаря клонам, имеющим поверхность альтернативного типа, причем эти клоны возникают в результате генной инверсии.

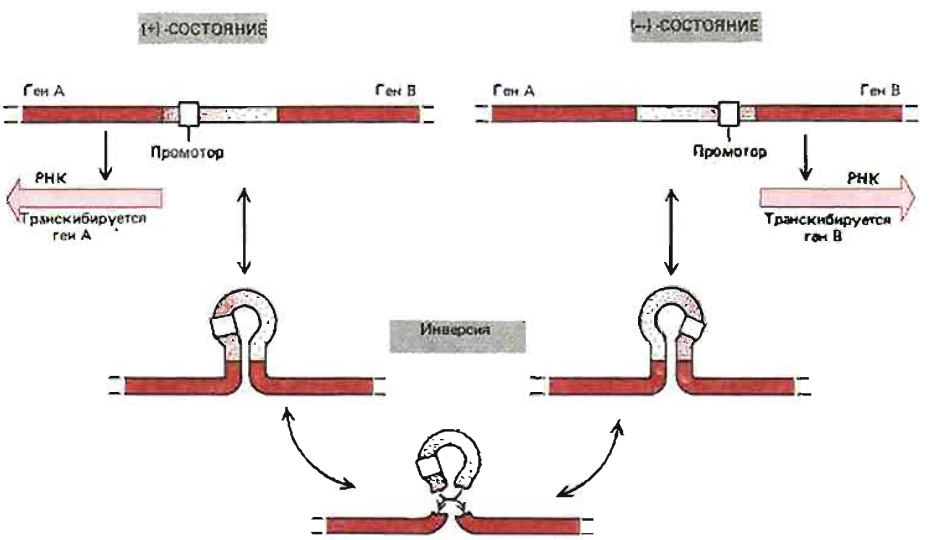


Рис. 8-111. Схема, показывающая, каким образом инверсия небольшого сегмента ДНК вызывает переключение транскрипции в клетке с гена А на ген В (механизм типа флип-флоп). Переворачивание участка ДНК происходит в результате индуцированной сайт-специфической рекомбинации (разд. 5.5.6) и наблюдается довольно редко. Таким образом, показанные здесь (+)- и (−)-состояния устойчиво наследуются в каждом клоне клеток. Регуляторный механизм этого типа (хотя и более сложный) функционирует в клетках бактерий *Salmonella*.

Похожий, но более сложный и в некотором отношении более интересный механизм характерен для некоторых штаммов дрожжей. Дрожжи – это одноклеточные эукариоты, жизненный цикл которых включает как гаплоидную, так и диплоидную фазу; диплоидные организмы возникают в результате *конъюгации*, т.е. слияния двух гаплоидных клеток. Конъюгирующие гаплоидные клетки относятся к разным половым типам. У обычных пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* существуют два половых типа (два типа спаривания) – α и *a*, определяемые тем, какой из двух генов – α или *a* – занимает специфический локус (так называемый *локус типов спаривания*) в дрожжевой хромосоме. Половые типы наследуются; одинаковые клетки не конъюгируют друг с другом. Однако гаплоидные дрожжевые клетки периодически переходят из одного типа в другой. Такое превращение осуществляется благодаря изменениям первичной структуры ДНК в локусе типов спаривания. Происходящие здесь перестройки выходят за рамки простой инверсии, определяющей, какой именно ген – α или *a* – будет экспрессироваться в данный момент. Каждый раз, когда клетки α-типа превращаются в клетки *a*-типа, α-ген вырезается из локуса и замещается новосинтезированной копией гена *a*-типа, построенной на ДНК-матрице «дремлющего» главного гена *a*-типа в каком-то другом генетическом локусе. В связи с тем что этот процесс включает удаление одного гена из активной «ячейки» и замену его другим геном, описанный механизм получил название *кассетного механизма*.

Изменение полового типа дрожжевой клетки – процесс обратимый: хотя исходный α-ген удален из соответствующего локуса дрожжевой хромосомы, в каком-то другом участке генома присутствует дремлющий главный ген α-типа; через довольно длительный промежуток времени на ДНК-матрице этого гена синтезируется новая копия α-гена, которая встраивается на место гена *a*-типа и тем самым восстанавливает прежний статус клетки. Таким образом, индивидуальные копии генов *a*- и α-типов функционируют подобно кассетам разового использования, которые попеременно вставляются в «проигрывающее устройство» – локус типов спаривания. Замена «кассеты» заставляет дрожжевую клетку перевоплощаться из одного полового типа в другой (рис. 8-112).

Предполагают, что различия между участками генома, содержащими дремлющие гены, и функционально активными локусами, в которых экспрессируются копии тех же генов, обусловлены различиями в структуре хроматина. Весьма вероятно, что дремлющие гены не транскрибируются из-за структурных особенностей содержащего их хроматина, препятствующих взаимодействию генов с белками-активаторами. В случае же перемещения данного гена (а точнее его копии) в локус типов спаривания та же самая последовательность ДНК принимает более «открытую» конформацию под влиянием нового хроматинового окружения. В принципе кассетный механизм может эффективно использоваться для довольно большого числа индивидуальных последовательностей ДНК; благодаря этому клетка получает возможность непосредственно передавать «по наследству» различные функциональные состояния гена.

Недавно было показано, что механизм подобного типа ответствен за множественные изменения, наблюдаемые в структуре и свойствах главного белка наружной оболочки трипаносом. Эти одноклеточные эукариоты вызывают серьезные заболевания у людей и домашних животных, например сонную болезнь. Как и в случае *Salmonella*, изменения поверхностной структуры клетки позволяет популяции трипаносом «обмануть» иммунную систему организма-хозяина.

Эксперименты по регенерации целого организма из одной-единственной соматической клетки (разд. 8.4.1) убедительно продемонстрировали, что дифференцировка клеток высших эукариот вовсе не обязательно сопровождается какими-то *необратимыми* изменениями в структуре ДНК. Однако эти наблюдения не исключают возможность того, что некоторые *обратимые* геномные перестройки (аналогичные тем, с которыми мы познакомились на примере

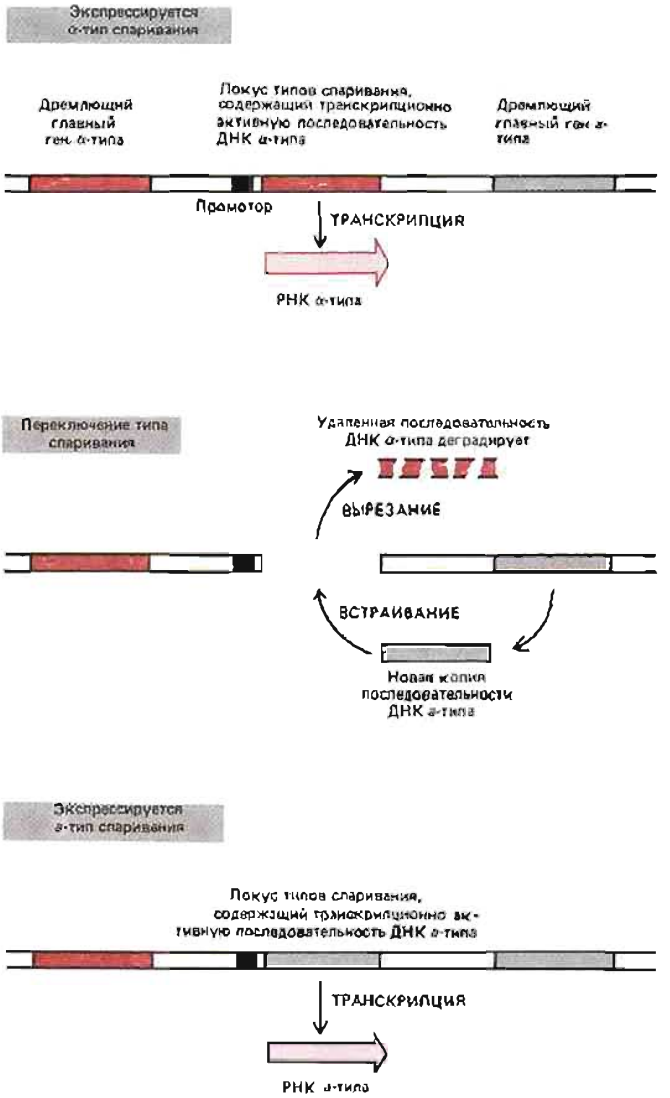


Рис. 8-112. Схема так называемого кассетного механизма, позволяющего дрожжевым клеткам изменять свой тип спаривания (клетки α-типа превращаются в клетки *a*-типа и наоборот). В принципе подобный механизм может обеспечить регуляцию экспрессии генов с участием не двух, а гораздо большего числа «дремлющих» генов; такая система будет охватывать целый ряд дискретных транскрипционных состояний. То обстоятельство, что представленная схема предполагает перестройку структуры ДНК (как и в случае механизма, изображенного на рис. 8-111), означает, что соответствующие изменения в характере экспрессии генов непосредственно наследуются всеми клетками-потомками.

Salmonella, дрожжей и трипаносом) играют определяющую роль в возникновении устойчиво наследуемых изменений в картине экспрессии генов, характерных для развивающихся соматических клеток.

8.5.8. В соматических клетках отдельные участки хромосом могут либо утрачиваться в результате делеции, либо подвергаться амплификации [56]

Хотя в соматических клетках большинства организмов вся ДНК, по-видимому, сохраняется интактной в процессе развития и дифференцировки, нет оснований заранее считать, что всегда должно быть именно так. В принципе подобная необходимость существует лишь для клеток зародышевой линии – яйцеклеток и сперматозоидов. И в самом деле, известны случаи, когда клеточный геном претерпевает значительные изменения.

Пожалуй, наиболее яркими примерами в этом отношении могут служить некоторые примитивные эукариоты, такие, как червь *Ascaris* или мелкие вес-



Рис. 8-113. Два способа элиминации специфических участков хромосом у двух видов веслоногих рачков. В обоих случаях подлежащий удалению хроматин предварительно сильно конденсируется, как здесь схематически изображено.

лоногие рачки. На самых ранних этапах развития этих организмов, когда оплодотворенное яйцо претерпело лишь несколько циклов дробления, все делящиеся клетки, за исключением одной, элиминируют специфические гетерохроматиновые участки своих хромосом; в результате последние уменьшаются в размере приблизительно вдвое. Удаленные фрагменты быстро деградируют. Таким образом, каждая соматическая клетка теряет примерно половину своей ДНК, тогда как единственная клетка, сохранившая интактные хромосомы, дает начало всем зародышевым клеткам следующего поколения. По всей видимости, утерянная соматическими клетками ДНК содержит последовательности, необходимые только для зародышевых клеток.

На молекулярном уровне элиминация специфических участков хромосом должна обеспечиваться расщеплением двойной спирали ДНК в строго определенных точках. В большинстве случаев таким способом удаляются только концы хромосом. Однако у одного вида веслоногих рачков – *Cyclops strenuus* – гетерохроматиновые участки рассеяны по всей длине хромосом, и для их удаления необходимо, чтобы в ДНК возникли множественные разрывы: оставшиеся после этого фрагменты должны затем соответствующим образом воссоединиться, с тем чтобы образовалась целая хромосома (рис. 8-113).

Подобные геномные перестройки, но в гораздо меньшем масштабе происходят и в специализированных клетках позвоночных – лимфоцитах, продуцирующих антитела. В процессе развития лимфоцита гены, которые призваны в будущем обеспечивать производство антител, претерпевают определенные структурные перестройки, которые дают им возможность направлять синтез огромного разнообразия белковых молекул. Как и в случае веслоногих рачков, разрывы в ДНК здесь вносятся в строго определенные точки, и после вырезания соответствующих участков целостность молекулы ДНК восстанавливается. Эти процессы происходят в строгой зависимости от стадии развития клетки (см. гл. 17). Следует, однако, заметить, что в клетках, производящих антитела, удаляется лишь очень малая часть всего генома. (Перестройки, происходящие на уровне ДНК, нельзя смешивать с теми изменениями в РНК, которые являются результатом процессинга и которые впоследствии обусловливают переключение в этих лимфоцитах производства мембраносвязанной формы антител на секретируемую форму.)

С другой стороны, в некоторых специализированных клетках отдельные гены могут амплифицироваться. В этом случае небольшой участок генома многократно реплицируется на протяжении одного клеточного цикла, вследствие чего образуются множественные экстра-копии данной последовательности ДНК. Амплификация генов характерна для двух типов клеток, которые сталкиваются с необходимостью синтезировать необычайно большие количества какого-то одного генного продукта в сравнительно короткие сроки. Это, во-первых, развивающиеся яйцеклетки (ооциты) большинства видов животных, продуцирующие и запасающие огромное число рибосом. Например, на самых ранних стадиях развития ооцитов ксенопуса гены рРНК амплифицируются, в результате чего общее количество рДНК в этих клетках увеличивается в 1000 раз и образуется около 1000 добавочных ядрышек (рис. 8-114). По мере роста и развития ооцита в этих ядрышках синтезируется большое количество рРНК и происходит самосборка рибосомных субчастиц (см. т. 4, рис. 14-29).

Другой пример амплификации генов можно найти в фолликулярных клетках, которые синтезируют и секретируют белки, формирующие твердую оболочку (хорион) яиц насекомых. У дрозофилы, например, непосредственно перед тем, как возникает потребность в белках хориона, кодирующие эти белки последовательности ДНК амплифицируются – их число возрастает приблизительно в 30 раз (рис. 8-115).

Вместе с тем, опираясь на те знания, которыми мы располагаем в настоящий момент, можно заключить, что, хотя отдельные последовательности ДНК в геноме соматических клеток могут утрачиваться, подвергаться раз-

личным изменениям или амплифицироваться, подобные необратимые геномные перестройки в целом нетипичны для процесса развития высших растений и животных.

8.5.9. Крупные перестройки хромосом обычно имеют неблагоприятные последствия для организма [57]

Неудивительно, что значительные изменения в числе и структуре хромосом часто приводят к серьезным аномалиям в развитии организма. В нормальных клетках человека должны быть две и только две копии каждой из аутосом. Эмбрионы, случайно унаследовавшие единичную копию какой-нибудь одной аутосомы, нежизнеспособны, а те индивидуумы, в клетках которых оказалось три копии одной аутосомы (такое нарушение называется *трисомией*), всегда имеют очень сильные отклонения от нормы. При этом жизнеспособными оказываются только те индивидуумы, у которых наблюдается трисомия по 21-й хромосоме (внешние проявления этой наследственной аномалии носят название «синдром Дауна»), а также по 13-й или 18-й хромосоме. Это с очевидностью указывает на то, что для нормального развития и функционирования клетки необходимо точно определенное число хромосом.

Внутри- или межхромосомные перестройки обычно также приводят к появлению нежизнеспособных эмбрионов, которые погибают задолго до того, как появятся на свет. Тем не менее некоторые типы хромосомных перестроек, не связанных с изменением общего количества генетического материала, бы-

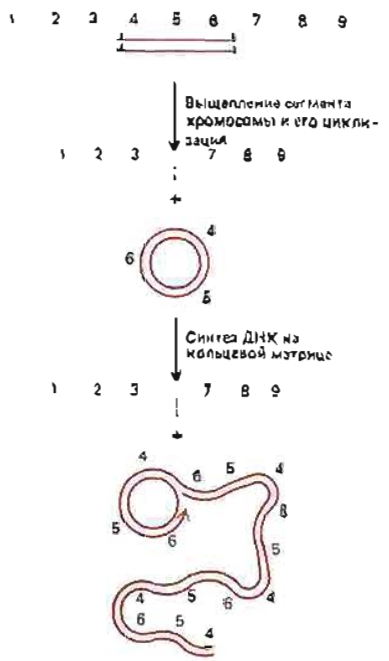


Рис. 8-114. Предполагаемый механизм амплификации генов рРНК на ранних этапах развития ооцитов амфибий. Амплифицирующиеся гены синтезируются в виде отдельных молекул ДНК, не связанных с хромосомой.

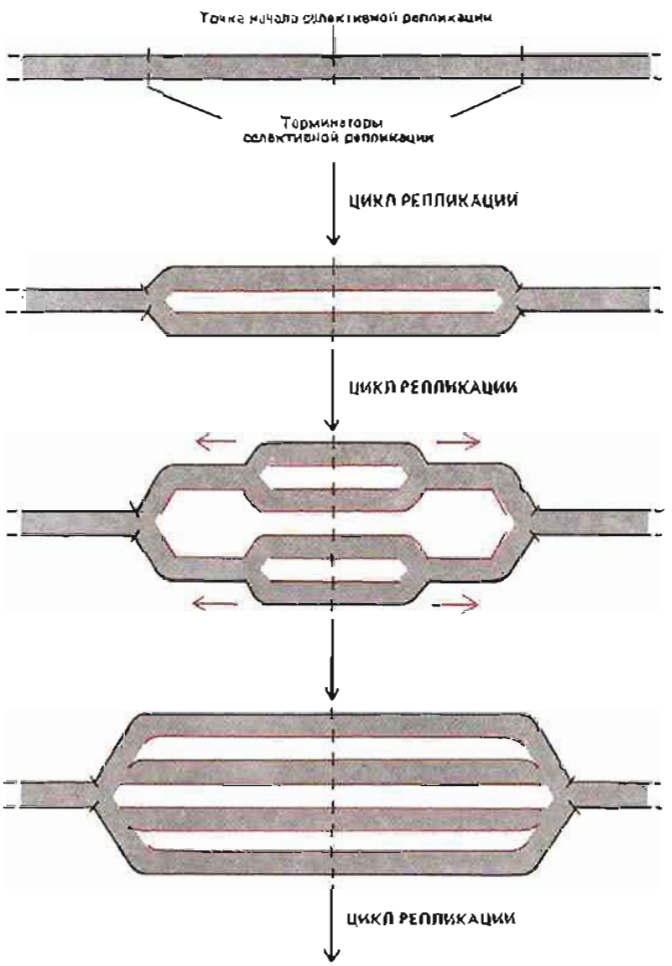


Рис. 8-115. Предполагаемый механизм амплификации генов, ответственных за синтез белков хориона в фолликулярных клетках дрозофилы. В данном случае амплифицирующиеся гены остаются связанными с хромосомой.

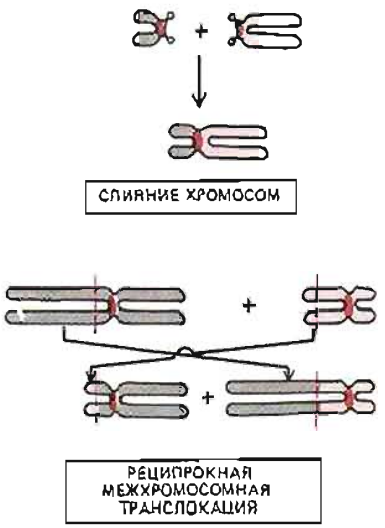


Рис. 8-116. Два типа хромосомных перестроек которые обычно встречаются у человека. При *слиянии хромосом* две отдельные хромосомы объединяются в одну. В случае *реципрокной межхромосомной транслокации* две хромосомы обмениваются своими участками, в результате чего образуются две модифицированные хромосомы.

ли обнаружены у совершенно нормальных людей. Например, наблюдается образование сшивок между концами любых двух из имеющихся пяти пар хромосом с одним плечом (хромосомы 13, 14, 15, 21 и 22), в результате чего возникает одна новая хромосома с двумя плечами. У таких внешне абсолютно нормальных индивидуумов клетки содержат не 46 хромосом, а 45. Кроме того, у нормальных индивидуумов встречаются так называемые **межхромосомные транслокации**: две различные хромосомы обмениваются сегментами и при этом потери генетического материала не происходит (рис. 8-116). Наиболее яркой иллюстрацией того, сколь незначительным может быть внешний эффект подобных геномных перестроек, служат два близкородственных вида мунтжака, у которых почти одинаковый генетический материал распределен в одном случае в 46 малых, а в другом в шести больших хромосомах. Не вызывает сомнения, что наблюдаемые у различных организмов хромосомные перестройки – лишь случайная выборка из всех возможных вариантов; при этом только некоторые подобные изменения не препятствуют формированию нормального организма.

Хромосомные перестройки, с которыми мы только что познакомились, носят наследственный характер и имеют место в каждой клетке. Однако точно такие же изменения могут происходить в соматических клетках животного в течение его жизни; это в свою очередь может самым решительным образом влиять на поведение клеток. Практически все опухолевые клетки человека имеют различные хромосомные аномалии, включая транслокации, делеции и дупликации. Бо́льшая часть из них, по-видимому, носит случайный характер, однако иногда специфические изменения хромосом являются характерным признаком того или иного типа опухоли. Например, в раковых клетках большинства больных, страдающих определенным типом лейкоза (хроническим миелогенным лейкозом), наблюдается взаимная транслокация дистальных концов 22-й и 9-й хромосом. Аналогично опухолевые клетки, образующие лимфому Бёркитта, обнаруживают специфическую взаимную транслокацию участков 8-й и 14-й хромосом и т. д. Было постулировано, что сущность подобных характеристических изменений хромосом составляет перемещение гена, кодирующего некий регуляторный белок, в окрестности какого-нибудь активно экспрессирующегося гена, в результате чего этот регуляторный белок начинает синтезироваться в аномально больших количествах. Такая сверхпродукция может обусловливаться структурными изменениями в хроматине, подвергшемся транслокации: предполагают, что именно она играет решающую роль в приобретении клеткой, дающей впоследствии начало злокачественной опухоли, способности к бесконтрольному росту. Каким образом реализуется эта способность и какова природа самого ростового контроля, будут подробно обсуждены в гл. 11 и 16.

Хромосомные перестройки оказываются стабильными только в том случае, если концевые участки каждой хромосомы остаются интактными; клетки, несущие хромосомы с поврежденными концами, неизбежно погибают. Концевые области хромосом, называемые **теломерами**, должны иметь особую структуру, которая обеспечивала бы возможность полной и совершенной репликации концов двойной спирали ДНК. Недавние эксперименты, проведенные с дрожжевыми клетками, показали, что теломерные зоны на концах каждой из 17 дрожжевых хромосом содержат очень сходные последовательности ДНК длиной около 3000 нуклеотидов. Почему для завершения концов хромосомы требуются столь длинные нуклеотидные последовательности, неизвестно.

Заключение

Некоторые механизмы клеточной «памяти» у высших эукариот, по-видимому, функционируют на уровне структуры хромосом. В частности, упаковка генов в гетерохроматин, вероятно, связана с их наследственной инактивацией, по-

добной той, которая происходит в одной из двух X-хромосом в клетках женских особей млекопитающих. Генетический контроль такого рода не может обеспечиваться способными к диффузии белками-регуляторами генной активности прокариотического типа ввиду того, что в данном случае две идентичные копии одного гена в одной и той же клетке управляются совершенно различным образом. Наиболее вероятно, здесь действуют следующие механизмы: прямое наследование в процессе репликации ДНК кооперативно связанных с ней хромосомных белков, прямое наследование общей схемы метилирования ДНК и наследование последовательностей ДНК, подвергшихся локальным перестройкам.

8.6. Организация и эволюция последовательностей ДНК [58]

Значительная часть всей истории эволюции записана в геномах ныне живущих организмов. Некоторые страницы этой истории открывает для нас технология рекомбинантных молекул ДНК (т. I, разд. 4.5.4), позволяющая определять первичную структуру самых различных последовательностей ДНК. Установление нуклеотидных последовательностей все новых и новых генов со временем даст возможность ясно увидеть пути эволюции, которые на протяжении сотен миллионов лет были пройдены нуклеотидными последовательностями, кодирующими те или иные индивидуальные белки. Однако сейчас мы еще вынуждены использовать гораздо более общие подходы, изучая взаимосвязь различных геномов и процессы их эволюционирования в целом. Исследование «поведения» ДНК в живых организмах позволяет нам строить предположения и догадки, касающиеся ее эволюции.

8.6.1. Генетическая рекомбинация – движущая сила эволюционных изменений

Существуют вполне определенные причины, объясняющие, почему нуклеотидные последовательности ДНК, кодирующие белки, должны с высокой точностью реплицироваться и надежно сохраняться; это уже было отмечено в разделах, посвященных репликации и репарации ДНК (гл. 5). Хотя бо́льшая часть изученных последовательностей ДНК необычайно стабильна (одна случайная замена основания на 1000 пар нуклеотидов происходит в среднем один раз в 200 000 лет; разд. 5.2.1), существуют и такие последовательности, которые удивительно часто претерпевают различного рода структурные изменения. Многие из них представлены высокоповторяющимися нуклеотидными последовательностями, реорганизация которых связана с процессами генетической рекомбинации. Полностью значение этих геномных перестроек пока не понято, однако не вызывает сомнения, что некоторые из них играют важную роль в возникновении эволюционных различий между организмами. Ниже мы познакомимся с некоторыми из повторяющихся последовательностей ДНК и рассмотрим те изменения, которые с ними происходят.

8.6.2. Повторяющиеся нуклеотидные последовательности составляют существенную часть ДНК большинства эукариотических организмов [58]

Открытие высокоповторяющихся нуклеотидных последовательностей в геномах высших эукариот было в известной степени неожиданностью. Впервые они были обнаружены методом ренатурации ДНК, который позволяет оценить степень повторяемости данного гена, т.е. число его копий в геноме. Методика этой процедуры включает дробление геномной ДНК на короткие двуспиральные фрагменты, длина которых составляет приблизительно 1000 нуклеотидов, и последующую их денатурацию, приводящую к образованию

одноцепочечных фрагментов ДНК. Скорость, с которой происходит ренатурация полученной смеси одноцепочечных фрагментов, в условиях, благоприятных для образования стабильной двуспиральной конформации, зависит от того, как много комплементарных копий каждого фрагмента присутствует в этой смеси. В целом реакция протекает очень медленно, потому что для полной ренатурации гаплоидного генома млекопитающего необходимо, чтобы примерно 6 млн. различных 1000-нуклеотидных фрагментов ДНК воссоединились друг с другом по принципу комплементарности. Это означает, что любой ген, присутствующий в диплоидной клетке только в двух копиях, может случайным образом столкнуться с 6 млн. некомплементарных нуклеотидных цепей, пока наконец не свяжется со своей комплементарной половиной.

Когда ДНК, выделенную из типичной клетки млекопитающего, анализируют описанным способом, оказывается, что около 70% нуклеотидных последовательностей ренатурирует с очень малой скоростью, характерной для многочисленной популяции неповторяющихся последовательностей ДНК (полный отжиг такой смеси требует нескольких дней). В то же время остальные 30% суммарной ДНК в основном ренатурируют значительно быстрее. Эта часть клеточной ДНК представлена последовательностями, многократно повторяющимися в геноме и поэтому гораздо более часто сталкивающимися в условиях ренатурации со своими комплементарными копиями. Эти высокоповторяющиеся последовательности ДНК, не имеющие аналогов в геноме бактерий, разделяют на два типа – *сателлитную ДНК* и *рассеянные по геному повторы*.

8.6.3. Генетические рекомбинационные процессы обусловливают увеличение или сокращение числа серийно повторяющихся последовательностей сателлитной ДНК

Наиболее быстро ренатурирующие сегменты ДНК обычно содержат повторяющиеся целыми сериями короткие последовательности нуклеотидов (рис. 8-117). Повторяющаяся единица в последовательностях этого типа может состоять всего из одного или двух нуклеотидов, однако чаще всего ее длина составляет от 170 до 250 нуклеотидов. Такие серийно повторяющиеся нуклеотидные последовательности получили название сателлитная ДНК, так как оказалось, что они имеют необычный нуклеотидный состав и благодаря этому могут быть отделены от основной массы клеточной ДНК как минорный компонент, или «сателлит». Последовательности сателлитной ДНК, вероятнее всего, не транскрибируются и в большинстве случаев локализованы в гетерохроматине, ассоциированном с центромерными зонами хромосом.

У некоторых млекопитающих какой-нибудь один тип последовательностей сателлитной ДНК составляет 10% и более суммарной ДНК и может даже занимать целое хромосомное плечо (несколько миллионов копий повтора на клетку). Похоже, что последовательности сателлитной ДНК в процессе эволюции претерпевали необычайно быстрые изменения и даже меняли свою локализацию в хромосомах. Так, например, человеческий геном содержит по меньшей мере три доминирующие последовательности сателлитной ДНК, которые в различных пропорциях присутствуют в каждой центромере. Если сравнить две гомологичные митотические хромосомы любого индивидуума, то почти наверняка окажется, что некоторые перестройки в сателлитных последовательностях, унаследованных от отца, сильно отличаются от таковых в последовательностях, унаследованных от матери.



Рис. 8-117. Одна из последовательностей сателлитной ДНК, образованная серией повторяющихся блоков из семи нуклеотидов. Данная последовательность обнаружена в геноме дрозофилы.

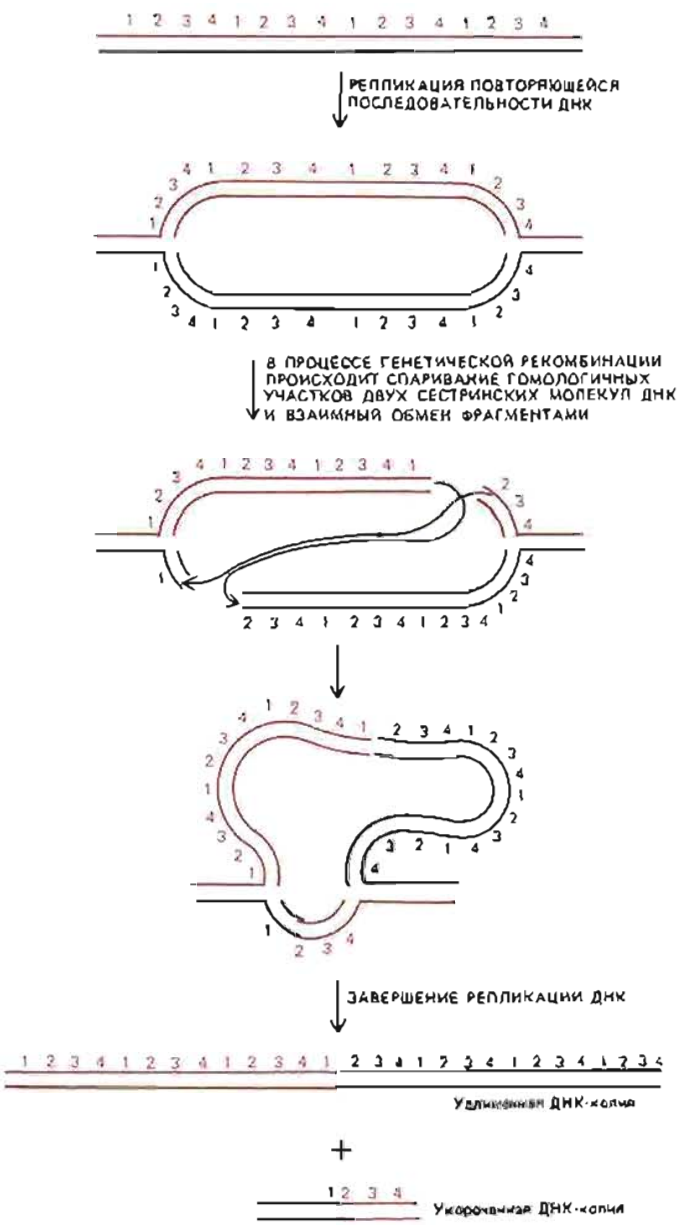


Рис. 8-118. Одна из возможных схем генетической рекомбинации, которая, как предполагают, реализуется в случае сателлитной ДНК. По-видимому, многократное повторение подобных рекомбинационных событий и обусловливает эволюционную нестабильность последовательностей сателлитной ДНК. Поскольку эти последовательности образованы повторяющимися блоками нуклеотидов, генетическая рекомбинация, основанная на узнавании гомологичных пар оснований (разд. 5.5.1) часто оказывается неравной.

Кроме того, у любых двух близкородственных видов обычно наблюдаются заметные различия в последовательностях сателлитной ДНК, что коренным образом отличает их от всех других геномных последовательностей, для которых характерна высокая степень консервативности. Одна из причин относительно быстрой эволюции сателлитной ДНК, по-видимому, кроется в том, что составляющие ее повторы провоцируют дупликации и делеции обширных областей ДНК в процессе генетической рекомбинации. В большинстве своем такие рекомбинационные события являются в каком-то смысле «кровосмесительными», поскольку происходят между двумя новообразованными дочерними спиралями ДНК (рис. 8-118). Неизвестно, оказывает ли генетическая лабильность сателлитной ДНК заметное влияние на эволюцию организмов; между тем, как мы скоро увидим, похожие (хотя гораздо более редкие) рекомбинационные процессы приводят к дупликациям и делециям генетически активных последовательностей ДНК, что может иметь весьма важные последствия с точки зрения эволюции.

8.6.4. Эволюция глобинов показывает, каким образом случайные дупликации ДНК влияют на эволюцию организмов [60]

Представим себе, что в процессе эволюция возникла аминокислотная последовательность, образующая полезный белковый домен с уникальной пространственной структурой. В принципе последовательность ДНК, кодирующая эту полипептидную цепь, может дуплицироваться, а дуплицированная копия в свою очередь может подвергаться дальнейшей модификации, так что в конце концов образуются дополнительные белки, в чем-то отличные от исходного полипептида. Такая картина вырисовывается на основании вполне очевидной гомологии, наблюдаемой в аминокислотной последовательности и структуре различных белков, выполняющих самые разнообразные функции (т. 1, разд. 3.3.6).

Как мы уже упоминали, большинство мутаций оказывает вредное воздействие на организм (разд. 5.2.3). У гаплоидных организмов любой важный ген, прежде чем подвергнуться какой-нибудь существенной модификации, должен предварительно дуплицироваться для того, чтобы жизнеспособность организма не оказалась под угрозой. Диплоидные организмы всегда имеют в запасе вторую, «лишнюю» копию каждого гена, которая может модифицироваться без риска для жизни организма. Таким образом, теоретически диплоидия дает организму известные преимущества, так как в значительной степени повышает частоту возникновения и темп эволюции новых белков. Предполагаемая цепь событий обсуждается в гл. 14 (т. 4, разд. 14.1.7).

Мы имеем возможность воссоздать эту последовательность событий на примере белка эритроцитов – гемоглобина – путем сравнения различных форм этой белковой молекулы, присутствующих в организмах, находящихся на разных ступенях филогенетической лестницы. Молекула типа гемоглобина понадобилась в связи с увеличением общих размеров многоклеточных животных, поскольку последние уже не могли обеспечивать себя кислородом с помощью простой диффузии его через покровы тела. Поэтому похожие молекулы обнаруживаются у всех позвоночных и у многих беспозвоночных животных. Наиболее простой молекулой, переносящей кислород, является глобин, образованный одной-единственной полипептидной цепью, в состав которой входит около 150 аминокислотных остатков. У многих морских червей, насекомых и примитивных рыб переносчиком кислорода служит именно такой глобин. У высших же позвоночных глобиновые цепи двух типов объединяются, образуя одну молекулу гемоглобина. По-видимому, около 500 млн. лет назад в процессе эволюции высших рыб имели место мутации и дупликации соответствующих генов. Эти события привели к возникновению в геноме каждого организма двух слегка различающихся глобиновых генов, кодирующих α- и β-глобиновые цепи. Молекула гемоглобина современных высших позвоночных представляет собой комплекс, образованный четырьмя такими цепями – двумя α-цепями и двумя β-цепями (рис. 8-119). Подобная структура гораздо более эффективна, чем мономерные глобины: четыре центра связывания кислорода в молекуле типа $\alpha_2\beta_2$ взаимодействуют друг с другом, вследствие чего в конформации олигомерной молекулы в момент связывания или отдачи кислорода возникают кооперативные аллостерические изменения (т. 3, разд. 13.4.9); благодаря этому значительно увеличивается доля связанного кислорода, которую гемоглобин может отдавать тканям.

На более поздней ступени эволюции – уже у млекопитающих – один из двух генов β-цепи гемоглобина, по-видимому, еще раз мутировал и дуплицировался, дав начало генам γ-цепи; γ-глобиновые цепи синтезируются только у эмбриона (или плода) и входят в состав гемоглобина типа $\alpha_2\gamma_2$. Этот так называемый *фетальный гемоглобин* имеет более высокое сродство к кислороду, чем гемоглобин взрослых организмов, что весьма важно для развивающегося плода. Дальнейшая дупликация, происшедшая несколько позже – в процессе эволюции приматов, обусловила появление δ-глобиновых генов и, как



Рис. 8-119. Пространственная структура одноцепочечного и четырехцепочечного глобинов. Изображенный здесь четырехцепочечный гемоглобин представляет собой комплекс, состоящий из двух α- и двух β-глобиновых цепей.

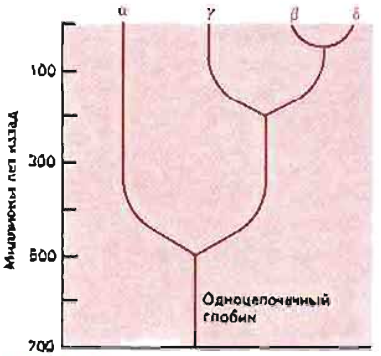


Рис. 8-120. Эволюционное древо, показывающее предполагаемое время возникновения некоторых глобинов человека. Данная информация получена в результате сравнительного анализа соответствующих белков или последовательностей ДНК у различных видов.



Рис. 8-121. Схема взаимного расположения генов, составляющих β-глобиновый кластер в геноме человека. Предполагается, что участки ДНК между указанными генами не несут кодирующей функции. α-Глобиновые гены образуют отдельный кластер, локализующийся в другой хромосоме; по всей видимости, α-глобиновые гены отделились от β-глобиновых генов в результате генетической рекомбинации, имевшей место на довольно раннем этапе эволюции глобинов.

Рис. 8-122. Схематическое изображение молекулы иммуноглобулина. Молекула представляет собой комплекс, образованный двумя парами полипептидных цепей: каждая из двух тяжелых цепей состоит из четырех сходных, ковалентно связанных доменов (обозначенных номерами от 1 до 4), а обе легкие цепи содержат только по два таких домена. Все эти белковые домены, по-видимому, возникли в результате серии последовательных дупликаций одной короткой предковой белковой последовательности.

следствие, еще одной минорной формы гемоглобина ($\alpha_2\delta_2$), обнаруживаемой только у взрослых приматов (рис. 8-120). Точно так же в какой-то момент времени возникли ε-глобиновые гены, обеспечившие существование другой формы эмбрионального гемоглобина – $\alpha_2\varepsilon_2$.

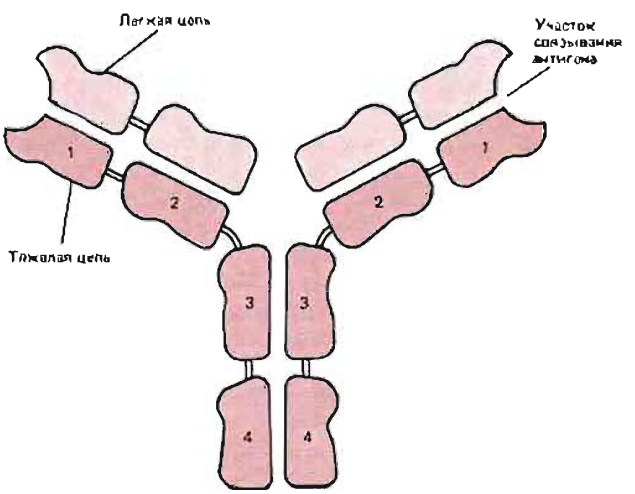
Конечным результатом серии последовательных генных дупликаций, приведших к появлению различающихся между собой цепей гемоглобина, является специфический порядок расположения генов, кодирующих эти различные цепи, которые ведут свое начало от исходной β-цепи. Детальный анализ этих генов с использованием методов генетической инженерии показал, что они составляют группу гомологичных последовательностей ДНК, расположенных в одной из хромосом человека на участке длиной 50 000 нуклеотидов (рис. 8-121). Оказалось также, что некоторые дуплицированные последовательности глобиновой ДНК, локализующиеся в том же участке хромосомы, не являются истинными генами. Эти последовательности, известные как *псевдогены*, обнаруживают очевидную гомологию с функционально активными генами, однако они не способны экспрессироваться вследствие происшедших с ними мутационных изменений. Не стоит удивляться существованию псевдогенов – далеко не каждая дупликация ДНК приводит к появлению нового функционального гена.

Итак, эволюционную историю человека можно проследить по нашим хромосомам, если тщательно проанализировать сходство и различия гомологичных генов на разных ступенях филогенетической лестницы – у червей, рыб, млекопитающих и, наконец, у человека (см. также т. 1, рис. 4-47).

8.6.5. Рекомбинационные процессы также играют роль в создании белковых цепей новых типов путем соединения кодирующих доменов [61]

Мы только что видели, как в процессе эволюции благодаря ряду последовательных генных дупликаций возникло несколько различных молекул гемоглобина, состоящих из двух типов взаимодействующих полипептидных цепей. Аналогичные события приводят также к появлению новых одиночных генов. Белки, кодируемые этими генами, отличаются тем, что содержат тандемно повторяющиеся, похожие друг на друга полипептидные домены, ковалентно связанные между собой. Примерами белков, возникших именно таким путем, могут служить иммуноглобулины (рис. 8-122), альбумины и коллагены.

Весьма вероятно, что присутствие в эукариотической ДНК некодирующих вставок – интронов – значительно ускоряет процесс накопления дупликаций, необходимых для формирования нового гена, ответственного за синтез по-



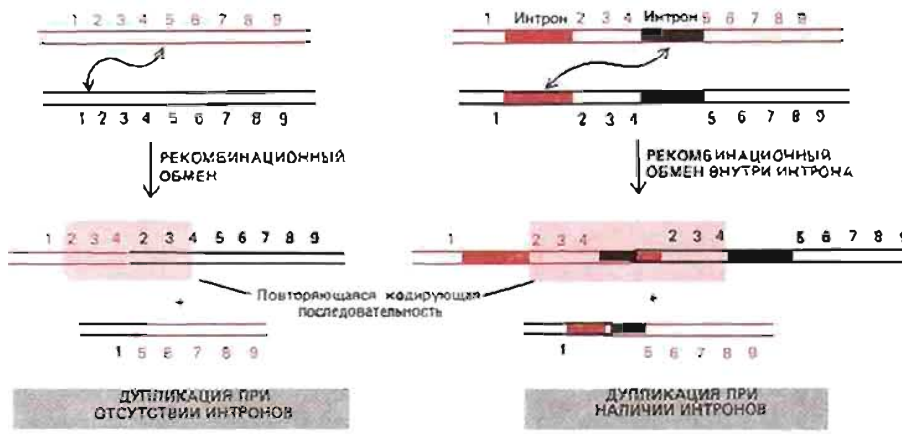


Рис. 8-123. Схема, показывающая, каким образом наличие интронов может способствовать возникновению нового белка, содержащего дуплицированный полипептидный домен, обозначенный здесь как «2 3 4». Следует подчеркнуть, что нуклеотидная последовательность в новообразованном интроне не является жестко заданной (рис. 8-46). Это значит, что к появлению нового белка, содержащего указанную дупликацию, может привести рекомбинация, происшедшая практически в любом месте внутри интрона.

добного белка. В отсутствие интронов в исходной последовательности ДНК существовало бы лишь небольшое число участков, в которых рекомбинационный обмен между сестринскими молекулами ДНК мог привести к дупликации полезного белкового домена; напротив, длинные интроны по обеим сторонам домена заметно умножают число потенциальных точек рекомбинации (рис. 8-123). По этой причине интроны сильно повышают вероятность благоприятной генной дупликации.

Аналогичным образом интроны способствуют возникновению новых полезных белков, так как при наличии интронов повышается вероятность того, что случайный рекомбинационный процесс соединит в одно целое две различные последовательности ДНК, которые кодируют определенные участки двух разных белков. В целом можно сказать, что интроны, присутствующие в кодирующих последовательностях ДНК эукариот, должны повышать частоту возникновения новых белков и ускорять их эволюцию.

8.6.6. Короткие рассеянные повторяющиеся последовательности — универсальные структурные элементы генома эукариот [62]

В геномах большинства млекопитающих последовательности сателлитной ДНК составляют лишь третью часть общего числа повторяющихся последовательностей. Остальные повторы (эта фракция объединяет до 20% всей клеточной ДНК) ренатурируют значительно медленнее, чем сателлитная ДНК, но в то же время быстрее, чем уникальные гены. К таким «умеренным» повторам относится ряд функционально важных участков генома, например гены, кодирующие рРНК, 5S-РНК, тРНК и гистоны. Однако повторяющиеся последовательности, функция которых нам известны, составляют менее 1% эукариотического генома. Как и в случае сателлитной ДНК, природа подавляющего большинства умеренных повторов остается неясной.

В клетках человека и грызунов бо́льшая часть несателлитной повторяющейся ДНК, как оказалось, представлена единственным доминирующим семейством **рассеянных повторяющихся последовательностей**. Данная группа гомологичных участков ДНК отличается от сателлитной ДНК целым рядом характерных свойств:

1. Эти последовательности представляют собой не тандемные повторы, группирующиеся в определенных областях хромосом, а повторы, рассеянные по всему геному в виде сотен тысяч индивидуальных копий, каждая из которых имеет длину около 300 нуклеотидов.
2. Многие рассеянные повторяющиеся последовательности эффективно транскрибируются как в составе длинных РНК-транскриптов, так и в виде самостоятельных коротких молекул РНК.
3. Эти последовательности в ходе эволюции млекопитающих изменялись по

своей первичной структуре и положению в геноме гораздо медленнее, чем элементы сателлитной ДНК.

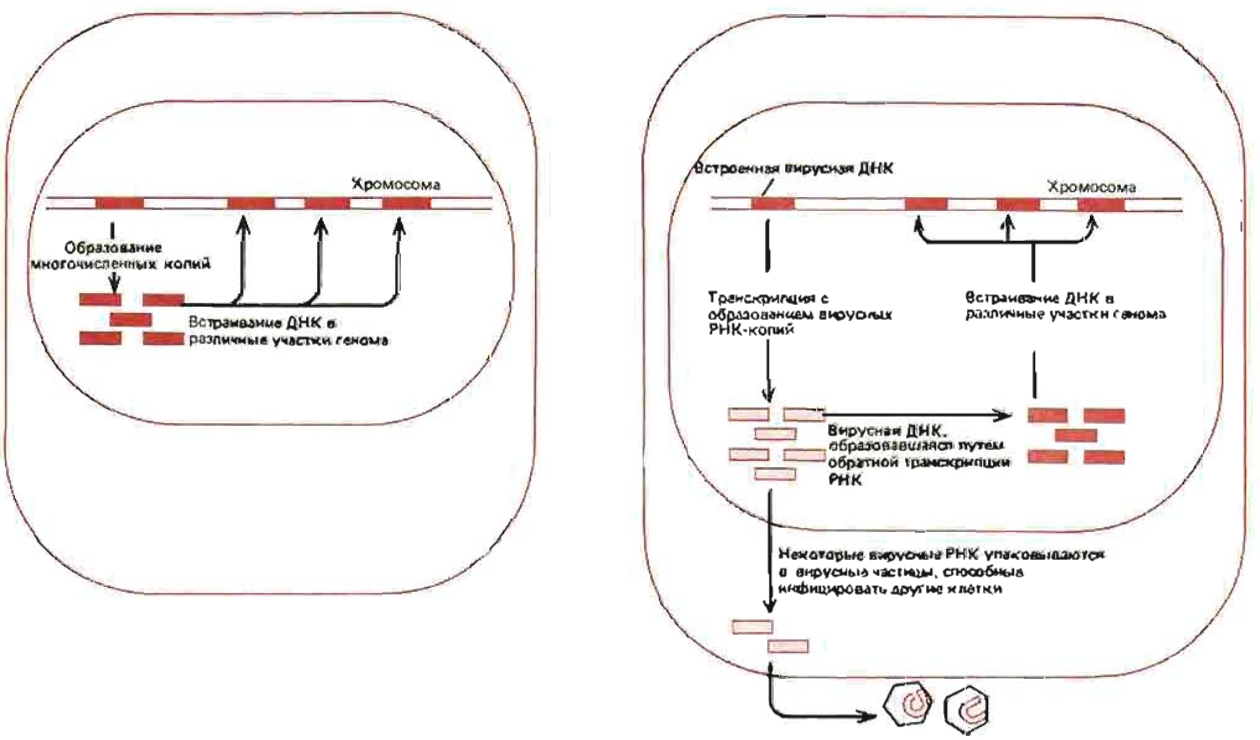
Нетрудно представить себе множество различных функций, которые можно приписать рассеянным повторяющимся последовательностям эукариотического генома. Например, они могли бы служить точками начала репликации ДНК, сигналами процессинга и сплайсинга РНК, некими контрольными участками, регулирующими транскрипцию генов, или же структурными элементами хромосом. Тем не менее конкретные функции этих последовательностей (если таковые существуют) пока остаются для нас загадкой.

Рис. 8-124. Предполагаемая схема возникновения повторяющихся последовательностей ДНК в результате размножения в клетке вирусов или подвижных элементов (красные прямоугольники на схеме слева). В отличие от вирусной ДНК ДНК подвижных элементов не упаковывается в белковые частицы и не покидает клетку. Поэтому, если такой элемент и размножается, это происходит только в пределах одной клетки. Некоторые повторяющиеся последовательности ДНК в геноме представляют собой копии клеточных мРНК; в них отсутствуют интроны, характерные для генов, кодирующих эти мРНК, однако присутствует poly(A)-«хвост». Это означает, что в ряде случаев обратной транскрипции подвергаются РНК, отличные от вирусных; полученные ДНК-транскрипты, подобно вирусным ДНК-транскриптам, могут включаться в клеточный геном (см. также рис. 5-52).

8.6.7. Концепция «эгоистичной» ДНК [63]

Нельзя, однако, исключить возможность того, что рассеянные повторяющиеся последовательности ДНК вообще не выполняют в клетке никаких функций. Описанное выше семейство рассеянных повторов, насчитывающих от 10^5 до 10^6 копий на гаплоидный геном, вероятно, возникло очень давно – во всяком случае до того момента, когда разошлись эволюционные пути приматов и грызунов. Все члены этого семейства, по-видимому, произошли из одной предковой последовательности, которая размножилась и как своеобразный паразит распространилась по всему геному древних млекопитающих. Рассматривая эту первичную последовательность ДНК под таким углом зрения, можно заключить, что она весьма напоминает вирус или, скажем, бактериальный *транспозон*: и тот и другой в известном смысле паразитируют в клетке-хозяине. Эти подвижные элементы генома амплифицируются и дают начало множеству идентичных последовательностей-копий, которые способны внедряться в новые участки ДНК клетки-хозяина и реплицироваться в составе ее хромосомы, получая тем самым возможность пассивно сохраняться в эволюции (рис. 8-124).

Вот почему сложилось мнение, что многие высокоповторяющиеся последовательности ДНК, присутствующие в геномах современных высших орга-



низмов, представляют собой фракцию «эгоистичной» ДНК, которая была отобрана и сохранилась в процессе эволюции только благодаря своей способности реплицироваться и распространяться в пределах генома, не причиняя большого вреда самому организму. Предполагается, что последовательности эгоистичной ДНК особенно быстро распространяются у видов, размножающихся половым путем, поскольку в этом случае хромосомы, переданные потомству одним из родителей, могут «инфицироваться» подвижными элементами, присутствующими в геноме другого родителя и переданными «по наследству» с его хромосомами.

Эгоистичная ДНК составляет по меньшей мере часть свойственного высшим организмам огромного избытка ДНК, не кодирующей белки и, по-видимому, не имеющей для этих организмов жизненно важного значения. Однако даже в том случае, если единственной изначальной функцией рассеянных повторяющихся последовательностей было самосохранение, кажется весьма вероятным, что со временем их взаимоотношения с клеткой-хозяином приобрели характер симбиоза. Например, для того чтобы смягчить неблагоприятный эффект присутствия в геноме клетки-хозяина подвижных элементов (и тем самым увеличить собственные шансы на выживание), у некоторых из них могли «развиться» на концах последовательности нуклеотидов, соответствующие пограничным экзон-интронным зонам генов. Поскольку эти пограничные зоны служат контрольными точками сплайсинга, внедрение таких элементов даже в кодирующую область гена не привело бы к изменениям в первичной структуре мРНК.

Мы уже упоминали о том, каким образом внедрение интронов в кодирующие последовательности эукариотических генов могло бы обеспечить этим организмам дополнительные возможности как в плане совершенствования механизмов генетического контроля (разд. 8.4.15), так и в отношении образования новых белков (разд. 8.6.4). Эгоистичная ДНК, принимающая участие в формировании интронов, могла бы в таком случае сообщить хозяйскому организму некоторые селективные преимущества.

8.6.8. Геномные катаклизмы могут углублять биологическую дивергенцию [64]

Существует, по-видимому, множество причин, приводящих к колонизации эукариотического генома разнообразными и на первый взгляд функционально малозначащими элементами ДНК. Весьма интересны наблюдения, свидетельствующие о том, что иногда такие «интерленты» в геномах дрожжей, насекомых и некоторых растений в определенные моменты активируются и вызывают при этом сложные структурные и функциональные изменения ДНК клетки-хозяина, которые в свою очередь приводят к изменению сразу нескольких признаков и свойств данного организма. Эти изменения наследуются и включаются в сферу действия естественного отбора. В конце концов последовательная цепь описанных событий может привести к формированию нового вида, занимающего другую экологическую нишу.

Примеры такого рода изменений обнаружены у льна. В ответ на те или иные необычные условия выращивания (например, избыток фосфата или недостаток азота в почве) эти растения могут давать семена, из которых вырастают дочерние растения, отличающиеся по ряду признаков от родительских форм. В некоторых случаях потомство представляет собой популяцию растений различных типов, многие из которых дают начало чистым линиям и в дальнейшем не изменяются даже при изменении почвенных условий. Две необычные формы льна были тщательно исследованы. Одна из них (получившая обозначение S) представляет собой заметно укороченное растение, по своей морфологии сходное с родительской формой. Другая, так называемая L-форма лишь ненамного короче родительской, но гораздо более ветвистая и к тому же обладает гладкой, неопушенной коробочкой (рис. 8-125).

Биохимический анализ показал, что внезапный переход обычной

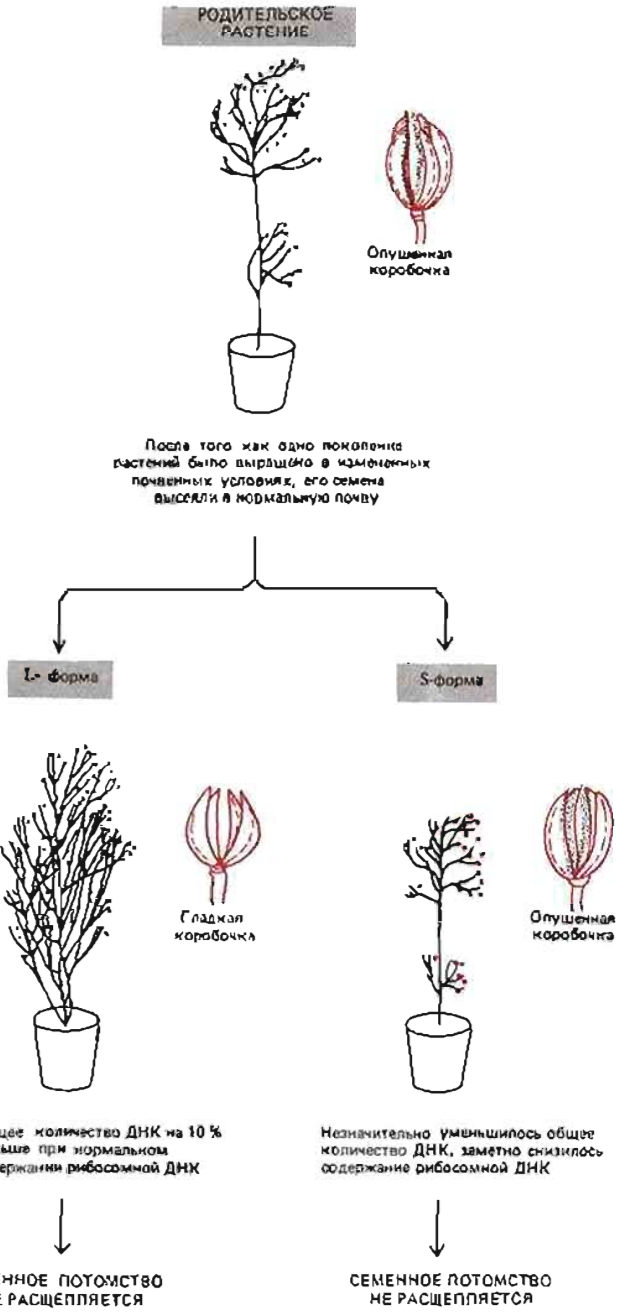


Рис. 8-125. Схема, иллюстрирующая описанные в тексте резкие морфофизиологические изменения, обнаруживаемые у растений льна.

формы льна в S- или L-форму сопровождается заметными изменениями в его геноме. Хотя при этом не наблюдается никаких различий в морфологии хромосом, в клетках L-формы льна обнаруживается на 10% больше ДНК, чем в клетках родительского растения, что является результатом дифференциальной амплификации ряда последовательностей нуклеотидов. Наоборот, клетки S-формы по сравнению с родительскими содержат в среднем на 6% меньше ДНК. Это связано с избирательной делецией некоторых сегментов генома; например, число рибосомных генов в клетках S-формы льна почти вдвое меньше, чем в нормальных.

Остается невыясненным, какие именно из многочисленных изменений в структуре ДНК ответственны за устойчивые морфологические сдвиги, на-



Рис. 8-126. Фотографии, на которых видны изменения в распределении пигмента в глазу взрослой дрозофилы, вызванные каким-то подвижным элементом. Такой элемент внедрился по соседству с геном *white*, ответственным за образование красного глазного пигмента. Вследствие какого-то изменения ДНК, происшедшего в данном хромосомном локусе, ген *white* сохраняет активность только в клетках, расположенных в дорзальной и вентральной областях глаза; последний приобретает бледно-желтую окраску с двумя несоприкасающимися темно-красными пятнами на полюсах. В том случае, если подобные сдвиги возникают в экспрессии гена, который контролирует пролиферацию клеток глаза, наблюдаются существенные изменения в морфологии этого органа, что может иметь адаптивное значение для мутантного организма. (С любезного разрешения Robert Levis и Gerald M. Rubin.)

блюдаемые у растений льна. Неясно также, как эти изменения возникают. Между тем подобного рода индуцируемые наследственные изменения были впервые описаны более 30 лет назад у кукурузы: изящный генетический и цитологический анализ выявил различия в активности и локализации генетических единиц, получивших название *контролирующие элементы*. Согласно современным представлениям, контролирующие элементы в геноме кукурузы аналогичны транспозонам бактерий, дрозофилы и дрожжей, подробно изученным на молекулярном уровне (разд. 5.5.6). Пожалуй, ситуация, наблюдаемая у дрозофилы, более всего напоминает таковую у кукурузы. При скрещивании мух определенных линий индуцируется перемещение мобильных генетических элементов особого типа, вследствие чего в потомстве резко увеличивается число мутантов (этот феномен известен под названием *гибридный дисгенез*). Кроме того, как это было ранее показано на кукурузе, внедрение какого-то мобильного элемента в хромосому дрозофиллы может привести к коренным сдвигам в экспрессии соседних генов (рис. 8-126).

Итак, вырисовывается следующая картина: случайные и достаточно жесткие внешние воздействия способны изменять внутреннюю среду организма и активировать какие-то неизвестные клеточные компоненты, которые в свою очередь заставляют транспозоноподобные генетические элементы перемещаться по геному путем их внедрения в новые участки хромосом и выщепления из старых; иногда эти элементы амплифицируются, претерпевают делеции и перестройки, причем все это сопровождается изменениями в характере экспрессии соседних с ними последовательностей ДНК. Конкретные изменения, вызываемые каждым из таких геномных катаклизмов, определяются, по крайней мере отчасти, законами случая, поэтому уровень, время или общая картина экспрессии отдельных генов у потомков могут изменяться самым различным образом.

Представляется весьма вероятным, что способность генетического аппарата к подобного рода структурной реорганизации играет существенную роль в эволюции организмов. И может быть, именно здесь кроется причина того, что клетки так упорно сохраняют повторяющиеся последовательности ДНК, которые на первый взгляд кажутся нам просто геномными паразитами.

Заключение

Не исключено, что наиболее сложно устроенные организмы ведут свое происхождение от клеток, геном которых обладает наибольшими адаптивными потенциями. Во многих эукариотических геномах структурные перестройки случаются, на удивление, часто; некоторые из таких перестроек, по-видимому, способствуют расширению видового многообразия эукариотических организмов. Повторяющиеся нуклеотидные последовательности, присутствующие в ДНК эукариот, играют важную роль в структурной реорганизации генома, что может служить объяснением факта их относительно высокого содержания в геномах большинства эукариот.

Повторяющиеся последовательности некоторых типов рассеяны по геному в виде одиночных копий. Другие собраны в группы, образующие сателлитную ДНК. Эта последняя эволюционировала необычайно быстро, вероятно, за счет тех же самых случайных рекомбинационных процессов, которые обусловливают возникновение генных дупликаций в других участках генома. Как предполагают, подобные случайные рекомбинационные события играют важную роль в возникновении и эволюции новых белков.

Литература

Общая

DNA Structures. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., Vol. 47, 1983. (Сборник оригинальных статей.)

Hood L. E., Wilson J. H., Wood W. B. Molecular Biology of Eucaryotic Cells, Menlo Park, Ca., Benjamin-Cumming, 1975.

Lewin B. Gene Expression, Vol. 2, Eucaryotic Chromosomes, 2nd ed., New York, Wiley, 1980. (Части 2, 3 и 4 включают основную долю содержащегося в данной главе материала, который изложен на более высоком уровне; кроме того, это богатый источник литературных ссылок.)

Watson J. D. Molecular Biology of the Gene, 3rd ed., Menlo Park, Ca., Benjamin-Cumming, 1976.

Цитированная

1. *Gall J. G.* Chromosome structure and the C-value paradox, J. Cell Biol., **91**, 3s–14s, 1981. (Хорошо написанный обзор.)
   Hsu T. C. Human and Mammalian Cytogenetics; A Historical Perspective, New York, Springer-Verlag, 1979.
   Felsenfeld G. Chromatin, Nature, **271**, 115–122, 1978. (Обзор.)
   Chambon P. Summary: the molecular biology of the eucaryotic genome is coming of age, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **42**, 1209–1234, 1978.
   Bostock C. J., Sumner A. T. The Eucaryotic Chromosome, Amsterdam, North-Holland, 1978. (Для подготовленных читателей.)
   Igo-Kemenes T., Hörz W., Zachau H. G. Chromatin, Annu. Rev. Biochem., **51**, 89–122, 1982.
2. *Isenberg I.* Histones, Annu. Rev. Biochem., **48**, 159–191, 1979.
3. *Kornberg R. D., Klug A.* The nucleosome, Sci. Am., **244** (2), 52–64, 1981.
   McGhee J. D., Felsenfeld G. Nucleosome structure, Annu. Rev. Biochem., **49**, 1115–1156, 1980.
4. *Worcel A., Strogatz S., Riley D.* Structure of chromatin and the linking number of DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 1461–1465, 1981.
   McGhee J. D., Rau D. C., Charney E., Felsenfeld G. Orientation of the nucleosome within the higher order structure of chromatin, Cell, **22**, 87–96, 1980.
5. *Thoma F., Koller T., Klug A.* Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin, J. Cell Biol., **83**, 403–427, 1979.
   Simpson R. T. Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones, Biochemistry, **17**, 5524–5531, 1978.
6. *Allfrey V. G.* Post-synthetic modification of histone structure. In: Chromatin and Chromosome Structure (H. J. Li, R. Eckhardt, eds.), pp. 167–191, New York, Academic Press, 1977.
   Goodwin G. H., Walker J. M., Johns E. W. The high mobility group (HMG) nonhistone chromosomal proteins. In: The Cell Nucleus, Vol. **6** (H. Busch, ed.), pp. 181–219, New York, Academic Press, 1978.
   Sandeen G., Wood W. I., Felsenfeld G. The interaction of high mobility proteins HMG 14 and 17 with nucleosomes, Nucleic Acids Res., **8**, 3757–3778, 1980.
   Ajiro K., Borun T. W., Shulman S. D., McFadden G. M., Cohen L. H. Comparison of the structures of human histones 1A and 1B and their intramolecular phosphorylation sites during the HeLa S-3 cell cycle, Biochemistry, **20**, 1454–1464, 1981.
7. *Ptashne M., Gilbert W.* Genetic repressors, Sci. Am., **222**(6), 36–44, 1970.
   Ohlendorf D. H., Anderson W. F., Fisher R. G., Takeda Y., Matthews B. W. The molecular basis of DNA-protein recognition inferred from the structure of cro repressor, Nature, **298**, 718–723, 1982.
   Tjian R. T antigen binding and the control of SV40 gene expression, Cell, **26**, 1–2, 1981.
   Engelke D. R., Ng S.-Y., Shastry B. S., Roeder R. G. Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes, Cell, **19**, 717–728, 1980.
8. *Zachau H. G., Igo-Kemenes T.* Face to phase with nucleosomes, Cell, **24**, 597–598, 1981.
9. *Elgin S. C. R.* DNase I-hypersensitive sites of chromatin, Cell, **27**, 413–415, 1981.
   Wu C., Gilbert W. Tissue-specific exposure of chromatin structure at the 5′ terminus of the rat preproinsulin gene, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 1577–1580, 1981.

McGhee J. D., Wood W. I., Dolan M., Engel J. D., Felsenfeld G. A 200 base pair region at the 5' end of the chicken adult β-globin gene is accessible to nuclease digestion, Cell, **27**, 45–55, 1981.

Samal B., Worcel A., Louis C., Schedl P. Chromatin structure of the histone genes of *D. melanogaster*, Cell, **23**, 401–409, 1981.

10. *Worcel A., Burgi E.* On the structure of the folded chromosome of *E. coli*, J. Mol. Biol., **71**, 127–148, 1972.

Benyajati C., Worcel A. Isolation, characterisation, and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster*, Cell, **9**, 393–408, 1976.

11. *Marsden M., Laemmli U. K.* Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model, Cell, **17**, 849–858, 1979.

Georgiev G. P., Nedospasov S. A., Bakayev V. V. Supranucleosomal levels of chromatin organization. In: The Cell Nucleus, Vol. 6 (H. Busch, ed.), pp. 3–34, New York, Academic Press, 1978.

12. *Lewin B.* Gene Expression, Vol. 2, Eucaryotic Chromosomes, 2nd ed. pp. 428–440, New York, Wiley, 1980.

Yunis J. J. High resolution of human chromosomes, Science, **191**, 1268–1270, 1976.

13. *Beermann W.* Chromosomes and genes. In: Developmental Studies on Giant Chromosomes (W. Beermann, ed.), pp. 1–33, New York, Springer-Verlag, 1972.

Bostock C. J., Summer A. T. The Eucaryotic Chromosome, pp. 233–265, Amsterdam, Nort-Holland, 1978.

14. Lewin B. Gene Expression, Vol. 2, Eucaryotic Chromosomes, 2nd ed., pp. 479–502, New York, Wiley, 1980.

Judd B. H., Young M. W. An examination of the one cistron: one chromomere concept, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **38**, 573–579, 1974.

15. *Levinger L., Varshavsky A.* Selective arrangement of ubiquitinated and D1 proteincontaining nucleosomes within the *Drosophila* genome, Cell, **28**, 375–385, 1982.

Howard G. C., Abmayr S. M., Shinefeld L. A., Sato V. L., Elgin S. C. R. Monoclonal antibodies against a specific nonhistone chromosomal protein of *Drosophila* associated with active genes, J. Cell Biol., **88**, 219–225, 1981.

Lezzi M., Robert M. Chromosomes isolated from unfixed salivary glands of Chironomus. In: Developmental Studies on Giant Chromosomes (W. Beermann, ed.), pp. 35–56. New York, Springer-Verlag, 1972.

16. *Ohta T., Kimura M.* Functional organization of genetic material as a product of molecular evolution, Nature, **233**, 118–119, 1971.

Gall J. G. Chromosome structure and the C-value paradox, J. Cell Biol., **91**, 3s–14s, 1981.

17. *Darnell J. E., Jr.* Transcription units for mRNA production in eukaryotic cells and their DNA viruses, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., **22**, 327–353, 1979.

Perry R. P. RNA processing comes of age, J. Cell Biol., **91**, 28s–38s, 1981.

18. *Chambon P.* Eucaryotic nuclear RNA polymerases, Annu. Rev. Biochem., **44**, 613–638, 1975.

Brown D. D. Gene expression in eucaryotes, Science, **211**, 667–674, 1981.

Grosveld G. C., de Boer E., Shewmaker C. K., Flavell R. A. DNA sequences necessary for transcription of the rabbit β-globin gene *in vivo*, Nature, **295**, 120–126, 1982.

McKnight S. L., Kingsbury R. Transcriptional control signals of a eucaryotic protein-coding gene, Science, **217**, 316–324, 1982.

19. *Hastie N. D., Bishop J. O.* The expression of three abundance classes of mRNA in mouse tissue, Cell, **9**, 761–774, 1976.

Lewin B. Gene Expression, Vol. 2, Eucaryotic Chromosomes, 2nd ed., pp. 708–719, New York, Wiley, 1980.

20. *Miller O. L.* The nucleolus, chromosomes, and visualization of genetic activity, J. Cell Biol., **91**, 15s–27s, 1981. (Обзор.)

Foe V. E., Wilkinson L. E., Laird C. D. Comparative organisation of active transcription in *Oncopeltus fasciatus*, Cell, **9**, 131–146, 1976.

21. *Beyer A. L., Christensen M. E., Walker B. W., LeStourgeon W. M.* Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hnRNP particles, Cell, **11**, 127–138, 1977.

Beyer A. L., Miller O. L., McKnight S. L. Ribonucleoprotein structure in nascent hnRNA is nonrandom and sequence-dependent, Cell, **20**, 75–84, 1980.

22. *Perry R. P.* RNA processing comes of age, J. Cell Biol., **91**, 28s–38s, 1981. (Содержит исторический обзор.)

Chambon P. Split genes, Sci. Am., **244**(5), 60–71, 1981.

Crick F. Split genes and RNA splicing, Science, **204**, 264–271, 1979.

Darnell J. E., Jr. Variety in the level of gene control in eucaryotic cells, Nature, **297**, 365–371, 1982.
23. *Lerner M. R., Steitz J. A.* Snurps and scyrps, Cell, **25**, 298–300, 1981.
24. *Wozney J., Hanahan D., Tate V., Boedtker H., Doty P.* Structure of the pro α2 collagen gene, Nature, **294**, 129–135, 1981.
25. *Ziff E. B.* Transcription and RNA processing by the DNA tumor viruses, Nature, **287**, 491–499, 1980. (Обзор.)
26. *Early P. et al.* Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin μ gene by alternative RNA processing pathways, Cell, **20**, 313–319, 1980.
27. *Beadle G.* Genes and the chemistry of the organism, Am. Sci., **34**, 31–53, 1946.
28. *Gruss P., Lai C.-J., Dhar R., Khoury G.* Splicing as a requirement for biogenesis of functional 16S mRNA of simian virus 40, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 4317–4321, 1979.
29. *Long E. O., Dawid I. B.* Repeated genes in eucaryotes, Annu. Rev. Biochem., **49**, 727–764, 1980.
Miller O. L. The nucleolus, chromosomes, and vizualization of genetic activity, J. Cell Biol., **91**, 15s–27s, 1981.
30. *Perry R. P.* Processing of RNA, Annu. Rev. Biochem., **45**, 605–629, 1976. (Особое внимание уделено рибосомной РНК.)
Jordan E. G. The Nucleolus, 2nd ed., Oxford University Press, 1978. (Ясно изложенный краткий обзор.)
31. *Ghosh S.* The Nucleolar structure, Int. Rev. Cytol., **44**, 1–28, 1976.
Fawcett D. W. The Cell, 2nd ed., pp. 243–265, Philadelphia, Saunders, 1981.
32. *McClintock B.* The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in Zea Mays, Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., **21**, 294–323, 1934.
Anastassova-Kristeva M. The nucleolar cycle in man. J. Cell Sci., **25**, 103–110, 1977.
33. *Franke W. W., Scheer U., Krohne G., Jarasch E.-D.* The nuclear envelope and the architecture of the nuclear periphery, J. Cell Biol., **91**, 39s–50s, 1981. (Обзор.)
Wolfe S. L. Biology of the Cell, 2nd ed. Belmont, Ca., Wadsworth, 1981. (Главы 11 и 12.)
34. *Fawcett D. W.* The Cell, 2nd ed., pp. 266–302, Philadelphia, Saunders, 1981.
Krstic R. V. Ultrastructure of the Mammalian Cell, pp. 2–10, New York, Springer-Verlag, 1979.
35. *Gerace L., Blobel G.* The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis, Cell, **19**, 277–187, 1980.
36. *Bonner W. M.* Protein migration and accumulation in nuclei. In: The Cell Nucleus, Vol. 6, (H. Busch, ed.), pp. 97–148, New York, Academic Press, 1978.
Paine P. L., Horowitz S. B. The movement of material between nucleus and cytoplasm. In: Cell Biology, A Comprehensive Treatise, Vol. 4 (D. M. Prescott, L. Goldstein, eds.), pp. 299–338, New York, Academic Press, 1980.
37. *Bostock C. J., Sumner A. T.* The Eucaryotic Chromosome, pp. 196–208, Amsterdam, North-Holland, 1978.
38. *Watson J. D.* Molecular Biology of the Gene, 3rd ed. Menlo Park, Ca., Benjamin-Cummings, 1976. (Главы 14 и 17.)
Brown D. D. Gene Expression in eucaryotes, Science, **211**, 667–674, 1981.
39. *Gurdon J. B.* The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles, J. Embriol. Exp. Morphol., **10**, 622–640, 1962.
Steward F. C., Mapes M. O., Mears K. Growth and organized development of cultured cells, Am J. Bot., **45**, 705–713, 1958.
40. *Garrels J. I.* Changes in protein synthesis during myogenesis in a clonal cell line, Dev. Biol., **73**, 134–152, 1979.
Van Nest G., MacDonald R. J., Raman R. K., Rutter W. J. Proteins synthesized and secreted during rat pancreatic development, J. Cell Biol., **86**, 784–794, 1980. (Исследование развивающихся тканей с помощью двумерного гель-электрофореза.)
41. *Derman E. et al.* Transcriptional control in the production of liver-specific mRNAs, Cell, **23**, 731–739, 1981.
42. *Miller J. H., Reznikoff W. S., eds.* The Operon, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1978. (Обзор белков-регуляторов генной активности в бактериальных системах.)
43. *Ptashne M. et al.* How the lambda repressor and cro work, Cell, **19**, 1–11, 1980.
Herskowitz I., Hagen D. The Lysis-lysogeny decision of phage lambda: explicit programming and responsiveness, Annu. Rev. Genet., **14**, 399–445, 1980.
44. *Gierer A.* Molecular models and combinatorial principles in cell differentiation and morphogenesis, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **38**, 951–961, 1974.
45. *Ogden S., Haggerty D., Stoner C. M., Kolodrubetz D., Schleif R.* The *E. coli* L-arabinose

operon: binding sites of the regulatory proteins and a mechanism of positive and negative regulation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3346–3350, 1980.
Yamamoto K.R., Alberts B. Steroid receptors: elements for modulation of eukaryotic transcription, Annu. Rev. Biochem., **45**, 721–746, 1976.

46. *Smith G.R.* DNA supercoilling: another level for regulating gene expression, Cell, **24**, 599–600, 1981.
Sinden R.R., Pettijohn D.E. Chromosomes in living *E. coli* cells are segregated into domains of supercoiling, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 224–228, 1981.
Wang J.C. Superhelical DNA, Trends Biochem. Sci., **5**, 219–221, 1980.

47. *Weintraub H., Groudine M.* Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation, Science, **193**, 847–856, 1976.
Garel A., Zolan M., Axel R. Genes transcribed at diverse rates have a similar conformation in chromatin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 4867–4871, 1977.
Foe V.E. Modulation of ribosomal RNA synthesis in *Oncopeltus fasciatus*: an electron microscopic study of the relationschip between changes in chromatin structure and transcriptional activity, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **42**, 723–740, 1978.
Weisbrod S., Groudine M., Weintraub H. Interaction of HMG 14 and 17 with actively transcribed genes, Cell, **19**, 289–301, 1980.
Mathis D., Oudet P., Chambon P. Structure of transcribing chromatin, Prog. Nuclei Acid Res. Mol. Biol., **24**, 1–55, 1980.
Weisbrod S. Active chromatin. (Обзор.), Nature, **297**, 289–295, 1982.

48. *Ashburner M., Chihara C., Meltzer P., Richards G.* Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **38**, 655–662, 1974.
Lamb M.M., Daneholt B. Characterization of active transcription units in Balbiani rings of *Chironomus tentans*, Cell, **17**, 835–848, 1979.
Korge G. Direct correlation between a chromosome puff and the synthesis of a larval saliva protein in *Drosophila melanogaster*, Chromosoma, **62**, 155–174, 1977. (Феномен «инфекционности» пуфов.)

49. *Sommerville J., Malcolm D.B., Callan H.G.,* The organization of transcription on lampbrush chromosomes, Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.), **283**, 359–366, 1978.
Bostock C.J., Sumner A.T. The Eucaryotic Chromosome, pp. 347–374, Amsterdam, North-Holland, 1978.

50. *Hagenbüchle O., Tosl M., Schibler U., Bovey R., Wellauer P.K., Young R.A.* Mouse liver and salivary gland α-amylase mRNAs differ only in 5′ non-translated sequences, Nature, **289**, 643–646, 1981.
Marie J., Simon M.-P., Dreyfus J.-C., Kahn A. One gene, but two messenger RNAs encode liver L and red cell L′ pyruvate kinase subunits, Nature, **292**, 70–72, 1981.
Amara S.G., Jonas V., Rosenfeld M.G., Ong E.S., Evans R.M. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products, Nature, **298**, 240–244, 1982.

51. *Brown S.W.* Heterochromatin, Science, **151**, 417–425, 1966.
Hsu T.C., Cooper J.E.K., Mace M.L., Brinkley B.R. Arrangement of centromeres in mouse cells, Chromosoma, **34**, 73–87, 1971.

52. *Lyon M.F.* X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals, Biol. Rev., **47**, 1–35, 1972.
Cattanach B.M. Control of chromosome inactivation, Annu. Rev. Genet., **9**, 1–18, 1975.
Martin G.R. X-chromosome inactivation in mammals, Cell, **29**, 721–724, 1982.

53. *Alberts B., Worcel A., Weintraub H.* On the biological implications of chromatin structure. In: Organisation and Expression of the Eukaryotic Genome, E.M. Bradbury, K. Javaherian, eds., pp. 165–191, New York, Academic Press, 1977.

54. *Lazin A., Riggs A.D.* DNA methylation and gene function, Science, **210**, 604–610, 1980.
Naveh-Many T., Cedar H. Active gene sequences are undermethylated, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 4246–4250, 1981.
Groudine M., Eisenman R., Weintraub H. Chromatin structure of endogenous retroviral genes and activation by an inhibitor of DNA methylation, Nature, **292**, 311–317, 1981.

55. *Simon M., Zeig J., Silverman M., Mandel G., Doolittle R.* Phase variation: evolution of a controlling element, Science, **209**, 1370–1374, 1980.
Kushner P.J., Blair L.C., Hershkowitz I. Control of yeast cell types by mobile genes: a test, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 2564–5268, 1979.
Borst P., Cross G.A.M. Molecular basis for trypanosome antigenic variation, Cell, **29**, 291–303, 1982.

56. *Beermann S.* The diminution of heterochromatic chromosomal segments in *Cyclops* (Crustacea, Copepoda), Chromosoma, **60**, 297–344, 1977.
Spradling A.C., Mahowald A.P. Amplification of genes for chorion proteins during

oogenesis in *Drosophila melanogaster*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1096–1100, 1980.
Gall J. G. Chromosome structure and the C-value paradox, J. Cell Biol., **91**, 3s–14s, 1981. (Содержит обзор данных по амплификации генов.)
Sakano H., Hüppi K., Heinrich G., Tonegawa S. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes, Nature, **280**, 288–293, 1979.
57. *Hsu T. C.* Human and Mammalian Cytogenetics: A Historical Perspective., New York, Springer-Verlag, 1979. (Главы 22 и 23.)
Klein G. The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis, Nature, **294**, 313–318, 1981. (Обзор.)
Cairns J. The origin of human cancers, Nature, 289, 353–357, 1981.
Szostak J. W., Blackburn E. H. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors, Cell, **29**, 245–255, 1982.
58. *Lewin B.* Gene Expression, Vol. 2, Eucaryotic Chromosomes, 2nd ed., pp. 503–569, 861–930, New York, Wiley, 1980.
59. *Hsu T. C.* Human and Mammalian Cytogenetics: A Historical Perspective, New York, Springer-Verlag, 1979.
Craig-Holmes A. P., Shaw M. W. Polymorphism of human constitutive heterochromatin, Science, **174**, 702–704, 1971.
John B., Miklos G. L. G. Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin, Int. Rev. Cytol., **58**, 1–114, 1979.
60. *Ingram V.* Gene evolution and the hemoglobins, Nature, **189**, 704–708, 1961.
Efstratiadis A. et al. The structure and evolution of the human β-globin gene family, Cell, **21**, 653–668, 1980.
Proudfoot N. Pseudogenes, Nature, **286**, 840–841, 1980.
Schimke R. T. Gene amplification and drug resistance, Sci. Am., **243**(5), 60–69, 1980.
61. *Doolittle R. F.* Protein evolution. In: The Proteins, Vol. 4, 3rd ed., H. Neurath, R. L. Hill, eds., pp. 1–118, New York, Academic Press, 1979.
Darnell J. E. Implications of RNA-RNA splicing in evolution of eucaryotic cells, Science, **202**, 1257–1260, 1978.
62. *Jelinek W. R., Schmid C. W.* Repetitive sequeces in eukaryotic DNA and their expression, Annu. Rev. Biochem., **51**, 813–844, 1982.
Jagadeeswaran P., Forget B. G., Weissman S. M., Short interspersed repetitive DNA elements in eucaryotes: transposable DNA elements generated by reverse transcription of RNA Pol III transcripts? Cell, **26**, 141–142, 1981.
63. *Orgel L. E., Crick F. H. C.* Selfish DNA: the ultimate parasite, Nature, **284**, 604–607, 1980.
Doolittle W. F., Saplenza C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution, Nature, **284**, 601–603, 1980.
Cohen S. N., Shapiro J. A. Transposable genetic elements, Sci. Am., **242**(2), 40–49, 1980.
64. *McClintock B.* Controlling elements and the gene, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **21**, 197–216, 1956.
Cullis C. A. Molecular aspects of the environmental induction of heritable changes in flax, Heredity, **38**, 129–154, 1977. (Обзор.)
Spradling A. C., Rubin G. M. Drosophila genome organisation: conserved and dynamic aspects, Annu. Rev. Genet., **15**, 219–264, 1981.
Roeder G. S., Farabaugh P. J., Chaleff D. T., Fink G. R. The origins of gene instability in yeast, Science, **209**, 1375–1380, 1980.
Bingham P. M., Kidwell M. G., Rubin G. M. The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: the role of the P element, a P-strain-specific transposon family, Cell, **29**, 995–1004, 1982.

Оглавление

Часть II. Молекулярная организация клеток

Глава 5. Основные генетические механизмы 7

5.1. Синтез белка 7
5.1.1. Декодирование заключенной в ДНК информации о структуре белка 7
5.1.2. РНК-полимераза «переписывает» заключенную в ДНК информацию в виде РНК 8
5.1.3. Синтез белка – процесс очень сложный 11
5.1.4. Каждая аминокислота присоединяется к соответствующей молекуле тРНК при помощи специфического фермента 13
5.1.5. Аминокислоты присоединяются к карбоксильному концу растущей полипептидной цепи 15
5.1.6. Выбор присоединяемой аминокислоты определяется комплементарным спариванием оснований между связанной с ней молекулой тРНК и цепью мРНК 16
5.1.7. Реакции синтеза белка протекают на рибосомах 17
5.1.8. Рибосома продвигается шаг за шагом вдоль цепи мРНК 17
5.1.9. Белковая цепь отделяется от рибосомы, как только она достигает какого-либо одного из трех терминирующих кодонов 19
5.1.10. Рамка считывания матрицы устанавливается в момент инициации синтеза полипептидной цепи 19
5.1.11. Общая скорость белкового синтеза регулируется у эукариот факторами инициации 20
5.1.12. Многие ингибиторы белкового синтеза прокариот – эффективные антибиотики 21
Заключение 22

5.2. Механизмы репарации ДНК 22
5.2.1. Высокая надежность сохранения нуклеотидных последовательностей ДНК 22
5.2.2. Частоты спонтанных мутаций, определенные прямым методом, совпадают с оценками, полученными на основе эволюционных исследований 23
5.2.3. Большинство мутаций, изменяющих белки, вредны и элиминируются естественным отбором 23
5.2.4. Наблюдаемые низкие частоты мутаций необходимы для жизни 24
5.2.5. Низкие частоты мутаций означают, что родственные организмы построены практически из одних и тех же белков 24
5.2.6. Без коррекции спонтанные повреждения в ДНК быстро изменили бы ее нуклеотидные последовательности 25
5.2.7. Стабильность генов обеспечивается репарацией ДНК 26
5.2.8. Особенности структуры и химические свойства двойной спирали ДНК облегчают ее репарацию 28
Заключение 29

5.3. Механизмы репликации ДНК 30
5.3.1. Репликация ДНК, как и ее репарация, основана на комплементарном спаривании оснований 30
5.3.2. Репликационная вилка асимметрична 32
5.3.3. Высокая точность репликации ДНК предполагает наличие механизма, осуществляющего коррекцию 33
5.3.4. Репликация ДНК в направлении 5′ → 3′ по самой своей природе отличается большей точностью 35
5.3.5. Для синтеза коротких затравочных молекул на матрице для отстающей цепи требуется особый фермент 35
5.3.6. Особые белки способствуют расплетанию двойной спирали ДНК перед репликационной вилкой 36
5.3.7. Другие специализированные белки предотвращают спутывание ДНК 37
5.3.8. Репликация ДНК у эукариот и прокариот в основных чертах сходна 39
5.3.9. Репликационные вилки возникают в точках начала репликации 41
Заключение 41

5.4. Вирусы 42
5.4.1. Вирусы – это мобильные гены 42
5.4.2. Генетическим компонентом вируса является ДНК или РНК 44
5.4.3. Вирус заключен в белковый капсид или в мембранную оболочку
5.4.4. Хромосомы вируса обычно несут в себе информацию для синтеза одного или нескольких ферментов, участвующих в репликации вирусной нуклеиновой кислоты 45
5.4.5. Геномы вирусов представлены разнообразными формами 45
5.4.6. Хромосомы вирусов способны включаться в хромосомы клетки-хозяина 46
5.4.7. РНК-вирусы реплицируются также путем образования комплементарных цепей 47
5.4.8. Генетические элементы вирусов способны превращать нормальные клетки в раковые 48
5.4.9. Как эволюционировали вирусы? 49
Заключение 50

5.5. Механизмы генетической рекомбинации 51
5.5.1. Процессы общей рекомбинации направляются взаимодействиями, обусловленными спариванием оснований между комплементарными цепями гомологичных спиралей ДНК 51
5.5.2. Общая рекомбинация инициируется в точке разрыва одной из цепей двойной спирали ДНК 52
5.5.3. Специальные белки дают возможность одиночным цепям ДНК спариваться с гомологичным участком двойной спирали ДНК 53
5.5.4. Генетическая рекомбинация включает обычно обмен с перекрещиванием цепей 56
5.5.5. Общая рекомбинация способствует процессам репарации ДНК 58
5.5.6. Ферменты сайт-специфической рекомбинации вводят в геномы особые нуклеотидные последовательности ДНК и выводят их из геномов 58
Заключение 61
Литература 62

Глава 6. Плазматическая мембрана 65

6.1. Липидный бислой 65
6.1.1. Мембранные липиды – это амфипатические молекулы, самопроизвольно формирующие бислои 67
6.1.2. Липидный бислой – это двумерная жидкость 69
6.1.3. Текучесть липидного бислоя зависит от его состава 70
6.1.4. Липидный бислой служит растворителем для мембранных белков 71
6.1.5. Липидный бислой плазматической мембраны асимметричен 72
6.1.6. Гликолипиды обнаруживаются на поверхности всех плазматических мембран, однако их функция неизвестна 73
Заключение 75

6.2. Мембранные белки 75
6.2.1. Многие мембранные белки удерживаются в бислое за счет гидрофобных взаимодействий с липидными молекулами 76
6.2.2. Использование электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия произвело революцию в исследовании мембранных белков 78
6.2.3. Поверхность мембранных белков, обращенную к цитоплазме, можно изучать на примере эритроцитов 78
6.2.4. Спектрин непрочно связан с внутренней стороной мембраны эритроцитов 80
6.2.5. Гликофорин пронизывает липидный бислой в виде одиночной α-спирали 81
6.2.6. Полоса III из мембраны эритроцитов человека представляет собой транспортный белок 82
6.2.7. Бактериородопсин – это протонный насос, пересекающий бислой в виде семи α-спиралей 83
6.2.8. Транспортные белки мембран можно увидеть в электронный микроскоп с помощью метода замораживания – скалывания 84
6.2.9. Для изучения некоторых белков из плазматической мембраны клеток, имеющих ядро, можно использовать реагенты, осуществляющие направленное мечение 86
6.2.10. При слиянии двух клеток белки их плазматических мембран быстро перемешиваются 87
6.2.11. Если мембранные белки «сшить» с помощью антител, они собираются в кластеры, образуя на поверхности клетки дискретные зоны неправильной формы 89
6.2.12. Сшитые друг с другом мембранные белки активно перемещаются к одному полюсу клетки в процессе «кэппинга» 91
6.2.13. Противоположные точки зрения на то, как образуются колпачки: гипотеза мембранного потока и гипотеза перетаскивания 92
6.2.14. С помощью индуцированного антителами перераспределения молекул можно определить, связаны ли два полипептида друг с другом в плазматической мембране 93
6.2.15. Скорость латеральной диффузии мембранных белков можно измерить 94

6.2.16. В клетках существуют способы уменьшения латеральной подвижности некоторых мембранных белков 95
Заключение 96

6.3. Мембранные углеводы 96
6.3.1. Углеводы в биологических мембранах располагаются только на поверхности, не контактирующей с цитоплазмой 96
6.3.2. Предполагается, что углеводы, расположенные на клеточной поверхности, играют важную роль во взаимодействии между клетками, но это трудно доказать 98
Заключение 98

6.4. Транспорт через мембрану малых молекул 99
6.4.1. Липидные бислои, не содержащие белков, не проницаемы для ионов, но свободно пропускают воду 100
6.4.2. Связанные с мембранами транспортные белки переносят через клеточные мембраны определенные молекулы малых размеров 100
6.4.3. Транспортные белки формируют в липидном бислое сквозные проходы 102
6.4.4. Белки-переносчики действуют как связанные с мембраной ферменты 102
6.4.5. Мембранный потенциал, существующий на плазматической мембране, поддерживается с помощью $(Na^+ + K^+)$-насоса 103
6.4.6. Повсеместно встречающийся в плазматической мембране $(Na^+ + K^+)$-насос – это АТР-аза 104
6.4.7. $(Na^+ + K^+)$-АТР-аза помогает регулировать объем клетки, контролируя внутриклеточные концентрации растворенных веществ 106
6.4.8. Некоторые Ca^{2+}-насосы – это тоже мембраносвязанные АТР-азы 108
6.4.9. Мембраносвязанные ферменты, синтезирующие АТР, – это транспортные АТР-азы, действующие в обратном направлении 109
6.4.10. Активный транспорт может осуществляться с помощью ионных градиентов 109
6.4.11. Активный транспорт в бактериях может идти путем векторного переноса групп или с участием водорастворимых связывающих белков 111
6.4.12. Некоторые трансмембранные белковые каналы имеют «ворота», открывающиеся только на короткое время 112
6.4.13. Асимметрично распределенные ионные каналы могут генерировать потоки ионов, поляризующие клетки 114
6.4.14. Ионофоры повышают ионную проницаемость искусственных и биологических мембран 115
Заключение 116

6.5. Мембранный транспорт макромолекул и частиц: экзоцитоз и эндоцитоз 116
6.5.1. Экзоцитоз происходит за счет слияния внутриклеточных пузырьков с плазматической мембраной 118
6.5.2. Индуцированный экзоцитоз – это локальный ответ плазматической мембраны и находящейся под ней цитоплазмы 119
6.5.3. Слияние мембран происходит путем слипания бислоев и последующего их объединения 120
6.5.4. В большинстве клеток эндоцитоз идет непрерывно 120
6.5.5. Большинство эндоцитозных пузырьков в конечном итоге сливается с лизосомами 122
6.5.6. Многие эндоцитозные пузырьки имеют кайму 122
6.5.7. Окаймленные ямки и пузырьки обеспечивают особый тип опосредуемого рецепторами эндоцитоза макромолекул 123
6.5.8. Многие рецепторы на поверхности клетки ассоциируют с окаймленными ямками только после связывания лиганда 126
6.5.9. Некоторые макромолекулы могут прямо проходить через клеточные мембраны 126
6.5.10. Специальные клетки-фагоциты поглощают частицы, связывающиеся со специфическими рецепторами на их поверхности 126
6.5.11. Фагоцитоз – это локальная ответная реакция, осуществляющаяся путем «застегивания» мембраны по принципу застежки-молнии 128
6.5.12. Транспорт через мембраны, осуществляемый посредством пузырьков: каким образом он приводится в действие, направляется и регулируется? 129
Заключение 129
Литература 130

Глава 7. Внутренние мембраны и синтез макромолекул 133

7.1. Компартментализация в клетках высших организмов 133
7.1.1. Крупным эукариотическим клеткам необходимы внутренние мембраны 133
7.1.2. Внутренние мембраны разделяют клетку на специализированные компартменты 135
7.1.3. Даже сложные эукариотические клетки имеют лишь несколько основных внутриклеточных компартментов 135
7.1.4. Внутриклеточные компартменты позволяют клетке осуществлять одновременно много несовместимых друг с другом химических реакций 138
7.1.5. С помощью вирусов удается обнаружить, что между компартментами клетки-хозяина существуют высокоорганизованные пути сообщения 138
7.1.6. Различные вирусы перемещаются по клетке различными путями 140
Заключение 141

7.2. Цитозоль 141
7.2.1. Большинство реакций промежуточного обмена происходит в цитозоле 141
7.2.2. Многие белки синтезируются на рибосомах в цитозоле 143
7.2.3. В результате связывания многих рибосом с одной молекулой мРНК формируются полисомы 143
7.2.4. Синтез белка блокируется специфическими ингибиторами 144
7.2.5. Некоторые белки регулируют скорость своего собственного синтеза путем связывания с молекулами соответствующих мРНК 146
7.2.6. У эукариот на каждой молекуле мРНК может синтезироваться полипептидная цепь только одного типа 147
7.2.7. В эукариотических клетках часто синтезируются полибелки 148
7.2.8. После завершения синтеза белков многие из них подвергаются ковалентной модификации 149
7.2.9. Некоторые белки деградируют вскоре после того, как они были синтезированы 150
7.2.10. Не все белки, синтезированные в цитозоле, остаются в нем 151
Заключение 151

7.3. Эндоплазматический ретикулум 151
7.3.1. Прикрепленные к ЭР рибосомы определяют границы его «шероховатых» областей 152
7.3.2. Гладким ЭР изобилуют некоторые специализированные клетки 155
7.3.3. Шероховатая и гладкая области ЭР могут быть физически отделены друг от друга 155
7.3.4. Шероховатые области ЭР содержат специфические белки, ответственные за связывание рибосом 157
7.3.5. Белки, синтезируемые на мембраносвязанных рибосомах, в процессе трансляции проходят через мембрану 157
7.3.6. Прямые доказательства в пользу концепции направленного выведения были получены из экспериментов, проведенных на бактериях 159
7.3.7. Мембраносвязанные рибосомы происходят от свободных рибосом, которые направляются к мембране ЭР с помощью специальных сигнальных последовательностей 159
7.3.8. Существуют генетические данные в пользу гипотезы сигнальной последовательности 161
7.3.9. Некоторые белки пересекают мембраны с помощью механизма посттрансляционного импорта, а не путем направленного выведения 161
7.3.10. Большинство белков, синтезированных в шероховатом ЭР, гликозилируется 162
7.3.11. Олигосахарид присоединяется к растущей полипептидной цепи на обращенной к полости стороне мембраны ЭР 164
7.3.12. Олигосахарид присоединяется к полипептиду при участии активированного липида и затем почти немедленно модифицируется 164
7.3.13. Липиды синтезируются на мембране ЭР 167
7.3.14. Биосинтез липидов асимметричен 168
7.3.15. Специальные белки переносят фосфолипиды из ЭР в митохондрии 168
7.3.16. Обращенная к полости сторона любой внутренней органеллы топологически эквивалентна наружной поверхности клетки 169
7.3.17. Рост мембран за счет непрерывного увеличения ЭР обеспечивает распространение трансмембранной асимметрии 171
Заключение 172

7.4. Аппарат Гольджи 172
7.4.1. Аппарат Гольджи состоит из стопок дисковидных цистерн, с которыми ассоциированы мелкие пузырьки 172
7.4.2. Аппарат Гольджи структурно и биохимически поляризован 173
7.4.3. Аппарат Гольджи пока еще непонятен с точки зрения его биохимических свойств 174
7.4.4. В аппарате Гольджи происходит модификация структуры углеводов 174

Scan - nau; Processing of the scan. ocr - waleriy, 2017

7.4.5. Процессинг олигосахаридов осуществляется с помощью чрезвычайно сложного и точно запрограммированного механизма 177
7.4.6. Точная программа отщепления углеводных остатков от олигосахаридов определяется на ранних стадиях их процессинга с помощью некоего необратимого «переключателя» 178
7.4.7. Процесс модификации углеводов в аппарате Гольджи можно изучать с помощью метода ридиоавтографии 178
7.4.8. Белки, предназначенные для секреции, упаковываются в ассоциированные с аппаратом Гольджи секреторные пузырьки, которые затем сливаются с плазматической мембраной 179
7.4.9. Компоненты мембран непрерывно совершают круговорот 180
7.4.10. Слияние и круговорот мембран можно продемонстрировать с помощью электронной микроскопии 181
7.4.11. Полагают, что окаймленные пузырьки играют главную роль в процессах внутриклеточной сортировки белков 182
7.4.12. Почему существует аппарат Гольджи? 184
Заключение 185

7.5. Лизосомы и пероксисомы 185
7.5.1. Лизосомы – это основные места, где происходит расщепление макромолекул 185
7.5.2. Гистохимическое окрашивание наглядно показывает, что лизосомы – гетерогенные органеллы 186
7.5.3. Первичные лизосомы формируются путем отпочковывания от аппарата Гольджи 188
7.5.4. В культуре клеток, полученных от больных с недостаточностью какого-либо лизосомного фермента, нарушенную функцию лизосом можно восстановить, добавив недостающий фермент к культуральной среде 189
7.5.5. В клетки проникают только те лизосомные гидролазы, которые содержат олигосахарид с фосфорилированным остатком маннозы 190
7.5.6. Внутриклеточные гидролазы, вероятно, направляются в первичные лизосомы с помощью маннозофосфатного маркера 191
7.5.7. Мембрана пероксисомы образуется путем отпочковывания от гладкого ЭР 192
7.5.8. Пероксисомы используют кислород для осуществления катаболических реакций 192
7.5.9. Пероксисомы в клетках разных типов различаются по своему ферментному составу 193
7.5.10. Механизм сортировки, подобный тому, который используется в лизосомах, может действовать и в других внутриклеточных компартментах 194
Заключение 195

7.6. Органеллы с двойными мембранами: ядро, митохондрии и хлоропласты 196
7.6.1. Бактерии, обладающие внутренней и наружной клеточными мембранами, можно рассматривать как модели органелл с двойной мембраной 196
7.6.2. Мембранные белки, вероятно, перемещаются между внутренним и внешним бислоями в зонах слипания 197
7.6.3. Зоны слипания, вероятно, также принимают участие в транспорте водорастворимых веществ в полость органелл с двойными мембранами 198
Заключение 200
Литература 200

Глава 8. Клеточное ядро 204

8.1. Структурная организация ДНК в составе хромосом 205
8.1.1. Гистоны – это самые консервативные из всех известных белков 205
8.1.2. Ассоциация гистонов с ДНК приводит к формированию нуклеосом – структурных единиц хроматина 207
8.1.3. Дальнейшая компактизация ДНК в составе хроматина связана с образованием наднуклеосомных структур 208
8.1.4. Гистон H1 обеспечивает укладку нуклеосомной нити 208
8.1.5. Не все нуклеосомы упакованы одинаково 209
8.1.6. Двойная спираль ДНК усеяна белками, узнающими специфические последовательности нуклеотидов 211
8.1.7. Белки могут узнавать специфические последовательности ДНК благодаря тому, что они образуют водородные связи с определенными азотистыми основаниями и «чувствуют» геометрическую форму данного участка двойной спирали 213
8.1.8. Гистоны ограничивают доступность ДНК для других ДНК-связывающих белков и тем самым участвуют в регуляции активности генов 215
8.1.9. Нуклеосомные частицы расположены на хромосомной ДНК неслучайным образом 216
8.1.10. Каждая хромосома содержит, вероятно, только одну очень длинную молекулу ДНК, имеющую петельную организацию 216
8.1.11. Полосы в митотических хромосомах указывают на существование еще более высоких уровней структурной организации хроматина 217
8.1.12. В политенных хромосомах можно увидеть интерфазные гены 222
8.1.13. Каждый петельный домен хроматина, возможно, соответствует отдельной функциональной единице 224
8.1.14. Разные хроматиновые домены содержат, по-видимому, различные по структуре нуклеосомы 225
8.1.15. Бо́льшая часть хромосомной ДНК не кодирует белки 226
Заключение 227

8.2. Синтез и процессинг РНК 228
8.2.1. Синтез РНК у эукариот осуществляют три различные РНК-полимеразы 228
8.2.2. Некоторые последовательности ДНК транскрибируются РНК-полимеразой II гораздо чаще, чем другие 230
8.2.3. В процессе транскрипции ДНК остается в составе нуклеосом 232
8.2.4. Новообразованная РНК упаковывается в рибонуклеопротеиновые частицы 233
8.2.5. Предшественники информационной РНК ковалентно модифицируются по обоим концам молекул 233
8.2.6. В ходе процессинга из середины молекул РНК удаляются длинные нуклеотидные последовательности 235
8.2.7. Малые ядерные рибонуклеопротеиновые частицы, возможно, участвуют в процессинге РНК 237
8.2.8. Из одного РНК-транскрипта может вырезаться множество интронных последовательностей 239
8.2.9. Процессинг одного и того же РНК-транскрипта может осуществляться разными способами, давая тем самым начало нескольким мРНК, кодирующим разные белки 241
8.2.10. Одна и та же последовательность ДНК на разных стадиях развития клетки может направлять синтез различных белков 241
8.2.11. Что такое ген? 244
8.2.12. Экспорт РНК из ядра в цитоплазму предполагает наличие соответствующих молекулярных сигналов 244
8.2.13. Рибосомные и транспортные РНК синтезируются на тандемно повторяющихся идентичных генах 245
8.2.14. Ядрышко – это центр образования рибосом 247
8.2.15. Ядрышко имеет весьма сложную структуру 248
8.2.16. После каждого митоза ядрышко образуется заново из специфических участков хромосом 250
Заключение 250

8.3. Ядерная оболочка 252
8.3.1. Ядро окружено двойной мембраной 252
8.3.2. Ядерная ламина способствует поддержанию формы ядра 253
8.3.3. Ядерный транспорт осуществляется через ядерные поры 255
8.3.4. Ядерные поры, вероятно, обеспечивают избирательный транспорт крупных частиц 256
8.3.5. Внутренняя поверхность ядерной ламины выполняет функцию структурного организатора хромосом 257
Заключение 258

8.4. Основные элементы контроля экспрессии генов 259
8.4.1. Все клетки многоклеточного организма содержат одинаковые последовательности ДНК 259
8.4.2. Клетки различных типов синтезируют разные наборы белков 260
8.4.3. В клетках различных типов транскрибируются разные наборы генов 261
8.4.4. Белки-репрессоры ингибируют транскрипцию некоторых бактериальных генов 262
8.4.5. В клетках высших эукариот, по-видимому, более распространены белки-активаторы генной активности 264
8.4.6. Благодаря взаимодействию двух регуляторных белков, каждый из которых блокирует синтез другого, бактериальная клетка обладает устойчивой «памятью» 266
8.4.7. У эукариот регуляторные белки, одновременно контролирующие активность большого числа генов, могут использоваться в различных комбинациях, для того чтобы обеспечить развитие разных тканей 268
8.4.8. В принципе развитие многих типов дифференцированных клеток может эффективно определяться различными комбинациями всего нескольких регуляторных белков, контролирующих активность генов 269