

Ф. Л. Калинин

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ



Ф. Л. Калинин

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Ф. Л. Калинин

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

К И Е В

ГОЛОВНОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО
ИЗДАТЕЛЬСКОГО ОБЪЕДИНЕНИЯ
«ВИЩА ШКОЛА»

1978

57.04
К17

УДК 576.1 (07)

Рекомендовано секцией биологии Научно-технического совета Министерства высшего и среднего специального образования УССР для использования студентами биологических специальностей университетов при изучении курса молекулярной биологии.

Основы молекулярной биологии. Калинин Ф. Л.
Киев, издательское объединение «Вища школа», 1978. 488 с.

В пособии на основе молекулярного строения и электронно-микроскопического изображения рассмотрены структура и функция мембран, строение и функция белков, нуклеиновых кислот, нуклеопротеидов, синтез белка, химические основы наследственности, биологическое движение, самосборка биологических структур, механизмы биологической регуляции и другие проблемы. Сущность биологических явлений, связь между структурой и функцией, между отдельными звеньями метаболизма показаны на различных уровнях клеточной организации.

Пособие рассчитано на студентов биологических специальностей университетов.

Табл. 6. Ил. 112. Список лит.: 275 назв.

Редакция литературы по биологии и географии
Зав. редакцией Ю. Ф. Кирьяков

ПРЕДИСЛОВИЕ

Если первая половина XX в. была ознаменована важнейшими открытиями в области физики, то прошедшие десятилетия второй половины отличаются бурным развитием биологии, в частности молекулярной биологии.

Возникновение нового современного направления в биологической науке — молекулярной биологии на стыке молекулярной физики, органической химии, биологии — знаменует собой наступление революции в познании сущности живого. Молекулярная биология — это уровень изучения и познания явлений жизни на основе понимания роли атомов и молекул в образовании биологических структур и их функций.

Важнейшим условием, основой возникновения и развития молекулярной биологии явились успешные исследования по физике и химии белков и нуклеиновых кислот. В результате этого многие общепризнанные истины и представления о живом коренным образом изменились или совсем отвергнуты.

Сегодня мы являемся свидетелями быстрого развития представлений о сущности жизни на молекулярном уровне. Расшифрован целый ряд механизмов, лежащих в основе тех биологических явлений, которые раньше рассматривались в общем, описательном виде.

Таинственная субстанция наследственности приобрела реальные черты химической структуры. Расшифрован механизм кодирования процессов специфического биосинтеза белка. Подробно изучены многие пути химических превращений веществ в организме. Клетка как самостоятельная единица биологической активности постепенно приобретает черты динамического образования, в котором четко выявляется тесная взаимосвязь между структурой и функцией.

Молекулярная биология придает большое значение изучению химии, структуры макромолекул, роли надмолекулярных структур, так как они приобретают новые свойства, выполняют специфические биологические

функции по сравнению с исходными составляющими ее мономерами, компонентами. Объясняется это прежде всего тем, что макромолекулы, возникая на основе информации, заложенной в их исходных компонентах, приобретают трехмерную третичную и четвертичную структуры, содержащие принципиально новую функциональную информацию.

Современная биология все больше становится точной наукой, в задачу которой входит выяснение физико-химических принципов, лежащих в основе осуществления многочисленных процессов метаболизма, и изыскание путей управления ими.

Наши представления об ультраструктуре живой материи коренным образом изменились в связи с изобретением светового и электронного микроскопов. Если простым глазом можно рассмотреть предметы размером не менее 0,1 мм, то с помощью светового микроскопа стало возможным рассматривать структуры, размеры которых находятся в пределах 0,001—0,0005 мм. Этому способствовало также изобретение электронного микроскопа, позволившего углубить и расширить наши представления об ультраструктурах клетки. Произошел новый скачок разрешающей возможности при анализе биологических структур, так как электронный микроскоп позволяет рассматривать структуры, размеры которых находятся в пределах 0,000001—0,0000005 мм. Еще более мощной разрешающей способностью, до нескольких ангстрем, обладает рентгеноструктурный анализ.

Электронный микроскоп помог раскрыть элементарную биологическую ультраструктуру и ее детали, еще четче проследить неразрывную взаимосвязь между структурой и функцией. На основе этой взаимосвязи биофизика, биохимия, физиология, цитология, вирусология, генетика и другие науки сливаются в единое современное направление более высокого уровня познания и понимания явлений жизни, которое рассматривает различные формы биологических молекул, их эволюцию, изменения и превращения в связи с выполняемой функцией. С помощью электронного микроскопа удалось увидеть мир субклеточных структур, отдельные детали которых уже получают интерпретацию на уровне свойств и значения отдельных молекул, атомов.

Параллельно с развитием вооруженности биолога, от линзы до электронного микроскопа и рентгеноструктурного анализа, шло развитие химических и физических методов исследования. Достигли совершенного развития такие биохимические методы исследования, как хроматография, препаративное и аналитическое ультра-

центрифугирование, высокоразрешающий электрофорез и др. С помощью этих методов можно выделить, разделить, идентифицировать отдельные биомакромолекулы, изучить их физико-химические свойства, роль в построении биологических элементарных структур и выполняемую ими функцию.

Современные теоретические и технические возможности позволяют, с одной стороны, делать анализ биологических ультраструктур до определения положения в них отдельных молекул, активных групп, радикалов, атомов, а с другой — приближаться к биофизическому и биохимическому истолкованию этих структур в связи с пониманием их функции.

Одной из важнейших основ изучения явлений жизни на молекулярном уровне явилось развитие биоорганической химии, так как без ясного представления о многообразии атомов, молекул, их формах и превращениях невозможно было бы выяснение законов и механизмов, управляющих живыми организмами.

Молекулярная биология исключительно большое значение придает элементарному изучению биологической структуры. Но это не означает, что и здесь мы имеем дело с прежней морфологией, но только более мелких биологических структур. Изучение структур в молекулярной биологии поднимается на принципиально новый «трехмерный» уровень и является основой физико-химического рассмотрения и анализа сущности функций, выполняемых этими структурами. Например, структура рибосомы рассматривается в связи со спецификой синтеза белка; мембраны — в связи с активным транспортом метаболитов и другими специфическими процессами, протекающими в мембранах тех или иных органелл; отдельных мышечных волокон — в связи с характером их взаимодействия при мышечном сокращении и т. д.

Если в задачу описательной биологии входит изучение различных свойств, присущих различным организмам, то задача молекулярной биологии — отыскать в специфике различных организмов то типичное, что является общим для многих или свойственным для всех живых существ. Этот подход в изучении сущности живого явился одним из условий больших успехов в области молекулярной биологии, достигнутых за последние 25—30 лет. Основной их результат — принципиально важное обобщение: окружающее нас многообразие форм жизни является только внешним проявлением, так как для всех организмов единицей биологической активности является клетка, а для функционирования всех живых клеток необходимы важнейшие универсальные, общие

структурно-химические системы. Одна из них — система синтеза определенных веществ клетки, необходимых для ее самовоспроизведения. При этом процессы воспроизведения различных клеток или их частей являются в принципе одинаковыми. Вторая — система мембран, окружающих клетку и разделяющих ее на отдельные части, отсеки. Эти мембраны несут на себе наборы, комплексы ферментов, которые управляют процессами метаболизма. Выяснить сущность функционирования мембран пытались уже в конце прошлого века, но это не принесло успеха, так как молекулярная структура мембран оставалась неизвестной. И третья — система, которая обеспечивает клетки энергией. Эти три общие системы клетки лежат в основе ее структурной и функциональной организации. Итак, структурно-химическое единство и универсальность живых систем служат основой для различных общепроизводственных обобщений, в том числе и для доказательства общности происхождения и эволюции всех живых систем.

Хотя молекулярная биология позволяет интерпретировать совершенно по-новому многие биологические явления, однако на основе самых последних достижений пока невозможно ответить еще на многие вопросы. Например, что такое жизнь? Но заранее можно сказать, что задача состоит не в том, чтобы понятие «жизнь» свести только к физическим и химическим процессам, а в том, чтобы проследить, в какой степени жизнь основывается на физических и химических принципах и можно ли ее полностью объяснить исходя из этих принципов.

Молекулярная биология находится у истоков своего развития. Однако очевидно, что путь к решению проблем воспроизведения живых систем и управления ими, решения коренных теоретических и прикладных вопросов биологии, безусловно, лежит только через познание физико-химических основ структуры и функции живого. Если, например, мы научимся экспериментально изменять генетическую информацию, то на этой основе можно будет приблизиться к решению таких практических задач, как лечение наследственных болезней, создание новых организмов и т. д.

Молекулярная биология как новый, современный этап, уровень в познании явлений жизни с каждым годом начинает занимать все большее место в подготовке специалистов биологического профиля. Современный биолог не может быть полноценным специалистом без знания новейших данных о биологических ультраструктурах, биохимическом их истолковании в связи с функцией на различных уровнях клеточной организации.

В ряде вузов нашей страны в программу подготовки студентов-биологов введен курс «Основы молекулярной биологии». В связи с этим возникает острая необходимость в создании соответствующего пособия. Но создание учебного пособия по молекулярной биологии значительно осложняется тем, что в этой области имеет место исключительно быстрый приток информации. Происходит смена представлений, гипотез. Даже публикуемые сводки и обзорные работы часто оказываются уже устаревшими, по крайней мере для специалистов. Поэтому при написании настоящего пособия были использованы, по возможности, только наиболее установившиеся представления в области молекулярной биологии.

Необходимость создания соответствующего пособия по молекулярной биологии стала особенно ясной в свете постановления ЦК КПСС и Совета Министров СССР «О мерах по ускорению развития молекулярной биологии и молекулярной генетики и использованию их достижений в народном хозяйстве», принятого в 1974 г.

В настоящем пособии сделана попытка отразить основные проблемы молекулярной биологии. На основе молекулярного строения и электронно-микроскопического изображения рассмотрены структура и функция мембран, строение и функция белков, нуклеиновых кислот, нуклеопротеидов, синтез белка, химические основы наследственности, биологическое движение, самосборка биологических структур, механизмы биологической регуляции и другие важнейшие проблемы молекулярной биологии. Постоянно подчеркивается связь между структурой и функцией на разных уровнях клеточной организации. При этом обращается внимание на структурированность внутриклеточной организации, ее упорядоченность, химическую универсальность в связи со специфическими функциями, выполняемыми клеткой. Этот морфо-биохимический подход в изложении материала в предлагаемом пособии позволяет определить основу молекулярной биологии как синтез успехов целого ряда смежных наук — биохимии, биофизики, молекулярной генетики и т. д. Подход этот дал возможность показать целостность и единство клеточной организации в связи с целостностью и единством отдельных путей метаболизма. Показать, с одной стороны, очень сложную структурную организацию живой клетки в целом и отдельных ее компонентов, их динамичность и стабильность, а с другой — что клетка при всей сложной организации и кажущейся разобщенности ее

различных органелл и структур представляет собой единое целое, связанное сложно разветвленной системой метаболических процессов. При этом обращается внимание на то, что биологическая специфичность целого живого организма должна рассматриваться с точки зрения структуры и взаимодействия определенных макромолекул; например, явление наследственности может быть рассмотрено на основе молекулярной картины удвоения генетического материала и специфического синтеза белков.

В основу пособия положен курс «Молекулярная биология», читаемый автором для студентов-биологов широкого профиля Киевского госуниверситета им. Т. Г. Шевченко и других университетов УССР. Автор искренне признателен академику А. С. Спирину, члену-корреспонденту АН УССР Г. Х. Мацуке, члену-корреспонденту АН УССР Д. М. Гродзинскому, профессору кафедры биохимии МГУ И. П. Ашмарину, доктору биологических наук В. А. Жидкову за ценные замечания, учтенные при подготовке книги к печати.

Отзывы и критические замечания на пособие «Основы молекулярной биологии» просим направлять на имя автора по адресу: 252054, Киев-54, ул. Гоголевская, 7, Головное издательство издательского объединения «Вища школа».

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОНИМАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

В основе понимания биологических явлений на молекулярном уровне лежат физико-химические представления об атомах, молекулах, макромолекулах.

Роль в биологических системах атомов и молекул может быть понята только на основе представлений об их электронной структуре, о взаимодействии между атомами на основе смещения и перераспределения электронной плотности.

Исключительное значение имеет дисперсионная среда, в которой протекают метаболические процессы. Как известно, вода является универсальной дисперсионной средой в биологических системах. Поэтому пространственная организация биомacroмолекул, их функции должны рассматриваться только на основе их взаимодействия с водой, имеющей специфическую электронную структуру, аномальные, уникальные физико-химические свойства, растворяющую, диссоциирующую способности и выполняющей важную роль в переносе зарядов.

Например, нативная трехмерная конформация белка в значительной мере определяется не только его первичной структурой, но и особенностями водной среды клетки, т. е. образованием между молекулами воды водородных связей.

Устойчивость, стабилизация трехмерной структуры зависит от взаимодействия между полипептидной цепью и водой. Полипептидная цепь в развернутом состоянии не обладает биологической активностью и имеет достаточно большой энтропийный член. Но в окружении молекул воды, способных образовывать водородные связи между собой и многими боковыми радикалами полипептидной цепи, последняя принимает самопроизвольно упорядоченную, трехмерную биологически активную конформацию. При этом молекулы воды ориентируют определенным образом пространственное расположение гидрофильных и гидрофобных боковых радикалов полипептида. В результате снижается энтропия белковой молекулы, и она имеет минимум свободной энергии. Возрастает энтропия внешней среды водного окружения в результате образования максимального количества водородных связей между молекулами воды. Аналогичную роль, видимо, выполняет вода при образовании мембран. Гидрофобные группы липидов располагаются так, что оказываются малодоступными для молекул воды, которые при этом стремятся образовать максимум водородных связей между собой, и это

приводит к возрастанию энтропии внешней среды (водного окружения). От состояния воды, концентрации ионов водорода, гидроксильных групп зависит структура и активность других важнейших биомолекул.

В процессе длительной и сложной химической эволюции живые организмы приобрели черты значительного отличия от физической системы. В связи с этим возникает вопрос о применимости законов термодинамики к биологическим системам. Молекулярные основы жизни могут быть выяснены на основе принципов химической термодинамики.

Для понимания биологического значения азотистых оснований, тетрапиррольного ядра и других соединений с сопряженными связями необходимо знание распределения электронной плотности между атомами и молекулами, а также других их физико-химических свойств.

Выяснение роли водородной связи, вандерваальсовых сил взаимодействия, гидрофобных и других типов связей и стабилизации вторичной и третичной структур белковой молекулы, двучепочечных структур в макромолекулах нуклеиновых кислот, в поддержании определенного взаимоположения компонентов мембранных структур, в процессах различных типов взаимного белково-нуклеинового узнавания как одной из основ самосборки биологических структур возможно только на основе представлений об электронной структуре молекул и входящих в их состав атомов. Поддержание уровня структурной организации биомолекул определяется силой и прочностью связей и взаимоотношений между атомами. Как правило, более низкий первичный уровень структурной организации стабилизируется ковалентными и другими связями, для разрыва которых необходимо затратить значительные силы. Более высокий уровень пространственной организации стабилизируется более слабыми силами взаимодействия (вандерваальсовы силы и др.). Сущность этого явления также может быть объяснена только на основе электронной структуры атомов.

Интерпретация других биологических явлений на современном уровне невозможна и без знания других физико-химических параметров. Поэтому прежде чем приступать к важнейшим проблемам молекулярной биологии, необходимо коротко рассмотреть физико-химические основы понимания биологических процессов.

Глава I

ЭЛЕКТРОННАЯ СТРУКТУРА АТОМОВ И МОЛЕКУЛ В СВЯЗИ С ИХ РОЛЬЮ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

В 60-х годах XIX в. А. М. Бутлеров создал *структурную теорию* органических соединений, которая помогла понять строение сложных молекул, пути их синтеза, роль в биологических процессах. Из этой теории следует, что свойства каждого атома в сложной

молекуле определяются не только его природой и положением, но и влиянием соседних атомов и атомных групп. Структурная теория получила свое дальнейшее развитие в понимании сущности физических сил, создающих связь между атомами и определяющих свойства этой связи. В результате развития атомной физики, открытия электрона, явления радиоактивности стало понятным, что в основе валентности химической связи лежит электрон.

Дальнейшее изучение сущности химической связи позволило определить межатомные расстояния, углы между связями, основные параметры структуры молекулы, распределение электронных зарядов в ней и т. д. Химическая связь, с одной стороны, приобрела более конкретный физический смысл и получила количественную характеристику по длине, энергии, полярности, направлению в пространстве, а с другой — предстала в бесконечном разнообразии, которое в ряде случаев трудно объяснить. Например, долгое время оставалось невыясненным, как пара электронов может осуществлять прочную и определенным образом направленную в пространстве ковалентную связь. Но эти вопросы стали разрешимыми на основе представлений квантово-механической теории о химической связи. Эта теория в настоящее время стала приложимой не только к малым, простым, но и сложным молекулам и широко используется для анализа механизмов различных реакций. Исходя из современных представлений даже простая ковалентная связь, например между атомами углерода, имеет различную физическую природу и происхождение. Еще большее разнообразие наблюдается в кратных связях, особенно в сопряженных системах.

Химические связи между атомами могут иметь и промежуточные порядки. Молекулы с такими связями уже не представляется возможным изобразить одной классической структурной формулой. В этом случае применяется *квантово-механическая теория*, и молекула описывается на основе суперпозиции структур, делокализации электронов.

Электронная теория строения органических соединений отражает достаточно полно физический смысл взаимоотношений и связей между атомами различных элементов и лежит в основе современного изучения механизмов биохимических процессов. Поэтому роль атомов различных элементов и состоящих из них молекул в метаболизме живых организмов может быть наиболее полно объяснена только на основе представлений об их электронной структуре.

1. Электронная структура атомов. Электронная структура атомов определяет их физические и химические свойства и свойства молекул, в состав которых они входят. В основе понимания механизмов взаимодействий атомов различных элементов молекул лежит смещение электронной плотности, делокализация электронов. Поэтому только с помощью электронной теории строения органических веществ можно понять и объяснить механизмы реакций и процессов, имеющих место в живых организмах. В связи с этим необходимо рассмотреть основы электронной теории строения атома.

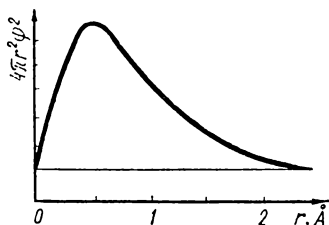


Рис. 1. Кривая распределения электронной плотности атома водорода. Максимум электронной плотности лежит на расстоянии 0,529 Å от ядра; быстро снижается по направлению к ядру и медленно — от ядра.

В 1913 г. Н. Бор предложил теорию строения атома: атом состоит из положительно заряженного ядра, вокруг которого по строго определенным круговым и эллиптическим орбитам вращаются электроны. В настоящее время достаточно полно раскрыта физическая природа электрона. Согласно *квантово-волновой теории*, электроны подобно квантам лучистой энергии — фотонам обладают двойственной природой. Они являются одновременно частицей с определенной массой и волной определенной длины. Электрон представляет собой стоячую волну в пространстве, типа волны,

образуемой колеблющейся струной. Стоячая волна состоит из пучностей и узлов. В колеблющейся струне образуются только те волны, длина которых (λ) связана с длиной струны (l) в соотношении $n\lambda_n = 2l$, где n — целое число, аналогичное главному квантовому числу электрона. Стоячие волны, соответствующие электронам в атомах, гораздо более сложны. Орбиты электронов — это пучности стоячих электронных волн. Их форма определяется квантовыми числами.

Распределение электронной плотности для атома водорода в зависимости от радиуса можно представить в виде кривой, показанной на рис. 1. Максимальная электронная плотность, как видно из этой кривой, приходится на 0,05 нм. Эта величина совпадает с радиусом орбиты 1s, по Бору. Электронная плотность быстро снижается по направлению к ядру и медленно по направлению от него.

Таким образом, будет более правильно представлять себе электронное облако расплывчатым в пространстве. Можно определить форму электронного облака на различных орбиталях. Для $n=1$ (орбиталь 1s) форма орбитали представляет собой сферу вокруг ядра. Для $n=2$ получаются четыре дискретные орбитали: орбиталь 2s — два сферических облака, разделенных сферической узловой поверхностью, и три орбитали 2p ($2p_x$, $2p_y$, $2p_z$) равной энергии и одинаковой формы в виде восьмерки или гантели, расположенные по взаимно перпендикулярным направлениям в пространстве.

Облако электронной плотности не имеет точных границ. Если мы говорим о той или иной геометрической форме электрона, то это означает, что в пределах названной формы сосредоточен основной заряд электрона (около 95%), который превращается в один квант лучистой энергии. Частота излучаемого света зависит от радиусов двух орбит, между которыми совершается переход электронов. Эта частота (λ) определяется разностью между запасом энергии атома

при его положении на более удаленной (I_2) и близкой орбиталах (I_1):

$$\lambda = \frac{I_2 - I_1}{h}.$$

Чем больше расстояние между орбиталями, тем больше частота излучения.

Квантовая механика показывает, что законы движения электронов имеют много общего с законами распространения волн. Основное уравнение в волновой механике связывает длину волны (λ) для потока электронов с ее скоростью (v) и массой (m). С помощью этого уравнения волновой механики можно объяснить устойчивость только определенных электронных орбиталей. Устойчивыми могут быть только те орбитали, на которых укладывается целое число волн. Если длина волны $\lambda = \frac{h}{m \cdot v}$, а длина круговой орбитали с радиусом r равна $2\pi r$, то устойчивость орбитали будет определяться уравнением: $2\pi r = n \frac{h}{m \cdot v}$, где h — постоянная Планка (при этом n должно быть целым числом). Множитель n в этом уравнении называется *главным квантовым числом* и показывает энергетический уровень, на котором находится электрон, и среднее расстояние от электрона до ядра. Главное квантовое число имеет значения 1, 2, 3, 4 и т. д., а энергетические уровни, которые соответствуют различным значениям n , принято обозначать буквами K , L , M , N . Значение $n = 1$ соответствует наиболее низкому энергетическому уровню, обозначаемому буквой K , $n = 2$ — энергетическому уровню L и т. д. Квантовая механика рассматривает орбиталь как облако, область или сферу вокруг ядра, в которой чаще всего находится быстро движущийся электрон. Главное квантовое число показывает среднее радиальное распределение электронной плотности вокруг ядра и является грубой мерой объема электронного облака. Кроме круговых орбит существуют эллиптические, которые отличаются друг от друга большими осями и своими эксцентриситетами. Чтобы охарактеризовать пути движения электронов по этим орбитам, вводится побочное квантовое число (l), магнитное (m) и спиновое (s). Состояния электрона, которые характеризуются различными значениями, принято называть энергетическими подуровнями и обозначать: s , p , d , f и т. д. Поэтому говорят о s , p , d , f и т. д. состояниях электронов или s , p , d , f и т. д. орбиталях.

Ориентация электронного облака в пространстве, или, согласно представлениям волновой механики, направление, в котором вытянуто электронное облако, характеризуется магнитным квантовым числом (m). Магнитное квантовое число для данного орбитального числа может иметь значения целых положительных и отрицательных чисел.

Электрон, кроме того, обладает спином, который характеризуется спиновым квантовым числом s . Оно может иметь положительное и отрицательное значения соответственно двум возможным вращениям электрона вокруг своей оси. Число спина выражается только

двумя значениями: $+1/2$ или $-1/2$. Электроны, имеющие одинаковые квантовые числа n , l и m , но отличающиеся спиновым числом, называются *спаренными электронами*, или *электронами с антипараллельными спинами*. На одной орбитали может находиться два таких электрона. Если атомы или молекулы не содержат неспаренных электронов, то они диамагнитны. Наличие неспаренных электронов проявляется в парамагнетизме соединений.

Состояние электронов того или иного атома должно отличаться по крайней мере одним квантовым числом (*принцип Паули*, или *принцип исключения*). В атоме нет двух электронов со всеми одинаковыми квантовыми числами. Например, в атоме гелия два электрона могут занимать наиболее устойчивую орбиту только в том случае, если спин одного электрона противоположен спину другого. Литий не может иметь трех электронов на орбите с $n = 1$, так как третий электрон должен был бы иметь спин, параллельный спину первого электрона или спину второго электрона. Поэтому атом лития имеет два электрона на более устойчивой орбите с $n = 1$ и один электрон на орбите с $n = 2$. Разнообразие химических свойств элементов обусловлено именно принципом исключения.

На основе спектров излучения элементов можно установить их электронные уровни и электронную конфигурацию. В связи с тем что вещества, из которых строится клетка, состоят более чем на 99% из элементов первых трех периодов периодической системы элементов Д. И. Менделеева, мы рассмотрим квантовые числа элементов только этих периодов. На электронной оболочке K могут быть только два электрона, так как она имеет одну орбиталь $1s^2$. На электронной оболочке L возможны восемь комбинаций квантовых чисел. Поэтому для этого электронного слоя характерны четыре орбитали с восемью электронами на них. Элементы второго периода имеют гелиевую оболочку K и оболочку L , на которой увеличивается число электронов от одного у лития до восьми у неона. Согласно принципу Паули, на следующей электронной оболочке M может быть 18 различных комбинаций квантовых чисел для 18 электронов, которые могут быть размещены на 9 орбиталях. Но, как известно, электронной оболочке M соответствует только восемь элементов: Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, Ar. Отсюда пять $3d$ -орбит остаются незаполненными и могут принять и обобщить еще пять неспаренных электронов. Это, как будет видно дальше, имеет решающее значение особенно для атома фосфора, его роли в переносе групп и изменении энергии. Вследствие этого у элементов следующего, четвертого периода электронная оболочка N начинает образовываться с недостроенной электронной оболочки M .

Если мы обратим внимание на число электронов во внешней электронной оболочке инертных газов, то окажется, что их или два (гелий), или восемь. Напрашивается мысль о том, что число внешних электронов показывает не только валентность атома, но и что восьмиэлектронная орбита является устойчивой, насыщенной конфигурацией. В. Коссель и Дж. Льюис обосновали, что восьмерка

(октет) электронов является действительно предельной устойчивой группировкой. Различные атомы, вступая во взаимодействия, химические реакции, стремятся к достижению восьми электронов на внешней электронной оболочке.

2. Взаимодействие между атомами. При сближении двух или нескольких атомов, стремящихся к присоединению или отдаче электронов, происходит перераспределение электронов во внешней оболочке. Эти представления являются теоретической основой понимания механизма образования ионных связей. Например, при взаимодействии натрия с хлором первый теряет единственный электрон с наружной оболочки M и становится натрий-катионом с наружной устойчивой оболочкой L из восьми электронов, как у неона. Наоборот, у хлора во внешней электронной оболочке M до восьмерки (октета), т. е. устойчивой группировки, не хватает одного электрона. Поэтому хлор приобретает один электрон и превращается в хлор-анион со стойкой M -оболочкой, как у аргона. В результате силы электростатического напряжения между разноименными рядами связывают образовавшиеся ионы друг с другом. Во всех подобных реакциях образующиеся ионы с устойчивой электронной группировкой удерживаются один около другого электростатическим притяжением. Образуется *электровалентная связь* между противоположно заряженными ионами.

Способность атомов превращаться в положительные или отрицательные ионы определяется их положением в периодической системе. У атомов элементов, занимающих место в начале периода, ядро имеет меньший заряд и электрон с меньшей силой притягивается и легче отдается тем атомам, которые стоят правее внутри периода, т. е. способность атомов становится положительным ионом уменьшается в периоде слева направо. При образовании электровалентной связи все ионы, кроме водорода, имеют ядро, окруженное электронной оболочкой. Поэтому при сильном сближении отрицательно и положительно заряженных ионов между ними начинается отталкивание. Ионы остаются на определенном расстоянии друг от друга в результате уравнивания сил притяжения и отталкивания.

Образование электровалентной связи на основе притяжения противоположно заряженных ионов едва ли применимо к молекулам, образованным близкими или идентичными атомами тех или иных элементов (H_2 , O_2 и т. д.). В этом случае нельзя допустить противоположно заряженных ионов, и поэтому говорят о *неионной, ковалентной* или *атомной связи*. При образовании такой связи два атома обобщают свои электроны. Например, при образовании молекулы водорода (H_2) два электрона, которые принадлежали каждому протону в отдельности, становятся обобщенными. При этом каждый атом получает устойчивую электронную группировку K из двух электронов, как у инертного газа гелия. В молекуле метана атом углерода достигает устойчивой октетной конфигурации за счет приобретения четырех электронов, которые отдают четыре

атома водорода. Если бы атомы водорода отдавали электроны полностью, то атом углерода приобрел бы устойчивую электронную структуру. Но тогда атомы водорода не приобретут устойчивой электронной конфигурации, свойственной ближайшему инертному газу гелию. Поэтому происходит следующее. Четыре электрона остаются в *K*-оболочке атомов водорода и одновременно занимают место в *L*-оболочке атома углерода. В то же самое время каждый из четырех электронов атома углерода вступает в *K*-оболочку одного из четырех атомов водорода, не покидая *L*-оболочки углерода. При этом атом углерода приобретает полный октет, а атомы водорода — устойчивую конфигурацию гелия. Этот процесс является примером *обобщения электронов*. В этом случае электроны не переносятся полностью. Каждый атом служит одновременно и донором и акцептором электронов. Возникает ковалентная, или гомеоплярная, связь.

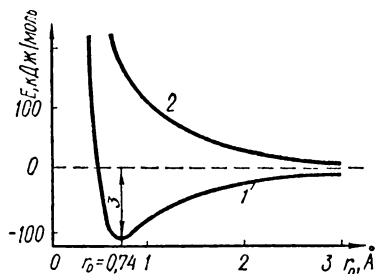
Если атомы идентичны, то каждый в равной степени и отдает и воспринимает электроны. При этом ни один из атомов не концентрирует вокруг себя избытка электрического заряда. Такая ковалентная связь является строго *неполярной*. Но если один из элементов будет более электроотрицателен (сильнее притягивать электроны), то он будет воспринимать большую, а отдавать меньшую долю заряда электронов. В результате вокруг него произойдет накопление отрицательного заряда, а вокруг второго атома — положительного заряда. Такая ковалентная связь будет *поляризованной*, образуется *электрический диполь*. Полярность такой связи будет являться функцией различия в электроотрицательности атомов, входящих в состав молекулы.

Таким образом, при образовании ковалентной связи устойчивость электронных оболочек достигается не за счет перехода электронов от одних атомов к другим, а в результате образования одной или нескольких пар электронов, которые становятся общими для соединившихся атомов, т. е. они входят одновременно в состав электронных оболочек двух атомов. Эти спаренные электроны вращаются по орбиталям, охватывающим ядра обоих атомов, и таким образом связывают их в молекулу.

С точки зрения теории квантовой механики становится понятным физический смысл ковалентной связи. Если при образовании молекулы с помощью ковалентной связи два положительно заряженных ядра можно рассматривать как одно ядро с большим зарядом, то электрон, вращающийся вокруг него, удерживается с большей силой вокруг комбинированного ядра. В этом и состоит энергетическая выгодность ковалентной связи. Движение электрона по молекулярным орбитам также подчиняется принципу Паули. На одной и той же молекулярной орбите может быть не больше двух электронов. При этом они должны иметь противоположные спины. Электроны с одинаковыми спинами не могут находиться на одной и той же орбите. Поэтому каждая ковалентная связь образована парой электронов.

Рис. 2. Кривые зависимости потенциальной энергии молекулы водорода от меж-атомного расстояния:

1 — взаимодействие между атомами, имеющими электроны с антипараллельными спинами. Сжатие ядер приводит к быстрому росту сил отталкивания; 2 — взаимодействие электронов с параллельными спинами (приводит к взаимному отталкиванию атомных ядер); 3 — потенциальная энергия невозбужденной молекулы водорода.



Молекулярная орбита, с точки зрения волновой механики, образуется в результате перекрывания атомных орбит. При этом наибольшая электронная плотность в молекулярной орбите оказывается между ядрами. Это означает, что при своем движении электроны попадают наиболее часто в область между ядрами, создавая как бы прослойку отрицательного электричества, которая еще больше сближает и удерживает ядра элементов в молекуле. Чем сильнее перекрываются атомные орбиты, тем прочнее связь.

Связь, возникающая на основе электростатического притяжения заряженных частиц, характерна для большинства неорганических соединений. В подавляющем большинстве органических веществ, составляющих живую клетку, встречается ковалентная связь. Поэтому для понимания механизмов химических реакций, протекающих в живой клетке, необходимо знать физическую сущность ковалентных связей. Она может быть понята только на основе квантово-волновой теории. В качестве примера простейшей молекулы с ковалентной связью может быть рассмотрена молекула водорода. Для этой молекулы можно рассчитать энергию связи, расстояние между атомами, спектральные частоты с помощью соответствующего волнового уравнения. Для более сложных молекул эти вычисления значительно более трудоемки, и они осуществляются с помощью приближенных методов: метода молекулярных орбиталей и метода валентных структур.

Исходя из метода молекулярных орбиталей, предложенного Р. Мулликеном и Е. Хюккелем, валентные электроны образуют вокруг ядер атомов общую для всей молекулы электронную систему. Заполнение молекулярных орбиталей осуществляется по таким же законам, как и атомных орбиталей, т. е. сохраняется принцип Паули. При этом происходит нейтрализация магнитных моментов электронов с антипараллельными спинами. Если в молекуле имеется неспаренный электрон, то его легко обнаружить по парамагнитным свойствам этого соединения. Если действуют электроны с параллельными спинами, то это приводит не к стабилизации ядер, а к их отталкиванию (рис. 2, кривая 2). На примере молекулы водорода показано, что потенциальная энергия молекулы зависит от межатомного расстояния. На рисунке 2 минимум кривой 1 показывает расстояние между атомами в невозбужденном состоянии

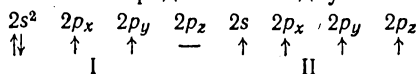
молекулы водорода. Если продолжать сжатие ядер, то это приводит к резкому возрастанию сил отталкивания.

С помощью метода валентных структур, разработанного В. Хейтлером и Ф. Лондоном, можно определить параметры молекулы. Л. Полинг развил и усовершенствовал этот метод и дал ему название *теории резонанса*. По этому методу простейшая молекула водорода образуется следующим образом. Когда ядра водорода H_A и H_B находятся на близком расстоянии, то возможен обмен электронами e_A и e_B . При этом могут образоваться структуры: $[H_{Ae_A} + H_{Be_B}]$ — I и $[H_{Ae_B} + H_{Be_A}]$ — II.

Реальным состоянием молекулы является нечто среднее между I и II структурами, которое должно быть выражено суммированием — резонансом этих двух структур.

Молекула водорода имеет одноэлектронную связь между двумя ядрами. Такие связи имеют место и в прочих молекулах. Но одноэлектронная связь слабее двухэлектронной. Прочность ковалентной связи зависит от степени взаимного перекрывания электронных облаков атомов, образующих молекулу. В процессе перекрывания орбиталей происходит выделение энергии. Поэтому чем степень перекрывания орбиталей больше, тем больше выделяется энергии при образовании связи, тем прочнее связь. Степень перекрывания электронных орбиталей, в свою очередь, зависит от их энергетического уровня. Энергетический уровень электрона тем выше, чем на большем расстоянии от ядра находится электронная орбиталь. Поэтому наименьшее перекрывание будет между орбиталями s с шаровой симметрией, которое имеет место при образовании молекулы водорода. В 1,7 раза больше перекрываются орбитали s водорода с орбиталью p фтора при образовании фтористого водорода и в три раза больше перекрываются две орбитали p при образовании молекулы фтора. Такого типа простые связи называются σ -связями. Радикалы, связанные в молекулу с помощью σ -связей, могут вокруг них свободно вращаться. σ -Связи, образованные одновалентными атомами, не имеют определенного направления в пространстве. Но такие связи у двух-, трех- и четырехвалентных атомов направлены по отношению друг к другу под определенным углом.

Например, в молекуле метана четыре связи углерода с атомами водорода образуют между собой углы в $109,5^\circ$. В связи с тем что углеродные соединения занимают господствующее место в живой клетке, следует рассмотреть связь между тетраэдрической направленностью четырех связей атома углерода с его электронным строением. Известно, что валентная оболочка углерода имеет четыре электрона и может быть представлена двумя конфигурациями:



В подавляющем большинстве соединений углерода, имеющих большое значение в биологических системах, связи образуются на основе электронной оболочки с четырьмя неспаренными электронами

(II). Очень мало углеродных соединений образуется с двухвалентным углеродом (I). Последние являются неустойчивыми и обладают высокой химической активностью.

Но, как видно, четыре валентности углерода неравноценны, так как представлены орбиталями s и p , электроны которых находятся на различных энергетических уровнях. Одна из электронных орбиталей имеет форму шара. Три других орбитали ($2p_x$, $2p_y$, $2p_z$) имеют форму гантелей или восьмерок и расположены под углом 90° друг к другу. Если у четырехвалентного углерода валентная оболочка образована энергетически различными электронами, то можно было бы ожидать, что в метане будут иметь место различные связи: одна связь $s-s$ и три связи $p-s$. Однако экспериментально установлено, что все четыре связи одинаковы. Это противоречие было объяснено тем, что в молекуле все связи не изолированы, а, наоборот, взаимозависимы друг от друга. В момент образования молекулы происходит суммирование энергии одной s - и трех p -орбиталей. В результате образуются четыре *гибридизированные орбитали*, которые обозначают символом sp^3 . Эти орбитали имеют вид вытянутой груши, т. е. имеют форму промежуточную между сферой и гантелей (восьмеркой). Гибридизация s -орбиталей и p -орбиталей практически отсутствует у элементов высших периодов. Это видно по углам между связями в их молекулах.

Такой тип sp^3 -гибридизации электронных орбиталей называют *тетраздральной гибридизацией связей*. Он широко распространен также в соединениях других элементов, например в соединениях азота с четырьмя ковалентными связями, имеющих биологическое значение. Грушевидная форма валентных орбиталей углерода способствует большему их перекрыванию с электронными орбиталями атомов, которые присоединяются к углероду. Простые связи углерода, образованные гибридизированными валентными орбиталями, относятся к σ -связям. Вокруг них также возможно вращение присоединенных к углероду атомов и радикалов.

Двойные связи нельзя рассматривать как удвоенные простые связи. Это следует из того, что расстояние между углеродными атомами, например, в молекуле этилена равно 13,3 нм. Но оно должно было бы равняться, по теоретическим расчетам, 9 нм, если исходить из длины простой связи между атомами углерода, равной 15,4 нм. Кроме этого, атомы углерода в молекуле этилена соединены неравноценными связями, так как в реакциях присоединения одна из двойных связей рвется, а другая сохраняется.

Исходя из квантово-механической точки зрения, кратные связи между атомами углерода представлены σ - и π -связями. Атомы углерода с атомами водорода связаны σ -связями, а между собой — тремя валентными электронами: $2s$, $2p_x$, $2p_y$. При этом происходит sp^2 -гибридизация трех электронных орбиталей. Такой тип гибридизации называют *тригональным*. Четвертый электрон $2p_z$ обоих атомов не гибридируется. Эти два электрона образуют π -связь. При сближении атомов их p -орбитали сливаются и образуют новую

электронную орбиталь иной формы. π -Связь отличается от σ -связей своей ориентацией в пространстве. Все σ -связи лежат в одной плоскости, а π -связь расположена перпендикулярно к этой плоскости. Гибридизация между σ - и π -связями не происходит из-за того, что в области расположения облака σ -электронов плотность π -электронов минимальная.

Эти связи различаются по энергии. Энергия первых составляет $259,5 \cdot 10^3$ Дж/моль, а вторых — $347,3 \cdot 10^3$ Дж/моль. Это объясняется тем, что орбитали p -электронов в π -связи перекрываются меньше, чем облака σ -электронов в σ -связи. Кроме этого, наибольшая электронная плотность в π -связи лежит не между атомными ядрами, а выше и ниже их.

Между атомами углерода может быть и тройная связь, как в молекуле ацетилена. В этом случае на образование двух σ -связей — C—H и C—C каждый атом углерода расходует по два электрона ($2s$ и $2p_x$). Эти электронные орбитали гибридизируются. Такой тип гибридизации называется *диагональным*, или *sp-гибридизацией*. Но у каждого атома углерода, как известно, имеется четыре валентных электрона. Поэтому за счет оставшихся двух валентных электронов ($2p_y$ и $2p_z$) между атомами углерода образуется еще две π -связи с орбиталями, перекрывающимися выше и ниже σ -связи. Таким образом, тройная связь между атомами углерода в молекуле ацетилена образуется за счет одной σ -связи и двух π -связей.

В тройной связи ацетилена ($C \equiv C$) три пары электронов между атомами углерода сосредоточены в малом пространстве и экранируют положительные заряды атомов углерода меньше, чем в молекуле этилена. Поэтому ацетилен более электроотрицателен, чем этилен.

Как видно, образование ковалентных связей осуществляется за счет гибридизации и обобщения различных электронных орбиталей. Это приводит к образованию различных типов связей и определяет физико-химические свойства соединений. Поэтому для понимания роли и функции различных биологически важных соединений необходимо знать их электронную структуру. Например, этан, этилен и ацетилен имеют различные физико-химические свойства. Это различие состоит в том, что атомы углерода связаны в этане одной σ -связью, в этилене — одной σ -связью и одной π -связью, в ацетилене — одной σ -связью и двумя π -связями. При этом гибридные орбитали образуются в этане sp^3 -гибридизацией, в этилене — sp^2 -гибридизацией и ацетилене — sp -гибридизацией. Это значит, что в этане все σ -связи содержат 25% орбитали s и 75% орбитали p . В этилене σ -связи содержат 33% орбитали s и 67% орбитали p , в ацетилене σ -связи на 50% содержат орбиталь s и на 50% — орбиталь p . Если исходить из теории молекулярных орбит, то σ -связь будет тем короче и прочнее, чем больше в ней содержится орбитали s . Например, длина связи C—H в молекуле этана — 1,094 Å, этилена — 1,079 Å, ацетилена — 1,057 Å и энергия этой связи соответственно: $431 \cdot 10^3$ Дж/моль, $443,5 \cdot 10^3$ Дж/моль и $506,3 \cdot 10^3$ Дж/моль. Это обуславливает раз-

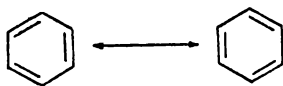
личную полярность молекулы C—H, которая возрастает от этана к ацетилену. Поэтому последний имеет свойства кислоты.

У атомов элементов периодической системы Д. И. Менделеева, имеющих большой радиус, обобщения и перекрывания *p*-орбиталей трудно осуществимы. Поэтому атомы таких элементов не способны к образованию двойных и тройных связей. Такие связи могут образовывать только элементы второго периода. Это является одной из причин того, что элементы второго периода периодической системы Д. И. Менделеева заняли ведущее место в биологических системах.

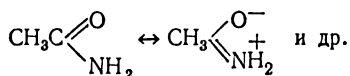
В особом состоянии находятся связи в *сопряженных органических соединениях*. К сопряженным соединениям относятся такие, у которых чередуются простые и кратные связи (π — π -сопряжение) или двойные и тройные связи находятся около атомов, имеющих неподеленные электронные пары (*p* — π -сопряжение). Соединения с сопряженными связями отличаются рядом особенностей. Они легко образуются, трудно разрушаются, отличаются повышенной прочностью. Простые, двойные и тройные их связи имеют иную длину по сравнению с теми же связями, но без сопряжения. При этом длина сопряженных связей может иметь самые различные промежуточные значения. Сопряжение изменяет свойства функциональных групп в молекуле. Например, в результате сопряжения у амидов полностью исчезают реакции, характерные для аминов и карбонильной группы альдегидов и кетонов. Наиболее важные группы веществ в клетке — белки, нуклеиновые кислоты, макроэргические соединения — отличаются эффектом сопряжения. Подавляющее большинство молекул, входящих в состав живого вещества, является соединениями с сопряженными связями. Выбор сопряженных соединений есть проявление квантового эффекта в биохимической эволюции. В процессе эволюции наиболее устойчивыми оказались соединения с сопряженными системами, характеризующимися делокализацией электронов. Эти соединения отличаются энергетической стабильностью, они устойчивы к действию различных факторов, в том числе ионизирующего и ультрафиолетового излучений, вследствие создания стабильных возбужденных состояний. Например, порфирины отличаются высокой степенью сопряжения, термодинамической стабильностью (энергия резонанса их достигает $836,8 \times 10^3$ Дж/моль). Поэтому они выполняют разнообразную биологическую роль в составе хлорофилла, гемоглобина, цитохромов и т. д. Важное биологическое значение имеет также аденин.

Строение сопряженных систем объясняется с помощью *теории мезомерии*, предложенной Ф. Арндтом и К. Инголдом. Мезомерию необходимо отличать от таутомерии, когда существует смесь двух реальных изомеров, которые отличаются по расположению определенных атомов в молекуле. При мезомерии существует только одно вещество со структурой промежуточной между граничными структурами, которые отличаются расположением не ядер, а только электронов. Согласно теории мезомерии, молекулы с сопряженными

связями должны изображаться по крайней мере двумя структурными формулами, например молекула бензола



Эти формулы отображают предельные граничные электронные состояния молекулы бензола, которые в действительности не существуют или могут существовать только тогда, когда молекула переходит в возбужденное состояние. В действительности же молекула бензола представляет собой промежуточное строение, мезомерное состояние. То же самое можно говорить о молекуле ацетамида:



С точки зрения теории молекулярных орбиталей, примененной Е. Хюккелем к рассмотрению сопряженных систем, каждый атом углерода в бензоле находится в состоянии sp^2 -гибридизации. Атомы углерода связаны между собой и атомами водорода σ -связями. Атомы углерода имеют по одной свободной p -орбитали, которые перекрываются выше и ниже плоскости бензольного кольца, в результате чего возникают π -связи. Образуется общая для всего кольца молекулярная орбиталь. Максимальная электронная плотность электронов в орбитали лежит выше и ниже плоскости кольца. Электроны π -связей в кольце делокализованы, т. е. не фиксированы около определенного атома углерода. Делокализация электронов является характерной особенностью сопряженных систем, так как при этом больше перекрываются орбитали, что ведет к большей стабилизации структуры молекулы.

Сопряжение системы можно также рассмотреть и объяснить иначе, с помощью *метода валентных структур*, или теории резонанса, разработанной Л. Полингом. Название теория получила по аналогии с резонансом двух физических колебательных систем. Молекула бензола может быть приближенно изображена двумя или тремя граничными структурами:



Но реально существующая молекула бензола не соответствует ни одной из граничных структур и представляет собой среднее между ними, являясь результатом их суперпозиции, т. е. наложения одной структуры на другую. Принято говорить, что двойная связь резонирует между двумя положениями. Часто оказывается трудным приписать молекуле единственную структуру типа валентной,

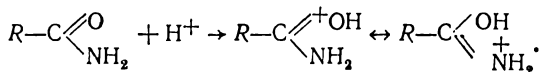
которая удовлетворительно выражала бы свойства молекулы. В этих условиях говорят, что действительная молекула резонирует между определенными структурами. Эти различные структуры не соответствуют разным видам молекул. Имеется лишь один вид молекул с электронной структурой, представляющей собой гибридную из двух или более структур валентной связи.

Рассмотрим свойства некоторых молекул с сопряженными связями на основе теории резонанса. Амид кислоты может рассматриваться как суперпозиция двух крайних граничных структур: не-

полярной $R - \text{C} \begin{smallmatrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{NH}_2 \end{smallmatrix}$ и биполярной $R - \text{C} \begin{smallmatrix} \text{O}^- \\ \parallel \\ \text{NH}_2^+ \end{smallmatrix}$. Амиды

кислот не проявляют кетонных свойств, т. к. кетоны и альдегиды присоединяют нуклеофильные реагенты к позитивированному атому углерода карбонильной группы. Это объясняется тем, что у амида кислоты частичный катионный заряд находится не на углероде карбонильной группы, а на атоме азота аминогруппы. И аминная группа амида кислоты не присоединяет протона при действии слабой кислоты, так как она уже частично находится в солеобразном состоянии.

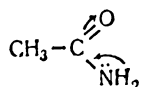
Если подействовать на амид кислоты сильной кислотой, то протон присоединяется не к атому азота, а к кислороду, который несет отрицательный заряд. При этом образуется катион, который стабилизируется резонансными структурами:



Если бы протон присоединился к азоту, то тогда образовался бы

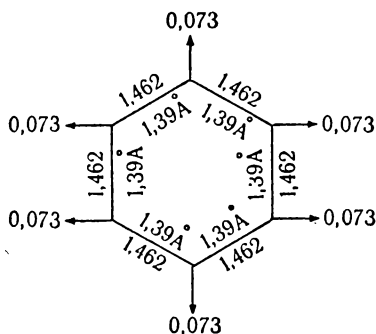
катион $R - \text{C} \begin{smallmatrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{NH}_3^+ \end{smallmatrix}$, который не способен к резонансу структур.

С целью экономии места пишут одну наиболее вероятную граничную структуру, а другие граничные структуры изображают направлением передвижения электронных пар с помощью кривых стрелок. Например, граничные структуры ацетамида будут изображены таким образом:



Изображение резонанса граничных структур различными способами также не показывает индивидуальных особенностей деталей молекулы. Поэтому электронное строение молекул в их основном состоянии все чаще изображается *молекулярными диаграммами*, которые получают расчетами с помощью методов молекулярных орбит или

валентной структуры. Примером может служить молекулярная диаграмма бензола:



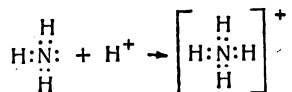
В молекулярных диаграммах представлен скелет молекулы (только σ -связи); кроме этого, на каждом атоме обозначаются цифрами длина связей, их порядок, электронная плотность, свободная валентность.

Структура молекулы органических соединений может быть представлена пространственной или кристаллографической моделью. Последняя показывает остов ковалентных связей, их длину, направление и углы. Пространственная модель изображает общую форму молекулы и ее отдельных групп. Наиболее близкое к реальному виду изображение даже таких сложных структур, как белковые молекулы, получается с помощью рентгеноструктурного анализа.

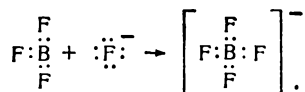
Рассмотрим случай, когда ковалентная связь имеет иное происхождение. Как было сказано выше, ковалентная связь образуется за счет обобщения электронов, принадлежащих двум различным атомам. Однако она может образовываться за счет электронной пары только одного из участвующих в реакции компонентов. Например, у аммиака имеется необобщенная электронная пара около атома азота:



Если в среде имеется протон водорода, то он может присоединиться к аммиаку с помощью этой необобщенной пары электронов, в результате чего образуется ион аммония

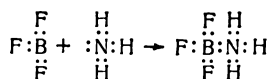


Такая же связь образуется при взаимодействии трехфтористого бора с фтором

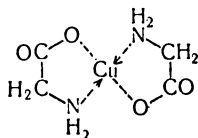


Химическая связь, которая образуется за счет необобщенной пары электронов, принадлежащей только одному из компонентов, участвующих в реакции, называется *координационной*. При этом заряд приносится одновалентным ионом и разделяется между атомами. Поэтому здесь мы имеем дело с разновидностью ковалентной связи. Образовавшиеся ионы $[\text{NH}_4]^+$ или $[\text{BF}_4]^-$ имеют симметрию правильного тетраэдра.

Но если в реакции участвуют не ионы, а атомы или молекулы, то при этом образуется *поляризованная координационная связь*. Примером этого может служить реакция взаимодействия фтористого бора с аммиаком:



В этом случае координационная связь образовалась за счет неспаренной пары электронов, принадлежащей азоту. Произошло смещение электронной плотности в сторону бора. Поэтому на азоте возникает положительный, а на боре отрицательный заряд, и молекула, таким образом, становится поляризованной с большим дипольным моментом, достигающим 2,4—3,5 *D*, тогда как дипольный момент ковалентной связи находится в пределах 0—1,5 *D*. Чтобы показать направление смещения электрона при образовании координационной связи, ставят знаки ионных зарядов над соответствующими атомами: F_3B^- , NH_3^+ . В биологических условиях большое значение имеют координационные связи атомов металлов в комплексных клещеобразных (хелатных) соединениях типа комплексной соли меди с аминоксусной кислотой:



В этом случае медь охватывается как бы двойными клещами. Когда металл приобретает полный октет электронов (за счет ковалентных и координационных связей), он теряет свойства иона. Такие пигменты, как хлорофилл, гемин, представляют собой клещеобразные комплексы аналогичного строения.

Исключительно большое значение в построении структуры и стабилизации биологически важных макромолекул имеет *водородная связь* (Н-связь, водородный мостик, гидроксильная связь, протонная связь и т. п.). Термин «водородная связь» возник на основе следующих данных. При изучении расстояний между атомом водорода и электроотрицательным атомом оказалось, что это расстояние меньше вандерваальсова радиуса электроотрицательного атома. Например, у кислорода вандерваальсов радиус равен 28 нм, а длина ковалентной связи равна 14 нм. В некоторых соединениях длина связи между атомами кислорода составляет 24,5—27,5 нм.

Это можно объяснить тем, что в данном случае между атомами кислорода внедряется протон водорода, т. е. возникает водородная связь. Таким образом, водородная связь — это связь, которая возникает между двумя электроотрицательными атомами при помощи атома водорода. Малая прочность водородной связи обуславливает некоторые ее характерные свойства. Молекулярные агрегаты, возникающие с помощью водородной связи, легко обратимы при обычных условиях. Водородная связь обладает энергией в несколько тысяч джоулей, что обуславливает ее сравнительно легкий разрыв, определенную ориентацию, количество молекул в агрегате. Равновесие между агрегатами и образующими их молекулами обратимо и быстро восстанавливается. Это имеет большое биологическое значение, так как водородная связь выступает как важное условие, определяющее и стабилизирующее вторичную структуру белка, нуклеиновых кислот, других биомакромолекул и их агрегатов. Это объясняется следующим образом. Единичные водородные связи, образованные в водном растворе между молекулами растворенного вещества, очень слабы. Это зависит от конкуренции молекул воды за образование водородной связи с молекулами растворенного вещества. Но если между макромолекулами имеется большое число водородных связей, то для их разрыва надо затратить энергии больше, чем сумма энергий всех этих связей. Это явление называется *кооперативностью водородных связей* и является характерным для белков и некоторых нуклеиновых кислот. У них имеется большое число связей, объединенных в кооперативную систему. Структуры с такими связями являются стабильными в воде.

Водородная связь возникает только между двумя электроотрицательными атомами O, N, F, реже Cl и S с помощью атома водорода. При этом хотя бы один электроотрицательный атом должен иметь необобщенную пару электронов. Эта связь отличается низкой энергией (около $21 \cdot 10^3$ Дж/моль) по сравнению с ковалентной и ионной связями (около $210 \cdot 10^3$ Дж/моль). Поэтому соединения с водородной связью непрочны и начинают диссоциировать при обычной температуре. Энергия водородной связи зависит от степени электроотрицательности атома. Наиболее электроотрицательным является атом фтора, затем идут кислород, азот и т. д. Соответственно этому изменяется энергия связи, которая у фтора (F—H...F) равняется $41,8 \cdot 10^3$ Дж, кислорода (O—H...O) — $29,9 \cdot 10^3$ Дж, азота (N—H...N) — $8,36 \cdot 10^3$ Дж. Но электроотрицательность одного атома может меняться под влиянием других атомов. Увеличение электроотрицательности атома делает его способным образовывать водородную связь. Поэтому иногда водородную связь образует хлор и даже углерод.

Соединения с водородной связью легко изменяют свои физические и химические свойства. При этом изменяется масса, размер, форма частицы, расположение электронов, электронная структура, температуры плавления, кипения, растворимость, диэлектрические свойства, электропроводность, сигналы протонного магнитного

резонанса и т. д. Наши представления о сущности водородной связи не являются полными. Тем не менее с помощью водородной связи объясним целый ряд явлений: адсорбция, катализ, кинетика биохимических процессов, активность ферментов.

Водородная связь носит всеобъемлющий характер химического взаимодействия, что, видимо, объясняется тем, что вода как дисперсионная среда в биологических системах способна к образованию водородных связей как с другими молекулами воды, так и с иными соединениями. Поэтому значительное количество биохимических реакций и процессов в живых системах обусловлено водородными связями. Можно утверждать, что водородная связь выполняет роль в функционировании живых систем, так как для последних характерно сложное сочетание слабых и сильных по энергии взаимодействий. Водородной связи принадлежит важная роль во многих реакциях, процессах в живой клетке, в том числе в миграции энергии в биологических системах, что является одной из интереснейших проблем молекулярной биологии. Так, миграция энергии в белково-липидных комплексах, индивидуальных макромолекулах, вероятно, осуществляется по системе пептидно-водородных связей белков, так как наличие регулярной сетки водородных связей, по-видимому, является одним из необходимых условий миграции заряда. Миграция заряда происходит под влиянием локальных молекулярных полей и осуществляется в виде перемещения электрона или дырки, или протона. Водородная связь обеспечивает при этом сопряжение между соседними пептидными группами и вследствие этого возникает единая молекулярная орбита. При этом одним из обязательных условий миграции энергии по системе пептидно-водородных связей является гидратация белковой молекулы. Это состояние в нативных условиях, как известно, всегда сохраняется, так как принято считать, что на каждый аминокислотный остаток приходится по три-четыре молекулы гидратационной воды. С увеличением степени влажности белка существенно возрастает его проводимость. Например, изменение влажности гемоглобина от 0 до 8% сопровождается увеличением его проводимости на десять порядков. При этом носителями тока в белках не являются ионы, а проводимость носит электронный характер, что подтверждается типом кривой падения тока в зависимости от времени.

Физический смысл водородной связи состоит в электростатическом взаимодействии положительного протона с необобщенными парами электронов электроотрицательных атомов. Водород при этом представлен в виде ядра (протона), поэтому он легко сближается с двумя электроотрицательными атомами и является связующим звеном между ними. Водородная связь является теоретической основой объяснения ассоциации молекул и изменения в связи с этим физических свойств вещества. Целый ряд жидкостей, которые имеют большое биологическое значение, являются ассоциированными: вода, органические кислоты, аммиак, спирты и др. При

этом роль ассоциативных сил выполняют водородные связи. Например, молекулы жидкой воды связаны водородными связями при комнатной температуре со степенью ассоциации около трех, тогда как в решетке льда каждая молекула воды образует водородные связи с четырьмя другими молекулами воды. При этом каждый атом кислорода находится в центре тетраэдра. Вода в неассоциированном состоянии имела бы более низкую точку плавления и температуру кипения. Из этого видно, что образование водородных связей является условием ассоциации молекул, что ведет к значительным изменениям физических свойств вещества. В частности, ассоциация молекул воды, возможно, обусловила роль, которую заняла эта жидкость в биологических процессах.

Водородные связи могут быть обнаружены при температуре кипения, которая повышается в присутствии водородных связей. Ассоциация гидроксильных производных определяет их растворимость в воде и обусловлена образованием водородных связей. Вещество растворяется в воде потому, что образуются водородные связи между молекулами вещества и воды. Поэтому, несмотря на то что молекулы крахмала, белков имеют высокую молекулярную массу, они растворяются в воде с образованием коллоидных растворов. Водородные связи с водой эти вещества образуют с помощью гидроксильных и амидных групп. Способность к образованию водородных связей у карбоксиллов, аминокрупп, гидроксиллов и других активных групп изменяется в зависимости от радикала, к которому они присоединены. Так увеличение углеводородного радикала приводит к уменьшению растворимости вещества в воде. Поэтому высшие спирты, органические кислоты с длинным углеводородным радикалом становятся по существу нерастворимыми в воде и располагаются на ее поверхности в виде ориентированного мономолекулярного слоя. Это явление имеет большое биологическое значение, так как лежит в основе образования различных фаз, клеточных структур, в частности, с участием липидов.

Водородная связь имеет большое значение в образовании и стабилизации структуры многих биомакромолекул (стабилизация вторичной структуры белковой молекулы, двойной спирали структуры дезоксирибонуклеиновой кислоты, ориентировка между фосфолипидами и белками в мембранах и т. д.). Роль водородной связи в биохимических реакциях и процессах пока остается не полностью понятой.

Таким образом, нами рассмотрены различные виды химических связей между атомами и молекулами, которые возникают на основе взаимодействия электронов. Из них наиболее слабой и бедной энергией является водородная связь. Но существуют еще более слабые связи между молекулами, обусловленные *силами Ван-дер-Ваальса*. Эти связи возникают только на очень малом расстоянии между молекулами и обусловлены кулоновскими силами электростатического притяжения, т. е. смещением зарядов в молекулах под влиянием электрических полей соседних молекул и атомов. Ядра

в пространстве по отношению друг к другу и может играть существенную роль в процессах самосборки биологических макромолекул и структур, а также при взаимодействии между молекулами белка и других биологически важных полимеров.

Но диполь, как и ион, может индуцировать возникновение диполя из неполярной молекулы. В результате возникают наиболее слабые силы вандерваальсовых взаимодействий. Силы вандерваальсовых взаимодействий очень быстро ослабевают с увеличением расстояния между молекулами. Принято определять наименьшее расстояние между нековалентно связанными атомами, на котором вандерваальсовы силы притяжения являются максимальными. Это расстояние называется *вандерваальсовым радиусом*. Эти радиусы определены для различных элементов.

Атом	Радиус, нм	Атом	Радиус, нм
H	12	P	19
N	15	S	18
O	14	—CH ₃	21,5
F	13,5		

Большая часть энергии, стабилизирующей конформацию биомacroмолекул, обеспечивается еще одним типом взаимодействия — *гидрофобными связями*. Эти связи встречаются в основном в биологических макромолекулах и будут подробно рассмотрены далее в соответствующих главах.

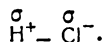
Связи и взаимодействия между молекулами могут носить чисто механический характер. Например, мочеви́на может образовывать кристаллические комплексы с рядом соединений. Это обусловлено включением в каналы гексагональной решетки мочевины тех молекул, которые подходят по своим размерам к этим каналам. Таким свойством, как мочеви́на, обладают и другие соединения, они используются для разделения различных веществ.

Можно говорить о зависимости между уровнем структурной организации молекулы и энергией связи, с помощью которой эта структура стабилизируется. Более высокий уровень организации молекулы стабилизируется связями с меньшим количеством энергии. Например, в молекуле белка первичная структура стабилизируется ковалентными связями (около $418 \cdot 10^3$ Дж/моль), вторичная — водородными связями (около $42 \cdot 10^3$ Дж/моль). А в стабилизации третичной и четвертичной структур большую роль играют силы вандерваальсовых взаимодействий ($0,4 \cdot 10^3$ Дж/моль).

Различные типы связей, электронная структура определяют многие физико-химические свойства различных соединений и их роль, выполняемую в биохимических реакциях и процессах в живой клетке.

Нельзя провести резкой границы между ковалентной и ионной связями, так как в одной и той же молекуле существуют одновременно ковалентные и ионные связи. Например, в молекуле соляной кислоты водород и хлор соединены ковалентной связью Cl : H. Но в силу того, что хлор является более электроотрицательным, обобщение электронной орбитали водорода происходит со смещением

электронной плотности в сторону хлора:



Это сообщает молекуле соляной кислоты частично и ионные, полярные свойства. Таким образом, электровалентная связь с различным вкладом может стабилизировать молекулу с характерной ковалентной связью. Так, электровалентная связь составляет: в HI — 5, HBr — 12, HCl — 17 и HF — 45%. Как видно, доля вклада электровалентной связи определяется степенью электроотрицательности атома галогена.

Но, как правило, в молекулах представлены не промежуточные связи, а, с явным преобладанием, типично ковалентные или ионные связи. Наиболее характерным свойством ковалентной связи является ее направленность в пространстве. У углерода, например, в случае обобщения всех четырех валентных электронов идентичными группами или атомами направление ковалентных связей таково, что между ними образуются равные углы в $109,5^\circ$. Если с атомом углерода соединены неодинаковые атомы или радикалы, то происходит изменение угла между ковалентными связями. Углы ковалентных связей у атомов серы ($\text{H}-\text{S}-\text{H}$), фосфора ($\text{H}-\text{P}-\text{H}$) и других определены взаимно перпендикулярным расположением p -орбиталей, у атомов кислорода и азота определяются частичной гибридизацией s - и p -связей.

Более характерным свойством ковалентных связей является не угол между ними, а расстояние между атомами, так как силы, фиксирующие величину угла, меньше сил, определяющих межатомное расстояние в молекуле. Длина ковалентных связей более постоянна, чем длина ионных. Это объясняется тем, что ионы, если они не фиксированы в кристаллической решетке, могут изменять свое положение, входить в связь с другими ионами.

Различные типы связей характеризуются различной длиной. Самыми длинными являются связи Ван-дер-Ваальса (33—44 нм), затем идут ионные связи (20 — 33 нм), а потом и самые короткие — ковалентные связи (12—18 нм). Длина ковалентной связи является аддитивной. Например, длина связи $\text{C}-\text{Si}$ обязательно составляет сумму среднеарифметических длин связи между атомами $\text{C}-\text{C}$ и $\text{Si}-\text{Si}$. Из этого следует, что каждый атом имеет свой ковалентный радиус, т. е. половину длины ковалентной связи между двумя одноименными атомами. Следовательно, длина ковалентной связи, образованной двумя разными атомами, будет равна сумме ковалентных радиусов этих элементов. Но это правило не распространяется на случаи, когда связи мало поляризованы. Если же атомы, участвующие в образовании ковалентной связи, резко различаются по своей электроотрицательности, то происходит поляризация молекулы и сокращение длины связи. Например, сумма ковалентных радиусов кислорода и углерода равна 15,1 нм, а длина ковалентной связи между ними равна 14,2 нм. Ковалентные связи

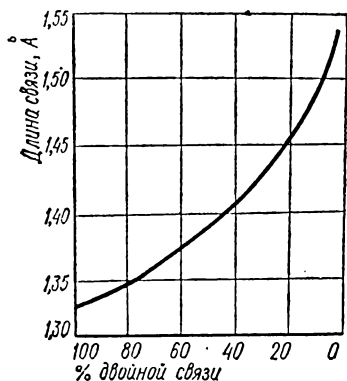


Рис. 3. Интерполяционная кривая Полинга, показывающая зависимость процента двойных связей в соединении от длины межуглеродных связей.

подвергаются еще большим колебаниям, если они находятся в сопряженных системах. Например, в бензоле расстояние между атомами углерода равно 13,9 нм, а среднее арифметическое из суммы длин двойной и простой связей между этими атомами равно 14,3 нм. В этом случае причиной сокращения длины связи является стабилизирующее действие резонанса.

Процент двойных связей сопряженных систем определяется графическим расчетом, предложенным Л. Полингом. Для этого соответствующим образом строится интерполяционная кривая для углеродных атомов, по которой можно определить процент двойной связи в конкретной сопряженной системе исходя из известной величины

— длины связи, установленной по углеродным атомам с помощью рентгеноструктурного или электронографического анализа (рис. 3).

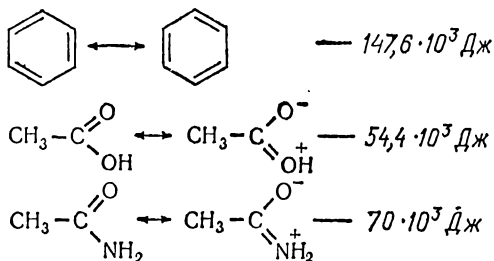
При определении процента двойных связей в сопряженных системах не учитывается характер гибридизации ковалентных связей соответствующих атомов, тогда как, например, связи, образованные между атомами углерода при гибридизации sp^2 , короче, чем при гибридизации sp^3 . Интерполяционная кривая может быть установлена и для связей между другими атомами.

Сопряженные системы отличаются большей стабильностью и устойчивостью, так как изменяется энергия связей. Под *энергией связи* понимается та энергия, которая необходима для образования или разрыва этой связи. Эта энергия может быть вычислена из теплот сгорания или у простых веществ — с помощью спектральных наблюдений. Как правило, кратные связи между атомами углерода не кратны по энергии.

Если в молекуле нет сопряженных связей, то энергия образования этой молекулы может быть определена суммированием энергий всех связей. Но энергия сопряженных систем всегда ниже суммы энергий всех связей в молекуле. Разницу в энергии, которая наблюдается между значением вычисленной энергии и определенной на опыте, относят за счет стабилизирующего действия сопряжения. Она называется *резонансной энергией молекулы*, или *энергией сопряжения*, или *энергией делокализации π -электронов*. Эту энергию можно определить по теплоте гидрирования. Теплота гидрирования, например, двойной связи в циклогексане составляет 120×10^3 Дж/моль. В молекуле бензола три тройных связи. Следовательно, теплота гидрирования их должна составить $360 \cdot 10^3$ Дж/моль. Но оказывается, что теплота гидрирования при превращении

бензола в циклогексан составляет $208 \cdot 10^3$ Дж/моль. Разница в $152 \cdot 10^3$ Дж/моль является резонансной энергией, которая стабилизирует молекулу бензола.

Расчет резонансной энергии может быть произведен методом валентных структур и молекулярных орбит. В первом случае энергия получается равной $138 \cdot 10^3$ Дж/моль, во втором — $146 \cdot 10^3$ Дж/моль. В настоящее время определена энергия резонанса многих сопряженных систем.



Таким образом, от характера связи зависят физико-химические свойства молекул, которые определяются состоянием, т. е. смещением электронной плотности атомов, входящих в состав этих молекул.

3. Смещение электронов. Смещение электронной плотности можно вызвать изменением структуры молекулы, состава ее атомов. В результате этого изменяются реакционная способность и другие химические свойства веществ. Электронная плотность молекулы с простой ковалентной связью может равномерно распределяться только в том случае, если оба атома одинаковы или связаны с одинаковыми группами или радикалами. Если это условие не соблюдается, т. е. ковалентная связь образована двумя различными атомами или группами атомов, то пара электронов смещается, оттягивается сильнее к электроотрицательному атому. Поэтому ковалентная связь принимает частично ионный характер. Причем смещение пары электронов оказывает влияние на свойства не только соединенных, но и близлежащих атомов. Например, в хлоруксусной кислоте наиболее электроотрицательным атомом является хлор. Поэтому смещение электронов происходит в такой последовательности: к хлору от соседнего углерода, затем к этому углероду от углерода карбоксильной группы, к углероду карбоксильной группы от кислорода и наконец

$$\text{O} \\ \parallel \\ \text{Cl} \leftarrow \text{CH}_2 \leftarrow \text{C} \leftarrow \text{O} \leftarrow \text{H}$$

к последнему от атома водорода. В смещении электронов принимают участие σ -электроны, и этот процесс называется *индукционным эффектом*, который может быть *положительным* ($+I$) и *отрицательным* ($-I$). Отрицательным индукционным эффектом называется состояние, когда атом или радикал притягивает к себе электрон. Под положительным индукционным эффектом, наоборот, понимается отталкивание электронов. В каждом конкретном

случае говорят об индукционном эффекте атома или группы атомов. В случае с хлоруксусной кислотой имеется отрицательный индукционный эффект атома хлора. Отрицательный индукционный эффект чаще наблюдается для следующих атомов и радикалов:

$-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$, $-\overset{+}{\text{N}}\text{R}_3$, $-\text{NO}_2$, $-\text{C}\equiv\text{N}$, $-\text{COOH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{COR}$, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CR}_2$, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{OH}$, OR , $-\text{NH}_2$, $-\text{NR}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{SR}$, $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_5$ и др., а положительный для $-\text{O}^-$, $-\text{COO}^-$, $-\text{CH}_3$, $-\text{CHR}_2$, $-\text{CR}_3$, $-\text{NR}^-$ и для атомов металлов в металлоорганических соединениях.

Смещение электронов изменяет ряд физических и химических свойств веществ, особенно силу кислот и оснований. Как было показано выше, в хлоруксусной кислоте в результате индукционного эффекта хлор оттягивает в конце концов электрон от водорода к кислороду, облегчает отрыв протона и в результате повышается степень диссоциации кислоты на ионы. Поэтому константа диссоциации (K) уксусной кислоты в 85 раз меньше константы диссоциации хлоруксусной кислоты.

Индукционный эффект постепенно затухает, по мере удаления атома, вызвавшего этот эффект. Например, K для $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHClCOOH} = 139 \cdot 10^{-5}$, а для $\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{COOH} = 3 \times 10^{-5}$.

Карбоксильная группа как электроотрицательная смещает электроны. Поэтому у двуосновных органических кислот K выше, чем у одноосновных. Но она уменьшается тем сильнее, чем больше удаляются карбоксильные группы друг от друга. Например, K для $\text{COOHCOOH} = 6000 \cdot 10^{-5}$, а $\text{COOH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH} = 3,7 \cdot 10^{-5}$. Но если в кислоте возрастает число электроотрицательных атомов, то это ведет к росту кислотных свойств и константы диссоциации. Например, K для $\text{CH}_3\text{COOH} = 1,82 \cdot 10^{-5}$, а $\text{CCl}_3\text{COOH} = 30000 \times 10^{-5}$.

Если в молекулу уксусной кислоты вводится метильный радикал ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$), то наблюдается отрицательный индукционный эффект, так как CH_3 является электроположительным радикалом по сравнению с водородом, который принимают за стандарт.

Смещение электронов с помощью электроотрицательных и электроположительных атомов и групп передается не только через цепь атомов, но и через пространство (*эффект поля*).

Например, фумаровая кислота	$\begin{array}{c} \text{CH}-\text{COOH} \\ \parallel \\ \text{HOOC}-\text{CH} \end{array}$	$K_1 = 98 \cdot 10^{-5};$ $K_2 = 2,7 \cdot 10^{-5};$
малеиновая кислота	$\begin{array}{c} \text{CH}-\text{COOH} \\ \parallel \\ \text{CH}-\text{COOH} \end{array}$	$K_1 = 1300 \cdot 10^{-5};$ $K_2 = 0,026 \cdot 10^{-5}.$

Как видно, у малеиновой кислоты K_1 намного выше, чем K_1 фумаровой кислоты, из-за того, что у первой карбоксильные группы

находятся на более близком расстоянии в пространстве. Наоборот, K_2 у малеиновой кислоты меньше, т. к. ион COO^- отталкивает, а не притягивает электроны. Свойства веществ в значительной степени зависят не только от индукционных смещений электронов, но и от полярных связей. И то, и другое проявляется в величине дипольного момента.

Смещение электронов более определенно проявляется в насыщенных соединениях. Но когда в молекуле имеются ненасыщенные связи, особенно в сопряженных системах, то те же атомы и радикалы могут вызвать совсем иное смещение электронов.

Смещение электронов лежит в основе современных представлений о механизмах биохимических реакций. При определении направления смещения электронов необходимо руководствоваться следующими правилами. В пределах периода электроны смещаются от левее стоящего к правее стоящему элементу (т. к. положительный заряд ядра атомов растет внутри периода слева направо). В пределах подгруппы электроны смещаются от нижестоящего к вышестоящему элементу (т. к. атомный радиус уменьшается снизу вверх).

4. Господствующее положение элементов 2 и 3 периодов таблицы Д. И. Менделеева в биологических системах. Известно, что живые организмы значительно отличаются по элементарному составу от неживого, физического окружения, особенно от земной коры. Последняя состоит на 99% из следующих элементов: кислород, железо, кальций, калий, натрий, алюминий, кремний, магний. Живые организмы состоят на 99% только из четырех элементов: кислород, водород, азот, углерод. Среди всех элементов кислород является самым тяжелым в живых системах и самым легким из элементов земной коры.

Таким образом, в процессе зарождения жизни и дальнейшей ее эволюции произошел отбор легких элементов, составивших основу живых организмов.

В живых системах имеются в следовых количествах все элементы, встречающиеся в земной коре, но только двадцать из них являются обязательными и без них организмы не могут существовать. Значительная часть этих элементов находится в клетке в состоянии ионов: Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Cl^- , CO_3^{2-} , NO_3^- . Количество этих ионов, их соотношение в живых системах подвержены колебаниям только в узких пределах. И если мы экспериментально изменяем ионный состав, его концентрацию, то это приводит к значительным, часто специфическим изменениям в живых системах (нарушение клеточного деления, вязкости протоплазмы, клеточной проницаемости и др.).

Важная роль ионов на молекулярном уровне становится понятной из того, что важнейшие макромолекулы клетки — нуклеиновые кислоты, белки являются поливалентными ионами. В роли их противоионов выступают катионы. Между ионами и макромолекулами

в клетке устанавливаются определенные соотношения и взаимодействия. Например, Mg^{2+} резко изменяет структурное состояние рибосом, Ca^{2+} является противоионом фосфолипидного компонента клеточных мембран, K^+ специфически взаимодействует с миозином мышц и т. п. Некоторые элементы находятся в клетке в ультранизких концентрациях (порядка 10^{-8} моль) и очень часто являются кофакторами соответствующих ферментов.

Таким образом, живые системы отбирают из окружающей среды только небольшое число элементов периодической системы Д. И. Менделеева, определяющих их структуру и функцию. Специфическую роль определенных элементов периодической системы Д. И. Менделеева в живых организмах можно объяснить исходя из электронной теории строения атомов и молекул. Известно, что основную массу тканей живого организма составляют углерод, кислород, водород, азот, фосфор и сера. В живых организмах чаще встречаются одни и те же одноатомные ионы Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} и Cl^- , а в роли ядер различных комплексов выступают, как правило, элементы, которые встречаются в микроколичествах, такие как Cu, Fe, Mn, Zn, Co. Все эти элементы относятся к первым тридцати элементам периодической системы Д. И. Менделеева, т. е. в основном ко второму и третьему периодам. Четыре элемента: C, O, N и H относятся к первому и второму периодам периодической системы элементов. Все они отличаются наименьшими размерами атомов и приобретают октетную стабильную структуру, присоединяя один, два, три и четыре электрона. Они легко спаривают электроны и образуют прочные ковалентные связи.

В отборе организмами более «пригодных» элементов играет, видимо, большую роль размер атомов. Этим можно объяснить, почему фтор не имеет такого большого значения в биологических системах, как водород, хотя и приобретает устойчивую октетную структуру также присоединением одного электрона. В этом случае сыграли решающую роль крупные размеры атома. Кроме этого, присоединение электрона резко электроотрицательным фтором приводит к образованию аниона, а не молекулы.

Наименьшие размеры атомов элементов первых трех периодов периодической системы обуславливают образование более коротких химических связей, которые отличаются высоким содержанием энергии. Кроме этого, образовывать кратные связи способны, как правило, только первые восемь элементов периодической системы, особенно C, O и N, реже — P и S.

Известно, что главную структурную, скелетную функцию в органических соединениях живых организмов выполняет углерод. И в этом случае выбор в процессе эволюции основывался на специфике электронной структуры атома этого элемента. Исходя из запасов на земле углерода и кремния можно было бы допустить, что кремний должен был бы занять важное место в построении биологических систем, так как его на земле в 135 раз больше, чем угле-

рода, и он также способен образовывать, как углерод, четыре ковалентные связи. Но атом кремния имеет больший размер, поэтому расстояние между атомами (длина связи) Si—Si значительно больше, чем в случае C—C. Это определяет прочность связи. C—C-связи имеют длину 15,4 нм и энергию около $335 \cdot 10^3$ Дж/моль, а Si—Si-связи соответственно — 23,4 нм и $176 \cdot 10^3$ Дж/моль. Кроме этого, меньший размер атома углерода по сравнению с кремнием обуславливает возможность образования им еще более прочных двойных и тройных связей.

Рассмотрим взаимодействие углерода и кремния с кислородом. В обоих случаях образуется двуокись. Углерод на внешней орбите имеет четыре неспаренных электрона и с каждым атомом кислорода образует двойную связь с помощью обобщения двух электронов. В результате электронная оболочка атома углерода и кислорода приобретает устойчивую структуру октета:



Углерод во внешней среде находится в более окисленном, а в биологических системах — восстановленном состоянии. Поэтому восстановленные соединения углерода стремятся к взаимодействию с кислородом. Как известно, двуокись углерода стала первичным источником углерода для живых организмов. При образовании четырех тетраэдрических одинаковых ковалентных связей четыре орбиты (одна — $2s$ и три — $2p$) гибридизируются и образуют четыре тождественные гибридные sp -орбиты. С образованием четырех ковалентных связей атом углерода приобретает устойчивую октетную структуру.

Иная картина получается при образовании двуокиси кремния. Атомы этого элемента лишены возможности образовывать кратные связи. Поэтому атом кремния оказывается ненасыщенным в электронном отношении и взаимодействует с необобщенными электронами атома кислорода другой молекулы SiO_2 . Но тогда вторая молекула должна взаимодействовать с атомом кислорода третьей молекулы SiO_2 , чтобы атом кремния мог приобрести устойчивую электронную конфигурацию. В результате создаются громадные неактивные агрегаты из-за присутствия в них внутренних молекулярных сил.

Кремний занимает центральное место, как и углерод, но только не во втором, а в третьем периоде. Он также может обобщить на внешней оболочке четыре электрона: один на $3s$ -орбите и три на трех $3p$ -орбитах. При этом атом приобретает некоторую стабильность электронной структуры, так как приближается к конфигурации аргона. Но она нарушается тем, что атомные орбиты кремния становятся орбитами молекулы. Кроме этого, у кремния образование октетной относительно устойчивой конфигурации не насыщает всю третью электронную оболочку, так как на третьем энергетическом уровне имеется еще пять $3d$ -орбит, которые могут принять и обобщить еще пять неспаренных электронов. Это делает атом

кремния малоустойчивым и легко атакуемым, особенно молекулами и атомами малого размера.

Итак, кремний не был отобран в химической эволюции как основа при формировании биологических систем по трем причинам: связи, образованные между атомами этого элемента или с атомами других элементов, слабее, чем C—C-связи, и легче разрываются; кремний не способен образовывать кратные связи, в результате чего возникают инертные полимеры, малоподвижные в круговороте веществ; и наконец кремний образует нестойкие цепи, которые легко разрываются в присутствии кислорода, воды, аммиака, т. е. тех веществ, которые являются неотъемлемыми для живых систем.

На этой же основе можно объяснить, почему фосфор и сера наряду с другими функциями выполняют в организмах выраженную специфическую роль переносчиков энергии и групп. Этому способствует свойство этих элементов образовывать различные типы связей с высоким и низким энергетическими потенциалами, а также нестабильность этих связей, которая облегчает участие в обмене. Процесс переноса энергии и групп в низко- и высокоэнергетических (макроэнергетических) связях тщательно изучается. Термины «низкоэнергетическая» и «высокоэнергетическая» связи не совсем отражают суть, так как речь идет не об энергии связи, а об изменении свободной энергии, сопровождающей реакцию переноса, т. е. разности между величиной свободной энергии реагентов и продуктов реакции. Известно, что все реакции переноса энергии и групп осуществляются фосфатами. Для серы известны три высокоэнергетических комплекса: ациловые эфиры тиолов (ацетил-КоА); смешанные ангидриды фосфорной и серной кислот (аденозинфосфорилсульфат в реакциях сульфирования); соединения сульфония (S-аденозил-метионин в реакциях метилирования).

В настоящее время известно только два высокоэнергетических комплекса, которые осуществляют перенос групп без участия фосфора и серы. Это класс ацилимидазолов, где ацильная группа связана с атомом азота и комплекс, в котором вторая или третья ОН-группы рибозы (концевой адениловой кислоты транспортной РНК) связаны эфирной связью с карбоксильной группой активированной аминокислоты.

Известно, что азот и кислород периодической системы элементов Д. И. Менделеева занимают пятое и шестое место во втором периоде, а фосфор и сера расположены в тех же группах, но третьего периода. Однако кислород и азот не выполняют той функции, которая осуществляется фосфором и серой. И в этом случае первичную причину следует искать в особенностях электронной структуры атомов фосфора и серы, которые обуславливают у этих элементов возникновение более длинных и слабых связей, образование более четырех ковалентных связей благодаря наличию у них 3d-орбит, сохранение способности образовывать кратные связи. Такое объяснение функции фосфора и серы как переносчиков энергии и групп вытекает из величин радиусов ковалентных связей.

Элемент	Радиус связи, Å		Элемент	Радиус связи, Å	
	простая	двойная		простая	двойная
C	0,77	0,67	Si	1,17	1,07
N	0,74	0,62	P	1,10	1,00
O	0,74	0,62	S	1,04	0,94

Более длинные связи, образуемые элементами третьего периода (Si, P, S), отличаются и более низкой энергией. Это видно из сравнения величины энергии для элементов второго и третьего периодов, которые они образуют с водородом.

Связь	Энергия связи, Дж/моль	Связь	Энергия связи, Дж/моль
C—H	$413,4 \cdot 10^3$	Si—H	$294,5 \cdot 10^3$
N—H	$391 \cdot 10^3$	P—H	$320 \cdot 10^3$
O—H	$460,5 \cdot 10^3$	S—H	$340 \cdot 10^3$

Таким образом, элементы третьего периода образуют более длинные связи с более низкой энергией, которые легче поддаются расщеплению и обмену. Известно, что элементы третьего периода имеют третью электронную оболочку, на которой расположено пять $3d$ -орбит, способных принять и разместить еще пять пар электронов. Однако возникновение стабильных связей у этих элементов ограничено, так как фосфор может образовать только пять, а сера — шесть ковалентных связей. Кислород и азот не обладают такими способностями.

Как и у кремния, у фосфора и серы наличие свободных $3d$ -орбит создает благоприятные условия для атаки их молекулами, у которых имеются неподеленные пары электронов и которые могут занять $3d$ -орбиты, что обуславливает протекание реакции обмена.

Из элементов третьего периода способность образовывать кратные связи сохраняется только у фосфора и серы. Образование кратных связей наблюдается практически только у атомов первых двух периодов периодической системы элементов, которые отличаются малым ядром и относительно малым количеством электронов. Это позволяет атомам достигнуть сближения на наименьшее расстояние, что необходимо для образования кратной связи.

По мере увеличения размера атомов растет масса их ядра, увеличивается радиус и количество электронов, не участвующих в образовании связи. Эти электроны отталкиваются друг от друга тем сильнее, чем больше их количество. Для образования кратной связи необходимо еще большее сближение, и это приводит к еще более значительному увеличению сил отталкивания. Таким образом, свойство элементов образовывать кратные связи коррелирует с малыми размерами их атомов.

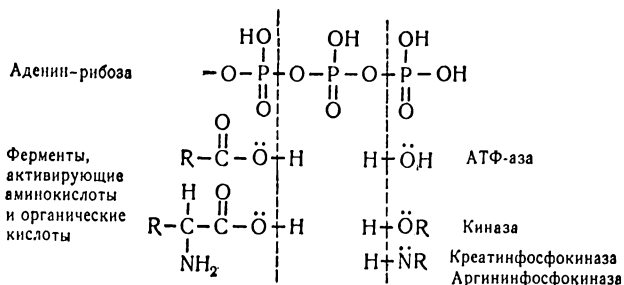
Однако становится непонятным, почему фосфор и сера способны к образованию кратных связей, а кремний не способен, хотя размеры атома и число электронов на внешнем электронном слое у кремния меньше, чем у фосфора и серы. Это объясняется тем, что образование кратных связей обусловлено только малой величиной атомного радиуса. Известно, что с увеличением порядкового номера элемента радиус его атома не только не увеличивается внутри периода, но даже уменьшается. Это объясняется тем, что с увеличением номера элемента растет положительный заряд ядра, которое с большей силой притягивает к себе электроны. Отсюда становится понятным, почему фосфор и сера способны образовывать кратные связи, а кремний не обладает такой возможностью. Это подтверждают и величины радиусов двойных ковалентных связей, которые равны: S — 0,94 Å; P — 1,00 Å; Si — 1,07 Å.

Длина связей, образуемых фосфором, может измениться в зависимости от атомов и радикалов, с которыми он соединяется. Длина связи P—O в фосфорной кислоте равна 1,54 Å. Если к кислороду присоединен водород, то длина связи увеличивается до 1,57 Å, если радикал серина — до 1,61 Å. Если фосфор соединен непосредственно с атомом азота (креатинфосфат, аргининфосфат), то наблюдается увеличение длины связи. То же самое наблюдается у сульфатов. В SO₄ длина S—O-связей равна 1,47 Å; в S—OH — 1,56 Å; в этилсульфате (C₂H₅—O—SO₃) длина связей S—O (C₂H₅) равна 1,603 Å. Удлиненные связи фосфатов и сульфатов вследствие присоединения к кислороду различных радикалов становятся открытыми местами. Незанятые 3d-орбиты атомов фосфора и серы являются своего рода «приманкой» для неспаренных электронов. Молекула, которая может отдать неподеленную пару электронов, через эти 3d-орбиты легко присоединяется к фосфору и сере. Такие соединения легко реагируют с водой, молекулами типа KOH, RNH₂. Все реакции взаимодействия серы и фосфора с органическими соединениями всегда начинаются с присоединения к ядру атомов этих элементов неподеленной пары электронов, занимающей свободные 3d-орбиты.

Гидролиз S- и P-связи начинается с присоединения неподеленной пары кислорода к этим атомам. Механизм реакций с фосфатной P—O-связью (АТФ) или другой макроэргической связью, например P—N (креатинфосфат, аргининфосфат), происходит таким образом. В продуктах гидролиза гидроксильная группа воды всегда будет связана с атомами серы или фосфора. Таким же образом протекает реакция и в случае, когда P—N- и P—O-связи атакуются молекулами, имеющими OH-группы или OR-группы. В этом случае также P—N- и P—O-связи разрываются, и OH- и OR-группы атакующей молекулы оказываются связанными с атомом фосфора.

АТФ-азная, или киназная, реакция с ROH, RNH₂ протекает с разрывом концевой фосфатной связи. При этом группы HO—, RO—, RN— остаются связанными с остатком фосфорной кислоты. При активировании молекул жирных кислот и аминокислот об-

разуются их аденилаты, а АТФ расщепляется с выделением пирофосфата. Механизм гидролиза молекулы АТФ может быть представлен для различных случаев таким образом:



Во всех случаях реакция инициируется присоединением неподделенной пары электронов кислорода или азота $3d$ -орбитами серы или фосфора. Остается неясным, почему в одних случаях атака направлена на первую фосфатную группу, а в других на конечную. Возможно, это определяется высокой специфичностью ферментов, участвующих в этих реакциях.

Таким образом, сера и фосфор способны к образованию макроэргических связей потому, что их атомы образуют более «открытые» и более слабые связи, чем кислород и азот. Сера и фосфор имеют $3d$ -орбиты, которые обуславливают образование этими элементами более четырех ковалентных связей. Кроме этого, сера и фосфор способны образовывать кратные связи, что имеет значение в термодинамике процессов переноса энергии. Способность фосфора и серы образовывать кратные связи и 5 или 6 ковалентных связей создает возможности резонанса исходных и конечных продуктов обменных реакций. Это увеличивает число и разнообразие энергетических изменений и обуславливает адекватную дозировку энергий. Большая длина и низкая энергия связей, способность присоединять неподделенные пары электронов на незанятые $3d$ -орбиты придают этим связям, образуемым серой и фосфором, нестабильность, что ведет к реакциям обмена.

Таким образом, электронное строение атомов элементов 2 и 3 периодов периодической системы Д. И. Менделеева явилось основой отбора их живыми организмами для осуществления процессов переноса энергии групп и других функций в клетке.

Список литературы

- Беккер Г. Введение в электронную теорию органических реакций. М., «Мир», 1965.
- Водородная связь (сборник). М., «Наука», 1964.
- Ингольд К. К. Механизм и строение органических соединений. М., Изд-во иностр. лит., 1959.
- Киприанов А. И. Введение в электронную теорию органических соединений. К., «Наукова думка», 1965.
- Кондратьев В. Н. Структура атомов и молекул. М., Изд-во АН СССР, 1946.

- Коулсон Ч. А. Валентность. М., «Мир», 1965.
- Мюллер Е. М. Новое воззрение в органической химии. М., Изд-во иностр. лит., 1960.
- Пиментел Дж., Мак-Келлан О. Водородная связь. М., «Мир», 1964.
- Пюльман Б., Пюльман А. Квантовая биохимия. М., «Мир», 1965.
- Ремик А. Электронные представления в органической химии. М., Изд-во иностр. лит., 1950.
- Реутов О. А. Теоретические основы органической химии. М., Изд-во Московск. ун-та, 1964.
- Сталл Д., Вестрам Э., Зинке Г. Химическая термодинамика органических соединений. М., «Мир», 1971.
- Стрейтвизер Э. Теория молекулярных орбит. М., «Мир», 1965.
- Темникова Т. И. Курс теоретических основ органической химии. Изд. 2. Л., Госхимиздат, 1962.
- Уэланд Дж. Теория резонанса и ее применение в органической химии. М., Изд-во иностр. лит., 1948.
- Хигаси К., Баба Х., Рембаум А. Квантовая органическая химия. М., «Мир», 1967.
- Хюккель В. Теоретические основы органической химии, т. 1. М., Изд-во иностр. лит., 1955; т. 2, 1958.

Глава II

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДИСПЕРСИОННОЙ СРЕДЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Роль универсальной, уникальной дисперсионной среды в биологических системах выполняет вода. Электронная структура воды, ее физические и химические свойства определяют многие важнейшие характерные особенности биологического мира; делают воду идеально пригодной для выполнения биологической роли. Все активно существующие клетки живых организмов состоят на 60—98 % из воды. Мы рассмотрим электронную структуру, физические и химические свойства воды только в связи с ролью, которую она выполняет в живых системах.

1. Электронная структура воды. Физические и химические свойства, а отсюда и биологическое значение воды определяются электронной структурой ее молекулы, которая хорошо изучена. В молекуле воды имеется три ядра, которые образуют равнобедренный треугольник с двумя протонами в основании и кислородом в вершине (рис. 4). Электронное облако молекулы воды состоит из 10 электронов. Одна внутренняя пара электронов расположена вблизи ядра кислорода, а остальные по паре обобществлены между каждым из протонов и ядром кислорода.

Два электрона кислорода из шести образуют электронные пары с атомами водорода. Ядро атома кислорода с большой силой притягивает остальные четыре электрона. Поэтому атомы водорода становятся электроположительными. Центры отрицательного заряда с наибольшей концентрацией электронов расположены в стороне от О—Н-связей. Таким образом, молекула воды приобретает форму тетраэдра. Атом кислорода находится в центре тетраэдра,

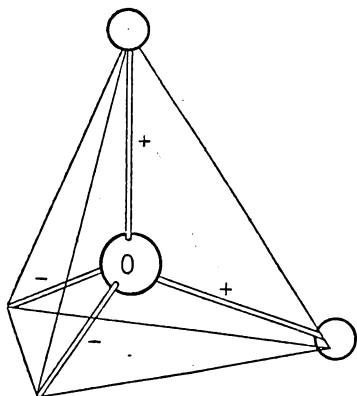


Рис. 4. В молекуле воды атом кислорода притягивает четыре неспаренных внешних электрона. Происходит разделение положительных и отрицательных центров заряда, которые смещаются в направлении четырех вершин тетраэдра.

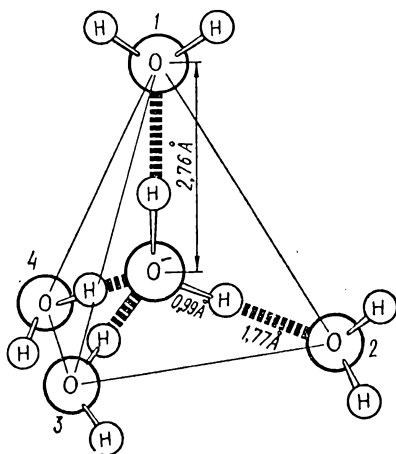


Рис. 5. Структура льда по Полингу. Тетраэдрическое расположение молекул воды в кристаллической решетке льда. Четыре молекулы воды образуют тетраэдр. Атомы кислорода (1, 2, 3, 4) лежат в вершинах правильного тетраэдра.

а два атома водорода занимают две из его вершин. Центры отрицательного заряда смещены в направлении двух других вершин тетраэдра. Таким образом, в молекуле воды имеются 4 полюса зарядов, расположенных в вершинах тетраэдра. Два отрицательных полюса созданы избытком электронной плотности в местах расположения неспаренных электронов кислорода. Два положительных полюса созданы недостатком электронной плотности в местах расположения протонов атомов водорода. При этом атомы водорода несут частичный положительный заряд около $+0,33 \cdot 10^{-10}$ электростатической единицы и атом кислорода $-0,66 \cdot 10^{-10}$ электростатической единицы. И хотя молекула воды не имеет суммарного заряда, она представляет собой электрический диполь. Дипольный момент равен $1,86D$. Центры отрицательного и положительного зарядов ориентируют молекулы воды по отношению друг к другу. При этом центры отрицательного заряда одной молекулы притягивают центры положительного заряда другой. В результате каждая молекула воды притягивает к себе четыре другие молекулы, т. е. координационное число молекулы равно четырем. Таким образом, образуется основа конфигурации тетраэдра (рис. 5).

В жидкой воде такая «тетраэдрическая» структура находится в состоянии динамического равновесия: упорядоченные (кристаллические) молекулы воды смешаны с хаотически распределенными молекулами. При замерзании же все молекулы воды упорядочиваются и принимают ориентированную, кристаллическую форму.

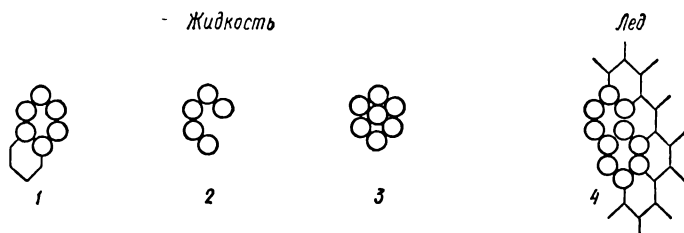


Рис. 6. Схематическое изображение структуры воды в жидком и твердом состояниях (Клотц, 1964):

1 — микрорешетка; 2 — дефекты; 3 — молекулы, расположенные в пустотах решетки; 4 — решетка.

Принято считать, что структура воды в жидком состоянии имеет гексагональную или пентагональную форму.

В жидком состоянии при температуре 4°C большое число молекул воды располагается в пустотах шестиугольников, что обуславливает известное явление высокой плотности воды при этой температуре (рис. 6).

В образовании тетраэдрической структуры воды имеет большое значение водородная связь. Как известно, ион водорода представляет собой ядро с зарядом 1^{+} . Ион водорода может сильно притягивать два электроотрицательных иона, например, фтора. При этом образуется ион $[\text{F}-\text{H}^{+}-\text{F}^{-}]^{-}$, который отличается достаточно высокой устойчивостью. Образование такого комплексного иона оказывается возможным благодаря наличию водородной связи, более слабой, чем электровалентная и ковалентная, но более сильной, чем вандерваальсовы силы молекулярного притяжения. Водородный ион образует с электроотрицательными атомами связи неодинаковой силы и длины. Например, дифтористый водород может быть изображен таким образом: $\text{F}^{-}-\text{H}^{+}-\text{F}^{-}$. При этом связь, которая образуется за счет необобщенной электронной пары притягиваемого атома с притягиваемым водородным ионом, всегда короче и сильнее, чем водородная или электростатическая связь. Исходя из особенностей электронной структуры, молекула воды обладает большой возможностью образования водородных связей. Это объясняется тем, что каждая молекула имеет два водородных атома и две необобщенные электронные пары. Каждая молекула воды может образовать четыре водородные связи.

Как мы уже говорили, электронные пары в молекуле воды расположены в форме тетраэдра. Это обуславливает возникновение кристаллической структуры, характерной для твердого состояния воды (льда). Методом рентгеноструктурного анализа определены размеры кристаллической решетки льда. Длина связи между кислородом и водородом в молекуле равна $0,99 \text{ \AA}$, а расстояние между атомами кислорода двух соединенных молекул воды составляет $2,76 \text{ \AA}$. Отсюда длина водородной связи между протоном и атомом кислорода другой соседней молекулы должна составлять $1,77 \text{ \AA}$. Эти связи

более лабильны и играют важнейшую роль во многих фундаментальных биологических процессах.

Известно, что вода имеет общие молекулярные свойства с молекулой метана, но последний не образует водородных связей. По разнице между теплотами возгонки льда и метана Полинг определил энергию водородной связи. Она равняется $18,8 \cdot 10^3$ Дж/моль, что приблизительно в двадцать раз меньше величины энергии ковалентной связи (О—Н) между атомами кислорода и водорода в молекуле воды. Из этого следует, что энергия водородной связи ниже энергии ковалентной и выше энергии межмолекулярных вандерваальсовых взаимодействий.

Однако энергия водородных связей является, с одной стороны, достаточно высокой для стабилизации большого числа сложных макромолекулярных структур (белки, нуклеиновые кислоты и т. д.), а с другой — сравнительно низкой для того, чтобы обеспечить возможность структурных модификаций в биологически важных макромолекулах и структурах. Только этим можно объяснить роль, которую водородные связи играют в определении структуры и функции большинства важных компонентов живой клетки.

В твердом состоянии вода имеет достаточно рыхлую структуру, так как каждая молекула воды окружена только четырьмя ближайшими соседними частицами и между ними остается много незаполненных мест. При переходе воды из твердого в жидкое состояние кристаллическая решетка разрушается. При этом молекулы воды сближаются и возрастает ее плотность. Однако после таяния структура льда распадается лишь частично, сохраняются многие водородные связи и значительная часть воды остается в паракристаллическом состоянии, т. е. жидкая вода состоит из короткоживущих «мерцающих скоплений». Если продолжать повышать температуру (до $+4^\circ\text{C}$), регулярная структура воды все больше меняется на хаотичную; плотность возрастает. При температуре выше $+4^\circ\text{C}$ плотность воды начинает уменьшаться за счет увеличения расстояния между молекулами. Это особое свойство воды обуславливает

Таблица 1. Физические свойства воды в сравнении с физическими свойствами других жидкостей

Физические свойства	H ₂ O	C ₂ H ₅ OH	Гексан	CHCl ₃
Теплоемкость, Дж/г	4,184	2,5	2,09	1,04
Теплота испарения, Дж/г	2494 (при 0° C)	1096 (при 64° C)	330 (при 68° C)	247 (при 61° C)
Скрытая теплота плавления, Дж/г	333 (при 0° C)	105 (при 114,4° C)	—	—
Поверхностное натяжение (жидкость — воздух), Дж/см	$76 \cdot 10^{-7}$	$22 \cdot 10^{-7}$	$18 \cdot 10^{-7}$	$11 \cdot 10^{-7}$
Диэлектрическая проницаемость	79	24	1,9	5

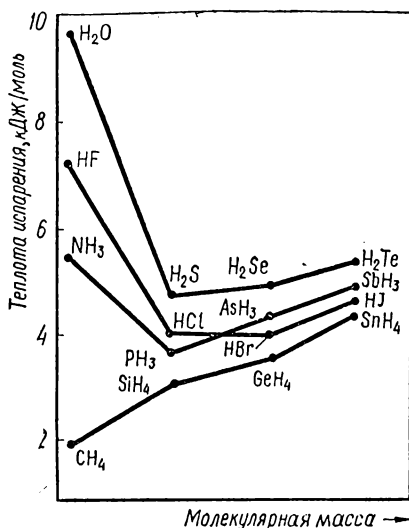


Рис. 7. Теплоты испарения изоэлектронных рядов гидридов. Гидрид кислорода имеет необычное поведение и структуру (по Полингу).

сильный охлаждающий эффект при испарении воды (рис. 7). Поэтому с помощью воды живые организмы более эффективно регулируют температуру своего тела.

Вода имеет также высокую теплоемкость и сохраняет свою температуру при значительных колебаниях температуры окружающей среды. Известно, что в клетках, находящихся в активном физиологическом состоянии, содержится до 98% воды. Поэтому во внутриклеточной среде создается надежный *тепловой буфер*, который защищает лабильные клеточные структуры от термического повреждения в результате локальных выделений значительных количеств энергии.

Вода отличается очень высокой диэлектрической проницаемостью и выполняет поэтому роль *электростатического буфера*. Это ослабляет интенсивность взаимодействия между зарядами. Кроме этого, аномально большая диэлектрическая проницаемость воды обуславливает ее высокую растворяющую способность, которая, в свою очередь, определяется образованием водородных связей. Вода легко растворяет соединения с электровалентной связью потому, что две отдельные дипольные молекулы обладают значительно меньшей способностью нейтрализовать приложенное электрическое поле, чем комплекс из двух молекул с двойным дипольным моментом. Поэтому вода относится к числу немногих веществ, у которых диэлектрическая проницаемость превышает 40, обладающих способностью легко растворять электролиты.

Молекулы воды в электрическом поле между электростатиче-

промерзание воды в водоемах сверху вниз. Лед имеет меньшую плотность и плавает на воде, образуя изоляционный слой и предохраняя нижележащую воду от потери тепла.

2. **Физические и химические свойства воды в связи с ее ролью в биологических системах.** Сильные взаимные притяжения молекул воды, обусловленные наличием водородных связей, определяют ее уникальные физические свойства, имеющие большое биологическое значение. Вода имеет аномальные физические параметры: точки плавления и кипения, теплоту плавления, теплоемкость, поверхностное натяжение, диэлектрическую проницаемость (табл. 1). Как видно, вода обладает высокой скрытой теплотой плавления, что обуславливает

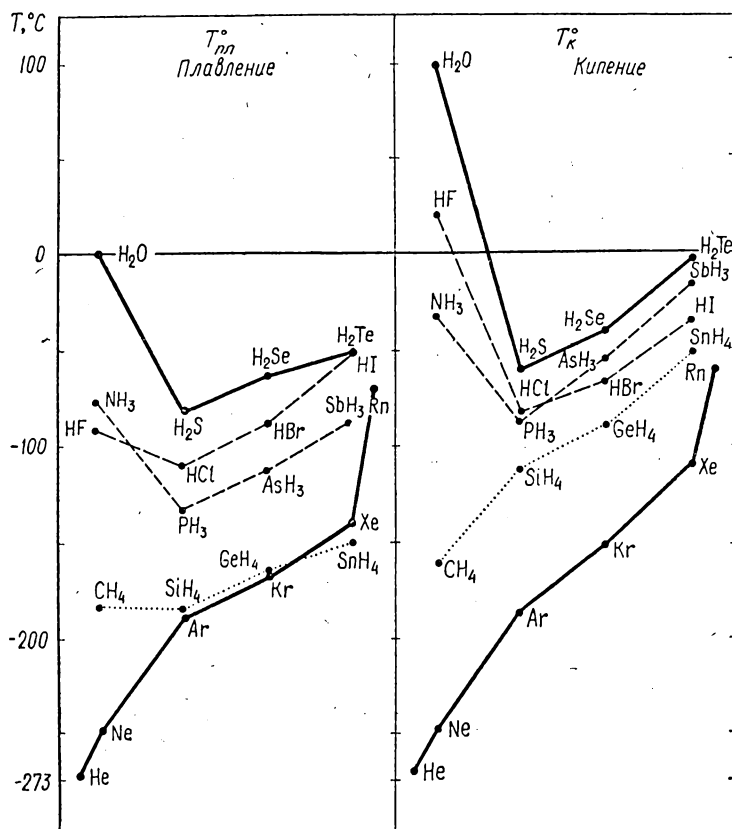


Рис. 8. Температуры плавления и кипения гидридов неметаллов. Более высокие значения у фтористого водорода, аммиака, воды обусловлены способностью образовывать водородные связи (по Полингу).

ски заряженными пластинами конденсатора ориентируются так, чтобы их положительно заряженные концы были обращены к отрицательной пластине, а отрицательно заряженные — к положительной пластине. Это частично нейтрализует силу наложенного электрического поля. Диэлектрическая проницаемость воды равна 81. Следовательно, два противоположных заряда в воде притягиваются с силой, составляющей $1/81$ часть силы, в которой эти заряды взаимно притягиваются в воздухе или вакууме.

Вода отличается аномальной температурой плавления и кипения. Это хорошо видно при сравнении температуры плавления и кипения в рядах родственных соединений неметаллов (рис. 8). Как видно, изменение температуры кипения и плавления является нормальным в ряду CH_4 , SiH_4 , GeH_4 , SnH_4 и отклоняется от нормы в другом ряду, например в ряду H_2O , H_2S , H_2Se , H_2Te . В ряду H_2S , H_2Se , H_2Te обнаруживается предполагаемый нормальный

Таблица 2. Некоторые физические свойства воды

Свойства	Жидкое состояние	Твердое состояние
Концентрация ионов H^+	$1 \cdot 10^{-7}$ моль	$1 \cdot 10^{-10}$ моль
Удельная электрическая проводимость	$1 \cdot 10^{-6}$ См/м	$0,3 \cdot 10^{-6}$ См/м
Подвижность ионов H^+	$0,0036 \cdot 10^{-4}$ м ² В ⁻¹ с ⁻¹	$\sim 0,3 \cdot 10^{-4}$ м ² В ⁻¹ с ⁻¹
Скорость реакции $H^+ + OH^- \rightarrow H_2O$	10^{11} лмоль ⁻¹ с ⁻¹	$10^{13} - 10^{14}$ лмоль ⁻¹ с ⁻¹
Подвижность ионов Li^+	$0,0004 \cdot 10^{-4}$ м ² В ⁻¹ с ⁻¹	$< 10^{-12}$ м ² В ⁻¹ с ⁻¹
Коэффициент диффузии молекул воды	$2,4 \cdot 10^{-9}$ м ² с ⁻¹	$8 \cdot 10^{-15}$ м ² с ⁻¹

ход изменения температуры кипения и плавления. Но при экстраполяции этих значений температура плавления и кипения воды должна была бы быть соответственно -100 и $-80^\circ C$, т. е. температура плавления воды должна была бы оказаться на 100° ниже, а температура кипения на 180° ниже, если бы она подчинялась общей закономерности в ходе изменения температуры плавления и кипения. Как видно из рис. 8, аномально высокие значения температуры плавления и кипения обнаруживаются для фтористого водорода, аммиака и воды. Это объясняется сильным взаимным притяжением молекул и тем, что эти соединения способны образовывать водородные связи. Выше уже говорилось, что вода обладает наиболее высокой способностью образовывать водородные связи, поэтому она заняла исключительное место в жизни живых организмов. Вода может находиться в трех агрегатных состояниях, из которых основными, имеющими наибольшее значение для биологических систем являются жидкое и твердое.

Как видно из табл. 2, концентрация ионов водорода в жидком состоянии равняется $1 \cdot 10^{-7}$ моль, в твердом — $1 \cdot 10^{-10}$ моль. Отсюда и удельная электрическая проводимость для льда составляет $0,3 \cdot 10^{-6}$ См/м, а для воды — $1 \cdot 10^{-6}$ См/м. Электрическая проводимость и концентрация водородных ионов находятся в определенной зависимости. Концентрация водородных ионов изменяется приблизительно в 1000 раз при переходе воды из жидкого в твердое состояние. Электрическая проводимость при $0^\circ C$ практически не изменяется.

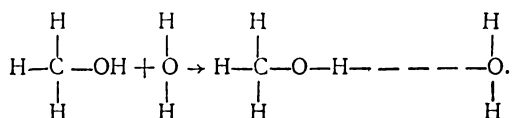
Под электрической проводимостью понимают перенос зарядов через определенное сечение проводника за единицу времени. Интенсивность переноса определяется числом зарядов или ионов в единице объема раствора и скоростью движения зарядов (подвижностью). Проводимость может быть высокой при малом числе ионов и зарядов при условии, если они движутся с большой скоростью. При этом число зарядов, которые проходят через определенное по-

перечное сечение в единицу времени, будет достаточно высоким. Подвижность ионов водорода в воде или водном растворе определяет электропроводность. Это видно из того, что электрическая проводимость льда и воды почти одинакова, а число ионов водорода в твердой фазе значительно меньше, чем в жидкой. Из этого следует, что подвижность ионов водорода для жидкой среды должна быть заметно ниже, чем для твердого состояния. Это подтверждено экспериментально. Подвижность ионов для воды составляет $0,0036 \cdot 10^{-4} \text{ м}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$, а для льда $0,3 \cdot 10^{-4} \text{ м}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$, т. е. приблизительно в 1000 раз больше. Из этого следует, что для твердой структурированной воды, имеющей кристаллическую решетку, подвижность ионов водорода очень высокая. Это имеет исключительно большое биологическое значение, особенно для передачи энергии.

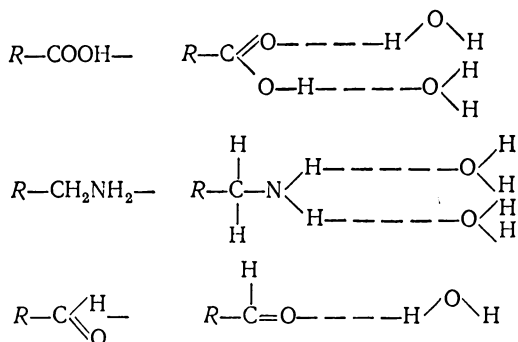
Ион водорода имеет аномальные свойства по сравнению с другими ионами. Для сравнения рассмотрим подвижность ионов лития (Li^+). Для жидкого состояния подвижность ионов лития выражается величиной $0,0004 \cdot 10^{-4} \text{ м}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$, т. е. приблизительно в 10 раз меньше подвижности ионов водорода. Но во льду подвижность ионов лития равна всего $10^{-12} \text{ м}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$ и ничтожно мала по сравнению с подвижностью ионов водорода в твердой воде. Таким образом, подвижность ионов Li^+ при переходе из жидкого в твердое состояние резко падает, а подвижность ионов водорода резко возрастает. Эта аномальность имеет большое значение для энергетики и транспорта зарядов и ионов в биологических системах.

3. Растворяющая способность воды. Как упоминалось выше, в молекуле воды присутствуют два водородных атома и две необобщенные электронные пары, что обуславливает образование четырех водородных связей. Последние придают воде исключительно высокую растворяющую способность. Это свойство воды позволило ей стать универсальной и господствующей дисперсионной средой в биологических системах. Вода является хорошим растворителем широкого круга веществ — от электрически нейтральных органических соединений до солей, которые легко диссоциируют на ионы.

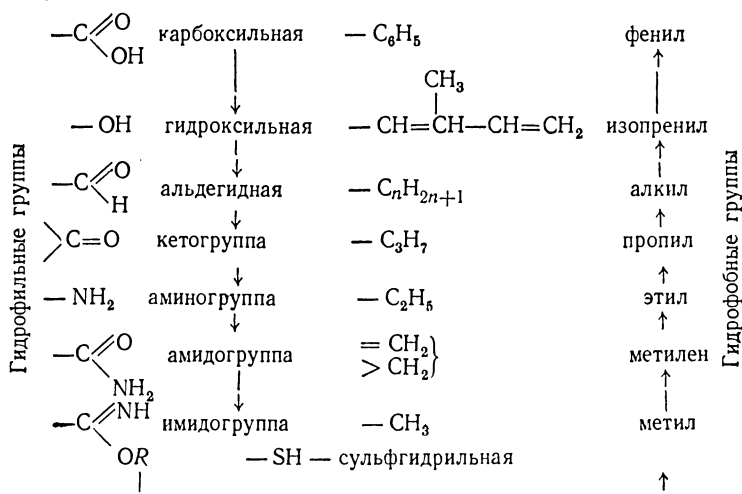
Растворимость в воде различных веществ определяется их способностью образовывать водородные связи. Поэтому введение в соединение, нерастворимое в воде, групп и радикалов, способных образовывать водородные связи, делает эти соединения растворимыми. Например, углеводород (метан CH_4) нерастворим в воде, но если в него ввести гидроксильную группу, то он становится растворимым потому, что протон гидроксильной группы образует водородную связь с атомом кислорода воды:



Растворимость в воде обусловлена и другими функциональными группами, способными образовывать водородную связь:



Все вещества можно расположить в ряд по наличию в них атомных группировок, имеющих различное средство к воде:



Как правило, чем более восстановленный углерод в активной группе, тем хуже растворимость вещества, в состав которого она входит. Но растворение различных веществ в воде приводит к изменению ее структуры.

Все молекулы воды вокруг катиона располагаются внутри отрицательными полюсами, а вокруг аниона — внутри положительными. Но вследствие нарушения структуры воды и из-за ее высокой диэлектрической постоянной положительные и отрицательные ионы оказываются разьединенными, и сила притяжения между ними снижается. Причина этого — взаимное притяжение между атомами кислорода воды и положительными ионами, и атомами водорода воды и отрицательными ионами. При этом вода выступает как оболочка, которая разделяет и нейтрализует заряды, снижает силу

электрического поля, приближая величину порогов энергетических переходов к физиологическому состоянию биологической системы.

Все молекулы воды вокруг иона располагаются в виде трех сфер (рис. 9). Молекулы воды, находящиеся непосредственно около иона, упорядочены и строго ориентированы сильным электрическим полем. В следующей сфере ориентация воды начинает нарушаться. Во внешней сфере вода имеет структуру, характерную для жидкого состояния.

На поверхности гидрофильных коллоидов, которыми являются белки и некоторые другие органические соединения, молекулы воды строго ориентированы и образуют оболочки, по структуре напоминающие лед. Гидрофильность белков и их сродство к воде определяется присутствием гидрофильных групп аминокислот, которые расположены вдоль полипептидной цепи. Вокруг макромолекул белка такой слой строго структурированной воды достигает толщины 10—20 Å и составляет до 30% массы гидратированной белковой молекулы. Ионы, находящиеся в растворе, не могут нарушить структуру этой оболочки, которая выполняет, таким образом, защитную роль. Следующая сфера воды вокруг макромолекулы белка достигает 100 Å, и молекулы воды в ней все еще сохраняют некоторую степень ориентации. Поэтому если есть в этой сфере ионы, то они свободно не могут в ней перемещаться в направлении к молекуле белка.

Вода изменяет в ионном растворе и некоторые физические свойства. Например, уменьшается теплоемкость. Это объясняется следующим образом. Если тепло сообщить чистой воде, то оно разрывает водородные связи и плавит отдельные микрокристаллические решетки. Но если в воду ввести ион, то он уже в известной мере нарушает обычную структуру воды, и тогда уменьшается количество тепла, необходимого для того, чтобы повысить температуру воды на один градус.

Иначе изменяются свойства воды в растворе неполярных веществ. Например, теплоемкость таких растворов, наоборот, возрастает, т. е. наблюдается обратная картина по сравнению с растворами ионных соединений. Увеличение теплоемкости растворов неполярных веществ (тетрабутиламмонийбромид) повышает степень упорядоченности молекул воды, т. е. молекулы неполярных веществ повышают степень структурной организации воды и теплота ее плавления возрастает.

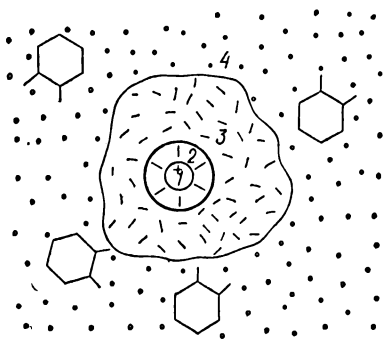
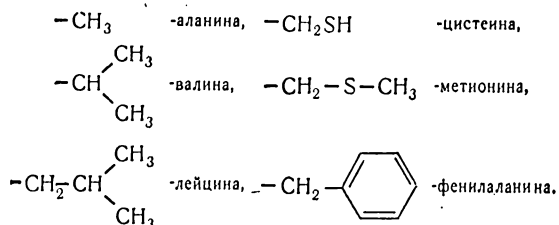


Рис. 9. Модель структуры воды в областях, прилегающих к неорганическому иону (Frank, 1957):

1 — ион; 2 — слой жестко связанной воды; 3 — слой воды с беспорядочно расположенными молекулами; 4 — обычная вода.

Мы видим, что состояние воды существенно изменяется в зависимости от тех веществ, с которыми она вступает во взаимодействие. Полярные вещества нарушают структуру воды, характерную для ее жидкого состояния, и ориентируют ее молекулы в зависимости от заряда иона. Неполярные соединения, наоборот, повышают степень структурной организации воды. В связи с этим необходимо рассмотреть состояние воды при взаимодействии ее молекул с белком, так как боковые группы полипептидной цепи могут быть полярными и неполярными.

Как известно, боковыми неполярными группами полипептидной цепи белковой молекулы могут быть:



Белки с такими боковыми группами будут обладать способностью образовывать кристаллогидраты при соприкосновении с водой, т. е. вокруг молекулы таких белков будет возникать стабильная кристаллическая структура воды. В белке, окруженном молекулами воды, будет происходить процесс кооперативного взаимодействия боковых цепей, прилегающих друг к другу. В результате этого структурированность воды вокруг белковой молекулы увеличится и произойдет усиление кристаллического состояния гидратных слоев, образование кристаллогидратов (гидротактоидов). Таким образом, будет происходить стабилизация белковых молекул за счет кристаллизации воды с помощью неполярных боковых групп полипептидной цепи. Белковая молекула в состоянии кристаллогидрата обладает большей устойчивостью против воздействия различных денатурирующих факторов: температуры, активных соединений и других. Тепловая денатурация белков будет наступать в этом случае только при более высокой температуре под действием веществ, разрывающих водородные связи (например, мочевина и др). При этом белок будет защищен кристаллической водой гидротактоида. Чтобы денатурировать белок, необходимо разорвать водородные связи между молекулами воды, разрушить решетку гидрата и уменьшить стабилизирующее действие, обусловленное присутствием неполярных групп. Таким образом, вода выполняет важную функцию в стабилизации белковых структур.

4. Диссоциирующая способность воды. Еще одним важным физическим свойством воды является ее способность к диссоциации. В чистой воде протоны атома водорода могут переходить от одной молекулы к другой. Это объясняется тем, что протоны являются легкими и подвижными частицами и изредка (с частотой 1 на $5,5 \times$

× 10⁸ молекул воды) перемещаются от кислорода одной молекулы к кислороду другой. В результате этого образуется отрицательно заряженный гидроксил (ОН[−]) и положительно заряженный ион

гидроксония (H₃O⁺):
$$\begin{array}{ccccccc} & \text{H} & & \text{H} & & \text{H} & & \text{H} \\ & | & & | & & | & & | \\ \text{O} & - \text{H} & + & \text{O} - \text{H} & \rightleftharpoons & \text{O}^- & \cdots & \text{H} - \text{O}^+ - \text{H} \end{array}$$
 или $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^-$. Ионы H₃O⁺, гидратированные в воде, реально существуют в виде ионов H₉O₄⁺. При этом с гидроксония (H₃O⁺) протоны перемещаются на другие молекулы воды с большой скоростью. Это явление лежит в основе высокой электрической подвижности протонов в жидкой и твердой воде.

Вода является одновременно и кислотой и основанием, так как, согласно теории диссоциации Бренстеда, кислотой является вещество, диссоциирующее на протон и сопряженное основание. Кислота является донором протонов, а сопряженное основание — их акцептором. Из предыдущего уравнения следует, что одна молекула воды отдает протон, а вторая принимает его. Диссоциацию воды обычно записывают сокращенно $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{OH}^-$. В термодинамике при определении истинной константы равновесия, которая не зависит от концентрации ионов, используют значение активности. В физиологических условиях концентрации молекул и ионов очень низкие, а температура не подвергается значительным колебаниям. Поэтому в этих условиях концентрации ионов и молекул очень близки к их активности.

По закону действия масс, константа равновесия определяется по равенству $K = \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]}$.

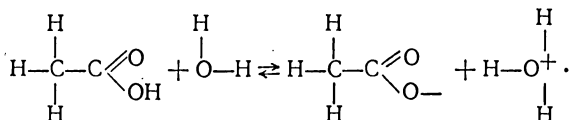
Концентрация ионов H⁺ и OH[−] по отношению к концентрации молекул воды ничтожно мала. Поэтому концентрацию молекул воды можно принимать как постоянную величину, т. е. в чистой воде и разбавленных растворах активность воды близка к единице. Тогда константу равновесия для воды можно записать по-другому: $K = [\text{H}^+] \cdot [\text{OH}^-]$. Диссоциация воды — процесс эндотермический. При расщеплении 18 г H₂O и соединении 1 г ионов водорода с 17 г ионов OH[−] соответственно поглощается или выделяется 57 × 10³ Дж/моль энергии. Известно, что, по принципу Ле Шателье, с повышением температуры равновесие сдвигается в сторону эндотермической реакции. Поэтому повышение температуры сопровождается увеличением диссоциации воды. В чистой воде при 25°С концентрация ионов [H⁺] равна концентрации ионов [OH[−]] и составляет 1 · 10^{−7}. Таким образом, константа равновесия воды равна 1 · 10^{−14}. Но в водном растворе может меняться концентрация водородных ионов. Если в воде растворено вещество с кислотными группами (—COOH), то эти группы будут отдавать протоны молекулам воды и концентрация ионов H₃O⁺ будет возрастать. Наоборот, если в воде растворяется вещество, молекулы которого несут основные

группы ($-\text{NH}_2$), то последние стремятся захватить протоны: $-\text{NH}_2 + \text{H}_3\text{O}^+ \rightleftharpoons \text{NH}_3^+ + \text{H}_2\text{O}$. В результате этого концентрация ионов H_3O^+ снижается.

Кислотность растворов (рН), таким образом, зависит от концентрации водородных ионов и выражается очень малыми, неудобными для пользования величинами. Поэтому выражение концентрации водородных ионов принято обозначать по способу, предложенному Серенсеном, через отрицательный десятичный логарифм активности водородных ионов: $\text{pH} = -\lg [\text{H}^+] = \lg \frac{1}{[\text{H}^+]}$. Как видно, в этом

выражении значение рН имеет обратную зависимость с концентрацией водородных ионов, т. е. чем выше концентрация водородных ионов, тем ниже значение рН. Необходимо помнить, что шкала рН — экспоненциальная, а не арифметическая, и при изменении значения величины рН на одну единицу концентрация водородных ионов изменяется на один порядок, в десять раз. Если рН изменяется на две единицы, то концентрация ионов водорода изменяется соответственно на два порядка, в 100 раз, и т. д. Предложенная Серенсеном шкала рН очень удобна, так как в случае растворов сильных кислот величина рН приблизительно равна логарифму числа, обратного концентрации кислоты. Например, рН 0,001 н. раствора соляной кислоты будет равняться логарифму 1000, т. е. 3. Те значения величин рН, которые мы обычно получаем при измерении в биологических системах, больше отражают активность, а не концентрацию водородных ионов, поэтому они больше дают термодинамическую информацию.

Способность воды к диссоциации имеет исключительно большое значение потому, что она активирует процесс диссоциации других веществ, особенно слабых электролитов, которые широко представлены в биологических системах. Дело в том, что слабые электролиты в чистом виде находятся в недиссоциированном состоянии. Если же их растворить в воде, то они диссоциируют и становятся реакционно-активными, что имеет большой биологический смысл. Это явление можно назвать *диссоциирующим эффектом воды*. Например, диссоциация слабой уксусной кислоты протекает по уравнению



Как видно, молекула воды выступает конкурентом уксусной кислоты и захватывает протон ее гидроксильной группы. Диссоциация молекулы уксусной кислоты обычно выражается равновесной системой $\text{CH}_3\text{COOH} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+$. Константа равновесия для этой реакции при 25° С равна: $K_A = \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]} = 10^{-4,75}$.

Диссоциацию слабых кислот также принято выражать через отрицательный логарифм величины константы равновесия: $pK_A \times \times [CH_3COOH] = -\lg K_A = \lg \frac{1}{K_A} = 4,75$. Необходимо отличать кислотность, которая определяется титрованием щелочью и показывает общее содержание кислоты в растворе, от активной кислотности, которая обусловлена частью кислоты, диссоциированной на ионы, определяемой активностью водородных ионов и выражаемой величиной pH.

У сильных кислот и оснований степень диссоциации близка к единице, поэтому концентрация водородных и гидроксильных ионов равна соответственно общей концентрации кислоты и основания.

У слабых кислот, которые отличаются малой диссоциацией, в растворе активна только та часть, которая расщепилась на ионы. Например, активная кислотность 0,1 н. раствора сильной соляной кислоты в 35 раз выше, чем активность той же концентрации раствора слабой уксусной кислоты. Необходимо обратить внимание на диссоциирующий эффект воды, т. е. на ее способность повышать скорость диссоциации других веществ, что связано с появлением в среде водородных ионов. А водородные ионы, как известно, отличаются от других ионов тем, что оказывают большое влияние на многие процессы, протекающие в живых системах. Известно, что в физиологических условиях большинство процессов осуществляется только при определенной концентрации водородных ионов. Незначительные отклонения в концентрации последних приводят к изменению скорости или полной приостановке той или иной реакции.

Поэтому в живых организмах в процессе эволюции выработались системы, обладающие буферным действием, т. е. противодействием к изменению концентрации водородных ионов. Доказательством этого может служить такой пример. Добавление 0,1 % молочной кислоты к воде повышает концентрацию водородных ионов в 10 000 раз, а к крови — в 2,2 раза. Буферное действие крови обусловлено главным образом содержащимся в ней белком гемоглобином. Кроме этого, имеют значение также карбонатный и фосфатный буферы, находящиеся в крови. Но белки обладают более сильным буферным действием, так как они являются амфолитами и способны связывать H^+ и OH^- ионы. Буферность в растворе, его стабилизация достигаются одновременным присутствием слабой кислоты и ее соли. Последняя образуется при взаимодействии между сильным основанием и слабой кислотой. Примером может служить раствор CH_3COOH и CH_3COONa , который противодействует изменению концентрации водородных ионов в системе. При добавлении в эту систему сильной кислоты (HCl) ее ионы (H^+) будут соединяться с анионами соли (A^-) и образуется слабая кислота: $Na^+ + CH_3COO^- + H^+ + Cl^- = CH_3COOH + NaCl$; а при добавлении сильной щелочи ($NaOH$) щелочь связывается слабой

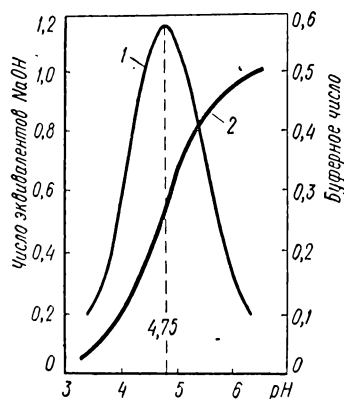


Рис. 10. Кривая титрования уксусной кислоты:
1 — буферная емкость; 2 — кривая титрования.

кислотой, образуются соль и вода:

$$\text{Na}^+ + \text{OH}^- + \text{H}^+ + \text{CH}_3\text{COO}^- = \text{CH}_3\text{COONa} + \text{H}_2\text{O}.$$
 Буферное действие системы прекратится, как только израсходуются все анионы соли при подкислении или вся слабая кислота при подщелачивании.

В буферных системах концентрация водородных ионов и гидроксильных групп определяется отношением концентраций составляющих компонентов, а не их абсолютным содержанием. Наибольшей буферной емкостью обладают растворы, pH которых равен показателю константы диссоциации слабой кислоты или слабого основания. При титровании уксусной кислоты едким натром, например,

буферная емкость определяется вычислением производной для кривой значений pH, т. е. скорости изменения pH в зависимости от скорости добавления NaOH. Максимальная буферная емкость наблюдается в точке, в которой добавление данного количества щелочи минимально сказывается на величине pH. Значение pH, соответствующее этому максимуму, численно равно значению pK_a кислоты (рис. 10). Наибольшей буферной емкостью обладает буферный раствор, в котором одинаковые концентрации слабой кислоты и ее соли. Значит, чтобы изменить величину pH такого раствора на единицу, нужно прибавить больше кислоты или щелочи, чем в случае, когда концентрации слабой кислоты и ее соли не были бы равны.

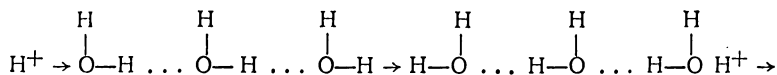
Буферы широко применяются в работе с биологическими системами. При приготовлении буферного раствора необходимо помнить, что за кислый компонент надо брать тот, у которого значение pK, по возможности, ближе к значению pH, которое в системе необходимо поддерживать. Например, уксусная кислота подходит как компонент для буферной смеси с pH около 4,7.

Многие виды макромолекул выполняют важную структурную и функциональную роль. Они являются слабыми полиэлектролитами, и степень их диссоциации, другие физические свойства в большей степени зависят от воды, растворенных в ней полярных веществ. Таким образом, вода является не только основной дисперсионной средой. Она оказывает влияние на свойства многих молекул, имеющих большое биологическое значение.

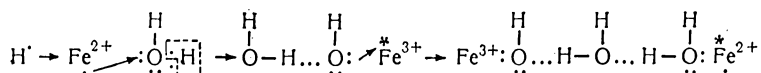
5. Роль воды в переносе зарядов. Вода выполняет важную роль в процессах проводимости, переноса энергии и зарядов в биологических системах.

В молекуле воды атом кислорода соединен с двумя протонами, положение которых может изменяться. Эти переходы протонов свя-

заны с перемещением зарядов и перегруппировкой водородных связей. Переориентация молекул приводит к возникновению упорядоченных областей, цепочек, по которым может осуществляться миграция протонов. Отсюда наличие упорядоченных структур, состоящих из молекул воды, является условием передачи энергии на расстояние. Перенос протона по цепочке молекул воды может осуществляться таким образом:



К молекуле воды подходит и ковалентно присоединяется протон. После этого атом водорода, связанный с кислородом этой молекулы ковалентно, а с кислородом соседней молекулы — водородной связью, отрывается и образует с ним ковалентную связь. Процесс повторяется, и в результате на противоположной стороне цепи образуется и выделяется протон. Этот процесс протонного пробоя осуществляется с большой скоростью. Наличие подобного цепного механизма обуславливает высокую подвижность ионов водорода в упорядоченной воде. При этом происходит не перенос одного и того же иона водорода, а возникновение в одном месте и образование на расстоянии другого нового иона водорода. По такому же принципу происходит перенос электронов между молекулами воды:



Процесс начинается с образования свободного водородного радикала присоединением к атому водорода одного электрона. Этот свободный радикал может быть донором электронов в окислительно-восстановительных процессах, которые осуществляются с помощью ионов железа или других металлов с различными положительными зарядами. Но непосредственная передача электрона водородного радикала от двухвалентного иона железа к трехвалентному не может произойти, так как они не в состоянии сблизиться на необходимое расстояние из-за взаимного отталкивания в силу наличия больших зарядов. Поэтому передача электронов водородного радикала осуществляется с помощью цепочки молекул воды. Ионы железа в растворе окружены молекулами воды и гидратированы. Одна из молекул воды координационно связана с ионом двухвалентного железа. Меченый ион трехвалентного железа (Fe^{3+}) обладает сильными кислотными свойствами и образует координационную связь с ОН-группой. Электрон от Fe^{2+} далее переходит на валентную орбиту кислорода воды, которая отдает свободный водородный радикал соседней молекуле воды. Эта молекула воды, присоединив атом водорода и электрон, передает далее свободный водородный радикал, пока он не достигает иона трехвалентного железа, который координационно связан с ОН-группой.

Когда свободный водородный радикал соединяется с OH^- , один из электронов атома кислорода переходит к трехвалентному иону, превращая его в двухвалентное железо. Таким образом, процесс сводится к изменению степени окисленности иона железа. При этом транспорт электрона осуществляется с переносом свободного водородного радикала по цепи, состоящей из молекул воды. Перенос двух электронов, которые имеют гидридный ион (H^-), осуществляется аналогичным механизмом также с помощью воды.

Из рассмотренных примеров проводимости энергии и передачи заряда на расстояние становится понятной высокая подвижность иона H^+ в твердом состоянии воды по сравнению с жидким. Это объясняется тем, что в жидком состоянии образуются только микрокристаллы, которые легко нарушаются и изменяются из-за слабости водородных связей. В твердом состоянии воды существует упорядоченная структура на всем протяжении кристалла, что обуславливает высокую подвижность ионов водорода.

Белки упорядочивают молекулы воды, приближая их структуру к кристаллической решетке льда. В такой воде обеспечивается движение протона с большой скоростью. Упорядочивающее действие на воду оказывают растворы ДНК. Слой ориентированной воды достигает 1000 Å от поверхности макромолекулы ДНК. Структурирующая способность макромолекулы ДНК зависит от конфигурации атомов, способных образовывать водородные связи. Чем больше эта конфигурация подходит к решетке льда, тем выше упорядочивающая способность данной поверхности. Форма спирали ДНК очень хорошо укладывается в кристаллическую решетку льда. Но если в раствор ДНК добавить электролит, то эта спираль сжимается и плохо подходит к структуре льда, и оболочка упорядоченной воды вокруг такой молекулы ДНК уменьшается. Вода в гидратной оболочке иона имеет нарушенную структуру, так как электростатическое поле иона разрывает водородные связи и как бы плавит кристаллическую решетку воды.

Таким образом, мы можем считать, что в биологических системах если не вся, то наиболее важная часть воды, находящейся в соприкосновении с макромолекулами, поверхностями, на границе раздела различных фаз и в зависимости от ряда других условий переходит в упорядоченное кристаллическое состояние. В этом состоянии, как было показано, вода выполняет много важных биохимических и биофизических функций. Поэтому биологические системы упрощенно можно представить как комплексы, состоящие из различных макромолекул и воды и представляющие собой единую упорядоченную структуру с регулярным электромагнитным полем.

Список литературы

- К л о т ц И. Вода.—В сб.: Горизонты биохимии. М., «Мир», 1964, с. 399—419.
П о л и н г Л. Вода.— В. сб.: Общая химия. М., «Мир», 1964, с. 258—271.
П р и в а л о в П. Л. Биофизика, т. 3, вып. 6, 1958.

- Слейчер Р. Водный режим растений. М., «Мир», 1970.
 Bernal J. D. Symp. Soc. exp. Biol., 19, 17, 1965.
 Buswell A. M., Rodebush W. H. Water, Scientific American off-prints, San Francisco, W. H. Freeman and Co, 1956.
 Edsall J. T., Wyman J. Water and its Biological Significance, Ch. 2, In Biophysical Chemistry. New York, Academic Press, Inc., 1958.
 Klotz I. M. Protein hydration and behaviour. Science, N. Y., 128, 815, 1958.
 Frank H. S. Proc. Roy. Soc. A 247, 481, 1958.
 Frank H. S., Wen W. Discuss. Faraday Soc., 24, 133, 1957.
 Nemethy G., Scheraga H. A. J. Chem. Phys., 36, 3382, 1962; 36, 3401, 1962.
 Pauling L. The Nature of the Chemical Bond., 3rd ed., Ithaca, N. Y. Cornell University Press, 1960.
 Stackelberg M. V., Müller H. R. Z. Elektrochem., 58, 25, 1954.

Глава III

ТЕРМОДИНАМИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Применимы ли к живым системам законы термодинамики, в частности второй закон, из которого следует, что всякая изолированная система спонтанно стремится к состоянию с меньшей степенью организации, к большей энтропии. Этот вопрос вытекает из того, что живые системы характеризуются высоким уровнем организации в пространстве и во времени.

Происхождение первых биомолекул абиогенным путем находит экспериментальное подтверждение. С. Миллер в 1953 г. имитировал состав первичной атмосферы. Он создал газовую смесь из метана, аммиака, водяных паров, водорода и при 80°С в замкнутом сосуде подверг ее воздействию электрическими разрядами в течение недели. В результате в газовой фазе были обнаружены окись и двуокись углерода, азот, а в конденсате — аминокислоты, органические кислоты, мочевины и другие соединения, из которых могли возникнуть первые биологические системы. Например, для возникновения первой клетки достаточно присутствие всего 30 молекул: 20 аминокислот, 5 азотистых оснований, двух различных моносахаридов, одной жирной кислоты, глицерина и холина.

Живая материя, возникнув в примитивном виде, прошла длительную и сложную эволюцию, в результате которой стала высокоорганизованной, более сложной и приобрела определенные черты отличия от физической вселенной.

Поэтому если исходить из того, что энтропия изолированных физических систем стремится к возрастанию, то, на первый взгляд, может показаться, что живые организмы не подчиняются, существуют вопреки законам термодинамики. Например, физические системы, состоящие из компонентов с различной температурой или различной концентрацией, стремятся к равновесию, выравниванию: степень их упорядоченности, организованности, сложности убывает, т. е. энтропия этих систем возрастает. А степень организации, сложности, упорядоченности живых организмов в силу

их воспроизведения и присущего им обмена веществ возрастает как в филогенетическом, так и онтогенетическом развитии. Чтобы разобраться в этом кажущемся противоречии нужно вспомнить, что законы классической термодинамики сформулированы для физических систем, изолированных от внешнего мира, тогда как в реальной системе энтропия может возрастать или уменьшаться. Любое уменьшение энтропии требует участия внешних сил. При этом энтропия внешней системы, взаимодействующая с этой системой, должна возрастать. Именно живые системы обмениваются с внешней средой и веществом и энергией, т. е. они являются не изолированными, открытыми системами.

Рассмотрим приложимость законов термодинамики к биологическим системам.

1. Первый закон термодинамики формулируется так: энергия изолированной системы есть величина постоянная; она не создается заново и не исчезает бесследно. При изменении состояния системы одна форма энергии может строго эквивалентно переходить в другую форму. Например, $1 \text{ кВт} \cdot \text{ч}$ электроэнергии эквивалентен $4,18 \cdot 10^3 \text{ Дж}$.

Допустим, что система переходит из состояния A в состояние B . При этом поглощается определенное количество тепла (Q_1) и производится работа (W_1). Если переход из состояния A в B был осуществлен иным способом, то величины тепла и работы будут иметь иные значения — Q_2 и W_2 и т. д. Оказывается, что независимо от способов перехода системы из состояния A в состояние B постоянной величиной будет разность между количеством затраченного тепла и произведенной работы: $Q_1 - W_1 = Q_2 - W_2 = Q_3 - W_3 \dots \rightarrow \Delta E$. Значение ΔE показывает изменение внутренней энергии E данной системы при переходе ее из состояния A в состояние B . Если система получила $41,8 \cdot 10^3 \text{ Дж}$, а против внешних сил она совершила работу в $4,18 \cdot 10^3 \text{ Дж}$, то внутренняя энергия системы увеличилась на $37,6 \cdot 10^3 \text{ Дж}$. Если внутренняя энергия системы в положении A была E_A , а в положении B — E_B , то $\Delta E = E_B - E_A$ или $\Delta E = Q_1 - W_1 = Q_2 - W_2, \dots = Q - W$.

Итак, $\Delta E = Q - W$. В этом выражении значение ΔE определяется исключительно начальным и конечным состояниями внутренней энергии, т. е. E_B и E_A , тогда как величины Q и W для каждого случая будут иметь разные значения в зависимости от пути, по которому протекает переход системы из одного состояния в другое. Примером может служить реакция восстановления пировиноградной кислоты в молочную, которая протекает с участием лактикодегидрогеназы: $\text{CH}_3\text{COCOON} + 2\text{H} \xrightarrow{\text{лактикодегидрогеназа}} \times \times \text{CH}_3\text{CHONCOON}$. В идеальных условиях в этой реакции Q равно $2,7 \cdot 10^3 \text{ Дж}$, а $W = 47,7 \cdot 10^3 \text{ Дж}$. Если реакция будет протекать в других, отличных от идеальных, условиях, то Q будет равняться $8,6 \cdot 10^3 \text{ Дж}$, а $W = 41,8 \cdot 10^3 \text{ Дж}$. Когда же реакция будет проводиться в изолированном сосуде, то Q будет равно $90,4 \times 10^3 \text{ Дж}$, а $W = 0$. Как видно, ΔE является одинаковым во всех

трех случаях независимо от условий протекания этой реакции. Если превращение системы происходит по замкнутому пути и она возвращается в свое исходное состояние, то ее внутренняя энергия не изменяется, так как она определяется только конечным состоянием, которое остается таким же, как и исходное.

Таким образом, первый закон термодинамики показывает зависимость между поглощенной и выделенной теплотами, произведенной или полученной работой и внутренней энергией системы при переходе ее из одного состояния в другое. При этом внутренняя энергия зависит только от состояния системы в данный момент и может быть определена по тепловому эффекту и величине произведенной работы. Следовательно, понятие о внутренней энергии системы не дает возможности предсказать, будет ли тот или иной процесс протекать, в каком направлении и каковы будут превращения в системе.

Для понимания явлений жизни на молекулярном уровне как раз очень важной является возможность предсказания спонтанности и направления той или иной реакции. Можно было бы предполагать, что реакция произвольно будет протекать только тогда, когда величина внутренней энергии системы уменьшится и ΔE будет меньше нуля. Примером может служить спонтанный переход аденозинтрифосфата (АТФ) в аденозиндифосфат (АДФ). Однако в ряде случаев спонтанное течение процесса наблюдается и тогда, когда внутренняя энергия системы в конечном состоянии будет выше, чем в начальном, и ΔE будет больше нуля. Например, при переходе лед $\rightarrow$ вода ΔE увеличивается на несколько тысяч джоулей. Но течение спонтанных реакций с увеличением энергии не противоречит первому закону термодинамики, так как в ходе превращения такие системы поглощают тепло из окружающей среды, т. е. эти системы являются открытыми. Таким образом, значение ΔE не может быть критерием определения возможности произвольного течения реакции.

2. Второй закон термодинамики. С помощью этого закона определяется та часть энергии системы, которая может производить работу. Поэтому можно предсказать, будет ли данная реакция протекать спонтанно, без затраты энергии извне. Исходя из второго закона термодинамики способность изолированных систем совершать работу падает, т. е. происходит рассеивание энергии системы. Критерием определения произвольного течения реакции может служить функция от величины Q . Но для этого необходимо показать некоторую аналогию между энергией в виде работы и энергией в виде тепла.

Известно, что совершенная работа может быть определена как произведение фактора интенсивности на фактор емкости. Например, при работе, совершаемой для подъема тела, фактором интенсивности является высота подъема, фактором емкости — масса тела. При работе электрических сил фактором интенсивности будет напряжение, а фактором емкости — заряд и т. д. В случае тепловой энергии

фактором интенсивности будет температура T , а фактором емкости — $\frac{Q}{T}$ (где Q — количество теплоты). Тогда тепловая энергия $Q = T \times \frac{Q}{T}$.

При обратимом переходе системы от состояния A к состоянию B произойдет изменение емкости $\frac{Q}{T}$. Выразим эти изменения через $\Delta \frac{Q}{T}$. При этом будут также совершаться изменения и в окружающей среде, которые выразятся через $\Delta \frac{Q_1}{T_1}$. Если $\Delta \frac{Q}{T} + \Delta \frac{Q_1}{T_1} > 0$, то превращение данной системы будет спонтанным. В случае равенства этой суммы нулю система будет находиться в равновесии.

Для функции $\frac{Q}{T}$ принят термин *энтропия* (S); $\Delta \frac{Q}{T}$ называют *изменением энтропии*. Следовательно, энтропия является фактором емкости. Общая энтропия термодинамической системы будет равняться сумме энтропий ее частей. Энтропия является функцией состояния системы и поэтому, как и внутренняя энергия, не зависит от пути и способа перехода системы. Если сумму $\Delta \frac{Q}{T} + \Delta \frac{Q_1}{T_1}$ записать в виде $\Sigma \Delta \frac{Q}{T}$, тогда $\Sigma \Delta \frac{Q}{T} = \Sigma \Delta S$. Следовательно, превращение системы будет спонтанным при $\Sigma \Delta S > 0$, а в состоянии равновесия система будет находиться при $\Sigma \Delta S = 0$. Чем меньше способность системы к спонтанным изменениям, тем больше становится ее энтропия. Поэтому энтропию можно рассматривать как критерий истощения, как степень неупорядоченности системы, как стремление системы к более вероятному состоянию, которым является состояние равновесия. Отсюда любая изолированная система за определенный срок достигнет состояния равновесия, которое характеризуется более высокой величиной энтропии. И в этом состоянии она будет находиться большую часть своего времени.

Таким образом, функция $\frac{Q}{T}$ как показатель изменения энтропии может служить критерием направления в превращении системы самопроизвольного, спонтанного течения процесса. Но для определения значения $\Sigma \Delta S$ необходимо знать не только эту величину, но и $\Delta \frac{Q_1}{T_1}$ для среды, которая окружает эту систему. Последнее всегда связано с трудностями. Поэтому желательно было бы найти такую термодинамическую величину, которая относилась бы только к превращениям самой системы и позволила бы определить спонтанность и направление ее изменений. Это особенно важно для биохимических систем, процессов, когда не всегда оказывается доступным определение изменений в окружающей среде.

При этом определение термодинамической величины как критерия биохимических реакций облегчается тем, что последние протекают обычно при сравнительно постоянных условиях давления и

температуры. Оказывается, спонтанность биохимических реакций можно определить по величине свободной энергии, т. е. по химическому потенциалу. *Свободная энергия* является движущей силой биохимических реакций; это та часть энергии системы при переходе ее к равновесию, которая способна производить работу. Чем больше отрицательное значение свободной энергии, тем больше движущая сила реакции, тем больше работы может быть выполнено в системе.

Если определяют изменение свободной энергии в условиях постоянной температуры и давления, то оно может быть выражено таким образом: $\Delta F = (\Delta E + p\Delta V) - T\Delta S$, где ΔF — изменение свободной энергии; ΔE — изменение внутренней энергии; ΔS — изменение энтропии; T — абсолютная температура; p — давление; ΔV — изменение объема при превращении данной системы (исходя из того, что объем и давление в биохимических реакциях мало изменяется, этими значениями можно пренебречь).

В классической термодинамике сумму $(\Delta E + p\Delta V)$ обозначают ΔH и называют *энтальпией*. Поскольку в формуле определения свободной энергии величина $p\Delta V$ незначительна, то в большинстве случаев ΔH и ΔE являются близкими по значению величинами. Тогда свободная энергия ΔF может быть определена с помощью формулы: $\Delta F = \Delta E - T\Delta S$ или $\Delta F = \Delta H - T\Delta S$. Иногда свободная энергия обозначается также через G .

Таким образом, чтобы предсказать возможность спонтанного течения биохимического процесса, необходимо определить изменение знака и величины свободной энергии по формуле $\Delta F \leq \Delta E - T\Delta S$. Если значение ΔF будет отрицательным, т. е. при переходе системы из одного состояния в другое количество свободной энергии будет уменьшаться, и система сможет совершить работу, то такая реакция будет протекать спонтанно. Если значение ΔF будет положительным, т. е. при переходе системы из одного состояния в другое количество свободной энергии будет увеличиваться, и система может совершить работу только за счет энергии, поступившей извне, то такая реакция не может протекать спонтанно. Если же изменение свободной энергии системы равно нулю, это означает, что вещества, принимающие участие в реакции, присутствуют в концентрациях, при которых реакция находится в состоянии равновесия.

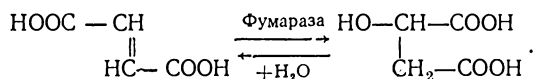
Величина ΔF изменяется в зависимости от условий. Например, при образовании аланилглицина из аланина и глицина, когда все компоненты реакции представлены в концентрации 1 моль, $\Delta F^\circ = 17,2 \cdot 10^3$ Дж/моль, а если в концентрации 0,1 моль — $\Delta F = 11,3 \cdot 10^3$ Дж/моль; в том случае, если аланин и глицин находятся в концентрации 0,1 моль, а аланилглицин — в концентрации $1,25 \cdot 10^{-5}$ моль, $\Delta F = 0$. Условия, когда все компоненты реакции участвуют в концентрации 1 моль в чистом растворителе, называются *стандартными условиями*. Получив значения свободной энергии для стандартных условий, легко определить его и для других концентраций компонентов. Стандартные значения ΔF° обычно приводятся в справочных пособиях.

Как видно, свободная энергия является функцией двух величин: внутренней ΔE , определяемой из первого закона термодинамики, и энтропии ΔS , определяемой на основе второго закона термодинамики. Свободная энергия является очень важной термодинамической функцией и с помощью ее мы можем интерпретировать и определять ряд важных биохимических процессов: возможность спонтанного течения реакции; энергетическую сопряженность различных процессов и реакций; потенциалы переноса различных групп; химические связи, богатые энергией; новые соотношения, характеризующие физико-химические свойства системы, и т. д.

Однако определение свободной энергии по формуле $\Delta F = \Delta E - T\Delta S$ является все же достаточно сложным, так как при этом необходимо предварительно определить величину внутренней энергии и изменение энтропии. Известно, что свободная энергия зависит от концентрации веществ, участвующих в биохимическом процессе. Поэтому изменение стандартной свободной энергии можно определить с помощью формулы, в которую вводится значение константы равновесия. Если реагенты участвуют в реакции в низких концентрациях, то константа равновесия K определяется частным от деления произведения концентраций продуктов реакции на произведение концентраций исходных веществ.

Например, в реакции $A + B \rightleftharpoons C + D$ константа равновесия будет равна: $K = \frac{[C][D]}{[A][B]}$. С помощью математических расчетов можно определить, что $\Delta F^\circ = -RT \ln K$, где R — газовая постоянная (8,31434 Дж/(моль · К)); K — константа равновесия; T — абсолютная температура в градусах Кельвина (273 + число градусов по Цельсию).

Рассмотрим определение ΔF° для некоторых биохимических реакций. Например, реакция превращения фумаровой кислоты в яблочную протекает при 25° С:

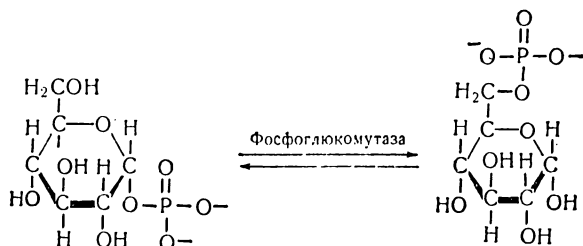


Константа равновесия этой реакции 4,42, логарифм этой величины — 1,486, температура — $273^\circ + 25 = 298^\circ$. Отсюда $\Delta F^\circ = -(8,314) \times (1,486) \cdot (298^\circ) = -3,7 \cdot 10^3$ Дж/моль.

Таким образом, стандартное изменение свободной энергии при превращении фумаровой кислоты в яблочную равно отрицательной величине — $(-3,7 \cdot 10^3$ Дж/моль), т. е. количество свободной энергии в этой системе уменьшается и она может произвести определенную работу. Поэтому процесс протекает спонтанно слева направо. Реакция справа налево при стандартных концентрациях реагентов протекать не может, так как ΔF° будет равно $+3 \cdot 10^3$ Дж/моль. А при других концентрациях реагирующих веществ эта реакция будет протекать также и справа налево. Это осуществимо в случае, когда отношение $\frac{\text{фумаровая кислота}}{\text{яблочная кислота}} < \frac{1}{K}$, где K — кон-

станта равновесия в реакции превращения фумаровой кислоты в яблочную. Следовательно, реакция протекает и при положительном значении ΔF° потому, что ΔF имеет отрицательное значение.

Спонтанно протекает также реакция переноса остатка фосфорной кислоты из первого в шестое положение в молекуле глюкозы с помощью фосфоглюкомутазы:



Константа равновесия этой реакции при 25°C и $\text{pH} = 7$ равняется 17. Отсюда $\Delta F^\circ = -(8,314) \cdot (298) \cdot (\ln 17) = -7,1 \cdot 10^3$ Дж/моль. Если в реакции будут участвовать компоненты в концентрации 1 моль в чистом растворителе, то реакция трансфосфорилирования будет протекать спонтанно, так как в результате ее течения выделяется значительное количество энергии. Необходимо обратить внимание на то, что участие фермента или катализатора не изменяет константу равновесия. Роль ферментов, катализаторов состоит только в увеличении скорости реакции и уменьшении времени, в течение которого наступает равновесие системы. Но если течение реакции термодинамически невозможно при положительном значении свободной энергии, то реакция не будет протекать и в присутствии фермента. Константа равновесия может меняться в зависимости от концентрации реагентов, температуры, при которой протекает реакция. Отсюда может изменяться и значение свободной энергии. Это наглядно можно показать на термодинамике денатурации белков, в частности химотрипсина.

Если исходить из того, что денатурация обратима, то константа равновесия будет равна количеству денатурированного химотрипсина (D), деленному на количество нативного химотрипсина (N): $K = \frac{[D]}{[N]}$. За ходом процесса денатурации химотрипсина в зависимости от температуры можно следить по изменению оптической плотности этого белка в области 293 нм. В стандартных условиях денатурация проходит таким образом. При температуре 43°C и $\text{pH} = 1,7$ значение ΔF° равно $-4,2 \cdot 10^3$ Дж/моль. Денатурация протекает спонтанно. Если температуру понизить до 34°C и оставить то же значение pH , то ΔF° будет положительной величиной ($+4,2 \cdot 10^3$ Дж/моль). При этом в стандартных условиях реакция будет протекать в обратном направлении, т. е. будет идти процесс ренатурации химотрипсина. При температуре 38°C

и $pH = 1,7$ в стандартных концентрациях $\Delta F^\circ = 0$; система находится в равновесии.

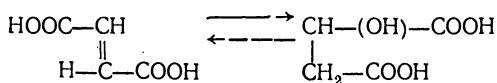
Свободная энергия может быть также определена с помощью окислительно-восстановительных потенциалов по формуле: $\Delta F^\circ = -n \cdot F e^\circ$, где n — число электронов, которое переносится в реакции; F — число Фарадея ($9,648452 \cdot 10^4$ К/моль); e° — величина окислительно-восстановительного потенциала при стандартных условиях.

По этой формуле можно определить свободную энергию восстановления цитохрома f с помощью цитохрома c и предсказать, возможно ли спонтанное течение этого процесса. Величина окислительно-восстановительного потенциала этой реакции $e = 0,11$ В. Отсюда $\Delta F = -1 \cdot (23061) \cdot (0,11) = -10,6 \cdot 10^3$ Дж/моль. Как видно, восстановление цитохрома f может идти спонтанно с помощью цитохрома c .

По изменению свободной энергии мы можем определить *экзергоническую* и *эндергоническую* реакции. Если свободная энергия отрицательна, т. е. реакция сопровождается выделением энергии, которая совершает химическую работу, то это — *экзергоническая* реакция и она может проходить спонтанно. В случае, когда свободная энергия положительна, т. е. реакция сопровождается поглощением тепла и может протекать только при затрате энергии извне, то это — реакция *эндергоническая* и спонтанно протекать не может. Но если в системе осуществляется не одна реакция, то эндергоническая реакция может протекать за счет той энергии, которая выделяется во второй, экзергонической реакции. В этом случае будет действовать принцип сопряжения, который очень широко распространен и имеет исключительно важное значение в осуществлении многих биохимических процессов и реакций, особенно связанных с образованием сложных макромолекул из простых веществ и мономеров.

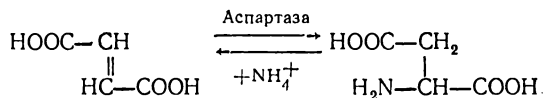
При сопряжении продукт первой реакции является субстратом второй реакции. Таким образом, сопряжение двух реакций осуществляется с помощью общего промежуточного продукта. Подавляющее большинство метаболических реакций осуществляется таким путем.

Для того чтобы протекала эндергоническая реакция, необходимо ее как бы «толкнуть» с помощью свободной энергии второй сопряженной с ней резко экзергонической реакции. Примером может служить обратное течение реакции превращения фумаровой кислоты в яблочную:

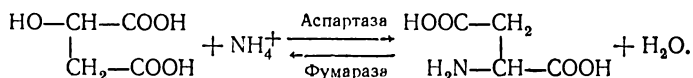


Эта реакция, как уже было сказано выше, протекает спонтанно слева направо, так как свободная энергия ее ΔF° равна $-3,7 \cdot 10^3$ Дж/моль. Но справа налево эта реакция протекать не может, так как ΔF° равна $+3 \cdot 10^3$ Дж/моль. Чтобы реакция шла справа налево,

необходимо затратить энергию извне за счет экзергонической реакции. Такой реакцией может служить образование аспарагиновой кислоты при аминировании фумаровой кислоты:



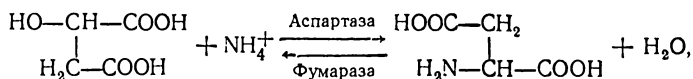
Стандартное изменение свободной энергии ΔF° для этой реакции равно $-15,5 \cdot 10^3$ Дж/моль. Если создать систему со всеми реагентами этих двух реакций, тогда в результате дегидратации яблочной кислоты будет образовываться фумаровая кислота. В результате аминирования фумаровой кислоты будет образовываться аспарагиновая кислота:



Стандартное изменение свободной энергии этой реакции имеет отрицательное значение, так как ΔF° образования фумаровой кислоты из яблочной равно $+3 \cdot 10^3$ Дж/моль, аминирования фумаровой кислоты $-15,5 \cdot 10^3$ Дж/моль. А сумма ΔF° этих двух реакций составит $(+3 \cdot 10^3) + (-15,5 \cdot 10^3) = -12,5 \cdot 10^3$ Дж/моль.

Таким образом, мы имеем пример, когда действует принцип сопряжения. В результате эндергоническая реакция протекает за счет стандартного изменения свободной энергии экзергонической реакции. В данном случае в присутствии фумаразы, яблочной и фумаровой кислот в концентрации 1 моль сначала начинается реакция аминирования фумаровой кислоты, так как при этом ΔF° имеет отрицательную величину. Поэтому концентрация фумаровой кислоты в реакционной смеси начнет понижаться. В результате соотношение между концентрациями яблочной и фумаровой кислот начнет изменяться. В какой-то момент это соотношение концентраций станет удовлетворять требованию: $\frac{\text{HOOC}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}}{\text{HOOC}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{COOH}} < \frac{1}{K}$, где

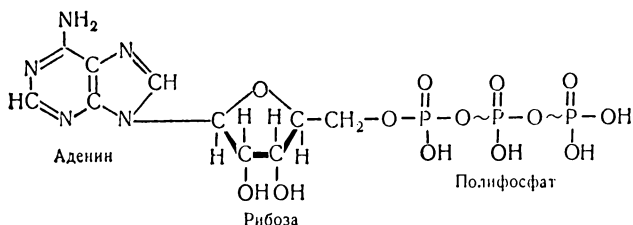
$\frac{1}{K}$ — константа равновесия реакции превращения яблочной кислоты в фумаровую. С этого момента ΔF реакции станет отрицательной, начнется процесс дегидратации яблочной кислоты и образование фумаровой кислоты. Эта реакция остановится, когда в ней наступит равновесие



т. е. когда константа равновесия K (частное от деления концентрации аспарагиновой кислоты на концентрацию яблочной кислоты) будет равняться 132. Таким образом, в рассмотренной нами системе реакций общим сопрягающим звеном является фумаровая кислота. С помощью этого звена оказалась сопряженной экзергони-

ческая реакция с эндергонической, что обеспечило прохождение последней.

Принцип сопряжения имеет исключительно большое значение в метаболизме живых организмов. При этом в роли факторов сопряжения выступает небольшое число универсальных соединений. К ним относятся трифосфатнуклеотиды (чаще всего аденозинтрифосфорная кислота, ацетилимидазол, фосфоенолпируват и др.). Все эти соединения имеют в своем составе так называемые «макроэргические связи», т. е. связи, богатые энергией. Необходимо остановиться на смысле, который вкладывается в выражение «макроэргическая связь». Рассмотрим это на примере аденозинтрифосфата (АТФ), наиболее характерного соединения с макроэргической связью, которую принято обозначать знаком $\sim$.



Как видно из формулы, АТФ содержит две макроэргические связи. Два последних остатка фосфорной кислоты соединены такой связью, которая несет большое количество энергии. Благодаря этой энергии последний концевой остаток фосфорной кислоты стремится отщепиться от молекулы АТФ. При этом разрывается макроэргическая связь и выделяется, как принято говорить, заключенная в ней энергия. Фосфор концевой остатка фосфорной кислоты соединен с кислородом второго остатка этой кислоты с помощью ковалентной связи. Чтобы разорвать эту связь, необходимо в газовой фазе приложить энергию, равную $210 \cdot 10^3$ — $420 \cdot 10^3$ Дж/моль. Однако остатки фосфорной кислоты в АТФ соединены макроэргическими связями, которые, как принято считать, содержат не более $42 \cdot 10^3$ Дж/моль. То же самое можно сказать о различии между энергией химической связи между кислородом глюкозы и фосфором в молекуле глюкозо-6-фосфата и потенциалом переноса остатка фосфорной кислоты. Энергия разрыва связи составляет, так же как в случае АТФ, около $420 \cdot 10^3$ Дж/моль, а энергия потенциала переноса — всего только $12,5 \cdot 10^3$ Дж/моль.

Дело в том, что разрыв химической связи должен осуществляться в газовой фазе. Но в физиологических условиях всегда присутствуют вода и другие соединения, и речь идет не о разрыве химической связи, а о переносе какой-то группы с одного соединения на другое. Причем значение потенциала переноса будет зависеть от характера донора группы и ее акцептора. Поэтому здесь имеет место изменение химического потенциала свободной энергии (ΔF), а не энергии разрыва химической связи. Для рассмотрения биологиче-

ских явлений на молекулярном уровне имеет большое значение определение потенциалов переноса групп (макроэргическая связь), переноса протона (кислотность среды), переноса электрона (окислительно-восстановительный потенциал). Во всех этих случаях потенциалы переноса выражаются величиной свободной энергии.

В переносе протона донором является кислота. Она передает протон какому-то акцептору, чаще воде: $\text{AH} + \text{H}_2\text{O} = \text{A}^- + \text{H}_3\text{O}^+$. Потенциал переноса протона в данном случае будет выражаться константой диссоциации кислоты по формуле $pK = \frac{\Delta F^\circ}{2,303 RT}$, где ΔF° — стандартное изменение свободной энергии; R — газовая постоянная ($8,31434 \text{ Дж/моль} \cdot \text{К}$); T — абсолютная температура в градусах Кельвина. Если же удалять протон в газовой фазе, например, с NH_4^+ , то для этого необходимо затратить энергию около $1250 \cdot 10^3 \text{ Дж/моль}$. Исходя из приведенного уравнения при большом значении pK ΔF° будет иметь положительную величину. Это значит, что отрыв протона будет осуществляться медленно и кислота будет слабой. При малом значении pK кислота будет сильной. Таким образом, потенциал переноса протона пропорционален ΔF° .

При переносе электрона в окислительно-восстановительных реакциях изменение энергии также составляет несколько тысяч джоулей и также зависит от величины свободной энергии. При этом должен присутствовать обязательно акцептор электрона: $\text{A} + \text{H}^+ = \text{A}^+ + 1/2 \text{H}_2$. Если же переносить электрон в изолированной среде, то необходимо затратить энергии во много раз больше. Например, для переноса электрона с Fe^{2+} необходимо затратить энергии около $420 \cdot 10^3 \text{ Дж/моль}$.

Потенциал переноса электрона определяется величиной окислительно-восстановительного потенциала ϵ° по формуле $\epsilon^\circ = \frac{\Delta F^\circ}{nF}$, где ΔF° — стандартное изменение свободной энергии; n — число электронов; F — число Фарадея ($9,648452 \cdot 10^4 \text{ К/моль}$). Если ϵ° будет больше нуля, а ΔF° меньше нуля, то передача электронов будет идти спонтанно.

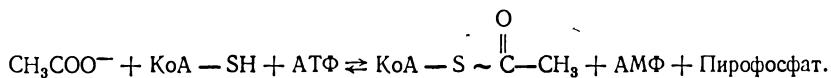
Известен ряд соединений, у которых стандартная энергия гидролиза фосфатной связи различна:

Фосфоенолпируват — $62 \cdot 10^3 \text{ Дж}$	АТФ — $30 \cdot 10^3 \text{ Дж}$
1,3-Дифосфоглицерат — $49 \cdot 10^3 \text{ Дж}$	Г-1-фосфат — $21 \cdot 10^3 \text{ Дж}$
Креатинфосфат — $43 \cdot 10^3 \text{ Дж}$	Ф-6-фосфат — $15 \cdot 10^3 \text{ Дж}$
Ацетилфосфат — $42 \cdot 10^3 \text{ Дж}$	Г-6-фосфат — $14 \cdot 10^3 \text{ Дж}$
Ацетил-S — КоА — $34 \cdot 10^3 \text{ Дж}$	Глицерол-1-фосфат —
Аргининфосфат — $32 \cdot 10^3 \text{ Дж}$	$9 \cdot 10^3 \text{ Дж}$

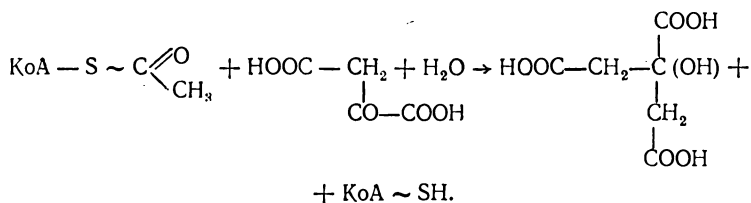
Все высокоэнергетические фосфаты могут выполнять роль факторов сопряжения и обуславливать прохождение эндоэргонических реакций. Но все эти и другие соединения, содержащие богатые энергией связи, образуются также в результате реакций сопряжения.

и сопрягающим фактором при этом выступает аденозинтрифосфат (АТФ). Таким образом, аденозинтрифосфорная кислота может рассматриваться как «разменная монета» в обмене энергии в биологических системах. АТФ занимает промежуточное положение по величине свободной энергии высоко- и низкоэнергетических фосфатов. Возможно, поэтому система АТФ — АДФ выполняет роль переносчика фосфатных групп от высокоэнергетических фосфатов к низкоэнергетическим фосфатам. В роли донора фосфата выступает активная АТФ в виде комплекса с Mg^{2+} — $MgATP^{2-}$.

Примером сопряжения эндергонической и экзергонической реакций может служить синтез ацетил-S — КоА. Но в этой реакции образуется ацилтиоловый эфир. Процесс этерификации требует большой затраты химической энергии, которая поставляется АТФ.

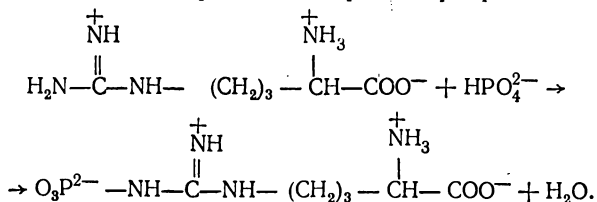


Ацетил-S — КоА обладает высоким потенциалом переноса ацетильной группы и на другие акцепторы, такие как щавелевоуксусная кислота, в результате чего осуществляется синтез лимонной кислоты.



Свободная энергия этой реакции $\Delta F^0 = -29 \cdot 10^3$ Дж/моль, и она протекает спонтанно. Таким образом, ацетил-КоА — SH получает энергию от АТФ и передает на другие реакции, требующие затраты энергии извне.

Вторым примером сопряжения эндергонической и экзергонической реакций является образование аргининфосфата:



Свободная энергия этой реакции $\Delta F^0 = +29 \cdot 10^3$ Дж/моль, и она может протекать только в сопряжении с экзергонической реакцией. Фактором сопряжения и здесь выступает аденозинтрифосфат: $ATP + H_2O \rightarrow ADP + HPO_4^{2-}$. В этом случае свободная энергия $\Delta F^0 = -33,5 \cdot 10^3$ Дж/моль, за счет которой и осуществляется фосфорилирование молекулы аргинина.

Таким образом, становится ясным, что аденозинтрифосфат в клетке является источником энергии, которая необходима для перевода многих метаболитов в реакционно-активное состояние. Особенно важно это в киназных реакциях, которые приводят к образованию более сложных соединений с затратой энергии извне.

Наиболее известными киназными реакциями являются образование аминоксил-тРНК в процессе синтеза белка; эфира $\text{CoA} - \text{SH}$ с жирной кислотой при синтезе и окислении жирных кислот и образовании глицеридов; уридиндифосфата глюкозы при биосинтезе гликогена; цитидиндифосфохолина при образовании фосфолипидов; фосфорибозилпирофосфата при синтезе нуклеотидов и многие другие.

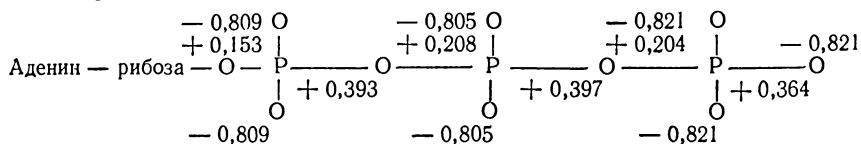
Все процессы метаболизма мы можем разделить на *катаболические*, т. е. процессы расщепления крупных и сложных молекул на простые, и *анаболические*, т. е. процессы образования сложных и крупных структур из простых соединений.

Если первые сопровождаются высвобождением энергии, то для осуществления вторых необходима затрата энергии, ее поступление извне. Это является основой фундаментального принципа энергетического сопряжения в биологических системах, т. е. свободная энергия катаболической реакции используется для осуществления реакции биосинтеза. При этом должно быть сохранено одно условие: свободная энергия реакции расщепления должна превышать свободную энергию реакции синтеза. Перенос энергии осуществляется через реагент, участвующий в обеих реакциях. Таким реагентом служит в подавляющем большинстве случаев фосфорильная группа аденозинтрифосфата. Причина заключается в том, что богатые энергией фосфаты относятся к сопряженным молекулам, в которых подвижные электроны фосфорильного остатка сопряжены с подвижными электронами других групп. В фосфатах, бедных энергией, фосфорильная группа связана с насыщенным атомом углерода. Высокий химический потенциал фосфатов, богатых энергией, объясняется следующим образом. Сумма энергий резонанса продуктов гидролиза богатых энергией фосфатов выше энергии резонанса этих фосфатов. Богатые энергией фосфаты имеют необычное распределение π -электронов. В их структуре представлена цепь атомов с положительным суммарным зарядом, которая окружена атомами с отрицательными суммарными зарядами.

АТФ несет на фосфатах отрицательные заряды, которые взаимно отталкиваются. После отщепления конечного фосфата (HPO_4^{2-}) образуется АДФ^{3-} . Оба эти продукта также несут отрицательные заряды, что препятствует их взаимодействию и образованию АТФ.

При гидролизе других эфиров образовавшиеся продукты обычно не несут одноименных зарядов. Кроме этого, АТФ является менее стабильной, чем продукты ее гидролиза. В молекуле АТФ электроны кислорода и фосфора конкурируют за энергетически более выгодные орбитали. Поэтому не все электроны занимают низ-

кие энергетические уровни. В продуктах реакции АДФ^{3-} и НРО_4^{2-} электроны занимают более низкие энергетические уровни. Поэтому продукты гидролиза АТФ за счет делокализации электронов являются более стабильными, и это обуславливает более отрицательное значение изменения свободной энергии. Распределение суммарных зарядов в молекуле АТФ имеет такой вид:



При таком распределении зарядов электростатическое отталкивание в молекуле АТФ намного выше, чем в продуктах ее гидролиза. У фосфатов, бедных энергией, не обнаружено такого суммарного распределения зарядов. Важно, что фосфаты, богатые энергией, являются термодинамически неустойчивыми и кинетически устойчивыми соединениями. Возможно, что кинетическая устойчивость молекулы АТФ обусловлена тем, что положительно заряженная цепь связана с защитным облаком отрицательных зарядов. Поэтому АТФ представляет собой электрофильный реагент.

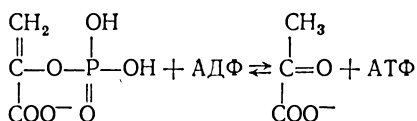
Высокая свободная энергия фосфатов обуславливается также кетенольной таутомерией продуктов гидролиза, например фосфоенолпирувата.

Необходимо отметить, что принцип сопряжения наиболее ярко проявляется в соединениях, богатых энергией, таких как нуклеиновые кислоты, белки, а также порфирины, каротиноиды и некоторые другие группы веществ. Можно сказать, что большинство метаболитов, которые являются динамической основой биологических систем, носителями жизни, представлено сопряженными молекулами. Это обусловлено особенностями делокализации электронов, что делает молекулы энергетически и термодинамически стабильными. Стабилизация, возможно, и определила место этих соединений в эволюции, в процессе отбора на молекулярном уровне. Например, порфирины обладают высокой степенью сопряжения, стабильности и поэтому рано появились в процессе развития органической формы движения материи и стали основными агентами в аккумуляции солнечной энергии, переносе кислорода и энергии в окислительно-восстановительных процессах и т. д. К числу подобных соединений можно отнести и аденин, который является главным компонентом нуклеиновых кислот, фосфатов, богатых энергией, многих коферментов и т. д.

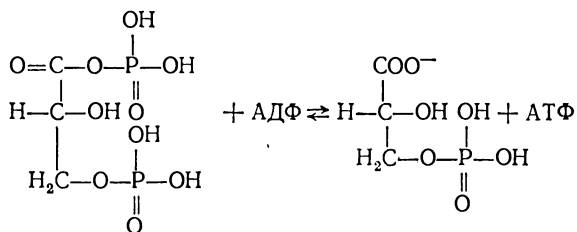
Таким образом, подавляющее большинство экзергонических реакций сопряжено с экзергоническими реакциями расщепления АТФ или других соединений, богатых энергией. Но биосинтез последних опять-таки осуществляется за счет свободной энергии гидролиза АТФ. Поэтому необходимо рассмотреть те экзергонические реакции, которые сопряжены с синтезом аденозинтрифосфорной

кислоты. По способности к образованию АТФ все живые организмы делятся на *автотрофные* и *гетеротрофные*. К гетеротрофным, как правило, относятся организмы, которые аденозинтрифосфат образуют только за счет энергии экзергонических реакций расщепления сложных органических соединений (углеводов, жиров, белков). К автотрофным относятся организмы, обладающие способностью образовывать аденозинтрифосфат, как правило, за счет энергии электромагнитных колебаний солнечного излучения.

Образование аденозинтрифосфорной кислоты может осуществляться несколькими путями: окислительным фосфорилированием, фосфорилированием, связанным с субстратом, циклическим и нециклическим фотосинтетическим фосфорилированием. Фосфорилирование, связанное с субстратом, протекает в основном в процессе гликолиза и брожения. Субстратное фосфорилирование осуществляется за счет переноса фосфорной группы с енолфосфопиривинатной и 1,3-дифосфоглицериновой кислот на аденозиндифосфорную кислоту:



ΔF^0 этой реакции равна $18 \cdot 10^3$ Дж.



ΔF^0 этой реакции равна $19 \cdot 10^3$ Дж.

Окислительное фосфорилирование протекает в несколько этапов. Сначала образуются в цикле трикарбоновых кислот восстановленные продукты в виде никотинамидадениндинуклеотида, никотинамидадениндинуклеотидфосфата. Затем осуществляется ряд реакций окисления этих соединений, в результате которых выделяется огромное количество свободной энергии: $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2 + 1/2 \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{НАДФ} + \text{H}_2\text{O}$. ΔF^0 этой реакции равна $-210 \cdot 10^3$ Дж. Эта энергия затем используется для осуществления экзергонической реакции образования АТФ.

Фотосинтетическое фосфорилирование осуществляется в хлоропластах листьев растений за счет энергии квантов солнечного излучения двумя путями: циклическим по уравнению $n \text{ АДФ} + n \text{ F}_n \xrightarrow{\text{свет}} n \text{ АТФ}$ и нециклическим: $2 \text{ АДФ} + 4 \text{ ферредоксина (окисленного)} + 2 \text{ F}_n + 4 \text{ H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{свет}} 2 \text{ АТФ} + 4 \text{ ферредоксина (восстановленного)} + \text{O}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O} + 4 \text{ H}^+$. Фотосинтез как процесс, противоположный

окислению, сопровождается заметным накоплением свободной энергии в виде фосфатов (АТФ) и восстановленных продуктов (ферредоксин, никотинамидадениндинуклеотидфосфат). Энергия, заключенная в этих соединениях, затем используется для восстановления углекислоты до углеводов и синтеза других групп веществ.

Таким образом, условием увеличения количества свободной энергии в биологических системах является образование доноров электронов (1,3-дифосфоглицериновая, янтарная и фосфоенолпириновинградная кислоты, восстановленные пиридиновые и флавиновые нуклеотиды, восстановленный ферредоксин). В процессе падения потенциала электрона при передаче его в электронно-транспортной цепи происходит образование высокоэнергетического продукта (АТФ), который выступает фактором сопряжения в эндогонических реакциях, протекающих с затратой энергии извне. При этом первичным источником энергии выступает фотон солнечного излучения. Он переводит в возбужденное состояние электрон, увеличивает его потенциальную энергию. Затем потенциал электрона постепенно падает, он переходит в основное состояние, а выделившаяся энергия используется на образование химических связей. Иначе говоря, энергия лабильных возбужденных электронов преобразуется в энергию стабильных химических связей.

Можно сказать, что динамическое состояние биологических систем поддерживается исключительно за счет энергии падения потенциала возбужденного электрона.

Теперь мы видим, что второй закон термодинамики вполне применим и к живым организмам. Из этого закона следует, как уже говорилось выше, что спонтанно не может протекать процесс, свободная энергия которого возрастает. Но этот процесс будет протекать, если соединить его с другим, свободная энергия которого имеет отрицательное значение. Создается единая система из двух и более процессов. Эта система будет поддерживаться за счет притока свободной энергии извне. Но если приток энергии извне прекратится, то энтропия резко возрастет, наступит дезорганизация и смерть биологической системы.

Поэтому соответствующий уровень организации биологической системы сохраняется за счет непрерывного притока свободной энергии извне. Такая система является открытой, не равновесной, так как ее стационарное состояние, кажущаяся стабильность поддерживаются притоком энергии. При этом скорость поступления энергии и веществ из внешней среды уравнивается скоростью выделения энергии и веществ из биологической системы. Живая клетка изотермична и не способна использовать тепло в качестве источника энергии, т. к. работа при постоянном давлении может совершаться только за счет перехода тепла из зоны с высокой температурой в зону с низкой температурой. Она из внешней среды получает химическую энергию, которая используется для выполнения различной работы: процессы биосинтеза, передвижение веществ, механическая работа и т. д.

Второй закон термодинамики нельзя непосредственно применить к неравновесным системам. Но если рассматривать биологические системы как неравновесные, то в принципе законы термодинамики сохраняют свое значение применительно и к живым организмам.

Рассмотрим приложимость второго закона термодинамики в эволюционном аспекте. Постепенное усложнение организации биологических систем, организмов сопровождалось увеличением используемой энергии, поступающей из окружающей среды. Но и здесь нет нарушения второго начала термодинамики, так как вся органическая материя представляет собой открытую систему, которая поддерживается непрерывным притоком свободной энергии, поступающей от солнца.

Список литературы

- Базаров И. П. Термодинамика. М., Физматгиз, 1961.
Волькенштейн М. В. Молекулы и жизнь. М., «Наука», 1965.
Гроот С. Р. Термодинамика необратимых процессов. М., Изд-во иностр. лит., 1956.
Клотц И. М. Энергетика биохимических реакций. М., «Мир», 1970.
Кребс Г., Корнберг Г. Превращение энергии в живых системах. М., Изд-во иностр. лит., 1959.
Пасынский А. Г. Успехи современной биологии, 43, 3, 263, 1957.
Пасынский А. Г. Биофизическая химия. М., «Высшая школа», 1963.
Пригожин И. Введение в термодинамику необратимых процессов. М., Изд-во иностр. лит., 1960.
Сент-Дьердьи А. Биоэлектроника. М., «Мир», 1971.
Baker J. J., Allen G. E. Matter, Energy and Life, Palo Alto, Addison-Wesley Pub. Co.; Inc. 1965.
Crick F. H. C. Of Molecules and Men., Washing. Paperbacks, Seattle and London, University of Washing. Press., 1967.
Klotz I. M. Some Principles of Energetic in Biochemical Reactions, Academic Press, New York, 1957.
Klotz I. M. Chemical Thermodynamics, Benjamin, New York, 1964.
Klotz I. M. Energy changes in biochemical reactions. Academic Press, New York, London, 1967.
Lehninger A. L. Bioenergetics, W. A. Benjamin Inc., New York, 1965.

ЧАСТЬ ВТОРАЯ

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ЖИЗНИ

Клетка содержит громадное число различных молекул. В зависимости от выполняемой роли молекулы находятся в клетке в различных количествах. Например, молекулы, которые служат источником строительного материала или топлива, представлены в большем количестве. Молекулы, несущие регуляторную функцию, выполняющие функцию источников информации или выступающие как переносчики групп и энергии, — в значительно меньшем количестве. В зависимости от выполняемой роли молекулы также различаются по продолжительности существования. Например, молекулы белков существуют дольше, чем молекулы углеводов, которые являются источником топлива, а некоторые виды молекул нуклеиновых кислот существуют столько же, сколько существует клетка.

Все молекулы, составляющие клетку живых организмов, по размеру можно условно разделить на малые и большие (*макромолекулы*). Последние могут быть информационные и неинформационные. Например, молекула нуклеиновых кислот состоит из четырех типов мононуклеотидов, которые расположены в определенной последовательности и несут соответствующую информацию. Информация также заложена в последовательности двадцати аминокислот полипептидной цепи. Такими свойствами не обладают другие макромолекулы (например, полисахариды).

Живая, в физиологически активном состоянии клетка состоит приблизительно на три четверти из воды. В состав остальной массы клетки входит около 70% белков и свободных аминокислот, 12% нуклеиновых кислот, 10% липидов, 5% сахаров и другие соединения. В клетке насчитываются десятки миллионов больших и малых молекул, которые участвуют в тысячах различных реакций и процессов, многие из которых являются многоступенчатыми. В живой клетке все это громадное число реакций и процессов в пространстве и времени взаимно друг с другом связано и представляет единую функционирующую биологическую систему. Чтобы понять молекулярные механизмы живой клетки, необходимо познакомиться с теми важнейшими химическими и физическими свойствами больших и малых молекул, которые определяют их роль в биологических структурах и выполняемую ими функцию.

Глава IV

МАЛЫЕ МОЛЕКУЛЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

К низкомолекулярным соединениям относятся углеводы, липиды, макроэргические фосфаты, аминокислоты и другие.

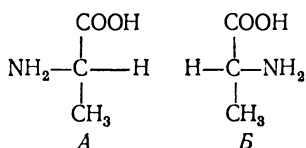
1. **Соединения углерода и некоторые их свойства.** Подавляющее большинство молекул органических веществ, составляющих биологическую структуру и обуславливающих ее функцию, являются соединениями углерода. Эти соединения отличаются высокой инертностью, слабо реагируют между собой и с другими молекулами и атомами. Однако эти реакции, как правило, являются экзергоническими, сопровождаются выделением большого количества свободной энергии. Атомы углерода между собой образуют очень прочные простые, двойные и тройные ковалентные связи. Например, энергия связи между атомами углерода составляет: простая связь — $343 \cdot 10^3$ Дж/моль, двойная — $607 \cdot 10^3$ Дж/моль. А энергия связи между углеродом и водородом равна $414 \cdot 10^3$ Дж/моль, углеродом и кислородом — $343 \cdot 10^3$ Дж/моль. Поэтому углерод образует устойчивые цепи и циклы.

Электронная структура атома углерода, его физические и химические свойства обуславливают образование громадного разнообразия органических соединений, имеющих чрезвычайно широкий диапазон свойств. Возможно, что эти особенности и определили главенствующую роль соединений углерода в химической эволюции при возникновении и развитии биологических систем.

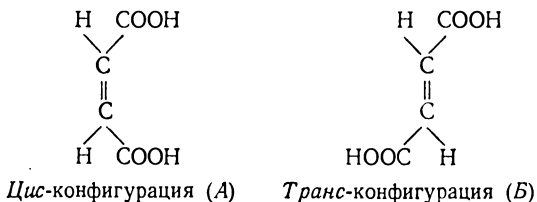
В связи с этим необходимо рассмотреть еще раз свойства углерода. Последний занимает особое место в периодической системе элементов Д. И. Менделеева. Как известно, углерод имеет шестой номер во втором периоде. Атом углерода не способен расширять свой октет. Поэтому соединения четырехвалентного углерода слабо образуют комплексы. Атом углерода в основном состоянии имеет два неспаренных электрона. Но при взаимодействии с четырьмя неспаренными электронами атом углерода переходит в возбужденное состояние. Это является энергетически выгодным, так как атом углерода при этом может образовать дополнительно две связи. Поэтому углерод является четырехвалентным и способен присоединить к себе четыре атома углерода или образовать четыре ковалентные связи с атомами других элементов. Например, атом углерода может обобщить свои четыре электрона с четырьмя атомами водорода. При этом атомы водорода и углерода приобретают стабильную структуру. На внешней орбите атомы водорода будут иметь по два электрона, как у инертного газа гелия, а атомы углерода — по восемь электронов, как у инертного газа неона. Четыре ковалентные связи, образуемые атомом углерода, имеют определенную длину и угол расположения в пространстве. Так, длина связи между атомами углерода и водорода равна $1,09 \text{ \AA}$, а между двумя атомами углерода — $1,54 \text{ \AA}$. Но если образуется двойная ковалентная связь, то длина ее между атомами углерода, например, в молекуле этилена

уменьшается до 1,34 Å. Ковалентные связи, образуемые атомом углерода, имеют тетраэдрическое расположение в пространстве, что обуславливает образование третичной структуры, имеющей громадное значение для выполнения биологической функции.

Молекула метана имеет пространственную конфигурацию, которая показана на рис. 11. Такая конфигурация определяет некоторые особенности органических молекул биологических систем. Если к атому углерода присоединяется четыре различных атома или радикала, то такое соединение может быть представлено двумя пространственными структурами, являющимися зеркальным отражением по отношению друг к другу. Оптическая изомерия обуславливает отклонение поляризованного луча света. Это имеет большое биологическое значение, так как увеличивает разнообразие углеводных органических соединений и возможность отбора тех, которые соответствуют выполнению той или иной функции. Установлена пространственная конфигурация всех аминокислот. Например, аланин имеет асимметрический атом углерода и является наиболее простой оптически активной аминокислотой, которая существует в правовращающей (А) и левовращающей (Б) формах.



Вторая форма изомерии органических веществ определяется наличием простых и двойных связей в молекуле. Если в молекуле между атомами углерода имеется двойная связь, то она ограничивает вращение атомов или радикалов, последние фиксируются и остаются расположенными по ту или другую сторону двойной связи. При этом образуются *цис*- и *транс*-изомеры. Если атомы или радикалы располагаются по одну сторону от двойной связи между атомами углерода, то такая асимметрия называется *цис-конфигурацией*. В случае расположения атомов с разных сторон от двойной связи возникает *транс-конфигурация*. Примером могут служить малеиновая (А) и фумаровая (Б) кислоты.



Но вокруг простых, менее прочных связей углерода возможно вращение различных групп, поэтому такие соединения должны существовать в большом количестве различных конформаций. Но,

как правило, большинство таких молекул принимает энергетически более выгодную форму. Например, если углеводород имеет неразветвленную цепь, то его молекула приобретает зигзагообразную форму, и все атомы располагаются в одной плоскости. При этом углы между связями, образуемыми атомами углерода, равны 114° .

Но если шесть атомов углерода образуют цикл с простыми связями, то располагаются они не в одной плоскости, а в виде «кресла» или «лодки» (рис. 12). Это еще один тип изомерии, который обусловлен наличием энергетически слабых межмолекулярных и внутримолекулярных вандерваальсовых взаимодействий.

Многообразие различных свойств органических веществ достигается также различным расположением атомов в углеродном скелете молекулы, присоединением и замещением различных атомов и групп, заменой одиночных связей двойными.

Низкомолекулярные соединения имеют очень большое значение для активации макромолекул. Это объясняется тем, что часто в основной углеродный скелет макромолекул входят различные функциональные группы, радикалы, остатки молекул с малой молекулярной массой. В результате этого макромолекулы становятся более реагентными, в частности, легко растворимыми в воде. Такими

функциональными группами могут быть остатки кетонов $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—}$.

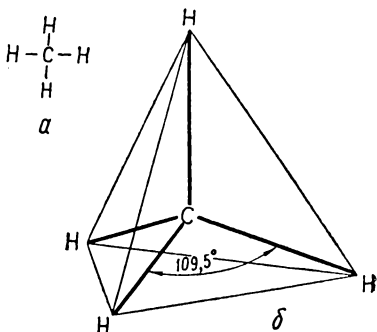


Рис. 11. Эмпирическая формула (а) и тетраэдрическая пространственная структура (б) метана.

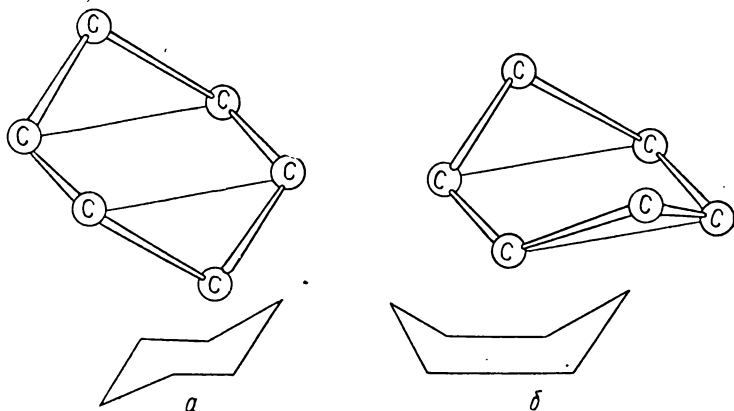


Рис. 12. Две возможные конформации циклогексанового кольца:
а — «кресло»; б — «лодка», или «ванна». Конформация «кресло» более стабильна

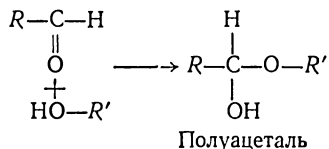
альдегидов $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—C—} \\ \backslash \\ \text{H} \end{array}$, амидов $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—C—} \\ \backslash \\ \text{NH}_2 \end{array}$, спиртов $\begin{array}{c} | \\ \text{—C—OH} \\ | \end{array}$, аминов —NH_2 , органических кислот $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—C—} \\ \backslash \\ \text{O—} \end{array}$ и т. д.

Огромное значение имеет также степень диссоциации биологически важных соединений в воде. В составе наиболее важных в биологическом смысле соединений — нуклеиновых кислот, белков — представлен ряд легко диссоциирующих функциональных групп: фосфатная, карбоксильная, гуанидиновая, имидазольная, аминогруппа и др.

В живой клетке имеется множество низкомолекулярных соединений, но мы кратко познакомимся только с наиболее важными.

2. Углеводы. Эти соединения очень широко представлены в живой клетке. Они выполняют метаболическую и структурную функции. Строение их может быть выражено общей формулой $n(\text{CH}_2\text{O})$. В процессах метаболизма, как правило, непосредственное участие принимают простые углеводы: сахара и их фосфорные эфиры. Структурная функция и запасные вещества обычно представлены полисахаридами, очень разнообразными по составу и сложности. Они представлены полимерами глюкозы, N-ацетилглюкозамина и других простых углеводов.

Простые углеводы, в основном, представлены моносахаридами и дисахаридами. При этом во всех сложных углеводах, как правило, элементарными звеньями (мономерами) являются моносахариды. Они являются полигидроксильными соединениями и представляют собой пиранозные и фуранозные гетероциклы. Образование пираноз — частный случай образования полуацетала, когда взаимодействует спирт с альдегидом:



При образовании гетероцикла гетероатомом является кислород. Атом кислорода придает пиранозам свойство альдегидов, а фуранозам — свойство кетонов. Структурные формулы простых сахаров обычно изображают в виде проекции шести- или пятичленного кольца на плоскость.

Шестичленное кольцо молекулы глюкозы в клетке обычно представлено в виде «кресла».

В случае альдогексоз (*D*-глюкоза) взаимодействует гидроксильная группа при С — 5 с альдегидной группой С — 1 и образуется производное структуры пирана — пираноза. В случае кетогексоз

(*D*-фруктоза) взаимодействует гидроксил при С—5 с карбонильной группой при С—2 и образуется производное структуры фурана — фураноза.

У глюкопиранозы, фруктофуранозы и других сахаров атом углерода в первом положении обладает повышенной активностью. Шестиленные кольца более устойчивы, чем пятиленные. Однако в каждой живой клетке мы встречаем пятиленный сахар рибозу, которая, как известно, является составной частью нуклеиновых кислот и участвует в процессах передачи информации и энергии.

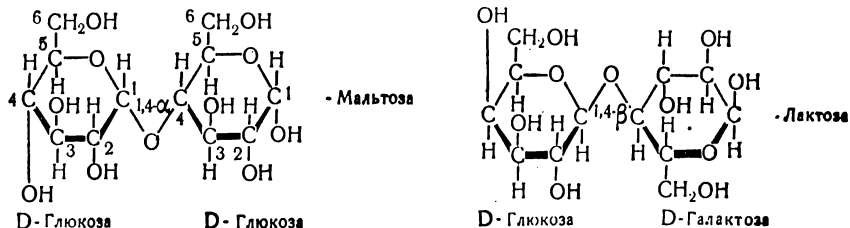
ОН-группы располагаются как выше, так и ниже плоскости кольца. Это обуславливает наличие 16 стереохимических изомеров, хотя наиболее часто встречаются только три изомера. Принято считать α - и β -формы сахаров в зависимости от положения ОН-группы около этого углеродного атома. Если эта группа лежит над плоскостью кольца, то это — β -форма, а в α -форме ОН-группа лежит под кольцом.

В зависимости от положения гидроксильной группы существует два стереоизомера, которые отличаются оптической активностью. Угол вращения α -*D*-глюкозы $[\alpha]_D^{20} = 112,2^\circ$, для β -*D*-глюкозы $[\beta]_D^{20} = 18,7^\circ$. Оптическое вращение растворов этих стереоизомеров меняется и становится равным $[\alpha]_D^{20} = 52,7^\circ$. Это явление называется мутарацией.

D- и *L*-конфигурации относят к асимметрическому атому углерода, более удаленному от карбонильного кислорода.

В клетке имеются многие производные моносахаридов. Они образуются включением в молекулу сахара той или иной функциональной группы — метильной, карбоксильной, аминной, фосфатной и др. Моносахариды полимеризуются и образуют цепи с различным числом мономеров. Если число мономеров не превышает девяти, то их называют олигосахаридами. Если остатков сахаров больше девяти, то их относят к полисахаридам.

Связывание двух, шести или пятиленных колец происходит, как правило, через наиболее активный атом углерода в первом положении. Этот атом углерода может соединиться с гидроксильными около других атомов углерода. Чаше происходит соединение с гидроксильным, связанным с четвертым атомом углерода. Образуется 1,4-связь. В зависимости от положения ОН-группы при первом атоме углерода образуются α - и β -формы. По аналогии образуются 1,4- α - или 1,4- β -гликозидные связи при полимеризации моносахаридов.



Различают α - и β -связи по пикам поглощения при инфракрасном облучении. Установление типа связи производят на олигосахаридах (ди-, трисахаридах), которые легко образуются при гидролизе сложных углеводов. Гликозидная связь устойчива в щелочной среде, расщепляется в кислой, а также специфическими ферментами. Наибольшее биологическое значение имеют аминосахара — *D*-глюкозамин и *D*-галактозамин. Первый входит в состав хитина, второй — в состав хрящей.

Среди аминосахаридных кислот важную роль выполняет муромовая кислота. В виде *N*-ацетилмуромовой кислоты она входит в состав полисахаридов клеточных стенок бактерий. Нейраминовая кислота в виде *N*-ацетилпроизводного входит в состав полисахаридов, являющихся составной частью гликопротеидов и гликолипидов оболочек животных тканей. *N*-ацилпроизводные нейраминовой кислоты объединяются под названием сиаловых кислот.

Широко распространены в природе из дисахаридов также мальтоза, сахароза, лактоза, а из трисахаридов — рафиноза и меллицтоза.

На земле количество углеводов превышает содержание всех других органических соединений. При этом углеводы в основном представлены полисахаридами, которые состоят из одинаковых моносахаридных единиц — гомополисахариды — или из различных моносахаридных остатков — гетерополисахариды. На долю целлюлозы приходится свыше 50% углерода биосферы.

Полисахариды служат или запасной формой питательных веществ, или выполняют важную структурную функцию, входя в состав стенок бактериальных и растительных клеток.

Одним из важнейших полисахаридов является крахмал, состоящий из амилозы и амилопектина. Амилоза — линейный полимер с молекулярной массой до 500 000, имеет трехмерную структуру в виде спирали. Амилопектин — более высокополимерное ветвящееся образование с молекулярной массой до 1 000 000. Остатки *D*-глюкозы связаны через α (1 $\rightarrow$ 4)-связи в амилозе, через α (1 $\rightarrow$ 4)- и α (1 $\rightarrow$ 6)-связи в амилопектине. Последний тип связи α (1 $\rightarrow$ 6) представлен в местах ветвления полимера. Крахмальное зерно имеет строго определенную структуру и обладает двойным лучепреломлением, хотя пока остается недостаточно ясным взаимное расположение обоих компонентов крахмального зерна.

Второй запасный полисахарид — гликоген с молекулярной массой около $5 \cdot 10^6$. Несмотря на это, гликоген хорошо растворим в воде. В химической эволюции организмы приспособились к отложению запасов питательных веществ в виде гликогена и крахмала. Это позволяет сохранить низкую молярную концентрацию, мало изменить осмотическое давление в клетке при наличии значительного количества вещества.

Кроме этих двух полисахаридов широко представлена также целлюлоза, которая вместе с другими соединениями составляет скелет клеточной стенки. Мономером является *D*-глюкоза, связанная в длинную неразветвленную цепь с помощью 1,4- β -глико-

зидной связи, которая гидролизруется целлюлазой, отсутствующей в животной клетке. Макромолекула представляет собой громадную нить, состоит приблизительно из 14 000 остатков глюкозы и имеет молекулярную массу около $2,3 \cdot 10^6$. Нити изогнуты, свернуты и образуют длинные волокна. При этом происходит взаимодействие между гидроксильными группами, возникают поперечные связи, как бы «сшивая» молекулы между собой. Это приводит к тому, что исключается возможность образования водородных связей с водой и растворимость в ней целлюлозы.

Цепи целлюлозы поперечными водородными связями соединены в пучки и выполняют механическую роль. Этому способствуют другие компоненты, входящие в состав клеточной стенки: лигнин, гемицеллюлоза, пектин, экстенсин. Гемицеллюлоза является *D*-ксиланом, в котором остатки *D*-ксилозы соединены β (1 $\rightarrow$ 4)-связями. В боковых цепях этого полисахарида имеется арабиноза. Пектин — полимер из остатков метил-*D*-галактуроновой кислоты, а экстенсин — белок, отличающийся высоким содержанием оксипролина, имеет в основном β -структуру, цепи его образуют водородные связи с целлюлозными цепочками.

Из других полисахаридов известны декстраны в виде разветвленных цепей. У них остатки *D*-глюкозы связаны α (1 $\rightarrow$ 6)-связями, а в точках ветвления могут быть 1 $\rightarrow$ 2-, 1 $\rightarrow$ 3- и 1 $\rightarrow$ 4-связи. В растительных тканях встречаются полисахариды — фруктаны, ксиланы, арабинаны, леваны; в бактериях, грибах — маннаны.

Структурным компонентом покровов насекомых является полимер — хитин, состоящий из остатков *N*-ацетил-*D*-глюкозамина, соединенных (1 $\rightarrow$ 4)-связями. Цепи хитина изогнуты, что обуславливает возникновение межмолекулярных водородных связей между гидроксильными группами углерода в третьем положении и кислородом кольца соседнего остатка. Кроме этого, водородные связи возникают между всеми СО- и NH-группами. Хитин в естественных условиях встречается в комплексе с белком.

Компонентом клеточной стенки водорослей является агар — полимер из остатков галактозы.

Клеточная стенка бактерий состоит из сложного полисахарид-пептида — пептидогликана, или муреина. Полисахаридные цепи состоят из повторяющегося дисахарида, в котором *N*-ацетил-*D*-глюкозамин β (1 $\rightarrow$ 4)-связями соединен с *N*-ацетилмурамовой кислотой. Дисахариды связаны между собой (1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями. К мурамовой кислоте ковалентно присоединяется пептид, чаще тетрапептид (*L*-аланин, *D*-аланин, *D*-глутаминовая кислота, *L*-лизин). В результате полисахаридные цепи соединяются поперечными пептидными связями. Лизоцим у грамположительных бактерий разрывает (1 $\rightarrow$ 4)-гликозидные связи и разрушает клеточную стенку.

В состав бактериальной клеточной стенки входят в различном количестве липиды. У грамположительных бактерий содержится мало, а у грамотрицательных — много липидов.

Клеточная стенка бактерий кроме защиты от внешних воздействий выполняет другие функции: половая конъюгация с помощью выростов клеточной стенки; взаимодействие с вирусами и антибиотиками; роль антигена в организме животных.

Возможно, что это объясняется тем, что в состав клеточной стенки грамположительных бактерий входят тейхоевые кислоты, состоящие из остатков глицерина и рибита, а также другие гетерополисахариды из остатков глюкозы, галактозы, рамнозы, маннозы и различные белки.

В состав граммотрицательных бактерий входят различные липопротеиды, полипептиды, липополисахариды. Все эти сопутствующие компоненты клеточной стенки обладают специфической антигенной активностью и акцепторной способностью.

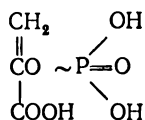
Соединения, входящие в состав бактериальной клеточной стенки, синтезируются внутри клетки, а их сборка с помощью ферментов осуществляется на наружной стороне клеточной мембраны.

Клеточная стенка животных менее выражена, но имеет сложное строение. Она состоит из гликолипидов, находящихся в наружном слое клеточной мембраны. Их полярные части, состоящие из углеводов, выступают наружу клетки.

Липопротеиды, входящие в состав клеточной стенки животных тканей, расположены во внешнем белковом слое цитоплазматической мембраны. Кроме этого, в состав клеточной стенки входят мукополисахариды, особенно часто гиалуроновая кислота, мономером которой является дисахарид, состоящий из *D*-глюкуроновой кислоты, *N*-ацетил-*D*-глюкозамина, соединенных β (1 $\rightarrow$ 3)-связями.

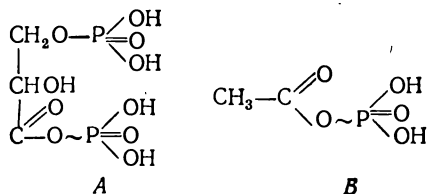
Такое специфическое строение клеточной стенки животной клетки имеет биологическое значение. В частности, это важно в различных видах межклеточного взаимодействия, например: при узнавании клеток; для контактного торможения в процессе клеточного роста и дифференциации; в выработке антител, отторжении чужеродных тканей и т. д.

3. Макроэргические соединения. Среди низкомолекулярных соединений макроэргические фосфаты выполняют важную функцию. Макроэргические соединения могут иметь различные типы богатых энергией связей. Такие соединения возникают при фосфорилировании третичного спирта и их называют *енолфосфатами*. Примером енолфосфата может быть енолфосфопировиноградная кислота, которая образуется при расщеплении молекулы глюкозы. Это соединение содержит одну макроэргическую связь:

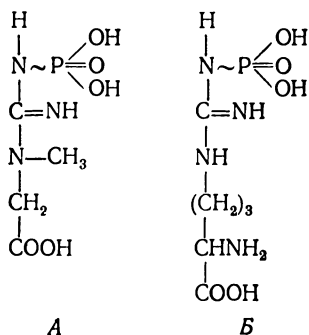


Подобные соединения возникают также при взаимодействии органической кислоты с фосфатным остатком. Например, 1,3-ди-

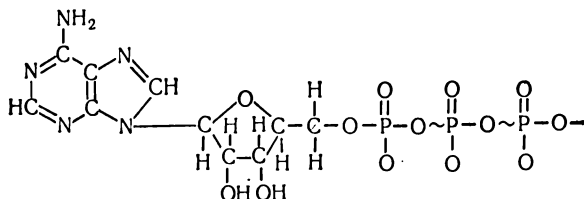
фосфоглицериновая кислота (А) и ацетилфосфат (Б):



Макроэргическая связь возникает и при взаимодействии основного азота с фосфатной группой. Примером такого типа соединения могут служить креатинфосфорная (А) и аргининфосфорная (Б) кислоты, которые находятся в мышцах и других тканях животных:



При взаимодействии двух молекул α -фосфорной кислоты в отщеплении молекулы воды образуются так называемые *фосфат-фосфатные ангидриды*. Ангидрид-фосфатная связь также относится к макроэргическим связям. К наиболее важным веществам, обладающим макроэргическими связями, относится аденозинтрифосфорная кислота. За счет свободной энергии АТФ осуществляются в клетке разнообразные синтезы органических соединений, активация аминокислот, включение их в полипептидную цепь в процессах синтеза белка, реакции ацилирования, метилирования и др.

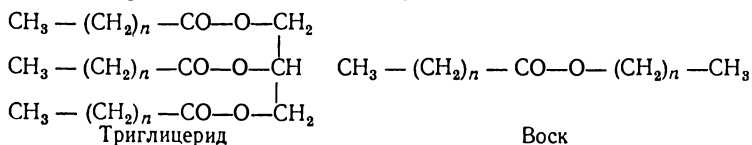


Величина свободной энергии гидролиза АТФ, т. е. разница между свободной энергией реагентов и продуктов реакции, составляет $30 \cdot 10^3$ Дж/моль. В настоящее время еще не существует удовлетворительного объяснения, почему некоторые соединения обладают

большим значением свободной энергии, т. е. являются макроэргическими. Но предполагается, что такие соединения отличаются резонансной стабильностью, способностью к ионизации и внутри-молекулярным электрическим отталкиваниям.

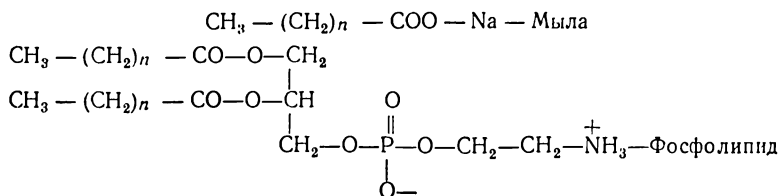
Макроэргические соединения почти всегда являются ангидридами фосфорной кислоты. Но возникновение ангидридной связи приводит к уменьшению резонирующих групп в молекуле. Ранее, рассматривая теорию резонанса, мы установили, что термодинамическая стабильность органических соединений зависит от наличия числа резонансных структур одного и того же вещества. Чем больше резонирующих структур имеет соединение, тем выше его устойчивость и стабильность. Поскольку макроэргические соединения являются ангидридами, они имеют меньше резонансных форм, отсюда становятся менее устойчивыми и стабильными. Поэтому при их гидролизе должно выделяться большое количество тепла.

4. Липиды. Липиды являются одной из основных составных частей клетки. Они принимают участие в образовании клеточных структур, а также выполняют метаболическую роль. К липидам относятся соединения, различные по химическому строению, но одинаковые по физическим свойствам, т. е. по их растворимости в органических, неполярных растворителях. Например, жирные кислоты, жиры, глицерофосфатиды, сфинголипиды, стероиды. С помощью органических растворителей липиды легко выделяются из тканей; имеют двойное лучепреломление. Поэтому они легко обнаруживаются и их содержание определенно установлено в различных тканях. Среди липидов не все соединения имеют одинаковое значение для образования структурных элементов клетки. Например, эфиры, образуемые высокомолекулярными жирными кислотами и спиртами, могут вступать в межмолекулярные взаимодействия только за счет вандерваальсовых сил. Поэтому такие липиды не участвуют в структурообразовании и чаще выполняют роль водоотталкивающих поверхностей или депо липидов. В физиологических условиях такие липиды часто представлены в виде эмульсий, частицы которых стабилизированы окружающими их полярными молекулами. Этот слой полярных молекул взаимодействует с частицами за счет вандерваальсовых сил. К этим липидам относятся триглицериды, воски, строение которых схематически может быть представлено таким образом:



Те же липиды, молекулы которых обладают не только гидрофобными, но и гидрофильными свойствами, принимают участие в образовании клеточных структур. К ним относятся жирные кислоты, фосфолипиды, сфинголипиды и др. Схематически строение некото-

рых из них может быть представлено таким образом:



Гидрофобность жирных кислот и некоторых других липидов зависит от числа атомов углерода в их цепи.

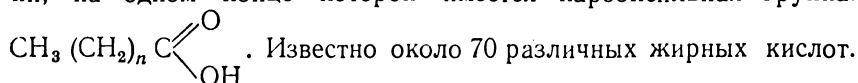
Углеводородная цепь в молекулах липидов имеет определенную структуру и оказывает значительное влияние на такие физические свойства этих соединений, как точка плавления, точка кипения, растворимость, молярная теплоемкость, оптическое вращение, показатель преломления.

Жирные кислоты и их производные на поверхности воды образуют слой в виде пленки, которая может сжиматься до определенного значения. Толщина пленки зависит от длины углеводородной цепи, т. е. от длины молекул, которые ориентированы перпендикулярно по отношению к поверхности воды. При этом гидрофильная часть молекулы направлена к воде и образует с ее молекулами водородную связь, а гидрофобные группы направлены в противоположную сторону. Если исходить из размеров диаметра атома углерода, то оказывается, что реальная толщина липидной пленки на поверхности воды меньше, чем сумма всех его атомных диаметров. Отсюда принято считать, что углеводородная цепь липида имеет форму зигзага. Это способствует более плотной упаковке молекул в липидном слое, пленке. В кристаллическом состоянии такие пленки имеют многослойную структуру.

В зависимости от строения молекул липидов при их взаимодействии с водой образуется мономолекулярный или бимолекулярный слой. Если липид имеет обе концевые группы гидрофобные или гидрофильные (углеводород, двухосновная кислота, эфир жирной кислоты и др.), то толщина слоя пленки равняется длине молекулы — *мономолекулярный слой*. При этом каждая группа CH_2 занимает длину около 2,5 Å. Если же липид имеет одну концевую группу гидрофильную, а другую — гидрофобную, то молекулы «стыкуются» друг с другом аналогичными концами и толщина пленки равняется сумме длин обеих молекул. Образуется *бимолекулярный слой*.

Рассмотрим структуру, физические и химические свойства некоторых липидов в связи с их ролью в биологических системах.

Жиры — наиболее важные соединения, которые относятся к липидам. Они состоят из углеводородной цепи, на одном конце которой имеется карбоксильная группа:



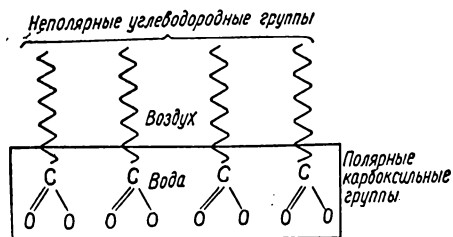


Рис. 13. Мономолекулярный слой, образуемый жирными кислотами на поверхности воды.

Жирные кислоты имеют четное число атомов углерода, так как их биосинтез осуществляется из ацетильных радикалов. В клетке чаще встречаются жирные кислоты с 16 и 18 атомами углерода. Это объясняется тем, что жирные кислоты с большим числом углеродных атомов совершенно не растворяются в воде. Жирные кислоты с меньшим числом атомов углерода, наоборот, очень хорошо растворяются в воде и могут заметно смещать кислотность внутриклеточной среды и оказывать вредное действие на клеточные структуры. Таким образом, физиологическим условиям больше соответствуют жирные кислоты с 16 и 18 атомами углерода.

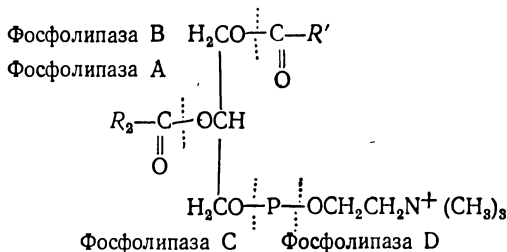
Жирные кислоты могут быть *насыщенными* (пальмитиновая, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$) и *ненасыщенными* (олеиновая, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$). У насыщенных жирных кислот углеводородный конец свободно вращается вокруг простых связей и поэтому может иметь различные конформации. Наоборот, жирные кислоты с двойными связями имеют жесткую структуру углеводородной части молекулы. Двойная связь может иметь *цис*- и *транс*-конфигурацию. Эти особенности в строении жирных кислот имеют большое значение при образовании мембран.

Один конец молекулы жирных кислот обладает выраженными *гидрофобными*, а второй — *гидрофильными* свойствами, т. е. одна часть молекулы растворима, а другая нерастворима в воде, что имеет громадное биологическое значение, особенно для разделения различных фаз и частей в клеточной среде. Противоположность свойств различных частей молекулы жирной кислоты лежит в основе ее строго определенной ориентации по отношению к воде. Жирная кислота своим гидрофильным концом благодаря образованию водородных связей направлена к воде, а гидрофобным — в противоположную сторону. Схематически это можно представить таким образом (рис. 13). В результате образуется мономолекулярный слой, пленка жирной кислоты на поверхности воды. Силы поверхностного натяжения воды уменьшаются, и она приобретает большую смачивающую способность.

Жиры как более восстановленные соединения содержат значительно больше химической энергии, чем углеводы. Из этого следует, что путь окисления жиров до конечных минеральных продуктов должен быть более длинным по сравнению с окислением углеводов.

Жирные кислоты в клетке легко взаимодействуют своими карбоксильными группами с другими соединениями. Особенно легко и часто они вступают во взаимодействие с гидроксильными группами трехатомного спирта — глицерина. Если реакция этерификации

Глицерофосфатиды. Ядро, митохондрии, рибосомы очень богаты глицерофосфатидами. Эти соединения отличаются полярными свойствами и являются наиболее важными липидными молекулами, так как выполняют не только структурную, но и функциональную роль. Химическое строение многих глицерофосфатидов подробно изучено. Но участие и место их в мембранных системах остается недостаточно выясненным. Однако эти вопросы в молекулярной биологии интенсивно изучаются и можно ожидать, что в недалеком времени станет понятной роль глицерофосфатидов в образовании мембран. Фосфоглицериды гидролизуются специфическими фосфолипазами А, В, С, D, которые разрывают определенные связи и служат средством изучения структуры и роли этих соединений. Ниже приводится схема разрыва связи различными фосфолипазами. Разрыв связи показан пунктирной линией.



изводные фосфатидной кислоты:

$$\begin{array}{c} R-CO-O-CH_2 \\ | \\ R_1-CO-O-CH \\ | \\ CH_2-O-P \begin{array}{l} \nearrow OH \\ =O \\ \searrow OH \end{array} \end{array}$$

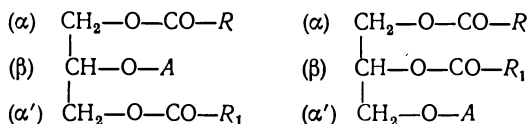
89 .

становится асимметричным и фосфатиды в отличие от нейтральных жиров становятся оптически активными.

Глицерофосфатиды отличаются от нейтральных жиров своими функциональными особенностями. Это обусловлено тем, что в составе глицерофосфатидов имеется остаток фосфорной кислоты и азотсодержащая группа, которая диссоциирует как щелочь. Некоторые глицерофосфатиды (серинфосфат) имеют еще карбоксильную группу с отрицательным зарядом. Диссоциирующие группы расположены недалеко друг от друга. При pH-7 глицерофосфатиды несут положительный и отрицательный заряды и один конец их молекулы приобретает полярные свойства.

Соединения, молекулы которых имеют большой углеродный скелет и содержат полярные группы на одном из своих концов, называются *детергентами* (лат. detergo — раздробляю, чищу). Детергентные свойства фосфатидов имеют большое значение в формировании границ раздела двух фаз. Молекулы фосфолипида (детергента) в водном растворе строго ориентированно занимают только пограничную поверхность. При этом углеводородная часть молекулы обращена от воды, а карбоксильная группа — к воде. Если в водную эмульсию масла ввести такой детергент, то его углеводородная часть будет растворена в масле, а полярные карбоксильные группы — в воде. В результате капельки масла будут окружены молекулами детергента, расположенными на границе раздела двух фаз вода — масло. Это приводит к стабилизации неполярного вещества с помощью небольшого количества детергента. Поверхность липидной фазы (масло) оказывается покрытой заряженными группами детергента, это придает заряд липидной фазе и препятствует слиянию частиц липидов. Детергенты, обладающие кислотными группами, называются *анионными*, а обладающие основными, — *катионными*.

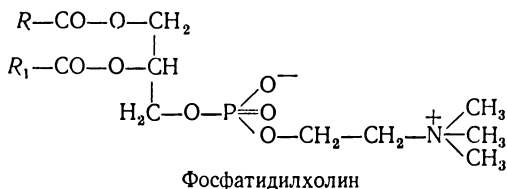
Фосфатидная кислота является исходным соединением в процессе синтеза различных глицерофосфолипидов. В зависимости от положения ионных группировок (*A*) около гидроксильных групп глицерина существуют α - и β -структуры.



Если ионная группировка, допустим остаток фосфорной кислоты, размещена около гидроксила в α -положении, то это — α -структура. В случае расположения ионной группы около гидроксила в β -положении — β -структура. Другие гидроксильные группы глицерина могут соединяться с насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами. Это определяется с помощью фосфолипазы, которая отщепляет остатки жирных кислот в молекуле фосфолипида только в β -положении. Установлено, что насыщенные жирные кислоты, как правило, занимают α -положение, а ненасыщенные —

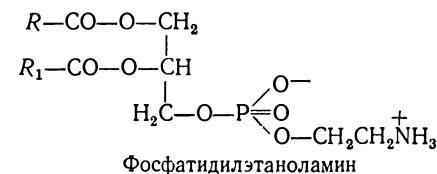
β -положение. Общим свойством всех глицерофосфатидов является выраженная гидрофобность одной части молекулы (углеводородные радикалы) и гидрофильность другой ее части (остаток фосфорной кислоты).

Наиболее часто в живой клетке встречается ряд глицерофосфолипидов, у которых одна OH-группа фосфорной кислоты этерифицирована остатками холина, серина, этаноламина, инозита или других веществ, например:



Молекула фосфатидилхолина несет положительный и отрицательный заряды в большом диапазоне рН (3,5 — 10). При этом остаток фосфорной кислоты имеет отрицательный, а азот холина — положительный заряды. Эти заряды уравниваются, и молекула является электронейтральной.

Другие глицерофосфолипиды при нейтральном значении рН имеют отрицательный заряд.

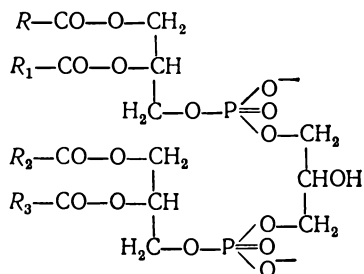


При нейтральной реакции у фосфатидилэтанолamina преобладает отрицательный заряд фосфорной кислоты над положительным зарядом азота этаноламина. Отрицательный заряд фосфатидилсерина еще более усиливается отрицательным зарядом, который несет карбоксильная группа. По степени электроотрицательности выделяются фосфатидилинозитиды.



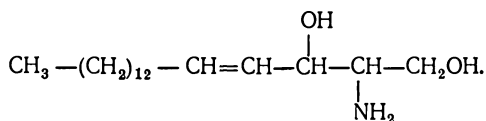
Как известно, гидроксильные группы инозита легко этерифицируются молекулами фосфорной кислоты. В клетке обнаружены фосфатидилинозитиды, у которых в кольце инозита имеется по несколько фосфатных остатков. Это придает резко отрицательный характер молекуле таких фосфатидилинозитидов.

Из митохондрий животных клеток выделен глицерофосфолипид дифосфатидилглицерин (кардиолипин).



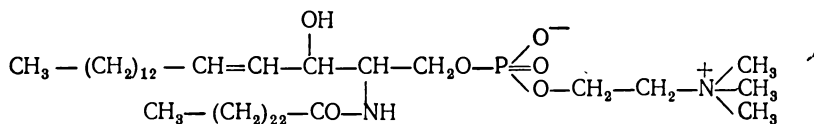
Кардиолипин

Сфинголипиды. Эта группа фосфолипидов также обнаружена в мембранах. К сфинголипидам относятся различные сложного строения соединения — сфингомиелин, цереброзид и др. Составной частью всех этих соединений является остаток двухатомного ненасыщенного аминокспирта — сфингозина:



Сфинголипиды не содержат глицерина и не являются сложными эфирами, так как здесь связь между жирной кислотой и сфингозином образуется не через OH -, а через его NH_2 -группу.

При этерификации фосфорилхолином концевго гидроксила сфингозина и присоединении стеариновой кислоты к аминокгруппе образуется сфингомиелин.

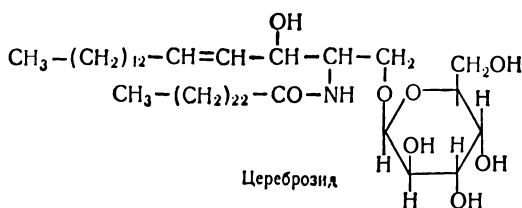


Сфингомиелин

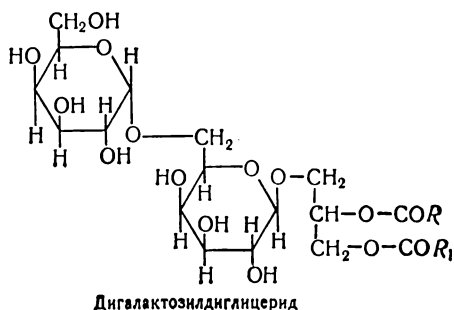
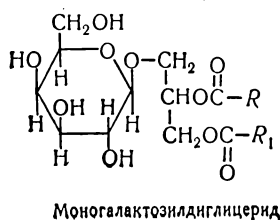
В молекуле сфингомиелина имеется две гидрофобные и одна гидрофильная части. Гидрофильная часть несет положительный и отрицательный заряды. Наличие гидрофобных и гидрофильных частей, положительных и отрицательных зарядов в молекуле сфингомиелина обуславливает его пригодность для образования мембран в клетке.

Цереброзиды образуются при возникновении гликозидной связи между концевым гидроксильным сфингозином и остатком сахара, в

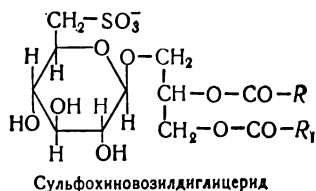
большинстве случаев — галактозой. Жирная кислота и в этом случае связана с азотом сфингозина:



Г л и к о л и п и д ы. В хлоропластах листьев растений в большом количестве представлены не фосфолипиды, а гликолипиды. Из них чаще обнаруживаются моногалактозилдиглицерид и дигалактозилдиглицерид.



В хлоропластах листьев широко представлен также сульфоксинозилдиглицерид с такой структурой:

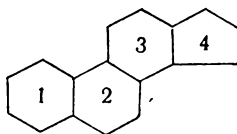


Гликолипиды и сульфолипиды широко представлены в тканях листьев растений, играют структурную и метаболическую роли в фотосинтетическом аппарате.

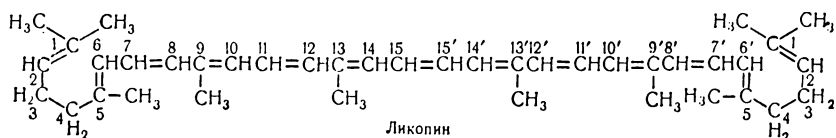
И з о п р е н о в ы е л и п и д ы. В клетке встречается также особый класс липидов, производных изопрена ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$).

К наиболее широко распространенным липидам этой группы относятся стероиды, среди которых в большом количестве в клетке представлены стерины. Постоянной составной частью их является

циклопентанопергидрофенантрен, в основе остова которого лежит циклическая структура.



Среди стероидов многие соединения известны как гормоны, выполняющие регуляторные функции. Ряд стероидов участвует в образовании комплексов с белками, которые являются структурными компонентами многих внутриклеточных мембран. Производными изопрена является также вторая группа липидов — каротиноиды. В природе встречается до 70 различных каротиноидов. Эти соединения синтезируют только клетки растений и прокариотов. Особенности этой группы липидов зависят от присутствия в них большого количества сопряженных двойных связей, являющихся хромоформными группами и определяющими цвет, а также функцию различных липидов этой группы. В основе строения всех каротиноидов лежит ликопин, который содержит 40 углеродных атомов и, таким образом, может рассматриваться как соединение, состоящее из 8 изопреновых остатков.

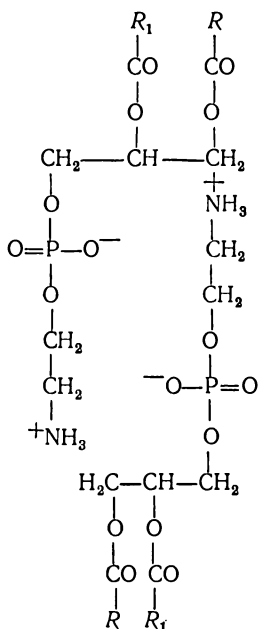


5. Роль липидов в образовании клеточных структур. Роль полярных липидов как компонентов мембран основывается на их способности самопроизвольно образовывать мономолекулярные, бимолекулярные слои, или мицеллы. Если молекулы полярных липидов находятся в водной среде, то они образуют мицеллы, или бимолекулярные слои, в которых можно выделить гидрофобную и гидрофильную фазы. Гидрофобная фаза образуется гидрофобными частями молекул липидов, направленными внутрь мицеллы. А гидрофильная фаза образуется гидрофильными частями молекул, которые располагаются на поверхности и взаимодействуют с молекулами воды. В случае, если образуется бимолекулярный слой, то внутри из углеводородных частей молекул липидов формируется гидрофобный слой (фаза). Два наружных слоя образуются из гидрофильных частей молекулы полярного липида и взаимодействуют с обеих сторон с водой.

Большой интерес представляет выяснение пространственной организации липидов как компонентов, входящих в состав различных клеточных структур. Но получение чистых фракций индивидуальных молекул липидов, в частности глицерофосфатидов, из естественных источников связано с рядом трудностей. Поэтому прост-

ранственная организация глицерофосфатидов и сфинголипидов изучается на синтезированных препаратах.

Установлено, что на поверхности воды молекулы фосфолипидов ориентированы по отношению друг к другу таким образом, что образуется пленка из двух слоев молекул. При этом достигается максимальная стабильность липидной пленки. Концевые группы молекул взаимно располагаются так, что их заряды находятся на наименьшем расстоянии в одной плоскости, параллельной плоскости слоя. Это обеспечивает нейтрализацию зарядов внутри слоя, благодаря чему достигается максимальная стабилизация структур. Таким образом, концевые группы как бы перекрывают друг друга и вносят соответствующий вклад в толщину слоя. Примером относительного расположения ионных концевых групп могут служить молекулы фосфатидилэтаноламина.



Самопроизвольное образование фосфолипидами бимолекулярного слоя является энергетически более выгодным. Эти структуры обладают, видимо, минимальной свободной энергией.

Бимолекулярные слои, образованные полярными липидами, особенно фосфолипидами, по толщине (70 Å) и некоторым физико-химическим свойствам имеют большое сходство с мембранами клетки. Но в биологических структурах липиды встречаются не обособленно, а образуют смешанные липидные фазы. Очень часто липиды вступают во взаимодействие с другими соединениями, в частности с белками. Все это происходит в водной клеточной среде. Вода проникает в полярные промежутки между липидными слоями, а из

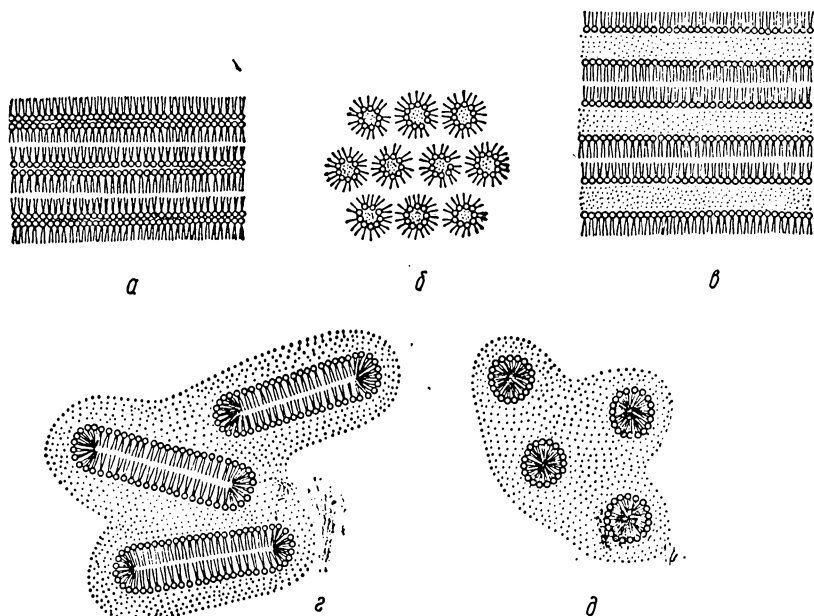


Рис. 14. Расположение молекул в системах фосфолипид — вода:
 а — безводный фосфолипид; б — гексагональная упаковка слоев воды в липидной фазе;
 в — ламеллярная (жидкокристаллическая) фаза; г и д — дисперсия липидных мицелл в воде.

липидной фазы в сторону воды протягиваются нити. Эти нити обладают двойным лучепреломлением и их называют *миелиновыми фигурами*. Нить состоит из сотен бимолекулярных липидных слоев, разделенных водными прослойками, которые находятся около полярных поверхностей каждого слоя (рис. 14). Бимолекулярные липидные слои могут образовывать также сферические агрегаты из молекул фосфолипидов, ионные группы которых обращены в сторону водной фазы, а углеводородные концы — внутрь агрегата. На основе дифракции рентгеновских лучей липидные агрегаты представляются в виде цилиндров, внутри которых находится водный канал. Полярные группы фосфолипида направлены в сторону стенок цилиндра.

Бимолекулярные липидные слои играют важную роль в образовании перегородок и мембран, которые разделяют между собой различные отсеки, или, как их называют, *компартменты*. Свойства фосфолипидных мембран изучаются на моделях, так называемых *липосомах*. Последние образуются при набухании фосфолипидов в воде и представляют собой сферические мицеллы. Они состоят из концентрических бимолекулярных слоев фосфолипидов, разделенных водными прослойками. Каждый такой бимолекулярный слой можно представить в виде пузырька, окруженного бимолекулярной фосфолипидной мембраной. В состав липосом вводится бел-

ковый компонент; в результате получаются очень близкие к естественным липопротеидные мембраны. В естественных условиях в состав липидных слоев мембран входят смешанные липидные системы. Липидный компонент мембран обуславливает такие физические свойства мембран, как распределение заряда на ионных поверхностях, точки фазовых переходов.

Считают, что одной из важнейших фосфолипидных систем в клетке является система, состоящая из фосфолипида и холестерина. На поверхности раздела фаз воздух — вода эти два компонента образуют смешанные пленки. При этом общая площадь пленки меньше площадей составляющих ее компонентов. Это объясняется тем, что холестерин занимает пустоты между слоями ненасыщенного фосфолипида. Холестерин обладает очень слабыми ионными свойствами, поэтому он локализуется ближе к углеводородной части молекулы фосфолипида и не в состоянии проникнуть в его ионный участок. Возникают вандерваальсовы силы взаимодействия между холестерином и углеводородной частью молекулы фосфолипида.

В смешанных липидных слоях неполярные нейтральные липиды выполняют роль фактора, стабилизирующего липидную часть мембран. При этом концевые ионные группы фосфолипида располагаются более свободно и могут принимать наиболее вероятную устойчивую конфигурацию. А углеводородный неполярный конец молекулы фосфолипида оказывается упакованным за счет молекул нейтрального липида холестерина.

Таким образом, молекулы липидов в растворе могут находиться в виде агрегатов, в состоянии равновесия с растворенными молекулами. В одних случаях агрегаты имеют форму сферических мицелл, у которых ядро состоит из углеводородных, неполярных цепей, а поверхность образована ионными группами. В других случаях агрегаты липидов представлены в виде ламеллярных мицелл (миелиновых фигур), в которых липиды располагаются в виде бимолекулярных слоев и образуют две отдельные полярные поверхности в водной среде.

Большой интерес представляет взаимодействие между белком и липидом, так как мембранные системы в живой клетке есть нечто иное, как липопротеидные комплексы. При этом состав белков и липидов контролируется генетически. Оказалось, что если под бимолекулярный слой, образованный фосфолипидом на поверхности воды, подвести растворимый белок, то последний своими боковыми цепями будет взаимодействовать с полярной поверхностью липидного слоя, обращенного полярными группами в сторону молекул воды. Таким образом, под слоем фосфолипида будет образовываться слой ориентированных молекул белка. В физиологических условиях, видимо, белок взаимодействует с обеими ионными поверхностями липидного бимолекулярного слоя. Взаимодействие заряда белковых молекул с зарядами липидных мицелл приводит к их взаимной нейтрализации и стабилизации структуры. По-видимому,

при соответствующих внутриклеточных условиях образуются системы из чередующихся слоев липида и белка, представляющие собой прообразы мембранных систем. Нейтрализация положительно заряженных групп белка отрицательными зарядами групп фосфолипидной мицеллы была получена при взаимодействии митохондриального белка цитохрома *c* с различными митохондриальными фосфолипидами. Был выделен структурный белок из митохондрий. При его взаимодействии с фосфолипидом образовался комплекс, в составе которого было 25% фосфолипида. Этот фосфолипид был способен связывать белок цитохрома *c*. Судя по степени связывания последнего, можно говорить о том, что заряженные группы фосфолипида оставались свободными. В биологических структурах между липидным и белковым компонентами возможны электростатическое и неполярное взаимодействия.

Выяснение структуры и функции мембран осложняется лабильностью и неустойчивостью их липопротеидного комплекса. При выделении неизбежна деградация системы, а также удаление из нее менее прочно связанных липидов. Полученный или выделенный липопротеидный комплекс часто оказывается артефактом. Поэтому при изучении естественных липопротеидных комплексов целесообразно учитывать те данные, которые получены при изучении модельных комплексов, состоящих из известных компонентов.

Липопротеидные комплексы живой клетки представлены либо в виде диспергированных частиц, либо в виде ламеллярных систем. Если первые структуры в основном находятся в водной фазе ткани, то вторые являются исходными компонентами построения клеточных мембран.

Липопротеидные частицы могут взаимодействовать с другими липопротеидными структурами и обмениваться липидными компонентами. Такой обмен установлен между митохондриями, рибосомами. Поэтому можно считать, что липопротеидные частицы принимают участие и в процессах транспорта липидов.

Фракционированием клеточных структур с применением ультрацентрифугирования удается получить многие ламеллярные липопротеидные системы. Значительную часть сухой массы мембран составляют липиды. Например, в изолированном миелине липиды составляют до 80% сухой массы, в мембранах митохондрий — около 30, в плазматических мембранах — 35—40%. При этом от 50 до 90% всех липидов составляют фосфолипиды, а среди последних преобладают фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин. Содержание холестерина в липопротеидных мембранах также сильно изменяется. По содержанию липидов миелин и плазматическая мембрана отличаются большим количеством холестерина и сфинголипидов, в то время как эндоплазматическая сеть, митохондриальные и другие цитоплазматические мембраны бедны этими липидами.

Белки, входящие в состав ламеллярных систем, в частности миелина, отличаются высоким содержанием неполярных аминокислотных боковых остатков. Эти белки, видимо, обладают слабой реа-

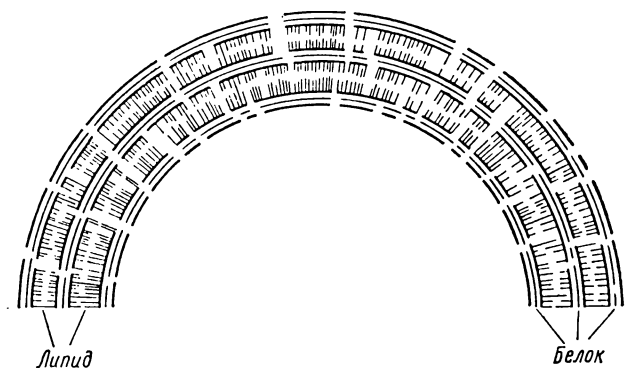


Рис. 15. Схематическое изображение ориентации липидного и белкового компонентов в миелиновой оболочке (по результатам исследований в поляризованном свете).

гентной способностью и выполняют структурную роль. Примером структуры, построенной из липопротеидных ламелл, является миелиновая оболочка нерва, которая имеет такое строение, как показано на рис. 15. Как видно из рисунка, липиды и белки, чередуясь, образуют концентрические слои вокруг осевого цилиндра. Эта структура характеризуется двойным лучепреломлением. Основной вклад в это свойство структуры миелиновой оболочки привносит липидный компонент. Миелиновая оболочка представляет собой мембрану, спирально обернутую вокруг аксона шванновской клетки.

Пока полностью не выяснены детали взаимного расположения молекул липидов и белков в миелиновом слое. Липопротеидными образованиями также являются мембраны других клеточных оргanelл.

6. Химическая эволюция и биохимическая универсальность. Органическая форма существования материи прошла длительный путь развития. В основе приспособления и совершенствования организмов лежали химическая эволюция, отбор атомов, молекул и структур, которые отвечали требованиям функционирования биологических систем. Поэтому из многих атомов периодической системы элементов и бесчисленного множества различных молекул в процессе химической эволюции были отобраны только те, которые по своей электронной структуре, физическим и химическим свойствам соответствовали выполнению биологическими структурами тех или иных специфических функций.

В процессе химической эволюции шел отбор не только элементов, но отдельных химических соединений. Известно, что вода удовлетворяет всем требованиям универсальной дисперсионной среды в биологических системах. Это объясняется особенностями электронной структуры, физическими и химическими свойствами молекулы воды. Поэтому среди множества жидкостей вода занимает такое важное место в живых организмах.

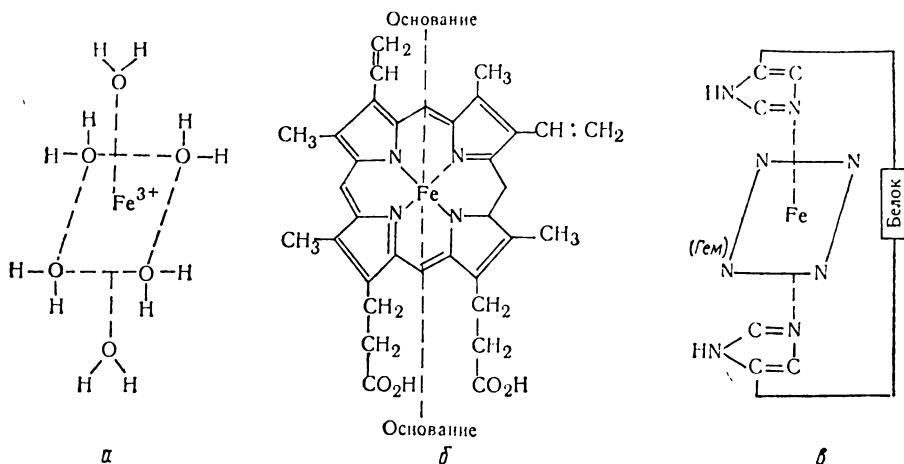


Рис. 16. Эволюция катализатора для реакции $H_2O_2 \rightarrow H_2O + 1/2 O_2$ (Кальвин, 1971):

а — акваион трехвалентного железа; каталитическая активность (при $0^\circ C$) $10^{-5} \text{ мл}^{-1} \text{ с}^{-1}$; б — гем; каталитическая активность $10^{-2} \text{ мл}^{-1} \text{ с}^{-1}$; в — каталаза; каталитическая активность $10^8 \text{ мл}^{-1} \text{ с}^{-1}$.

Из известных 150 аминокислот было отобрано только 20, входящих в состав белка. Все они являются *L*-аминокислотами. Из многих оснований и их производных были отобраны только аденин, гуанин, цитозин, тимин, а из 70 сахаров — α -D-глюкоза.

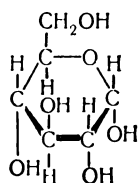
В процессе химической эволюции шел отбор соответствующих соединений, совершенствование и усложнение структуры их молекул, что обуславливало более эффективное течение того или иного процесса или выполнения определенной функции.

Из многих уже известных процессов рассмотрим эволюцию катализатора разложения перекиси водорода. Известно, что перекись водорода может разлагаться трехвалентным железом, константа скорости этой реакции равна $10^{-5} \text{ мл}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Когда ион железа входит в состав гема, состоящего из тетрапиррольного ядра, скорость разложения перекиси водорода этим более сложным соединением возрастает на три порядка и составляет $10^{-2} \text{ мл}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Но если гем соединен с белком и является составной частью каталазы, то константа скорости каталитической реакции возрастает приблизительно еще на семь порядков. Таким образом, эволюция биокатализатора разложения перекиси водорода шла в направлении изменения его структуры, направленного на повышение эффективности реакции (рис. 16).

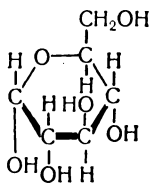
Молекулы, которые в процессе эволюции отбираются и выполняют соответствующую функцию, должны иметь определенную структуру, физические и химические свойства. Особое значение, видимо, имеет форма и размер молекул, определяющие их взаимодействие на основе структурного соответствия и комплементарности.

Это имеет важное значение, так как форма и размер в большей мере разрешают взаимодействие между простыми низкомолекулярными соединениями при образовании полимеров, макромолекул, надмолекулярных структур и различных органелл клетки. Эти важнейшие свойства атомов и молекул являются, видимо, одним из факторов их отбора в химической эволюции и пригодности для выполнения определенной функции.

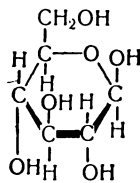
Какие же факторы определяют отбор молекул? Почему, например, среди множества существующих простых сахаров выбор пал не на пяти-, а на шестиуглеродные сахара, а среди них — на α -D-глюкозу?



α -D-Глюкоза

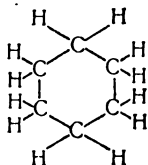


α -L-Глюкоза



β -D-Глюкоза

В клетке этот моносахар является основным источником топлива по той причине, что сахара вообще хорошо растворяются в воде и соответствуют поэтому внутриклеточной дисперсионной среде. Они всегда в достаточном количестве находятся в клетке в доступном растворенном состоянии. Эти соединения легко поддаются активации, расщеплению и окислению. А в результате этих процессов высвобождается большое количество энергии, за счет которой осуществляются различные обменные процессы. Кроме этого, из шестиуглеродного сахара образуются дву- и трехуглеродные соединения, которые, в свою очередь, являются важными промежуточными продуктами различных метаболических реакций. α -D-Глюкоза обычно встречается в α -форме. Но в результате реакции мутаратации превращается в β -форму. Распознавание α -формы и β -формы D-глюкозы, которые имеют только разное расположение OH-группы по отношению к плоскости кольца ее молекулы, возможно лишь на основе специфичности ферментативной реакции. Поэтому считают, что выбор α -D-глюкозы как основного клеточного топлива был решен в эволюции ферментной системой, которая легче окисляла эту форму сахара. Но когда этот выбор осуществился, он распространился на все другие катализаторы и молекулы. Но основным отличием α -D-глюкозы, решившим отбор ее в химической эволюции, является более высокая стабильность молекулы по сравнению с другими шестиуглеродными сахарами. Чтобы понять происхождение этого отличия, рассмотрим структуру молекулы циклогексана:



Представленное изображение молекулы циклогексана не отражает ее пространственного строения, так как в действительности атомы водорода не лежат в одной плоскости. Направление связей, образуемых атомами углерода и водорода, имеет форму тетраэдра, т. е. четыре атома, соединенные с атомом углерода, расположены в вершинах правильного тетраэдра. Шесть атомов углерода образуют шестичленный цикл с сохранением тетраэдрического характера связей. Но шестичленный цикл изогнут по типу «кресла» или «ванны», не все атомы углерода находятся в одной плоскости (см.

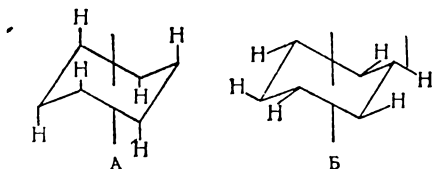


рис. 12). Шесть атомов водорода образуют связи с атомами углерода, располагаясь в одной плоскости с кольцом молекулы циклогексана. Это — *экваториальное* расположение водородных атомов. Другие шесть атомов образуют с атомами углерода связи, направление которых параллельно оси перпендикулярной «усредненной» плоскости кольца молекулы циклогексана. Это — *аксиальное* расположение атомов водорода. От способа ориентации атомов в кольце молекулы циклогексана зависит ее стабильность. При аксиальной ориентации атомов водорода молекулы испытывают большее напряжение, так как расстояние между ними меньше, и атомы водорода с большей силой отталкиваются друг от друга. В случае, если при аксиальном направлении связей около атома углерода находятся группы большего размера и с большим зарядом, то тенденция к отталкиванию выражена еще сильнее; молекула еще менее устойчива. При экваториальной ориентации связей атома углерода с водородом молекула более стабильна.

Кольцо молекулы *D*-глюкозы практически не отличается от кольца циклогексана. Но у молекулы *D*-глюкозы большие группы имеют экваториальную ориентацию в отличие от молекул других шестиуглеродных сахаров, в молекуле которых обязательно присутствует не менее одной большой группы с аксиальной ориентацией. Из этого следует, что молекула *D*-глюкозы является самой устойчивой из молекул всех шестиуглеродных сахаров.

В процессе отбора большое значение имели размер и форма молекулы. Это видно из такого примера. Известно, что между субстратом и активным центром фермента должно быть комплементарное соответствие, что является одной из основ высокой специфичности биокатализа. Если произойдет изменение формы и размера молекулы даже на долю ангстрема, то она уже не может выступать в роли субстрата. Кроме этого, в живых системах существует лестница молекулярных взаимоотношений, основанных на строгом соответствии формы и размера молекул. Например, форма и размер малых

молекул должны соответствовать размерности макромолекулы; размер и форма последних — форме и размерности надмолекулярных комплексов и т. д. Таким образом, для выполнения соответствующей функции в клетке шел отбор молекул с определенной структурой. Это также видно на примере кофермента А ($\text{CoA} - \text{SH}$), основной функцией которого является перенос ацильных групп. При этом активным центром кофермента А является сульфгидрильная группа. Между этой группой и остатком кислот образуется высокореакционноактивный эфир. Известно, что для синтеза жирных кислот больше всего подходит уксусная кислота. Эволюционный отбор пошел дальше, в направлении образования сложного эфира

О

||

ацетилкофермента А: $\text{CoA} - \text{S} \sim \text{C} - \text{CH}_3$. При этом возникла богатая энергией химическая связь между атомом серы кофермента А и углеродом карбоксильной группы уксусной кислоты. Известно, что кофермент А выполняет свою функцию с помощью тиоловой группы (SH). Но многие соединения, в том числе и белки, также содержат в своем составе эту группу, однако не могут выполнять функцию переноса ацильных остатков.

И в этом случае выбор малых молекул был решен на основе их электронной структуры, химических свойств. Чтобы стать биологически активной, молекула должна обладать соответствующей структурой, которая позволяет ей выполнять определенную функцию. Этот принцип действовал и при отборе других веществ, в частности жирных кислот. Из многообразия жирных кислот были отобраны те, которые имеют в своей углеводородной цепи от 16 до 18 атомов углерода.

На основе особенностей электронной структуры, физических и химических свойств шел отбор и других молекул, таких как пиррол, и образование на его основе тетрапиррольного ядра; пуринов и, прежде всего, аденина, а на основе последнего — образование аденозинтрифосфорной кислоты.

Таким образом, в процессе химической эволюции шел отбор только тех молекул, которые соответствуют выполнению необходимых функций. В результате создалась *биохимическая универсальность* — когда громадное количество протекающих в клетке реакций осуществляется с помощью небольшого числа универсальных атомов, молекул. В живой клетке осуществляется громадное количество реакций окисления-восстановления, переноса различных химических групп и остатков, гидролитического расщепления внутримолекулярных связей, присоединения групп по двойным связям и обратные реакции отрыва таких групп, изомеризации различных органических соединений, соединения двух молекул с затратой энергии извне и т. д. Но все это множество реакций во время многоступенчатых процессов осуществляется с помощью небольшого числа универсальных кофакторов и простетических групп: НАД, НАДФ, ФАМ, ФАД, $\text{CoA} - \text{SH}$, биотин, тиаминпи-

рофосфат, рибофлавин, гем, пиридоксин, АТФ, фолиевая кислота, убихинон и др.

В клетке имеется громадное количество разных нуклеиновых кислот, полисахаридов, жиров, белков, но все они состоят всего из четырех нуклеотидов, двадцати аминокислот, *D*-рибозы, *D*-глюкозы, глицерина, холина, жирной кислоты. Эти соединения были отобраны не только потому, что они подходили по своей структуре и физико-химическим свойствам, но и потому, что способны к взаимным превращениям. Например, из *D*-глюкозы может образоваться аминокислота, уксусная кислота, глицерин, жирная кислота.

Участие множества веществ в катаболических и анаболических реакциях, процессах, протекающих в живой клетке, осуществляется с помощью небольшого числа функциональных групп, универсальных для того или иного класса соединений. Участие всех углеводов осуществляется с помощью общей для всех них функциональной группы — CH_2 , карбоновых кислот — с помощью группы — COOH , аминокислот — — COOH и — NH_2 , углеводов —

— $\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H} \end{array}$, спиртов — — CH_2OH , амидов — — $\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{NH}_2 \end{array}$, аминов — — CH_2NH_2 , меркаптанов (тиоловых соединений) — — CH_2SH , эфиров — — $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$ и — $\text{CH}_3\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$. Как видно, все вещества клетки,

возможно, за небольшим исключением, вступают во взаимодействие с другими соединениями с помощью всего десяти различных алифатических функциональных групп.

Все функциональные группы могут быть разделены на *алифатические* и *ароматические*. К ароматическим группам можно отнести бензол, фенол, нафталин, пиррол, индол, пиридин, пиримидин, имидазол, пурин, порфириновое ядро и некоторые другие. Ароматические соединения отличаются более низкой теплотой сгорания по сравнению с алифатическими. Разница в теплоте сгорания определяет энергию стабилизации ароматических молекул, делает их более устойчивыми, инертными и менее реакционноспособными. Это зависит от резонансной структуры ароматических соединений и обусловлено наличием системы двойных сопряженных связей и делокализованных π -электронов.

В процессе химической эволюции живые организмы приобрели биохимическую универсальность и в результате отбора макромолекул. Носителем генетической информации, как правило, является дезоксирибонуклеиновая кислота, в которой тексты информации состоят из миллионов пуриновых и пиримидиновых оснований в прокариотической клетке и из миллиардов этих оснований в клетке высших, эукариотов. В триплетной последовательности этих оснований заложена информация синтеза около десяти тысяч различных белков. При этом имеет место явная биохимическая универ-

сальность в передаче генетической информации, биосинтезе белка, а также процессах клеточного деления.

В живой клетке насчитывается около сорока миллионов больших и малых молекул, принимающих участие, примерно, в трех-четыре тысячи химических реакций. Но если к этим тысячам реакций применить принцип универсальности, то окажется, что все они у клеток разной сложности структурной организации могут быть объединены всего в несколько метаболических циклов: жирных, ди- и трикарбоновых кислот, пентозофосфатный, глюкуронат-силулозный, дикарбоксилатный, кофермента А, образования мочевины и некоторые другие.

Известно, что живые системы отличаются адекватной и быстрой ответной реакцией и приспособляемостью к внешнему воздействию; высоким коэффициентом использования энергии; экономичностью в расходовании различных веществ; закономерностью и строгой последовательностью во времени и пространстве процессов деления клетки, роста, дифференциации, формообразования, лежащих в основе индивидуального развития; строгой последовательностью и координацией биосинтеза белка и многочисленных других процессов и реакций, составляющих метаболизм.

Все это свидетельствует о наличии в организмах совокупности систем строгой регуляции. В результате химической эволюции выработалась универсальность и в принципах функционирования регуляторных механизмов клетки. Регуляция метаболизма осуществляется несколькими общими, универсальными для всех организмов путями: индукцией и репрессией синтеза белков-ферментов, изменением их активности по принципу обратной связи, изостерии, аллостерии, доступностью субстратов и коферментов.

Список литературы

- А н ф и н с е н К. Б. Молекулярные основы эволюции. М., Изд-во иностр. лит., 1962.
- Б е р н а л Д. Ж. Биохимическая эволюция. Горизонты биохимии. М., «Мир», 1964.
- Б о л д у н и н Э. Основы динамической биохимии. М., Изд-во иностр. лит., 1949.
- Г е й л ь б р у н Л. Динамика живой протоплазмы. М., Изд-во иностр. лит., 1957.
- Г р и н Д., Г о л ь д б е р г е р Р. Молекулярные аспекты жизни. М., «Мир», 1968.
- И б е р т Д. Ж. Взаимодействующие системы в развитии. М., «Мир», 1968.
- К а л ь в и н М. Химическая эволюция. М., «Мир», 1973.
- К а р р е р П. Курс органической химии. Л., Госхимиздат, 1960.
- О п а р и н А. И. Возникновение жизни на Земле. М., Изд-во АН СССР, 1957.
- G o u l d E. S. Mechanism and Structure in Organic Chemistry, Holt, New York, 1959.
- A l l e n J. M. Molecular Organization and Biological Function, Harper and Row Publishers Inc., New York, 1967.
- F i s e r L., F i s e r M. Organic chemistry, 3rd ed., D. C. Heath and Co. Boston, Massachusetts, 1956.

- Herz W. The shape of Carbon Compounds, New York, Benjamin, 1966.
 Höber R. Physical Chemistry of Cells and Tissues, Blakiston, Philadelphia, Pennsylvania, 1946.
 Pauling L. The Nature of the Chemical Bond., 3rd ed., Cornell University Press, Ithaca, New York, 1960.
 Speakman J. C. Molecules, New York, Mc Graw — Hill Book Co., Inc, 1966.
 White A., Handler P., Smith E. L. Principles of Biochemistry, Mc Graw — Hill Book Co., New York, 1, 64.

Глава V

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, ИХ СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ



Фридрих Мишер (1844—1895)

Немногим больше ста лет тому назад, в 1869 г., 25-летний швейцарский врач Фридрих Мишер выделил ядра из клеток гноя. Для этого он разрушал клетки гноя перевариванием с помощью пепсина в присутствии соляной кислоты с последующей экстракцией в смеси эфир — вода. На поверхности раздела фаз ядра сосредотачивались в виде чистой фракции. Чтобы убедиться в чистоте этой фракции, Мишер применил микроскопический контроль. Таким образом, сто лет назад, когда не существовало современных технических возможностей фракционирования клеточных органелл, ядра были выделены в чистом виде. Мишер применил цитохимические и биохимические методы исследования ядер. Он установил, что в состав ядер входит неизвестное вещество и назвал его *нуклеином*. При подкислении это вещество выпадало в осадок. Последний содержало около 10% фосфора и обладал кислотными свойствами, так как жадно соединялся с некоторыми основными красителями. Поскольку эти кислоты были найдены в ядре (nucleus), они были названы *нуклеиновыми кислотами*. Как было позже установлено, кислый характер этих соединений объясняется тем, что одна гидроксильная группа фосфорной кислоты является свободной и может диссоциировать. Затем Мишер установил, что нуклеиновые кислоты являются высокомолекулярным веществом и соединены с белком, имеющим основные свойства. Этот белок был назван им *протамином*. Теперь известно, что кислая реакция нуклеиновых кислот в клетке, их отрицательные заряды, которые несут остатки фосфорной кислоты, сбалансированы двухвалентными катионами или основными полиаминами (проламины, гистоны).

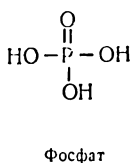
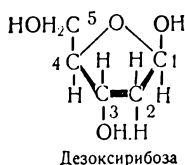
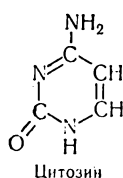
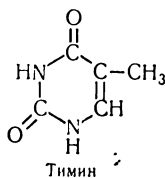
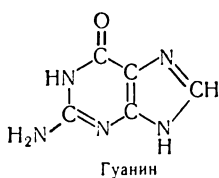
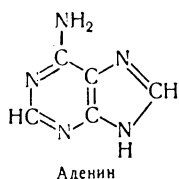
Современник Мишера О. Гертвиг при изучении оплодотворения у морского ежа впервые обнаружил слияние ядер яйцеклетки и сперматозоида. В связи с этим он высказал предположение, что нуклеин является веществом, которое отвечает за передачу наследственных свойств.

Юлиус Сакс пошел дальше. Он считал, что нуклеин, который приносит сперматозоид в яйцеклетку, должен отличаться от уже находящегося там нуклеина. Эти предположения о функции нуклеиновых кислот (нуклеина) вскоре были забыты. Но продолжалось интенсивное изучение химии нуклеиновых кислот.

Было установлено, что в клетке присутствуют нуклеиновые кислоты двух типов. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и рибонуклеиновая кислота (РНК). За последние годы изучение структуры и функции нуклеиновых кислот ведется настолько интенсивно, что стало одной из самых важных и увлекательных разделов молекулярной биологии.

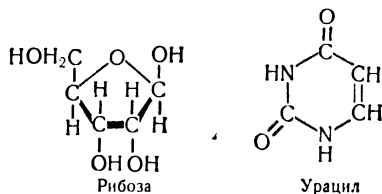
1. Химическое строение нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты представляют собой линейные полимеры с очень высокой молекулярной массой от 20 000 до $2 \cdot 10^6$ у рибонуклеиновых кислот и от 100 000 до $20 \cdot 10^9$ — у дезоксирибонуклеиновых кислот. Это соответствует полимерным цепям, которые содержат от десятков и сотен до тысяч и сотен тысяч нуклеотидов. В основе полимерной цепи лежит нуклеотид, который состоит из азотистого основания, сахара и фосфата.

В состав дезоксирибонуклеиновых кислот входят пуриновые азотистые основания аденин и гуанин, ядро которых состоит из пиримидина и имидазольного кольца, и пиримидиновые азотистые основания цитозин и тимин, а также дезоксирибоза и фосфат, структуру которых графически можно представить следующим образом:

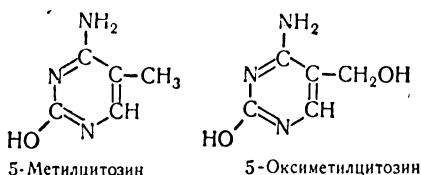


Молекула пиримидиновых оснований имеет плоскую структуру, а пуриновых — с небольшой складкой. Химическое строение РНК от ДНК отличается тем, что в ее состав входит урацил, иногда

тимин, а вместо дезоксирибозы — рибоза:



В молекуле нуклеиновых кислот иногда обнаруживают другие основания: 5-метилцитозин и 5-оксиметилцитозин вместо цитозина. Концентрация 5-метилцитозина составляет в растительной клетке 5—7, а в животной — 1,5%, у некоторых бактериофагов в полинуклеотидной цепи представлен только 5-оксиметилцитозин.



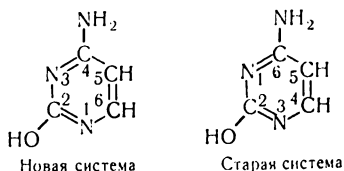
В состав молекулы нуклеиновой кислоты пентоза входит в β-конфигурации и с помощью 1-углеродного атома соединяется с пиримидиновыми основаниями через 1'-атом азота, а с пуриновыми — через 9-атом азота. Остаток фосфорной кислоты присоединен к 5'-атому пентозы. Это имеет отношение к биосинтезу нуклеиновых кислот, так как рост полинуклеотидной цепи идет именно за счет присоединения нуклеозид-5'-фосфатов. В результате соединения рибозы или дезоксирибозы с азотистыми основаниями образуются соответственно рибонуклеозид или дезоксирибонуклеозид, которые лучше растворяются в воде, чем их основания. При фосфорилировании последних образуются соответственно рибонуклеотид и дезоксирибонуклеотид.

Состояние 2'-гидроксильной группы в молекуле пентозы оказывает значительное влияние на свойства РНК и ДНК. Присутствие водорода в 2'-положении дезоксирибозы делает более прочной и стабильной связь между С—2 и С—3 атомами углерода. В связи с этим молекула ДНК приобретает еще более высокую устойчивость, стабильность и компактность — свойства, необходимые для соединения, выполняющего роль переносчика генетической информации.

Кроме этого, в состав нуклеиновых кислот в небольших количествах (от 0,1 до 1,0%) входят так называемые минорные основания. К ним относятся: 2-метиладенин, 6-аминопурин, 6-диметиламинопурин, 1-метилгуанин, 6-окси-2-метиламинопурин, 5-метилцитозин. Минорные (редкие) основания больше обнаруживаются в транспорт-

ных рибонуклеиновых кислотах и могут составлять от 8 до 19% всех азотистых оснований. Они входят в состав ДНК, и также являются продуктами метилирования основных компонентов (в состав ДНК некоторых вирусов входит не тимин, а урацил).

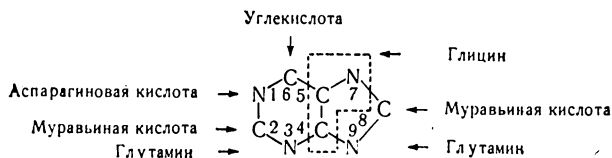
Существует путаница в системе нумерации атомов пиримидинового кольца. Следует придерживаться принятой новой системы нумерации.



Биосинтез пентозы (рибозы) происходит в процессе реакций неполного окисления молекулы глюкозы по пентозофосфатному циклу.

Достаточно сложно протекает биосинтез дезоксирибозы. У *E. coli* он осуществляется с участием тиоредоксина и НАДФ. Но, возможно, дезоксирибоза образуется из уксусного и 3-фосфоглицеринового альдегидов. У некоторых микроорганизмов имеется фермент, который активирует этот процесс.

Биосинтез пуриновых и пиримидиновых оснований осуществляется в результате сложной цепи реакций, которые в настоящее время достаточно хорошо изучены. Синтез ядра пуринов протекает с участием муравьиной кислоты, глицина, аспарагиновой кислоты, глутамина, углекислоты, аденозинтрифосфорной кислоты и ферментов, катализирующих отдельные реакции процесса. С помощью меченых исходных продуктов установлено происхождение всех атомов азота и углерода, входящих в состав пуринового ядра. Это схематически можно представить таким образом:

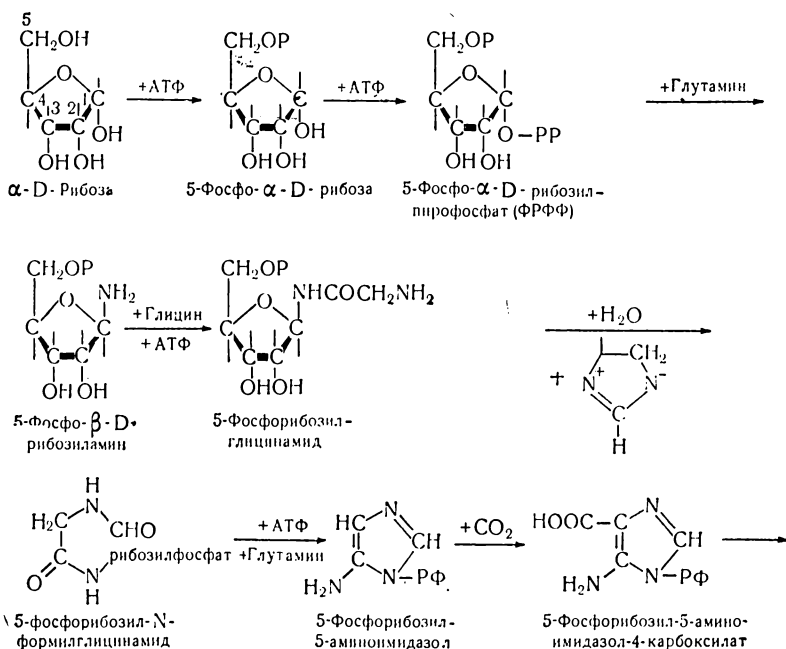


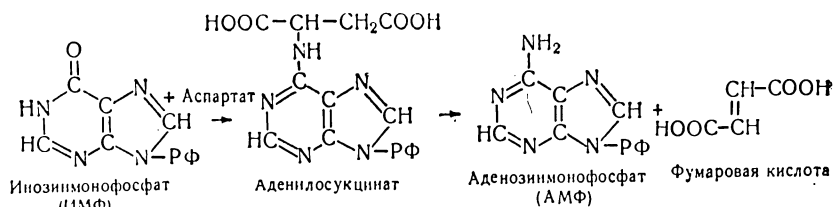
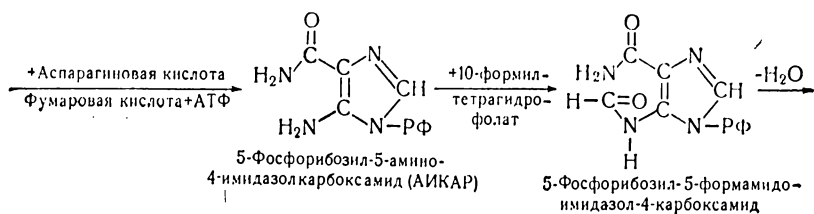
Азот в первом положении N—1 происходит из аспарагиновой кислоты, C—2 и C —8 — из муравьиной кислоты, N—3 и N—9 — из глутамина, C—4, C—5 и N—7 — из глицина, C—6 — из углекислоты. Каким же образом происходит включение этих атомов азота и углерода в соответствующие положения пуринового ядра?

Этот процесс начинается с фосфорилирования α -D-рибозы, заканчивается образованием инозинмонофосфата и протекает таким

образом. После двухкратного фосфорилирования α -D-рибозы образуется фосфорибозилпирофосфат, который взаимодействует с глутамином. При этом амидная группа замещает остаток пирофосфорной кислоты и образуется фосфорибозиламин. Свободная энергия этой реакции мало изменяется, так как в энергетическом отношении гликозидфосфорная и амидная связи близки друг к другу. В дальнейшем вступает в реакцию глицин. При этом образуется кислото-амидная (пептидная) связь за счет энергии, которая высвобождается при гидролизе молекулы аденозинтрифосфорной кислоты. Возникающий при этом 5-фосфорибозилглицинамид взаимодействует с 5,10-метенилтетрагидроfolатом и глутамином, и за счет энергии АТФ возникает 5-фосфорибозил-5-аминоимидазол. Последний подвергается карбоксилированию, и образуется новый промежуточный продукт 5-фосфорибозил-5-аминоимидазол-4-карбоксилат. Это соединение за счет энергии АТФ своей карбоксильной группой реагирует с аминок группой аспарагиновой кислоты, а затем с фумаровой кислотой. Возникает 5-фосфорибозил-5-амино-4-имидазолкарбоксамид (АИКАР). В результате взаимодействия этого соединения с 10-формилтетрагидроfolатом с последующей дегидратацией образуется инозинмонофосфат, являющийся предшественником аденозинмонофосфата и гуанозинмонофосфата.

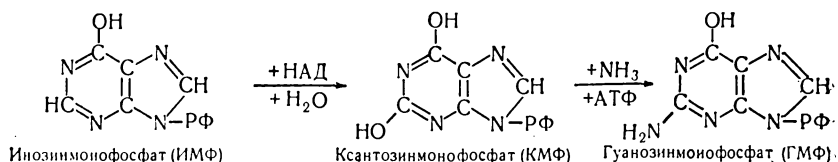
Ниже представляется цепь реакций многоступенчатого и сложного процесса образования пуриновых оснований.



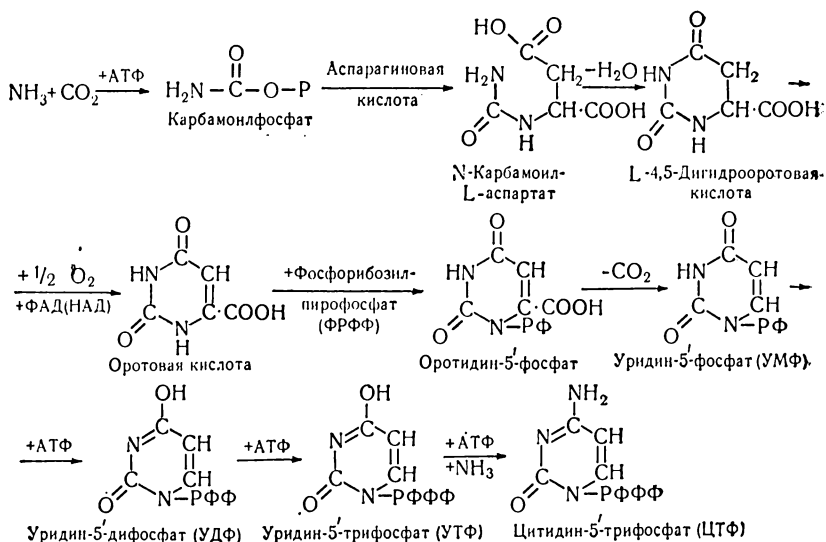


Таким образом, в результате цепи реакций с участием пентозы-*D*-рибозы, фосфорной кислоты, ряда органических и аминокислот образуется пуриновый нуклеотид — аденозинмонофосфат.

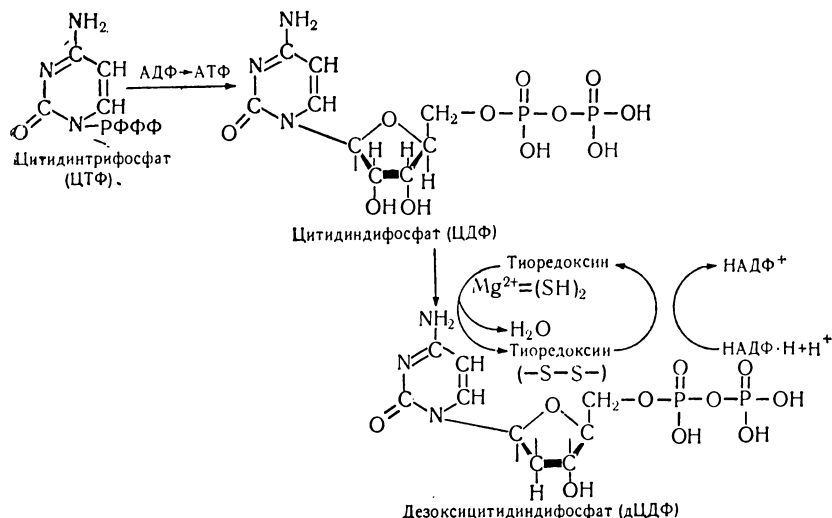
В результате ряда реакций превращения инозинмонофосфата образуется второй пуриновый нуклеотид — гуанозинмонофосфат.



Биосинтез пириимидинов протекает иным путем:

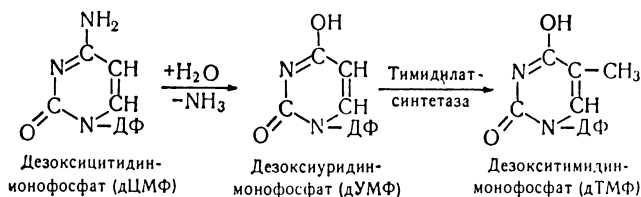


Пятиуглеродный сахар входит в состав нуклеотидов нуклеиновых кислот в виде рибозы и дезоксирибозы. Биосинтез дезоксинуклеотидов протекает следующим образом:



Дезоксицитидиндифосфат (дЦДФ) в присутствии АТФ с помощью нуклеозиддифосфаткиназы превращается в дезоксицитидинтрифосфат (дЦТФ). Последний, также как и другие нуклеозидтрифосфаты, является исходным продуктом биосинтеза дезоксирибонуклеиновой кислоты.

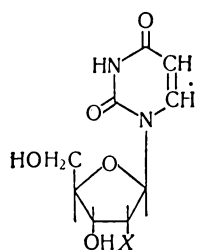
Образование тимидинфосфатов происходит через ряд превращений дезоксицитидиндифосфата (дЦДФ), который в результате действия дезоксицитидилаткиназы дефосфорилируется в дезоксицитидинмонофосфат. Дезокситимидинмонофосфат в присутствии АТФ подвергается фосфорилированию сначала с помощью тимидинмонофосфаткиназы, а затем нуклеозиддифосфаткиназы с образованием дезокситимидинтрифосфата.



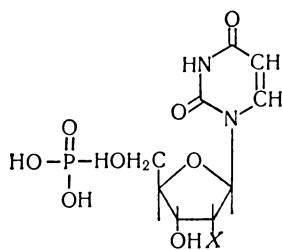
Мы рассмотрели пути биосинтеза пуриновых, пиримидиновых оснований и образование на их основе нуклеотидов, являющихся

исходными мономерами биосинтеза макромолекул нуклеиновых кислот.

Подводя некоторый итог, можно сказать, что синтез мононуклеотидов осуществляется следующим образом. Рибоза или дезоксирибоза фосфорилируются с помощью соответствующих фосфофераз за счет фосфатных остатков АТФ. Затем к альдегидной группе рибозо-5-фосфорной кислоты или дезоксирибозо-5-фосфорной кислоты надстраиваются соответствующие соединения, которые служат исходными для синтеза пуринов. В случае синтеза пиримидиновых мононуклеотидов к этим фосфорилированным пентозам присоединяются соответствующие производные пиримидина. Образование мононуклеотидов на основе уже готовых, находящихся в свободном состоянии пуринов протекает через синтез нуклеозидов, которые затем подвергаются фосфорилированию. Компонентами нуклеиновых кислот, таким образом, являются основания, сахар пентоза и фосфорная кислота, из которых состоят нуклеозиды и нуклеотиды:



Нуклеозид:
Рибонуклеозид: X=ОН
Дезоксирибонуклеозид: X=Н

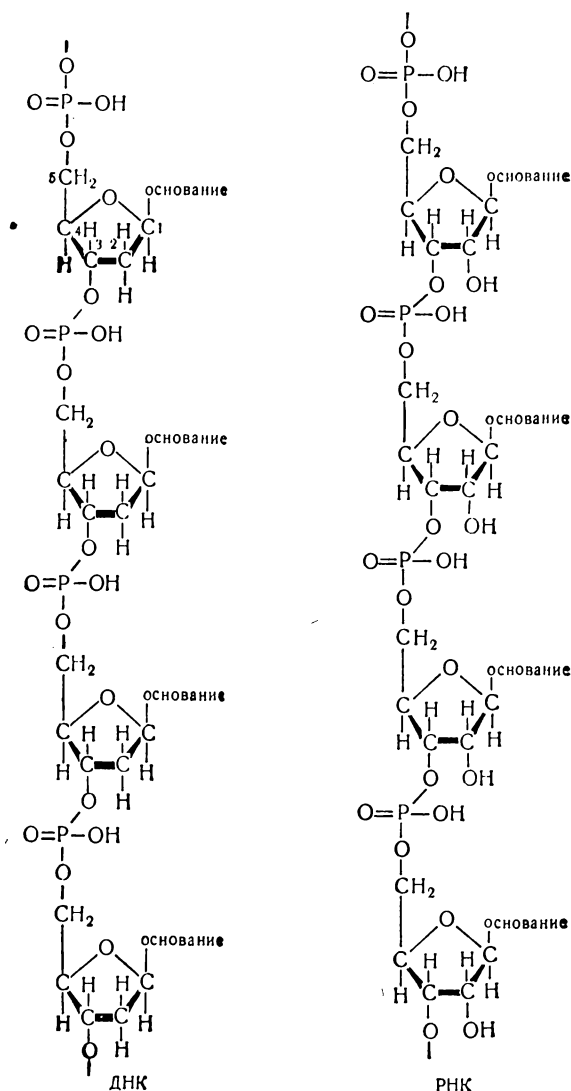


Нуклеотид:
Рибонуклеотид: X=ОН
Дезоксирибонуклеотид: X=Н

Компоненты нуклеиновых кислот и их сокращенные обозначения

Основания	Нуклеозид	Рибонуклеозидфосфаты			Дезоксирибонуклеозидфосфаты		
		моно-	ди-	три-	моно-	ди-	три-
Аденин	Аденозин	АМФ	АДФ	АТФ	дАМФ	дАДФ	дАТФ
Гуанин	Гуанозин	ГМФ	ГДФ	ГТФ	дГМФ	дГДФ	дГТФ
Цитозин	Цитидин	ЦМФ	ЦДФ	ЦТФ	дЦМФ	дЦДФ	дЦТФ
Тимин	Тимидин	—	—	—	дТМФ	дТДФ	дТТФ
Урацил	Уридин	УМФ	УДФ	УТФ	—	—	—

Отдельные нуклеотиды в молекуле ДНД соединяются между собой 3', 5'-фосфодиэфирной связью. Части полинуклеотидных цепей ДНК и РНК могут быть изображены таким образом.



Как видно, цепь главных валентностей полимера образована попеременно эфирносвязанной фосфорной кислотой с рибозой или дезоксирибозой, соединенной с фосфорной кислотой эфирной связью в 3' и 5' атомах углерода фуранозного цикла.

Последовательность нуклеотидов, в которой они связаны 3', 5'-фосфодиэфирными связями, является характерной и устойчивой для каждой нуклеиновой кислоты и определяет ее первичную структуру. В полинуклеотидной цепи РНК во втором положении вместо Н находится ОН-группа. Поэтому в молекуле ДНК только один

концевой нуклеотид содержит ОН-группу, тогда как в молекуле РНК все нуклеотиды имеют в своем составе свободные гидроксильные группы. Это обуславливает различие химических и физических свойств полидезоксирибонуклеотидов и полирибонуклеотидов.

Нуклеиновые кислоты представляют собой длинные полинуклеотидные цепи. Начало цепи обозначается фосфатом или гидроксильной группой при 5'-углероде пентозы. Конец цепочки обозначается фосфатом или гидроксильной группой при 3'-углероде пентозы. Со-кращенно направление цепочки обозначают так: 5' → 3' или 3' → 5'. Обозначение 5' → 3' соответствует направлению считывания информации при репликации и транскрипции. Концевой нуклеозид, который связан с полимерной цепью через гидроксил при С—5', называется 3'-концевым остатком, а концевой нуклеозид, связанный с полинуклеотидной цепью через гидроксил при С—3', называется 5'-концевым остатком. Если полинуклеотид изображается в виде одноцепочечного полимера, то справа находится 3'-концевой остаток, а слева — 5'-концевой нуклеозид. Гидроксильные группы в положении С—3' и С—5' на концах полинуклеотидной цепи могут вступать в реакцию ацилирования и другие реакции.

Макромолекулы нуклеиновых кислот представляют собой сложные образования, в которых определенным образом в пространстве взаимно расположены составляющие их компоненты. В связи с этим различают несколько уровней структурной организации нуклеиновых кислот. Под *первичной структурой* понимают последовательность нуклеозидных мономеров, соединенных фосфодиэфирной связью в неразветвленную полинуклеотидную цепь. *Вторичная структура* — пространственное расположение нуклеозидных мономеров, которое определяется силами межплоскостных взаимодействий между основаниями. Если молекула нуклеиновой кислоты представлена двумя комплементарными цепями, то под вторичной структурой понимают двойную спираль, силами стабилизации которой являются водородные связи между комплементарными гетероциклами оснований параллельных цепей, а также силами межплоскостного взаимодействия соседних оснований одной и той же цепи. Под *третичной структурой* имеются в виду иные типы фиксированной укладки полинуклеотидных цепей. *Четвертичная структура* — это пространственное расположение взаимодействующих макромолекул, как правило, полинуклеотидов и полипептидов, в различных нуклеопротеидах (рибосомах, вирусах, хромосомах).

2. Электронная структура мономеров нуклеиновых кислот. Биологическая активность нуклеиновых кислот зависит от реакционной способности остатков фосфорной кислоты, нуклеозидных звеньев и особенно от входящих в их состав азотистых оснований. Компоненты мономеров нуклеиновых кислот вступают во взаимодействие с другими элементами и молекулами с образованием ковалентных связей. Но, кроме этого, реакционная активность проявляется во взаимодействии оснований с белками (гистоны, вирусные белки, белки-ферменты нуклеинового обмена), а также ионами

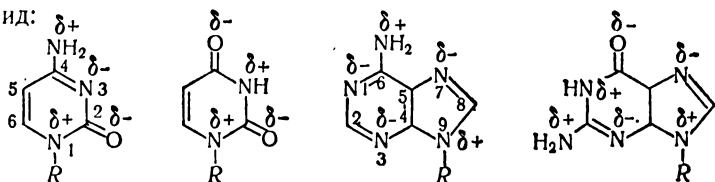
металлов в макромолекуле. Реакционная активность мономерных компонентов как в случае взаимодействия с другими соединениями, так и при взаимодействии внутри макромолекул нуклеиновых кислот зависит от их электронной структуры.

Рассмотрим электронную структуру гетероциклических азотистых оснований как наиболее важных компонентов нуклеиновых кислот. Распределение электронной плотности в молекуле оснований будет рассматриваться только в основном невозбужденном состоянии и у тех таутомерных форм, в сторону которых смещено таутомерное равновесие и которые отличаются большей стабильностью при обычных, физиологических условиях.

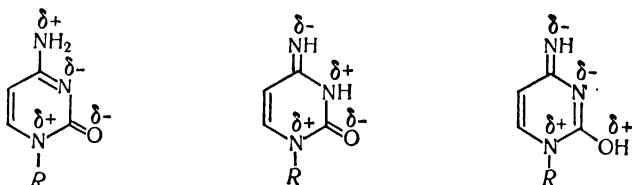
Азотистые основания относятся к циклическим сопряженным резонирующим системам, имеющим в своем составе простые и двойные связи. В их молекулах электроны можно разделить на два типа: σ -электроны, которые принимают участие в образовании простых связей, создают жесткий скелет молекул, локализованы попарно между соседними атомами; π -электроны, образующие двойные связи. Они создают расплывчатое облако с определенным статистическим распределением электронной плотности, охватывающим всю молекулу. С помощью обычных структурных формул невозможно отразить такое распределение электронной плотности в молекуле. π -Электроны в сопряженных, резонансных молекулах определяют их физико-химические свойства. Это зависит от того, что π -электроны связаны менее жестко, чем σ -электроны, и поэтому легче принимают участие в различных химических реакциях и физических перестройках. Видимо, по этой причине многие биологически важные вещества представлены сопряженными резонирующими молекулами, богатыми π -электронами. Атомы в молекуле оснований перекрываются между собой электронными облаками и образуют π -электронные молекулярные орбитали. Тригональные атомы, входящие в состав молекулы оснований, между собой сопряжены sp^2 -гибридизацией. Каждый из элементов, входящих в состав гетероцикла, вносит соответствующий вклад в общую систему электронов молекулы.

Атомы азота экзоциклических аминогрупп цитозина, аденина, гуанина, связанные с тремя другими атомами, вносят в общую π -электронную систему два электрона и не имеют несвязывающих орбит. Такие атомы азота, как N—3 цитозина и N—7 гуанина и аденина, связанные с двумя атомами, в общую π -электронную систему вносят только по одному π -электрону. Поэтому их несвязывающая орбита имеет два электрона. У кислорода на несвязывающей орбите находятся также два электрона; в общую молекулярную систему он вносит два электрона. А кислород карбонильной группы и углерод вносят вклад в общую систему только по одному электрону. Атомы, которые вносят в общую систему π -электронов по два электрона, являются *электрофильными* и обладают частичным положительным зарядом (δ^+), а атомы, вносящие один π -электрон, — *нуклеофильными* и обладают отрицательным зарядом (δ^-). Сопряжение гетероатомов в одной из таутомерных форм оснований имеет та-

кой вид:

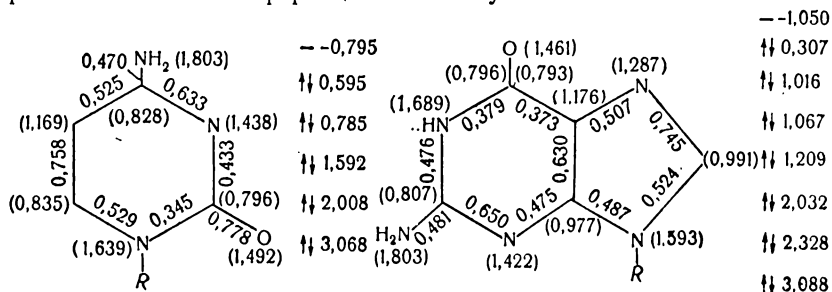


Но распределение π -электронной плотности будет неодинаковым у различных таутомерных форм одного и того же основания, что видно на примере цитозина.



Электронная плотность в гетероцикле пиримидиновых оснований должна быть повышена на углероде в пятом положении по сравнению с углеродом в шестом положении. Для объяснения химической активности отдельных атомов, входящих в гетероцикл оснований, составляются молекулярные диаграммы, на которых указывается плотность π -электронов на отдельных атомах, участвующих в сопряжении; порядок связей между атомами, которые характеризуют плотность электронного облака между атомами; распределение энергетических уровней молекулы.

Все эти характеристики молекулы оснований различны у их таутомерных форм. Примером может служить молекулярная диаграмма кетоаминных форм цитозина и гуанина:

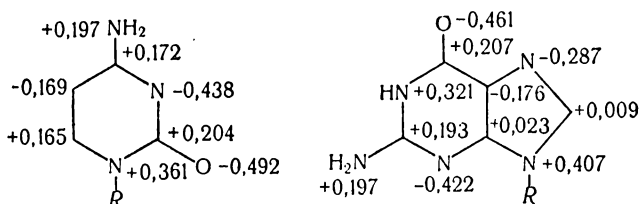


В скобках около атомов указана плотность π -электронов, а вдоль связей — их подвижные порядки, показывающие плотность электронного облака между атомами. Рядом с молекулярными диаграммами приведены схемы распределения π -электронов по молекулярным энергетическим уровням в условных единицах (β)¹.

¹ Энергия обычно выражается функцией параметра β . Абсолютная величина его в среднем равна $83,7 \cdot 10^8$ Дж/моль. Разность энергий между двумя разрешенными энергетическими уровнями в этилене равна 2β .

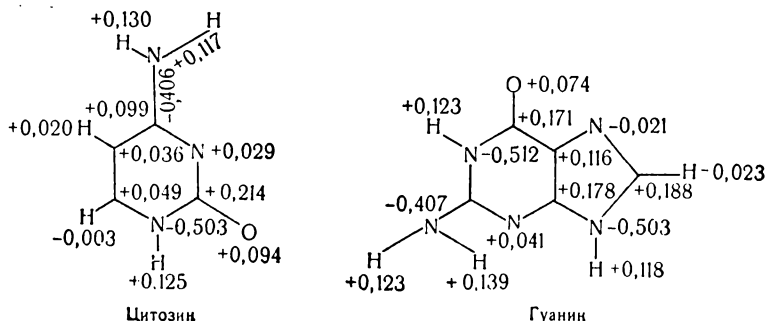
Незаполненные электронные орбитали обозначены знаком «—», электронные орбитали, на которых находятся два электрона с противоположными спинами,— знаком « $\uparrow\downarrow$ ».

С помощью молекулярных диаграмм можно определить роль того или иного атома как электроположительного и электроотрицательного центров молекулы. Об этом можно судить по частичному заряду (δ^+ , δ^-) на соответствующих атомах. Величина δ^+ или δ^- определяется вычитанием из числа электронов, которые вкладывает атом в общую π -электронную систему, значения π -электронной плотности на этом атоме. Отсюда можно определить реакционную способность атома, его нуклеофильную или электрофильную атакуемость. Например, на кетоаминных таутомерных формах цитозина и гуанина частичные заряды на скелетных и экзоатомах распределяются таким образом. Как видно, в гетероцикле пи-



римидиновых оснований атомы углерода С—2, С—4, С—6 несут частичный положительный заряд, а С—5 — частичный отрицательный заряд. У пуринов частичные положительные заряды расположены на С—2 и С—6, а еще менее положительный заряд — на С—8 углеродном атоме. Таким образом, те группы или атомы, которые поставляют в общую π -электронную систему молекулы по два π -электрона, имеют частичный положительный заряд, а те, которые вкладывают по одному π -электрону, несут значительные отрицательные заряды. Зная распределение электронной плотности в молекуле азотистых оснований, можно судить о реакционной способности их отдельных атомов.

Некоторые физические свойства оснований, такие как дипольные моменты, зависят также и от распределения σ -электронных зарядов, которые в кетоаминных формах некоторых азотистых оснований имеют такой вид:



Распределение зарядов в молекуле оснований исходя из σ -электронов остается в принципе таким же, как и при определении по π -электронам. Например, в пиримидиновых основаниях большая электронная плотность отвечает атому С—5, а положительный заряд сосредоточен на С—6 цитозина и аденина. Таким образом, по распределению электронной плотности в гетероциклических основаниях можно говорить о реакционной способности молекулы исходя из свойств составляющих ее атомов.

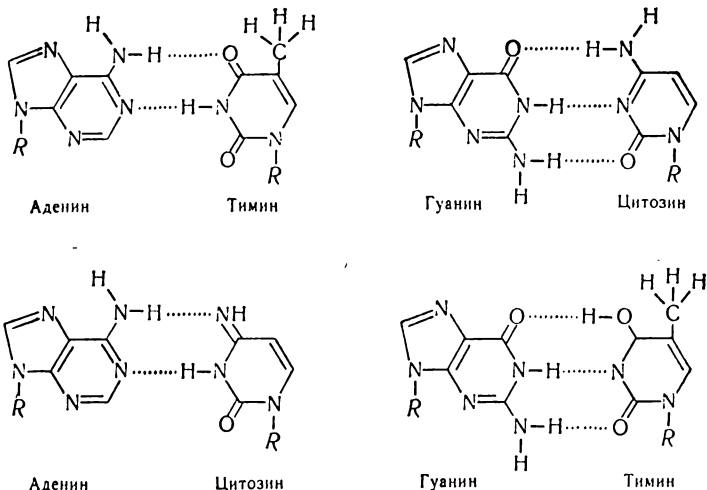
Важное значение имеет энергетическая характеристика оснований нуклеиновых кислот. При этом наибольшее значение имеет энергия резонанса, энергия высшего и низшего свободных уровней. π -Электроны могут располагаться на различных разрешенных энергетических уровнях. В основном состоянии они занимают уровни с минимально возможной энергией. Большое значение в стабилизации молекул гетероциклических оснований имеет энергия резонанса или энергия делокализации. Энергия резонанса зависит от числа электронов, которые принимают участие в сопряжении. Но разные молекулы содержат разное количество π -электронов, поэтому более надежным показателем стабильности молекулы считается энергия резонанса, определенная на один делокализованный электрон. Чем выше будет значение этой энергии, тем более устойчивой будет молекула. По этому показателю гетероциклические основания располагаются в ряд: аденин > гуанин > цитозин > урацил. Из этого следует, что в различных процессах ядро аденина будет более устойчивым. Возможно, это одно из обстоятельств, в силу которых аденин занял важнейшее место в энергетике клетки.

По энергии резонанса можно также судить об устойчивости различных таутомерных форм гетероциклических оснований. Энергия высшего занятого и низшего свободного уровней является также надежным показателем реактивности молекулы. В основе этого лежит легкость удаления электрона из молекулы. Чем выше энергия высшего занятого уровня, тем легче электрон может оторваться от молекулы, и это приводит к образованию катиона. Чем ниже энергия низшего свободного уровня, тем легче молекула присоединяет электрон, становясь анионом. По энергии высшего занятого уровня орбиталей азотистые основания располагаются в таком порядке: гуанин > аденин > цитозин > урацил > тимин.

Из этого следует, что лучшим донором электронов является гуанин, а худшими — урацил и тимин. Пурины легче отдают электроны, чем пиримидины. По энергии низкого свободного электронного уровня пока определенно не установлены электроноакцепторные свойства оснований.

Большое биологическое значение имеет таутомерия оснований, так как это ведет к нехарактерному их спариванию и может резко сказываться в передаче генетической информации, а также синтезе специфических белков. Все гетероциклические основания могут находиться в различных таутомерных формах, что зависит от числа экзотических групп в них и определяет их химические

взаимодействия с другими основаниями, их производными. Например, цитозин в своей аминной форме имеет такую электронную структуру, при которой он соединяется с гуанином. Но если он перейдет в иминную форму, то будет соединяться уже с аденином.



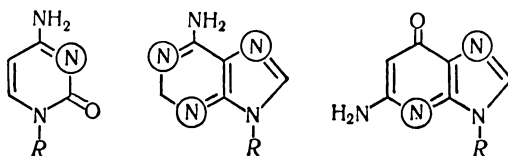
Основания в различных таутомерных формах обладают различными химическими свойствами, реакционной активностью. Такая таутомерия оснований может привести к изменению очередности нуклеотидов в цепи и нарушению матричного синтеза.

Гетероциклические основания нуклеиновых кислот находятся чаще в кето- и аминных таутомерных формах. Переход основания из одной таутомерной формы в другую сопровождается перестройкой в молекуле σ -связей, изменением структуры π -электронной системы сопряженной молекулы и ее энергии резонанса, изменением системы внутримолекулярных водородных связей и степени сольватации молекулы. Последнее имеет исключительно большое биологическое значение, особенно если таутомерное равновесие рассматривается в условиях раствора. Изменение всех этих свойств определяет устойчивость той или иной таутомерной формы молекулы гетероциклических оснований нуклеиновых кислот. Если рассчитывать энергию молекулы по изолированным связям, то кетоформы оснований оказываются более стабильными, чем оксиформы. Поэтому в таутомерном равновесии оснований нуклеиновых кислот должны преобладать кетоформы, так как они отражают более полно свойства этих соединений. В случае аминно-иминной таутомерии энергия резонанса выше у аминформ. Поэтому таутомерная аминформа преобладает и выполняет в клетке основные функции. ИК-спектры, а также спектры ядерного магнитного резонанса, показывающие место локализации в молекуле подвижных протонов, подтверждают наличие дикетопиримидиновой таутомерной формы, в которой находятся основания этих нуклеозидов. Это под-

тверждается также константой таутомерного равновесия, которое сдвинуто в сторону дикетоформы. Все эти характеристики говорят о том, что у цитозина преобладает кетоаминная таутомерная форма. У пиримидиновых оснований большое значение на смещение таутомерного равновесия оказывает насыщение связей С—5 и С—6. Но и при этом пиримидиновые основания преобладают в кетоформе.

Между особенностями в изменении химической структуры оснований и их таутомерным равновесием имеется связь. Изменение химической структуры оснований приводит к установлению таутомерного равновесия в сторону редких форм. Это заставляет предполагать важную роль таутомерии в биогенезе нуклеиновых кислот. По-видимому, в процессе химической эволюции основания, которые легко переходили из одной таутомерной формы в другую, отбрасывались в связи с тем, что они могли привести к очень неустойчивой наследственной основе.

В таутомерном равновесии пуриновых оснований аденина и гуанина преобладает аминная структура. Гетероциклические основания в подавляющем большинстве случаев участвуют в химических реакциях в растворах в протонированной (катионной) или депротонированной (анионной) форме. В кислой среде основания протонируются, т. е. приобретают протон, а в щелочной, наоборот, теряют его. Такие основания, как цитозин и аденин, имеют выраженные основные свойства, поэтому присоединяют протон в слабокислой среде и отдают его в сильнощелочной. Тимин и урацил являются слабыми кислотами, приобретают протон только в сильнокислой среде и отдают его в слабоосновной. Понятно, что протонироваться должны те атомы в гетероцикле оснований, которые несут наибольший частичный отрицательный заряд, создаваемый наличием π -электронов. Такими атомами являются N—3 в цитозине; N—1, N—3, N—7 в аденине; N—3, N—7 в гуанине. Эти атомы образуют



только две σ -связи и обладают неподеленной электронной парой, что способствует присоединению протона, тогда как экзоциклические атомы азота образуют три σ -связи, несут частично положительный заряд, и присоединение протона будет связано с выведением из сопряжения пары электронов на p -орбите и затратой энергии извне. Но поскольку гетероциклические азотистые основания являются сопряженными системами, место присоединения протона может не совпадать с местом локализации положительного заряда, так как последний может быть смещен, делокализован. При этом большая часть заряда может оказаться не на том атоме, к которому присоединен протон, а на другом близлежащем атоме. Это

наблюдается на аденине, где к азоту N—1 присоединяется протон, а положительный заряд смещен к экзациклическому азоту аминогруппы и к азоту N—9.

Важным критерием состояния оснований является их кислотно-основное равновесие. Оно зависит от многих факторов: структуры самих оснований, наличия заместителей, образования водородных связей, цвиттерионов, температуры, ионной силы и других условий. Если судить о кислотно-основном равновесии по константе ионизации (K), то ее значение уменьшается при введении в гетероцикл таких заместителей, как дезоксирибоза и рибоза. При этом уменьшение константы ионизации значительнее в случае рибозы. Это зависит, очевидно, от возможности возникновения водородной связи между водородом 2—ОН пентозы и кислородом карбонильной группы C—2 пиримидинового ядра. На константу ионизации оснований оказывают влияние фосфатные группы нуклеотидов. Константа ионизации зависит от положения фосфатной группы по отношению к основанию. В случае нуклеозид-5-фосфата константа ионизации имеет более высокое значение, так как его фосфатная группа пространственно расположена ближе к циклу основания, чем 2- и 3-фосфатные группы, которые к тому же находятся в *транс*-положении по отношению к гетероциклу основания.

Таким образом, исходя из электронной структуры (электронные плотности на атомах, порядки связей, энергия заполненных и свободных электронных уровней), таутомерии, кислотно-основных свойств можно предсказать реакционную активность оснований нуклеиновых кислот. Из всех этих показателей реагентности основания наиболее важным является электронная плотность на атомах. Поэтому атом с более высокой электронной плотностью будет атаковаться электрофильными реагентами с наибольшей, а нуклеофильными с наименьшей силой. Исходя из этого нуклеофильные реагенты будут атаковать в пиримидинах атомы C—2, C—4, C—6, а в пуринах — C—2, C—4, C—6, C—8, которые имеют частичный положительный заряд. Электрофильные соединения будут атаковать атомы C—5 кислорода карбонильных групп, так как они имеют частичный отрицательный заряд. Реакционная активность оснований может быть определена и по порядку связи. Атаке электрофильным реагентом будет подвергаться связь с более высоким порядком. Такой наиболее реакционноспособной является двойная связь между C—5 и C—6 атомами углерода у пиримидинов.

По энергетическим характеристикам также можно предсказать реакционную активность молекулы. При этом основным критерием служит энергия высшего занятого и низшего свободного электронных уровней. Электрофильный реагент будет атаковать соединение, если у последнего энергия высшего занятого уровня выше энергии низшего свободного уровня реагента. Нуклеофильный реагент будет атаковать соединение, если у последнего энергия низшего свободного уровня ниже, и тем легче молекула присоединяет электрон. Это значит, что если соединение имеет более высокий высший заня-

тый уровень, то оно способно к электрофильным реакциям. Если соединение имеет более низкий свободный уровень, то оно способно к взаимодействию с нуклеофильным реагентом.

3. Макромолекулярная структура нуклеиновых кислот. По структуре молекулы все нуклеиновые кислоты можно разделить на одноцепочечные и двуцепочечные. Такое деление нуклеиновых кислот на две группы носит определенную условность, так как в одной и той же их молекуле могут иногда присутствовать одноцепочечные и двуцепочечные участки. При соединении комплементарных оснований двух цепей с помощью водородных связей образуется двуцепочечная структура, которая отличается более высокой жесткостью, устойчивостью и стабильностью. Но в стабилизацию двуспиральной структуры ДНК большой вклад вносят не только водородные связи, но также и вандерваальсовы силы. Это приобретает значение в связи с тем, что при комплементарном избирательном взаимодействии на основе стерического соответствия между аденином и тимидином, гуанином и цитозином межатомные расстояния способствуют возрастанию вандерваальсовых сил взаимодействия. Значение вандерваальсовых связей в стабилизации двуспиральной структуры ДНК видно из того, что в определенных условиях денатурация двуспиральной структуры ДНК наступает еще при сохранении водородных связей. За небольшим исключением, ДНК представлена двуцепочечной структурой. Но двуцепочечную структуру имеют также РНК некоторых вирусов. В этом случае РНК является также носителем генетической информации. К двуцепочечным структурам относится так называемая *репликативная* форма РНК, которая возникает при размножении некоторых вирусов, содержащих одноцепочечную РНК. Двуцепочечные РНК обнаружены и у эукариотов. К одноцепочечным нуклеиновым кислотам относятся: ДНК ряда вирусов, в частности некоторых колифагов; различные типы клеточной РНК — рибосомальная, информационная, транспортная, хотя все указанные типы РНК содержат как одноцепочечные, так и двуцепочечные области в своей молекуле.

Двуцепочечные нуклеиновые кислоты. Д в у ц е п о ч е ч н а я ДНК, как указывалось выше, представляет собой полимер, имеющий молекулярную массу от 10^6 до $200 \cdot 10^9$ и выше. Молекула ДНК имеет такие размеры, что при наложении небольших гидродинамических сил происходит ее разламывание на фрагменты.

Легче удается выделить в нативном состоянии ДНК вирусов. ДНК, выделенная из вируса фХ174, имеет кольцевую форму, одно- и двуцепочечную структуру. Одноцепочечная имеет длину 1,77 мкм и молекулярную массу 1700000 дальтон, двуцепочечная — соответственно 1,64 мкм и 3400000; вирус λ — 17,2 мкм и 32000000; бактериофаг Т2 — 56,0 мкм и 130000000 и т. д. Уже двуцепочечную молекулу ДНК *E. coli*, имеющую кольцевую форму, содержащую 4,2 млн. нуклеотидных пар с молекулярной массой 2800000000, очень трудно выделить в нативном состоянии. Но молекула ДНК эукариотов может содержать от $5,5 \cdot 10^9$ и больше пар нуклеотидов, т. е.

превышает размеры ДНК *E. coli* больше чем в тысячу раз и легко разрывается на фрагменты. Поэтому о размерах молекул ДНК имеется еще недостаточно сведений.

Связующим звеном отдельных мономеров, т. е. дезоксирибонуклеотидов, в цепи являются остатки сахара и фосфорной кислоты. У дезоксирибозы С—4 участвует в образовании кольца, а С—2 не имеет гидроксильной группы. Поэтому отдельные нуклеотиды в молекуле ДНК могут соединяться с помощью гидроксильных групп дезоксирибозы только в 3'- и 5'-положениях. Это подтверждается тем, что электрометрическое титрование при рН-12,0—13,5 не показывает наличия свободных гидроксильных групп. В связи с отсутствием ОН-группы при С—2 дезоксирибозы ее гидролиз при $\text{pH} > 7,0$ протекает иначе, чем РНК, и исключается образование циклического фосфата. Эта особенность в структуре ДНК используется при ее выделении и отделении от РНК.

Молекулы ДНК представляют собой длинные, тонкие, достаточно жесткие неразветвленные нити или имеет циклическую форму. Диаметр этих нитей может быть около 20 Å. Первая форма молекулы в виде жестких неразветвленных нитей характерна для высших организмов, вторая — циклическая — для некоторых прокариотов (вирусы, бактерии) и клеточных органелл (митохондрии, хлоропласты). Циклические формы ДНК отличаются более низкой молекулярной массой.

До начала 50-х годов XX ст. ученые не знали структуры молекулы ДНК. Большинство склонялось к тому, что генетическая информация передается с помощью белков. Были забыты работы Ф. Мишера и предположения О. Гертвига о том, что нуклеин является веществом, которое отвечает за передачу наследственных свойств. Понятно, что без выяснения пространственной организации молекулы ДНК невозможно было объяснить ее биологическую функцию, в частности, ответить на вопрос, каким образом осуществляется хранение, воспроизведение и передача генетической информации.

Однако накапливались данные, которые говорили о том, что именно нуклеиновые кислоты, а не белки являются материальными носителями генетической информации. Исходя из поведения молекулы ДНК при различной температуре, рН, ионной силе, из изменения ее оптического вращения, поглощения в ультрафиолетовой части спектра следовало, что нативная молекула ДНК не является абсолютно гибкой беспорядочно свернутой структурой. Направлялось предположение о регулярной упорядоченности трехмерной структуры, в которую уложены цепи ДНК в макромолекуле, и что эта трехмерная структура разрушается при определенных условиях. Разрешение этого вопроса продолжалось в течение 15-ти лет. Уже в 1938 г. В. Астбюри, изучая дифракционную картину кристаллической ДНК и двойное лучепреломление ее растворов в потоке, установил, что гетероциклические азотистые основания расположены перпендикулярно длинной оси молекулы дезоксири-



Джеймс Уотсон.



Френсис Крик.

бонуклеиновой кислоты. Плоскости ядра гетероцикла расположены параллельно в виде стопки. После этого было предложено несколько различных моделей ДНК. С. Фурберг считал, что трехмерная структура ДНК образована свертыванием одной цепи так, что ядра гетероциклических оснований уложены параллельно друг другу и образуют вид стопки. А вокруг этой стопки в виде спирали уложен остов цепи. Л. Полинг в 1953 г. предложил свою модель макромолекулы ДНК. По этой модели трехмерная структура представлена тремя цепями, закрученными одна вокруг другой в виде спирали. При этом гетероциклические азотистые основания расположены снаружи, а фосфатные группы — внутри макромолекулы ДНК. Однако на основе всех этих предположений о трехмерной структуре макромолекулы ДНК невозможно было объяснить многие общеприродные явления, в том числе передачу генетической информации.

Решить этот вопрос можно было только на основе полного знания трехмерной пространственной конфигурации макромолекулы ДНК. Только на этой основе могла быть понята биологическая функция ДНК. Ответ на этот вопрос в 1953 г. дали Дж. Уотсон и Ф. Крик, предложившие модель структуры ДНК. Основным методом работы Дж. Уотсона и Ф. Крика было построение стереохимических моделей структуры ДНК и поиск такой структуры, которая не противоречила бы уже имеющимся в то время данным. А к 1953 г. уже было известно, что основания в молекуле ДНК, полученной в виде волокон из концентрированных гелей, расположены таким образом, что дают высокосимметричную картину дифракции рентгеновских лучей (Р. Фрэнклин, М. Уилкинс); в нуклеотидном составе различных ДНК количество аденина равно количеству тимина, а количество гуанина равно количеству цитозина, т. е. величины отношений этих пар оснований равны единице, а

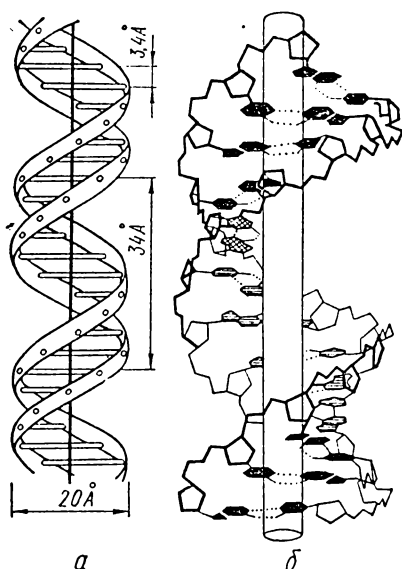


Рис. 17. Схематическое изображение молекулы ДНК (а). Две фосфатно-сахарные цепи изображены в виде лент, а пары оснований, удерживающих одну цепь возле другой, — в виде горизонтальных перекладин. Модель двойной спирали ДНК (б). Пунктирные линии соответствуют водородным связям между основаниями (Watson, Crick, 1953).

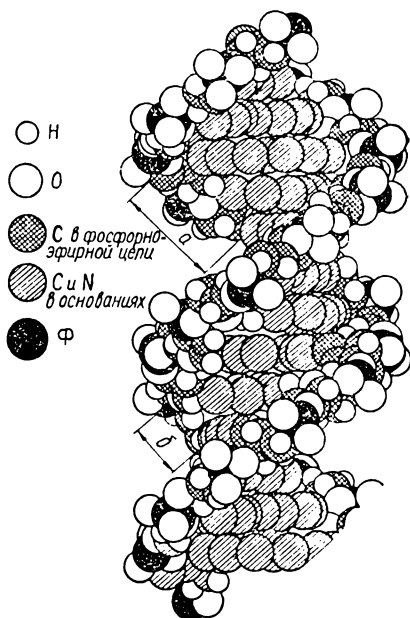


Рис. 18. Пространственная атомная модель ДНК, в которой соблюдены относительные размеры атомов. Основания расположены внутри. Видны обе бороздки:

а — большая; б — малая (Wilkins, 1955).

характерным специфическим значением для ДНК из клеток различных организмов (Э. Чаргафф); что ДНК, согласно данным рентгеноструктурного анализа, имеет спиральное строение и в ее молекуле наблюдается периодичность, имеющая размерность 3,4 Å и 34 Å; нуклеотидные звенья в полинуклеотидной цепи соединены 3'5'-фосфодиэфирной связью; полинуклеотидная цепь не имеет ветвления; дезоксирибоза находится в молекуле ДНК в фуранозной форме; N-гликозидная связь имеет β-конфигурацию; а также были получены полные данные рентгеноструктурного анализа о структуре гетероциклических ядер аденина, гуанина, цитозина. Все эти сведения послужили ориентировкой в работе Дж. Уотсона и Ф. Крика, которые создали оптимальную стереохимическую модель макромолекулы ДНК.

Согласно этой модели, молекула ДНК представляет собой двойную правовинтовую спираль и состоит из двух полинуклеотидных цепей (рис. 17). При этом одна цепь обвита вокруг другой таким образом, что пары гетероциклических оснований расположены внут-

величина отношения $\frac{A+T}{G+C}$ не равна единице и является харак-

ри молекулы, а фосфатные остатки и пентозные кольца навиваются в виде спирали. Каждая пара оснований повернута вокруг оси относительно соседних пар на 36° . На один виток спирали приходится 10 пар нуклеотидов; поперечник молекулы составляет около 20 Å; проекция витка на ось молекулы равна 34,6 Å; трансляционное расстояние на один нуклеотид составляет 3,4 Å. Остатки дезоксирибозы расположены непараллельно оси молекулы ДНК и образуют с плоскостями оснований угол $74\text{--}79^\circ$. В результате образуются две бороздки: малая и большая (рис. 18).

Цепи являются антипараллельными, идут в противоположных направлениях и считываются с разных концов. Предполагается, что при образовании нуклеопротеида полипептидная цепь основного белка укладывается внутри малой бороздки и приобретает вид спирали. Выступающие боковые группы полипептидной цепи, которые несут положительные заряды, взаимодействуют с отрицательными зарядами фосфатных групп ДНК. Обе цепи соединены между собой с помощью водородных связей, которые возникают между гетероциклическими основаниями. При этом образование водородных связей является специфичным, так как они возникают строго между аденином и тиминном, гуанином и цитозином. Такая точность подгонки пар оснований определяется сочетанием их размеров, соответствует возникновению правильной спирали и не ограничивает соответствующую последовательность нуклеотидов. Таким образом, разрешенными парами оснований в молекуле ДНК являются А—Т и Г—Ц-пары, т. к. пары А—Г занимают слишком много пространства, а Ц—Т, наоборот, имеют меньший размер и между ними будет большое расстояние.

Азотистые основания с гидрофобными свойствами создают внутри молекулы ДНК гидрофобную зону. Поэтому двойная спираль ДНК стабилизируется не только водородными связями, но также гидрофобными взаимодействиями между азотистыми основаниями.

Из фага Т2 была выделена ДНК, которая представляет собой одну гигантскую молекулу, имеющую молекулярную массу $1,2 \times 10^8$ дальтон и состоящую из 10^5 пар оснований (рис. 19). Таким образом, макромолекулу ДНК, по модели Дж. Уотсона и Ф. Крика, можно представить себе в виде винтовой лестницы, состо-

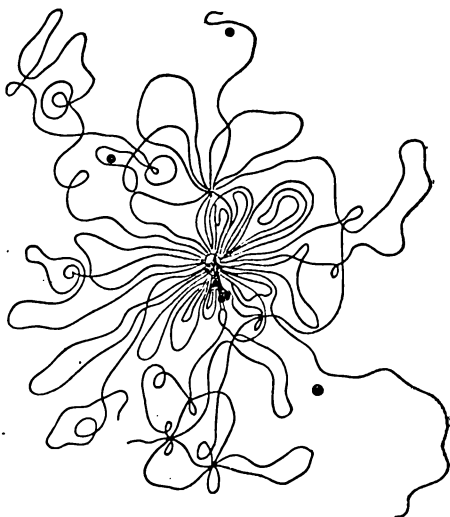
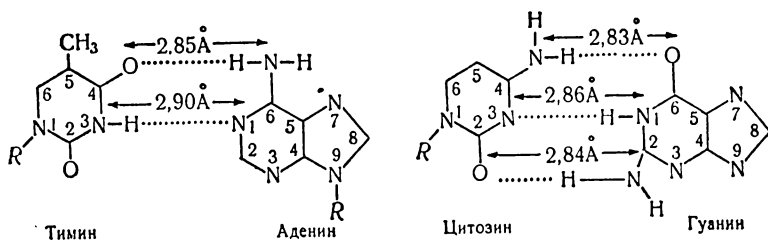


Рис. 19. Фотография ДНК фага Т2, представленной одной гигантской молекулой.

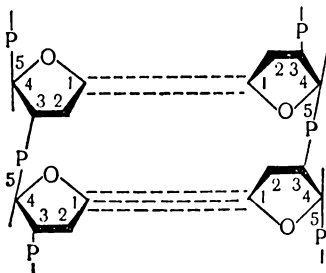
вом которой являются сахаро-фосфатные цепи, а ступеньками — комплементарные пары гетероциклических оснований. В последовательности расположения этих пар оснований и заключена генетическая информация, которая передается при клеточном делении разъединением этих двух цепочек ДНК и воспроизведением над каждой из них недостающих комплементарных цепей. Молекулярная структура ДНК, предложенная Дж. Уотсоном и Ф. Криком, не только не противоречила всем ранее известным фактам, но явилась основой для объяснения ряда фундаментальных биологических проблем, в частности химических механизмов передачи генетической информации.

Исходя из того, что структура и свойства гетероциклических оснований делают их центром биохимических превращений, которые осуществляются с участием ДНК, их изучению было уделено особое внимание.

Комплементарные пары оснований образуют водородные связи. Этот процесс протекает спонтанно без участия ферментов, и выбор комплементарных оснований происходит без катализа. Между аденином и тиминном возникает две водородные связи, а между гуанином и цитозином — три водородные связи, которые становятся неустойчивыми за пределами pH от 4 до 11, и тогда двуцепочечная ДНК нарушается.



В структурных формулах водородные связи изображены пунктиром. Как видно, длина связей между основаниями мало изменяется (от 2,83 до 2,90 Å). Это способствует тому, что оба углеводно-фосфатных скелета могут принимать эквивалентные спиральные конформации. Соседние основания одной и той же цепи связаны между собой фосфатно-сахарными звеньями с помощью фосфорно-диэфирных ковалентных связей, образование которых происходит с участием ферментов. Схематически это может быть представлено следующим образом:



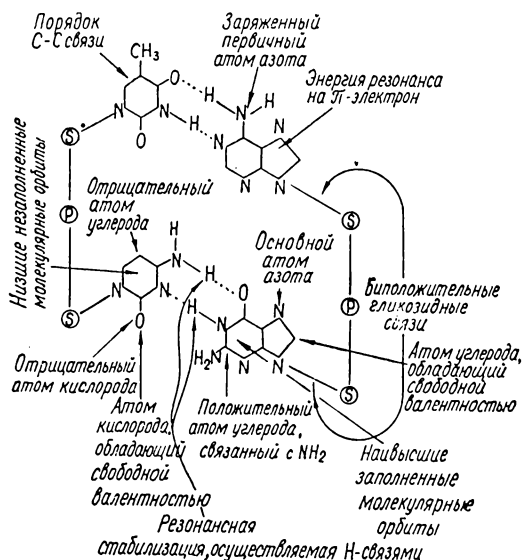


Рис. 20. Локализация некоторых электронных и энергетических индексов в гетероциклических основаниях нуклеиновых кислот, в большей степени определяющих свойства и реакционную способность молекулы (Пюльман, 1966).

Наиболее фундаментальная характеристика оснований получена при изучении их электронной структуры. С помощью метода молекулярных орбит можно определить основные электронные и энергетические индексы в гетероциклических основаниях. На этой основе предсказывается локализация основных центров химических, физико-химических и биологических свойств оснований нуклеиновых кислот.

В настоящее время получена характеристика электронной структуры комплементарных пар. Но она мало отличается от рассмотренных выше данных для отдельных свободных оснований. Это объясняется, видимо, тем, что водородные связи относятся к энергетически слабым взаимодействиям и мало изменяют электронную структуру оснований в составе молекулы нуклеиновой кислоты. На рис. 20 представлены наиболее важные характеристики электронной структуры, которые отражают основные физико-химические свойства оснований и их реакционную способность. На основе электронной структуры нуклеиновых кислот, в частности их гетероциклических оснований, рассмотрены их важнейшие химические свойства, которые представлены в виде сводной схемы на рис. 21.

Двухцепочечная ДНК в зависимости от условий (содержание воды, ионная сила и др.) приобретает определенную структурную организацию. На основе кристаллизации солей различных щелочных металлов ДНК при различной влажности в настоящее время установлены три основные конформации полинуклеотидной цепи — А,

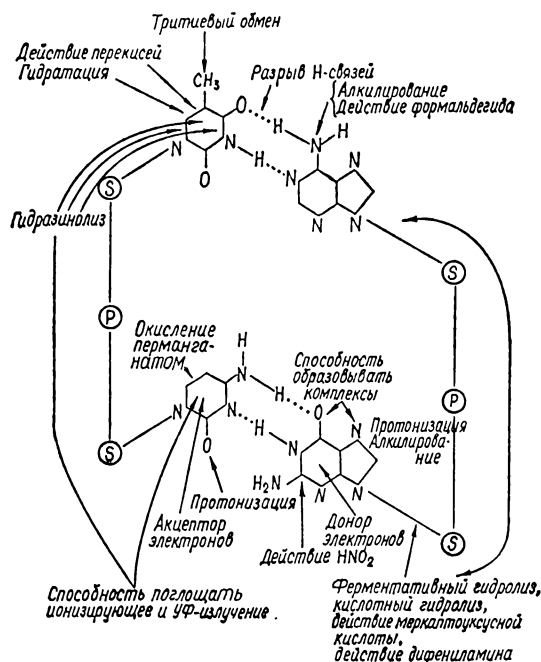


Рис. 21. Локализация основных центров химических и физико-химических свойств в гетероциклических основаниях нуклеиновых кислот (Гюльман, 1966).

В, С. При изменении относительной влажности и типа катиона, который связан с остатком фосфорной кислоты, эти формы могут превращаться друг в друга (рис. 22).

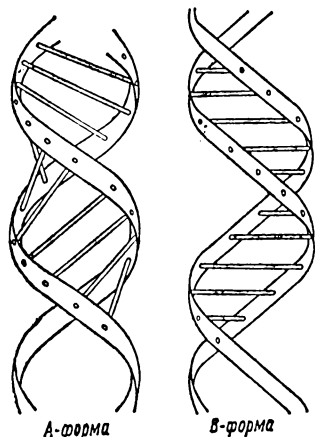


Рис. 22. Схематическое изображение двух форм двуспиральной структуры молекулы ДНК.

Форма А — кристаллическая натриевая соль ДНК, имеет трехмерное строение и возникает при 75% относительной влажности. Но литиевая соль ДНК при этой влажности находится в форме В. Один виток спирали в ДНК формы А включает 11 оснований, у которых угол отклонения от перпендикуляра оси спирали равен 20° , расстояние между основаниями равно $2,56 \text{ \AA}$. Двугранный угол между плоскостями двух оснований приблизительно равен 16° , а диаметр спирали равен $17 \text{ \AA}$. Форма А имеет ось симметрии второго порядка, которая перпендикулярна оси спирали. Отсюда, две цепи спирали ДНК имеют противоположное направление, т. е. каждый конец двучепочечной спирали молекулы ДНК имеет

3'-конец одной цепи и 5'-конец второй. Предполагается, что разные конфигурации молекулы ДНК определяются больше не влажностью, а вариациями в изменении соли. Структура ДНК из различных источников, полученная в виде различных кристаллических форм, в основных чертах одинакова и отличается больше гибкостью цепей. Спиральная структура представлена и в растворе, причем молекула ДНК имеет вид гибкой нити.

Форма В. При влажности выше 92% независимо от катиона ДНК находится в форме В. В этой форме ДНК связана с белком и находится в паракристаллическом состоянии. Молекулы располагаются приблизительно параллельно одна другой, но не в таком строгом порядке, как в кристалле.

Эта форма, по-видимому, выполняет важную роль, так как существует в водном растворе, близком к физиологическому состоянию. На каждый виток приходится 10 нуклеотидов. Диаметр двойной спирали составляет 18 Å, гетероциклические основания размещены ближе к оси двойной спирали, а остатки дезоксирибозы сильно отклонены от нее. Расстояние между смежными парами оснований в растворе ДНК составляет 3,2 Å. Если молекула ДНК имеет молекулярную массу менее $0,3 \cdot 10^6$, то она имеет линейный вид. Если молекулярная масса в пределах $100 \cdot 10^6$, то полинуклеотид принимает форму статистического клубка.

Форма С. Литиевая соль ДНК при влажности около 44% приобретает форму С, которая отличается более рыхлой, раскрученной структурой, так как на один виток приходится только 9 нуклеотидов. Основания отклонены от перпендикуляра к оси спирали приблизительно на 5° и отстоят друг от друга на расстоянии 3,3 Å. Возможно, что в этой форме ДНК находится в хроматине. Форма С имеет меньшее значение, чем формы А и В.

Макромолекула ДНК в форме А имеет правовращающую спираль. Построение левовращающего типа спирали является невозможным без нарушения вандерваальсовых радиусов. ДНК в форме В может иметь левовращающий тип спирали. Но поскольку макромолекула ДНК может переходить из формы А в форму В, то последняя принимает также вид правовращающего типа спирали.

В последнее время установлена новая форма двуцепочечной ДНК в растворе в виде компактных частиц, которая соответствует, видимо, нативному состоянию. Дело в том, что при выделении ДНК из клетки ее молекула выпрямляется и приобретает вид тонких нитей. В такой форме изучались физико-химические свойства ДНК. Упругость двойной спирали ДНК в растворе определяется отталкиванием зарядов фосфатных групп и структурированной водой между бороздками спирали. Если нейтрализовать отрицательные заряды фосфатных групп и связать воду, то нити ДНК теряют упругость и принимают компактную форму. Этот процесс обратимый. Изучение этих конформационных переходов ДНК важно в связи с пониманием ее функции. Как известно, функционально активная ДНК

Таблица 3. Структурные параметры различных форм ДНК

Полинуклеотид	Шаг спирали	Число остатков на виток	Смещение вдоль оси на один остаток, Å	Поворот спирали на один остаток, град	Наклон оснований, град ¹
ДНК					
Форма А	28,1	11,0	2,5	33	20
» В	34,6	10,3	3,4	36	0
» С	31,0	9,3	3,3	39	6
РНК					
Вирус раневых опухолей	30,1	10,0	3,03	36	10—20
Реовирус	30,5	10,0	3,05	36	10—15

¹ Наклон оснований выражен углом между осью спирали и перпендикуляром к плоскости оснований.

в клетке находится в развернутом состоянии, а остальная, «неработающая», находится в плотноупакованном виде.

Имеются другие, промежуточные формы ДНК. Но все они могут быть расположены по трем семействам форм А, В, С. В процессе эволюции преимущество получили те формы ДНК, которые лучше соответствовали белковому узнаванию и выполнению биологической функции. Белковое узнавание в большой мере определяется положением оснований в спирали.

Различные формы нуклеиновых кислот в состоянии двуспиральной конфигурации характеризуются структурными параметрами, которые приводятся в табл. 3.

Исследование макроструктуры двуцепочечной ДНК в связи с выполняемой ею функцией является одной из ведущих проблем современной биологии. Исключительно большую роль в этом сыграла теория Уотсона и Крика, которая обобщила имевшиеся данные о структуре ДНК и явилась толчком в изучении физики, химии и функции нуклеиновых кислот. С помощью предложенной ими стереохимической модели структуры ДНК решался ряд фундаментальных вопросов. Так, стабильность ДНК и ее способность к самовоспроизведению на основе формирования комплементарных цепей объясняла механизмы хранения и передачи генетической информации; на основе специфической последовательности пар оснований становился понятным процесс биосинтеза белка. При этом в линейной последовательности четырех гетероциклических оснований записана информация с помощью четырехбуквенного алфавита, которая затем переписывается на язык белка с двадцатибуквенным алфавитом. Ранее, когда не было модели структуры ДНК, предложенной Дж. Уотсоном и Ф. Криком, оставался трудноразрешимым вопрос, каким образом с такой огромной молекулярной

массой молекула может быть матрицей для синтеза своей копии. Исходя из модели структуры ДНК Дж. Уотсона и Ф. Крика не целая молекула, а одна из двух цепей служит матрицей для синтеза комплементарной половины (цепи), которая, в свою очередь, становится матрицей для синтеза исходной цепи и т. д. То, что предложенная Дж. Уотсоном и Ф. Криком модель структуры ДНК полностью соответствует действительной ее структуре, доказано в настоящее время многими экспериментальными данными и поэтому может рассматриваться как одно из самых крупных обобщений в изучении клетки. На основании сопоставления теоретически рассчитанной дифракционной картины, которую дает трехмерная структура, с экспериментально полученным дифракционным изображением подтверждены предсказанные данные о ширине молекулы (20 Å), расстоянии между основаниями вдоль оси (3,4 Å), шаге спирали (34 Å). Кроме этого, уточнено, что плоскости ядер гетероциклических оснований не идут строго перпендикулярно оси спирали. По молекулярной массе ДНК и ее толщине была определена длина двойной спирали, которая совпадала с наблюдаемой под электронным микроскопом. Полученные данные о физико-химических свойствах ДНК в растворе подтвердили, что ДНК имеет вид неветвящейся палочковидной структуры. При определенной температуре разрываются (плавятся) водородные связи между комплементарными парами оснований, и молекула ДНК распадается на две цепи; этот процесс имеет кооперативный характер. Таким образом, двуцепочечная структура ДНК в настоящее время является хорошо изученной.

Двуцепочечная РНК. У некоторых вирусов (вирус раковых опухолей растений, реовирус и др.) генетический материал представлен двуцепочечной РНК. Двуцепочечная структура РНК образуется также при поражении клетки вирусами, которые вне ее обычно имеют одноцепочечную РНК. При поражении клетки такими вирусами возникает так называемая *репликативная* двуцепочечная РНК, выполняющая роль матрицы для вирусных РНК-полимераз. Обнаружены двуцепочечные РНК и у эукариотов. Но их происхождение и функция остаются неясными.

Двуцепочечные РНК имеют особенности структуры, которые обуславливают более высокую их устойчивость по сравнению с двуцепочечной ДНК. Например, двуцепочечные РНК и ДНК содержат одинаковое количество Г—Ц-пар, но у первой температура плавления равна 99° С, а у второй — 87°. С помощью рентгеноструктурного анализа определена структура двойной спирали РНК. Получен кристаллический рибонуклеотид Г—Ц, на котором рассмотрено расположение атомов в повторяющемся структурном Г—Ц-элементе двойной спирали. Двуцепочечные РНК слабее атакуются и расщепляются рибонуклеазами, чем обычные РНК; имеют водородные связи между гетероциклическими основаниями, что подтверждается тем, что они не способны реагировать с формальдегидом: при нагревании водородные связи разрываются, и

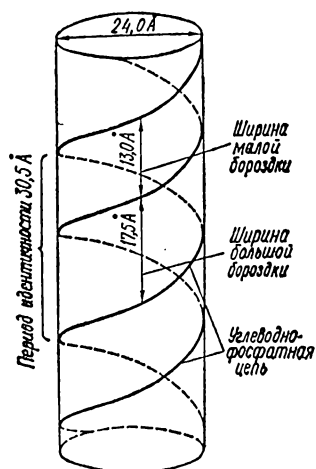


Рис. 23. Одна из возможных макроструктур двуспиральной РНК вируса карликовости риса (Sato, 1966).

двучепочечная РНК переходит в денатурированную форму; молярная экстинкция у них ниже, чем у одноцепочечных РНК; величина отношения аденин\ урацил и гуанин: цитозин приблизительно равна единице.

Но если структура двучепочечной ДНК детально изучена, то остается не совсем ясным строение двучепочечной РНК. Для некоторых вирусных РНК известно, что они имеют структуру, которая отличается от А- и В-форм ДНК (рис. 23). Двучепочечные РНК отличаются по числу нуклеотидных звеньев на один виток; по отклонению оснований от перпендикуляра к оси спирали; по углам, которые образуются между основаниями; по расстояниям между парами оснований. Конформация двуспиральной РНК не зависит от количества воды в кристалле, отличие ее от конформации

двуспиральной ДНК связано, видимо, с присутствием в ее составе рибозы.

Двуспиральная структура РНК может быть представлена двумя моделями, по которым на один виток спирали приходится или по 10, или по 11 нуклеотидных звеньев. Для первой модели (10 звеньев) плоскости гетероциклических ядер оснований отклонены от перпендикуляра к оси спирали на 10° , для второй (11 звеньев) — на 14° . Основания повернуты относительно друг друга для первой модели на 36° , для второй — на $32,7^\circ$. Расстояние между парами оснований равны соответственно 3 и 2,73 Å. Структура с 11 нуклеотидными звеньями на один виток спирали согласуется больше с экспериментальными данными.

Вторичная и третичная структуры РНК, видимо, менее устойчивы, чем ДНК. Двучепочечная структура РНК возникает в результате образования водородных связей между комплементарными основаниями двух цепей или некоторых участков одной и той же полирибонуклеотидной цепи. Это подтверждается на некоторых синтетических полирибонуклеотидах. Например, с помощью полинуклеотидфосфорилазы можно получить полиадениловую и полиуридиловую кислоты. В разбавленных водных растворах они образуют комплекс, в котором между адениловым и урациловым остатками возникают водородные связи:

Поли (А) : Поли (У)

А — — — У

А — — — У

Этот комплекс представляет собой, как и ДНК, двойную спираль, в которой на один виток приходится 10 пар оснований, шаг спирали занимает 34 Å. Наблюдается гипохромный эффект. Оптическая плотность комплекса падает на 34% по сравнению с суммарной величиной поглощения для обоих компонентов. У этого двуспирального комплекса наблюдается явление плавления и перехода спираль — клубок при 60°, в 0,15 моль NaCl, при pH-7 на 34% возрастает поглощение в области 260 нм (гиперхромный эффект). При медленном охлаждении происходит восстановление двуспиральной структуры.

Одноцепочечные нуклеиновые кислоты. Одноцепочечная ДНК. Такие формы ДНК чаще встречаются у вирусов, в частности, у вирусов, поражающих *E. coli*. К ним относятся бактериофаги фX174, fd, S13 и др. Молекулярная масса одноцепочечных ДНК отличается низкими значениями. ДНК бактериофага фX174 состоит всего из 5500 нуклеотидов и имеет молекулярную массу, равную $1,7 \cdot 10^6$.

У одноцепочечных ДНК не соблюдаются чаргаффовы отношения между гетероциклическими основаниями аденин — тимин и гуанин — цитозин. Молярные концентрации оснований в ДНК фага фX174 имеют такие значения (относительно аденина): аденин — 1, тимин — 1,31, гуанин — 0,98, цитозин — 0,80. При нагревании или воздействии другими денатурирующими агентами отсутствует переход спираль — клубок, четко проявляется реакция формальдегида с аминогруппами цитозина, гуанина, аденина, тогда как у двуцепочечных ДНК эти аминогруппы защищены водородными связями между основаниями; одноцепочечные ДНК легко атакуются фосфодиэстеразой из *E. coli* — ферментом, специфическим для одноцепочечных ДНК. Важная структурная особенность этих нуклеиновых кислот состоит в том, что их цепь может быть замкнута и они тогда имеют циклическую форму, устойчивую к действию фосфодиэстеразы из *E. coli*, так как не имеют доступных ее действию концевых 3'-гидроксильных групп.

Циклизация молекулы ДНК происходит за счет ковалентного и нековалентного замыканий кольца. В случае нековалентного замыкания кольца происходит образование водородных связей между комплементарными концевыми гетероциклами оснований. Этот тип слабой термолабильной циклизации. В случае ковалентного замыкания кольца происходит образование ковалентной связи между концевым сахаром и концевым остатком фосфорной кислоты. Это тип сильной термостабильной циклизации, который протекает под влиянием специального фермента полинуклеотидлигазы. Замыкание в циклическую структуру, видимо, происходит таким образом, что 5'-конец каждой цепи замыкается с 3'-концом той же цепи. Ковалентнозамкнутые ДНК отличаются от нековалентнозамкнутых тем, что они гидролитически не расщепляются экзонуклеазами даже в присутствии фосфомоноэстераз. Циклические ДНК имеют вторичную структуру в виде обычной двойной спирали В-формы.

Разрыв ковалентных связей на некоторых участках цепи циклической ДНК достигается с помощью эндонуклеаз, что приводит к изменению конформации ее молекулы. Двойная спираль у ковалентно замкнутых циклических ДНК уложена так, что образуется третичная структура в виде сверхспирали.

С помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности и последующего хроматографического разделения на МАКе из бактериофага фХ174 выделен комплекс ДНК с молекулярной массой, в два раза превышающей массу одноцепочечной молекулы. Оказалось, что этим комплексом является репликативная двуцепочечная ДНК. Это обусловлено тем, что одноцепочечная ДНК фага фХ174 способна к репликации. Это подтвердил А. Корнберг, который выделил одноцепочечную ДНК этого фага и в присутствии ДНК-полимеразы получил комплементарную ей цепь, т. е. двуспиральную структуру, которая выполняет репликативную функцию. При поражении вирусом фХ174 клетки *E. coli* репликация начинается только после того, как возникает двуцепочечная форма. Если мы обозначим полинуклеотидную цепь вируса фХ174 как $+$ цепь, то на ней образуется комплементарная $-$ цепь, и возникает обычная двуспиральная структура. Эта двуспиральная структура затем начинает синтезировать только $+$ цепи вируса, которые в условиях клетки *E. coli* соединяются с белком и образуют вирусные частицы. Синтез одноцепочечных ДНК вируса фХ174 ($+$ цепей) происходит вследствие того, что под действием вируса образуется ДНК-полимераза, которая в роли матрицы изгибает ($-$ цепь).

В ряде случаев ДНК-вируса транскрибируется, образуется информационная РНК, синтезируется белок фермента дезоксирибонуклеазы, которая специфично разрушает ДНК клетки-хозяина. ДНК-вируса метилируется и глюкозилируется, поэтому устойчива к синтезируемой дезоксирибонуклеазе. В данном случае наглядно видно биологическое значение универсальности двуспиральной структуры. Даже в случае одноцепочечной ДНК ее репликативная форма представлена двуспиральной структурой.

О д н о ц е п о ч е ч н а я Р Н К. Известные типы клеточной РНК не имеют строго одноцепочечного строения, так как они содержат в своих молекулах различного размера области с двуцепочечной структурой. Частичное двуцепочечное состояние является характерным для всех рибонуклеиновых кислот при нормальных физиологических условиях. Двойная цепочка при этом образуется за счет водородных связей между комплементарными последовательностями одной и той же полинуклеотидной цепи. Двуспиральные участки в молекулах РНК чередуются с односпиральными. Это придает третичной структуре молекулы жесткость, с одной стороны, а с другой — большую гибкость по сравнению с ДНК и генетической РНК.

Частичное двуцепочечное состояние РНК подтверждается также характером кривой плавления. Но переход кривой плавления РНК, например вируса табачной мозаики (ВТМ), менее резкий, чем ДНК

(рис. 24). Это объясняется тем, что количество спаренных оснований в молекуле РНК меньше, чем в молекуле ДНК. Такие изменения наблюдаются и при нагревании нативной рибосомальной РНК и некоторых вирусов. Из этого следует, что полирибонуклеотидная цепь в некоторых участках сгибается на себя так, что комплементарные основания сближаются, а между ними образуются водородные связи и возникает двуспиральная структура. По Спирину, в образовании двуспиральных участков матричной РНК принимает участие от 40 до 70% всех нуклеотидов молекулы (рис. 25). В односпиральных полинуклеотидах имеются короткие упорядоченные последовательности, между которыми расположены участки не взаимодействующих компонентов. Это отличает вторичную структуру односпиральных полинуклеотидов.

Односпиральные полинуклеотиды отличаются более высокой реакционной способностью их оснований по сравнению с двуспиральной структурой молекулы. Это обусловлено большей доступностью реагентных групп в односпиральной структуре молекул нуклеиновых кислот. Таким образом, однопочечные полинуклеотиды, которыми являются молекулы различных форм клеточных РНК, имеют характерную специфическую вторичную структуру. Одопочечные молекулы различных типов РНК и ДНК отличаются большей пластичностью, но в разнообразии их структурного состояния имеются определенные ограничения. Они зависят от пространственного расположения пентозы по отношению к остатку фосфорной кислоты, а также от образования связи между кислородом при 5'-углероде пентозы и азотом аденина в первом положении.

Двучечных участков меньше у мРНК, что обусловлено, видимо, спецификой ее функции. Двучечное состояние мРНК будет затруднять выполнение функции матрицы при сборке полипептидной цепи на рибосоме. Поэтому у информационных РНК

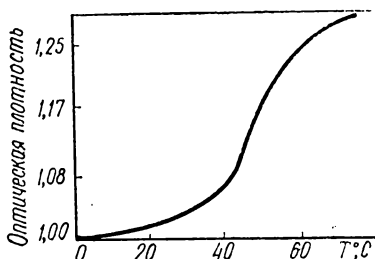


Рис. 24. Кривая плавления РНК вируса табачной мозаики. Процентное содержание спаренных оснований в РНК меньше, чем в ДНК. Поэтому для РНК менее выражен гиперхромный эффект и менее резки переходы кривой плавления, чем для ДНК (по Доти).



Рис. 25. Структура молекулы информационной РНК. Видны спирализованные участки полинуклеотидной цепи (Спирин, 1962).

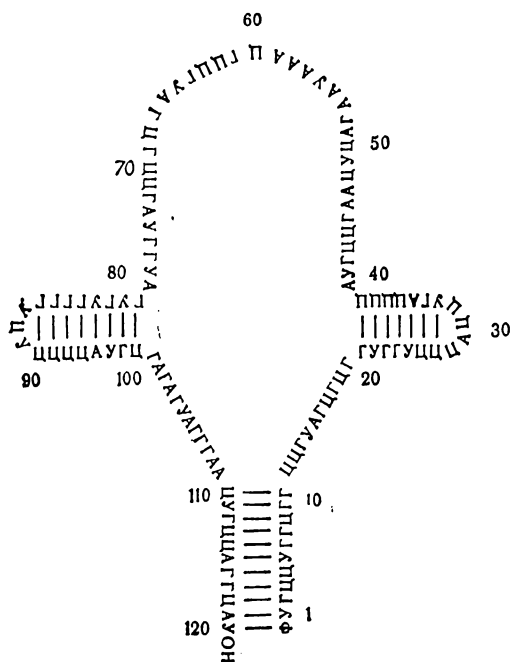


Рис. 26. Нуклеотидная последовательность в 5S-РНК, входящей в состав 50S-субъединицы рибосомы *E. coli* (по Браунли и Сэнгеру).

двучепочечное состояние характерно больше для 5'-конца, что, возможно, способствует узнаванию этого участка белковыми факторами инициации, что обуславливает начало сборки молекулы белка на рибосоме. Большее количество двучепочечных областей имеет рибосомальная РНК. В физиологических температурных условиях при невысокой ионной силе эти небольшие по размеру области с двучепочечной структурой у рРНК составляют около 60—65%; в их состав может входить до 20 нуклеотидов. Они отличаются меньшей упорядоченностью структуры и меньшей устойчивостью по сравнению с двучепочечной ДНК, но имеется определенная регулярность в расположении, и молекула приобретает форму палочки или клубка в зависимости от ионной силы. Возможно, что некоторые изменения в структуре рибосомальной РНК возникают в процессе ее выделения.

В последнее время полностью расшифрована нуклеотидная последовательность 5S-РНК, которая входит в состав 50S-субъединиц рибосом *E. coli*. Вторичная структура ее представлена на рис. 26.

По мнению А. С. Спирина, макромолекулы высокополимерной РНК могут изменять свое состояние и третичную структуру в за-

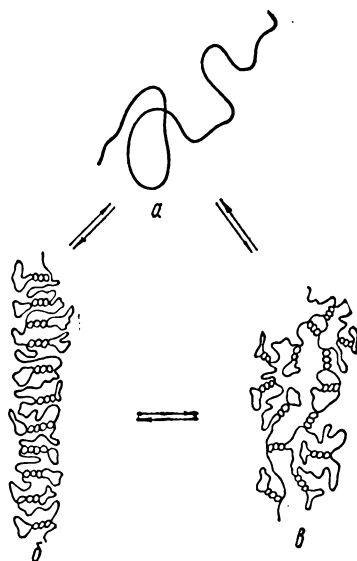


Рис. 27. Состояние макромолекулярной структуры РНК в зависимости от ионной силы раствора, температуры и других факторов (Спирин, 1962):

a — развернутая нить; *б* — компактный стержень; *в* — компактный клубок.

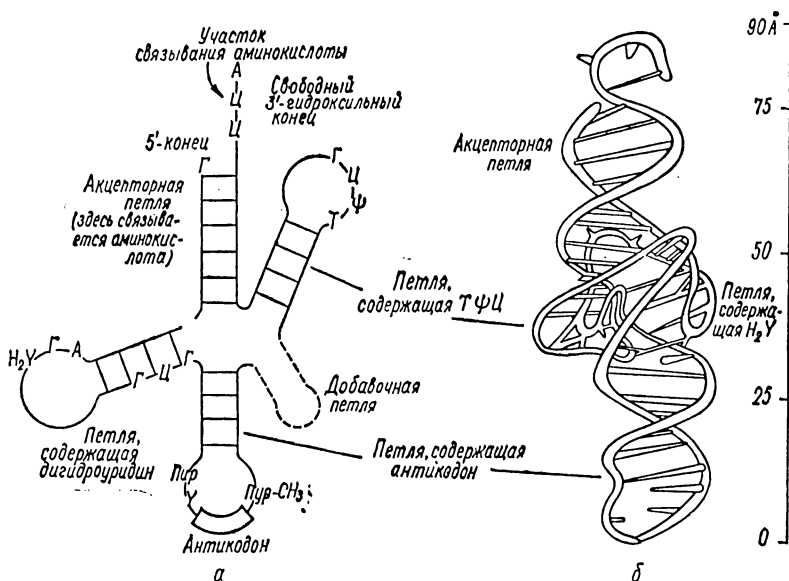


Рис. 28. Вторичная и третичная структуры тРНК:

а — средняя вероятная структура тРНК в виде «клеверного листа»; б — модель третичной структуры тРНК.

висимости от различных условий: температуры, ионной силы раствора и т. д. При этом различные формы могут переходить одна в другую (рис. 27). При комнатной температуре, в условиях низкой ионной силы РНК принимает форму асимметричной компактной палочки. С повышением ионной силы возникает форма компактного клубка. В условиях высокой ионной силы и в бессолевой среде молекула имеет вид развернутой нити и рыхлых беспорядочных клубков. Вторичная и третичная структуры тРНК в настоящее время представляются таким образом (рис. 28).

Молекулы транспортных РНК отличаются значительно более высокой степенью спирализации, более прочной, жесткой конфигурацией, определенной третичной структурой. Это обусловлено не только большей степенью спирализации, но и образованием водородных связей между отдаленными друг от друга нуклеотидами полинуклеотидной цепочки. Например, в состав полинуклеотидной цепи тРНК, выделенной из печени кролика, входит 70 остатков оснований, из них: 21 — гуанина, 20 — цитозина, 11 — аденина, 11 — урацила, 3 — рибозилурацила (псевдоурацила) и 4 других минорных основания. Содержание последних в тРНК может достигать 8—19%.

О значительном количестве оснований, образующих достаточно длинные участки из спаренных последовательностей, говорит эквивалентность между числом комплементарных оснований: аденин — урацил, гуанин — цитозин, высокий гиперхромизм и высокая

температура плавления. На рис. 28 изображена средняя вероятная модель расположения нуклеотидов в транспортной РНК. При повышении температуры раствора транспортной РНК происходит плавление ее вторичной структуры, о чем свидетельствует повышение оптической плотности в области 260 нм и уменьшение оптического вращения. Увеличение оптической плотности объясняется разры-

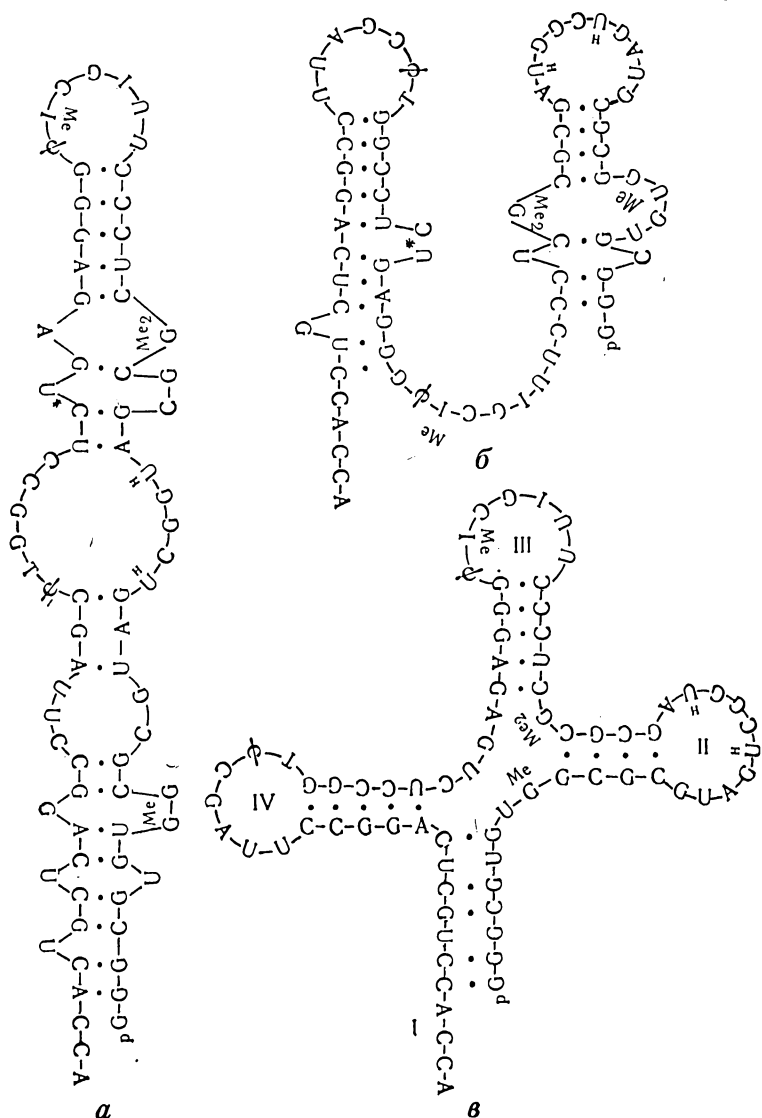


Рис. 29. Возможные структуры аланиновой транспортной РНК из дрожжей:
а — «шпилька»; б — «двушпильчатая»; в — «клеверный лист».

вом связей между комплементарными парами: гуанин — цитозин, аденин — урацил, а также нарушением межплоскостных взаимодействий оснований на односпиральных участках. Величина температуры плавления также зависит от ионной силы среды. Как правило, повышение ионной силы среды и содержания гуанина и цитозина ведет к возрастанию температуры плавления вторичной структуры. Из этого следует, что в молекуле транспортной РНК имеются двуспиральные участки, связанные по принципу комплементарности. Основания, находящиеся в двуспиральных областях молекулы, химически реагируют медленно, а на односпиральных участках — более быстро. Отсюда по скорости той или иной реакции при участии всей молекулы транспортной РНК можно говорить о степени ее спирализации. По реакции взаимодействия оснований транспортной РНК с формальдегидом, по активности обмена атомов водорода и атакваемости РНК-азой принято считать, что около 70—75% оснований всей молекулы образуют комплементарные пары.

При образовании двойной спирали молекулы РНК могут возникать структурные дефекты, например неспиральные участки, возникающие из-за расположения друг против друга некомплементарных оснований. В конце молекулы транспортных РНК имеется 3'-концевой тринуклеотид, который также не участвует в образовании комплементарных пар и двуспиральной структуры. Это подтверждается тем, что только этот концевой тринуклеотид легко отщепляется.

Высокая степень спирализации молекул транспортных РНК вносит вклад в определение их вторичной и третичной структур. После выяснения последовательности нуклеотидов в молекуле многих транспортных РНК были предложены возможные схемы вторичной структуры. Примером может служить аланиновая транспортная РНК, первичная структура которой была установлена раньше других. Предложено три возможные структуры: «шпилька», «двушпильчатая» и «клеверный лист» (рис. 29). Структура «клеверного листа» является более доказанной (А. А. Баев) и имеет, видимо, место во всех транспортных РНК, в которых уже изучена первичная структура. При такой структуре в образовании водородных связей может участвовать большое число оснований.

4. Некоторые физико-химические свойства нуклеиновых кислот. От изменения состава, структуры, состояния нуклеиновых кислот зависят их физико-химические свойства. Наиболее важными являются оптические свойства (оптическая активность, круговой дихроизм, вращение плоскости поляризации, двойное лучепреломление, рассеяние света под разными углами); гидродинамические свойства (константа седиментации, характеристическая вязкость, ломкость) и др.

О п т и ч е с к и е с в о й с т в а . Нуклеозиды, нуклеотиды, высокоупорядоченные двуспиральные нуклеиновые кислоты имеют максимум поглощения в области 260 нм. Это обусловлено поглощением света пуриновыми и пиримидиновыми основаниями. При

этом цитозин имеет максимум поглощения в области 270 нм, а все другие основания — в области 260 нм. Таким образом, у оснований, нуклеозидов, нуклеотидов, полимерных двуспиральных нуклеиновых кислот максимум поглощения практически не изменяется. Но в значительной мере изменяется интенсивность поглощения, оптическая плотность.

У двуцепочечных ДНК оптическая плотность в области 260 нм приблизительно на 40% ниже, чем оптическая плотность эквивалентной смеси их мономеров. Такое изменение оптической плотности называется *гипохромным эффектом* и определяется пространственной упорядоченностью, в данном случае параллельным расположением плоскостей гетероциклических азотистых оснований в двуцепочечной ДНК. Гипохромный эффект начинает проявляться уже при соединении двух-трех нуклеотидов. У одноцепочечных ДНК и РНК эффект гипохромности выражен меньше, чем у двуцепочечных, т. е. снижение оптической плотности коррелирует с двуцепочечным состоянием молекулы ДНК. Поэтому по оптической плотности в области 260 нм мы можем судить о степени спирализации молекулы ДНК. Чем больше в молекуле спирализованных, двуцепочечных участков, тем ниже оптическая плотность. Поэтому плавление двуцепочечных РНК всегда сопровождается более низким гипохромным эффектом. Это определяется меньшей степенью спирализации молекулы РНК по сравнению с ДНК. Поэтому гипохромный эффект служит одним из важных критериев процессов денатурации и ренатурации ДНК.

Вторым важным оптическим свойством молекулы ДНК является *дихроизм*, т. е. разная степень поглощения света, который поляризован вдоль или перпендикулярно ориентации молекулы. Для определения дихроизма молекулы ДНК предварительно ориентируются вдоль направления растяжения полинуклеотидной пленки. В этом случае достигается большее различие в поглощении света в зависимости от направления его поляризации. Поглощение больше, когда свет поляризован перпендикулярно оси макромолекул, т. е. лежит в плоскости азотистых оснований. Таким образом, на основании дихроизма макромолекулы ДНК мы можем делать вывод о том, что в двуцепочечной спирализованной ее структуре плоскости гетероциклических оснований расположены перпендикулярно оси макромолекулы. Очень чувствительно изменяется круговой дихроизм и его дисперсия макромолекулы ДНК в зависимости от конформации ее цепей. При этом основная причина — изменение угла наклона между плоскостью гетероциклических оснований и направлением цепи главных валентностей.

Одним из важных критериев наличия двуцепочечной спирализованной структуры ДНК является сильное правое вращение плоскости поляризованного света. Удельная активность $[\alpha]_D^{25}$ двуцепочечной ДНК достигает 150° , тогда как удельная активность мономерных нуклеотидов и одноцепочечных ДНК при той же длине волны в пять-шесть раз меньше. Высокая удельная активность вращения

плоскости поляризованного света двуцепочечной ДНК обусловлена спирализованным расположением компонентов молекулы, которая не имеет плоскостной симметрии. Но если мы вызовем тепловую денатурацию молекулы ДНК и превратим спирализованную ДНК в одноцепочечную, то удельная активность при этом уменьшится в несколько раз и приблизится к значению активности, характерному для мононуклеотидов или одноцепочечного состояния молекулы. Таким образом, величина оптической активности $[\alpha]_D'$ является также характерным признаком наличия двуцепочечного спирализованного состояния в молекуле ДНК. При этом плавление спиральной структуры ДНК в большой степени зависит от ионной силы раствора. Это говорит о вкладе ионных взаимодействий в стабилизацию двойной спирали ДНК.

Гидродинамические свойства макромолекул ДНК. Громадные размеры ДНК делают ее молекулу легко уязвимой, ломкой при небольших гидродинамических напряжениях среды. Исходя из этого, необходимо учитывать высокую *степень ломкости* макромолекулы ДНК. Ломкость двуцепочечных ДНК обычно выражают их лабильностью к действию ультразвука. При незначительных градиентах скорости потока раствора, которые возникают при взятии пробы пипеткой, уже наблюдаются разрывы двуцепочечных структур и фрагментация молекулы ДНК. У ДНК, имеющих молекулярную массу выше десятков миллионов, молекула разрывается, как правило, на две равные половины. Поэтому ломкость молекулы ДНК является известным препятствием при определении молекулярной массы от $100 \cdot 10^6$ дальтон и выше. Свойство ломкости молекулы ДНК необходимо учитывать как при получении нативных двуцепочечных, спирализованных молекул, так и тогда, когда необходимо добиться поперечного дробления молекулы на фрагменты определенного размера. При дроблении ДНК на фрагменты ее раствор продавливается через капилляры, которые имеют поперечник, составляющий десятки долей миллиметра, под давлением, равным нескольким килобарам. При этом образуются преимущественно фрагменты ДНК с молекулярной массой $(200-300) \cdot 10^6$ дальтон.

Таким образом, генетическая информация, с одной стороны, отличается высокой стабильностью, а с другой — хранится в виде хрупкой молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты, которая распадается на фрагменты при наложении небольших гидродинамических усилий.

Важными гидродинамическими свойствами ДНК являются их *седиментационные характеристики* и *характеристическая вязкость*, с помощью которых можно определить молекулярную массу. Зависимость между константой седиментации, характеристической вязкостью и молекулярной массой может быть выражена формулой: $M_w = \left[\frac{S[\eta]^{1/3} \cdot \eta_0 N \cdot 10^{-13}}{\beta(1 - V\rho)} \right]^{3/2}$, где M_w — средневесовая молекулярная масса; S — константа седиментации (в единицах Сведберга); $[\eta]$ — характеристическая вязкость; η_0 — вязкость

растворителя; N — число Авогадро; V — удельный объем полимера; ρ — плотность растворителя; β — эмпирический коэффициент, определяющий степень доступности объема, занятого макромолекулой, для молекул растворителя и заключенный для большинства полимеров в интервале $2\text{--}2,5 \cdot 10^6$.

Можно вывести более упрощенное выражение зависимости между седиментационной характеристикой, которая получается при ультрацентрифугировании, величиной характеристической вязкости и молекулярной массой. По этой зависимости в логарифмических значениях можно определять молекулярную массу ДНК с помощью такого равенства: $0,665 \lg M = 2,863 + \lg \{[\eta] + 5\}$. При этом характеристическая вязкость определяется по формуле: $[\eta] =$

$= \frac{\eta_{\text{отн}} - 1}{C}$, где $\eta_{\text{отн}}$ — относительная вязкость; C — концентрация в г/100 мл. Повышенные концентрации ДНК в силу межмолекулярных взаимодействий искажают зависимость между вязкостью и молекулярной массой. В связи с этим нужно определить значение характеристической вязкости при разных концентрациях ДНК и экстраполировать полученную кривую до нулевой концентрации.

Зависимость между константой седиментации и молекулярной массой выражается формулами: для ДНК — $0,445 \lg M = 1,819 + \lg (S - 2,7)$; для одноцепочечной РНК — $0,56 \lg M = \lg S_{20} + 2,01$.

Выражение этой зависимости может быть еще больше упрощено и представлено: для ДНК — $M \cong 1000 S^3$; для одноцепочечной РНК — $M \cong 2000 S^2$. Но упрощение этой зависимости сопряжено с отклонениями от точных значений молекулярной массы до 20%. Таким образом, гидродинамические методы определения молекулярной массы нуклеиновых кислот требуют определенной калибровки.

Одним из надежных способов определения молекулярной массы является метод светорассеяния. Если вести измерение светорассеяния до угла $10\text{--}15^\circ$, то можно определять молекулярную массу до $3 \cdot 10^7$ дальтон. Если молекула ДНК имеет еще большую молекулярную массу, то надо предварительно провести калибровку зависимости радиуса клубка молекулы ДНК от молекулярной массы. Для калибровки берется ДНК с определенной молекулярной массой (например, монодисперсная ДНК из бактериофагов). Двухцепочечные, спирализованные молекулы нуклеиновых кислот несут заряды и должны выступать как полиэлектролиты, свойства которых должны изменяться в зависимости от pH, ионной силы среды и т. д. Однако эти изменения в молекуле двухцепочечных нуклеиновых кислот очень незначительны в широких пределах колебания pH (от 4 до 11) и ионной силы (от 10^{-3} до нескольких единиц). В этих пределах почти не изменяется ряд гидродинамических и оптических свойств спирализованных макромолекул нуклеиновых кислот. Из этого следует, что система водородных и вандерваальсовых связей надежно стабилизирует двухцепочечную спирализованную структуру.

Если молекулы нуклеиновых кислот имеют одноцепочечную структуру, то их гидродинамические и оптические характеристики больше подвержены изменению под влиянием кислотности и ионной силы среды, чем двуцепочечные молекулы. Но если значение кислотности среды будет в пределах $4 < \text{pH} < 11$, то это приведет к разрушению и двуцепочечной структуры. В случае, когда pH меньше 4, степень протонизации возрастает и протоны присоединяются к NH_2 -группе, которая в молекулах аденина, цитозина и гуанина приобретает положительный заряд (NH_3^+). Если величина pH достигает значения 12 и больше, то наступает кислотная диссоциация гидроксильных групп и происходит кетоенольный таутомерный переход молекул гуанина, тимина. Таким образом, значительное смещение pH в кислую или щелочную сторону приводит к разрушению двуцепочечной структуры ДНК и ее денатурации. В случае, когда ионная сила среды становится ниже 10^{-3} , то это приводит к уменьшению степени экранирования зарядов, которые несут фосфатные группы. В результате возрастают силы отталкивания между зарядами этих групп, и двуцепочечная структура становится нестабильной и также разрушается. Для того чтобы ДНК сохранила свою двуцепочечную нативную структуру, ее необходимо хранить в растворе соли, ионная сила которой 0,01—0,1 моль.

В изучении физико-химических свойств нуклеиновых кислот большое значение имеют синтетические полинуклеотиды, которые можно получать конденсацией рибонуклеозиддифосфатов с помощью фермента полинуклеотидфосфорилазы. Процесс поликонденсации нуклеотидов этим ферментом идет за счет выделения свободной энергии при расщеплении нуклеозиддифосфатов на нуклеозидмонофосфат и остаток ортофосфорной кислоты. На полученных более просто устроенных полирибонуклеотидах были изучены различные особенности строения и свойств одноцепочечных и двуцепочечных РНК. Было установлено, что из одноцепочечных полимеров возникают молекулы РНК, которые имеют до 95% двуцепочечных областей. Эти двуцепочечные РНК обладают гипохромным эффектом. Была изучена также размерность двойной спирали этих полимеров, которая почти идентична размерности двуцепочечной структуры ДНК. Оказалось, что цепочки, состоящие из пиримидиновых оснований, способны образовывать двуцепочечные спирализованные комплексы. Они возникают с помощью водородных связей между пиримидиновыми основаниями. При этом образуется двуцепочечная структура, в которой обе полинуклеотидные цепи параллельны. Ряд других физико-химических свойств нуклеиновых кислот также был изучен на синтетических полирибонуклеотидах.

5. Процессы денатурации и ренатурации нуклеиновых кислот.

Если нарушить водородные связи или гидрофобные взаимодействия (стэкинг-взаимодействия) между основаниями в двуцепочечной ДНК изменением pH, нагреванием, уменьшением диэлектрической постоянной воды или с помощью мочевины, то разрушается

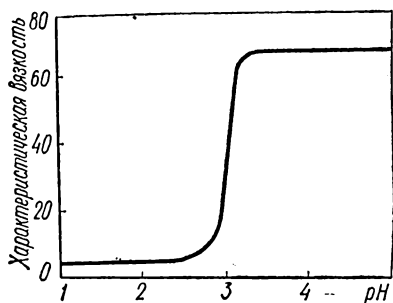


Рис. 30. Изменение pH вызывает резкое снижение вязкости ДНК, что говорит о кооперативном характере перехода спираль — хаотический клубок. Поэтому раскручивание жесткой двойной спирали ДНК протекает в узком интервале значений pH (по Доти и Томасу).

двухцепочечная структура, и одноцепочечная ДНК принимает форму клубка. Происходит процесс денатурации, или «плавления», двуспиральных полинуклеотидов. Разделение (денатурация) двухцепочечной ДНК на две цепи протекает в два этапа. Сначала происходит раскручивание, утрата состояния спирали, а затем две цепи полностью распадаются. Если приостановить денатурацию на первом этапе, то при охлаждении молекула ДНК спонтанно восстанавливает свою нативную структуру. Процессы денатурации и ренатурации носят кооперативный характер, т. е. в переходе из одного состояния в другое участвует большое число взаимодействий, и каждое предыдущее взаимодействие повышает вероятность протекания последующего. Распад двойной спирали нуклеиновых кислот на одноцепочечные молекулы сопровождается изменением их физических свойств. Увеличивается оптическая плотность (до 80%) в области 260 нм и коэффициент седиментации; уменьшается вязкость (рис. 30), оптическое вращение и другие свойства. В качестве критерия процесса перехода молекул двухцепочечных нуклеиновых кислот в одноцепочечные, т. е. перехода спираль — клубок, чаще используют изменение оптической плотности (рис. 31).

Поглощение нуклеиновых кислот в ультрафиолетовой области спектра объясняется присутствием в их составе ароматических пу-

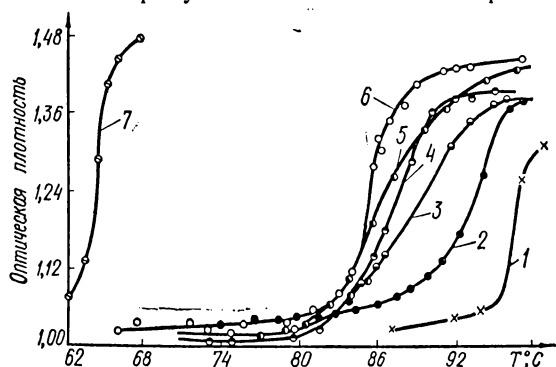


Рис. 31. Изменение оптической плотности при денатурации различных двуспиральных полинуклеотидов в 0,1 моль растворе NaCl с добавкой 0,015 моль цитрата натрия (Микельсон, 1965):

1 — ДНК *Mycobacterium phlei*; 2 — ДНК *Serratia marcescens*; 3 — ДНК *E. coli*; 4 — ДНК зубной железы телят; 5 — ДНК спермы лосося; 6 — ДНК *Pneumococcus*; 7 — двуспиральный комплекс поли (dAdT).

риновых и пиримидиновых гетероциклических азотистых оснований. Поглощение в ультрафиолетовой области приводит молекулы нуклеиновых кислот в возбужденное состояние и оказывает влияние на их функциональные свойства. Более слабое поглощение двуцепочечной ДНК света при 260 нм (гипохромизм) объясняется электронными взаимодействиями между основаниями. При денатурации основания в одноцепочечной структуре становятся экспонированными, и поглощение в ультрафиолетовой части спектра возрастает.

По оптической активности можно определить степень разрушения вторичной структуры двуспиральных молекул нуклеиновых кислот. Для этого определяется часть спиральных и неспиральных участков по формуле:

$$\theta = \frac{D_{\infty} - D_t}{D_{\infty} - D_0},$$

где D_{∞} — оптическая плотность полностью денатурированной молекулы; D_t — оптическая плотность раствора полинуклеотида при некоторой температуре; D_0 — оптическая плотность раствора полностью спирализованной двуцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты.

В определенный момент денатурации количество спиральных участков равно количеству неспиральных участков. Температура, при которой наступает такое равновесие, называется *температурой плавления* (T_m) полинуклеотида (рис. 32). При прочих постоянных условиях (ионная сила, рН, давление) величина температуры плавления является постоянной и характеризующей стабильность двуспиральной структуры.

Процесс денатурации за определенный интервал изменения температуры (ΔT_m) проходит через непрерывный ряд состояний. Для двуспиральных молекул этот интервал составляет обычно 3—7° С.

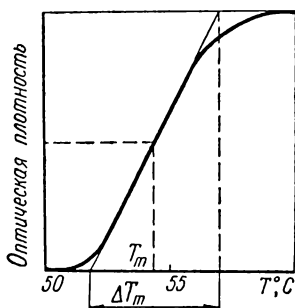


Рис. 32. Интервал перехода ДНК из нативного в денатурированное состояние, который отражает кооперативность разрушения двуспиральной структуры (Франк-Каменецкий, 1967).

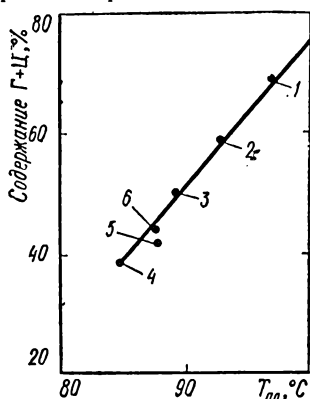


Рис. 33. Температура плавления двуспиральных полинуклеотидов в зависимости от содержания в них гуанина и цитозина (Doty, 1961):

1 — *M. phlei*; 2 — *S. marcescens*; 3 — *E. coli*; 4 — зубная железа телят; 5 — сперма лосося; 6 — *Pneumococcus*.

Но на процесс денатурации двуспиральной структуры оказывает влияние ряд других факторов: длина молекулы, нуклеотидный состав, углеводный остаток и др. Температура плавления повышается с увеличением длины молекулы полинуклеотида, с увеличением процентного содержания в нем Г—Ц-пар (рис. 33). Увеличение мольной доли таких пар на 2,5% вызывает повышение температуры плавления на 1°. Это повышение температуры обусловлено образованием трех водородных связей между этими азотистыми основаниями, тогда как между аденином и тиминном или аденином и урацилом в РНК возникает только две водородные связи. Но температура плавления не всегда имеет прямую зависимость от количества водородных связей у двуцепочечных нуклеиновых кислот. Это объясняется тем, что при плавлении имеют значение и вандерваальсовы силы взаимодействия между основаниями.

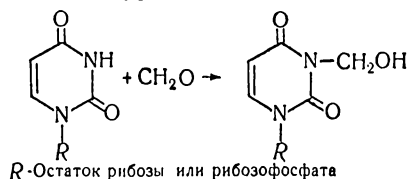
Температура плавления двуспиральных рибополинуклеотидов всегда выше, чем дезоксирибополинуклеотидов. Возможно, что причиной является возникновение водородной связи между гидроксильной группой рибозы и основанием. В результате этого свобода вращения основания вокруг гликозидной связи уменьшается и силы межплоскостных взаимодействий оснований снижаются. На температуру плавления двуцепочечных нуклеиновых кислот оказывает влияние также ионная сила раствора. С увеличением последней температура плавления двуспиральных полинуклеотидов возрастает. Это зависит от экранирования зарядов фосфатных групп. Известно, что электростатическое взаимодействие отрицательных зарядов фосфатных групп снижает степень стабилизации двуспиральной структуры молекулы. Если повышать ионную силу, концентрацию ионов в растворе, то изменяется экранирование зарядов фосфатных групп за счет изменения ионного окружения. С увеличением экранирования фосфатных групп возрастает устойчивость двуспиральных полинуклеотидов. Это обуславливает повышение температуры плавления. Различные ионы оказывают различное денатурирующее влияние на двуспиральную молекулу ДНК. Одни ионы — Mg^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} — повышают стабильность молекулы и температуру ее плавления. Другие — Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} — оказывают противоположное действие.

На температуру плавления двуцепочечных ДНК оказывает большое влияние степень протонирования оснований. Поэтому кислотно-основные свойства среды, величина рН оказывают большое влияние на процесс денатурации. Если величина рН имеет значение ниже 2,7 или выше 12, то денатурация ДНК наступает при комнатной температуре. При рН от 5,5 до 8,5 температура плавления ДНК почти не зависит от кислотности среды. Температура плавления двуспиральной ДНК зависит также от присутствия в растворе тех или иных соединений (мочевина, гуанидин), органических растворителей, давления, концентрации ДНК и других факторов.

Процесс перехода ДНК из двуспирального состояния в одноцепочечную структуру не протекает по принципу «все или ничего».

Наблюдается плавление только некоторых частей двуспиральной молекулы ДНК, т. е. локальная денатурация. Поэтому предполагается, что в молекуле ДНК имеются так называемые термостабильные области, или ядра. Оказалось, что такие области богаты Г—Ц-парами оснований, которые по принципу комплементарности удерживают от плавления некоторые части двуполочечной ДНК. Наоборот, области двуспиральной молекулы ДНК, богатые А—Т-парами оснований, легче поддаются денатурации.

Денатурация тепловая отличается от денатурации химическими агентами, например формальдегидом. При взаимодействии формальдегида с нуклеозидами и нуклеотидами образуются *N*-метилльные производные по азоту гетероциклического ядра, связанному с водородом. При этом изменяется поглощение в УФ-спектре. Это видно на примере производных уридина.



Химическая денатурация сопровождается химическими взаимодействиями и модификацией звеньев полинуклеотида. Поэтому после химической денатурации восстановление (ренатурация) таких молекул и их областей становится невозможной.

Для понимания биологической роли, функции ДНК имеет большое значение выяснение причин и условий, при которых может осуществляться хотя бы частичное восстановление исходной (нативной) двуспиральной структуры ДНК и других нуклеиновых кислот.

При повышении температуры приблизительно на 5° выше температуры плавления две цепи денатурированной ДНК расходятся вследствие сил броуновского движения. Если раствор таких однополочечных ДНК быстро охладить, то эти цепи останутся разделенными. Но если раствор охлаждать медленно приблизительно на 20° ниже температуры плавления, то в результате рекомбинации происходит восстановление (ренатурация) двойной спирали (рис. 34). Это вызвано тем, что комплементарные цепи «узнают», находят друг друга, ориентируются по отношению друг к другу и занимают нужное положение только через определенное время. Процесс ренатурации ДНК при медленном охлаждении называется *отжигом*. Осуществление процесса ренатурации важно в связи с поражением ДНК различными экстремальными условиями и поиском путей восстановления ее функции в биологических системах. Поэтому основным критерием того, что денатурированная ДНК ренатурирована, является ее биологическая активность.

Установлено, что при ренатурации у ДНК восстанавливаются такие ее функции, как трансформирующая активность, иммуно-

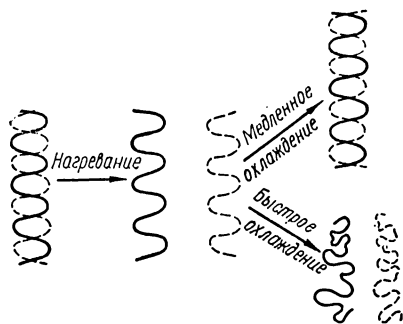


Рис. 34. Расхождение цепей двуспиральной ДНК при денатурации нагреванием. Цепи ренатурируются при медленном охлаждении и остаются раздельными при быстром охлаждении.

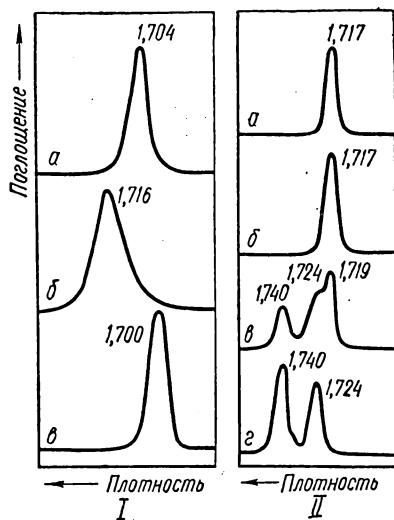


Рис. 35. Центрифугирование ДНК в градиенте плотности CsCl (Doty, 1961): I. а — ДНК после нагревания и медленного охлаждения; б — ДНК после нагревания и быстрого охлаждения; в — ДНК без нагревания (нативная форма). II. Гибридная ДНК, одна из цепей которой представлена ^{14}N -ДНК, вторая — ^{15}N -ДНК; а — нативный гибрид; б — после нагревания при 90°C в течение 20 мин (эффекта нет); в — после нагревания при $93,8^\circ\text{C}$ в течение 20 мин (цепочки частично отошли друг от друга); г — после нагревания при 100°C в течение 10 мин (произошло полное разделение тяжелой и легкой цепей).

химические свойства и др. Денатурированная ДНК такой способностью не обладает. В настоящее время еще не получено достаточного количества биологических критериев восстановления нативной формы денатурированных ДНК. Но осуществление процесса ренатурации может контролироваться по ряду физико-химических показателей. У ренатурированной ДНК кривая плавления почти полностью совпадает с кривой плавления у нативной ДНК. Ренатурированная ДНК приобретает способность давать дифракционную картину, типичную для нативной В-формы ДНК; приобретаются характерные для нативной ДНК оптические свойства (гипохромизм, круговой дихроизм, оптическое вращение), гидродинамические характеристики, длина, диаметр и другие показатели двуспиральной структуры естественной ДНК. В частности, ренатурированная ДНК почти полностью приобретает плотность, характерную для нативной ДНК. Это устанавливается с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия (рис. 35). Если в растворе имеются ДНК с различной плотностью, то они распределяются в разных слоях. Положение их может быть определено с помощью специальной оптической приставки в аналитической центрифуге.

В препаративной центрифуге после центрифугирования прокалывают дно пробирки, собирают в серию пробирок фракции вытекающего раствора и определяют содержание ДНК на спектрофотометре (при 260 нм), а ее плотность — по показателю

преломления. Результаты выражаются графически (рис. 36). По плотности ДНК можно рассчитать содержание в ней Г—Ц-пар. При ренатурации взаимодействуют комплементарные цепи. Если же в процессе ренатурации участвуют деградированные препараты ДНК, то наблюдается ряд отклонений в физических свойствах восстановленных молекул. Возникают на концах молекулы клубкоподобные образования. В процессе ренатурации происходит случайное взаимодействие и сочетание комплементарных цепей различной длины. Образуются свободные концы, которые комплементарно взаимодействуют с концами других молекул, и возникают агрегаты с очень высокой молекулярной массой. Случайность в сочетании комплементарных цепей при ренатурации подтверждается с помощью меченой ДНК. Например, денатурации подвергалась немеченая ДНК с плотностью 1,703 (легкая) и меченая ^{15}N с плотностью 1,743 (тяжелая) (рис. 37). Отжиг проводился в условиях, которые позволяли процессам ренатурации пройти наполовину, т. е. неспецифическая агрегация сводилась к минимуму. При ультрацентрифугировании в градиенте плотности получили пять фракций, которые по плотности соответствовали тяжелой денатурированной с плотностью 1,760; тяжелой ренатурированной с плотностью 1,746; гибридной ренатурированной с плотностью 1,732; легкой денатурированной с плотностью 1,717 и легкой ренатурированной с плотностью 1,708. Смесь была обработана фосфодиэстеразой, которая разрушила одноцепочечные формы. В результате этого остались фракции вторая, третья и пятая, которые соответствовали ренатурированным ДНК: тяжелой

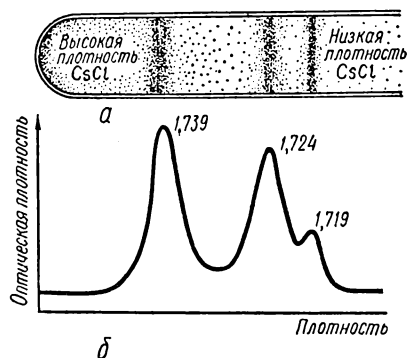


Рис. 36. Центрифугирование различных по плотности ДНК при 45000 об/мин в течение 20 ч;
а — ДНК располагаются в тех областях, где их плотность идентична плотности CsCl;
б — кривые поглощения ДНК различной плотности (г/см^3).

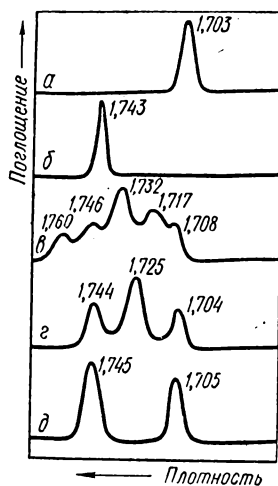


Рис. 37. Центрифугирование ДНК в градиенте плотности (Doty, 1961):

Нативная легкая ДНК (а); нативная тяжелая ДНК (б); легкая и тяжелая ДНК, нагретые и ренатурированные совместно (в); легкая и тяжелая ДНК, обработанные фосфодиэстеразой, затем совместно нагретые и ренатурированные (г); то же после раздельной ренатурации и обработки ферментом (д).

(1,744), гибридной (1,725) и легкой (1,704). В случае раздельной ренатурации этих двух видов ДНК и последующего их смешивания обнаруживались ДНК с плотностью исходных форм.

Процесс ренатурации молекулы ДНК зависит от ее размера, количества Г—Ц-пар, сложности. Чем больше Г—Ц-пар, тем легче идет ренатурация. ДНК вирусов и бактерий более простая в своем строении, она не содержит значительных по размерам повторяющихся последовательностей, тогда как ДНК высших организмов имеет большое количество крупных повторяющихся последовательностей (повторов), что делает более сложным процесс ее ренатурации. Одни повторяющиеся последовательности представлены в молекуле ДНК многочисленно, другие — малочисленно (уникальные). Поэтому ренатурация состоит из быстрых стадий, в которых участвуют многочисленные повторы, и медленных стадий с участием уникальных повторяющихся последовательностей. Процесс ренатурации обычно начинается с образования «ядра» нескольких комплементарных пар, соответствующих нативной ДНК на нескольких участках ее цепи. Затем наступает быстрый процесс восстановления двуспиральной цепи ДНК. Установлено, что скорость ренатурации двуспиральной молекулы ДНК обратно пропорциональна ее сложности. Отсюда скорость ренатурации молекул ДНК вирусов, бактерий выше по сравнению с ДНК высших организмов.

Цепи денатурированной молекулы ДНК имеют структуру в виде клубка, поэтому в цепи могут сближаться и взаимодействовать комплементарные основания, образуя двуспиральную структуру. Такие участки могут служить центрами, или «ядрами», образования двойной спирали ДНК.

На процесс ренатурации большое влияние оказывают ионная сила среды, величина рН, температура. Если значение рН превышает 9 или снижается до 5, то наступает ионизация оснований, и процесс ренатурации замедляется. Кислотность среды в пределах рН от 5 до 9 не оказывает влияния на скорость восстановления двуспирального полинуклеотида.

Изменение скорости процесса ренатурации при разной ионной силе выражается сложной зависимостью. Если увеличивать количество ионов в среде (концентрацию соли), то отрицательные заряды фосфатных групп экранируются, уменьшается сила электростатического отталкивания между цепями, и скорость ренатурации возрастает. Но влияние ионной силы на процесс ренатурации зависит от температуры. Обычно в процессе ренатурации поддерживается температура 50—60° С, при которой оптимальная концентрация солей составляет 0,4 моль. Таким образом, оптимальными условиями для течения процесса восстановления двуспиральной нативной ДНК являются рН от 5 до 9, температура, на 25° С ниже температуры плавления, и ионная сила 0,4.

По особенностям процесса ренатурации можно судить о строении макромолекулы ДНК. Если две цепочки денатурированной ДНК идентичны, гомогенны, то это будет способствовать встрече компле-

ментарных оснований и более быстрому течению процесса ренатурации. Но если в процессе ренатурации будут участвовать гетерогенные одноцепочечные денатурированные ДНК с различной последовательностью оснований, то это будет снижать вероятность образования водородных связей между комплементарными основаниями и тормозить процесс ренатурации.

Молекулы ДНК вирусов отличаются меньшим размером и состоят из участков с уникальной последовательностью оснований. Если мы раздробим такую молекулу на фрагменты размером около 300—400 нуклеотидных пар, то скорость ренатурации этих фрагментов и всей цепи будет определяться ее размером, однородностью нуклеотидной последовательности и концентрацией. За единицу скорости этого процесса принято время, которое необходимо для ренатурации половины фрагментов ДНК в растворе с концентрацией, равной единице, при определенном размере фрагментов. Если мы обозначим через C — концентрацию оставшихся еще денатурированных цепей в некоторый момент времени t ; через C_0 — исходную концентрацию данного типа фрагментов (в молях нуклеотидов на литр); через K — константу (которая будет более высокой при большей гомогенности фрагментов ДНК), то кинетика реассоциации (ренатурации) ДНК может быть выражена таким равенством: $\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + K C_0 t}$. Десятичный логарифм $C_0 t (\log C_0 t)$, который

соответствует ренатурации половины фрагментов ДНК ($\frac{C}{C_0} = 0,5$), в растворе является величиной, характерной и постоянной для данной определенной ДНК. Эту величину обозначают $C_0 t_{0,5}$.

Известно, что ДНК организмов, стоящих на различных уровнях эволюционного развития, отличается по составу уникальных и повторяющихся участков. У вирусов ДНК состоит целиком из участков с уникальной нуклеотидной последовательностью, тогда как ДНК у высокоорганизованных организмов состоит как из уникальных участков, так и последовательностей, которые повторяются много раз. Эти повторы образуют при дроблении ДНК значительное количество комплементарных фрагментов, которые легко реассоциируют.

Например, для уникальных участков ДНК животных $C_0 t_{0,5}$ равняется $\frac{3000 \cdot \text{моль } C^\circ}{\text{л}}$, а для повторяющихся участков — $\frac{0,03 \cdot \text{моль } C^\circ}{\text{л}}$. Поэтому можно изучать ренатурацию уникальных участков ДНК отдельно от повторяющихся последовательностей. Для этого применяют гидроксипатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, который избирательно сорбирует только ренатурированную двуцепочечную ДНК. Последнюю удаляют, и продолжают изучение ренатурации уникальных участков ДНК.

Кинетическая константа реассоциации K пропорциональна числу повторяющихся последовательностей. Исходя из ее значения можно видеть, что повторяемость нуклеотидных последовательностей

(участков) достигает 1000—100000 раз, т. е. до 50% всей молекулы. У прокариотов повторяющиеся последовательности почти не встречаются. О степени повторяемости отдельных участков можно судить также по количеству колец, которые образуют фрагменты ДНК, содержащие повторы. Для этого большие фрагменты ДНК, состоящие из повторов, обрабатывают экзонуклеазой. При этом с 3'-концов обкусываются концевые нуклеотиды, а 5'-концы становятся «липкими», и на основе комплементарности цепь замыкается в кольцо. Роль повторяющихся последовательностей мало изучена. Они, видимо, выполняют регуляторную функцию при биосинтезе белка. Возможно, что при наличии многих повторов клетка, при необходимости, очень быстро может синтезировать то или иное соединение.

Денатурированная ДНК может взаимодействовать на основе принципа комплементарности с одноцепочечными РНК и ДНК, принадлежащими другим организмам. Это своеобразный тип реанатурации и его называют «гибридизацией», так как при этом образуются гибридные молекулы. Для начала инициации (возникновения гибридной молекулы ДНК) достаточно, чтобы гибридизируемые цепи имели около 12 комплементарных пар. Разрешающая способность метода гибридизации нуклеиновых кислот очень высока и близка к чувствительности серологических методов. С помощью метода гибридизации можно различить последовательности около пяти триплетов, а серологический метод обнаруживает пептиды из пяти аминокислотных остатков. С помощью гибридизации «чужеродных» одноцепочечных молекул нуклеиновых кислот можно решать различные биологические вопросы. Например, на основании возникновения по принципу комплементарности смешанных гибридных молекул ДНК, ДНК и РНК устанавливается таксономическое положение и генетическая близость различных организмов, место изменений в цепи ДНК, которые ведут к возникновению мутаций. Гибридизация характеризуется величиной C_{ot} .

Количество гибридных ДНК может быть определено по радиоактивности. Для этого одну из нуклеиновых кислот денатурируют и сажают на агар-агар или целлюлозный фильтр. Вторая меченая нить ДНК денатурируется и дробится на фрагменты, которые диффундируют по агар-агару и находят комплементарные себе участки. После этого негибридизовавшиеся фрагменты отмывают и измеряют радиоактивность связанной ДНК. На основании степени гибридизации одноцепочечных РНК с денатурированной ДНК определяется тип рибонуклеиновой кислоты и ее происхождение.

С помощью гибридизации можно изучать идентичность нуклеотидной последовательности в различных типах нуклеиновых кислот. Известно, что определение нуклеотидной последовательности является сложным и не всегда возможным, особенно в макромолекулах с высокой молекулярной массой. Поэтому о соответствии различных полинуклеотидов судят по идентичности нуклеотидной последовательности. Это достигается таким образом. При плавлении двуспиральной макромолекулы ДНК распадается на одноцепочеч-

ные полимеры. В присутствии одноцепочечных полимеров других нуклеиновых кислот при медленном охлаждении происходит образование гибридного двуцепочечного комплекса, который состоит из полинуклеотидных цепей, ранее входивших в состав различных макромолекул. Чем больше комплементарных оснований в этих полинуклеотидных цепях, тем больше образуется гибридных комплексов. Их количество может быть определено равновесным центрифугированием в градиенте плотности или с помощью нитроцеллюлозных фильтров. Гибридизация может осуществляться также между так называемыми «липкими концами», т. е. одноцепочечными концами одной и той же молекулы ДНК, которая на своих концах имеет комплементарные основания. В результате этого происходит циклизация, т. е. возникновение циклической формы ДНК за счет нековалентного взаимодействия комплементарных «липких концов». Идентичность двух нуклеотидных последовательностей можно также проверить по «методу ближайших соседей». Он состоит в том, что ДНК-полимеразная реакция проводится в присутствии одного дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфата, меченного по фосфору α -фосфатной группы. При расщеплении вновь синтезированной ДНК дезоксирибонуклеазой микрококков и фосфодиэстеразой селезенки фосфатная группа с меченым фосфором будет переходить из 5'-положения к предшествовавшему дезоксирибонуклеозид-3'-монофосфату (ближайшему соседу). Эксперимент повторяется четыре раза со всеми четырьмя мечеными нуклеозидтрифосфатами. Получаются 16 возможных ближайших соседей. Интенсивность радиоактивности каждого из четырех полученных меченых дезоксирибонуклеозид-3'-монофосфатов показывает частоту пар ближайших соседей.

Определение идентичности двух типов РНК, степени образования ими двуспиральных структур с одними и теми же участками ДНК проводится также по методу конкурентной гибридизации, предложенному Р. Б. Хесиным. Смысл этого метода состоит в том, что ДНК денатурируется и фиксируется на сорбенте. Две разных РНК, конкурентность которых изучается, подвергаются дроблению на фрагменты. Одна из них является меченой. Если обе эти РНК одинаковы, то они будут конкурировать за одни и те же участки ДНК, и процесс гибридизации будет подавляться. Если эти РНК различны, то они будут вступать во взаимодействие с разными участками ДНК и процесс гибридизации не ингибируется.

Двуспиральная ДНК в определенных условиях более устойчива, чем ДНК в состоянии одноцепочечной структуры. Одной из причин этого является различие в величине поверхности между двуспиральной молекулой ДНК и составляющими ее цепями. Поэтому двуспиральное состояние должно быть более выгодным, если исходить из влияния растворителя на свободную энергию системы. Устойчивость молекулы ДНК зависит от характера внутримолекулярных взаимодействий, которые складываются из водородных связей между основаниями и плоскостных взаимодействий между

ними; влияния растворителя, электростатических взаимодействий между отрицательными зарядами фосфатных групп. При этом во взаимодействие вступают не только соседние фосфатные группы одной и той же цепи, но и фосфатные группы противоположных цепей.

Макромолекулярная структура ДНК оказывает также влияние на активность оснований. Последние резко утрачивают реакционную способность. Так, формальдегид реагирует с основаниями в составе нуклеозидов и нуклеозидфосфатов и совсем не реагирует с ними в состоянии макромолекул ДНК. То же самое можно сказать о взаимодействии с другими химическими реагентами. Резкое снижение реактивности оснований в составе ДНК обусловлено, видимо, пространственными факторами, состоящими в упаковке оснований. Но тем не менее ряд химических реакций протекает с группами оснований, находящихся внутри молекул ДНК. Это объясняется тем, что в определенных частях молекулы ДНК происходит временная денатурация; эти основания открываются и становятся доступными для химического взаимодействия.

6. Реакции присоединения и замещения у нуклеиновых кислот. Свойства нуклеиновых кислот изменяются, если по гетероциклическим ядрам их оснований протекают реакции замещения или присоединения. Это приводит к модификации оснований, что затем сказывается на структуре и функции нуклеиновых кислот. Такие реакции протекают с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями. Электрофильные реакции замещения могут протекать с атомами азота и углерода цикла, а нуклеофильные — с экзоциклическим азотом аминогрупп гуанина, аденина, цитозина. Нуклеофильные и электрофильные реакции присоединения могут осуществляться также по двойной связи между С—5 и С—6 углеродными атомами, особенно у пиримидиновых оснований, так как эта связь у пуринов является очень стабильной. У мономерных компонентов по атомам углерода могут протекать реакции, в результате которых подвергаются атакам атомы С—5 пиримидиновых и С—8 пуриновых оснований. Если эти атомы атакуются галоидами, то образуются 5'-бромурдин, 5-оксибромуридин и 8-замещенные пуриновые основания. Эти производные применяются в биохимических исследованиях при изучении механизмов мутационных процессов, действия ферментов и других вопросов. Если с галогенами взаимодействуют не мономерные компоненты, а полинуклеотиды, то при этом реакции протекают с С—5 и С—8 углеродными атомами, образуются 5-бромурацил, 5-бромцитозин, 8-бромгуанин. Если бромირуется молекула транспортной РНК, то это приводит к нарушению ее вторичной структуры. В связи с этим изменяются ее физические свойства; снижается температура плавления, уменьшается гипохромный эффект.

Реакции замещения и присоединения могут идти и по атомам азота, которые могут нести частично положительный или отрицательный заряд. Атомы азота N—3, N—7 в пуринах; N—1 в аминформе аденозина и N—3 в аминформе цитидина. Атомы в этих положениях гетероциклических оснований имеют два замести-

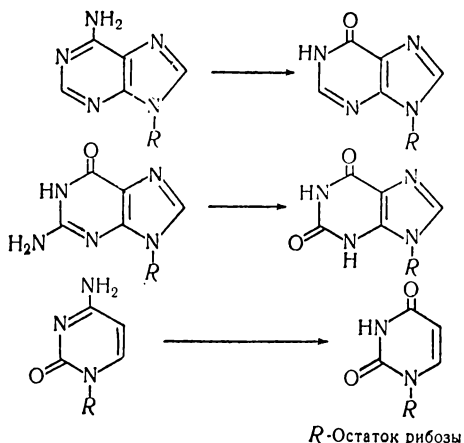
теля, в сопряженную систему отдают только один π -электрон и являются электроотрицательными. Они несут избыточную электронную плотность и легко подвергаются атаке электрофильными агентами, в частности протонами. Другие атомы азота в гетероциклических основаниях нуклеиновых кислот отдают в сопряженную систему два π -электрона и имеют частичный положительный заряд. Эти атомы азота имеют по три заместителя, одним из которых может быть атом водорода. Если при этом группа N—H за счет перераспределения электронной плотности в молекуле будет подвергаться поляризации, то водород может отщепиться в виде протона, и тогда соединение будет носить свойства кислоты. При диссоциации будет образовываться анион с отрицательным зарядом на том атоме азота, который будет подвергаться электрофильной атаке протоном или другими электрофильными реагентами. Такими атомами азота в гетероциклических основаниях нуклеиновых кислот являются атомы N—1 в кетоформе гуанозина и N—3 в кетоформе уридина. Атака атомов азота оснований чаще осуществляется электрофильными агентами. Сюда относятся реакции алкилирования нуклеотидов и нуклеозидов. Алкилирование нуклеиновых кислот имеет большое биологическое значение, так как в них происходят такие изменения, которые, видимо, обуславливают мутагенные и канцерогенные процессы.

К изменению реакционной способности и химическим модификациям нуклеиновых кислот приводят реакции экзоциклических заместителей пуриновых и пиримидиновых оснований. Такими экзоциклическими заместителями являются аминогруппы цитозина, аденина, гуанина, карбонильные группы гуанина, урацила, производные серы в минорных основаниях РНК. Известно, что π -электроны атомов азота аминогрупп и кислорода карбонильных групп гетероциклических оснований взаимодействуют с π -электронной системой кольца оснований, поэтому свойства соответствующих компонентов нуклеиновых кислот отличаются от амидов, аминов.

Экзоциклические аминогруппы отдают два π -электрона на образование сопряженной системы, и поэтому у них возникает частичный положительный заряд. Но если учитывать заряды σ -электронов, то суммарный заряд экзоциклических аминогрупп оказывается отрицательным. Поэтому аминогруппы подвергаются атакам электрофильными реагентами, которыми могут быть остатки кислот, альдегиды, азотистая кислота. Взаимодействие с азотистой кислотой приводит к дезаминированию аденозина, гуанозина и цитидина, в результате чего образуются соответственно инозин, ксантозин и уридин.

Азотистая кислота обуславливает модификации полинуклеотидов, может вызвать изменение первичной структуры полимеров, их микроструктуры и функции, т. е. обладает сильными мутагенными свойствами. В основе этого лежит образование гипоксантина при дезаминировании аденина и уридина — при дезаминировании цитозина. Гипоксантин и уридин обладают способностью образовывать

комплементарные пары с цитозином и аденином. Если же дезаминированию подвергается гуанин, то это приводит к инактивации генетического материала.

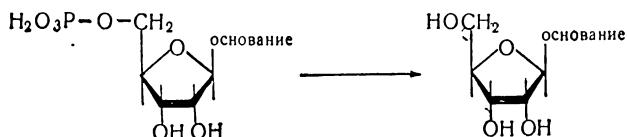


Нуклеиновые кислоты могут реагировать с помощью атома кислорода карбонильной группы урацила, гуанина, преобладающей таутомерной формой которых является кетоформа. Атом кислорода карбонильной группы участвует в образовании сопряженной системы отдачей одного электрона и на нем остается частичный отрицательный заряд. Поэтому атом кислорода может подвергаться атаке электрофильными реагентами. При этом образуются циклонуклеозиды.

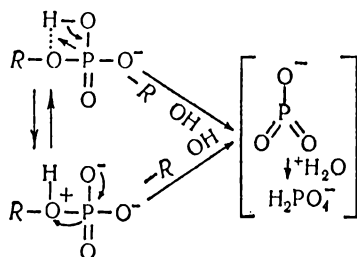
Нуклеиновые кислоты могут взаимодействовать с помощью гидроксильных групп своих углеводных остатков. Дезоксирибонуклеиновые кислоты имеют единственную свободную гидроксильную группу только на 3'-концевом нуклеотиде, так как у 5'-концевого нуклеотида гидроксильная группа содержит остаток фосфорной кислоты. С помощью этой гидроксильной группы на 3'-концевом нуклеотиде ДНК может вступать в химическое взаимодействие. Если же образуется циклическая ДНК, то тогда и эта гидроксильная группа отсутствует. Рибонуклеиновые кислоты содержат по одной гидроксильной группе при С—2 остатка рибозы каждого нуклеотида и незамещенную 2', 3'-*цис*-гликольную группировку в 3'-концевом нуклеотиде. Гидроксильные группы рибозы чаще подвергаются электрофильной атаке, при которой происходит замещение водорода гидроксила. Чаще могут быть реакции ацилирования, алкилирования или присоединения. Эти реакции применяются для определения концевых групп в олигодезоксирибонуклеотидах и для изучения вторичной структуры и функции полирибонуклеотида.

Важное место в определении состояния нуклеиновых кислот занимают фосфатные группы. Их взаимодействие с различными группами и расщепление фосфоэфирных и фосфодиефирных

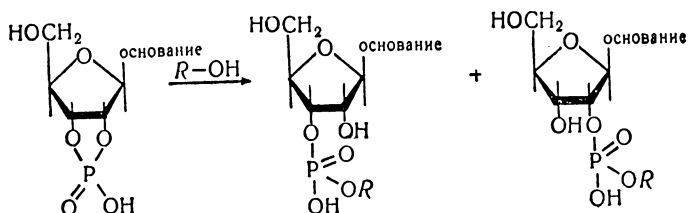
связей имеют большое значение в химических превращениях нуклеиновых кислот. Разрыв фосфэфирных связей может идти между фосфором и кислородом, когда осуществляется нуклеофильная межмолекулярная и внутримолекулярная атака атома фосфора. Такой разрыв связи имеет место в мононуклеотидах, нуклеозидциклофосфатах, полирибонуклеотидах. Расщепление фосфэфирных связей достигается воздействием специфическими ферментами в условиях, близких к клеточной среде, а также с помощью кислот, щелочей, тяжелых металлов. Разрыв фосфомоноэфирных связей в рибонуклеотидах ведет к образованию нуклеозида



или распаду РНК. Этот процесс состоит в том, что перераспределяются электроны, и это приводит к расщеплению связи $\text{P}-\text{O}$. При этом OH -группа выступает как нуклеофильный реагент, ата-

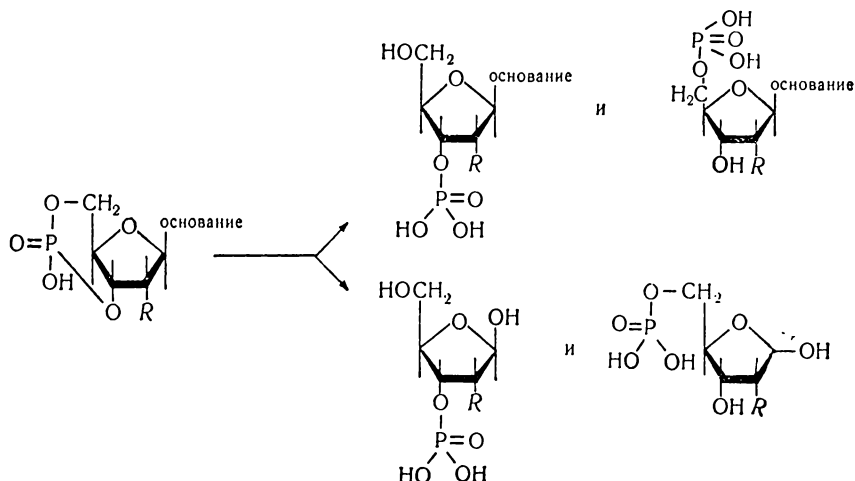


кующий атом фосфора. Фосфэфирные связи в рибонуклеозид-2',3'-циклофосфатах могут разрываться с помощью рибонуклеаз или кислот и оснований. При этом образуются рибонуклеозид-2'- и рибонуклеозид-3'-фосфаты. В условиях кислой и основной среды в

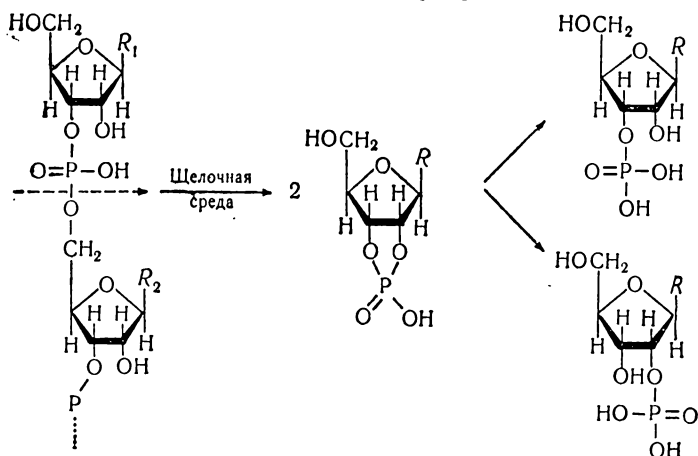


нуклеозид-3',5'-циклофосфатах осуществляется разрыв фосфодиэфирной и гликозидной связей. В результате образуется смесь нуклеозид-3'- и 5'-фосфатов, рибозо-, дезоксирибозофосфатов (см. стр. 160). Фосфодиэфирные связи в полинуклеотидах ДНК и РНК имеют неодинаковую стабильность, особенно по отношению к воздействию средой со сравнительно слабой щелочной реакцией. В этих условиях РНК легко гидролизует до мононуклеотидов, а ДНК является

достаточно стабильной. В кислой среде происходит гидролиз с деградацией полимеров РНК и ДНК, но механизм их распада различен.



Различная устойчивость РНК и ДНК в щелочной среде положена в основу методов их разделения. Расщепление фосфодиэфирных связей РНК протекает через трансфосфорилирование. При этом принимает участие гидроксильная группа во втором положении (С—2') рибозы. Эта группа в условиях щелочной реакции подвергается диссоциации, повышается ее нуклеофильность, и она атакует атом фосфора, что ведет к разрыву связи Р—О при С—5'. В результате возникает нуклеозид-2', 3'-циклофосфат.



Нуклеиновые кислоты могут взаимодействовать с помощью внутренних межнуклеотидных остатков фосфорной кислоты и концевых фосфатных групп в полинуклеотидах. Последний случай

используется для анализа нуклеотидной последовательности введением в концевые фосфатные группы соответствующей метки.

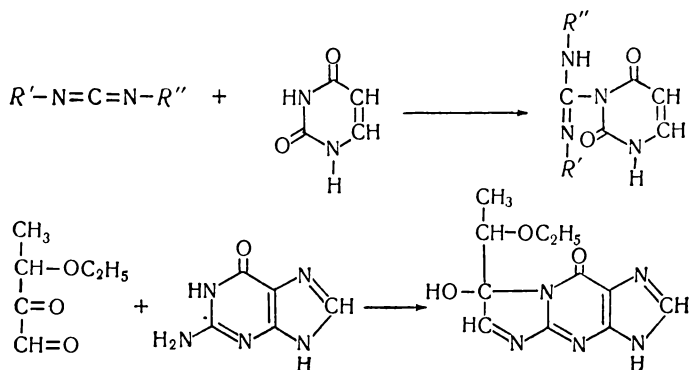
7. Определение первичной структуры нуклеиновых кислот. Исключительно большое значение для понимания вторичной и третичной структуры нуклеиновых кислот и выполняемой ими функции имеет изучение последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК и РНК. Изучение линейной последовательности нуклеотидов ДНК важно потому, что при этом одномерная информация преобразуется в результате биосинтеза полипептидной цепи в трехмерную информацию белковой молекулы и надмолекулярных структур. Последние образуются вследствие строгой комплементарности между белковыми молекулами или их частями, что зависит только от определенного взаимодействия и соединения между ними.

Если изучение первичной структуры белков является, по крайней мере в методическом отношении, задачей уже решенной, то с определением последовательности нуклеотидов в цепях нуклеиновых кислот дело обстоит иначе. Это объясняется прежде всего тем, что белки состоят из 20 основных различных мономеров, а нуклеиновые кислоты — всего только из четырех оснований. Поэтому возникают трудности, которые состоят в том, что мы имеем большую возможность получать из различных участков полинуклеотидной цепи при ее расщеплении одинаковые короткие последовательности. Особенно сложным является определение нуклеотидной последовательности в ДНК из-за громадных размеров ее молекулы. Например, одна из самых малых однопочечных молекул ДНК фага ϕX174 содержит около 5500 нуклеотидов, тогда как молекула транспортных РНК содержит всего 75—85 нуклеотидов. Химическими методами с помощью депуринизации дифениламином и муравьиной кислотой, а также другими способами удается получить последовательности, состоящие только из пиримидиновых или пуриновых нуклеотидов. Но эта информация дает весьма ограниченные сведения о первичной структуре ДНК. Поэтому нуклеотидная последовательность у РНК изучается методом химической или ферментативной деградации или с помощью блочного метода.

Химической ступенчатой деградацией, по П. Витфельду, определяется первичная структура олигонуклеотидов РНК, у которых 2'- и 3'-гидроксильные концевые группы являются свободными. При окислении периодатом образуется диальдегид, который при pH-10 или pH-7 в присутствии первичного амина (циклогексил-амин) подвергается β -элиминации с освобождением концевого основания. Оставшийся олигонуклеотид оказывается на одно звено короче, но в 3'-положении содержит концевой фосфат. Этот фосфат удаляется фосфомоноэстеразой, и проводится следующее периодатное окисление. Таким образом можно определить нуклеотидную последовательность небольшого олигонуклеотида.

Более широкими возможностями располагает блочный метод определения нуклеотидной последовательности. Он состоит в том, что полинуклеотидная цепь РНК разрывается на фрагменты (бло-

ли) с помощью специфических эндонуклеаз. Можно использовать различные эндонуклеазы, каждая из которых разрывает полинуклеотидную цепь специфически в определенных местах. Затем реконструируется молекула РНК на основе перекрывания блоков, образующихся при различных специфических способах расщепления. Например, с помощью высокоспецифических рибонуклеаз (T_1 - или гуаниловая РНК-аза, панкреатическая РНК-аза и др.) можно получить набор олигорибонуклеотидов с характерными концевыми нуклеотидами для того или иного типа расщепления. Гуаниловая рибонуклеаза специфически разрывает эфирную связь между фосфатом и 5'-ОН-группой рибозы, образуются олигонуклеотиды и мононуклеотиды с 3'-фосфатами, связанными с гуаниловой кислотой. Панкреатическая рибонуклеаза разрывает цепь РНК до моно- и олигонуклеотидов, которые заканчиваются 3'-фосфатом, связанным с нуклеозидом цитозина или урацила. T_1 -РНК-аза атакует также связи между псевдоуридиновыми и риботимидиновыми кислотами, и образуются олигонуклеотиды, оканчивающиеся этими характерными нуклеотидами. Изучение первичной структуры транспортных РНК облегчается тем, что в их состав в значительных количествах входят минорные основания, которые могут служить своеобразными маркерами; тРНК имеют жесткую вторичную структуру; надежный функциональный критерий — образование аминокислотных производных. Кроме того, на транспортных РНК легко изучать связь между структурой и функцией по их адапторной роли, взаимодействию с аминоацил-тРНК-синтетазами, информационной РНК, рибосомами, ЦЦА-пирофосфорилазой, метилазами и рядом других модифицирующих ферментов. Определение нуклеотидной последовательности облегчается получением модифицированных азотистых оснований. Модификацию оснований можно получить с помощью различных химических агентов. Например, урацил модифицируется при взаимодействии с карбодимидом, а гуанин с кетооксалем:



В результате расщепления соответствующей рибонуклеазой получается олигонуклеотид с этими модифицированными основаниями.

ми, что облегчает определение нуклеотидной последовательности. В полученных олигонуклеотидах при расщеплении молекулы РНК рибонуклеазами определяется очередность нуклеотидов методом ступенчатой деградации. Для этого концевые нуклеотиды дефосфорилируются с помощью щелочной фосфатазы из *E. coli*, в результате открываются и становятся доступными к атаке ОН-группы в 2', 3' и 5' положениях. Затем с помощью фосфодиэстеразы змеиного яда атакуются концевые нуклеотиды со свободными 2' и 3'-ОН-группами и образуются 5'-нуклеозидмонофосфаты, которые идентифицируются и определяются.

Модифицированными могут быть и молекулы рибозы, которые в 2'-положении имеют метильную группу. Это приводит к тому, что при щелочном гидролизе не образуется промежуточный щелочной циклофосфат. Но эти устойчивые к щелочи связи можно гидролизовать фосфодиэстеразой и получить как бы меченый метоксирибонуклеотид. Фосфодиэстераза селезенки разрывает связь между фосфатом и 5'-ОН-группой рибозы. Образуются 3'-фосфатнуклеотиды, фосфодиэстераза змеиного яда разрывает связь между фосфатом и 3'-ОН-группой рибозы; образуется 5'-фосфатнуклеотид.

С помощью метода П. Витфельда, химической ступенчатой деградацией РНК можно определить последовательность в получаемых олигонуклеотидах до четырех концевых оснований. Определение можно вести только в случаях, когда олигонуклеотид заканчивается концевыми 2'- и 3'-ОН-группами, которые окисляются периодатом с образованием диальдегида. Периодатное окисление повторяется и, таким образом, определяется несколько нуклеотидов.

Применяя эти методы, в 1963—1967 гг. А. А. Баев с сотрудниками определил первичную структуру валиновой тРНК из дрожжей. Р. Холли в 1965 г. расшифровал первичную структуру дрожжевой аланиновой транспортной РНК. Они применили препаративные методы противоточного распределения для выделения индивидуальных специфических транспортных РНК из смеси различных РНК в цитоплазме. Более эффективное разделение тРНК достигается колоночной хроматографией с помощью бензоилированной ДЭАЭ-целлюлозы. Набор олигонуклеотидов с концевыми гуаниловыми нуклеотидами был получен с помощью T_1 -рибонуклеазы. Важно, что в этом случае при соблюдении мягких условий связь разрывается сначала по гуаниловому нуклеотиду, который входит в антикодонный триплет аланиновой тРНК, и молекула распадается посередине на две части. Этот факт свидетельствует, что антикодонный триплет является экспонированным, доступным для атаки.

Более быстрым и удобным методом определения нуклеотидной последовательности является метод нуклеотидных карт с помощью меченых по ^{32}P тРНК, разработанный Ф. Сэнгером. В этом случае для определения достаточно около 0,1 мг рибонуклеазных гидролизатов РНК. Расщепление молекулы тРНК осуществляется гуаниловой или панкреатической рибонуклеазой. Разделение радиоактивных олигонуклеотидов достигается двухмерным разделением: в

одном направлении — на ацетатцеллюлозе, а во втором — на ДЭАЭ-целлюлозе с помощью высоковольтного электрофореза. Картина разделения получается с помощью автордиографии. Темные пятна показывают места расположения олигонуклеотидов. По интенсивности потемнения судят о количестве олигонуклеотида и числе фосфатных групп, которые в нем представлены. По положению олигонуклеотида на нуклеотидной карте (на «фингерпринте») с помощью определенной диаграммы можно говорить о его нуклеотидном составе. На основании полученных данных восстанавливается единая последовательность всей полинуклеотидной цепи.

Уже полностью расшифрована нуклеотидная последовательность в молекулах свыше 60 транспортных РНК и нескольких 5S РНК. В настоящее время становится возможным определение нуклеотидной последовательности также в цепях, состоящих из тысяч нуклеотидов. Например, почти полностью определена последовательность нуклеотидов в 16S рибосомальной РНК *E. coli*. Успешно идет изучение 23S рибосомальной РНК и РНК ряда РНК-содержащих вирусов. Так, в 1976 г. бельгийский ученый В. Фирс полностью выяснил первичную структуру РНК вируса MS2, поражающего *E. coli*. Вся его нуклеотидная цепь состоит из 3569 нуклеотидов, которые образуют три гена, ответственные за биосинтез трех белков — оболочки вируса, РНК-репликазы и белка, контролирующего процесс сборки вируса.

Проблема изучения первичной структуры ДНК является одной из наиболее трудных проблем современного естествознания. Но в последнее время открыты ферменты, способные специфически расщеплять также цепь ДНК. Например, эндонуклеаза IV, выделенная из *E. coli*, в которой ее образование индуцируется при инфицировании фагом T4. Эндонуклеаза IV активна по отношению к одноцепочечной или денатурированной ДНК. При этом гидролизуются связь между дезокситимидином и дезоксцитидином, образуются фрагменты с цитидиловым нуклеотидом на 5'-конце. Эндонуклеаза IV при 4°С, ионной силе 0,2 разрывает 90% ДНК фX174 на фрагменты от 15—150 до 600 звеньев, а при 45°С и ионной силе меньше 0,05 образуются фрагменты из 5—30 нуклеозидных звеньев. Кроме того, быстро растет число открываемых ферментов рестрикции, обладающих очень высокой специфичностью расщепления ДНК в определенных местах ее цепи. Поэтому в результате их действия образуется небольшое число фрагментов ДНК. Рестриктазы способны узнавать специфические последовательности в нативной двуцепочечной ДНК, разрывать в этих местах полинуклеотидную цепь и таким образом вызывать деструкцию ДНК чужеродной данной клетке. Совместное применение эндонуклеазы IV и ферментов рестрикции позволяет определить структуру небольших фрагментов ДНК.

Одной из важных задач является изучение первичной структуры участков ДНК, которые специфически взаимодействуют с белками и выполняют определенные функции. Такими участками являются

промоторные, операторные и те, которые узнаются различными белками: РНК-полимераза, белки-репрессоры, эндонуклеазы, модифицирующие ферменты и т. п. Соответствующие участки ДНК связываются с этими белками и таким образом защищаются ими от эндо- и экзонуклеаз. Это кладется в основу метода выделения соответствующих функционально специфических участков ДНК. Например, РНК-полимераза соединяется с промоторной областью, состоящей из 30—40 нуклеотидов, которые остаются неразрушенными после гидролиза молекулы ДНК ДНК-азой.

Высокоспецифично соединяются с ДНК белки-репрессоры, некоторые из которых, например лактозный из *E. coli*, выделены и получены в очищенном виде в больших количествах. Уникальное взаимодействие белка-репрессора лактозного оперона позволило выделить этот участок ДНК и установить его первичную структуру. Дж. Беквит с сотрудниками выделил в 1969 г. Лас-Оперон из *E. coli* с помощью бактериофагов λ и ϕ 80. *E. coli* инфицируется этими фагами, ДНК которых состоит из тяжелой и легкой цепей. Лас-Оперон при поражении клетки включается в тяжелые цепи, которые легко отделить от легких цепей. После выделения и смешения тяжелых цепей образуется двуцепочечная ДНК Лас-оперона. Неспаренные концы ее отщепляются экзонуклеазой и образуется чистый Лас-оперон. Большая перспектива принадлежит изучению первичной структуры ДНК с помощью эндонуклеаз-ферментов рестрикции. Уже выделено достаточно большое количество этих ферментов. Например, при действии рестриктазы *Hind* на ДНК вируса SV-40 образуется всего 11 фрагментов длиной от 400 до 2250 пар оснований. Затем эти фрагменты подвергаются действию других специфических эндонуклеаз (рестриктаз) и получают более короткие последовательности, которые подвергаются дальнейшему структурному анализу.

Химические методы для специфического расщепления ДНК пока широко не применяются. В настоящее время уже расшифрованы полидезоксирибонуклеотидные последовательности нескольких сателлитных ДНК (сателлитная ДНК морской свинки, мыши и др.), молекулы ДНК фага ϕ X174; последовательности, которые расщепляются некоторыми ферментами рестрикции; последовательности оператора лактозного оперона и ряда промоторных участков ДНК фагов и вирусов; примыкающего к ЦЦА триплету участка ДНК, кодирующего тирозиновую РНК; выделены последовательности ДНК, ответственные за синтез всех гистонов и другие.

Несмотря на некоторые успехи, проблема определения полной структуры высокомолекулярной ДНК остается сложной, и для ее успешного решения необходимо изыскание и разработка новых более эффективных методов изучения.

8. Выделение, фракционирование и определение нуклеиновых кислот. Для изучения и характеристики нуклеиновых кислот их необходимо выделить в чистом виде. Все современные методы выделения и определения содержания нуклеиновых кислот делятся

на три группы: по определению ультрафиолетового поглощения азотистыми основаниями; по цветным реакциям с рибозой и дезоксирибозой; по содержанию фосфора. Изменение оптической плотности в области 260 нм зависит от пространственного расположения гетероциклических ядер азотистых оснований, что обусловлено состоянием дипольных моментов электронных переходов в молекуле. Оптическая плотность при 260 нм находится в зависимости также от водородных связей между основаниями двух параллельных цепей макромолекулы нуклеиновых кислот.

Все нуклеотиды имеют максимум поглощения при 260 нм, а цитидин при 270 нм. Величина оптической плотности заметно ниже у двуцепочечных нуклеиновых кислот по сравнению с одноцепочечными, а у последних ниже, чем суммарная оптическая плотность составляющих мононуклеотидов. В случае наличия примесей белка измерения оптической плотности необходимо проводить при двух длинах волн. Это вызвано тем, что некоторые аминокислоты, особенно содержащие ароматическое ядро, являются оптически активными. Первая длина волны должна быть ближе к длине волны оптимальной оптической плотности нуклеиновых кислот, вторая — к длине волны оптической плотности белков (270 и 290 нм; 260 и 286 нм; 260 и 284 нм). При значительных загрязнениях нуклеиновых кислот белками спектрофотометрический метод применять нецелесообразно.

Определение углеводов основано на специфических реакциях, которые протекают с рибозой и дезоксирибозой. Эти реакции протекают с одной из форм рибозы и поэтому могут лежать в основе методов, позволяющих дифференцированно определять ДНК и РНК. В реакциях рибоза или дезоксирибоза участвует своей альдегидной группой. Реакция проводится в кислой среде или предварительно необходимо разорвать гликозидные связи. Трихлоруксусная или хлорная кислоты разрывают гликозидные связи в пуриновых нуклеотидах и не разрушают в пиримидиновых нуклеотидах. Поэтому в реакции участвует приблизительно половина рибозы, что определяется нуклеотидным составом нуклеиновой кислоты.

Из цветных реакций с углеводами для определения содержания ДНК широко применяется реакция с дифениламином, который взаимодействует с 2-дезоксирибозой и дает синее окрашивание, интенсивность которого измеряется при 595 нм. Но при этом дифениламин взаимодействует и с другими пентозами. С индолом ДНК дает желтое окрашивание, и оптическую плотность измеряют при 490 нм. С пентозами и РНК индол дает коричневую окраску, и, хотя чувствительность этой реакции в 12 раз меньше, чем между индолом и ДНК, значительные примеси пентоз и РНК могут мешать анализу. При определении содержания РНК применяются реакции рибозы с орцином, флороглюцином, бромфенилгидразином. Среди всех этих цветных реакций рибозы или дезоксирибозы с различными соединениями наиболее часто применяется дифениламиновая (на ДНК) и орциновая (на РНК).

Определение нуклеиновых кислот по фосфору дает надежные результаты, так как содержание этого элемента не зависит от нуклеотидного состава. Но это возможно при условии, если изучаемый препарат не содержит примесей других нуклеиновых кислот и загрязнений неорганическим фосфором. Фосфор в образце минерализуется, затем осуществляется реакция между фосфором и молибдатом аммония, при этом образуется фосфомолибдат. После восстановления последнего смесь окрашивается в синий цвет, который фотометрируется.

Описанные методы могут быть приложимы к определению нуклеиновых кислот в тканях только после очистки и разделения их. Обычно очистка начинается с удаления кислоторастворимых соединений трихлоруксусной кислотой или HClO_4 на холоду. При этом из растертой ткани удаляются свободные нуклеотиды, неорганический фосфор, производные азотистых оснований. Но липиды и белки остаются вместе с нуклеиновыми кислотами. Липиды, в частности фосфолипиды, удаляются органическими растворителями (смесь спирт — эфир при нагревании или хлороформ на холоду). Дальнейшее определение ДНК и РНК можно проводить либо без разделения, либо после предварительного разделения. При определении по рибозе и дезоксирибозе нуклеиновые кислоты без предварительного разделения очищают от белков переводом их в осадок обработкой трихлоруксусной кислотой. Затем содержание ДНК и РНК определяется цветными реакциями (по В. Шнайдеру). По методу Г. Шмидта и С. Тангаузера проводится предварительное разделение нуклеиновых кислот с помощью щелочного гидролиза. После гидролиза РНК КОН или NaOH реакционная смесь нейтрализуется HClO_4 или трихлоруксусной кислотой и доводится до кислой реакции. ДНК и белок выпадают в осадок. В надосадочной жидкости оказываются 2', 3'-мононуклеотиды РНК. Это разделение основано на различии химического строения между ДНК и РНК. Как известно, у рибозы имеется свободная гидроксильная группа у второго углеродного атома пентозного кольца. При воздействии щелочью возникает связь между 2'-гидроксилом рибозы и соседней фосфатной группой, образуется нестойкий фосфотриэфир. Он превращается в лабильный нуклеозид 2', 3'-циклофосфат, который легко гидролизуеться в фосфат. В результате РНК распадается на 2', 3'-мононуклеотиды, которые переходят в надосадочную жидкость, и их содержание затем определяется одним из трех методов.

ДНК из осадка извлекается в кислой среде с помощью трихлоруксусной кислоты или HClO_4 . В экстракте содержание ДНК может быть определено одним из методов, применяемых в случае РНК. Однако определение по фосфору может дать завышенные результаты из-за присутствия ненуклеиновых фосфорных соединений: фосфосерин, инозитдифосфат, инозитмонофосфат, фосфопептиды, содержание которых может достигать свыше 20% от всего фосфора.

Выделение и разделение нуклеиновых кислот можно проводить с помощью HClO_4 . Для этого сначала ткань обрабатывается

органическими растворителями для извлечения липидов, а затем подвергается последовательным экстракциям различными концентрациями HClO_4 . При этом последовательно извлекаются кислоторастворимые продукты, затем РНК и наконец ДНК (по М. Огуру и Г. Розену). Но этот способ надежного разделения нуклеиновых кислот не дает, так как РНК полностью не извлекается и загрязняет фракцию ДНК. Кроме этого, при рН-3 в молекуле ДНК рвутся N-гликозидные связи между пуриновыми основаниями и дезоксирибозой. Пуриновые основания отделяются (апуринизация — отщепление пуринов). В этом случае ОН-группа при углеродном атоме в первом положении освобождается и цепь ДНК разрывается. В связи с этим появляется свободная ОН-группа и ДНК становится неустойчивой к действию щелочи, так же как и РНК.

Очистка нуклеиновых кислот от белка и других примесей может быть достигнута с помощью NaCl . Для этого после удаления кислоторастворимых соединений и липидов гомогенат суспендируют в NaCl , центрифугируют и нуклеиновые кислоты осаждают спиртом. Затем нуклеиновые кислоты разделяются щелочным гидролизом и определяются известными методами.

Выявление локализации и определение количества нуклеиновых кислот может быть проведено в живой клетке, ее органоидах. Для определения ДНК в клетке кислотным гидролизом вызывают апуринизацию. Образуется апуриновая кислота, свободные гидроксильные группы, которые взаимодействуют с восстановленным основным фуксином и дают окрашенное в красный цвет соединение (реакция Фельгена).

Локализация ДНК в клетке или ее органеллах определяется визуально, а количественное содержание — цитофотометрированием. Для цитохимического изучения нуклеиновых кислот часто применяется смесь пиронина и метилового зеленого. Ценность этого состава красителей состоит в том, что он дает возможность определять одновременно локализацию ДНК и РНК в клетке и ее органоидах. Причина этого — избирательная адсорбция ДНК (в нативной форме) метилового зеленого, в результате чего она окрашивается в зеленый или синий цвет, тогда как РНК взаимодействует с пиронином с образованием красного окрашивания.

Если же ДНК находится в состоянии одноцепочечной структуры, то она лучше взаимодействует с пиронином. Пиронин связывается только за счет свободных фосфатных групп. Если же последние закрыты аминными группами белков (фосфамидные связи), белково-липидными структурами органондов и т. д., то они не реагируют с пиронином. Поэтому с помощью пиронина мы можем определить только ту часть РНК, у которой есть свободные фосфатные группы. И этот метод для количественной цитохимии не может быть использован. Метилловый зеленый также не может быть использован для количественного определения ДНК, так как в ядре ее фосфатные группы блокированы аминогруппами негистоновых и «остаточных» белков.

Для количественного определения содержания нуклеиновых кислот в клетке применяется измерение поглощения в ультрафиолетовой области с помощью цитофотометра, т. е. обычного микроскопа, оборудованного монохроматором и фотоэлектрическим устройством для регистрации степени поглощения света. Все шире начинает применяться люминесцентная микроскопия для изучения нуклеиновых кислот в клетке. С помощью акридинового оранжевого ДНК обнаруживается по светло-зеленой или желто-зеленой флуоресценции, а РНК — по красной флуоресценции. Существуют и другие методы определения нуклеиновых кислот, но они менее широко применяются.

Для того чтобы выяснить путь биосинтеза, свойства, биологическую активность и значение нуклеиновых кислот, необходимо их выделить, по возможности, в нативном состоянии. Это всегда сопряжено с трудностями, состоящими в том, что нуклеиновые кислоты имеют очень большие сложные молекулы, которые связаны с другими соединениями, в частности с белками. Их молекулы трудно отделяются от белков и подвергаются различным гидродинамическим воздействиям. Кроме этого, в клетках (как правило, в лизосомах) всегда имеются активные нуклеазы, которые в гомогенизированной ткани высвобождаются и находятся в активном состоянии. Из существующих методов выделения нуклеиновых кислот наиболее надежным является фенольно-детергентный. При этом из гомогенизированной ткани нуклеиновые кислоты извлекаются фенолом в присутствии детергентов (додецилсульфат натрия и др.) и ингибиторов нуклеаз (бентонит, поливинилсульфат, йодацетамид и др.).

В настоящее время имеется ряд методов, позволяющих выделять и фракционировать различные формы нуклеиновых кислот. Кратко рассмотрим некоторые из этих методов. Для изучения структуры и функции РНК необходимо выделение ее различных форм. Частично эта задача может быть решена разделением, дифференциальным центрифугированием субклеточных структур, содержащих определенные формы РНК. Различные формы РНК можно получить с помощью зонального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы с перепадом концентрации от 5 до 20%. В получаемых фракциях содержание различных форм РНК определяется по оптической плотности в области 260 нм.

При наличии небольшого количества РНК для ее разделения на различные формы применяется электрофорез в полиакриламидном геле, агарозе и др. Содержание РНК в отдельных зонах геля определяется сканированием в ультрафиолете или по окраске толуидиновым синим или другими красителями.

Смесь транспортной и рибосомальных РНК может быть разделена нанесением на метилированный альбумин на кизельгуре с последующей концентрационной элюцией NaCl. Хорошее разделение различных форм РНК также достигается на колонках с различными производными целлюлозы (ДЭАЭ-целлюлоза и др.). Если на целлюлозу иммобилизуется ДНК, то можно получить в чистом

виде иРНК. Различные тРНК получают методом противоточно-го разделения. При выделении и получении различных форм ДНК мы сталкиваемся с ломкостью ее молекулы, с гидролизом ДНК-азой. ДНК легче получать из бактерий, вирусов, у которых ее молекула имеет меньшие размеры. При зональном центрифугировании в градиенте сахарозы разделяются спирализованные кольцевые и линейные ДНК. В сахарозе при щелочном рН разделяются циклические и линейные одноцепочечные ДНК. Формы ДНК, различные по плавучей плотности (одно-, двуцепочечные, разное количество Г—Ц пар), разделяются центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия. Разделение суперспиральной ДНК достигается по плавучей плотности равновесным центрифугированием в градиенте смеси хлористого цезия и бромистого этидия или йодистого пропи-дия, которые внедряются между основаниями и обуславливают раз-личную интенсивность изменения плотности у двуцепочечной и су-перспиральной ДНК. Различные формы ДНК можно разделять на колонках с эктеолоцеллюлозой (целлюлоза после обработки эпи-хлоргидрином и триэтаноламином); с гидроксипаттитом; с метили-рованным альбумином на кизельгуре и т. д. Для разделения РНК, ДНК и их гибридов применяются нитроцеллюлозные фильтры. Они связывают денатурированную ДНК, РНК/ДНК-гибриды и пропускают нативную ДНК и РНК. Эти формы нуклеиновых кис-лот можно разделить также центрифугированием в градиенте хло-ристого цезия.

9. Репликация и биосинтез ДНК. На стадии *S* интерфазы клеточ-ного цикла протекают процессы репликации ДНК. При этом про-исходит точное воспроизведение нуклеотидной последовательности в молекуле ДНК у дочерних клеток. Если бы это не соблюдалось, то генетическая информация была бы искажена или совсем утеряна. В связи с этим очень важным является познание механизма матрич-ного синтеза ДНК. Матричный синтез по принципу комплементар-ности осуществляется при наличии трех условий: геометрического соответствия; возможности образования 2—3 водородных свя-зей; прямого контакта между основаниями при синтезе. Хотя точ-ность матричного синтеза достаточно высока, имеют место ошибки при транскрипции в пределах 10^{-3} — 10^{-4} , а при репликации — 10^{-6} — 10^{-7} . Ферменты репликации и транскрипции имеют два центра. Один из них «узнает» нуклеотидное звено на матрице, вто-рой — нуклеотиды-предшественники. Один из этих центров — ка-талитический. Если нарушить один из центров, то частота ошибок при включении очередного нуклеотида резко возрастает. В основе специфичности матричного синтеза при репликации и транскрип-ции лежат процессы узнавания между белками-полимеразами и матрицей. При этом решающее значение имеет вторичная и третич-ная структура, конформационное состояние макромолекул.

Ведущую роль в узнавании играют азотистые основания, так как образование комплементарной пары возникает между осно-ваниями уже без сахара и фосфорного остатка. Механизм этого

узнавания состоит в том, что белок полимеразы узнает основание матрицы одним центром, после этого возникает сигнал на активный центр, в котором происходят изменения, повышается его сродство со следующим комплементарным основанием-предшественником.

Создатели модели двуспиральной структуры ДНК Уотсон и Крик считали, что репликация ДНК происходит через разрыв водородных связей между полинуклеотидными цепями, их разматывание и синтез вдоль каждой из них новых комплементарных цепей. Было высказано предположение, что процесс репликации может протекать тремя путями. Первый — полуконсервативный, когда две цепи макромолекулы ДНК отделяются друг от друга. При этом одна цепь является матричной, а вторая затравочной. К затравочной присоединяются нуклеотиды в последовательности, соответствующей матричной цепи. Каждая цепь служит шаблоном для синтеза новой цепи. Поэтому каждая новая молекула ДНК состоит из одной старой цепи и одной новой комплементарной ей цепи, т. е. при делении клетки получают половину исходного генетического материала родителей. Второй — консервативный путь репликации — состоит в том, что у дочерних клеток формируется наследственный материал точно по образцу родительского генетического материала. Это осуществляется таким образом: после синтеза двух дочерних цепей они объединяются и образуют целую новую двуспиральную молекулу ДНК. То же самое происходит и с двумя материнскими исходными цепями. Третий — дисперсный способ, когда ДНК материнской клетки случайно, статистически поровну, распределяется между дочерними клетками. При этом происходит разрыв молекулы ДНК, в результате которого в дочерних цепях оказываются участки новой и старой материнской цепи.

Экспериментальные данные, полученные к настоящему времени, подтверждают, что процесс репликации ДНК протекает по полуконсервативному механизму, хотя при этом возникает несколько затруднений. Например, каким образом происходит расплетание двуспиральной молекулы ДНК перед синтезом новых комплементарных цепей. Через каждые 10 пар оснований молекула должна повернуться вокруг своей оси один раз. Для полного разделения цепей молекула должна вращаться со скоростью около 10000 об/мин. Если энергетически это возможно, то неясно, как с такой скоростью может вращаться молекула, длина которой может достигать одного миллиметра. Разъединение двуспиральной цепи может происходить по принципу «активного раскручивания», вследствие вращения молекулы ДНК против часовой стрелки. Затем при образовании дочерних комплементарных цепей на двух материнских цепях вновь происходит образование водородных связей. Этот механизм принято называть «разрыв—воссоединение».

Однако экспериментальное доказательство механизма репликации, постулированное Дж. Уотсоном и Ф. Криком, было связано с техническими трудностями, состоящими в разработке методов, с

помощью которых можно воспроизвести изменения с низкой радиоактивностью молекул ДНК. Сначала для этой цели были применены опыты по переносу меченой по ^{32}P и ^{14}C ДНК на нерадиоактивную среду, где протекала репликация. Затем в дочерних молекулах ДНК определяли радиоактивность. Но окончательное и убедительное подтверждение полуконсервативный механизм репликации ДНК получил в классических опытах М. Мезелсона и Ф. Сталя, проведенных в 1957 г. Они использовали ДНК, меченую тяжелым стабильным изотопом азота ^{15}N . При этом ученые исходили из того, что при замене легкого изотопа ^{14}N в азотистых основаниях на тяжелый изотоп ^{15}N заметно возрастает плотность молекулы ДНК, что легко доказывается методом равновесного центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия. Сущность этого метода состоит в том, что центрифужные пробирки заполняются раствором, плотность которого возрастает в направлении к ее дну. При центрифугировании изучаемые молекулы под действием центробежной силы будут двигаться, пока не достигнут зоны растворителя в пробирке, в которой имеется соответствующая ей плотность. В конце концов в этой зоне собираются все молекулы, имеющие одинаковую плотность.

М. Мезелсон и Ф. Сталь выращивали четырнадцать поколений *E. coli* на среде, в состав которой входило 96,5% ^{15}N в виде $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. ДНК этих бактерий метилась ^{15}N . После этого клетки *E. coli* были пересажены на среду, в состав которой входил ^{14}N в виде хлористого аммония. Через интервалы времени, соответствующие определенному количеству поколений *E. coli*, брали пробы на определение ^{15}N . Предварительно эти ученые выращивали *E. coli* на двух средах: $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ и $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$. Затем получили ДНК из «тяжелых» и «легких» бактерий и смешали. Смесь центрифугировали в градиенте плотности хлористого цезия. «Тяжелые» и «легкие» ДНК четко разделялись. Этот метод обладает достаточно высокой чувствительностью, чтобы разделить молекулы с близкими значениями плотности. В данном случае молекулярная масса ^{15}N -ДНК увеличивается по сравнению с ^{14}N -ДНК приблизительно на 1%. Затем бактерии *E. coli*, выращенные на среде с ^{15}N ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$), переносились на среду с ^{14}N ($^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$). Через некоторый промежуток времени, необходимый для формирования первого поколения клеток *E. coli* (количество клеток удвоилось по сравнению с первоначальным), отбирали пробы культуры, из которых получали ДНК, и определяли ее плавучую плотность. В результате была обнаружена только одна полоса ДНК, плавучая плотность которой занимала промежуточное положение между тяжелой ^{15}N -ДНК и легкой ^{14}N -ДНК. Этот результат соответствовал именно полуконсервативному механизму репликации ДНК, при котором ДНК содержала одну тяжелую цепь с ^{15}N и одну легкую с ^{14}N .

Когда клетки *E. coli* прошли вторую генерацию, в них вновь определялась плавучая плотность ДНК. Было получено две полосы, одна из которых содержала ДНК с плотностью, равной плотнос-

ти легкой ДНК, а вторая — ДНК с плотностью гибридной ДНК, образовавшейся при первом делении клеток на среде, содержащей ^{15}N (рис. 38).

Определение плавучей плотности продолжалось при прохождении клетками *E. coli* последующих генераций, когда начали образовываться ДНК с плавучей плотностью, характерной для легкой ДНК (^{14}N -ДНК). Легкая ДНК, обнаруженная после второй генерации, могла возникнуть при репликации ^{14}N -цепи ДНК, которая появилась после первого деления клеток *E. coli*. Таким образом, убедительно была подтверждена гипотеза полу-

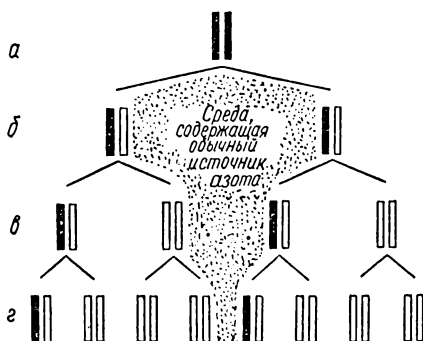


Рис. 38. Схема полуконсервативного механизма репликации ДНК (тяжелая ДНК обозначена черными сплошными линиями):

а — одна тяжелая молекула; б — две полутяжелые молекулы; в — две полутяжелые и две легкие молекулы; г — две полутяжелые и шесть легких молекул.

консервативной репликации, высказанная Дж. Уотсоном и Ф. Криком. Но данные, полученные М. Мезелсоном и Ф. Сталем, можно объяснить исходя и из консервативного механизма редупликации, если считать, что гибридная молекула состоит из двух двойных спиралей, одна из которых полностью «легкая», а другая — «тяжелая». М. Мезелсон и Ф. Сталь провели дополнительно изучение гибридной ДНК. Они денатурировали гибридную ДНК и установили, что молекулярная масса каждой из двух цепей равняется половине молекулярной массы исходной гибридной молекулы. Если бы имел место консервативный механизм репликации ДНК, то тогда молекулярная масса цепей ДНК, разошедшихся при денатурации, должна была бы равняться четвертой части гибридной молекулы, т. е. и эти данные говорят о полуконсервативном механизме репликации ДНК.

Под электронным микроскопом удалось наблюдать, как реплицируется кольцевая ДНК митохондрий. Репликация начинается с расплетания нити ДНК на небольшом участке и на одной из нитей идет синтез копии ДНК. Вторая нить в синтезе пока не принимает участия. Постепенно матричная ДНК расплетается все дальше, и ДНК-полимераза строит копию. Когда удлинение прошло на одну треть цепи, становятся хорошо видны две точки: одна — стартовая точка репликации, другая — точка роста дочерней нити. Возникает вилкообразная структура, репликативная вилка. Когда ДНК-полимераза удвоит одну нить, тогда начинается репликация второй нити. По окончании процесса образуются четыре цепи. Цепи растут со скоростью около $27 \text{ мкм} \cdot \text{мин}^{-1}$. За одну минуту образуется около $9 \cdot 10^4$ межнуклеотидных связей. Все эти данные также подтверждают полуконсервативный путь репликации ДНК (рис. 39). Но эти работы были выполнены на микроорганизмах, у которых ДНК представлена одной двуспиральной молекулой, тогда как у

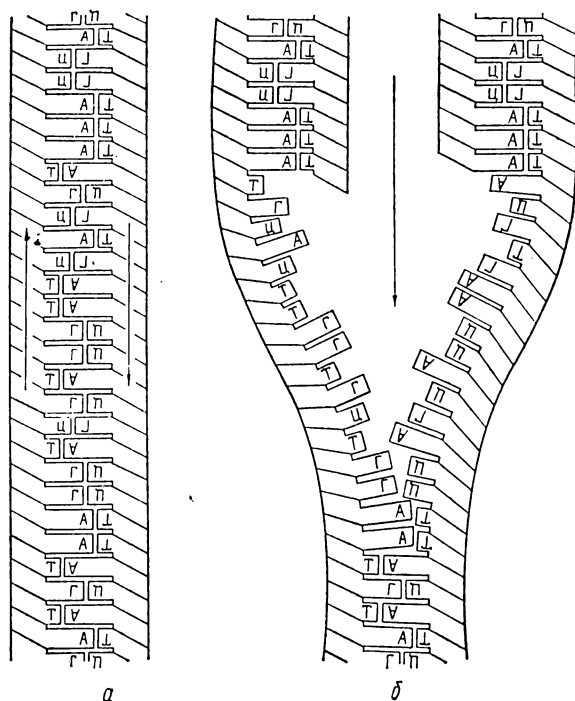


Рис. 39. Схема репликации ДНК по Дж. Уотсону и Ф. Крику (Whitshouse, 1969): а — часть молекулы ДНК: стрелки показывают полярность двух полинуклеотидных цепей; б — молекула ДНК в состоянии репликации: стрелка показывает направление разделения тяжей и синтеза.

эукариотов ДНК представлена в хромосомах многими молекулами в сочетании с белком.

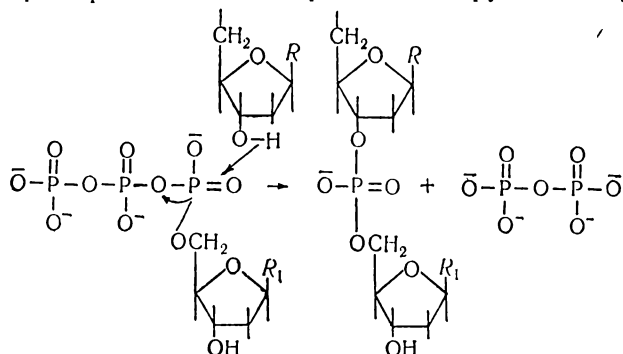
Опыты, проведенные на клетках корешков конских бобов, показали также полуконсервативный механизм репликации хромосом. Корешки выдерживались сначала в присутствии меченого тритием тимидина, а затем переносились на среду с немеченым тимидином. С помощью метода радиоавтографии было установлено, что в присутствии меченого тимидина образовались меченые хромосомы. При последующем удвоении образовались меченые и немеченые хромосомы, т. е. каждая хромосома состояла из двух субъединиц, одна из которых является вновь синтезированной. Значит репликация хромосом проходит также по полуконсервативному механизму. Необходимо отметить, что у одноцепочечных РНК и ДНК, которые являются носителями генетической информации у многих вирусов, процесс репликации протекает по особому механизму с помощью так называемых репликативных форм.

Вторым подтверждением полуконсервативного механизма репликации ДНК являются фундаментальные исследования А. Корнберга по ферментативному синтезу ДНК. А. Корнберг за эти рабо-

гы был удостоен Нобелевской премии. В 1956 г. из экстрактов *E. coli* он выделил фермент, который был способен включать дезокси-нуклеозидтрифосфаты в полинуклеотидную цепь ДНК. Этот фермент был назван ДНК-полимеразой, дупликазой или ДНК-нуклеотидилтрансферазой. Позже он был найден и у эукариотов. Фермент А. Корнберга, или ДНК-полимераза I, является гомогенным белком по данным седиментации, хроматографии, электрофореза, и представляет собой одну полипептидную цепь с кольцеобразной структурой с диаметром 65 Å. Имеется один дисульфидный мостик. В активный центр входит SH-группа. Фермент обладает высоким сродством с 3'-ОН концевым нуклеотидом в области «насечек» на одной цепи матрицы. Белок ДНК-полимеразы имеет несколько активных участков. Активный центр белка-фермента обладает способностью взаимодействовать и связываться с одним из четырех дезоксирибонуклеозид-5-трифосфатов. Вторым активным участком фермент связывается с матричной цепью. Третьим взаимодействует со свободной 3-гидроксильной группой затравочной цепи. Четвертым участком фермент удерживает затравочную цепь денатурированной молекулы ДНК. Молекула ДНК-полимеразы I состоит из двух фрагментов, один из которых обладает полимеразной и 3', 5'-экзонуклеазной активностью. Таким образом, исправляются ошибки при включении очередного нуклеотида отщеплением его с 3'-конца строящейся полинуклеотидной цепи. Второй фрагмент обладает только 5', 3'-экзонуклеазной активностью. ДНК-полимеразная реакция протекает при наличии в системе четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов, Mg^{2+} в концентрации 10^{-2} — 10^{-3} моль, однощепочной ДНК-затравки при pH-9,2. Один из дезоксинуклеозидтрифосфатов (дезокситимидинтрифосфат) метится по C—2 тимина или по ближайшей к тимину фосфатной группе. Если в системе отсутствует один из субстратов или Mg^{2+} , образование ДНК снижается во много раз. То же самое происходит, если затравку обработать дезоксирибонуклеазой. Одна молекула ДНК-полимеразы включает в полинуклеотидную цепь около тысячи нуклеотидов в минуту. Новообразованная ДНК по составу оснований идентична ДНК-затравке.

Синтез ДНК начинается с насечки, которая наносится на одну из цепей двуцепочечной матрицы специальными эндонуклеазами (*никазами*). Образуются свободные 5'-фосфатный и 3'-гидроксильный концы, способные связываться с ДНК-полимеразой. Узнавание очередного комплементарного основания, которое включается в цепь, обусловлено аллостерическим переходом конформации белка ДНК-полимеразы, который возникает под влиянием основания на матрице. Изменение конформации ДНК-полимеразы повышает ее сродство именно к следующему комплементарному основанию. В процессе биосинтеза ДНК имеет место нуклеофильная атака активированного пирофосфатом дезоксирибонуклеозид-5'-фосфата гидроксильной группой, которая находится в 3'-положении дезоксирибозы на растущем конце полимера. При этом освобождается пирофосфат

и цепь удлиняется на один мономер. А. Корнберг выделил два белковых фактора, которые принимают участие в элонгации, удлинении полинуклеотидной цепи. Как видно, для образования молекулы ДНК необходимы кроме ДНК-полимеразы другие ферменты и белковые факторы. ДНК-полимераза синтезирует полинуклеотид-



ную цепь в направлении 5' → 3'. Но в клетке, как известно, идет одновременная репликация двух антипараллельных (5' → 3')- и (3' → 5')-цепей ДНК. Поэтому возникало затруднение, которое было преодолено после открытия еще двух ферментов — ДНК-лигазы и эндонуклеазы. Из *E. coli* был выделен белок с молекулярной массой 100 000, который способен соединять концы цепей ДНК с помощью фосфодиэфирной связи между 3'-ОН и 5'-фосфатной группой. Белок же эндонуклеазы способствует репликации обеих цепей в антипараллельной двойной спирали.

Процесс репликации ДНК в нативных условиях осуществляется короткими участками, фрагментами (около 1000—2000 нуклеотидов), которые сшиваются ДНК-лигазами. Такие мелкие фрагменты ДНК были обнаружены в клетках *E. coli* Р. Оказаки и названы его именем (фрагменты Оказаки). Особенно много фрагментов ДНК обнаруживается у мутантов *E. coli*, которые потеряли способность синтезировать ДНК-лигазу. Р. Оказаки изучал репликацию ДНК у *E. coli* с помощью ³N-тимина. Метка включается во фрагменты, которые выделялись центрифугированием и определялись по радиоактивности. Кроме этого, установлено, что в начале каждого фрагмента имеются по 50—100 нуклеотидов последовательности РНК. Они служат затравкой, с них начинается репликация ДНК. Поэтому для начала репликации ДНК необходимо присутствие активной РНК-полимеразы. Затем короткие цепи-затравки РНК разрушаются РНК-азой.

В процессе репликации участвуют три фермента: ДНК-лигаза, ДНК-полимераза, эндонуклеаза. Последняя осуществляет разрывы в полинуклеотидной цепи ДНК. Затем ДНК-полимераза реплицирует короткие фрагменты ДНК, при этом использует попеременно в качестве матрицы обе антипараллельные цепи, поэтому образова-

ние фосфодиэфирных связей осуществляется в обоих случаях в направлении $5' \rightarrow 3'$.

ДНК-полимераза I обладает полифункциональным действием: включение нуклеотидов в полинуклеотидную цепь, обмен пирофосфатного остатка дезоксинуклеотидтрифосфата на свободный пирофосфат, экзонуклеазная активность. Как видно, ДНК-полимераза является, с одной стороны, универсальным ферментом, так как собирает нуклеотиды на различных матрицах, а с другой — выполняет различные функции. У ряда мутантов *E. coli*, которые нормально размножаются, установлена почти исчезающая активность ДНК-полимеразы I. Поэтому возможно, что основной функцией ДНК-полимеразы I является восстановление повреждений, репарация ДНК.

Функцию репликации, вероятно, выполняет открытая в 1968 г. ДНК-полимераза II, функционирующая у мутантов *E. coli*, которые не содержат ДНК-полимеразы I. Белок ДНК-полимеразы II имеет молекулярную массу около 70 000; для активации необходимы Mg^{2+} и NH_4^+ ; чувствителен к соединениям, связывающим сульфгидрильные группы. ДНК-полимераза II синтез ДНК осуществляет в направлении $5' \rightarrow 3'$, не обладает экзонуклеазной активностью, но, видимо, принимает участие в репарации ДНК также, как и ДНК-полимераза I.

В некоторых мутантах *E. coli* обнаружена ДНК-полимераза III, которая обладает высокой активностью в нативных условиях, более термолабильна и чувствительна к соединениям, связывающим сульфгидрильные группы. У эукариотов в последнее время установлены различные белки с ДНК-полимеразной активностью. ДНК-полимераза (α) обнаружена в цитоплазме, в составе имеет SH-группы, молекулярная масса около 140 000, константа седиментации 6—8 S. ДНК-полимераза (β) найдена в ядре, не содержит SH-групп, имеет молекулярную массу от 27 000 до 45 000, константа седиментации 3,3 S. ДНК-полимераза (γ) — белок, который содержит SH-группы, имеет молекулярную массу около 110 000 и обладает высокой активностью при низкой концентрации ДНК.

Как видно, ДНК-полимеразы представлены различными белками. Возможно, что множественность ДНК-полимераз является одним из факторов надежности процесса репликации.

Особенностями репликации ДНК *in vitro* является обязательное присутствие в инкубационной смеси небольших количеств готовой ДНК, так называемой затравки. Важно, что при этом всегда происходит биосинтез индивидуального специфического полидезоксирибонуклеотида, идентичного по нуклеотидному составу и последовательности ДНК-затравке, и что от соотношения нуклеозидтрифосфатов в инкубационной смеси не зависит соотношение азотистых оснований в синтезированной ДНК. Из этого следует, что ДНК-полимераза не обладает специфичностью в отношении нуклеотидного состава синтезируемого дезоксиполимера. При изучении вновь синтезированного полимера оказывается, что он действительно является двуспиральной нативной макромолекулой ДНК с цепями

противоположной полярности. Это подтверждается: наличием соотношения азотистых оснований по правилу Э. Чаргаффа; чувствительностью к эндо- и экзонуклеазам; точкой плавления; изменением вязкости и удельного веса; наличием 3', 5'-фосфодиэфирных связей; наличием гиперхромного эффекта (до 35—40%) при денатурации; трансформирующей активностью, если в качестве затравки бралась биологически активная трансформирующая ДНК бактерии. Одинаковый состав оснований у синтезируемого продукта и ДНК-матрицы доказывается также с помощью остроумного метода — анализа частоты ближайших соседей,— рассмотренного выше.

Важная особенность репликации ДНК состоит в том, что она происходит, когда ее молекула находится в одноцепочечном состоянии. В опытах применяется или односпиральная ДНК вирусов, или это достигается предварительной температурной обработкой и денатурацией двуспиральной молекулы ДНК. В клетке, в нативных условиях, ДНК также временно переводится в однотяжевое состояние, в котором она выполняет функцию матрицы. Характерной для репликации ДНК является особенность приобретения ею нативной жесткой двуспиральной структуры. Такая структура возникает не сразу в процессе биосинтеза, а через какой-то отрезок времени при участии ферментов или спонтанно. ДНК-полимераза включает в полинуклеотидную цепь аналоги ряда оснований, которые можно использовать в качестве маркеров. Таким образом, весь процесс репликации мы можем разделить на этапы: инициация, локальное плавление двуцепочечной структуры ДНК, образование фрагментов Оказаки, репликация фрагментов, сшивка их в общую цепь.

При биосинтезе кольцевых ДНК необходимо еще соединить конец в конец полинуклеотидные цепи, т. е. образовать связи между концевыми 3'-ОН и 5'-фосфорильными группами. Эти процессы осуществляются с помощью соединяющих ферментов — ДНК-лигаз. При этом ДНК-лигаза образует ковалентный комплекс с НАДФ, где последний служит донором аденила. Аденил сначала соединяется с 5'-фосфатным концом ДНК, а затем замещается 3'-ОН с образованием фосфодиэфирной связи. Кроме этой функции и репарации разрывов цепи, ДНК-лигазы принимают участие в процессах генетической рекомбинации и репликации антипараллельных цепей при действии ДНК-полимеразы. В последнее время установлены РНК-лигазы, сшивающие 5'- и 3'-концы полирибонуклеотида. Таким образом, матричный синтез ДНК осуществляется не одной ДНК-полимеразой, а сложным комплексом белков и других соединений. При этом необходимо участие также эндонуклеаз (никаз) для нанесения насечек; лигаз для сшивки концов цепи; белковых факторов для локального расплетания двуспиральной структуры ДНК и т. д. ДНК-полимеразы изучались не только у микроорганизмов, но и у высших организмов.

Возможность репликации вне клетки была показана М. Гулиа-
иум, А. Корнбергом и Р. Синсхеймером. С помощью ДНК-полимера-

зы и ДНК-лигазы они в 1968 г. синтезировали двуцепочечную ДНК фага ϕ X174. Эта ДНК имела молекулярную массу $1,7 \cdot 10^6$ дальтон и обладала биологической активностью. При заражении *E. coli* вызывала ее гибель.

В последнее время выделен ряд белковых факторов репликации, но их роль на молекулярном уровне остается полностью не выясненной. Выделен и изучается ряд белков, ответственных за локальную денатурацию, расплетание двуцепочечной структуры ДНК. Один из них — белок 32, биосинтез которого контролируется геном № 32 фага T4. Этот белок состоит из четырех субъединиц, термостабилен, специфичен для ДНК-полимеразы фага. С помощью хорошо изученной генетической карты фага T4 установлено, что у него свыше десяти оперонов, последовательностей ДНК, контролирует биосинтез различных белковых факторов репликации. Как видно, для осуществления процесса репликации необходимо большое количество белковых факторов, из которых не все известны и еще недостаточно полно изучены. С этой стороны почти неизученной остается стадия терминации процесса репликации. Остаются малоизученными механизмы регуляции репликации ДНК, в частности генетические детерминанты, контролирующие этот процесс.

Управление процессом репликации и биосинтеза ДНК имеет большое значение, особенно в связи с избирательным подавлением активности ДНК-полимеразы как основы борьбы с размножением вирусов, подавления опухолевого роста, сопровождаемого более активным процессом синтеза ДНК. Известны различные вещества, с помощью которых можно оказывать влияние на синтез предшественников нуклеиновых кислот; блокировать матрицу образованием с ней водородных и ионных связей; ингибировать ДНК-полимеразную активность; приостанавливать включение очередного нуклеотида в полинуклеотидную цепь и вызывать структурные изменения в молекуле ДНК. Такие изменения могут быть вызваны заменой одних оснований на другие, выпадением или включением оснований. Эти изменения ведут к спонтанным мутациям, частоту которых можно повысить действием радиации, различными мутагенами.

10. РНК-зависимый биосинтез ДНК. Биосинтез ДНК может осуществляться также с помощью РНК-зависимых ДНК-полимераз — обратных транскриптаз.

На основе структуры двойной спирали ДНК, созданной в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком, считалось общепризнанным, что передача генетической информации идет от ДНК к ДНК у всех организмов и от РНК к РНК у РНК-содержащих вирусов. Но в 1961 г. С. М. Гершензон высказал предположение о передаче генетической информации от РНК к ДНК. В 1963 г. Л. Кавальери на РНК-матрице, состоящей из аденина и урацила на поли (A—У) в присутствии ДНК-полимеразы Корнберга, выделенной из *E. coli*, получил полидезоксирибонуклеотид, состоящий из тимина и аденина, поли д(Т—А). Затем Г. Темин в 1964 г., а также Г. Темин и Д. Балтимор опытным путем установили передачу

генетической информации от РНК к ДНК. Из онкогенных вирусов и клеток, инфицированных этими вирусами, были выделены РНК-зависимые ДНК-полимеразы, или обратные транскриптазы. Эти РНК-содержащие вирусы после воздействия на них неионным детергентом активировали образование ДНК из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Этот процесс снимается РНК-азой, не чувствителен к актиномицину Д, не протекает в присутствии рибонуклеозидтрифосфатов.

С. Спигельман в 1970 г. обнаружил РНК-зависимую ДНК-полимеразу у многих вирусов. Этот фермент был позже выделен из клеток нормальных тканей и из вирусов, не вызывающих опухолевую трансформацию. Оказалось, что ДНК-полимераза I также катализирует обратную транскрипцию. Белок ревертазы получен из многих онкорнавирусов в очищенном виде. Он находится в сердцевине вируса и составляет 0,5—1% его белка. Ревертаза из онкорнавируса птиц AMV состоит из двух форм, основной и минорной. Основная определяет 80—90% суммарной активности, имеет молекулярную массу 160 000 и состоит в эквимольном соотношении из α и β субъединиц с молекулярной массой соответственно 65 000—70 000 и 105 000—110 000. Молекулярная масса минорной формы — 65 000—69 000. Этот белок обладает также ДНК-зависимой ДНК-полимеразной активностью, а также рибонуклеазной активностью (РНК-аза-Н) и расщепляет РНК только гибридной РНК-ДНК. Ревертаза и РНК-аза-Н связаны с α -субъединицей. Эти ферменты катализируют сначала образование гибридной молекулы двуцепочечной РНК-ДНК, которая затем служит матрицей для синтеза ДНК. Образовавшаяся гибридная молекула РНК-ДНК реплицируется в двуцепочечную ДНК с помощью вирусной ДНК-зависимой ДНК-полимеразы. Образованная таким образом ДНК включается в геном клетки и вызывает опухолевую трансформацию. Все РНК-зависимые ДНК-полимеразы активируют присоединение нуклеотидов к концевому 3'-ОН ДНК- или РНК-затравки. Но не катализируют биосинтез ДНК *de novo*. Синтез полинуклеотида идет в направлении 5' $\rightarrow$ 3'.

Оптимум активности ревертазы при pH 7,6—8,3 в присутствии K^+ или Na^+ Mg^{2+} или Mn^{2+} и меркаптоэтанола, глутатиона или другого восстанавливающего агента. Обнаружение ревертаз и их активности проводится на основе матриц-затравок. На матрице поли (Ц) способны синтезировать олиго (дГ) только ревертазы онкорнавирусов, а на поли (А) — олиго (дТ) — клеточные обратные транскриптазы.

Таким образом, в настоящее время установлены различные пути передачи генетической информации, но преобладающим является путь ДНК—ДНК, ДНК—РНК. Открытие обратной транскрипции является основой обобщения, которое можно сделать в молекулярной биологии. Это обобщение состоит в том, что поток информации всегда идет от нуклеиновой кислоты к белку (так как во всех случаях синтез белка направляется РНК-матрицей). Открытие обратных транскриптаз поставило перед молекулярной биологией ряд проблем. На основе определения активности РНК-зависимой ДНК-полимеразы с помощью синтетических гибридных полидезоксипо-

лирибонуклеотидов возможна ранняя диагностика раковых заболеваний. Если в роли матрицы для синтеза ДНК использовать различные информационные РНК, то можно получать отдельные гены для работ по генной инженерии. С помощью обратных транскриптаз можно изучать и другие вопросы, такие как первичная структура ДНК, последовательность оснований в ее цепи. Дело в том, что прямой анализ нуклеотидной последовательности ДНК очень сложен. Прежде всего потому, что самые низкомолекулярные вирусные ДНК содержат намного больше мономеров, чем белки, первичная структура которых расшифрована. Вместе с тем уже теперь имеются другие пути определения нуклеотидной последовательности участков ДНК, детерминирующих нуклеотидную последовательность транспортных РНК, первичная структура которых установлена. На основе принципа комплементарности по первичной структуре иРНК определяется последовательность дезоксирибонуклеотидов соответствующих участков ДНК.

Обратная транскрипция позволяет получить с вирусных и информационных клеточных РНК структурные части генов (кДНК), определяющих состав белковой молекулы; определить, сколько и какие гены имеются в клетке для того или иного белка (глобин, фиброин, кератин и др.); по меченой кДНК можно дать временную характеристику начала функционирования различных генов, изучить временной код в процессе развития сложных организмов; по времени начала функционирования гена и начала синтеза белка облегчается определение факторов, обуславливающих начало считывания генетической информации; по кДНК представляется возможность установить дефекты генетического аппарата, обуславливающие наследственные болезни; с помощью кДНК высокой радиоактивности можно определить кодоны, выполняющие структурную и регуляторную роль.

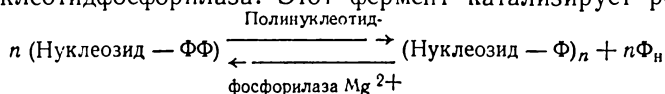
В 1972 г. одновременно Д. Балтимор, С. Спигельман и Д. Ледер обратной транскрипцией получили структурные фрагменты гена глобина по матрицам клеточных иРНК.

Ферментативный синтез комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) на основе молекулярной гибридизации открывает возможность решения ряда других проблем молекулярной биологии, таких как амплификация генов, наличие той или иной иРНК в зависимости от состояния клетки, определение синтеза специфических про-иРНК и образование в процессинге иРНК и др. Синтез кДНК облегчает выделение и синтез нужного генетического материала соединением его с молекулой-вектором в генной инженерии. С помощью кДНК, образованной ревертазой вируса, можно достигать соединения двух геномов внедрением вновь образованной ДНК в геном трансформируемой клетки. Таким образом, у прокариотов и эукариотов имеются белки — ферменты, обратные транскриптазы, которые активируют синтез ДНК на матрицах РНК.

11. Биосинтез РНК. Если ДНК является определенным соединением, выполняющим функцию хранения и воспроизведения

генетической информации и информации транскрипции биосинтеза специфического белка, то РНК представлена несколькими типами макромолекул, которые различаются своими физическими свойствами и выполняют различные функции. Поэтому и механизмы биосинтеза РНК более разнообразны.

Вопрос биосинтеза высокомолекулярных нуклеиновых кислот стал одним из важнейших, после того как были выяснены процессы образования полинуклеотидов. Одним из первых открытых ферментов, который осуществляет биосинтез полирибонуклеотидов, была полинуклеотидфосфорилаза. Этот фермент катализирует реакцию:



Предположение о том, что этот фермент катализирует образование различных типов РНК, столкнулось с рядом противоречий. Прежде всего, состав полирибонуклеотида, образующегося в результате этой реакции, определяется соотношением нуклеотидов, которое создается в инкубационной смеси. Поэтому было непонятно, каким образом определяется строго определенный состав РНК, биосинтез которой протекает в клетке. Продолжались поиски других ферментов, катализирующих биосинтез РНК. Они окончились открытием ДНК-зависимого биосинтеза РНК.

12. ДНК-зависимый биосинтез РНК. Стимулом к дальнейшим исследованиям явилось открытие А. Корнбергом ДНК-полимеразы, которую он выделил из *E. coli*. Одним из таких ферментов была ДНК-зависимая РНК-полимераза, или транскриптаза. Впервые этот фермент был получен в 1959 г. С. Вайсом и сотрудниками из ядер клеток печени. У высших организмов фермент преимущественно находится в ядре, где соединен солевыми связями с высокополимерной ДНК и является составной частью нерастворимого хромосомного комплекса. РНК-полимераза активирует включение нуклеозидтрифосфатов в полирибонуклеотидную цепь. РНК-полимераза представляет собой негистоновые белковые частицы с молекулярной массой около 400 000. Они состоят из многих субъединиц, соединенных между собой так, что образуют канал, через который проходит ДНК-матрица. Простетических групп в белке РНК-полимеразы не обнаружено.

ДНК-зависимые РНК-полимеразы различных организмов различаются по своей структуре и функционально. Молекулы РНК-полимераз, ДНК-содержащих вирусов, митохондрий, галобактерий состоят из одной или двух полипептидных цепей, отличаются высокой специфичностью и не требуют для осуществления транскрипции присутствия дополнительных белковых факторов.

Более изучена структура РНК-полимеразы *E. coli*. Этот фермент состоит из нескольких частей и субъединиц, которые выполняют различные функции. Основная часть молекулы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* (минимальный фермент) состоит из нескольких полипептидных цепей, в том числе: две α -цепи, по одной β - и

β'-цепи и две ω-цепи. Эта часть молекулы РНК-полимеразы катализирует образование полинуклеотидной цепи. Процесс ускоряется в присутствии ββ'-цепей и еще одного белка, так называемого σ-фактора. ββ'-Цепи служат для связи фермента с матрицей, а σ-фактор «узнает» определенный участок ДНК (промотор), повышает сродство фермента к этому участку и усиливает интенсивность его транскрибирования. Действие σ-фактора усиливается еще ψ-белком. Наоборот, σ-фактор снижает сродство РНК-полимеразы к не-промотору. Если же σ-фактор удалить, то РНК-полимераза начинает соединяться неспецифически со многими участками ДНК. σ-Белок изменяется при считывании различных последовательностей ДНК, поэтому он является фактором специфичности, который направляет РНК-полимеразы на считывание только соответствующих последовательностей ДНК. ДНК-зависимые РНК-полимеразы эукариотов изучены недостаточно. Имеется ядрышковая РНК-полимераза, которая катализирует транскрипцию при образовании предшественников рибосомальных РНК; нуклеоплазменная РНК-полимераза — ответственная за транскрипцию хроматина; митохондриальная РНК-полимераза. Активность ядрышковой РНК-полимеразы подавляется циклогексимидом, нуклеоплазменной α-аманитином, митохондриальной — рифамицином. Белок ДНК-зависимой РНК-полимеразы трудно поддается очистке и поэтому при выделении получается в измененном виде.

РНК-полимеразная реакция зависима от присутствия ДНК и протекает таким образом: $n_1\text{АТФ} + n_2\text{ГТФ} + n_3\text{УТФ} + n_4\text{ЦТФ} \xrightarrow{\text{ДНК}} \text{АМФ} - \text{ГМФ} - \text{УМФ} - \text{ЦМФ} + (n_1 + n_2 + n_3 + n_4) \text{ФФ}$. Мононуклеотиды присоединяются к 3'-гидроксилу, и РНК строится в направлении 5' → 3'. Реакция очень чувствительна к ДНК-азе и РНК-азе, так как ДНК в реакции является затравкой, а РНК образуется в результате реакции. ДНК-затравка выполняет роль матрицы и определяет не только суммарный состав нуклеотидов РНК, но и их последовательность в полимере. Это подтверждается определением нуклеотидной последовательности в РНК с помощью метода ближайших соседей или методом гибридизации. Интенсивность гибридизации обнаруживается с помощью нитроцеллюлозных фильтров, которые пропускают свободную РНК и задерживают гибриды РНК с денатурированной ДНК. Для этого ДНК закрепляют на целлюлозе или агаре, и на ней в колонках улавливается РНК с комплементарными основаниями. Другие формы РНК проходят через колонки. Оптимальными условиями РНК-полимеразной реакции является инкубационная смесь, состоящая из 4 типов нуклеозидтрифосфатов, ДНК, Mg^{2+} (10^{-3} моль) или Mn^{2+} (10^{-3} моль) при pH 7,5—8,7, β-меркаптоэтанола или другого реагента, содержащего SH-группу. Добавление последних связано с тем, что при очистке фермента SH-группы ингибируются тяжелыми металлами или специфическими ингибиторами. Инактивация обратима и снимается добавлением реагентов, содержащих SH-группы. Если исклю-

чить из инкубационной смеси ДНК (с помощью ДНК-азы) или один из нуклеозидтрифосфатов, то реакция подавляется. В инкубационную смесь вводятся меченые нуклеозидтрифосфаты либо меченые основания (аденин- ^{14}C , урацил- ^{14}C). Но в последнем случае не требуется высокая очистка РНК-полимеразы, так как в экстракте присутствуют и ферменты, которые активируют рибозилирование и фосфорилирование оснований.

На ДНК имеются места сильного и слабого связывания молекул РНК-полимеразы. Места, где имеется прочное связывание, называют промоторами, и с них начинается считывание информации при синтезе РНК. Значущая нить ДНК РНК-полимеразой узнается не только по специфической последовательности нуклеотидов, но и по определенной структурной организации этой последовательности. Это следует из того, что считывание со значущей нити происходит только с нативной ДНК. В процессе связывания под влиянием σ -фактора изменяется конформация РНК-полимеразного белка и повышается его сродство к матрице. Процесс нуклеиново-белкового узнавания теряется при денатурации ДНК. Это говорит о ее роли в процессе связывания матрицы с ферментом.

Возможно, что при транскрипции происходит изменение конформации ДНК, и она переходит из В-формы в А-форму. При этом основания становятся более доступными для транскрипции. Весь процесс транскрипции делится на четыре стадии: присоединение фермента к матрице, инициация, элонгация и терминация. Процесс транскрипции начинается с нуклеиново-белкового узнавания и со связывания белка РНК-полимеразы с помощью ионного взаимодействия со значущей цепью спирали ДНК. Процесс связывания отличается высокой избирательностью, что, видимо, обусловлено специфической нуклеотидной последовательностью на матрице, наличием пиримидиновых блоков и отрицательными зарядами остатков фосфорной кислоты. При этом ДНК расплетается, претерпевает локальную денатурацию там, где присоединена РНК-полимераза. Возникает комплекс, состоящий из РНК-полимеразы и ДНК. σ -Фактор не участвует в процессе соединения фермента с ДНК, но в его присутствии прочность связи именно с промоторными участками ДНК заметно возрастает.

На стадии *инициации* ДНК-зависимая РНК-полимераза с помощью одного активного центра взаимодействует с 3'-ОН рибозила первого нуклеозидтрифосфата, с которого начинается синтез новой рибонуклеиновой кислоты; отщепления пирофосфата при этом не происходит. Первым нуклеозидтрифосфатом, как правило, бывает пурин (аденин или гуанин). Это объясняется, видимо, тем, что синтез начинается с полипиримидиновых блоков, из которых состоят промоторные участки НК. Однако РНК-полимераза начинает считывание, вероятно, с последних пиримидиновых нуклеотидов, стоящих с 3'-конца промоторного участка. Затем второй нуклеозидтрифосфат взаимодействует со вторым центром фермента и с помощью фосфодиэфирной связи присоединяется к 3-углеродному

атому рибозы первого нуклеозидтрифосфата. В результате этого выделяется молекула пирофосфата. Допускается, что при этом σ -белок с другими белками принимают участие в локальном расплетании участка ДНК, на котором начинается комплементарное включение первого нуклеозидтрифосфата.

В процессе инициации важную роль выполняет σ -фактор. Он присоединяется к минимальному ферменту РНК-полимеразы, вызывает в нем конформационные изменения, в результате чего происходит инициация. Процесс инициации блокируется антибиотиком рифамицином, который взаимодействует не с ДНК, а с белком РНК-полимеразы и, видимо, тормозит образование связи между первыми двумя нуклеотидами. После окончания инициации белок РНК-полимеразы претерпевает конформационные изменения, и прочность связи фермента с матрицей возрастает. Матрица при этом ориентирует соответствующим образом очередные нуклеозидтрифосфаты, и это облегчает образование водородных связей между комплементарными основаниями. Кроме этого, матрица выступает также в роли конформационного кофактора РНК-полимеразы. В результате у фермента возникает рабочая конфигурация его активного центра. Образованием первой фосфодиэфирной связи заканчивается стадия инициации.

Затем начинается стадия *элонгации*. Связь РНК-полимеразы с образовавшимся динуклеотидом ослабевает. РНК-полимераза смещается (транслоцируется) в сторону роста полинуклеотидной цепи, образует следующую фосфодиэфирную связь с 3'-ОН-группой образовавшегося динуклеотида, который остается связанным с матрицей. Этот процесс осуществляется с помощью двух имеющихся в ее молекуле активных центров. Один из них связывает фермент с 3'-ОН-концом растущей РНК, а второй — с очередным нуклеозидтрифосфатом. Таким образом, для биосинтеза РНК необходимы два белковых фактора: σ -фактор для инициации процесса транскрипции и белок для образования 3', 5'-фосфодиэфирной связи. Так процесс продолжается до образования всей полинуклеотидной цепи и снятия ее с участка считываемой последовательности ДНК.

Заканчивается матричный синтез РНК стадией *терминации*. РНК-полимераза осуществляет один цикл транскрипции, в результате которого образуется молекула РНК. Фермент узнает сигналы терминации, которые указывают конец оперона и место окончания считывания информации с определенного транскриптона.

Предполагается, что замедление и приостановка биосинтеза РНК осуществляется по принципу торможения конечным продуктом. В роли последнего выступает продукт реакции — РНК. Кроме этого, в окончании репликации принимает участие еще один белок ρ (ро-фактор). В конце транскрипции изменяется конформация РНК-полимеразы, повышается сродство к ρ -фактору и определяется участок ДНК, служащий сигналом окончания процесса роста полинуклеотидной цепи. Полинуклеотид, который образуется в результате действия ДНК-зависимой РНК-полимеразы, является типичной

РНК. Он растворим в кислоте, устойчив к нагреванию и действию ДНК-азы, легко атакуется РНК-азой, в щелочной среде расщепляется с образованием 2'-, 3'-моонуклеотидов.

Матричная активность ДНК-затравки резко снижается, когда часть молекулы ДНК заблокирована гистонами. Синтез РНК *in vitro* протекает на двуцепочечной и одноцепочечной ДНК. Если затравкой служит одноцепочечная ДНК, то сначала на ней образуется гибрид ДНК с РНК, который затем служит матрицей для синтеза РНК. Когда количество РНК достигает количества ДНК-затравки, тогда начинается образование свободной РНК. При этом после каждого акта репликации образовавшаяся новая молекула РНК замещает предшествующую в составе гибрида ДНК — РНК. Если затравкой служит двуцепочечная ДНК, то она не изменяется в процессе синтеза РНК и может быть выделена в неизменном состоянии. При этом репликация протекает на обеих цепях ДНК по консервативному методу. Образующиеся цепи РНК являются взаимнокомплементарными и образуют двуспиральную структуру.

Биосинтез РНК в клетке *in vivo* протекает иначе, т. е. только на двуцепочечной ДНК-матрице. Это подтверждается также тем, что РНК-полимеразная активность подавляется больше в том случае, если затравкой служит двуспиральная ДНК. Но при биосинтезе РНК происходит комплементарное соединение гетероциклических оснований. Поэтому имеет место временное разъединение цепей на небольших участках молекулы ДНК. При этом транскрипция протекает только на одной из цепей ДНК. Это обеспечивается структурой молекулы РНК-полимеразы. Предполагается, что этот белок имеет два отверстия для двух цепей ДНК-матрицы. В одном из отверстий находится активный центр РНК-полимеразы. При прохождении ДНК-матрицы через фермент последний вращается вокруг ее оси, и происходит раскручивание двойной спирали ДНК, движение фермента вдоль цепи ДНК и биосинтез молекулы РНК. Одновременно идет закручивание и восстановление первоначальной структуры. Предполагается, что к одной молекуле ДНК может прикрепляться несколько молекул РНК-полимеразы. При этом происходит несколько последовательных считываний информации с ДНК-матрицы со скоростью до нескольких нуклеотидов в секунду.

Основной ролью ДНК-зависимой РНК-полимеразы является синтез различных типов РНК клетки. Это объясняется тем, что все типы РНК — информационная, рибосомальная и транспортная — имеют комплементарное строение по отношению к ДНК-матрице. Подтверждение этому — одинаковый нуклеотидный состав ДНК и РНК и способность их образовывать специфические гибридные двуспиральные молекулы. Например, у *E. coli* от 0,1 до 0,25% всей ДНК является комплементарной по отношению к рибосомальной и транспортной РНК. Среди продуктов РНК-полимеразной реакции транспортная РНК обнаруживается с помощью фермента метилазы, который специфически метилирует только эту форму РНК. ДНК-затравка выполняет роль матрицы в ДНК-зависимой РНК-

полимеразной реакции. Это следует из того, что при воздействии на ДНК -затравку актиномицином Д последний соединяется с остатком гуаниловой кислоты в молекуле ДНК и приостанавливает процессы, связанные с синтезом различных форм РНК. При этом биосинтез рибосомной РНК подавляется актиномицином Д более сильно. Это объясняется тем, что более высокое содержание гуанина находится на последовательности ДНК, служащей матрицей для биосинтеза рибосомальной РНК. В процессе транскрипции первой синтезируется информационная РНК, что показывают данные, полученные с помощью меченого тритием уридина. После 20-минутной инкубации выделяли всю РНК и определяли радиоактивность. Почти вся РНК была нерадиоактивной, а информационная РНК давала ясно выраженный пик радиоактивной метки. Через более длительное время радиоактивная метка проявлялась в трех пиках. Существует три вида РНК-полимеразы: ядерная, ядрышковая и синтезирующая короткие РНК-фрагменты (тРНК, 5S РНК и др.).

Процесс транскрипции можно наблюдать. Это имеет очень большое значение, так как до сих пор о работе гена, о транскрипции мы судили по логическим заключениям на основе анализа генетических и биохимических данных. Видеть, как передается генетическая информация, как работает ген, не удавалось. И вот О. Миллер сумел с помощью электронного микроскопа увидеть ген за работой и зафиксировать этот процесс (рис. 40). Известно, что последовательности ДНК, которые кодируют биосинтез рибосомальных РНК-предшественников, находятся в центральной части ядрышек. Процесс образования рРНК особенно интенсивно протекает на ранних стадиях развития яйцеклетки амфибий. На рис. 40 видно, как на транскриптонах (последовательностях ДНК) образуются молекулы рРНК-предшественников. Непрерывная осевая нить — это нить ДНК, покрытая белком. На каждом участке (транскриптоне) ДНК одновременно образуется до ста фибрилл — поперечных нитей, т. е. цепей РНК в комплексе с белком. Нити имеют постепенно увеличивающуюся длину, что соответствует различным стадиям синтеза полинуклеотидной цепи рибосомальной РНК. У основания каждой такой поперечной нити имеются шарики — молекулы РНК-полимеразы. Они передвигаются слева направо по нити вдоль гена, что сопровождается ростом полинуклеотидной цепи рибосомальной РНК. Длина сегментов (последовательностей) ДНК, покрытых фибриллами (поперечными нитями), составляет 2—3 мкм. У эукариотов такой длины участок ДНК кодирует биосинтез приблизительно 18S и 28S рибосомных РНК. На осевой нити ДНК имеются участки, которые не покрыты фибриллами РНК, т. е. они не активны и на них не идет транскрипция. Таким образом, на рис. 40 зафиксирована структура и работа индивидуальных генов эукариотической клетки, которые кодируют биосинтез рибосомальных РНК.

В результате ДНК-зависимого синтеза с помощью РНК-полимеразы образуются различные типы клеточной РНК в виде



Рис. 40. Синтез рРНК на ДНК яйцеклетки амфибий. Около ста молекул рРНК образуются одновременно. РНК-полимераза перемещается вдоль цепи ДНК.

рибонуклеиновых кислот-предшественников. Затем проходит пост-транскрипционное созревание, в результате чего образуются функционально активные истинные РНК (Г. П. Георгиев). Сначала РНК-предшественник подвергается расщеплению — *процессингу*, а затем ферментативной модификации (метилование) и другим изменениям. РНК-предшественник имеет значительно большие размеры по сравнению с функциональной РНК. Последняя образуется с помощью РНК-азы, отщепляющей значительную часть нуклеотидной последовательности от РНК-предшественника. Например, информационная РНК синтезируется в ядре в виде про-мРНК. Значительная ее часть распадается в ядре и не несет структурной информации. Ее называют псевдо-мРНК. Функциональноактивная мРНК локализована около 3'-концевого участка гигантских про-мРНК, а 5'-концевые участки содержат последовательности, которые, вероятно, относятся к псевдо-мРНК. Из этого следует, что транскриптон, с которого считывается информация мРНК, только на небольшом своем отрезке несет структурную функцию, т. е. кодирует белок. Остальная, большая, часть транскриптона выполняет, видимо, регуляторную функцию. Поэтому РНК-полимераза соединяется с промотором, вначале считывает значительную часть транскриптона и тогда только доходит до последовательности, несущей структурную функцию. В результате образуется громадная молекула про-мРНК.

В процессинге у бактерий и других низкоорганизованных организмов отщепляется незначительная часть про-мРНК. У высших организмов мРНК образуется, наоборот, при процессинге в результате потери значительной части про-мРНК, т. е. у про-мРНК прокариотов часть, которая не несет структурной информации и распадается в ядре, значительно меньше, чем в про-мРНК высших организмов. Про-мРНК после синтеза в ядре остается связанной с особыми белковыми частицами-информосомами. Этот белок информатин способствует снятию РНК с матрицы и переносу к ядерной мембране. После того как информационная РНК пройдет через мембрану, в протоплазме она образует с другими, транспортирующими, белками информосомы. Эти белки обладают очень высоким сродством с РНК и состоят из кислой и слабоосновных фракций. Информосомы имеют разный размер, что, видимо, говорит о разных размерах информационной РНК. Возможно, что долгоживущая информационная РНК находится в состоянии информосом.

Принято считать, что у бактерий до 90—95% нуклеотидной последовательности оперона выполняют структурную функцию, а 5—10% — регуляторную, обслуживающую функцию. У высших, наоборот, структурную информацию несет небольшой отрезок транскрипта, а 90% — выполняет функцию управления, регуляции. Фрагмент информационной РНК-предшественника, который отщепляется, впоследствии в ядре подвергается полной деградации. Образовавшаяся функционально активная информационная РНК поступает в цитоплазму.

Про-мРНК имеет до 100—200 адениловых нуклеотидов поли (А), которые присоединяются к ней с 3-конца как сразу после транскрипции, так и при созревании (процессинге). Роль поли (А) в процессинге и в функционировании мРНК остается неясной. Предшественник рибосомальной РНК образуется в ядрышке и при процессинге также теряет часть своей молекулы. Например, в животной клетке рибосомальная РНК-предшественник на транскриптоне образуется в виде 45S с молекулярной массой $4,4 \cdot 10^6$, которая значительно превышает сумму молекулярных масс ($1,9 \cdot 10^6 + 0,65 \times 10^6$) 28S РНК и 18S РНК, входящих в состав рибосомы. После биосинтеза рибосомальной РНК-предшественника происходит в ядре ее распад и образование уже рибосомальных 28S РНК и 18S РНК, которые затем поступают в цитоплазму. Из данных по конкурентной гибридизации следует, что часть РНК-предшественника, которая распадается, имеет иную нуклеотидную последовательность по сравнению с функционирующими рибосомальными 28S РНК и 18S РНК. Часть РНК-предшественника, которая отщепляется и распадается в ядре, занимает ее значительную долю и транскрибируется промотором и участками с регулирующими функциями. Предшественник транспортной РНК после образования на ДНК-матрице также проходит посттранскрипционные превращения (созревание), которые состоят из процессинга (расщепления) и ферментатических модификаций. Так, предшественник тирозиновой тРНК состоит

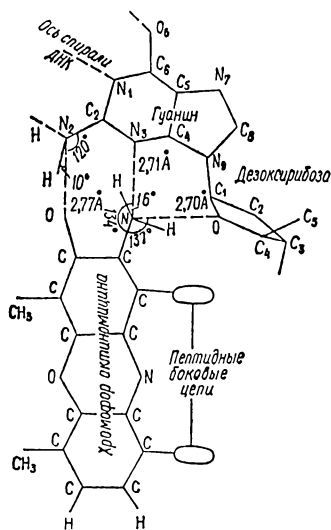


Рис. 41. Предполагаемая модель связывания актиномицина Д с ДНК в В-конформации. Длина и углы водородных связей вычислены из координат, измеренных на пространственных моделях. Водородные связи между актиномицином Д и ДНК обозначены прерывистыми линиями.

ку: а тРНК подвергается энзиматической модификации. Модификация тРНК осуществляется метилированием, ацетилированием по рибозе и основаниям. При этом процессы модификации протекают строго только около определенных нуклеотидов. Особенно много модификаций происходит около антикодона. Число модификаций возрастает в тРНК параллельно усложнению организма. Установлено, что процесс модифицирования (например, превращение уридина в псевдоуридин) осуществляется только на уровне полинуклеотида. Отдельные, свободные, нуклеотиды модификации не подвергаются.

Метилирование осуществляется метилазами. Остается неизвестным, сколько имеется всего метилаз. Но разные основания в разных положениях метилируются разными метилазами. Однако еще не выделены, не очищены белки метилаз, которые оказались очень лабильными. При этом применялись современные методы выделения и очистки: электрофокусировка, афинное разделение и т. д.

Минорные компоненты строго определенно распределены в тРНК. Из этого следует, что метилазы высокоспецифичны и строго различают соответствующий нуклеотид, его положение. Например, в валиновой тРНК метилируется только цитозин в определенном положении при определенной последовательности. Из этого следует, что конформация тРНК, специфические последовательности являются важным условием специфического действия метилаз. В связи с этим первичная структура важна потому, что она в определенной степени определяет третичную структуру тРНК. Роль минорных модифицированных компонентов зависит от природы модифицируемого компонента, его места и положения в молекуле тРНК. На этой основе делается классификация модификаций, которые отвечают за функции тРНК. Например, модификация в антикодоне связа-

из 126 нуклеотидов, а истинная тРНК — из 85 нуклеотидов, т. е. при процессинге отщепляется 41 нуклеотид. Установлены случаи, когда про-тРНК состоит из двух молекул, сшитых несколькими нуклеотидами. Предшественник расщепляется, и образуются две молекулы тРНК. При этом концевой триплет ЦЦА синтезируется на матрице или достраивается у зрелых тРНК. В течение дальнейшего посттранскрипционного созревания молеку-

на с возможностью узнавания кодона на основе принципа комплементарности. При этом, например, метилирование уридина и образование псевдоуридина усиливает связь кодона и антикодона, так как при этом образуется не две, а три водородные связи.

Время жизни различных типов РНК различно. Обычно короткой продолжительностью жизни отличается информационная РНК. Например, у бактерий жизнь одного поколения длится около 90 мин и информационная РНК обновляется через 4—6 с. За это время молекула информационной РНК несколько десятков раз принимает участие в биосинтезе белка. У высших животных эта форма РНК существует дольше — от 3 до 12 часов.

Биосинтезом всех типов РНК, особенно информационной, можно управлять с помощью различных актиномицинов. Актиномицин Д взаимодействует с дезоксигуаниловой кислотой двуспиральной ДНК. Как показывает рентгеноструктурный анализ, феноксазиновое кольцо располагается перпендикулярно оси ДНК, между ее гетероциклическими основаниями. При этом антибиотик с дезоксигуанозином образует три водородные связи, а его полипептидные цепи взаимодействуют с фосфатными группами ДНК (рис. 41). Поэтому чем больше гуанозиновых остатков в молекуле ДНК, тем она чувствительнее к действию актиномицина Д. Процесс транскрипции ингибируется рифамицином, но он взаимодействует не с ДНК, а полимеразой. Ингибирование ДНК-зависимого синтеза РНК достигается с помощью других антибиотиков (актиномицин С, оливомин), аналогов оснований (8-азагуанин, фторурацил и др.). На этой основе решаются прикладные вопросы (борьба с опухолеобразованием), а также теоретические (роль ДНК в биосинтезе различных РНК, продолжительность жизни информационной РНК и др.).

Как видно, между ДНК-полимеразой и ДНК-зависимой РНК-полимеразой имеются и значительные различия, и сходство. Последнее выражается в том, что обе ферментные системы осуществляют биосинтез ДНК и РНК только в присутствии четырех нуклеозид-трифосфатов; приблизительно одинаково включают аналоги оснований в полинуклеотидные цепи; затравка и продукты реакции имеют сходство по составу и последовательности оснований и удовлетворяют принципу комплементарности, по Дж. Уотсону и Ф. Крику; вновь синтезированные цепи ДНК и РНК обладают противоположной полярностью; сходны процессы торможения биосинтеза ДНК и РНК актиномицином Д. При действии РНК-полимеразы, также как ДНК-полимеразы, выделяется пирофосфат, который гидролизруется пирофосфатазой, поэтому обе реакции направляются в сторону синтеза.

13. РНК-зависимый синтез РНК. Было известно, что в инфицированной клетке протекает процесс репликации вирусной РНК. Поэтому возникало предположение о том, что должен существовать фермент, который активирует этот процесс. Такой фермент был обнаружен при изучении репликации РНК вирусов табачной мозаики, MS2, f2 и др. Оказалось, что клетки, зараженные РНК-вирусами,

образуют РНК-зависимую РНК-полимеразу или РНК-репликазу. Но чаще этот фермент называют РНК-синтетазой. РНК-синтаза является белком, константа седиментации которого находится в пределах 40S. Белок не диссоциируется при обычных условиях.

В последнее время бельгийский ученый В. Фирс с сотрудниками полностью расшифровал первичную структуру РНК-репликазы вируса MS2, поражающего *E. coli*. Первичная структура этого белка, состоящего из 544 аминокислотных остатков, расшифрована на основе полностью выясненной первичной структуры РНК этого вируса, состоящей из 3569 нуклеотидов. Участок нуклеотидной последовательности, определяющий состав этого белка, состоит из 1653 нуклеотидов РНК-фага. Важно, что впервые удалось определить последовательность аминокислот в полипептидной цепи по последовательности нуклеотидов в полинуклеотидной цепи. РНК-репликаза способна синтезировать РНК фага MS2 *in vitro* из всех четырех рибонуклеозидтрифосфатов в присутствии вирусной РНК. В отличие от ДНК- и РНК-полимераз, РНК-синтаза требует специфической матрицы только РНК вируса, но не клетки-хозяина. Это обуславливает непрерывную репликацию только вирусной РНК и размножение вируса. РНК-репликаза кодируется вирусной РНК, поэтому с ней специфически взаимодействует. Процесс репликации всегда идет в направлении $5' \rightarrow 3'$.

Функция РНК-синтазы состоит в активации процесса биосинтеза вирусной РНК. Причем этот процесс биосинтеза РНК в пораженной клетке отличается от биосинтеза обычных РНК тем, что он является нечувствительным к действию актиномицина Д, что говорит о том, что он независим от ДНК. При этом синтезируется РНК, отличная от всех трех типов клеточной РНК, во многих случаях биосинтез протекает в цитоплазме. РНК-синтазная реакция протекает при условии присутствия в реакционной смеси всех четырех нуклеозидтрифосфатов, РНК, ионов Mg^{2+} . РНК выступает в роли матрицы, и если ее разрушить РНК-азой, то процесс репликации приостанавливается. Оказалось, что матричная роль РНК осуществляется с помощью специального механизма репликации. Сначала образуется репликативная двуцепочечная РНК. Это подтверждается тем, что она устойчива к действию РНК-азы, имеет такую же кривую плавления, как и ДНК. Репликативная форма РНК вирусов, видимо, сходна с репликативной формой ДНК фага $\phi X174$. Одна из цепей репликативной РНК является вирусной РНК (+ цепь), а другая вновь синтезированная, комплементарной ей (— цепь). РНК-синтаза прочно связана с репликативной РНК. Процесс репликации осуществляется таким образом, что в роли матрицы выступает (— цепь) репликативной формы РНК, на которой образуется вирусная РНК (+ цепь).

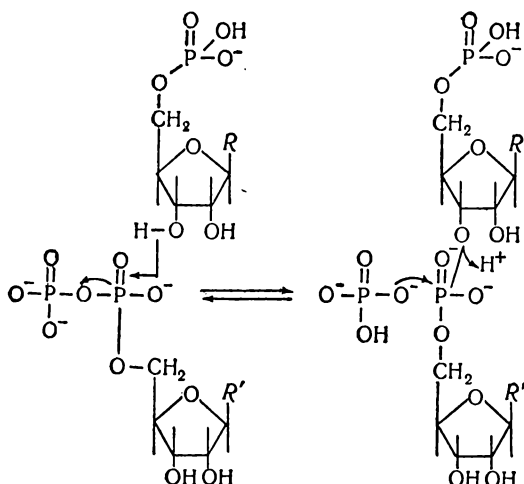
Таким образом, новообразованная + цепь замещает предшествующую цепь, и вся синтезированная РНК представлена + цепями. Биосинтез вирусной РНК осуществляется полуконсервативным путем и имеет комплементарный характер. Если образовавшиеся

+ цепи вирусной РНК перенести в белоксинтезирующую систему *in vitro*, то протекает процесс биосинтеза белка, специфического для вируса (от которого взята РНК-матрица), т. е. вирусная РНК несет генетическую информацию и выполняет роль информационной РНК без дальнейшей транскрипции. Репликация вирусной РНК (+ цепь) осуществляется в два этапа. Сначала вирусная РНК выполняет роль информационной РНК. С ее помощью на рибосомах клетки-хозяина осуществляется биосинтез белков вирусной оболочки и РНК-синтетазы. Последняя активирует комплементарный биосинтез РНК (— цепь) на РНК-матрице (+ цепь), образуется двуцепочечная репликативная форма РНК. Эта форма РНК затем служит матрицей при полуконсервативном биосинтезе + цепей, на основе которых формируются вирусные частицы. Образование репликативной формы РНК, видимо, является обязательной стадией размножения всех РНК-содержащих вирусов.

Биосинтез клеточных и вирусных РНК осуществляется с помощью принципиально различных механизмов. Это делает возможным поиск таких ингибиторов, которые будут подавлять специфически только биосинтез РНК-вируса и явятся основой борьбы с инфекциями, вызываемыми РНК-содержащими вирусами. В клетке имеется ферментная система, ЦЦА-пирофосфорилаза, которая добавляет концевые нуклеотиды к молекуле транспортной РНК. Этот процесс не может рассматриваться как матричный синтез, но близко примыкает к нему. Способностью присоединять к своей концевой группе свободные нуклеотиды не обладают другие формы РНК. Процесс добавления нуклеотидов к транспортной РНК имеет большое значение, и он детально изучен. Это процесс обязательно предшествует прикреплению активированной аминокислоты при биосинтезе белка. Акцептирование концевых нуклеотидов осуществляется только в присутствии нуклеозидтрифосфатов и сопровождается отщеплением пирофосфата. При этом у всех видов транспортной РНК образуется концевая нуклеотидная последовательность, представленная тремя нуклеотидами: ЦЦА. Синтез РНК, главным образом, локализован в ядре. Однако при удалении ядра у ацетабулярии (одноклеточного организма громадных размеров) способность к синтезу РНК сохраняется. Кроме этого, фермент, который добавляет к транспортной РНК нуклеотиды ЦЦА, находится в цитоплазме. Но этот фермент не является РНК-полимеразой системы.

14. Полинуклеотидфосфорилаза. В 1955 г. М. Грюнберг-Манаго и С. Очоа выделили из азотобактера фермент, который катализировал нематричный синтез рибополинуклеотидов из нуклеотид-5-фосфатов с выделением ортофосфата по реакции: n (Нуклеозид — ФФ) $\rightleftharpoons$ (Нуклеозид — Ф) $_n$ + n Ф $_v$. Этот фермент был назван полинуклеотидфосфорилазой (НДФ : РНК-нуклеотидилтрансфераза). Полинуклеотидфосфорилаза была первым открытым ферментом, ответственным за синтез полинуклеотидов. Ее свойства более полно изучены по сравнению с другими ферментами, однако ее роль в клетке остается не выясненной. Этот фермент широко распространен

и выделен из бактерий, растений. Молекулярная масса белка полинуклеотидфосфорилазы составляет 230 000. Особенность этого фермента состоит в том, что полинуклеотиды он образует из нуклеозиддифосфатов, тогда как РНК-полимераза активна только в присутствии нуклеозидтрифосфатов. Важно, что полинуклеотидфосфорилаза является неспецифичной в соединении оснований между собой, поэтому образует полимеры, которые имеют случайную последовательность нуклеотидов. Нуклеотиды между собой связаны 3,5-фосфодиэфирными связями. Реакция протекает при $\text{pH} = 7,5\text{--}10,0$ в присутствии ионов Mg^{2+} . Молекулярная масса полирибонуклеотидов находится в пределах 30 000—2 000 000, т. е. приближается к молекулярным массам рибонуклеиновых кислот. В очищенном виде фермент начинает образовывать полинуклеотид только после лаг-фазы. Но если дать затравку в виде небольшого количества полинуклеотида или олигонуклеотида, хотя бы из двух нуклеотидных остатков, то синтез начинается без латентного периода. Затравка не оказывает влияние на состав полинуклеотида. Для начала синтеза в затравке необходимо наличие свободной гидроксильной группы при С—3' положении, которая участвует в образовании новой фосфодиэфирной связи. Синтез начинается с возникновения связи между С—3'-гидроксилом диадениловой кислоты и 5'-фосфатом уридинмонофосфатного остатка. Дальнейшая цепь увеличивается путем аналогичной конденсации.



Первая реакция полимеризации, т. е. образование первого ди-нуклеотида из нуклеозиддифосфатов, требует преодоления высокого энергетического барьера. Поэтому введение в реакционную смесь затравки со свободным концевым 3'-гидроксилом снижает этот энергетический порог. Дальнейшая полимеризация протекает свободно.

С помощью полинуклеотидфосфорилазы можно получать полирибонуклеотиды заданного состава, которые могут выполнять функ-

ции естественных РНК. При введении таких полирибонуклеотидов в инкубационную смесь, в которой имеются рибосомы и другие факторы белоксинтезирующей системы, протекает синтез полипептидной цепи. С помощью полинуклеотидфосфорилазы получены определенного состава полирибонуклеотиды, которые были использованы для изучения вторичной и третичной структуры нуклеиновых кислот, а также для расшифровки нуклеотидного триплетного кода включения аминокислот в полипептидную цепь. Если, например, в реакционную смесь вводить только один нуклеозиддифосфат, то синтезируется гомополимер. При введении в реакцию смеси нуклеозиддифосфатов в определенном между ними соотношении сохраняется тенденция к образованию полирибонуклеотида с составом, близким к субстратной смеси. Синтез, катализируемый полинуклеотидфосфорилазой, не управляется какой-либо матрицей, а определяется статистически. Включение следующего нуклеотида в полинуклеотидную цепь определяется его парциальной концентрацией в реакционной смеси. Подбором определенного соотношения нуклеозиддифосфатов можно получать полимеры определенного нуклеотидного состава. Это, как известно, сыграло решающую роль в расшифровке генетического кода.

Полинуклеотидфосфорилаза широко распространена в микробной клетке, обнаружена в клетке растительного организма, она присутствует в рибосомах. Однако остается не выясненной ее биологическая функция. Во всяком случае можно утверждать, что эта ферментная система не участвует в образовании клеточной РНК, так как этот процесс является матричным синтезом. Можно предполагать, что физиологическая роль полинуклеотидфосфорилазы состоит в создании запаса рибонуклеотидов при избытке нуклеозидполифосфатов. Фермент осуществляет не синтез, а деградацию РНК. Возможно, с помощью этого фермента разрушается фосфолизом молекула РНК. Это подтверждается тем, что полинуклеотидфосфорилаза с меньшей скоростью разрушает транспортную и рибосомальную РНК, что объясняется тем, что эти типы РНК имеют в значительной своей части двуцепочечную вторичную структуру. Возможно, что этот фермент разрушает информационную РНК, которая, во-первых, имеет линейную одноцепочечную структуру, а во-вторых, является короткоживущей.

В клетках животных обнаружены другие ферменты, которые осуществляют нематричный синтез гомополинуклеотидов — полимеразы гомополинуклеотидов. Эти ферменты (гомополинуклеотид-нуклеозидтрифосфат-нуклеотидилтрансфераза) способны образовывать полиадениловую, полицитидиловую кислоты из нуклеозидтрифосфатов. Возможно, что эти полимеразы принимают участие в пристройке 100—200 полиадениловых нуклеотидов к 3'-концу информационной РНК, что облегчает ее передвижение из ядра в цитоплазму. Нематричным синтезом также достраивается концевая последовательность (ЦЦА) транспортных РНК с помощью специфических терминальных тРНК-синтаз. Существуют также полимеразы,

которые способны осуществлять нематричный синтез полидезоксирибонуклеотидов из нуклеозидтрифосфатов.

15. Ферментативный гидролиз нуклеиновых кислот. Мононуклеотидные единицы соединяются в полинуклеотидной цепи с помощью 3',5'-фосфодиэфирных связей. Поэтому расщепление полимерных молекул ДНК и РНК может осуществляться с помощью ферментов, которые гидролизуют эти эфирные связи между фосфатом и гидроксильной группой в 3'- или 5'-положениях углеродного атома рибозы или дезоксирибозы.

Эти реакции осуществляются с помощью нуклеаз, которые могут быть разделены по специфике своего действия. Нуклеазы принимают участие при превращении нуклеиновых кислот в процессах их распада при пищеварении, при их биосинтезе, репарации, рекомбинации, деградациии РНК-предшественников и т. д.

Нуклеазы, гидролизующие связи внутри полинуклеотидной цепи, называют *эндонуклеазами*. Их также называют нуклеодеполимеразами, или нуклеофосфодиэстеразами. При этом полинуклеотид распадается на мононуклеотиды или различных размеров олигонуклеотиды без выделения неорганического фосфата.

Нуклеазы, которые последовательно отщепляют мононуклеотиды с одного из концов полинуклеотидной цепи, называют *экзонуклеазами*, или фосфодиэстеразами.

Эндонуклеазы делятся на две группы: рибонуклеазы, гидролизующие РНК, и дезоксирибонуклеазы, расщепляющие ДНК. Эндонуклеазы (дезоксирибонуклеазы) обладают специфичностью к той или иной нуклеотидной последовательности, поэтому разрывают фосфодиэфирные связи предпочтительно в определенных местах полинуклеотидной цепи. Связи разрываются между 3'-гидроксилом пентозы и остатком фосфорной кислоты или между 5'-гидроксилом и остатком этой кислоты внутри полинуклеотидной цепи. Например, связи между фосфатом и 3'-углеродным атомом пентозы расщепляет дезоксирибонуклеаза I, выделенная из поджелудочной железы быка и хорошо изученная. Связь между фосфатом и 5'-углеродным атомом пентозы расщепляет дезоксирибонуклеаза II, выделенная из селезенки.

Рибонуклеиновые кислоты также расщепляются соответствующими эндонуклеазами (рибонуклеазами). Например, рибонуклеаза из поджелудочной железы быка термостабильна, гидролизует связи, которые образованы 5'-углеродным атомом пентозы с фосфатом, который связан с 3'-углеродом пентозы около пиримидинового основания. Поэтому при действии этой эндонуклеазы образуются нуклеозид-3'-фосфаты, содержащие пиримидины и олигонуклеотиды с концевым пиримидиннуклеотидом, несущим 3'-фосфатную группу. Еще более высокоизбирательно полинуклеотидная цепь РНК расщепляется T₁-рибонуклеазой из *Aspergillus oryzae*. При этом цепь рвется около гуанина так, что освобождается гидроксил 5'-углерода пентозы. Кроме этого, имеются эндонуклеазы, которые гидролизуют и ДНК и РНК. Экзонуклеазы гидролизуют только фосфодиэфирные

связи, образованные концевыми нуклеотидами. Они отрывают одно концевое звено за другим и таким образом гидролизуют всю цепь до мононуклеотидов. Если экзонуклеаза разрывает связи с 3'-конца цепи, то продуктами гидролиза являются нуклеозид-5'-фосфаты. Хорошо изученной экзонуклеазой этого типа является фосфодиэстераза из яда некоторых змей, которая расщепляет эти связи у всех РНК и ДНК. Если экзонуклеаза разрывает связи с 5'-конца цепи, то продуктами гидролиза являются нуклеозид-3'-фосфаты. Этот тип фосфодиэстеразы выделен из селезенки быка, и он тоже атакует все типы нуклеиновых кислот. Таким образом, экзонуклеазы обладают специфичностью расщепления ДНК или РНК или же гидролизуют те и другие.

Нуклеазы выполняют также более специфическую роль. Эндонуклеаза делает на одной из цепей ДНК разрывы, «насечки», в специальных участках, с которых начинается репликация. Эти нуклеазы называют *никазами*. Они имеют также сродство к поврежденным участкам цепи ДНК и вырезают их. Затем на этих участках синтезируется новая цепь. Важно, что некоторые ДНК-полимеразы обладают также экзонуклеазной активностью. Например, ДНК-полимераза I, выделенная из *E. coli*, обладает 3' → 5' и 5' → 3' экзонуклеазной активностью. Поэтому ДНК-полимераза выполняет не только функции синтеза полинуклеотидной цепи, но также и в репарации повреждений ДНК, и в исправлении ошибок, которые допускаются при включении некомплементарных нуклеотидов.

При классификации нуклеаз в основу кладется специфичность их действия: расположение в цепи связей, которые подвергаются гидролизу; тип нуклеиновой кислоты (ДНК, РНК); какая из связей гидролизруется: между фосфатом и 3'-углеродом или 5'-углеродом рибозы (дезоксирибозы); способность расщеплять одноцепочечную или двуцепочечную нуклеиновую кислоту. Нуклеазы расщепляют фосфодиэфирные связи только у полинуклеотидов. Эти связи в других соединениях нуклеазы не расщепляют. Это обусловлено их спецификой, основанной на особенностях организации фосфодиэфирной связи. Специфичность нуклеаз определяется нуклеозидной частью полинуклеотидной цепи и прежде всего возможностью образования водородной связи между белком-ферментом и нуклеиновой кислотой. Например, панкреатическая РНК-аза образует с урацилом три водородные связи. При этом решающую роль играет водородная связь между С—2 урацила и NH треонина. Если карбонил убрать во втором положении, то РНК-аза теряет активность и специфичность к урацилу.

Возможностью образовывать водородную связь определяется также специфичность белков-нуклеаз по отношению к какому-либо типу нуклеиновых кислот. Скорее это обусловлено наличием в субстрате 2—ОН-группы рибозы, с помощью которой с ферментом образуется водородная связь. Специфичность белков-нуклеаз в отношении эндо- и экзодействия остается недостаточно изученной. Эта специфичность относительная, так как некоторые нуклеазы обладают

и той и другой активностью, что зависит от степени протонизации среды. Специфичность нуклеаз по отношению к 3'- и 5'-концам полинуклеотидной цепи обусловлено стереохимией и прежде всего аксиальной и экваториальной ориентировкой связей.

Иммобилизация реагентов повышает активность нуклеаз, скорость реакции. Это хорошо видно на примере расщепления РНК панкреатической РНК-азой. Два остатка гистидина, входящие в активный центр фермента, обладают большой степенью свободы, поэтому малоактивны. Но при взаимодействии с нуклеиновой кислотой происходит фиксация активного центра фермента (остатков гистидина) и активность последнего резко возрастает, т. е. иммобилизация фермента приводит к его активной конформации.

В настоящее время из многих объектов выделен, очищен и получен, часто в кристаллическом состоянии, ряд рибонуклеаз, дезоксирибонуклеаз, обладающих определенными признаками и специфичностью.

Рибонуклеазы (рибонуклеинат-нуклеотидил-трансферазы). Более изученной и широко применяемой является РНК-аза, которая образуется в поджелудочной железе и состоит из двух компонентов: РНК-аза А и РНК-аза В. Белок РНК-азы А термостабилен, имеет одну полипептидную цепь, которая состоит из 124 аминокислотных остатков; молекулярная масса 14 000. Выяснена третичная структура этого белка. В молекуле имеется четыре дисульфидных мостика, которые вносят большой вклад в образование ее третичной структуры и поддержание биологической активности. РНК-аза В отличается тем, что является гликопротеидом, так как содержит олигосахаридный остаток, соединенный ковалентно с полипептидной цепью и состоящий из шести молекул маннозы и двух молекул ацетилглюкозамина. Большое сродство, избирательность фермент проявляет к таким нуклеотидным последовательностям: пиримидин-3',5'-пиримидин; пиримидин-3',5'-пурин, а в пиримидиновых основаниях быстрее гидролизуются связи, образованные с участием цитидина.

При гидролизе РНК образуются пиримидинмононуклеотиды и олигонуклеотиды, которые заканчиваются пиримидиннуклеотидом. Фермент неактивен по отношению поли(А). Панкреатическая РНК-аза сначала разрывает фосфодиэфирные связи между нуклеотидами неспирализованных участков РНК. Это ведет к ослаблению водородных связей в спирализованных участках, их распаду и потере вторичной структуры. Фермент гидролизует связи фосфорил-5'-углеродом рибозы. Образуются олигонуклеотиды, которые заканчиваются циклическими 2',3'-нуклеотидами. Затем разрываются эти 2',3'-фосфодиэфирные связи и образуются мононуклеотиды и олигонуклеотиды с концевым 3'-фосфатом. Некоторые РНК-азы не вызывают циклизации. Поэтому они делятся на циклизующие и нециклизирующие. Панкреатическая РНК-аза активирует и обратную реакцию, но последняя протекает при очень высокой нефизиологической концентрации субстратов и поэтому не имеет значения для

внутриклеточных условий. Панкреатическая РНК-аза легко инактивируется в щелочной среде, но очень устойчива при pH-4 и 100° С. В течение 5 мин теряет только 20% активности. Температурный оптимум равен 65° С. Это дает возможность полностью освободиться от примесей (ДНК-азы, протеолитических ферментов), которые деградируют при такой высокой температуре. РНК-аза I не способна гидролизовать двуцепочечную РНК или ее гибриды с ДНК. Фермент не является строгой эндонуклеазой, т. к. отщепляет и концевые нуклеотиды.

Имеется еще ряд рибонуклеаз. Щелочная РНК-аза, выделенная из печени и селезенки, имеет оптимум pH-8. При расщеплении РНК остается небольшой негидролизуемый остаток. Фермент предпочтительно разрывает связи между пиримидиновыми нуклеотидами. Кислая РНК-аза выделена из печени и селезенки. Оптимум pH-5,2—5,7. Расщепляет РНК без остатка и этим отличается от щелочной РНК-азы. В яде кобры имеется эндорибонуклеаза с оптимумом активности pH-7,6—7,8. Фермент не обладает специфичностью к азотистым основаниям, разрывает до 30% всех фосфодиэфирных связей РНК без образования мононуклеотидов. Олигонуклеотиды заканчиваются 5'-нуклеотидами. Из грибка *Aspergillus oryzae* выделены две рибонуклеазы: T₁- и T₂-РНК-азы.

T₁-РНК-аза (6-рибонуклеинат-гуанинонуклеотид-2'-трансфераза, циклизующая) специфически разрывает фосфодиэфирные связи, которые в РНК образованы 3'-фосфат-гуанозином, поэтому ее называют гуаниловой рибонуклеазой. T₁-РНК-аза — кислый, очень устойчивый белок, с молекулярной массой 11 127. Установлена первичная структура белка. Он состоит из 105 аминокислотных остатков, имеет два дисульфидных мостика, которые вносят определенный вклад в образование третичной структуры молекулы. При полном расщеплении молекулы РНК сначала образуются циклические гуанозин 2',3'-фосфаты, а затем ди-, три-, тетра- и более длинные олигонуклеотиды, устойчивые к действию фермента и имеющие в конце гуанозин 3'-фосфат. Специфичность гуаниловой РНК-азы, а также панкреатической РНК-азы, которая способна образовывать при гидролизе РНК пиримидинмононуклеотиды и олигонуклеотиды с концевыми пиримидиннуклеотидами, используется для определения нуклеотидной последовательности в РНК.

T₂-РНК-аза (рибонуклеинат-нуклеотид-2'-трансфераза, циклизующая). Оптимальная активность проявляется в нейтральной области pH, быстрее разрывает связи, образованные адениловыми нуклеотидами. При полном гидролизе РНК расщепляется на 3'-мононуклеотиды.

Дезоксирибонуклеазы I (дезоксирибонуклеинат-5'-нуклеотид-гидролазы). Хорошо изученной ДНК-азой I является фермент, выделенный из панкреатической железы (олигонуклеотидгидролаза дезоксирибонуклеиновых кислот). ДНК-аза I, как и все дезоксирибонуклеазы, разрывает фосфодиэфирные связи без образования промежуточных циклических 2', 3'-нуклеотидов. Это объясняется тем,

что во втором положении в дезоксирибозе нет ОН-группы. ДНК гидролизруется на олигонуклеотиды размером около четырех нуклеотидов с ОН-группой на 3'-конце и фосфатом на 5'-конце. Оптимальная активность фермента проявляется при нейтральной или слабощелочной реакции. Панкреатическая ДНК-аза имеет молекулярную массу, равную 62 000. Значительно выше активность проявляется в присутствии магния. Фермент предпочитает разрыв связей типа пуринпиримидин в двуспиральной ДНК. Сначала образуются двуспиральные обломки молекулы. Фосфодиэфирная связь разрывается между углеродом рибозы в 3'-положении и фосфатом, поэтому образуются олигонуклеотиды с 5'-концевым нуклеотидом. Активность фермента по мере гидролиза уменьшается, так как падает чувствительность продуктов реакции и возрастает их ингибирующее действие. Панкреатическая ДНК-аза более медленно расщепляет ДНК дезоксирибонуклеопротеида. Этот процесс ускоряется, если одновременно действуют и протеазы. В крови животных обнаружена ДНК-аза I с оптимумом действия pH-7,3—7,6. Она более термостабильна, чем панкреатическая ДНК-аза. Дезоксирибонуклеаза из *E. coli* (эндонуклеаза I) является белком с основными свойствами, с оптимумом действия в щелочной области. Двучепочечная молекула ДНК в 7—10 раз быстрее гидролизруется, чем денатурированная. Сначала образуются двуспиральные обломки, а затем олигонуклеотиды на конце с 5'-фосфатнуклеотидами.

Дезоксирибонуклеазы II (6-дезоксирибонуклеинат-3'-нуклеотидогидролаза). Сравнительно более полно изученной является ДНК-аза II, выделенная впервые из селезенки и тимуса и являющаяся основным белком с молекулярной массой, равной 38 000. В состав молекулы входят 343 аминокислотных остатка и глюкозамин, состоящий из восьми звеньев. Оптимум действия pH-4,8, ионная сила — 0,1 моль, концентрация Mg — 0,001 моль. Фермент быстрее гидролизует двучепочечную, чем одноцепочечную ДНК.

Разрыв фосфодиэфирной связи протекает между 5'-углеродом дезоксирибозы и фосфатом. Поэтому продуктами реакции являются 3'-фосфатнуклеотиды. В отличие от панкреатической ДНК-азы этот фермент без лаг-периода быстро вызывает парные симметричные разрывы в обеих цепях ДНК. Возможно, это объясняется тем, что ДНК-аза II состоит из двух субъединиц, в каждой из которых имеется по активному центру. Продуктами реакции являются крупные олигонуклеотиды, которые затем служат хорошим субстратом для ДНК-азы I. Фермент вначале гидролиза ДНК проявляет большее сродство к разрыву связей между гуаниловыми нуклеотидами. Затем специфичность возрастает больше к цитидиловым нуклеотидам.

Из микрококков *Staphylococcus pyogenes* выделена неспецифическая эндонуклеаза, которая расщепляет ДНК, РНК и обладает также экзонуклеазной активностью. Молекулярная масса белка фермента находится в пределах 11 000—12 000. Активность выше в присутствии ионов Ca^{2+} . Оптимум действия pH-8,6. При гидролизе разрывается связь между углеродом дезоксирибозы в 5'-положении

и фосфатом. Продуктами реакции являются 3-нуклеотиды. Сначала фермент действует как эндонуклеаза, образуются олигонуклеотиды от 3 до 9 нуклеотидов. После этого проявляется экзонуклеазная активность.

В плесени *Neurospora crassa* обнаружена эндонуклеаза, которая лучше расщепляет связи около гуанина и только полидезоксиполирибонуклеотиды с неупорядоченной структурой (денатурированная ДНК, односпиральная ДНК фага ϕ X174, рибосомная РНК). Оптимум действия pH-7,5—8,5. Активируется ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} . Из *E. coli* выделены эндонуклеаза I, эндонуклеаза II. Первая разрывает обе цепи, активна больше по отношению к нативной ДНК. Образуются олигонуклеотиды по 7 звеньев с фосфатом на 5'-конце. Вторая разрывает одну из цепей ДНК.

Экзонуклеазы (фосфодигидролазы ортофосфорных диэфиров). Выделены из различных объектов. Экзонуклеаза из змеинного яда (3'-экзонуклеаза) широко применяется для получения мононуклеозид-5'-фосфатов и ее называют экзонуклеаза I (фосфодиэстераза). Гидролиз начинается с 3'-гидроксильного конца цепи. Если на 3'-конце имеется фосфатный остаток, то это придает субстрату устойчивость. Экзонуклеаза из яда *Grotalus adamantus* имеет оптимум действия при pH-8,6, предпочитает разрыв связи между двумя тимидиновыми нуклеотидами. От РНК начинается отрыв нуклеотидов сразу, а от ДНК после обработки ее панкреатической ДНК-азой (ДНК-аза-I). Фермент гидролизует молекулу ДНК на 90% до мононуклеотидов.

Экзонуклеаза из яда гюрзы расщепляет только денатурированные препараты ДНК с образованием 5'-нуклеотидов. Олигонуклеотиды с 3'-концевым фосфатом устойчивы к действию этой экзонуклеазы. Наоборот, экзонуклеаза, выделенная из селезенки (5'-экзонуклеаза), отщепляет от ДНК и РНК только 3'-мононуклеотиды. Этот фермент обозначается как экзонуклеаза II (фосфодиэстераза). В этом случае разрывается связь, образованная между 5'-углеродом рибозы и фосфатом, т. е. с противоположного конца по сравнению с действием экзонуклеазы змеинного яда. Фермент не расщепляет олигонуклеотиды, у которых имеются 5'-фосфомонодиэфирные концевые группы. Фермент из селезенки способен также гидролизовать циклическую 2',3'-адениловую кислоту до 2'-нуклеотида, а также обладает эндонуклеазной активностью и расщепляет крупные олигонуклеотиды.

Из *E. coli* выделены несколько экзонуклеаз, которые обладают специфичностью к расщеплению преимущественно одноцепочечной ДНК. Экзонуклеаза I гидролизует преимущественно денатурированную ДНК. Атака начинается со свободной 3'-ОН группы. Освобождаются 5'-мононуклеотиды до образования динуклеотида, по отношению к которому фермент неактивен. Экзонуклеаза II проявляет специфичность к атаке и гидролизу больше одноцепочечной ДНК. Как и экзонуклеаза I, этот фермент сначала отщепляет нуклеотид также со свободной 3'-ОН-группой. Продуктами реакции

являются 5-моонуклеотиды. Экзонуклеаза не атакует олигонуклеотиды с 3'-фосфомоноэфирной группой. От этой экзонуклеазы не удается отделить ДНК-полимеразу. Экзонуклеаза III обладает особенностью, которая состоит в том, что от фосфодиэстеразной активности неотделима фосфомоноэстеразная, т. е. фосфатазная активность. Фермент выделяет неорганический ортофосфат концевых и моонэтерифицированных фосфатных групп из моон- и олигонуклеотидов. Поэтому гидролизуется 3'-фосфомоноэфирная связь последнего в цепи нуклеотида и открывается 3'-ОН-группа. Фосфодиэстеразное действие приводит к накоплению 5'-моонуклеотидов. Дезоксирибоолигонуклеотиды, имеющие свободные 5'-ОН-группы, экзонуклеазой III не атакуются. По отношению к денатурированной ДНК фермент не активен. Экзонуклеазы IVA и IVB активны по отношению к олигонуклеотидам, которые образуются при действии дезоксирибонуклеазы I. Из бактерий *B. subtilis* выделена экзонуклеаза, которая гидролизует быстрее высокомолекулярную денатурированную ДНК и отличается от экзонуклеазы селезенки способностью расщеплять олигонуклеотиды. Из *E. coli* выделена специфическая экзорибонуклеаза (РНК-аза II), которая разрывает одноцепочечные РНК, не имеющие вторичной структуры, до 5'-фосфатмоонуклеотидов. Видимо, эта РНК-аза гидролизует информационные РНК. Оптимальное действие фермента при pH 7,5. Полиадениловые участки цепи расщепляются быстрее.

Экзонуклеазной активностью обладает ЦЦА-пирофосфорилаза, которая выделена из *E. coli*. Этот фермент от 3'-конца тРНК отщепляет универсальную последовательность ЦЦА. Этот фермент обладает прямым и обратным действием. Из поджелудочной железы выделена дециклизующая фосфодиэстераза, превращающая циклические пуриновые и пиримидиновые 2',3'-моонуклеотиды в 2'-моонуклеотиды, но она не разрывает межнуклеотидные связи. В различных объектах обнаружена также фосфодиэстераза, которая расщепляет 3',5'-нуклеотиды с образованием 5'-нуклеотидов.

Таким образом, нуклеазы осуществляют важные превращения нуклеиновых кислот. На основе специфичности их действия можно определять последовательность нуклеотидов и решать другие задачи.

16. Биологические функции нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты были открыты около ста лет тому назад и уже в то время О. Гертвиг высказал предположение о том, что нуклеин отвечает за передачу наследственных свойств. Однако биологическая роль нуклеиновых кислот оставалась неизвестной до недавнего времени. Интенсивное изучение органической химии нуклеиновых кислот, разработка методов их разделения и определения способствовали выяснению их локализации в клеточных структурах. В частности, способность нуклеиновых кислот взаимодействовать с основными красителями была положена в основу цитохимического определения локализации ДНК и РНК в различных органеллах и частях клетки.

С помощью гистохимической реакции обнаружили, что более интенсивная окраска наблюдается в тех клетках и тканях, где более активно протекают процессы синтеза белка. С другой стороны, из данных о локализации ДНК в ядре клетки, ее хромосомах определенно вытекало предположение о том, что ДНК каким-то образом связана с передачей наследственных признаков. Но не было прямых доказательств такой функции нуклеиновых кислот. Поэтому необходимо было экспериментально, фактически доказать правильность этого предположения и опровергнуть существовавшее утверждение о том, что роль генетического материала выполняют белки.

Представление о белках как носителях наследственности существовало вплоть до начала 50-х годов. Оно было опровергнуто многими экспериментальными данными, из которых следовало, что носителями генетической информации являются дезоксирибонуклеиновая и рибонуклеиновая кислоты.

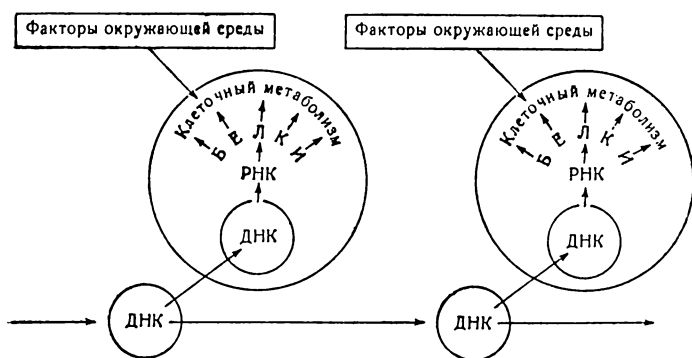
О. Эвери в 1943 г. экспериментально доказал, что ДНК выполняет генетическую функцию. О. Эвери, К. Мак-Леод и М. Мак-Картни получали высокоочищенную ДНК из вирулентного штамма *Rheptosoccus* (колонии S-типа) и добавляли к невирулентному штамму этой бактерии (колонии R-типа). Была установлена трансформация R-клеток в S-клетки, которая была устойчивой и обнаруживалась в последующих поколениях. Таким образом, О. Эвери с сотрудниками выяснил причину явления, которое Ф. Гриффит наблюдал еще в 1926 г. Он добавлял убитые S-клетки к живым R-клеткам и наблюдал трансформацию R-клеток в S-клетки.

А. Херши и М. Чейз также показали генетическую роль ДНК при поражении бактериальной клетки вирусами. С помощью радиоактивной метки они установили, что при инфицировании в бактериальную клетку проникает не белок, а ДНК. Кроме этого, было установлено, что инфекция возникает при введении в бактериальную клетку высокоочищенной ДНК вируса. Чистая РНК, выделенная из вируса табачной мозаики, также обладает инфекционными свойствами, и при ее введении в клетку табака в ней формируются новые вирусные частицы ВТМ. При разделении частиц двух штаммов ВТМ на белок и нуклеиновую кислоту и после рекомбинации новых гибридных вирусных частиц, которые состоят из белка одного и РНК другого штамма, наследственные свойства передает не белок, а нуклеиновая кислота и т. д.

В настоящее время уже известно больше тридцати вирусов животных и растений, инфекционность которых обусловлена нуклеиновой кислотой. Все это явилось основанием для двух крупных обобщений о том, что ДНК и РНК являются носителями генетической информации и что РНК каким-то образом участвует в синтезе белка. Однако оставалось непонятным, каким образом ДНК участвует в синтезе РНК, а последняя — в биосинтезе белка. Но если в состав полипептидной цепи белка входят двадцать различных мономеров, то в полинуклеотидную цепь включено только четыре различных

основания, нуклеотида. Не вызывало сомнений, что уникальность молекулы нуклеиновой кислоты как носителя генетической информации должна состоять в нуклеотидной последовательности. Представление о ДНК как носителе генетической информации получило фундаментальное подтверждение в работах Дж. Уотсона и Ф. Крика, которые в 1953 г. предложили свою модель структуры ДНК. Эта модель явилась теоретической основой объяснения процессов сохранения, передачи генетической информации и биосинтеза белка.

В настоящее время биологическая функция ДНК выяснена. ДНК переносит генетическую информацию по двум путям. Первый путь — от ДНК к ДНК; передается от поколения к поколению. Второй путь — передача информации, с помощью которой осуществляется управление метаболической активностью клетки через биосинтез белков. При этом промежуточным звеном являются различные формы РНК. Но передача генетической информации может идти также от РНК к ДНК. Биологическая функция ДНК может быть схематически выражена таким образом:



Генетическая функция нуклеиновых кислот. Как видно из приведенной схемы, генетический материал должен выполнять две функции: во-первых обладать свойством самовоспроизведения; во-вторых, управлять всеми процессами, которые выражают и обуславливают свойства, присущие определенной живой системе (структура и функция белков, особенность обмена веществ, морфологические и биологические особенности и т. п.). Иначе говоря, генетический материал должен управлять процессами, которые лежат в основе выражения фенотипа. Таким образом, ДНК как основной генетический материал должна обладать способностью к точному копированию, воспроизведению своей собственной молекулы и нести в себе информацию, необходимую для синтеза специфических, характерных для той или иной живой системы белков. Функция белка обусловлена в значительной мере первичной его структурой, т. е. последовательностью аминокислот в полипептидной цепи, ко-

торая, в свою очередь, определяется нуклеотидной последовательностью в полинуклеотидной цепи ДНК. Информация от ДНК передается через информационную РНК, которая образуется на определенных участках молекулы ДНК.

Если исходить из комплементарного принципа построения двуспиральной молекулы ДНК, то уже сама ее структура с характерной последовательностью оснований способствует самовоспроизведению. В каждой из цепей двуспиральной молекулы ДНК заложены возможности воспроизведения комплементарной цепи. При этом специфичность образования водородных связей между аденином и тиминном, гуанином и цитозином является условием, обеспечивающим направленный биосинтез комплементарной цепи с определенной нуклеотидной последовательностью. Матрицей для самовоспроизведения служит не вся молекула ДНК, а только ее половина. Процесс самовоспроизведения в поколениях носит непрерывный характер. На каждой цепи двуспиральной молекулы ДНК идет процесс биосинтеза комплементарной цепи, а на последней — репликация исходной и т. д. Дупликация молекулы ДНК начинается с определенного ее участка и происходит без предварительного полного разделения ее цепей. При вращении молекулы ДНК идет удлинение и закручивание двух дочерних цепей и раскручивание остатка двойной материнской цепи. При этом происходит копирование дочерних цепей путем ферментативного присоединения к ним нуклеотидов (рис. 42). Соединение двух цепей затем происходит путем спонтанного образования водородных связей.

Самовоспроизведение ДНК и всей хромосомы осуществляется по полуконсервативному способу. Это наглядно прослеживается с помощью включения в молекулу ДНК тимина, меченого по тритию. Тимин включается в ДНК в процессе ее синтеза, что обнаруживается с помощью автордиографии ДНК (хромосомы). Если *E. coli* выращивать на среде с радиоактивным тиминном, то последний во время репликации включается в молекулу ДНК, и хромосома приобретает радиоактивную метку. Радиоактивная хромосома проявляется с помощью светочувствительной эмульсии. Распад

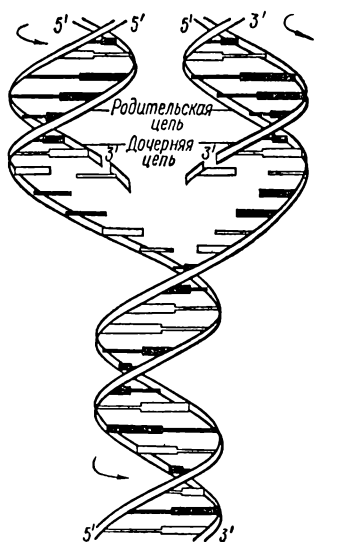


Рис. 42. Модель репликации ДНК. Во время синтеза родительские цепи раскручиваются. При этом осуществляется ферментативное присоединение нуклеотидов одновременно к концам фрагментов растущих дочерних цепей в направлении $5' \rightarrow 3'$.

Гуанин Аденин
Цитозин Тимин

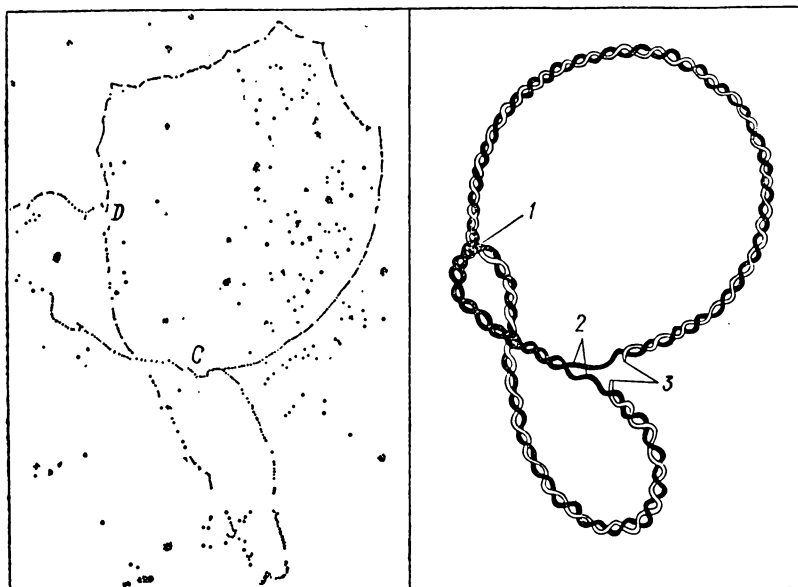


Рис. 43. Радиоавтограф хромосомы *E. coli*, меченой ^3H -тимидином (слева). Модель реплицирующейся хромосомы (справа) (Cairns, 1963):

G — Y-образная точка роста; *D* — начальная точка репликации. Половина хромосомы мечена в большей своей части, где процесс репликации завершен; 1 — шарнирный механизм, 2 — исходные цепи, 3 — новые цепи.

третия вызывает почернение серебра на пластинке, и меченая хромосома проявляется в виде почерневшей линии. С помощью радиоактивной метки может быть прослежена динамика процесса репликации ДНК (хромосомы). Для этого тимин, меченый по тритию, вводится в среду через определенные интервалы времени, и длина радиоактивной части хромосомы постепенно нарастает до тех пор, пока она не примет форму замкнутого кольца (рис. 43).

С помощью меченого предшественника ДНК может быть также определена точка начала репликации и роста хромосомы. Для этого дается импульсная метка 5-бромурацилом, который включается в ДНК в место тимина. Затем меченый начальный фрагмент ДНК определяют по его большей плотности с помощью ультрацентрифугирования в градиенте хлористого цезия. Таким образом, репликация ДНК, при которой материнская молекула дает начало двум идентичным дочерним молекулам, обуславливает сохранение в каждой дочерней клетке точно такой генетической информации, какая содержалась в материнской клетке.

Содержание ДНК в ядрах клеток различных тканей одного и того же организма является постоянным. Возможны некоторые отклонения, возникающие за счет ошибок при определении. Содержание ДНК в клетке изменяется в меньшей степени, чем содержание любых других компонентов. Поэтому по содержанию ДНК

можно определить количество клеток в участке ткани. На ДНК можно делать пересчет других веществ в клетке. Но абсолютное содержание ДНК в вирусных частицах и ядрах клеток различных организмов колеблется в очень широких пределах.

В диплоидной клетке высших организмов масса ДНК составляет около 1—7 пикограммов (пг)¹, и в ней насчитывается около 100—6500 млн. пар нуклеотидов. У бактерий масса ДНК составляет 0,002—0,06 пг, а число пар нуклеотидов около 2 млн. В одной вирусной частице — соответственно от 0,00008 до 0,00024 пг и 0,07—0,22 млн. пар нуклеотидов, т. е. масса ДНК в одной клетке у высших организмов превышает массу ДНК у прокариотов и вирусов приблизительно в 100 000 раз. Кроме того, при равновесном центрифугировании ДНК вирусов сосредотачивается в одной узкой зоне, а ДНК высших организмов образует широкие зоны, что говорит о гомогенности ДНК вирусов и гетерогенности ДНК высших организмов.

Генетическая информация заложена в последовательности оснований в полинуклеотидной цепи ДНК. На протяжении молекулы ДНК может быть громадное число вероятных сочетаний из четырех нуклеотидов. Например, если молекула ДНК имеет только 100 нуклеотидов, то число возможных сочетаний может быть выражено 4^{100} различными способами. А если взять генетическую информацию, представленную в яйцеклетке человека, то она состоит из 5 млрд. оснований, из которых можно составить 1 700 000 000 триплетов и закодировать астрономическое число различных признаков. Генетический материал, представленный ДНК и РНК у прокариотов и эукариотов, имеет различную сложность и структурную организацию. Клетки прокариотов имеют одну хромосому, которая содержит одну двуцепочечную молекулу ДНК. Прокариоты в процессе жизненного цикла являются гаплоидными организмами, поэтому у них нет явления доминантности и рецессивности. Еще легче изучать молекулярную генетику на вирусах, у которых может быть от трех до двухсот генов. Наиболее обстоятельно изучены вирусы *E. coli* — бактериофаги T2, T4, T6, MS2, φX174, λ, масса которых резко различается: MS2 — 3 600 000; φX174 — 6 000 000; λ — 50 000 000; T2, T4, T6 — около 220 000 000 дальтон.

В бактериальной клетке имеются также нехромосомные генетические детерминанты, так называемые плазмиды (эписомы). К ним относятся факторы: половые (F_1), конъюгации и колицинов (Col), переноса лекарственной устойчивости (R) и др. Плазмиды представлены также дезоксирибонуклеиновой кислотой. У бактерий ДНК прикреплена к определенному месту мембраны клетки, которое называется мезосомой.

Геном у эукариотов является более сложным, так как у высших организмов представлены механизмы регуляции значительно большего объема генетической информации в процессах дифференцировки и развития (эпигенетика). В клетке эукариотов кроме ядерной

¹ 1 пикограмм равен 10^{-12} г.



Андрей Николаевич Белозерский (1905—1972).

имеется небольшое количество цитоплазматической, или сателлитной, ДНК, которая отличается по соотношению оснований, молекулярной массе и составляет около 0,1—0,2% всей ДНК. Генетический материал у эукариотов сосредоточен в хромосомах и представлен ДНК с линейным строением молекул. Вторичная структура ДНК высших организмов не отличается от вторичной структуры ДНК бактерий. Но геном высших организмов отличается тем, что в молекуле ДНК имеются так называемые повторы — многократно повторяющиеся последовательности. Они иногда составляют до 20—40% генома. Повторяются, как правило, те последовательности, которые

в соответствующих условиях должны нести большую функциональную нагрузку, например, последовательности, кодирующие биосинтез рибосомальных РНК, которые в раннем эмбриогенезе интенсивно синтезируются. Повторяющиеся нуклеотидные последовательности обеспечивают выработку тРНК в различных количествах в зависимости от функции и физиологического состояния клетки, ткани. Кроме этого, повторы в молекуле ДНК являются условием совершенствования генома в эволюции, выступая как материальная основа для появления количественно новых единиц наследственности. Установлено, что степень сблоченности пиримидинов в ДНК заметно возрастала при переходе от прокариотов к эукариотам. Заслуживают внимания обращенные повторы, так называемые шпильки, размер которых достигает 1000 пар нуклеотидов. Они «узняют» белок РНК-полимеразы. Считается, что число шпилек равно числу транскриптонов, и они выполняют регуляторную роль в начале репликации и транскрипции. Если они аналогичны, то включают сразу в действие несколько уникальных структурных последовательностей ДНК. Известно, что многие гены представлены в виде *тандемов*, т. е. когда одинаковые гены много раз следуют один за другим (например, гены рибосомной РНК, гистонов и др.).

Увеличение количества ДНК может осуществляться *амплификацией* (умножением) генов по механизму вращающегося кольца. Этот механизм состоит в том, что ДНК в виде кольца имеет хвост, на котором имеется насечка и идет репликация. Кольцо вращается и в хвостовой части образуется вновь синтезированная молекула, которая является копией ДНК кольца. В процессе онтогенеза могут набираться в большом количестве определенные повторы, которые затем элиминируются, когда функция ими выполнена. О сложности генетического материала говорит количество нуклеотидов в геномах различных организмов. Например, число нуклеотид-

ных пар равно: фаг T2— $2 \cdot 10^5$, *E. coli*— $4 \cdot 10^8$, дрозофила— $0,2 \cdot 10^9$, человек— $5,6 \cdot 10^9$. Распределение молекулярной массы соответственно равно: фаг T2— $1,3 \cdot 10^8$, *E. coli*— $2,6 \cdot 10^9$, дрозофила— $0,12 \cdot 10^{12}$; человек— $3 \cdot 10^{12}$ дальтон.

В процессе эволюции шло изменение нуклеотидного состава, особенно по молярной доле Г—Ц-пар. ДНК высших организмов, как правило, обладает А—Т-типом и содержание Г—Ц-пар у них колеблется от 35 до 50%. Колебания по содержанию Г—Ц-пар у протозоа и грибов составляет от 28% до 70%, у бактерий—25—75%, что может служить таксономическим подходом при классификации прокариотов. Меньшая прочность А—Т-пар придает ДНК большую функциональную подвижность. Высоким содержанием А—Т-пар характеризуются последовательности ДНК, которые выполняют регуляторную роль. Эволюция шла в направлении увеличения содержания А—Т-пар. Фундаментальные исследования по изучению связи между составом и структурой ДНК и таксономическим положением организмов в эволюционном процессе выполнены А. Н. Белозерским и его школой.

По предположению Ф. Крика, большая часть хромосомной ДНК имеет глобулярную форму и выполняет контрольные функции, а меньшая—нитевидной формы, состоит из нуклеотидных последовательностей, которые кодируют положение аминокислот в полипептидной цепи. У высших организмов ДНК обнаружена в митохондриях и хлоропластах с кольцевидной, двуцепочечной формой молекулы. Функция ДНК митохондрий и хлоропластов не выяснена, но предполагается, что она детерминирует цитоплазматическую наследственность. Митохондрии *in vitro* включают в свой белок аминокислоты в присутствии белок-синтезирующей системы; кодируют биосинтез ряда белков, входящих в состав их мембран. Возможно, что ДНК находится и в других внутриклеточных структурах и обуславливает автономные генетические системы. Генетическая функция ДНК на молекулярном уровне в значительной части была изучена на бактериях и вирусах. Это объясняется тем, что бактерии обладают рядом особенностей, которые способствуют изучению функции ДНК: за короткий срок можно получить популяцию, являющуюся потомством одной клетки, и вести соответствующую селекцию целенаправленно; воздействовать на клетку, изменяя условия внешней среды и особенно используя соединения с мутагенными свойствами. Молекула ДНК у микроорганизмов имеет более простое строение и состоит приблизительно из 10^7 нуклеотидов. В молекуле же ДНК человека насчитывается нуклеотидов примерно в 2000 раз больше. Кроме этого, у микроорганизмов и вирусов более доступно изучение процессов переноса, смешения и обмена генетического вещества двух различных клеток и получение измененного потомства генетической рекомбинацией, переносом эписом, сексдукцией, трансдукцией, трансформацией и другими путями. Генетическая роль нуклеиновых кислот может быть понята только на основе выяснения механизма соответствия нуклеотидной

последовательности в молекуле ДНК аминокислотной последовательности в молекуле белка.

Нуклеотидно-аминокислотный код. Важнейшей проблемой молекулярной биологии является изучение нуклеотидно-аминокислотного кода. Сущность этого вопроса в настоящее время можно считать полностью выясненной. Генетическая информация закодирована в нуклеотидной последовательности цепочки ДНК и состоит главным образом в определении структуры белков различной функции.

Вопрос о коде впервые был рассмотрен Г. Гамовым в 1953 г. Его представления о генетическом коде были ошибочны, так как исходили из структурного соответствия полипептидной и полинуклеотидной цепи, т. е. каждая аминокислота должна кодироваться лежащим против нее звеном полинуклеотидной цепи. Поэтому код должен бы быть трехзначным, с перекрытием, т. е. каждый нуклеотид участвует в кодировании трижды, и поэтому отношение числа нуклеотидов к числу аминокислот (кодовое отношение) составляло единицу. Но исходя из перекрывающегося кода нельзя объяснить разнообразие последовательности аминокислот в различных белках. Кроме этого, оставалось непонятным, почему при точечных мутациях замена одного звена в цепи ДНК сопровождается заменой не трех аминокислот, а лишь одного аминокислотного остатка.

Открытия М. Ниренберга, сделанные им в 1961 и 1964 гг. о способности рибосом синтезировать полипептиды на синтетических матрицах, значительно облегчили расшифровку генетического кода. Согласно гипотезе адапторов, высказанной Ф. Криком, должны существовать молекулы, выполняющие функцию присоединения аминокислот к себе и специфической передачи их на полинуклеотидную цепь. При этом код является также трехзначным, но неперекрывающимся, вырожденным, не имеющим пунктуации (запятых), т. е. в коде нет сигналов, которые показывают конец одного и начало другого кодона.

Одним из первых и важных вопросов в расшифровке генетического кода являлось определение *размера кодирующих элементов*. Необходимо было доказать, как четырехбуквенный «алфавит» нуклеиновых кислот переводится на двадцатibuквенный «алфавит» аминокислот, а также, сколько необходимо нуклеотидов, чтобы обозначить одну аминокислоту, т. е. определить кодовое отношение. Исходя из элементарных математических расчетов можно было утверждать, что для кодирования одной аминокислоты недостаточно одного нуклеотида, так как молекула ДНК состоит всего из четырех различных нуклеотидов, а в состав белков входит двадцать различных аминокислот. Двух нуклеотидов также недостаточно, чтобы определить место аминокислоты в полипептидной цепи, так как число комбинаций из четырех по два может быть не больше шестнадцати. Но если четыре нуклеотида взять в комбинации по три, то тогда можно закодировать шестьдесят четыре аминокислоты. Отсюда предположение, что информация о структуре полипептид-

ной цепи от нуклеиновой кислоты передается с помощью трехзначного кода.

Представления о триплетности кода были подтверждены целым рядом генетических экспериментов. Наиболее убедительные доказательства получил Ф. Крик с сотрудниками в 1961 г. в опытах «со сдвигом рамки», проведенных на бактериофаге T4 (у *E. coli*). Был изучен процесс направленного мутагенеза у этого бактериофага в В-цистроне в области гII с помощью акридиновых красителей. Было применено профлавиновое производное акридина, которое индуцирует мутации включением (интеркаляция) или удалением (делеция) одного из нуклеотидов в двуцепочечной ДНК. В случае интеркаляции между двумя соседними нуклеотидами образуется разрыв, который может заполниться каким-то основанием, но чаще этим основанием является аденин, который в дальнейшем обычно реплицируется. В результате в цепь ДНК вставляется дополнительное основание. Но акридиновое производное может само в процессе репликации занимать место одного из оснований. При этом оно не образует ковалентной связи, слабо удерживается в цепи ДНК, при следующей репликации выпадает и возникает делеция. В результате вставки или выпадения одного нуклеотида происходит сдвиг рамки считывания и образование новых триплетов на участке, расположенном после места интеркаляции или делеции. Кодировается новая последовательность аминокислот, образуется дефектный белок. В случае вставки или выпадения одного основания в начале нуклеотидной последовательности цистрона будет образовываться иной, дефектный, биологически неактивный белок вирусной оболочки. Если же мутация происходит близко от С-конца цепи, то синтезируется полноценный белок. Когда недалеко от места вставки лишнего основания следуют делеция или, наоборот, за делецией происходит вставка, то одна мутация снимает эффект другой и фаза считывания восстанавливается. Синтезируется активный белок, так как нарушение аминокислотной последовательности происходит на небольшом участке полипептидной цепи при условии, что эти нарушения не касаются последовательности аминокислот, несущих важную функциональную нагрузку. Такие двойные мутации противоположного значения в одном гене, ведущие к возвращению ревертантов к дикому типу, называются внутригенными супрессорными мутациями. Из полученных результатов следовало, что имеет место сдвиг порядка считывания. Однако величина кодового отношения оставалась неясной. Этот вопрос решался на основе изучения суммарного действия нескольких мутаций одного знака. Убедительное подтверждение триплетности кода получено с тройными мутациями одного знака в одном гене. Оказалось, что если мы получаем три вставки (интеркаляции) или три выпадения (делеции), то рамка считывания восстанавливается после третьей мутации, т. е. за пределами участка, где произошли три мутации одного знака. Такие тройные мутации одного знака приводят к возврату к дикому или псевдодикому фенотипу, т. е. происходит полная

коррекция кода и восстанавливается аминокислотная последовательность в той части цепи, которая определяется участком нуклеотидной последовательности после третьей мутации.

Например, если у *E. coli* В одновременным заражением тремя различными точечными мутантами вызвать три различные точечные мутации, то образуются тройные рекомбинанты, и они возвращаются к дикому фенотипу. Это происходит при условии, если все три мутации находятся друг от друга на расстоянии, не превышающем 0,1 части длины цистрона. Из этого следует, что при трех вставках или пропусках восстанавливается последовательность считывания информации после части цепи ДНК, где находятся три ошибки. Это можно представить схемой: АТЦ ↓ АГЦ — АТА — ЦАТ + А → → АТЦ — ААГ — ЦАТ — АЦА. Одна вставка нарушает рамку считывания. АТЦ — АГЦ ↓ АТА — ЦАТ + ТГЦ → АТЦ — АГЦ — — ТГЦ — АТА — ЦАТ — три вставки не нарушают рамку считывания (стрелка указывает место интеркаляции).

Ф. Крик с сотрудниками из этих данных сделал вывод, что восстановление рамки считывания может происходить только при условии триплетного кода. Триплетность кода подтверждается и тем, что комбинация из шести мутаций одного знака также приводит к дикому фенотипу.

Позже, в 1966 г., Г. Стрейзингер с сотрудниками изучал действие мутации со сдвигом рамки считывания на аминокислотную последовательность в белке лизоцима, который синтезирует фаг Т4 при поражении *E. coli*. Эта группа ученых пришла к выводу, что в результате сочетания интеркаляции с делецией или трех мутаций одного знака образуется белок лизоцима, в полипептидной цепи которого на небольшом участке имеется искаженная аминокислотная последовательность. Если одновременно вводится три основания в полинуклеотидную цепь, то в полипептидной цепи лизоцима появляется одна дополнительная аминокислота. Таким образом, и опыты Г. Стрейзингера с сотрудниками также подтвердили триплетность кода. Триплетная теория кода подтверждается также соответствием между определенными участками полинуклеотидной цепи информационной РНК и полипептидной цепи белка. Так, участку в 30 аминокислотных остатков в гемоглобине соответствует 90 нуклеотидов в цепи информационной РНК, т. е. кодовое отношение в этих случаях равняется трем. У вируса MS2 белок РНК-репликазы состоит из 544 аминокислотных остатков, а ген, контролирующий образование этой полипептидной цепи, состоит из 1635 нуклеотидов РНК этого вируса. У вируса-сателлита вируса табачной мозаики в полинуклеотидную цепь РНК входит 1200 оснований, которые кодируют одинаковые белковые субъединицы оболочки вируса. В состав такой субъединицы входит 400 аминокислотных остатков.

Триплетность генетического кода подтверждается и прямыми биохимическими данными, полученными М. Ниренбергом в опытах по связыванию рибосомами специфических тринуклеотидов в присут-

ствии соответствующих аминоксил-тРНК; Г. Кораной, осуществившим синтез пептидов с аминокислотной последовательностью, соответствующей повторяющимся тринуклеотидам с известной последовательностью в синтетических полирибонуклеотидах. Таким образом, код является триплетным, неперекрывающимся, вырожденным и не имеющим знаков препинания. Важнейшими и основными вопросами в расшифровке нуклеотидно-аминокислотного кода является *состав кодонов (кодových триплетов) и последовательность нуклеотидов* в кодоне.

При решении этих вопросов были применены две группы методов — генетические и биохимические. Генетический подход в расшифровке нуклеотидно-аминокислотного кода основывается на том, что в соответствующем месте полипептидной цепи мутантного белка одна аминокислота замещается на другую, которая имеется у дикого типа. На основе анализа таких аминокислотных замен в связи с предполагаемыми заменами нуклеотидов, вызванными мутациями в соответствующих участках ДНК, можно изучать генетический код.

Первые исследования по изучению связи генетических изменений с молекулярным изменением структуры белка были проведены В. Ингрэмом в 1959 г. Наследственное заболевание — серповидноклеточную анемию — он объяснил изменениями очередности аминокислот в полипептидной цепи гемоглобина. При этом заболевании наблюдаются характерные изменения формы эритроцитов. Они принимают вместо круглой — серповидную форму. Такие эритроциты плохо переносят кислород в организме. Л. Полинг с сотрудниками изучил методом электрофореза гемоглобин, выделенный из эритроцитов крови больных серповидноклеточной анемией. Гемоглобин из крови больных (HbS) двигался к катоду, а из крови здоровых (HbA) — к аноду. Из этого следовало, что один из этих белков несет более отрицательный, а второй — более положительный заряд. Оказалось, что нет различия в строении простетической группы (комплекса из гема и окиси углерода) гемоглобина больных и здоровых людей. Следовательно, в основе должно лежать различие в химическом строении самой белковой молекулы. В. Ингрэм подверг гемоглобин биохимическому изучению с помощью метода пептидных карт («отпечатков пальцев»). После обработки гемоглобинов HbA и HbS протеолитическими ферментами полученная смесь пептидов распределялась с помощью электрофореза на бумаге. При этом пептидные карты гемоглобина HbA и HbS совпадали, за исключением одного пептида. Из 26 пептидов гемоглобина HbS только пептид под номером 4 при движении смещался ближе к отрицательному полюсу (рис. 44). Оказалось, что четвертый пептид состоит из 9 аминокислотных остатков. Различие обнаружено в 7 положении в цепи HbS. Оно состоит в том, что вместо глутаминовой кислоты находится валин.

В состав молекулы гемоглобина входят две пары субъединиц, α и β , и ее можно представить в виде двух идентичных половинок, каждая из которых содержит по 300 аминокислотных остатков.

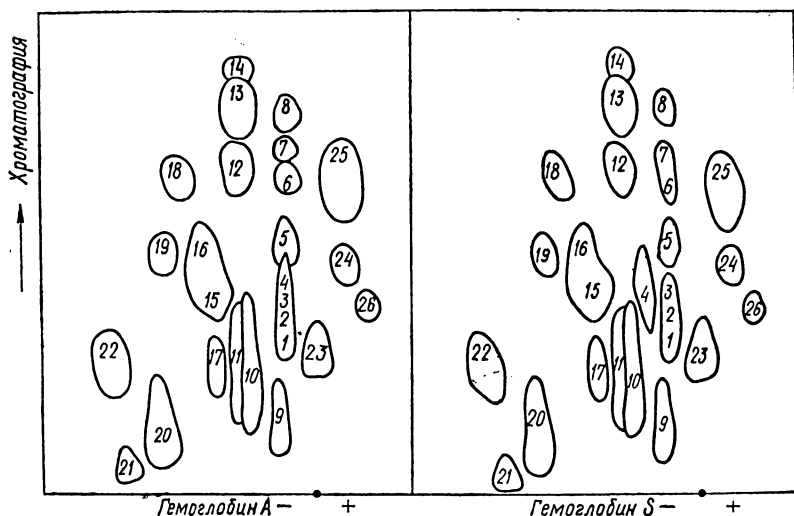


Рис. 44. Пептидные карты гемоглобинов НвА (слева) и НвS (справа); отличаются по пептиду 4, который лежит левее у гемоглобина НвS.

И из них в β -цепи гемоглобина НвS замещен только один остаток глутаминовой кислоты на остаток валина, и это определяет различную электрофоретическую подвижность. Она обусловлена тем, что отрицательно заряженный остаток глутаминовой кислоты заменен на незаряженный валин. Поэтому НвS обладает пониженной растворимостью в воде при низких парциальных давлениях кислорода.

Серповидноклеточная анемия является доказательством точности, с которой синтезируется белок. Полипептидная цепь имеет строго определенную последовательность аминокислот, и замена только одной из них может привести к значительным изменениям свойств белка. Но к изменению активности белка приводят только такие нарушения полипептидной цепи, которые затрагивают наиболее важные, ключевые аминокислотные остатки. В этом случае удастся легче выявить фенотипические изменения. Мутации, в результате которых одна аминокислота заменяется на другую, называются *мутациями с изменением смысла*. Как правило, они являются следствием замены в тринуклеотиде одного пурина на другой или пиримидина — на пиримидин.

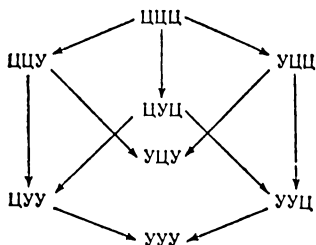
Выявление аминокислотных замен, возникших как следствие генетических мутаций, является одним из способов изучения кода. По первичной структуре белка мы можем судить о фенотипическом проявлении мутаций, о морфологии на самом исходном элементарном уровне. Для изучения этих вопросов высшие организмы являются сложными объектами. Более удобными являются бактерии и вирусы. При этом легче устанавливается связь между химическим строением белков, нарушениями в их полипептидной цепи с положением мутации на генетической карте. Примером может

служить белок фосфатазы. Некоторые мутанты *E. coli* синтезируют белок щелочной фосфатазы, который близок к фосфатазе дикого штамма. Идентичность этих белков подтверждается иммунологически, однако белок щелочной фосфатазы мутанта не активен. Если вызвать обратную мутацию, получить ревертанты, то среди них одни синтезируют щелочную фосфатазу, идентичную фосфатазе дикого штамма, другие синтезируют также активный фермент, но имеющий иное строение, в частности, по электрофоретической подвижности. Белок фосфатазы состоит из двух одинаковых субъединиц по 380 аминокислотных остатков в каждой. При расщеплении и последующем разделении белка фосфатазы электрофорезом на бумаге получается 35 пептидов. Белок фосфатазы ревертантов отличается от фосфатазы дикого типа одним-двумя аминокислотными остатками. С помощью рекомбинаций точка повреждения цепи ДНК устанавливается с точностью до 2—3 нуклеотидных звеньев. Обратная мутация приводит к восстановлению функционально нормального состояния. Удалось установить пропорциональную связь расстояния между двумя мутациями с расстоянием между замещенными аминокислотными остатками в полипептидной цепи фермента. Аналогичные данные получены при изучении мутантов *E. coli*, у которых в белке триптофансинтетазы происходили замены одной аминокислоты на другую.

Попытки расшифровать нуклеотидно-аминокислотный код генетическим путем были сделаны также Х. Виттманом, Х. Френкель-Конрат и др. Они изучали связь генетических изменений со структурными изменениями белка у мутантов вируса табачной мозаики. Был изучен ряд различных аминокислотных замещений у спонтанных и индуцированных мутантов ВТМ. И почти всегда у одного мутанта обнаруживалось замещение только одной аминокислоты. Эти данные еще раз доказывали непрерывность генетического кода.

Если мутация обусловлена действием вещества с мутагенными свойствами, то можно говорить о химической основе этого явления. С помощью азотистой кислоты была получена химически измененная РНК ВТМ. При инфицировании табачного листа образовались различные мутанты, белок которых отличался одним-двумя замещениями аминокислотных остатков в полипептидной цепи капсидного белка. При этом большая часть мутаций является следствием одного химического изменения в молекуле РНК. Исходя из того, что азотистая кислота дезаминирует аденин, цитозин и гуанин соответственно в гипоксантин, урацил и ксантин, можно на основе сопоставления замещений в полипептидной цепи сделать логические заключения о коде. Например, если в белке мутанта произошло замещение пролина на лейцин, то из этого следует, что произошло изменение в триplete ЦЦА, кодирующего пролин, и образовался триплет ЦУА, который кодирует лейцин, т. е. при дезаминировании цитозин превратился в урацил. Изменения кодовых триплетов под влиянием азотистой кислоты можно представить в виде диаграмм,

так называемых *октетов Виттмана*, которые содержат все возможные превращения кодовых триплетов при дезаминировании азотистой кислотой. С помощью этих превращений можно исследовать



аминокислотные замещения, которые имеют место в мутантных белках. Как правило, все изменения в белке объяснимы с помощью этой диаграммы. Аминокислотные замещения являются важным подходом в изучении характера кода. Как правило, замещения одной аминокислоты на другую обусловлены изменением одного основания. Из этого следует, что кодоны заменяемой и заменяющей аминокислот отличаются только на одно основание. При этом почти всегда две смежные аминокислоты не изменяются. Но исследования с аминокислотными замещениями недостаточно дают информации о составе кодонов и последовательности нуклеотидов в них.

Решающую роль в расшифровке генетического кода сыграли прямые биохимические методы. Эти методы основаны на получении с помощью полирибонуклеотидфосфорилазы синтетических полинуклеотидов желаемого состава и структуры, которые служат матрицами для синтеза полипептидов. При этом были использованы бесклеточные системы, состоящие из рибосом, транспортных РНК, надосадочной жидкости, аминокислот и АТФ, гуанозинтрифосфата, фосфорилирующей системы, ионов магния и калия, информационной РНК, функцию которой выполняет синтетический полинуклеотид. Информационная РНК, которая находилась в клетке в момент ее вскрытия, разрушается, и синтез белка через несколько минут останавливается. В модельной системе можно наблюдать синтез белка по включению в него меченых ^{14}C аминокислот. Бесклеточные системы можно получать из бактерий, простейших и высших организмов.

Исходя из того, что рибосомы, в которых нет эндогенной мРНК, способны синтезировать полипептиды на чужеродной, экзогенной мРНК, М. Ниренберг и Д. Маттеи в бесклеточную белоксинтезирующую систему *E. coli*, в которой распалась вся своя информационная РНК, ввели полиуридиловую кислоту. В результате они наблюдали, что из 18 изученных аминокислот включался в биосинтез только фенилаланин, и в кислоторастворимой фракции был обнаружен полипептид из остатков этой аминокислоты. Из этого следовало, что триплет УУУ кодирует включение фенилаланина. Оказалось, что УУУ и другие тринуклеотиды обладают высокой

активностью включения аминокислот в полипептидную цепь только тогда, когда имеют свободную гидроксильную группу в 3'-положении и фосфорилированную ОН-группу на 5'-конце. В последующих исследованиях М. Ниренберг и Д. Маттеи в качестве синтетической информационной РНК в бесклеточную систему вводили различные полинуклеотиды. При этом полиадениловая кислота включала лизин, полицитидиловая — пролин, полигуаниловая — глицин.

С помощью полинуклеотидфосфорилазы были получены также различные сополимеры, которые включали в полипептидную цепь различные аминокислоты. Исходя из количественного соотношения оснований, взятых для биосинтеза полинуклеотида, можно определить, используя элементарные соображения вероятности состава кодонов, частоту возможных триплетов и относительное соответствующее включение аминокислот в полипептидную цепь. Данные, полученные с сополимерами УА, УГ, УЦ, представлены в табл. 4.

Результаты работы двух лабораторий, возглавляемых М. Ниренбергом и С. Очоа, привели к расшифровке эмпирических формул состава большинства кодонов. Но оставался полностью нерешенным вопрос о последовательности нуклеотидов в кодонах,

Таблица 4. Частота включения различных аминокислот в полипептидную цепь синтетическими полинуклеотидами различного состава (по М. Ниренбергу)

	Полинуклеотид			
	УА	УЦ	УГ	
Относительное содержание оснований Вероятная частота триплетов относительно УУУ. %	$У = 0,87$ $A = 0,13$ $У_3 = 100$ $У_2A = 13$ $УA_2 = 2,2$ $A_3 = 0,3$	$У = 0,39$ $Ц = 0,61$ $У_3 = 100$ $У_2Ц = 157$ $УЦ_2 = 244$ $Ц_3 = 382$	$У = 0,76$ $Г = 0,24$ $У_3 = 100$ $У_2Г = 32$ $УГ_2 = 10,6$ $Г_3 = 3,4$	
Аминокислота	Полинуклеотид			Предполагаемый состав кодона
	УА	УЦ	УГ	
Фенилаланин	100	100	100	УУУ
Аргинин	0	0	1,1	
Аланин	1,9	0	0	
Серин	0,4	160	3,2	УУЦ
Пролин	0	285	0	УЦЦ
Тирозин	13	0	0	УУА
Изолейцин	12	1	1	УУА
Валин	0,6	0	37	УУГ
Лейцин	4,9	79	36	УУЦ, УУГ
Цистеин	4,9	0	35	УУГ
Триптофан	1,1	0	14	УГГ
Глицин	4,7	0	12	УГГ
Метионин	0,6	0	0	
Глутаминовая кислота	1,5	0	0	

за исключением УУУ, ААА, ЦЦЦ и ГГГ. Решение этой задачи могло быть только на основе синтеза полирибонуклеотидов с определенной последовательностью оснований. Г. Корана синтезировал такие полирибонуклеотиды и использовал их как матрицы в бесклеточной белоксинтезирующей системе. Например, при использовании в качестве матрицы полирибонуклеотида УГУ—ГУГ—УГУ—ГУГ образовался полипептид цистеин — валин — цистеин — валин. Кроме определения очередности нуклеотидов в кодоне из этих экспериментов вытекало окончательное доказательство триплетности кода. Эти работы Г. Корана сыграли важную роль в расшифровке нуклеотидно-аминокислотного кода.

В 1964 г. М. Ниренберг сделал новое открытие, которое состояло в том, что при введении в бесклеточную белоксинтезирующую систему тринуклеотидов с определенной последовательностью оснований рибосомы связывают аминоксил-тРНК, у которой антикодон комплементарен введенному тринуклеотиду, т. е. в этом случае тринуклеотид заменяет соответствующую последовательность информативной РНК. Очередность расположения нуклеотидов во всех кодонах было выяснено с помощью остроумного и простого метода, разработанного М. Ниренбергом и С. Очоа. Для этой цели были синтезированы все 64 рибонуклеотидфосфатных шаблона с определенной последовательностью мономеров. Были синтезированы также динуклеотиды, но они оказались неактивными по включению аминокислот в полипептидную цепь. Тринуклеотиды были активными при условии, что 3'-ОН-конец у них был свободен. Такие тринуклеотиды, как искусственно полученные матрицы, легко прикрепляются к рибосомам. Затем нагружают транспортную РНК специфической ей меченой аминокислотой. При взаимодействии полученного аминоксил-тРНК с синтетическим тринуклеотидом, прикрепленным к рибосоме, происходит взаимодействие антикодона транспортной РНК с кодоном. Меченая аминокислота, таким образом, садится на свою матрицу. Эти данные были проверены с помощью высокомолекулярных полирибонуклеотидов. Г. Корана с сотрудниками синтетически получал дезоксирибополинуклеотиды с определенной последовательностью азотистых оснований и использовал их для синтеза высокомолекулярной ДНК с помощью ДНК-полимеразы. Затем на этой ДНК с помощью РНК-полимеразы была получена информационная РНК также с определенной нуклеотидной последовательностью. При синтезе на ней полипептида подтвердилось предположение о нуклеотидно-аминокислотном коде.

Таким образом, на основании данных, полученных с помощью биохимических и генетических методов, удалось в достаточно короткий срок полностью расшифровать нуклеотидно-аминокислотный код, который представлен в табл. 5. Принцип, положенный в основу составления этой таблицы, был предложен Ф. Криком. Таблицу генетического кода (по значению для биологии) можно сравнивать с таблицей периодической системы элементов Д. И. Менделеева для химии. Как видно из таблицы, нуклеотидно-аминокислотный

Таблица 5. Нуклеотидно-аминокислотный код.

Вторая «буква»						
		У	Ц	А	Г	
Первая «буква»	У	УУУ } Фенилаланин УУЦ } УУА } Лейцин УУГ }	УЦУ } УЦЦ } Серин УЦА } УЦГ }	УАУ } Тирозин УАЦ } УАА Ochre УАГ Amber	УГУ } Цистеин УГЦ } Umber УГА } Триптофан УГГ }	У Ц А Г
	Ц	ЦУУ } ЦУЦ } Лейцин ЦУА } ЦУГ }	ЦЦУ } ЦЦЦ } Про- ЦЦА } лин ЦЦГ }	ЦАУ } Гистидин ЦАЦ } ЦАА } ЦАГ } Глутамин	ЦГУ } ЦГЦ } Аргинин ЦГА } ЦГГ }	У Ц А Г
	А	АУУ } АУЦ } Изолейцин АУА } АУГ ¹ Метионин	АЦУ } АЦЦ } Трео- АЦА } нин АЦГ }	ААУ } ААЦ } Аспарагин ААА } ААГ } Лизин	АГУ } АГЦ } Серин АГА } АГГ } Аргинин	У Ц А Г
	Г	ГУУ } ГУЦ } ГУА } ГУГ }	ГЦУ } ГЦЦ } Ала- ГЦА } нин ГЦГ }	ГАУ } Аспараги- ГАЦ } новая кис- ГАА } лота ГАГ } Глутамино- вая кисло- та	ГГУ } ГГЦ } Глицин ГГА } ГГГ }	У Ц А Г

¹ У 5'-конца цепи кодон служит инициатором роста белковой цепи и кодирует формилметонин.

код является сильно вырожденным, так как каждой аминокислоте (кроме метионина и триптофана) соответствует больше одного кодона. Бросается в глаза неравномерность вырожденности кода. Например, серин, лейцин — каждый включается в полипептидную цепь шестью различными кодонами, а глутаминовая кислота, гистидин и др. — только двумя. Почти для половины аминокислот третий нуклеотид является произвольным. При различии в третьем нуклеотиде пуриновые нуклеотиды кодируют одну аминокислоту, а пиримидиновые другую. Как видно, третий нуклеотид кодона играет менее существенную роль.

Вырожденность кода выработалась в процессе эволюции как фактор приспособления. Например, если произойдет мутация в триплете антикодона транспортной РНК, то и в этом случае при вырожденном коде остается большая возможность комплементарного соединения антикодона и кодона, а также включения аминокислоты в полипептидную цепь. Таким образом, вырожденность кода делает более надежной систему хранения и передачи генетической информации. Это подтверждается тем, что в случае изменения третьего основания в 32 кодонах их смысл не меняется. В 26 кодонах смысл

не изменяется, если заменяется пурин на пурин, а пиримидин на пиримидин. Этому способствует также возможность деформации антикодона, когда его первые два нуклеотида соединяются комплементарно с кодоном матрицы. При этом третий нуклеотид претерпевает некоторый поворот, качание, приобретая способность спариваться менее специфично. Поэтому чаще в кодоне изменяется третий нуклеотид. Этим, видимо, можно объяснить, что кодоны-синонимы, как правило, находятся в одном и том же квадрате кодовой таблицы и отличаются только третьим основанием.

Из всего этого следует, что первые два основания в триплете более специфичны для определенной аминокислоты по сравнению с третьим. У триплетов многих аминокислот в третьем положении может находиться любой из двух пиримидиновых и пуриновых оснований. Например, кодирование аланина осуществляется четырьмя различными тринуклеотидами: ГЦУ, ГЦЦ, ГЦА, ГЦГ, которые отличаются третьим нуклеотидом. Антикодон дрожжевой аланиновой тРНК имеет последовательность ИГЦ (И — инозиновая кислота). Ему соответствует в мРНК при антипараллельном расположении последовательность ГЦХ. Из них обязательными являются Г и Ц, а вместо Х могут быть У, Ц и А. Если две различных аминокислоты кодируются триплетом, у которых два первых основания одинаковы, то третьим основанием обязательно должен быть пурин или пиримидин. Примером могут служить кодоны ЦАУ и ЦАЦ гистидина и ЦАА и ЦАГ глутамина.

В связи с большей специфичностью первых двух оснований в тринуклеотиде Ф. Крик в 1965 г. предложил теорию *неоднозначного соответствия* (Wobble hypothesis), «уоббл-теорию», что в точном переводе означает качание, колебание. Из нее следует, что основную роль при узнавании кодона антикодоном на рибосоме играют первые два основания, которые подчиняются уотсон-криковскому правилу стандартных комплементарных взаимодействий. Что касается третьего основания кодона, то оно неоднозначно может вступать во взаимодействия больше чем с одним типом нуклеотида антикодона, т. е. третий нуклеотид антикодона узнает спектр оснований кодона.

В нуклеотидно-аминокислотном коде имеется три так называемых *бессмысленных*, или *нонсенс-кодона*, — УАА, УАГ, УГА, которые не способны включать аминокислоты в полипептидную цепь. Их соответственно называют ochre-, amber- и umber-триплеты. Если эти триплеты встречаются в полинуклеотидной цепи информационной РНК, то выполняют роль сигналов окончания (терминации) биосинтеза полипептидной цепи. Но бессмысленные кодоны используются для терминации с неодинаковой частотой. Чаще других используется кодон ochre (УАА). Таким образом, нонсенс-кодоны выполняют важную функцию. Их узнают специфические белки, в результате чего появляется сигнал, и синтезированная полипептидная цепь отделяется от рибосомы. Поэтому если произойдет точечная мутация (нонсенс-мутация), в результате которой возни-

кает бессмысленный триплет ochre-кодон, amber-кодон или umber-кодон, то наступит обрыв полипептидной цепи и синтез белка приостановится. Например, УАГ может возникнуть из кодона для серина — УЦГ, глутамина — ЦАГ, тирозина — УАУ, УАЦ и т. д. Но amber-, ochre- и umber-мутации могут ревертировать, и тогда восстанавливается осмысленный кодон, и в полипептидную цепь включается соответствующая аминокислота. Возникшие в результате мутации бессмысленные триплеты исправляются так называемыми *супрессорными мутациями*. Например, в результате точечной мутации заменяется один нуклеотид на другой. Образуется бессмысленный триплет. Если произойдет супрессорная мутация в области ДНК, управляемой синтезом транспортной РНК, то у последней антикодон будет приспособлен к бессмысленному кодону. В результате восстанавливается синтез белка. Но кодируемая при этом аминокислота может не быть идентичной той, которая должна быть в исходном белке.

Код является *специфичным*, так как не отмечены случаи, когда один и тот же кодон соответствовал бы более чем одной аминокислоте. Но известны два кодона (валиновый — ГУГ и метиониновый — АУГ), которые еще несут функции инициаторов синтеза белковой молекулы. Специфическую роль выполняет триплет АУГ, который кодирует производное метионина α -формилметионин и является инициатором синтеза полипептидной цепи. После того как биосинтез белковой молекулы окончен, формилметионин отщепляется от полипептидной цепи целиком или только один формильный остаток. Имеется две тРНК, которые связывают метионин. Но только на одной из них метионин может превращаться в формилметионин, с помощью формирующего фермента. Эта тРНК участвует в инициации синтеза полипептидной цепи. Вторая тРНК включает метионин во внутренние участки полипептидной цепи. Взаимодействует с триплетом АУГ. Формилметионил-тРНК иницирует синтез полипептидной цепи с разных кодонов АУГ, с валинового — ГУГ, а также лейцинового — УУГ и ЦУГ. Эта тРНК, как видно, более специфична по отношению ко второму и третьему основаниям кодона.

У *E. coli* биосинтез полипептидной цепи начинается всегда с N-формилметионина, который присоединяется специальной метиониновой транспортной РНК. Как видно, в начале образующей полипептидной цепи стоит аминокислота с блокированной NH_2 -группой. Инициация синтеза полипептидной цепи стимулируется факторами, которые связаны с рибосомой. В отсутствие иницирующего триплета считывание полинуклеотидной последовательности может начинаться с любого триплета при повышенной концентрации магния. Но синтез белка с матрицы, не содержащей иницирующего триплета АУГ, протекает в десятки раз медленнее. При биосинтезе полипептидной цепи *in vitro*, где в матрице может не присутствовать иницирующий триплет АУГ или ГУГ, необходимо создать высокую концентрацию магния (0,02 моль), при которой образуется

функционально активная 70S рибосома из ее 30S и 50S субъединиц, и начинается синтез. Но если концентрацию ионов Mg^{2+} уменьшить в 2—4 раза, то для инициации синтеза обязательно присутствие на матрице триплетов АУГ или ГУГ. Таким образом, триплеты АУГ, а также ГУГ можно рассматривать как знаки, определяющие фазу, рамку считывания последовательности кодонов.

Код является непрерывающимся. Тринуклеотиды, входящие в состав кодона, транслируются целиком. Каждый из нуклеотидов кодона не может транслироваться в сочетании с другими триплетами.

Между структурой триплетов генетического кода и строением боковых групп аминокислот имеется определенная связь. Так, гидрофобные аминокислоты, имеющие неполярные боковые радикалы (фенилаланин, лейцин, валин, изолейцин и др.), включаются в полипептидную цепь триплетами, которые содержат во втором положении урацил; полярные боковые радикалы, несущие отрицательные заряды (аспарагиновая, глутаминовая аминокислоты), кодируются триплетами, у которых на первом и втором месте стоят гуанин и аденин. Можно предполагать, что в возникновении специфического строения кодонов определенную роль играла структура аминокислот.

Все имеющиеся в настоящее время данные говорят о том, что генетический код является *универсальным*, т. е. тринуклеотиды, которые кодируют одну и ту же аминокислоту, имеют одинаковый состав и последовательность у всех живых организмов. Экспериментальное подтверждение этому выводу получено, в частности, в работе М. Ниренберга и сотрудников. Было выделено 50 различных тРНК морской свинки и лягушки; с помощью аминоацил-тРНК-синтетаз этих же организмов образовали 50 соответствующих аминоацил-тРНК. Эти аминоацил-тРНК двух филогенетически отдаленных видов млекопитающих и земноводных взаимодействовали с соответствующими кодонами из *E. coli*, предварительно связанные с ее рибосомами. Об универсальности генетического кода также свидетельствует такой факт, как рост вируса в клетках чужеродных высших организмов и др.

Хотя код и является универсальным, имеются особенности в трансляции разных кодонов в различных организмах. Например, при вырожденности кода одна и та же аминокислота транслируется интенсивнее одними кодонами у одних организмов и другими — у других. Поэтому в чужеродном организме могут оказаться в недостатке определенные тРНК, и трансляция будет тормозиться.

Генетический код отличается *линейным соответствием (коллинеарностью)* полинуклеотидной и полипептидной цепей. Имеется достаточно данных, показывающих наличие линейного соответствия между кодонами в полинуклеотидной последовательности генетических нуклеиновых кислот с последовательностью аминокислот в полипептидной цепи. Например, Ф. Крик с сотрудниками показал, что в результате супрессорных тройных мутаций одного знака

(интеркаляция или делеция) восстанавливается рамка считывания и часто образуется нормальный, функционально активный белок. К. Яновский с сотрудниками получил прямые доказательства коллинеарности гена и полипептидной цепи на белке триптофансинтазы, который катализирует завершающую стадию биосинтеза триптофана. Этот белок состоит из 2-х одинаковых цепей А и их двух цепей В. В полипептидной цепи А установлена последовательность 267 аминокислотных остатков, входящих в ее состав.

У 20 различных мутантов *E. coli* изучалась измененная последовательность аминокислот, и эти данные сравнивались с генетической картой высокого разрешения гена *trpA* *E. coli*, которая была построена с помощью трансдукции. Установлено, что при получении мутанта *trpA46* в 210 положении происходит замена глицина на остаток глютаминовой кислоты, а у мутанта *trpA23* — на остаток аргинина. При обратной мутации *trpA23* в 210 положении снова обнаруживается глицин, и активность фермента восстанавливается. Эти данные говорят о коллинеарности нуклеотидной последовательности в гене и аминокислотной последовательности в полипептидной цепи. Установлено, что мутантные участки на генетической карте располагаются в том же линейном порядке, что и остатки аминокислот в белке триптофансинтазы. Наконец В. Фирс установил последовательность триплетов в трех генах РНК вируса MS2 и на основе коллинеарности определил последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи белка РНК-репликазы этого вируса.

Исключительно важное значение имеет *направление считывания* кода. Код имеет определенный смысл, если он считывается в определенном направлении. Кодоны в полинуклеотидной цепи мРНК расположены таким образом, что первое основание находится ближе к 5'-, а последнее — к 3'-концу. Как известно, транскрипция осуществляется в направлении 5' → 3'. В том же направлении идет трансляция мРНК. Экспериментально подтверждено, что и считывание кода идет в направлении от 5'- к 3'-концу. Например, при трансляции гексануклеотида АААУУУ всегда образуется дипептид лизилфенилаланин, а не наоборот. Направление считывания кода изучалось в лаборатории С. Очоа. С помощью полинуклеотидфосфорилазы был синтезирован сополимер, состоящий из 21 нуклеотида, из них шесть триплетов ААА, кодирующих лизин и один триплет на 3'-конце ААГ, кодирующий аспарагин. Этот сополимер был использован как матрица. При этом получали олигопептид, у которого аспарагин всегда стоял с С-конца пептидной цепи.

Код *не имеет сигналов, знаков*, определяющих начало одного и конец другого тринуклеотида. Поэтому приобретает исключительное значение точное определение начала считывания. В противном случае будет искажена рамка считывания и будет протекать биосинтез дефектного белка.

Ряд аминокислот, входящих в полинуклеотидную цепь, не имеет своих кодонов: оксипролин, оксипролин, фосфосерин, цистин и др.

Все эти аминокислоты являются производными некоторых из 20 аминокислот, входящих в состав белка и имеющих свои кодирующие триплеты. Например, оксипролин является производным пролина, оксилизин и десмозин — лизина и т. д. Боковые радикалы этих аминокислот образуются в готовой полипептидной цепи посттрансляционной ферментативной модификацией.

Нуклеотидно-аминокислотный код подвергался эволюционным изменениям. Хотя код является универсальным, одинаковым для всех видов, но возможны незначительные видовые отклонения, возникшие в процессе эволюции и дифференцировки. Если исходить из того, что при кодировании аминокислот в процессе биосинтеза белка более важное значение имеют два первых основания триплета, то можно допустить, что первоначальный код был дуплетным. При этом шестнадцати возможных дуплетов было достаточно для включения в полипептидную цепь 15 первичных аминокислот. 16-й дуплет, возможно, выполнял функцию свободного пространства между отдельными цистронами. Первоначальный код имел большое количество двусмысленных кодонов, т. е. кодонов, которые кодируют больше чем одну кислоту. Но двусмысленные кодоны искажали трансляцию генетической информации, поэтому отбор шел к уменьшению таких ошибок при трансляции. Когда появились оставшиеся пять аминокислот, возник триплетный код: к каждому кодону-дуплету добавилось по одному основанию.

Стабильность кода на протяжении длительной эволюции можно объяснить наличием стереохимического соответствия между кодоном или антикодоном и боковым радикалом аминокислоты. Хотя имеются данные, из которых вытекает, что боковой радикал не имеет решающего значения, так как аланин, присоединенный к цистеиновой тРНК, включался в полипептидную цепь вместо цистеина. Стабильность кода объясняется также тем, что он сформировался случайно, но затем стабилизировался и приобрел устойчивость, которая сохранилась. Поэтому можно допускать, что индукция формирования кода могла идти в направлении от белка к нуклеиновым кислотам.

Таким образом, *кодон* можно рассматривать как *элементарную единицу* генетической информации, которая определяет положение аминокислоты в полипептидной цепи. Последовательное соединение кодонов образует более крупные структуры генетической информации — *цистроны* и *гены*. Структура цистронов и генов в настоящее время усиленно изучается. Для этой цели они выделяются препаративно или синтезируются химическим путем. До настоящего времени еще не удалось выделить сложных молекул ДНК и прочитать последовательность нуклеотидов, заложенную в них генетическую информацию. Поэтому о молекулярной структуре отдельных участков ДНК, о распределении генов в хромосоме пока судят по генетическим картам. Последние составляются на основе вероятности рекомбинаций, по которым определяют строение генетического вещества, т. е. судят о взаимном расположении и взаим-

ных расстояниях между различными генетическими маркерами и областями на хромосоме.

К а р т и р о в а н и е ф у н к ц и о н а л ь н ы х г е н е т и ч е с к и х э л е м е н т о в х р о м о с о м ы . Построение генетической карты основано на том, что определенный участок бактериальной хромосомы, состоящий из одного или нескольких генов, переходит в другую бактериальную клетку-реципиент. Затем по изменению фенотипа или других свойств клетки-реципиента судят о характере перешедшего в нее гена и о его положении в хромосоме донора. Передача гена или нескольких генов осуществляется методом *конъюгации, трансформации, трансдукции*.

Генетическая карта с высокой степенью разрешения получена методом половой конъюгации для *E. coli*. У этой бактерии хромосома из мужской (+ клетки) переходит в женскую (— клетку) через половой волосок за 90 мин. Этот процесс можно прервать в любой момент разрывом половых волосков резким встряхиванием, когда из + клетки в — клетку перейдет определенное количество генетического материала. Важно, что передача от донора (+ клетки) к реципиенту (— клетке) в процессе конъюгации, репликации целой хромосомы протекает с постоянной скоростью и в строго определенное время. Все эти особенности попадания хромосомы от донора к реципиенту положены в основу ее картирования с указанием места и размеров цистронов. Это делается с помощью меченой ДНК (+) клеток с определенной удельной радиоактивностью. Положение и размер цистрона определяется по маркерам, в роли которых может выступать образование какого-то функционально активного белка и т. п. Таким путем составляются генетические карты, на которых фрагменты входящей хромосомы из (+) клетки в (—) клетку характеризуют по массе в дальтонах; по числу пар нуклеотидов; по времени, необходимому для переноса данного фрагмента хромосомы от нулевой точки до данного участка. По изменениям, возникшим в женской клетке, определяют характер и место гена, признаки, которые обуславливает он в хромосоме мужской (+) клетки. Хромосома *E. coli* имеет циклическую форму, поэтому генетическую карту изображают в виде цикла. По частоте одновременного появления двух признаков можно говорить об их взаимном положении в хромосоме. Если они лежат близко друг к другу, то вероятность их совместного проявления в клетке-реципиенте возрастает. Генетические карты высокого разрешения, как правило, строятся с помощью трансдукции, когда фаг способен трансдуцировать (переносить) очень малое количество генетического материала (до 1% длины хромосомы) из одной клетки в другую. Таким образом, вирус поражает одну бактериальную клетку, захватывает часть хромосомы и передает ее при инфицировании другой клетке.

В качестве генетических маркеров используются: вещества, которые микроорганизмы способны синтезировать или усваивать в качестве источников питания; действие различных ингибиторов на

микроорганизмы; устойчивость последних к поражению бактериофагами и другие признаки. Например, маркером может быть фосфатаза, триптофансинтаза и др. При этом дикий тип микроорганизма синтезирует фосфатазу. Но если оказать влияние на этот микроорганизм каким-либо мутагенным фактором, то возникает мутация, в результате появляется новый штамм, который не осуществляет фосфатазной реакции. Из этого следует, что возникла мутация в локусе хромосомы, который несет в себе информацию синтеза этого фермента. В результате белок-фермент или совсем не синтезируется, или изменяет свою структуру настолько, что теряет фосфатазную активность. Примером могут служить также мутанты *E. coli*, которые потеряли способность превращать индолилглицерофосфат в триптофан в присутствии серина. У этих мутантов были обнаружены изменения в белке А триптофансинтазы, состоящем из 267 аминокислотных остатков. Белок А этих мутантов отличался от белка А дикого типа замещением только одной аминокислоты. При сравнении генетической карты мутантов с последовательностью аминокислот в белке А было установлено, что последовательность мутантных спектров и изменений в белках одинаковы, т. е. генетические карты строятся на том основании, что участок модификации полипептида соответствует участку мутации в геноме. Поэтому цистрон и полипептид коллинеарны, т. е. топография мутации определяет топографию соответствующих аминокислотных замен.

Таким образом, причиной мутагенного процесса является изменение химического строения дезоксирибонуклеиновой кислоты. Последовательность кодонов в полинуклеотидной цепи определяет последовательность аминокислот в полипептидной цепи. Соответствующие последовательности кодонов образуют цистроны, гены. Цистрон — более мелкая единица вещества наследственности, чем ген. Это участок генетической нуклеиновой кислоты, который кодирует первичную структуру одной полипептидной цепи или одной молекулы рибосомальной или транспортной РНК. Ген — реальное химическое значение, синоним цистрона, выражен определенным участком молекулы ДНК, кодирующим первичную структуру молекулы белка, которая состоит из одной субъединицы или из нескольких одинаковых или разных субъединиц. В последние годы в Англии Ф. Сэнгер расшифровал первичную структуру ДНК бактериофага ϕ X174, состоящую из 5500 нуклеотидов. При этом установлено принципиально новое явление. Оказалось, что внутри одного гена находится другой ген. Таким образом, с одного гена считывается информация биосинтеза двух белков.

Размер гена может иметь различную протяженность на полинуклеотидной цепи ДНК и состоять примерно из нескольких десятков, сотен и тысяч пар нуклеотидов в зависимости от размера, длины кодируемой полипептидной цепи или молекулы РНК. Например, ген тирозиновой РНК состоит из 126 пар нуклеотидов, кодирующих ее молекулу. Если исходить из того, что поли-

пептидные цепи могут содержать от 100 до 2000 остатков аминокислот, то длина нуклеотидных последовательностей, кодирующих молекулы различных белков, соответственно должна состоять из 300—6000 пар нуклеотидов.

Каждый ген содержит несколько участков, последовательностей ДНК, в которых может наступить мутация. Так, в ДНК фага Т4 хорошо изучена область гП, в которой ген гПА состоит из 2500 нуклеотидных пар. По этому гену гПА установлено около 500 мутаций. Таким образом, на одну единицу мутации приходится около пяти пар нуклеотидов. В настоящее время установлено, что мутация может наступить даже в результате изменений, происходящих только в одном нуклеотиде.

Точность картирования функциональных генетических элементов хромосомы определяется различными способами, например, по части, фрагменту хромосомы, которая путем трансдукции переносится фагом из одной клетки в другую. Такой фрагмент может составлять менее 1% всей хромосомы.

Расположение всех функциональных генетических единиц на определенных относительных расстояниях друг от друга в связи с молекулярным строением ДНК можно осуществить методом *радиоактивного самоубийства* бактерий, фагов. Он состоит в том, что бактерии или вирусы выращиваются на среде с фосфором высокой радиоактивности, который включается в состав ДНК. Это приводит к разрыву двойной спирали ДНК (или только одной спирали ДНК). После этого наступает гибель клетки. Например, для гибели клетки *E. coli* необходимо поглотить хромосомой 3000 атомов радиоактивного изотопа ^{32}P , а частицу бактериофага Т2 приводят к гибели десять распадов радиоактивного изотопа фосфора. Вирусы с одноцепочечной ДНК — ϕX174 и S13 погибают при одном распаде изотопа фосфора. При выращивании, например, мужских клеток *E. coli* на среде с высокой удельной радиоактивностью фосфора наступает инактивация хромосом. Если провести конъюгацию таких клеток с женскими клетками, то число рекомбинантов растет пропорционально числу распавшихся радиоактивных атомов фосфора. Это объясняется тем, что происходит уменьшение размера фрагментов хромосомы мужских клеток, которое пропорционально числу разрывов, вызванных радиоактивным распадом. Принимается, что фосфор равномерно распределен вдоль хромосомы. Поэтому вероятность разрыва участка хромосомы между данными локусом и начальной точкой должна быть пропорциональна расстоянию между маркерами и началом хромосомы. На основе радиоактивного разрыва хромосом можно установить молекулярный масштаб генетической карты. Например, на генетической карте *E. coli* на расстоянии в одну минуту приходится 10^6 пар нуклеотидных звеньев. Расстояния на генетической карте, полученные с помощью *метода измерения вероятности рекомбинаций*, совпадают с данными, определенными по *методу времени вхождения* и *методу радиоактивной инактивации*. При этом величины, получаемые с помощью разных методов,

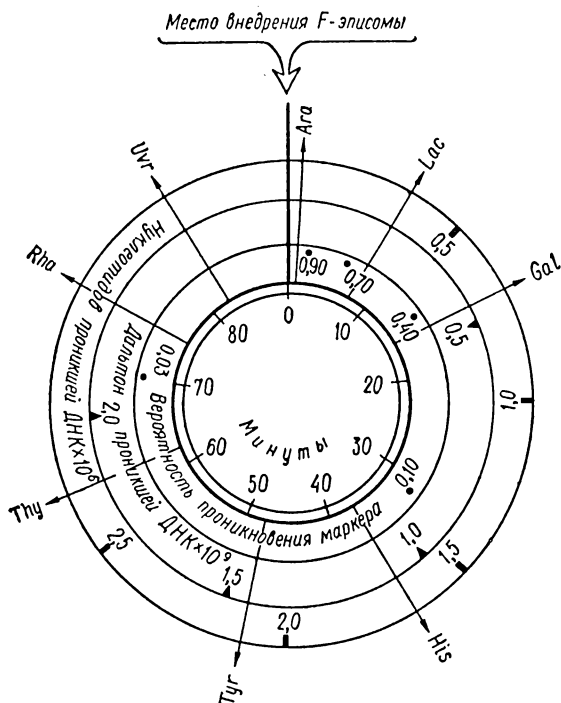


Рис. 45. Генетическая карта хромосомы *E. coli* с указанием места локализации некоторых оперонов:

Ara — арабиноза, *Lac* — лактоза, *Gal* — галактоза, *Rha* — рамноза, *His* — гистидин, *Tyr* — тирозин, *Thy* — тимин, *Uvr* — устойчивость к УФ-излучению.

эквивалентны. Так, 20%, т. е. 20 единиц вероятности рекомбинации, соответствуют 10^5 пар нуклеотидов или 1 мин. Отсюда одна единица вероятности рекомбинации составляет 5000 пар нуклеотидов. В таких же пределах находится и величина единицы вероятной рекомбинации: у фага λ — 660, T4 — 250, дрозофилы — $3 \cdot 10^5$ пар нуклеотидов и т. д.

К настоящему времени сравнительно более полно изучена генетическая карта только хромосомы *E. coli* (рис. 45), на которой уже выделено 310 генных участков, свыше 10 оперонов, и установлена их последовательность. Лас-Оперон выделен, изучена его структура и он *in vitro* не теряет функциональной активности. Процесс выделения Лас-оперона из *E. coli* основан на специфической трансдукции с помощью фагов λ и $\phi 80$ и является сложным процессом. Электронно-микроскопическое изображение Лас-оперона представлено на рис. 46. Структурная часть Лас-оперона состоит из трех нуклеотидных последовательностей (цистронов) — *z*, *y* и *x*, которые соответственно контролируют образование трех белков-ферментов: β -галактозидазы, пермеазы, тиогалактозидтрансацилазы. Первый из них расщепляет β -галактозиды, например лактозу; второй обес-

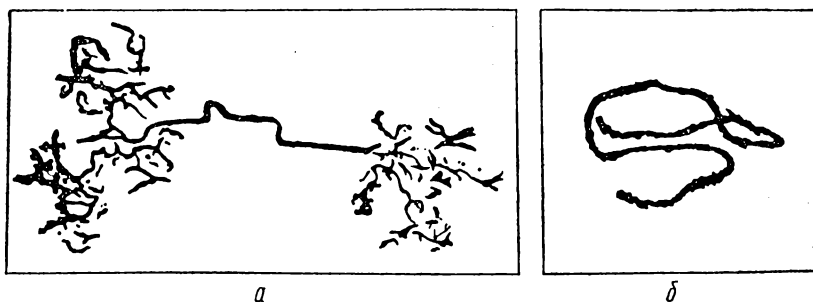


Рис. 46. *Lac*-Оперон *E. coli*, связанный с ДНК фага (а) и в изолированном состоянии (б) (Shapiro et al., 1969).

печивает проникновение лактозы в клетку *E. coli*; третий — контролирует превращение образующейся галактозы. Нуклеотидные последовательности промотора и оператора занимают в этом опероне 410 нуклеотидных пар, тогда как структурный участок составляет несколько тысяч пар нуклеотидов. Принято считать, что одна единица генетической карты у *E. coli* соответствует $5 \cdot 10^3$ нуклеотидным парам, а за одну минуту переносит 20 единиц рекомбинации,

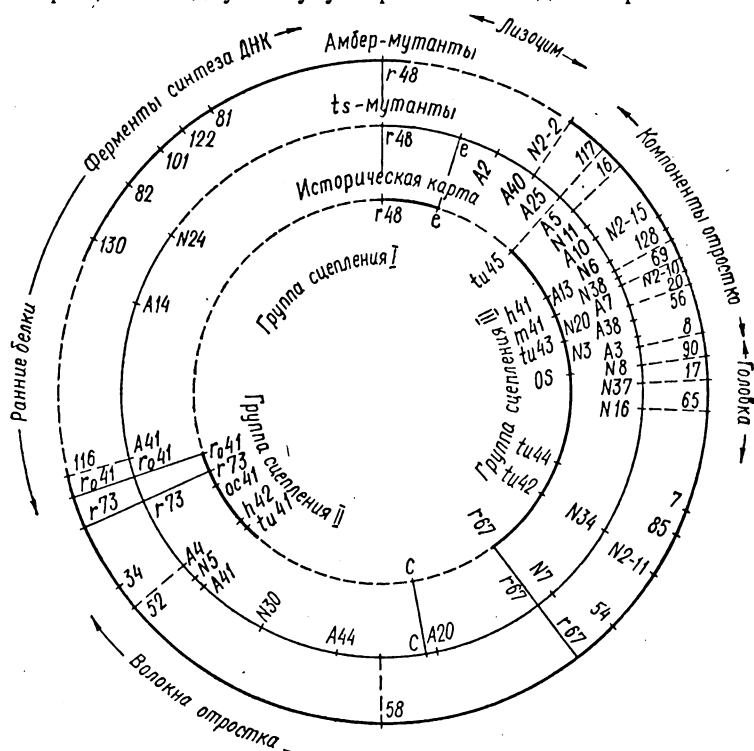


Рис. 47. Генетическая карта фага T4 (Edgar, 1966).

т. е. длина переноса за одну минуту равна 10^5 парам нуклеотидов: Поэтому 310 генов, выделенных и определенных на хромосоме *E. coli*, составляют приблизительно 10% всей ДНК, перенос которой осуществляется за 90 мин.

Электронно-микроскопические исследования показывают, что генетическим материалом у бактерий является одна хромосома, представляющая собой циклическую молекулу ДНК длиной 1000—1400 мкм, с молекулярной массой $2 \cdot 10^8$, с $3 \cdot 10^6$ парами нуклеотидов, из которых может образоваться до 3000 генов.

Генетическая карта хромосомы в меньшей мере изучена у *S. typhimurium*. У нее выделено 170 генных участков. При ее сравнении с генетической картой *E. coli* обнаружено очень близкое сходство. Около 89 участков оказались гомологичными. Генетическая карта некоторых фагов, в частности фага Т4, подробно изучена (рис. 47), особенно в области гII. Наиболее полные сведения получены о гене гIIА, состоящем из 2500 пар нуклеотидов. Удалось наблюдать генетический контроль процессов морфогенеза на молекулярном уровне. Было проведено заражение двух различных штаммов *E. coli*, у которых образуются дефектные фаги, т. е. фаги, у одних из которых образуются только головки, у других — отростки. Клетки этих штаммов вскрываются температурным шоком, клеточное содержимое смешивается в присутствии ионов магния (2×10^{-2} моль). В этих условиях осуществляется автоматическая самосборка полноценных фагов на основе комплементарности между головкой и отростком, т. е. дефектными фагами (рис. 48). Этот процесс осуществляется с помощью специфических собирающих ферментов, функция которых сводится к тому, что они отщепляют пептиды, маскирующие на деталях фага активные группы. Это активирует головку, отросток фага, и осуществляется самосборка. Процесс самосборки проходит ступенчато. Сначала идет самосборка головки, отростка и волокон фага. Затем к головке присоединяется отросток, а к последнему прикрепляются волокна. Все процессы самосборки осуществляются строго в определенной последовательности, что определяется особенностью структуры самих белков. Можно предполагать, что у высших организмов морфогенез осуществляется по тем же механизмам. С помощью генетической карты можно установить место внедрения профага в хромосому бактерии.

Известно, что при поражении бактериальной клетки вирусом наступают генетические изменения. Одним из доказательств этого является наличие у ряда бактерий профага, т. е. когда ДНК фага встроена в хромосому клетки. Профог с вероятностью приблизительно 10^{-4} отделяется от хромосомы бактериальной клетки, достраивается белковая оболочка и образуется вегетативная форма фага. В результате наступает лизис клетки и выход из нее вирусных частиц. Такая культура называется лизогенной. Но эти вирусные частицы не могут заразить другие бактериальные клетки, так как последние являются иммунными.

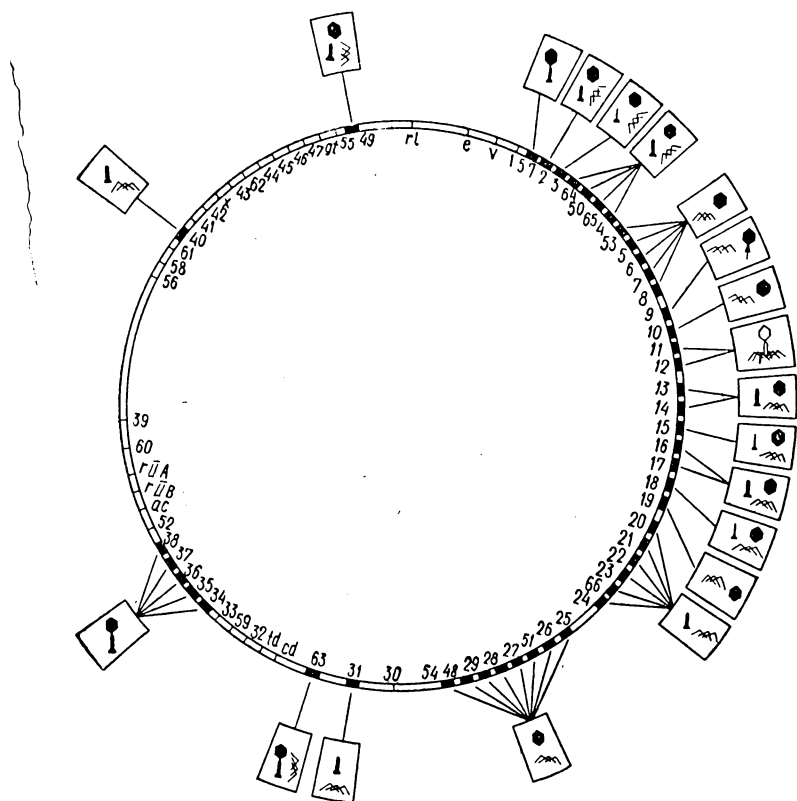


Рис. 48. Морфогенез бактериофага Т4:

На генетической карте изображены гены, которые определяют структуру и сборку фага Т4 (черные сегменты). В прямоугольниках показаны структуры, образуемые в клетке фагом, мутантным по определенному гену.

Профаг может превратиться в вегетативную форму при индукции химическими мутагенами, рентгеновскими лучами, ультрафиолетовым светом. ДНК профага редуцируется так же, как ДНК бактериальной клетки-хозяина. Если между мужской и женской бактериальными клетками осуществляется процесс конъюгации, то профаг может подвергнуться рекомбинации, как и генетический материал самой бактерии. Таким путем можно определить на генетической карте положения профага. Например, фаг Т2 в хромосоме *E. coli* занимает три участка и подвергается рекомбинации. Интеграция хромосомы фага λ в бактериальной клетке протекает следующим образом. Концы незамкнутой хромосомы фага λ замыкаются в кольцо образованием водородных связей на основе принципа комплементарности. Профаг прикрепляется к хромосоме клетки гомологичной областью своей хромосомы. После этого происходит кроссинговер, замкнутая на себя хромосома фага λ разворачивается,

раздвигает генетические маркеры бактериальной клетки и встраивается в ее хромосому.

Вирусы животных также могут находиться в вегетативном свободноживущем инфицирующем состоянии и в состоянии провируса, когда его ДНК встроена в хромосому клетки. В этом состоянии клетка переходит к дедифференцированному, объемному росту. Поэтому можно предполагать, что многие вирусы утратили свои инфекционные свойства, перешли в состояние провируса и обуславливают появление канцерогенного роста. Таким образом, картированием функциональных генетических элементов хромосомы мы можем изучать и изменение наследственной основы.

Одним из важнейших факторов изменения эволюции органических форм являются мутации. Мутации могут быть крупными, когда перестройка захватывает значительные области хромосомы, и точечными, обусловленными выпадением или вставкой одной пары пурин-пиримидиновых оснований. Мутации могут быть спонтанные и индуцированные. Первые в значительной мере зависят от условий среды, а вторые индуцируются физическими факторами (ультрафиолетовое и ионизирующее излучения) и химическими агентами. В основе мутагенеза лежит изменение или исключение какого-то участка генетической нуклеиновой кислоты. Эти изменения могут быть в акцепторном или регуляторном участке, в структурных цитронах, могут затрагивать только одно основание и возникать в каком-то триplete. Например, если эти изменения будут в терминирующих кодонах, то произойдет нонсенс-мутация. Если замена одного основания на другое приведет к преобразованию одного триплета в другой, то произойдет изменение смысла информации, т. е. *миссенс-мутация*. Мутации могут затрагивать обе нити ДНК, и тогда эти повреждения не могут быть ликвидированы системами репарации, которые могут застраивать брешь только на матрице, т. е. на второй неповрежденной цепи.

Мутации возникают при воздействии на ДНК в различных ее состояниях модификацией оснований или отщеплением их от рибозофосфатного скелета, когда ДНК еще не реплицируется; вставкой или исключением пары оснований или за счет флуктуации теплового движения атомов в последних, в процессе репликации ДНК; изменением реакций биосинтеза азотистых оснований; изменениями в белке ДНК-полимеразы, в процессе синтеза и репликации ДНК.

Спонтанные генетические изменения часто возникают за счет таутомерии и ионизации оснований. При нормальном специфическом комплементарном спаривании оснований в ДНК образуются пары: аденин — тимин и гуанин — цитозин. В этом случае аденин и цитозин должны находиться в аминной, а гуанин и тимин в лактамной формах. Лактамные и аминные формы энергетически являются более устойчивыми, чем иминные и лактимные. Редкие пары оснований из таутомерных форм могут образовываться на уровне матрицы при репликации или при включении на уровне

субстрата. Если аденин представлен своей таутомерной иминной, а тимин — лактимной формами, то произойдет транзиция $A \rightarrow T \rightarrow G \rightarrow C$. Если гуанин находится в лактимной, а цитозин в иминной формах, то произойдет транзиция $G \rightarrow C \rightarrow A \rightarrow T$. Спонтанные мутации чаще возникают из-за таутомерных переходов оснований, чем из-за их ионизации.

Индукцированные генетические повреждения химическими мутагенами состоят в нарушении действия ферментов, ответственных за биосинтез ДНК, или прямым воздействием на ДНК. В последнем случае воздействуют на выделенную из вируса в чистом виде молекулу РНК или ДНК и после модификации вводят их в клетку. Химические агенты вызывают точечные мутации, т. е. изменения в положении одной аминокислоты в молекуле белка, а также изменения в больших областях хромосомы — делеции (выпадения) участков ДНК, транслокации (перестановки) последовательности нуклеотидов, инверсии (обратное направление копирования). При точечных мутациях могут быть простые замещения — пурин на пурин, пиримидин на пиримидин (транзиции) или сложные замещения — пурин на пиримидин и наоборот (трансверсии). В результате изменения одного звена в полинуклеотидной цепи в дальнейшем редуцируется модифицированная структура. Исходя из вырожденности генетического кода мутации на основе транзиции и трансверсии или совсем не происходят или являются «мягкими», «молчащими», так как не приводят к функциональным изменениям. Такие точечные мутации могут также возникать спонтанно за счет ошибки в процессе самой репликации ДНК. Это происходит из-за того, что активный центр ДНК-полимеразы имеет одинаковую степень сродства со всеми четырьмя нуклеозидтрифосфатами, если не присутствует матрица. В присутствии же матрицы равновесие между четырьмя основаниями смещается в сторону комплементарности матрицы. Но может быть ошибка, и в ДНК будет осуществлено включение некомплементарного звена. Это происходит из-за мутации в локусе ДНК, который ответственен за синтез ДНК-полимеразы. Происходит изменение ее структуры и избирательности к образованию соответствующего комплекса: белок — матрица — комплементарный нуклеозидтрифосфат.

Из химических агентов, индуцирующих мутации, известны: азотистая кислота, гидроксилламин, формальдегид, диметил-диэтил-сульфат, акридиновые красители, аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований и др.

Аналог тимина — 5-бромурацил и аденин-2-аминогуанин включаются ДНК-полимеразой в полинуклеотидную цепь вместо обычных оснований. 5-Бромурацил подвергается кетоенольной таутомерии и приобретает способность образовывать с помощью водородных связей пары оснований с аденином и гуанином. Действие 5-бромурацила усиливается смещением электронов в его молекуле за счет введения в ее состав сильно электроотрицательного атома брома. Включение в полинуклеотидную цепь 5-бромурацила

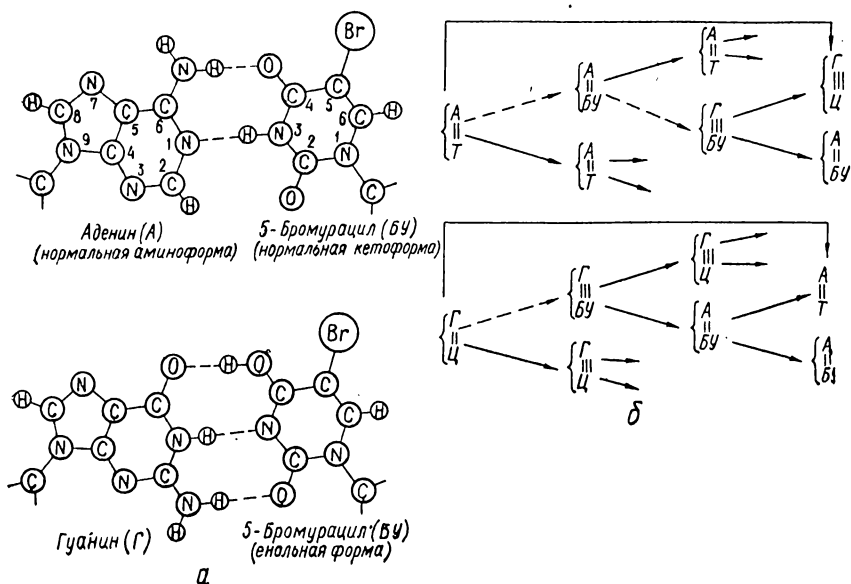


Рис. 49. Транзиции, возникающие при включении 5-бром урацила в ДНК (Za-
menhof, 1959):

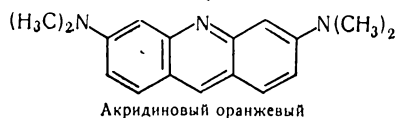
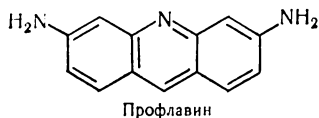
а — схема водородных связей; б — схема замещений.

вызывает замену при дальнейшей репликации аденина на гуанин и наоборот. В результате в молекуле ДНК возникают транзиции (рис. 49), преимущественно в направлении Г — Ц → А — Т.

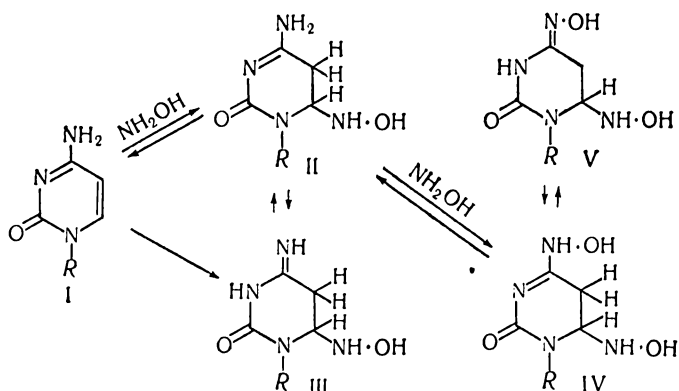
2-Аминопурин образует две водородные связи с тиминном и одну с цитозинном. Электронные оболочки атомов N—1 в 2-аминопурине и N—3 в цитозине сильно отталкиваются и не могут устойчиво фиксироваться в пространстве при образовании пары. Поэтому 2-аминопурин включается чаще в полинуклеотидную цепь вместо аденина, чем гуанина. Но замена аденина на 2-аминопурин не вызывает мутаций. Мутагенное действие этого аналога пурина зависит от легкости перехода в таутомерную форму 2-аминопурина или цитозина, поэтому после образования первой водородной связи возникает вторая, что приводит к большей стабилизации этой пары и возникновению транзиции при дальнейшей репликации. Мутагенное действие 5-бром урацила и 2-аминопурина очень высокое. В одном поколении вероятность возникновения мутаций при замещении в ДНК тимина на 5-бром урацил около 3%. 5-Бром урацил и 2-аминопурин часто используются при изучении мутагенного действия других агентов путем индукции обратных мутаций. Например, при тиминном голодании возникают мутанты. Если на них оказать действие 5-бром урацилом или 2-аминопурином, то подавляющее большинство тиминных мутантов ревертирует. Особенно большой процент ревертантов возникает при действии 5-аминоурацила, так

как он вызывает транзиции $A \rightarrow T \rightarrow G \rightarrow C$, т. е. в направлении, обратном тому, которое возникает при тиминовом голодании.

Другие химические агенты мутагенное действие оказывают образованием комплексов с ДНК. При этом они внедряются между парами оснований (интеркаляция), в результате звенья двуспиральной структуры оказываются раздвинутыми и рамка считывания смещается. К таким соединениям относятся профлавин, акридиновый оранжевый, акрифлавин и др.



Целый ряд агентов действует прямой химической атакой молекул ДНК или РНК вне организма или на вирусы в состоянии покоя вне клетки. Очень сильным мутагенным действием на свободные фаги обладает гидроксилламин. Наиболее активно протекает взаимодействие этого соединения с цитозином по схеме:



При этом III или V таутомерные формы имеют NH -группы в третьем положении кольца и в образовании водородных связей ведут себя как тимин. II или V таутомерные формы обуславливают в основном транзиции $G \rightarrow C \rightarrow A \rightarrow T$.

Азотистая кислота является одним из хорошо изученных мутагенов. Она взаимодействует с аминогруппой как дезаминирующий агент по химической реакции: $R-NH_2 + HNO_2 \rightarrow R-OH + N_2 + H_2O$. Скорость реакции дезаминирования оснований в молекуле ДНК убывает в ряду гуанин $\rightarrow$ цитозин $\rightarrow$ аденин, а в молекуле РНК протекает с одинаковой скоростью у всех оснований. При дезаминировании цитозин превращается в урацил, аденин — в гипоксантин, гуанин — в ксантин. Между образовавшимися урацилом, гипоксантином, ксантином возникают комплементарные пары соответственно с аденином, цитозином и цитозином (рис. 50).

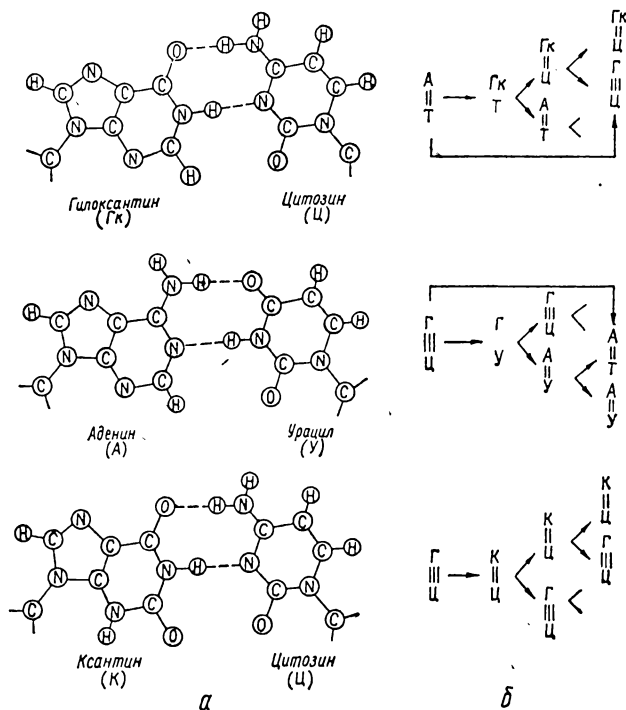
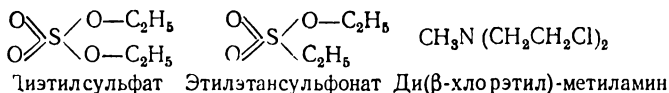


Рис. 50. Замещения в ДНК, возникающие при дезаминировании оснований азотистой кислотой:

а — схема водородных связей; б — схема замещений.

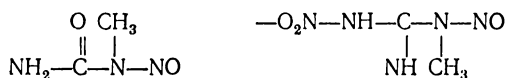
Дезаминирование гуанина может привести только к ослаблению связи между основанием и дезоксирибозой, так как образовавшийся из гуанина ксантин, хотя и соединяется с цитозином, но между ними возникают только две водородные связи. В результате дезаминирования цитозина образуется урацил, который соединяется с аденином. Поэтому при репликации происходит замена пар гуанин — цитозин на аденин — тимин. При дезаминировании аденина возникает гипоксантин, который также образует две водородные связи с цитозином. В этом случае происходит замена пары аденин — тимин на гуанин — цитозин. В связи с тем что дезаминирование не приводит к возникновению оснований, которые дают редкие пары, азотистая кислота индуцирует только ошибки репликации, которые приводят к замене аминокислотных остатков в полипептидной цепи.

Мутагенным действием обладают алкилирующие агенты: диэтилсульфат, этилэтансульфонат, ди(β-хлорэтил)-метиламин и др.

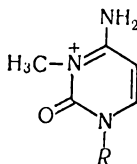


Алкилирующие агенты вызывают простые и сложные замещения, разрывы цепи ДНК. Алкильная группа этих веществ замещает у оснований водород, соединенный с нуклеофильным центром. Чаще алкилируется гуанин по N — 7, а также аденин по N — 1 и N — 3, цитозин по N — 3. Одним из объяснений мутагенного действия алкилирующих агентов может быть следующее. При алкилировании гуанина N — 7 образуется 7-алкилгуанин, в котором положительный заряд на N — 9 возрастает с 0,41 до 0,52. В результате гликозидная связь более легко подвергается гидролизу и гуанин отщепляется от углеводнофосфатного остова ДНК. Возможно, этим объясняется и летальное действие этих соединений.

Новые мутагенные вещества, открытые в последнее время, относятся к нитрозосоединениям—нитрозометилмочевина и N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин:

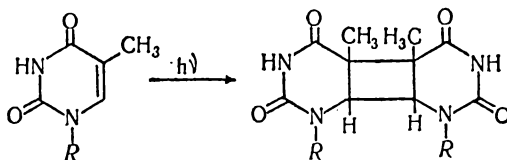


В водных растворах эти соединения оказывают летальное действие на РНК и ДНК. В условиях органических растворителей алкилируют цитозин по азоту в третьем положении (N — 3). Мети-



лированный цитозин теряет способность образовывать водородные связи с гуанином. Условия органических растворителей, в которых протекает метилирование азота N₃ цитозина, говорят о том, что нуклеиновые кислоты клетки, очевидно, находятся в гидрофобной белковой оболочке. При этом гидрофобные аминокислотные остатки экранируют нуклеиновые кислоты от проникновения к ним воды.

Мощным фактором мутагенеза является радиация. При ультрафиолетовом излучении в молекуле ДНК происходит внутривязевая фотодимеризация, сшивка тимина, а также урацила и цитозина соседних звеньев одной цепи и между цепями ДНК. Образуются цикlobутановые мостики. Димеризация протекает по 5—6-связям.



При этом между димерами возникают ковалентные связи, нарушаются стерические условия, которые являются препятствием при

репликации ДНК. В результате теряется способность к репликации и наступает летальное действие ультрафиолетовой радиации. Ультрафиолетовая радиация обладает также мутагенным эффектом. Наряду с фотодимерами образуются фотогидраты пиримидиновых оснований. Это вызывает замены оснований и точечные мутации чаще транзиции $G \rightarrow C \rightarrow T \rightarrow A$.

Ионизирующая радиация (рентгеновские лучи, электроны, протоны, нейтроны, α -частицы и т. д.), несущая излучение высокой энергии, при поглощении клеткой приводит к разрывам и большим делециям хромосом, а иногда к точечным мутациям. Ионизирующая радиация возбуждает и ионизирует молекулы клетки, из которых образуются свободные радикалы. Механизм мутагенного действия свободных радикалов пока остается не совсем выясненным. γ -Облучение может приводить к дезаминированию аденина и цитозина, к образованию гидроперекисей, к таутомерным переходам оснований. Свободнорадикальные процессы подавляются меркаптанами, которые являются протекторами, защищающими клетку от повреждения.

В макромолекуле ДНК имеются области, которые особенно легко подвергаются действию мутагенов. Эти области называют «горячими» точками генетического вещества. Неодинаковая атакуемость различных участков в макромолекуле ДНК объясняется различной плотностью расположения водородных связей; прочностью химических связей и т. д. Вследствие этого возникают слабые «горячие» места, которые легко атакуются различными агентами и подвергаются различным повреждениям. В клетке существует система *репарационных ферментов*, функция которых состоит в репарации, т. е. устранении повреждений в генетическом веществе. Повреждения, которые вызываются ионизирующей радиацией и некоторыми другими агентами, восстанавливаются только обменом поврежденного фрагмента ДНК путем трансформации, рекомбинации и кроссинговера. Если в клетке целый ряд репарационных ферментов поврежден, то она становится чувствительной к воздействию мутагенных агентов. В процессах так называемой темновой репарации принимают участие эндонуклеазы, экзонуклеазы, ДНК-полимеразы, лигазы и другие ферменты. Эндонуклеазы узнают место первичного повреждения ДНК. При этом эндонуклеаза находит поврежденный участок, делает перед ним насечку и вырезает его. Например, фермент легко узнает димер пиримидинового основания, который возник при ультрафиолетовом облучении, и является чуждым для ДНК. Этот димер может быть расщеплен с помощью фотореактивирующего энзима, который возникает только при воздействии света с длиной волны 400 нм. При темновой репарации этот димер или участок цепи с этим димером обычно вырезается эндонуклеазой. Экзонуклеаза (или ДНК-полимераза I, которая обладает экзонуклеазной активностью) отщепляет моно- или олигонуклеотидные фрагменты. Затем специальная ДНК-полимераза восстанавливает утраченную нуклеотидную последовательность. компле-

ментарным синтезом на основе матрицы второй неповрежденной цепи ДНК. Утраченный фрагмент может содержать 7—500 нуклеотидов. Фосфоэфирные связи восстанавливает полинуклеотидлигаза. Репарационные ферменты интенсивно изучаются. Если повреждения закрепились мутациями, то последние компенсируются супрессорными мутациями. Например, нонсенс-мутация компенсируется изменением цистрона одной из тРНК, антикодон которой теряет комплементарность к одному из кодонов и приобретает комплементарность к одному из терминальных кодонов. В результате биосинтез полипептидной цепи не приостанавливается. Таким образом, супрессорные мутации подавляют другие мутации, снижают их проявление. Диплоидность способствует этому. Поэтому гаплоидные организмы (бактерии) не претерпевают супрессорных изменений. Супрессорные мутации, в результате которых устраняются нонсенс-мутации (образованием триплетов УАГ и УАА), называют янтарными, или охра-мутациями. Репарационные системы имеют важнейшее общеприкладное значение. Они исправляют возникающие искажения в структурах, восстанавливают их первоначальное состояние. С помощью картирования функциональных генетических элементов мы можем судить о молекулярной структуре отдельных участков ДНК, а также об их изменениях в результате спонтанных и индуцированных мутаций.

Перенос, обмен, изменение генетического материала. В природе имеют место различные формы переноса, обмена и изменения наследственного вещества, которые служат источником образования организмов с новыми свойствами. Одной из таких форм является рекомбинация наследственного вещества, которая осуществляется в течение полового или тождественного ему процесса, в результате чего происходит образование различных устойчивых сочетаний фрагментов вещества наследственности, которое передается потомству.

У высших организмов обмен веществом наследственности происходит в результате сочетания родительских хромосом или их отдельных частей (кроссинговер). Перенос и обмен вещества наследственности имеет место и у прокариотов, где половой процесс представлен в более упрощенном виде. У микроорганизмов широко представлено явление переноса внехромосомных форм вещества наследственности с помощью эписом. Эписомы — это внехромосомные структуры, которые содержат около одной десятой части ДНК клетки. Эписомы несут информацию, которая, как правило, реализуется редко. Но в определенных условиях реализация этой информации для клетки является жизненно необходимой для повышения устойчивости против антибиотиков, синтеза ферментов, расщепляющих редкие источники питания; кодирования защитных компонентов оболочки и т. д. У бактерий перенос от клетки к клетке эписомного вещества наследственности осуществляется с помощью специальной половой и ряда других эписом. ДНК таких эписом имеет кольцевую форму: масса ее около $60 \cdot 10^6$ дальтон;

она, как правило, не связана с хромосомой. В клетке может быть до десяти половых эписом. Мужские — F^+ -клетки передают эписомы, а женские — F^- -клетки принимают их. Количество F^+ -клеток в популяции может достигать 10%. Эписомы от мужской клетки к женской передаются в процессе конъюгации. При конъюгации ДНК переходит из мужской клетки в женскую. Это наглядно показывает следующий опыт. Перед конъюгацией мужские клетки предварительно выращивались на среде и белок метился ^{35}S , а нуклеиновые кислоты по ^{32}P . После конъюгации оказалось, что из мужской клетки в женскую переходила ДНК, а не белок. Часть половых эписом при конъюгации не передается и остается в клетке. Передача эписом при конъюгации осуществляется через цитоплазматический мостик, возникающий между F^+ - и F^- -клетками.

При конъюгации передаются другие эписомные факторы, RTF -эписомы, которые переносят информацию устойчивости бактериальной клетки к различным антибиотикам, способность продуцировать гемолизины, антигены оболочек, Col -фактор — белковый антибактериальный фактор и др. Некоторые эписомы могут нести информацию устойчивости сразу против восьми различных антибиотиков. F -Эписомы способны иногда включаться в состав хромосомы своей клетки. Такие клетки у *E. coli* называют Hfr -клетками, так как они приобретают повышенную способность к генетической рекомбинации с F^- -клетками. В этом случае F -эписома при конъюгации захватывает с собой и переносит в другую клетку часть или всю хромосому F^+ -клетки. При этом до конъюгации в F^+ -клетке происходит репликация чаще одной нити ДНК, а иногда и всей хромосомы. Репликация начинается с той точки хромосомы клетки, где произошло внедрение в нее эписомы. Образовавшаяся нить проникает в F^- -клетку и на ней образуется двуцепочечная ДНК, которая взаимодействует с хромосомой реципиента, и может протекать генетическая рекомбинация. Этот тип конъюгации, когда переносится вместе с эписомой и часть хромосомы клетки, называют *сексдукцией*. Именно этот способ переноса и обмена генетического материала между микробными клетками ближе стоит к половому процессу у эукариотов. В процессах рекомбинации генетического материала между фрагментом или целой хромосомой F^+ -клетки и хромосомой реципиента (F^- -клетки) принимают участие ферменты репарации. При этом в процессы рекомбинации вовлекается только часть перенесенной ДНК. Таким образом, F -эписомы, внедряясь в то или иное место хромосомы мужской клетки, захватывают различные фрагменты генетического материала и переносят их в другие клетки. Это имеет большое значение при решении вопросов генной инженерии.

Перенос генетического материала может происходить с помощью так называемой трансдукции, которая осуществляется с помощью вирусов, способных временно включать свою хромосому в хромосому клетки-хозяина. При выходе из состава хромосомы клетки-хозяина

вирус захватывает определенную долю ДНК, количество которой может достигать 1%. В дальнейшем, при заражении таким вирусом, в хромосому другой клетки-хозяина переносится ДНК хромосомы, которая была захвачена в предыдущей клетке, т. е. осуществляется трансдукция генетического материала. Например, берется мутант *E. coli*, который не способен синтезировать тимин. Если бактериофаг Т2 культивировать предварительно на другом штамме *E. coli*, синтезирующем это соединение, а потом заразить этот мутант *E. coli*, то он приобретает способность синтезировать тимин. Это объясняется тем, что бактериофаг переносит фрагмент генетического материала (хромосомы, ДНК) из одной клетки в другую. Одни из таких вирусов переносят различные неспецифические фрагменты хромосомы донора. Другие — только специфические участки ДНК, и это имеет большое значение при выделении определенных цистронов, оперонов и переносе их в чужеродный геном. Например, вирус λ может переносить из *E. coli* галактозный оперон в другие клетки.

Перенос вещества наследственности осуществляется также с помощью трансформации, когда генетические изменения наступают вследствие захвата клеткой части ДНК от другой клетки. При этом внедрение чужеродной ДНК осуществляется без посредников, в роли которых при сексдукции выступают эписомы, а трансдукции — вирусы. В основе трансформации лежит внедрение, интеграция фрагмента ДНК-донора в хромосому, геном реципиента другой бактерии, образование сложной структуры и возникновение рекомбинантов. При этом количество трансформированных клеток возрастает пропорционально количеству трансформирующей ДНК. Перенос и обмен генетического материала с помощью трансформации имеет место и у одноклеточных эукариотов, а у высших многоклеточных отмечен в культуре клеток. Например, культура клеток человека линии Д985 синтезирует фермент ИМФ-пирофосфорилазу. ДНК этой культуры добавили к культуре клеток линии Д98/АН-2, которая не образовывала этого фермента. После введения ДНК наступила трансформация, и эта последняя культура клеток приобрела способность синтезировать ИМФ-пирофосфорилазу.

Более подробно изучена трансформация на бактериальной клетке. Трансформирующим фактором может быть полимерная, неденатурированная ДНК. Если ее извлечь из разрушенных клеток, освободить от РНК и белка, то ДНК сохраняет трансформирующую активность. Трансформация протекает при условии генетической совместимости фрагмента ДНК донора с участком ДНК цистрона реципиента. Трансформация бактерий осуществляется, если молекула ДНК проникла в бактериальную клетку. Но молекула ДНК имеет большие размеры с молекулярной массой порядка $1 \cdot 10^7$, поэтому она плохо проникает в клетку, и трансформация у бактерий — явление, встречающееся достаточно редко. Очень хорошо трансформация протекает у пневмококков; она легче осуществляется между родственными организмами (штаммы одного вида) и хуже

между различными видами одного рода. Вопрос снижения эффективности переноса и обмена генетического материала различными способами в зависимости от степени родства между организмами имеет общее значение и усиленно изучается. В процессе эволюции был создан механизм, который делает невозможным смешение генетического материала между далекородственными организмами. Этот механизм представляется таким образом. ДНК определенного вида метилируется так, что становится устойчивой к одной из своих ДНК-аз. Но последняя разрушает ДНК, принадлежащую далекородственному организму, так как она метилирована в другом участке своей молекулы. Процесс трансформации определяется в значительной мере компетентностью клеток реципиента, т. е. готовностью их к приему ДНК донора. Компетентность микробной клетки определяется условиями выращивания, фазой роста клетки, повышенной проницаемостью ее клеточной стенки, которая обусловлена более активными литическими ферментами. Возможно, этим объясняется повышение интенсивности трансформации при воздействии лизоцимом. Однако мы еще не знаем полностью всего комплекса факторов, делающих клетку компетентной, и не можем управлять процессом трансформации.

Проникновение в микробную клетку во многом зависит от состояния молекулы или фрагмента ДНК донора. Нативная ДНК проникает лучше, чем денатурированная. При прохождении в клетку ДНК донора на внешней стороне оболочки или цитоплазматической мембраны дробится (видимо, эндонуклеазами) на фрагменты ($2-9 \cdot 10^6$ дальтон) и во время проникновения денатурируется. Одна цепь при этом включается в хромосому реципиента, а вторая разрушается нуклеазами. Участок ДНК реципиента, где произошло присоединение одной цепи ДНК донора, теперь состоит из трех цепей. Две из них спирализованы. Оставшаяся неспирализованная цепь подвергается действию репарационных систем, исправляющих ошибки. Если при этом уничтожается фрагмент донора, то трансформации не происходит. Если уничтожается фрагмент своей ДНК, то происходит трансформация.

Большой научный и прикладной интерес представляет возможность экспериментального управления переносом, обменом и изменением генетического материала. На пути к достижению этой цели стоит целый ряд препятствий, так как необходимо при этом преодолеть защитное действие нуклеаз, прохождение генетического материала через различные мембраны в клетке, добиться внедрения фрагментов чужеродной ДНК в геном. Все эти препятствия еще больше осложняются в случае, если мы имеем дело с генетически далеко стоящими организмами. Одним из путей в достижении этой цели является слияние протопластов различных клеток. Например, удалось включить таким путем в фибробласт последовательность ДНК, ответственную за синтез пиррофосфорилазы инозиновой кислоты, взятой из эритроцитов цыпленка. Из всех рассмотренных выше путей переноса и обмена генетическим материалом, наиболее

часто применяемыми, являются перенос с помощью эписом и специфическая трансдукция. В последнем случае умеренный фаг внедряется в чужеродный геном в строго специфических местах и осуществляется перенос только определенных фрагментов ДНК.

Новым путем управления наследственностью является *генная инженерия*. Генная инженерия состоит в селекции и выделении генов и включении их в геном клеток других видов. Делаются попытки использовать ген — специфические фракции ДНК в трансформационных экспериментах. Перспективы генной инженерии направлены на излечение наследственных болезней включением генетического материала, несущего признаки синтеза биологически важных соединений; конструирование качественно новых признаков, обладающих суммой свойств разных видов и др. Генная инженерия может быть использована как способ получения стабильных бактериальных ферментов в больших количествах. При этом важным является решение вопроса способности клетки бактерий к транскрипции эукариотической ДНК в РНК, а затем к трансляции и образованию белка.

Наиболее перспективными в генной инженерии являются способы направленного изменения генома. Одним из таких путей прежде всего является специфическая трансдукция, при которой определенные участки хромосомы донора переносятся умеренными фагами и включаются в соответствующие специфические участки хромосомы реципиента. Более направленное изменение генома достигается также с помощью переноса эписом. При этом генный носитель-вектор может реплицироваться автономно сам, а также в связи с гетерологичной ДНК.

Большие возможности генной инженерии возникают на основе выделения специфических оперонов и включения их в геном другого организма. Это может быть достигнуто выделением индивидуальных мРНК и дальнейшим получением ДНК с помощью обратных транскриптаз. Эти ДНК затем вводятся в геном других организмов.

Перспективным направлением в создании новых генетических структур в результате переноса, смешения и обмена генетической информацией является использование определенных лигаз, с помощью которых можно ковалентно сшивать отдельные фрагменты ДНК. Процесс соединения двух фрагментов ДНК становится более успешным, если к концу одного присоединяются последовательности из поли (А), а к другому — поли (Т). Образуются так называемые липкие концы, происходит комплементарное взаимодействие и образование двуцепочечных структур А—Т. Однако получение биологически активных рекомбинантных молекул ДНК, по-видимому, встретится с рядом препятствий.

Возможные объяснения биологической активности экзогенной ДНК, введенной в чужеродную клетку, могут основываться на том, что ДНК используется как матрица, или фрагменты ДНК замещают разрушенные участки ДНК-реципиента; фрагменты

экзогенной ДНК соединяются с ДНК реципиента и препятствуют ее репликации; низкомолекулярные продукты деградации ДНК стимулируют синтез ДНК в клетках реципиента; экзогенная ДНК действует как защитный агент; экзогенная ДНК взаимодействует с гистонами или другими регуляторами генной активности, что приводит к дерепрессии и экспрессии ДНК реципиента.

С каждым днем накапливается все больше данных о получении и размножении рекомбинантных молекул ДНК. Получена трансформация *E. coli*, в результате которой она приобрела устойчивость к пенициллину. Для этого плазмиду SC101 из *E. coli*, которая несла информацию устойчивости против тетрациклина, смешали с плазмидой 1-258 из золотистого стафилококка, которая была устойчивой к пенициллину. С помощью рестрикционной нуклеазы R_1 плазида SC101 разрезалась в одной точке и превращалась из кольцевой в линейную молекулу, а из плазмиды 1-258 образовалось в результате четырех разрывов четыре фрагмента. Затем после отжига и сшивания лигазой образовались возможные комбинации фрагментов, соединенных концами. Этой смесью обрабатывали *E. coli*, при этом в нее проникали рекомбинированные молекулы, она претерпевала трансформацию и в результате приобретала устойчивость к пенициллину. Таким образом, образовавшаяся плазида-химера несла оба гена, которые имели исходные плазмиды. Она была способна к самовоспроизведению. Кроме этого, удалось включить *gal*-оперон из *E. coli* в ДНК-вектор вируса λ и с помощью последнего ввести его в геном животных (фибробласты из кожи людей). В результате этого последние приобрели способность образовывать β D-галактозо-1-фосфатуридилтрансферазу.

Получены также гибридные молекулы между ДНК фага λ и плазмидой Col E1. Путем длительного попеременного пассирования фага λ b2 на штамме *E. coli* C600 и штамме *E. coli* C600 (R1), содержащем рестриктазу $E_{co}R1$, получен мутант λ III, имеющий одну точку рестрикции в несущественной области генома, и λ IV без точек рестрикции. ДНК мутанта λ III использована в качестве векторной молекулы. После рестрикции эндонуклеазой $E_{co}R1$ в нее была интегрирована ДНК плазмиды Col E1. Остающиеся одиночные разрывы репарированы полинуклеотидлигазой фага T4, и путем трансфекции обработанных хлористым кальцием клеток *E. coli* получен клон фага λ , содержащий ДНК плазмиды Col E1.

В настоящее время получены различные рекомбинантные молекулы ДНК. Например, двуспиральная, циклическая гибридная ДНК, состоящая из ДНК вируса SV-40 и фага λ ; тройная рекомбинированная ДНК из фага λ , вируса SV-40 и *E. coli*, патогенность которой состоит в том, что она содержит онковирус SV-40.

Известны рекомбинантные ДНК из фрагментов ДНК, взятых от фага λ и дрозофилы; фага λ *E. coli* и стафилококка и др.

Особый интерес представляет гетероспецифическая трансформация высших растений под влиянием ДНК микроорганизмов. При этом приобретение клеткой растения новых признаков осуществ-

ляется включением чужеродных генов в ее хромосому. Донорным материалом может быть как цельная хромосома, так и ее фрагмент.

Передаваемые гены могут быть присоединены к ДНК, выделенной из бактерий, которая способна к образованию кольцевых структур и автономной репликации (бактериальные и фаговые эписомы). Доказан феномен интеграции бактериальной и растительной клетки. Остается неясным, какая часть генома бактерий включается в ДНК растений, какая природа этой части, как осуществляется линейная ассоциация в единую структуру.

Целью генной инженерии растений является не только улучшение видов, но и изучение экспрессии генов, в частности, в процессах клеточной дифференциации и других случаях. Экспрессия генов, перенесенных в чужеродную цитоплазму, может проявляться на уровне ферментов. Например, на пшенично-ржаных амфиплоидах, несущих цитоплазму пшеницы, изучали экспрессию генов ржи, ответственных за синтез изоферментов алкагольдегидрогеназы и эстеразы. Установлено, что гены ржи транскрибируются и транслируются в цитоплазме пшеницы, и образуются активные формы этих изоферментов.

ДНК с определенной нуклеотидной последовательностью можно получить на основе сочетания химического и биохимического методов синтеза, что является очень важным в связи с созданием искусственного гена. Это достигается таким образом. Проводится синтез фосфодиэфирной связи конденсацией свободной 3'-гидроксильной группы одного мононуклеотида со свободной 5'-фосфатной группой другого. Получают сначала короткие олигонуклеотиды (4—5 нуклеотидов), затем более длинные последовательности с помощью ДНК-лигазы. Таким путем Г. Корана собрал нуклеотидные последовательности из 75 и 85 нуклеотидов, которые соответствовали структурной части гена, кодирующего аланиновую и тирозиновую транспортные РНК. Но, как известно, «зрелая» тРНК образуется из более крупной молекулы тРНК-предшественника. Так, предшественник тирозиновой тРНК состоит из 126 нуклеотидов, а собственно тРНК — из 85 нуклеотидов. Но в состав гена тРНК входит кроме структурной его части, кодирующей собственно тРНК, еще промоторный и терминаторный участки. Последовательность нуклеотидов этих частей гена определяется так называемым методом «подсматривания». Принцип этого метода состоит в том, что если будем знать последовательность включения нуклеотидов в строящуюся новую цепь ДНК с помощью ДНК-полимеразы, то исходя из принципа комплементарности можно определить структуру самой матрицы. Таким способом Г. Корана синтезировал ген тирозиновой тРНК, который состоит из промотора, терминатора и структурного участка, кодирующего собственно тРНК. Уже достигнуты некоторые успехи в методах выделения, соединения фрагментов макромолекул и получения рекомбинантных молекул ДНК. Созданы новые типы бактериальных плазмид, получают фрагменты ДНК с липкими концами с помощью рестрикционных эндонуклеаз и т. д.

Но перспектива развития исследований по генной инженерии может привести не только к решению важных теоретических и практических проблем, но и к созданию новых инфекционных типов дезоксирибонуклеиновых кислот, и некоторые из них могут оказаться биологически опасными. Особенной осторожности требуют работы по конструированию и введению в бактерии искусственно созданных плазмид, которые несут резистентность к антибиотикам и токсинам. Кроме этого, опасность представляют работы по включению в рекомбинантные бактериальные или вирусные молекулы участков ДНК онкогенных или других вирусов животных. Одна из серьезных опасностей состоит также в том, что в этих работах широко используется *E. coli* для получения и размножения рекомбинантных молекул ДНК. Кишечная палочка с новой генетической информацией может оказаться опасной, широко распространиться и привести к непредвиденным последствиям.

Поэтому важнейшим вопросом генной инженерии является наряду с оценкой потенциальных выгод предполагаемых экспериментов также уменьшение их потенциальной опасности.

Регуляция функции ДНК. Регуляция функции ДНК в естественных условиях осуществляется в состоянии надмолекулярной структуры — нуклеопротеида, являющегося основным компонентом хроматина. Структура хроматина изменялась в процессе эволюции и имеет наиболее сложное строение у высших многоклеточных организмов. Хроматин состоит из нуклеопротеиновых нитей, укладка, структурное состояние которых изменяется на различных этапах митотического цикла. При этом белковые компоненты выполняют важную структурную и регуляторную роли.

Нуклеопротеиновые нити состоят из ДНК (до 45%), гистоновых и кислоторастворимых белков (до 50%), негистоновых белков (4—33%), рибонуклеиновых кислот (1,5—10%). Нуклеопротеиновые нити характеризуются рядом коэффициентов — отношений между их составными частями. Значения этих коэффициентов обусловлено видовой и тканевой специфичностью. В хроматине обычно в 1,5—2,0 раза больше белков, чем дезоксирибонуклеиновой кислоты. При этом содержание гистоновых белков почти всегда равно количеству ДНК, тогда как отношения негистоновых белков к дезоксирибонуклеиновой кислоте равняется 0,3—0,7, а РНК и ДНК — от 0,05 до 0,14.

В зависимости от состояния и взаимоотношения этих компонентов хроматина изменяется функциональная активность его ДНК. Вторичная структура ДНК в составе хроматина остается недостаточно выясненной. Исходя из стереохимической модели Дж. Уотсона и Ф. Крика ДНК находится в состоянии двуспиральной структуры, кроме тех случаев, когда отдельные ее участки подвергаются временной денатурации в процессе репликации и транскрипции. Допускается, что в ДНК имеются постоянно денатурированные участки в виде частично спирализованных отростков, с помощью

которых ДНК взаимодействует с регуляторными белками. Происходит специфическое блокирование соответствующих участков ДНК. Эти участки более богаты А—Т-парами, легче поддаются денатурации и взаимодействуют с лизин-богатыми гистонами.

В ДНК имеются и другие участки со специфической функцией. Например, участки с повторяющимися пиримидиновыми блоками, которые находятся в промоторных зонах, и по отношению к ним РНК-полимераза обладает высоким сродством.

Важным составным компонентом хроматина являются гистоновые белки, содержащие от 21 до 30 мол. % лизина и аргинина. Эти белки не содержат триптофана, не имеют четвертичной структуры, так как состоят только из одной полипептидной цепи. Гистоны имеются в хроматине всех многоклеточных и многих одноклеточных эукариотов. В бактериальных хромосомах нет гистонов, а вот у некоторых ДНК-содержащих вирусов внутренний белок по составу и свойствам близок к гистонам. Гистоны, особенно фракции H_3 , H_4 , отличаются стабильностью и сходством свойств у всех многоклеточных организмов. Но больше других белков подвергаются модификации, несмотря на свою стабильность. Это явление лежит в основе значительных изменений состояния хроматина в клеточном цикле. В результате гистоны изменяют уровень упаковки ДНК и, таким образом, регулируют ее матричную активность. Гетерогенность гистонов выражается 11—20 формами, которые представляют собой ацетилированные, фосфорилированные и метилированные модификации 5 основных их фракций, обозначаемые таким образом: H_1 , H_{2a} , H_{2b} , H_3 , H_4 . Наиболее заметные различия всех этих фракций состоят в том, что H_1 по молярной доли в % содержит лизина больше, чем аргинина, в 18—20 раз. В других фракциях это значение колеблется от 0,7 до 2,5. Фракция H_{2b} тоже содержит сравнительно много лизина и отличается тем, что N-концевой аминокислотой является пролин. Фракция H_3 отличается от остальных содержанием цистеина, а H_4 — очень высоким количеством глицина. Выяснена первичная структура всех пяти основных фракций гистонов, в состав которых входят следующие количества аминокислотных остатков: H_1 — 212; H_{2b} — 125; H_{2a} — 129; H_3 — 135; H_4 — 102. Основные кислоты сосредоточены в N-концевой половине полипептидной цепи в белках H_4 , H_{2b} , H_3 , а в C-концевой — H_1 . Эти участки несут более высокие положительные заряды и прочно связаны с ДНК. Имеется неравномерность в распределении вдоль полипептидной цепи также боковых радикалов дикарбоновых и неполярных аминокислот. В участках сосредоточения боковых радикалов, однообразных по заряду (основные, дикарбоновые) или по пространственной конфигурации (пролин), создаются условия, препятствующие образованию α -спиральной структуры полипептидной цепи и ее взаимодействию с ДНК.

Способность гистонов подавлять транскрипцию падает иногда при ацетилировании N-концевых остатков серина (H_1 , H_4 , H_{2a}) и ϵ -аминогрупп лизина. Особенно сильно меняется репрессорная

способность гистонов при их фосфорилировании по ОН-группе серина (H_2b). Репрессорная сила определяется также присутствием в полипептидной цепи цистеина (H_s). При этом возникают дисульфидные мостики, которые, как известно, резко изменяют третичную структуру белковой молекулы. Все эти изменения в состоянии гистонов могут сказываться на регуляции процесса транскрипции. В ряде случаев (клетки с пониженной способностью к делению) катионные белки представлены протаминами, в которых содержание аргинина может достигать 50 мол. %.

В процессе эволюции гистоны, видимо, возникли в связи с новыми средствами регуляции, которые были необходимы для многоклеточных высших организмов. Можно считать твердо установленным, что гистоны вносят большой вклад в стабилизацию ДНК в хроматине. Это очевидно из более высокой температуры плавления дезоксинуклеопротеида по сравнению с чистой ДНК. Причем кривая плавления имеет несколько пиков, что говорит о различной связи отдельных участков ДНК с различными гистоновыми и негистоновыми белками.

С помощью небольшого разнообразия и гетерогенности гистоновых белков нельзя полностью объяснить регуляцию функциональной активности ДНК. В связи с этим в последнее время большое значение придается негистоновым белкам, в состав которых в отличие от гистонов входит триптофан, и они состоят из слабоосновных и кислых белков. Эти белки отличаются большим разнообразием. Уже известно свыше 150 различных фракций этих белков. В состав негистоновых белков входят так называемые остаточные белки, которые особенно прочно связаны с ДНК и от последней отделяются только 0,5% додецилсульфатом в присутствии 1 моль $NaCl$. Еще более прочно ковалентно связанными с ДНК после этого остается около 0,15% белков, в составе которых очень много серина и валина. В негистоновых белках в 1,3—2 раза больше дикарбоновых кислот, чем основных. Они связаны с ДНК электростатическими, водородными связями (I группа), а также гидрофобными взаимодействиями (II группа). В состав I группы входит более легко растворимая подгруппа белков Ia. В группе I и подгруппе Ia присутствуют РНК-содержащие белки, R—RNP-фракция Wang, С-фракция С. Р. Уманского, фосфопротеины. Белки группы II, остаточные белки, очень прочно связаны с ДНК, имеют высокое содержание в своей цепи боковых радикалов с неполярными свойствами. Предполагают, что некоторые белки этой группы обладают РНК-полимеразной активностью.

Высокое содержание негистоновых белков найдено в функционально активных участках ДНК, в частности, в зонах пуфф хромосом у дрозофилы. Негистоновые белки обладают высокой видовой специфичностью. Образуют различной силы комплексы с ДНК, взятой из близкородственных организмов. Но эта группа белков остается еще недостаточно изученной. Одной из причин этого является трудность их выделения и фракционирования. В выпол-

нении регуляторной функции гистоновыми и негистоновыми белками большую роль приписывают также РНК. Таким образом, гистоновые, негистоновые белки и РНК неравномерно распределены вдоль полипептидной цепи ДНК хроматина. Отдельные ее участки остаются свободными, что следует из особенностей взаимодействия с актиномицином Д, полилизином, нуклеазами и т. д. Все это обуславливает различную степень разрепрессированности отдельных участков ДНК. Состояние ДНК в хромосомах прокариотов отличается по сравнению с эукариотической клеткой. В бактериальной клетке ДНК находится в относительно свободной форме.

Можно выделить два уровня организации упаковки ДНК. Эукариоты имеют нуклеопротеидный, а прокариоты—условно называемый свободный уровень организации, упаковки ДНК. На молекулярном уровне проблема упаковки ДНК остается еще недостаточно изученной. Но основой для решения этого вопроса является многообразие форм, которые имеет хромосома на разных этапах митотического и мейотического цикла, а также отличие хромосом одних организмов от других.

Проблема компактной упаковки ДНК у организмов различных уровней организации остается неясной. В этой связи представляет интерес сравнение состояния ДНК у прокариотов и эукариотов. У эукариотов хромосома в метафазе митотического цикла представляет собой компактную структуру. ДНК находится в состоянии метаболического покоя, очень плотно упакована и аналогична покоящейся ДНК бактериофага. Показателем очень плотной упаковки ДНК являются такие данные. Принято считать, что ДНК хромосомы представляет одну непрерывную двойную спираль. Длина двуспиральной ДНК хромосомы человека равна 40 000 мкм, а в метафазе приобретает длину, равную 4 мкм. В интерфазе ДНК распределяется из плотной упаковки и имеет вид ультратонких нитей, является метаболически активной. Интерфазная хромосома и состояние ДНК имеет сходство с вегетативной молекулой ДНК бактериофага, которая также находится в активном состоянии и принимает участие в его внутриклеточном развитии. В основе молекулярных механизмов периодического перехода хромосомной ДНК из конденсированного в расправленное состояние лежат, по-видимому, взаимодействия типа ДНК—гистон и гистон—гистон.

В настоящее время предполагается, что хроматин состоит из хроматиновых глобул — нуклеосом. Гистоновые белки представляются в виде глобул, в центральной части которых находятся гидрофобные аминокислоты. В таком состоянии гистоны образуют с ДНК солевые связи. В состав глобулы хроматина входит до 200 пар нуклеотидов, и она имеет длину около 140 Å. В глобуле хроматина — нуклеосоме — имеется периодичность, которая проявляется через 10 пар оснований. Между нуклеосомами имеется разрыв в 14—20 пар оснований.

Гистоны H_{2a} , H_{2b} , H_3 , H_4 образуют нуклеосому, а H_1 находится между нуклеосомами и выполняет регуляторную роль. Он может

выполнять роль в релаксации. Основу нуклеосомы образуют аргининбогатые H_3 и H_4 гистоны. На этот димер надстраиваются умеренно богатые лизином гистоны H_{2a} , H_{2b} . Гистоны могут рассматриваться как площадки для посадки других активных белков, которые уже взаимодействуют с ДНК. Нуклеосомы соединяются и образуют компактную структуру в виде нити, изогнутой зигзагом или спиралью, длиной до 300 Å. Нуклеосомы можно выделить и реконструировать. Предполагается, что гистоновые белки образуют основу размером 80 Å, а на нее наматывается ДНК, и нуклеосома имеет диаметр 100 Å. С помощью метода рассеивания нейтронов показано, что ДНК находится на поверхности нуклеосомы.

Структура хроматина интенсивно изучается, в частности, с помощью реконструкции его из составляющих компонентов. При этом важнейшим остается процесс транскрипции, осуществляемый на ДНК как основном компоненте хромосомы, которая у прокариотов представлена в виде генетической нуклеиновой кислоты. У эукариотов ДНК имеет сложное строение. В процессе транскрипции на определенных оперонах или транскриптонах, т. е. участках нуклеотидной последовательности ДНК, происходит процесс биосинтеза различных РНК. Эти единицы транскрипции имеют различную сложность строения у организмов различного уровня организации.

Наиболее полно состав оперона (транскриптона) изучен у микроорганизмов. В него входят прежде всего участки нуклеотидной последовательности ДНК, которые выдают информацию о структуре различных рибосомальных, транспортных РНК и белков. Затем в оперон входят две последовательности с регуляторными свойствами. Они включают и выключают оперон. Первая — промотор, который имеет родство к РНК-полимеразе и определяет место начала считывания генетической информации в молекуле ДНК; вторая — операторный участок, который определяет место присоединения регуляторных факторов — репрессора, циклического АМФ с белком и др.

Более простое строение имеют опероны вирусов, у которых отсутствует операторный участок. У высших организмов, наоборот, оперон (транскриптон) имеет более сложное строение. Его структурный участок может много раз повторяться, а участки, выполняющие регуляторную функцию, имеют еще более сложное строение.

Многие опероны как единицы транскрипции хорошо изучены, а некоторые из них, такие как Лас-оперон, выделены *in vitro* в функционально активном состоянии. В состав других оперонов может входить несколько нуклеотидных последовательностей. Они имеют более сложное строение и недостаточно изучены. Сложность строения регуляторных участков оперонов высших организмов вытекает также из особенностей транскрипции различных форм РНК в виде их предшественников, что особенно рельефно проявляется на транскрипции информационных РНК. Таким образом, компоненты,

входящие в состав хроматина, выполняют важную роль в его структуре и регуляции функции ДНК.

Функции нуклеиновых кислот в биосинтезе белка. Механизм участия нуклеиновых кислот в процессах биосинтеза белков, их детерминации стали более или менее понятны в самое последнее время. Как уже упоминалось, в нуклеотидной последовательности ДНК закодированы состав и структура всех белков. Передача информации от ДНК к белку осуществляется в несколько этапов. В процессе репликации образуются копии ДНК и осуществляется передача генетической информации. Затем информация с ДНК путем транскрипции переносится на комплементарно синтезированную информационную РНК. И на последнем этапе генетическая информация транслируется с четырехбуквенного алфавита информационной РНК на двадцатибуквенный алфавит белка в рибосоме. В воспроизведении и осуществлении этого синтеза непосредственное участие принимают рибонуклеиновые кислоты.

В клетке имеется три различных рибосомных РНК, свыше 70 транспортных и сотни, тысячи информационных РНК, различающихся по нуклеотидной последовательности и молекулярной массе.

В жизни клетки громадное значение имеет синтез с определенной скоростью тех белков, которые необходимы в данный момент. Это осуществляется специальной системой регуляции, функционирование которой в сильной степени зависит от воздействия на клетку, организм внешней среды. С помощью механизма, который работает по принципу обратной связи, клетка синтезирует с большой скоростью нужный белок-фермент и подавляет синтез ненужных белков-ферментов. Между скоростью синтеза белка и суммарным содержанием рибонуклеиновых кислот имеется прямая зависимость. Это свидетельствует о прямом участии этих кислот в биосинтезе белка. Информация о синтезе рибонуклеиновых кислот поступает с молекулы ДНК. Однако прямой зависимости между содержанием ДНК и РНК не существует. Это объясняется тем, что транскрипция в данный момент осуществляется только с определенных некоторых областей молекулы ДНК. При этом синтезируются различные рибонуклеиновые кислоты с различной структурой, свойствами и функцией.

Важнейшей особенностью биосинтеза полипептидной цепи является исключительная точность и безошибочность этого процесса, который запрограммирован и обеспечивается нуклеотидной последовательностью ДНК. В основе образования белковой молекулы лежит матричный синтез биополимеров, который реализуется на основе принципа комплементарности, когда с помощью матрицы производится узнавание, отбор соответствующего мономера и включение его в определенное место синтезируемого полимера.

В результате длительного изучения установлено два механизма биосинтеза белка — *адапторный* и *безадапторный*. Первый основан на включении в полипептидную цепь аминокислотных остатков в строгой последовательности, которая определяется чередованием

кодонов в информационной РНК. Сущность адапторного механизма состоит в том, что от самой аминокислоты не зависит место, которое она займет в полипептидной цепи в процессе ее биосинтеза. Это зависит от типа тРНК, которая выполняет акцепторную и адапторную функции. Это убедительно было доказано трансформацией цистеина в аланин на цистеинил-тРНК. Из этого эксперимента следует вывод: место аминокислотного остатка определяется адапторной функцией тРНК, а не самой аминокислотой. Адапторная функция тРНК выполняется с помощью антикодона — триплета, занимающего срединную часть в молекулах всех тРНК. Грямое доказательство этого положения получено в эксперименте с супрессорными тРНК, которые отличались от обычных тРНК по одному нуклеотиду в антикодоне. Взаимодействие антикодона с кодоном протекает на основе антипараллельного спаривания: 5'-конец (первая буква) антикодона находится против 3'-конца (третьей буквы) кодона и наоборот. Антикодон одной тРНК может узнавать один, два и больше кодонов, которые отличаются по третьей букве. Одним из объяснений этого явления может быть гипотеза качаний, из которой вытекает, что третья буква кодона (3'-конец) может спариваться неспецифически с первой буквой антикодона (5'-конец).

Согласно второму, безадапторному, механизму синтезируются небольшие пептиды включением аминокислот в их молекулу соответствующими ферментами.

Господствующим является адапторный механизм биосинтеза белка. Весь этот процесс делится на две стадии: подготовка аминокислот к трансляции — *рекогниция* (узнавание) и *собственно трансляция*. Подготовка аминокислот к трансляции начинается и состоит в их взаимодействии с АТФ, которое заканчивается образованием аминоациладенилатов. Затем аминоациладенилат взаимодействует с соответствующей транспортной РНК и образуется аминоацил-тРНК. Оба эти этапа подготовки аминокислот к трансляции катализируются одними и теми же ферментами — аминоацилсинтетазами, которые называются также аминоацил-тРНК-синтетазами (АРС-азами), а по рациональной системе классификации ферментов — аминокислота-РНК-лигазами. Эти ферменты в результате аминоацилирования тРНК выполняют кодирующую функцию. По предложению В. А. Энгельгардта они называются также *кодазами*, что отражает их функциональное значение. Белки этих ферментов отличаются преобладающим содержанием кислых аминокислотных остатков. Как правило, многие аминоацил-тРНК-синтетазы являются тиоловыми ферментами. Например, метионил-тРНК-синтетаза содержит десять SH-групп. Хотя аминоацил-тРНК-синтетазы функционально одинаковы, они имеют различную молекулярную массу: одни из них в пределах 90000—110000, другие выше (24 000 у триптофанил-тРНК-синтетазы) или ниже (около 50 000 у глутамил-тРНК-синтетазы и метионил-тРНК-синтетазы).

Известно, что белки, имеющие молекулярную массу в пределах 100000, состоят обычно из двух или более субъединиц. Поэтому

молекулы белков различных . аминоацил-тРНК-синтетаз также состоят из различного числа субъединиц. Аминоацил-тРНК-синтетазы (валиновая, изолейциновая, аргининовая и др.) состоят из одной полипептидной цепи. Метиониновая, сериновая, лизиновая, тирозиновая, триптофановая и др. имеют четвертичную структуру и состоят из идентичных субъединиц. Глициновая, глутаминовая и другие аминоацил-тРНК-синтетазы состоят из неидентичных субъединиц. У аминоацилсинтетаз имеет место, видимо, структурная разобщенность активных центров взаимодействия с субстратами: аминокислота, АТФ, тРНК. Решение этих вопросов затрудняется незнанием первичной структуры этих белков-ферментов, их активных центров, участков узнавания и связывания с субстратами, а также без данных о комплексах фермента с субстратами с помощью рентгеноструктурного анализа. Предполагается, что эти ферменты *in vivo* представлены комплексом с тРНК и в клетке находятся, приблизительно, в эквимольном соотношении. Аминоацил-тРНК-синтетазы являются бифункциональными ферментами. Они катализируют реакцию связывания аминокислоты с АТФ и образование аминоацил-тРНК. Субстраты этих ферментов — аминокислота, АТФ и тРНК — имеют различные физические и химические свойства. Поэтому в молекуле белка фермента центры связывания этих субстратов должны иметь различную структурную организацию. Все эти ферменты обладают очень высокой специфичностью к своим аминокислотам. Меньшая, видимо, специфичность этих ферментов по отношению к тРНК, так как они ацилируют все транспортные рибонуклеиновые кислоты одной и той же аминокислоты. Несмотря на высокую специфичность аминоацил-тРНК-синтетаз, они могут присоединять аналоги «своих» аминокислот, такие как *n*-фторфенилаланин, этионин (аналог метионина), канаванин (аналог аргинина) и др. Эти ферменты обладают также видовой специфичностью. Например, тРНК *E. coli* связывается с аргинином на 2% аминоацил-тРНК-синтетазой из дрожжей и на 100% собственным ферментом. Аминоацил-тРНК-синтетазы имеют, с одной стороны, много общего, а, с другой, отличаются по многим признакам, поэтому необходимо изучение каждого фермента.

Исходя из множественности тРНК, их изоакцепторных фракций можно предполагать наличие большой гетерогенности аминоацил-тРНК-синтетаз, которая может быть обусловлена четвертичной структурой белковой молекулы у многих из этих ферментов. Однако количество аминоацил-тРНК-синтетаз меньше, чем тРНК, так как один фермент часто активирует несколько изоакцепторных тРНК. Вообще, если мы посмотрим на степень вырожденности кодирования аминокислот, то она уменьшается от ДНК к аминоацилсинтетазам, т. е. на 20 аминокислот приходится 61 кодон, около 50 антикодонов, немногим больше 20 аминоацилсинтетаз. Принято считать, что в клетке эукариотов имеется около ста, а у бактерий около шестидесяти различных тРНК, акцептирующих 20 аминокислот.

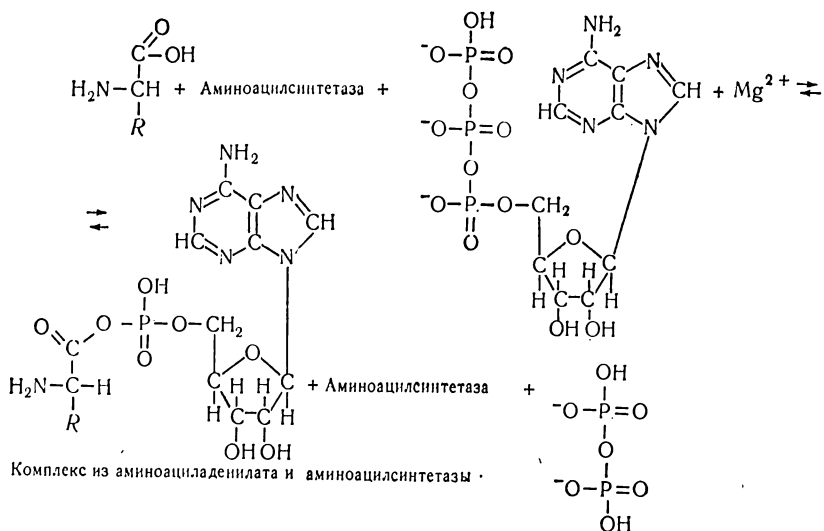
Точность узнавания аминоксил-тРНК-синтезами своих аминокислот имеет исключительное значение, так как ошибка в присоединении к тРНК чужой аминокислоты приведет к нарушению и изменению генетической информации. Поэтому имеются механизмы, с помощью которых в клетке сохраняется специфичность аминоксил-тРНК-синтез при присоединении аминокислоты к тРНК. Это обеспечивается скоростью активации ферментом тРНК своей аминокислоты. Кроме этого, тРНК обладает способностью гидролизовать комплекс аминоксил-аденилат — фермент с чужой аминокислотой. Исходя из того, что аминоксил-тРНК-синтезазы имеют четвертичную структуру, возможно, существует набор трехмерных полипептидных рецепторов для одной и той же аминокислоты. Аминоксил-тРНК-синтезазы активируют только *L*-стереоизомеры аминокислот. *D*-Аминокислоты не активируются и выступают иногда как ингибиторы процесса активации *L*-изомеров.

Предполагается, что у разных аминоксил-тРНК-синтез имеется различная степень специфичности в узнавании своей аминокислоты. Если в клетке имеется ряд близких по структуре аминокислот, то аминоксил-тРНК-синтезазы должны обладать более высокой специфичностью в узнавании своей аминокислоты. Если же аминокислоты резко отличаются по своей структуре от других, природных аминокислот, то эти ферменты обладают менее строгой специфичностью и могут включать в полипептидные цепи экзогенные аналоги с отличной структурой. В узнавании аминоксил-тРНК-синтезами своих аминокислот большое значение, видимо, имеют боковые цепи последних. Меньшее значение имеют общие функциональные группы NH_2 и особенно COOH . Достаточно полно изучено взаимодействие аминоксил-тРНК-синтез с субстратами. В молекуле этих ферментов имеется один активный центр, который участвует в образовании аминоксил-аденилата. Затем аминокислотный остаток переносится прямо на соответствующую тРНК.

Между аминоксил-тРНК-синтезазой и тРНК имеет место взаимное узнавание в отсутствии субстратов — аминокислоты и АТФ. Молекулярные основы этого взаимного узнавания остаются недостаточно изученными. В молекуле аминоксил-тРНК-синтез возникают структурные изменения, которые вызываются субстратами. Фермент имеет три места связывания для всех трех субстратов: аминокислота, АТФ и тРНК. Поэтому он, видимо, не является аллостерическим ферментом обычного типа. При этом каждый из субстратов вызывает свое конформационное изменение в молекуле аминоксил-тРНК-синтезазы, физическая природа которого недостаточно изучена.

Весь процесс подготовки аминокислот к трансляции представляется таким образом. Аминокислота активируется. Эта реакция осуществляется за счет свободной энергии, которая высвобождается при расщеплении молекулы АТФ с выделением пироглютата, и образуется аминоксил-аденилат. При этом карбоксильная группа каждой аминокислоты активируется своим специфическим

ферментом. Но аминоациладенилат не находится в свободном состоянии, а образует с аминоацилсинтетазой комплекс, который участвует в дальнейших реакциях подготовки аминокислоты к трансляции. Этот процесс может быть представлен следующим об-



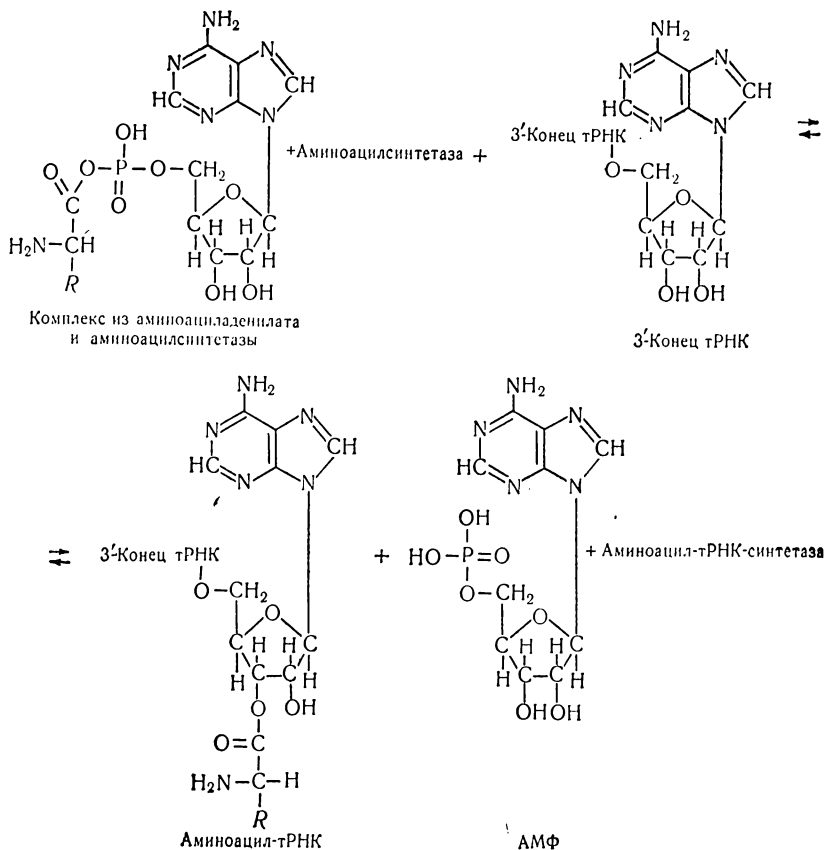
разом. Энергия, которая выделяется при расщеплении АТФ и образовании аминоациладенилата, сохраняется в эфирной связи, возникающей между остатками аминокислоты и фосфорной кислоты. За счет этой энергии осуществляется и дальнейшая реакция подготовки аминокислоты к трансляции, в результате которой образуется аминоктил-тРНК.

При этом комплекс из аминоациладенилата и аминоацил-тРНК-синтетазы взаимодействует с 3'-концом тРНК и образуется аминоктил-тРНК. Аминокислота присоединяется с помощью аденилового нуклеотида. Между водородом 2'-гидроксильной группы рибозы и N—3 пуринового ядра возникает водородная связь. Это приводит к нуклеофильности кислорода 2'-ОН-группы по сравнению с кислородом 3'-ОН-группы. Поэтому кислород 2'-ОН-группы совершает нуклеофильную атаку карбонильного атома углерода аминоктил-аденилата, в результате которой образуется аминоктилэфир. Таким образом, аминокислота присоединяется с помощью эфирной связи к 2'-ОН-группе. Но затем остаток аминокислоты может перейти к 3'-ОН-группе. Это следует из того, что обнаруживается равновесная смесь 2'-и 3'-аминоацилизомеров.

Образование указанной эфирной связи подтверждается тем, что после связывания 3'-ОН-группы рибоза перестает окисляться подной кислотой (HIO_4). При образовании аминоктил-тРНК энергия продолжает сохраняться в связи между карбонилем аминокислоты и 3'-углеродом рибозы конечного аденилового нуклеотида тРНК.

Этой энергии оказывается достаточно для образования пептидной связи при включении аминокислотного остатка в полипептидную цепь в рибосоме.

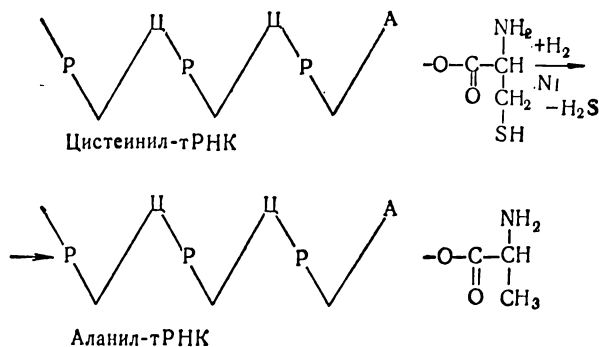
Второй этап подготовки аминокислоты к трансляции — образование аминоацил-тРНК — может быть представлен таким образом:



Аминоацил-тРНК затем поступает на рибосому и включается в строго определенное место полипептидной цепи в соответствии своему кодону на информационной РНК. Таким образом, тРНК выполняют свою акцепторно-адапторную функцию (рис. 51).

Адапторная роль транспортных РНК доказывается с помощью остроумного эксперимента. Цистеин ферментативно был присоединен к своей транспортной РНК, а затем гидрированием в присутствии никеля Рэнея превращен в аланин отщеплением SH-группы и заменой ее водородом (см. стр. 257).

После этого была взята синтетическая матрица, которая включает в цепь цистеин, а не аланин. Тем не менее, из аланил-тРНК в цепь включался аланин, полученный из цистеина. Таким путем удалось



получить гемоглобин с заменой цистеина на аланин. Из этого следует, что транспортная РНК выполняет именно роль адаптора. В последнее время удалось показать, что различные кодоны на матричной РНК, соответствующие одной и той же аминокислоте, взаимодействуют с различными транспортными РНК той же самой аминокислоты. При этом каждая транспортная РНК одной и той же аминокислоты заполняет кодоны и включает аминокислоту в точно определенном месте полипептидной цепи.

Адапторную функцию тРНК можно затормозить и приостановить биосинтез высокомолекулярного полипептида, если подействовать аналогом концевого аденилового нуклеотида тРНК. Одним из

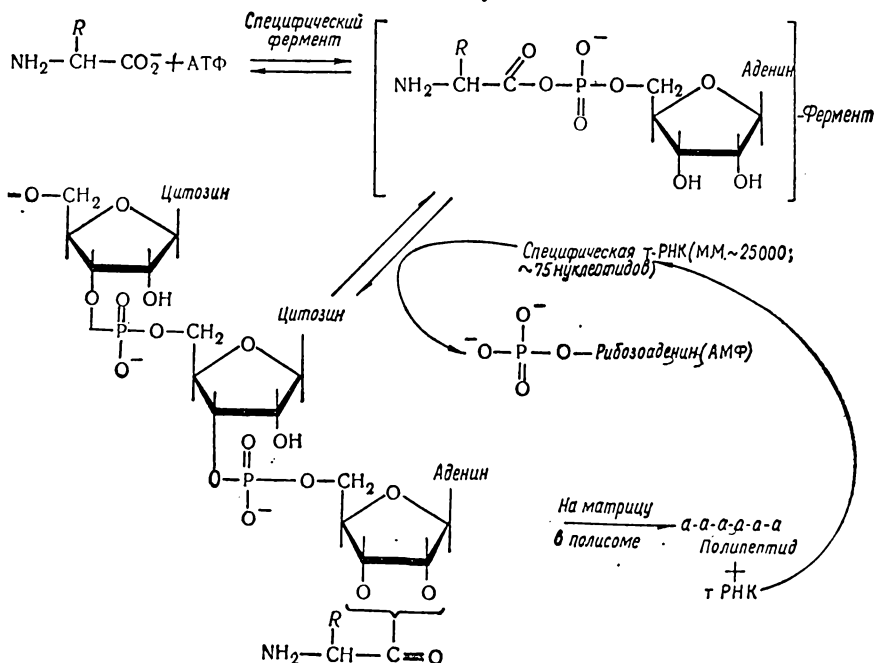
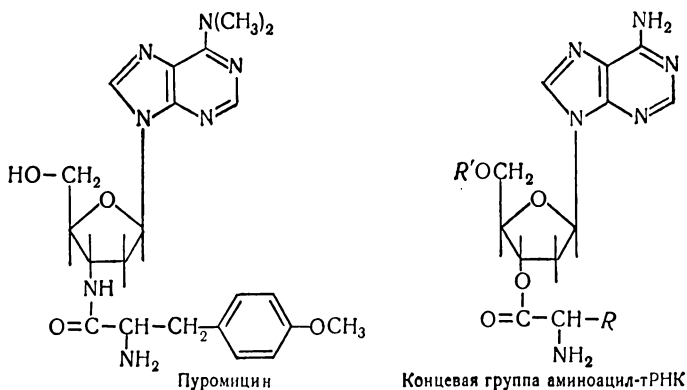


Рис. 51. Активация аминокислоты при образовании аминоксил-транспортной РНК.

таких аналогов является пурамицин, который имеет структурное сходство с аминоациладенилатом и взаимодействует с транспортной РНК. Это соединение включается в биосинтез белка на уровне удлинения полипептидной цепи. Отличие пурамицина от аминоацил-тРНК состоит в наличии двух метильных групп на аминном азоте аденина; присутствии тирозинового остатка, метилированного также на феноксигруппе; содержании аминокислоты вместо рибозы. Поэтому аминоацильная группа прикрепляется не эфирной связью, как при образовании аминоацил-тРНК, а с помощью амидной группировки. С помощью меченого ^{14}C пурамицина установлено, что он ковалентно связывается с полипептидом, рост цепи которого при этом приостанавливается. Пурамицин замещает концевую пептидил-тРНК, что прерывает дальнейший рост полипептидной цепи.



Как видно, важную роль в подготовке аминокислот к трансляции выполняют транспортные рибонуклеиновые кислоты. тРНК имеют небольшую молекулярную массу от 23 000 до 28 000 и константу седиментации 49, составляют 10—15% всех клеточных рибонуклеиновых кислот и находятся в клетке в свободном состоянии или в связи с соответствующей аминокислотой. тРНК содержат много гуанина и цитозина, что обуславливает образование спирализованных участков, количество которых достигает 60—70%. Молекула тРНК имеет длину около 90 Å, а поперечник от 25 до 35 Å. Полностью изучена первичная структура свыше 60 тРНК, среди которых всего только единицы транспортных рибонуклеиновых кислот эукариотов. тРНК получены в кристаллическом состоянии и рентгеноструктурным анализом определена их третичная структура. тРНК выполняют важные функции в биосинтезе белка: связывание аминокислотного остатка, ориентацию его на рибосоме и точное включение в строго определенное место полипептидной цепи.

тРНК кроме акцепторной и адапторной роли выполняют и другие функции: перенос аминокислотных остатков на акцепторные белки; защита белка аминокислот-тРНК-синтетазы от термоинактивации; участие в синтезе липидов; взаимодействие со многими фер-

ментами процессинга тРНК (метилазы, нуклеазы, лигазы, трансферазы и др.); регуляция биосинтеза белка в процессе трансляции.

Одним из важных свойств тРНК является их множественность, т. е. одна аминокислота может присоединяться к нескольким видам молекул тРНК. Такие тРНК называются изоакцепторными. Гетерогенность изоакцепторных типов тРНК возникает на основе различий в первичной структуре участков ДНК, с которых считывается информация в процессе транскрипции. Это генетический тип гетерогенности, и он может вести к изменению в антикодоне и в первичной структуре тРНК. Но формирование молекул тРНК продолжается после ее снятия с молекулы ДНК, т. е. путем посттранскрипционной модификации с помощью специальных ферментов — метилазы, ЦЦА-пирофосфорилазы и др. Таким образом, множественность изоакцепторных фракций тРНК возникает на основе генетической и модификационной гетерогенности. Но гетерогенность тРНК может возникнуть и при одной и той же первичной структуре за счет конформационных изменений в молекуле тРНК. Множественность тРНК может возникнуть также и за счет олигомеризации, димеризации ее молекулы или за счет деградации ее минорных компонентов.

Можно считать твердо установленным, что все тРНК имеют однотипную общую пространственную организацию. Их полинуклеотидная цепь состоит в среднем из 80 мономеров, незначительно также колеблется молекулярная масса тРНК. Поэтому суммарная фракция тРНК обладает некоторыми физико-химическими свойствами как гомогенное вещество. Исходя из физических свойств молекулы тРНК и ее первичной структуры можно считать, что водородными связями соединено около 60% всех оснований, которые оказываются экранированными. Часть остальных оснований оказываются экспонированными и доступными для различных, в том числе и химических, воздействий.

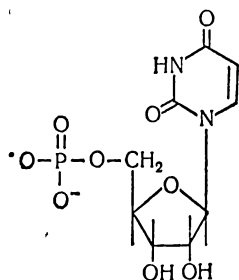
Несмотря на множественность тРНК, в их структуре имеется много общего. Все они имеют «структуру клеверного листа», содержат четыре спирализованных и одну неспирализованную центральную область (см. рис. 28). Первый спирализованный участок образуется 3'- и 5'-концами полинуклеотидной цепи тРНК и состоит из 7 комплементарных пар оснований. Заканчивается этот спирализованный участок универсальным концевым триплетом ЦЦА, который выполняет акцепторную функцию. 3'-конец тРНК всегда заканчивается аденозином, 3'-ОН-группа которого остается нефосфорилированной. 5'-конец тРНК заканчивается гуанозином с фосфорилированной 5'-ОН-группой. Терминальный триплет ЦЦА обновляется. Этот процесс катализуется ЦЦА-пирофосфорилазой. При отщеплении ЦЦА тРНК теряет адапторную функцию. Второй спирализованный антикодонный участок расположен посередине молекулы против ЦЦА-триплета. Этот участок является специфическим для каждой тРНК и для одной из аминокислот. Его спирализованный участок у всех тРНК содержит 5 пар

оснований. По специфичности антикодона транспортные РНК обозначаются таким образом: тРНК^{ала}, тРНК^{лиз}, тРНК^{сер} и т. д. Если имеется несколько изоакцепторных тРНК, то тогда они обозначаются так: тРНК₁^{сер}, тРНК₂^{сер} и т. д.

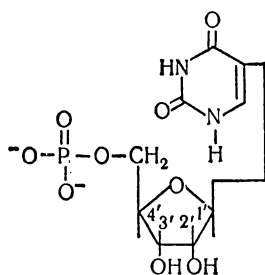
Антикодон расположен всегда в неспирализованной части петли, является экспонированным, доступным для взаимодействия. По составу антикодонов число различных тРНК заметно превышает число аминокислот. Г. Кантони предложил называть этот триплет тРНК «нодок», чтобы отразить его комплементарность кодону. Но более широкое распространение получил термин «антикодон».

Общие черты в структуре различных тРНК вносятся также боковой псевдоуридиновой, или Т—ψ—Ц-петлей, название которой определяется присутствием в ней псевдоуридина. Спирализованный участок этой петли содержит 5 пар оснований. Псевдоуридиновая петля выполняет, видимо, важную роль во взаимодействии тРНК с 50S субчастицей рибосомы. В этой петле имеется пентануклеотид Г—Т—ψ—Ц—Г. 5SРНК 50S субъединицы рибосомы содержит комплементарный ему пентануклеотид.

Необходимо отметить, что водородные связи, которые образуются между кодоном и антикодоном, термодинамически недостаточны, чтобы долго удерживать аминоацил-тРНК на матрице. Поэтому активные участки могут быть только в изгибах и петлях полинуклеотидной цепи транспортной РНК, где основания оказываются неспаренными. Это объясняется тем, что между некоторыми парами оснований водородные связи не могут образоваться из-за того, что водороды заняты металльными группами. Очень часто среди таких (минорных) оснований встречаются псевдоуридиновая кислота — 5-рибозильный изомер уридиновой кислоты или дигидроуридиновая кислота.



Уридиновая кислота



Псевдоуридиновая кислота

Для второй боковой петли тРНК характерно содержание тетра-нуклеотида А-Пур-Пир-Пир. Но в ее состав иногда входят остатки дигидроуридина, поэтому эту петлю называют дигидроуридиновой. Ее спирализованный участок состоит из 3—4 пар оснований.

Всегда в центральной части молекулы тРНК присутствует S-участок, или дополнительная петля, спирализованная часть которой содержит до 3—4 пар оснований. Эта петля находится на поверхности молекулы тРНК и является экспонированной.

Третичная структура тРНК стабилизируется водородными связями между основаниями в спирализованных участках, а также расположенными в различных петлях. Возможно, что различным функциональным состояниям тРНК соответствуют различные третичные структуры.

Одной из важнейших функций тРНК является специфический выбор и включение аминокислот. Включение аминокислотных остатков в нужной последовательности в полипептидную цепь определяется узнаванием тРНК соответствующего кодона на мРНК, т. е. это нуклеиново-нуклеиновое узнавание основано на кодон-антикодонном взаимодействии по принципу комплементарности. Более сложный механизм лежит в нуклеиново-белковом узнавании определенной тРНК своей аминоацил-тРНК-синтетазы. Для этого, видимо, не достаточно какой-то нуклеотидной последовательности, а необходима в молекуле тРНК область с определенной третичной структурой. Функцию узнавания не могут выполнять звенья одинаковые, общие для всех форм тРНК, такие как концевой триплет ЦЦА, пентануклеотид Г—Т—ψ—Ц—Г. При более детальном анализе оказалось, что у всех тРНК имеются значительные сходства в их структуре. Около 36 из 75—85 нуклеотидов, составляющих всю молекулу тРНК, являются одинаковыми и занимают аналогичные места. Эти сходные нуклеотиды в основном расположены в правой и левой петлях «клеверного листа», содержащих соответственно Т—ψ—Ц и дигидроуридин diHU. В этих участках тРНК не обнаруживается различий по трем нуклеотидам. Но для опознавания тРНК необходимо не менее трех нуклеотидов. Поэтому структурные компоненты, обеспечивающие узнавание, видимо, представлены в других частях молекулы тРНК.

Можно считать, что в узнавании (рекогнции), видимо, играет определенную роль антикодонная петля, а также пятая, шестая и седьмая пары оснований стебля спирализованной части на 5'- и 3'-конце молекулы и биспиральный участок у основания дигидроуридиновой петли. Можно определенно говорить, что центр рекогнции имеет в молекуле тРНК сравнительно малые размеры. Это следует из того, что значительные перестройки в молекуле тРНК не приводят к потере ее функции.

тРНК отличаются высоким содержанием минорных оснований, которые могут изменять свойства отдельных участков молекулы тРНК, ее третичную структуру и функцию. Процесс метилирования определенных участков тРНК протекает в посттранскрипционный период с помощью большого числа метилаз. От специфического метилирования зависит структурная организация молекул тРНК, возможность узнавания соответствующих аминоацилсинтетаз и другие свойства. Известно около ста структур тРНК, у которых двучепочечные участки имеют громадное разнообразие, что может рассматриваться как основа для узнавания различными белками.

Считается, что участки в тРНК, бедные гуанином или не содержащие его совсем, служат местом взаимодействия с белком-фер-

ментом, аминоацил-тРНК-синтетазой. Из всех двуцепочечных участков тРНК наиболее бедным гуанином является антикодонный стержень, наиболее важный для узнавания и взаимодействия с аминоацил-тРНК-синтетазами и метилазами. Таким образом, тРНК несут в себе очень большую информацию при сравнительно малом размере молекулы.

На второй стадии биосинтеза белка — трансляции — принимают участие не только транспортная, но информационная и рибосомальная рибонуклеиновые кислоты.

Р и б о с о м а л ь н а я Р Н К. На ее долю приходится около 80% всей клеточной РНК. Этому типу РНК свойственен медленный синтез и высокая стабильность, так как она может переходить в дочерние клетки. Рибосомальная РНК является структурным материалом при построении рибосомы и составляет около 60% ее вещества. В хромосоме бактерий имеются специальные области, на которых происходит синтез рибосомальной РНК. Значение рибосомальной РНК видно из того, что всегда и во всех случаях биосинтез белка протекает в присутствии рибосом. Этим, видимо, объясняется то, что рибосомы имеются в цитоплазме, а также в митохондриях, хлоропластах и, возможно, в других структурах и частях клетки, где идет синтез белка. Рибосомальные РНК, по-видимому, участвуют в инициации синтеза полипептидной цепи; создают соответствующую трехмерную поверхность, по которой могла бы мРНК передвигаться по рибосоме. Возможно, что одна из функций рибосом сводится к тому, чтобы пространственно изолировать процессы включения в белок аминокислот, так как последние могут вовлекаться в большое число различных реакций. В связи с этим рибосомы должны быть проницаемы для аминокислот, гуанозинтрифосфата и некоторых других веществ цитоплазмы. Но непосредственная функция, которую выполняет рибосомальная РНК в процессах биосинтеза белка, пока остается полностью невыясненной.

М а т р и ч н а я , и л и и н ф о р м а ц и о н н а я , Р Н К. Большой вклад в открытие информационной РНК внесли А. Н. Белозерский и А. С. Спирин. В 1957 г. на основе результатов сопоставления состава общей РНК и ДНК у микроорганизмов они пришли к выводу о наличии небольшой специфической фракции в тотальной РНК, которая была переносчиком генетической информации. Позже, в 1960 г., они определенно установили, что имеется коррелирующая с ДНК часть РНК, которая является связующим звеном в передаче наследственной информации от ДНК к другим субстратам клетки, в особенности к белкам. Это предсказание через пять лет было подтверждено, и информационная РНК была выделена и идентифицирована в ряде зарубежных лабораторий. Открытие мРНК сыграло большую роль в изучении значения генетической информации в биосинтезе белка.

Доказательство значения РНК в переносе генетической информации было получено также при инфицировании *E. coli* бактериофагом T2. В этом случае РНК образовывалась только в присутствии

фаговой ДНК, имела сходный с ней нуклеотидный состав и легко вступала в гибридизацию с ней.

На основе этих данных, а также сведений о том, что в клетке имеется небольшое количество быстро обновляющейся формы РНК, отличающейся от других типов РНК и близкой по нуклеотидному составу к ДНК, Ф. Жакоб и Д. Моно в 1961 г. высказали гипотезу об информационной РНК. Они предсказали, что эта форма РНК синтезируется ферментативно на ДНК и переносит от нее генетическую информацию на рибосому, где идет специфический синтез белка. При этом каждый тип информационной РНК является матрицей для синтеза только определенной полипептидной цепи, а затем распадается. Процесс синтеза белка регулируется быстрым синтезом, коротким временем жизни и быстрым распадом информационной РНК. Эти положения гипотезы Ф. Жакоба и Д. Моно затем получили экспериментальное подтверждение. Действительно, оказалось, что информационная РНК выполняет роль матрицы, на которой идет сборка полипептидных цепей. Этот тип РНК отличается высокой метаболической активностью. У микроорганизмов она синтезируется за 20—30 с. Затем активно включается в биосинтез белка и через 3—5 мин распадается. Этим, видимо, объясняется незначительная доля этой РНК, которую она составляет от общей клеточной РНК. Обычно ее содержание находится в пределах 3—5%. В каждый данный момент, вероятно, в клетке меняется специфический состав молекул этой РНК, который определяется скоростью и характером биосинтеза в данный момент того или иного белка.

Один из ранних методов изучения информационной РНК состоял в выделении из бактериальной клетки рибосом и их фракционировании в градиенте сахарозы с перепадом концентраций от 5% вверху до 25% у дна пробирки. После 20-секундного радиоактивного импульса меченым урацилом ^{14}C клетки разрушались, определялась радиоактивность и оптическая плотность при 260 нм (рис. 52.) Оптическая плотность была выше во фракции 50S и 30S при

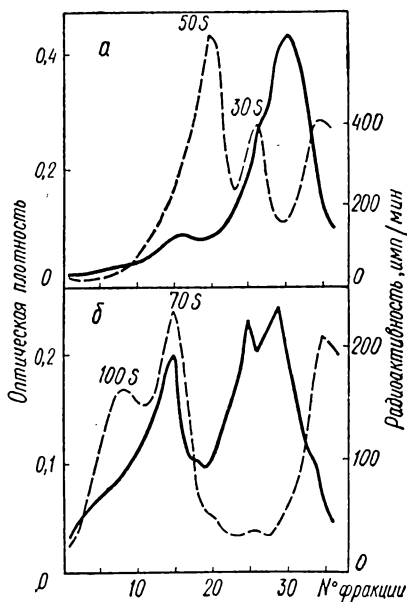


Рис. 52. Ультрацентрифугирование информационной РНК из *E. coli* после импульсной метки ^{14}C -урацилом в растворе соли магния (Gros, 1961):

а — 10^{-4} моль; б — 10^{-2} моль. Прерывистая линия — распределение оптической плотности вдоль кюветы; сплошная — распределение радиоактивности.

концентрации марганца 10^{-4} моль и во фракции 70S при концентрации 10^{-2} моль, что соответствует зависимости состояния рибосом от концентрации ионов магния. Радиоактивная метка информационной РНК обнаруживается в виде пиков с константой седиментации от 10S до 40S.

Пик радиоактивной информационной РНК обнаруживается через 20 с, а через 5 мин после перенесения культуры на среду с обычным урацилом исчезает. Та же картина наблюдается, если после 20-секундной экспозиции на ^{14}C -урациле культура *E. coli* переносится на среду с актиномицином Д. Через 3—5 мин пик радиоактивной информационной РНК исчезает. Метка переходит в кислоторастворимую фракцию, где представлены фрагменты распавшейся информационной РНК.

Таким же путем установлено, что у высших организмов время распада информационной РНК исчисляется многими часами или она вообще остается стабильной. Информационная РНК особенно легко разрушается РНК-азой. Поэтому радиоактивная метка при импульсном воздействии урацилом ^{14}C обнаруживается более четко, если применяется мгновенное вскрытие клетки и депротеинизация додецилсульфатом и фенолом.

В настоящее время преодолены трудности, которые ранее состояли в выделении иРНК из клеток эукариотов из-за очень большой гетерогенности их молекул, присутствия нуклеаз. Это обеспечивает получение и изучение специфических иРНК эукариотов. иРНК чрезвычайно гетерогенна. Например, в клетках *HeLa* около 2% всей информационной РНК состоит из 17 различных классов последовательностей, каждая из них в 800 копиях на клетку. 28% всей иРНК состоит из 370 различных классов последовательностей, каждая из них в 440 копиях на клетку. 50% всей иРНК состоит из 3300 различных классов последовательностей, каждая из них в 8 копиях на клетку.

В последние годы достигнуты большие успехи по выделению и очистке индивидуальных иРНК эукариотов. иРНК находится в виде иРНП в полирибосомах цитоплазмы и из них выделяется. Индивидуальные полирибосомы могут быть выделены по биоспецифической идентификации. Например, полирибосомы, синтезирующие коллаген, выделяются по интенсивному включению меченого пролина, гидролизу этого белка коллагеназой. Из полирибосом иРНК выделяется в виде иРНП. Белки, входящие в состав рибонуклеопротеида, возможно, обладают активностью иницирующих факторов. иРНК выделяется из иРНП его депротеинизацией. Такие иРНК, как глобиновая, фибринозная, можно выделять из нефракционированного цитоплазматического клеточного экстракта. Выделение многих индивидуальных иРНК облегчается присутствием в них нетранслируемого поли(А), связанного с 3'-концом иРНК. При этом широко применяется сорбция поли(А) фрагмента на поли(У) иммобилизованных на стекловолокнистых фильтрах, на целлюлозе, сефарозе и т. д.

Идентификация иРНК, степень ее обогащения и гомогенности определяется по молекулярной массе; гомогенности нуклеотидных последовательностей изучением кинетики гибридизации; сопоставлением последовательностей нуклеотидов иРНК и последовательностей аминокислот в кодируемой ею полипептидной цепи; по структуре 5'- и 3'-концевых последовательностей; по синтезу кодируемых полипептидных цепей в бесклеточной белоксинтезирующей системе. Рибосомальная и информационная РНК являются высокомолекулярными полимерами и этим отличаются от транспортных РНК.

Второй стадией биосинтеза белка является *собственно трансляция*. В начале 50-х годов Р. Замечник с сотрудниками с помощью меченых атомов установил, что биосинтез белка протекает в рибонуклеопротеидных частицах. Эти частицы Э. де Робертс назвал рибосомами. Количество и состояние рибосом заметно изменяется в зависимости от внешних условий. Например, при магниевом голодании рибосомы в клетках не образуются и синтез белка приостанавливается.

В бактериальной клетке рибосомы являются свободными; диаметр их 170—200 Å, молекулярная масса $2,7 \cdot 10^6$, константа седиментации 70S. У высших организмов рибосомы связаны с мембраной эндоплазматической сети. После разрушения клетки рибосомы можно выделить, очистить дифференциальным центрифугированием и вести на них синтез белка *in vitro*. Рибосомы должны быть отмыты от белков центрифугированием и раствором хлористого аммония. Если необходимо освободиться от собственной иРНК, то рибосомы сначала надо проинкубировать и нагрузить их участием в биосинтезе белка. В настоящее время получено несколько высокоэффективных бесклеточных систем из клеток бактерий и эукариотов, в частности, на основе рибосом зародышей пшеницы.

Белоксинтезирующие бесклеточные системы могут состоять из высокоочищенных фракционированием компонентов; из нефракционированных экстрактов, стоящих ближе к нативной белоксинтезирующей системе клетки, различных тканей; из бесклеточных систем, которые транслируют экзогенные иРНК и могут служить для изучения экспрессии генов, составления генетических карт и т. п. Более быстрый синтез полипептидных цепей протекает в белоксинтезирующей системе, в которой рибосомы, иРНК и другие факторы имеют одно происхождение. Оптимальными условиями функционирования белоксинтезирующей системы *in vitro* являются: рН среды, близкая к нейтральной, ионы Mg^{2+} , в концентрации от 2,0 ммоль до 5,0 ммоль, которые необходимы для сохранения определенной структуры рибосом, их функционирования; одновалентные катионы K^+ или NH_4^+ ; гуанозинтрифосфат как аллостерический эффектор связывания компонентов белоксинтезирующей системы, а после расщепления обуславливающий высвобождение компонентов рибосомы. По молекуле ГТФ расщепляется на стадии инициации

и терминации и две молекулы на стадии элонгации. ГДФ является ингибитором трансляции, так как имеет большое сродство с факторами инициации и элонгации. Поэтому он постоянно регенерирует до ГТФ нуклеозиддифосфаткиназой. В состав белоксинтезирующей системы вводится АТФ для активации аминокислот и образования аминоацил-тРНК, а также фосфорилирования ГДФ, что обеспечивает высокое отношение ГТФ/ГДФ; креатинфосфат и креатинкиназа или фосфоенолпируват и пируваткиназа — для регенерации АТФ; цитидинтрифосфат, который необходим для восстановления тРНК-нуклеотидилтрансферазой ЦЦА-последовательности на 3'-конце тРНК, если триплет деградировал при получении бесклеточных экстрактов; SH-соединения для поддержания у эукариотов активности трансферного фактора и фактора инициации M1, которые чувствительны к окислению.

Основным компонентом белоксинтезирующей системы являются аминокислоты. Обычно хроматографией освобождаются от эндогенных аминокислот, а затем они вносятся в систему в соответствующих количествах. Меченой берется та аминокислота, которая более часто представлена в данной полипептидной цепи. Например, для глобина берут лейцин, для коллагена — пролин и т. д. Инкубация белоксинтезирующей системы обычно проводится при 25—30° С и продолжается около 30 мин, когда в ней инициация не происходит. При синтезе полифенилаланина на поли(У) — до 30—45 мин и от одного до двух часов, когда в системе происходит инициация *in vitro*. Если имеется нефракционированная белоксинтезирующая система, которая является супернатантом в результате центрифугирования гомогената клеток при 10 000—30 000g, то в ней представлены все необходимые компоненты для синтеза полипептидной цепи.

Результаты, полученные при работе с белоксинтезирующими системами *in vitro*, надо с осторожностью переносить на условия в клетке. Это зависит от того, что в нативную белоксинтезирующую систему входит большое количество различных молекул белков и рибонуклеиновых кислот и нарушается согласованность в их действии. Кроме этого, *in vitro* снижается концентрация компонентов системы, нарушается их пространственная организация; соотношение между макромолекулярными компонентами; теряется при приготовлении ряд низкомолекулярных компонентов.

Более полно изучены функции рибосомы бактерий 70S и эукариотов 80S. Рибосомальные РНК животных представлены двумя формами. 18S РНК имеет молекулярную массу $0,7 \cdot 10^6$ и находится в малой 40S субъединице рибосомы. 28S РНК имеет молекулярную массу $1,8 \cdot 10^6$ и находится в большой 60S субъединице рибосомы. В большой субъединице рибосомы животных обнаружена 5S РНК, полинуклеотидная цепь которой содержит 120 нуклеотидов и 7S РНК, состоящая из 130 нуклеотидов.

Клетка *E. coli* содержит около 15 000 рибосом с массой одной рибосомы, равной 2 800 000 дальтон. Рибосомы содержат очень вы-

сокий процент сухого остатка, достигающий 50%, в 1,5—2 раза выше по сравнению с другими структурами клетки. Приблизительно 65% сухого остатка составляют рибонуклеиновые кислоты. 50S и 30S субчастицы 70S рибосомы бактерий выполняют свою функцию изменением степени связывания контакта между собой. Крайними состояниями контакта являются полная ассоциация или диссоциация субчастиц. Изменение степени контакта зависит от ионов магния и полиаминов, которые экранируют отрицательно заряженные фосфатные группы и изменяют силу отталкивания между субчастицами. На соединение субчастиц, видимо, оказывают влияние аминоацил-тРНК и пептидил-тРНК. 30S субчастица содержит РНК, в которой преобладают гуанин и цитозин, составляющие 55% суммарной молярности. Минорных оснований в ней в 4—10 раз меньше, чем в тРНК. До 65% нуклеотидов образуют двуспиральные участки, по которым идет взаимодействие с белками, связанными 16S РНК малой субъединицы. В состав 30S субъединицы входит 21 различных белок с основными свойствами. Из этих белков двенадцать выполняют важную функциональную роль, имеют сильное сродство с отдельными спиральными участками 16S РНК, что имеет большое значение при самосборке. В процессе самосборки белки 30S и 50S субъединиц узнают свои места на 16S и 23S РНК.

В основе образования и стабилизации структуры субъединиц рибосомы лежат нуклеиново-белковые и белок-белковые узнавания и взаимодействия. При этом в субъединице 30S между 4—5 белками и спиральными участками 16S РНК имеют место нуклеиново-белковые взаимодействия; они называются *глубинными* белками. Другие белки имеют меньшую специфичность связывания с РНК и вступают в белок-белковые взаимодействия; их называют *поверхностными* белками. Субчастица 30S реконструируется из ее составных компонентов и обладает функциональной активностью. Большая субъединица 50S состоит из двух молекул РНК — 23S и 5S и 34 белков, которые, в отличие от белков 30S, имеют кислую реакцию. Эта субъединица меньше изучена. 5S РНК, видимо, необходима для сборки большой 50S субъединицы и взаимодействия последней с тРНК. Это вытекает из того, что тРНК содержит последовательность Г—Т—ψ—Ц—Г, которая комплементарна с одной из последовательностей 5S РНК. На 50S субъединице из 34 белков только 8 имеет специфические нуклеиново-белковые взаимодействия. Остальные белки участвуют в образовании структуры 50S субъединицы на основе белок-белкового взаимодействия. На 50S субъединице имеется несколько активных участков: пептидильный, трансферазный, транслочазный.

Процесс биосинтеза белковой молекулы в рибосоме еще полностью не раскрыт. Мы еще всего не знаем о механизме функционирования рибосомы, особенно о механизме транслочации, который может быть полностью познан только на основе объяснения сущности механо-химических процессов биологического движения.

Процесс увеличения, наращивания полипептидной цепи на одно аминокислотное звено в рибосоме может быть представлен таким образом. На малой (30S) и большой (50S) субъединицах рибосомы микроорганизмов имеются по одному гнезду, рабочему месту, с помощью которых связываются транспортные РНК. На большой субъединице (50S) находится пептидилный участок для связывания пептидил-тРНК (П-участок). П-Участок не имеет сродства к свободной тРНК или аминоацил-тРНК и не связывается с ними. Малая субъединица (30S) имеет акцепторный или аминоацильный участок, на котором удерживается аминоацил-тРНК (А-участок). На 30S субъединице имеется зона связывания мРНК. В этой зоне имеется небольшой акцепторный участок, который вместе с кодоном способствует более прочному удержанию специфической, своей аминоацил-тРНК. Если этот акцепторный участок блокировать, повредить, то допускаются ошибки в связывании чужих аминоацил-тРНК и включении иных аминокислотных остатков в строящуюся полипептидную цепь.

Такое распределение рабочих мест на 50S и 30S субъединицах вытекает из следующих данных. В условиях низкой концентрации ионов магния (10^{-4} моль) рибосома расщепляется на 50S и 30S субъединицы. Информационная РНК выходит из комплекса, а пептидил-тРНК остается связанной с большой (50S) субъединицей. Кроме того, пептидилтрансфераза — фермент, катализирующий образование пептидной связи, остается на большой (50S) субъединице. И, наконец, при взаимодействии комплекса, состоящего из 50S субъединицы и пептидил-тРНК с пуромицином, образуется пептидная связь. Пуромицин присоединяется к пептидной цепи вместо тРНК, которая при этом высвобождается. На каждой субъединице сорбируется только по одной молекуле тРНК. Сорбция является обратимой с константой диссоциации на большой субъединице — $3 \cdot 10^{-8}$ моль, а на малой — $7 \cdot 10^{-7}$ моль. Оба этих рабочих места на интактной рибосоме служат для удержания двух молекул транспортной РНК, одна из которых связана с недостроенной пептидной цепью (пептидил-тРНК), а вторая — с активированной аминокислотой (аминоацил-тРНК). Оба участка находятся друг от друга на расстоянии молекулярных размеров. Это способствует молекулам тРНК занимать правильное, точное положение в пространстве по отношению к пептидилтрансферазе, при передаче аминокислотного остатка и его присоединении к полипептидной цепи. Связывание транспортных РНК с рибосомами без информационных РНК не избирательно, тогда как в присутствии информационной РНК в каждом акте образуется только специфический строго определенный аминоацил-тРНК-комплекс.

Биохимия функционирования рибосомы изучена более полно. Рибосомы переходят в активное состояние только тогда, когда они соединены с информационной РНК. Биосинтез полипептидной цепи можно разделить на несколько процессов: инициация, рост (элонгация), завершение (терминация) (рис. 53).

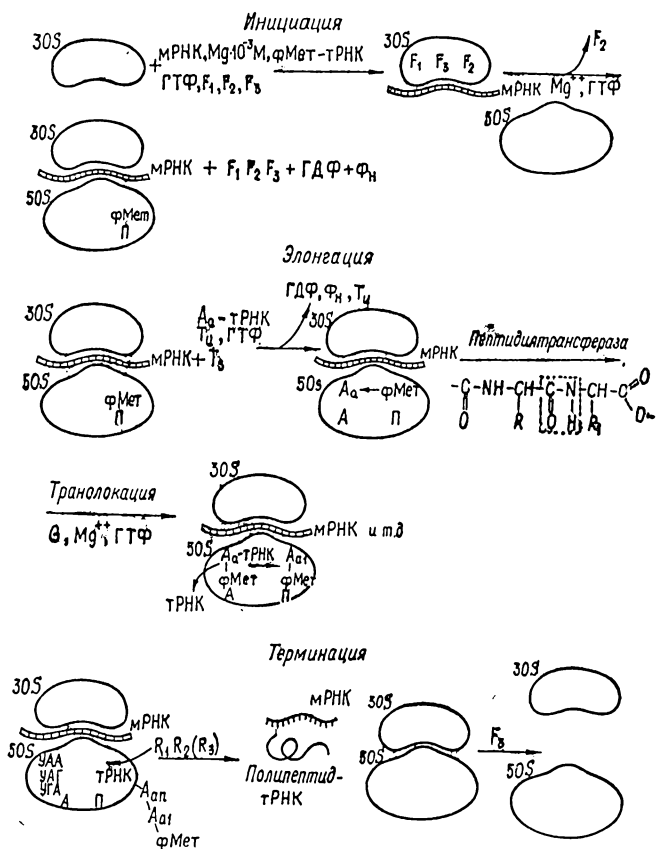


Рис. 53. Схематическое изображение процессов инициации, элонгации и термации синтеза белка на рибосомах.

В процессе *инициации* образуется иницирующий комплекс, который затем связывается с 50S субъединицей, и образуется функционально активная 70S рибосома. В этом процессе принимает участие три нерибосомных белка, три иницирующих фактора: F_1, F_2, F_3 , которые связываются с 30S субъединицей. Все три белка выделены и имеют молекулярную массу соответственно: 9000, 70 000 и 29 000. Затем образуется иницирующий комплекс, который состоит из 30S субъединицы, формилметионил-тРНК, мРНК. Образование этого комплекса осуществляется с помощью этих же трех иницирующих белков — F_1, F_2, F_3 и ГТФ. Функционально активная рибосома 70S образуется также с участием этих белков, которые после выделяются в свободном состоянии и снова используются для инициации синтеза новых цепей. Таким образом, этап инициации заканчивается образованием функционально активной 70S рибосомы (полисомы), которая состоит из 30S и 50S субъединиц, формилметионил-тРНК, информационной РНК. Связывание мРНК

с 30S субъединицей осуществляется в присутствии Mg^{2+} (10^{-3} моль) и стимулируется факторами F_2 и F_3 . иРНК соединяется с 30S субъединицей с помощью соответствующей площадки, состоящей из 27 нуклеотидов. Основная роль рибосомальной РНК состоит в том, чтобы создать соответствующую трехмерную поверхность, по которой мРНК могла бы скользить вдоль рибосомы.

Синтез полипептидной цепи начинается с формилметионина. Формильный остаток блокирует аминогруппу первой аминокислоты, выполняет, видимо, роль пептидила и этим обеспечивает связь первой аминокислоты с П-участком 50S субъединицы рибосомы. Первыми кодонами любой информационной РНК поэтому являются АУГ и ГУГ, т. е. те, которые связывают формилметионин. Возможно, что этим двум триплетам предшествуют другие короткие последовательности, которые способствуют узнаванию и взаимодействию между мРНК и 30S субъединицей. Предполагается, что взаимная ориентировка определяется также третичной структурой начальной области мРНК и соответствующей структурой на поверхности 30S субъединицы. На синтетических матрицах для инициации не обязательно присутствие формилметиониновых кодонов. В образовании иницирующего комплекса (мРНК, 30S субъединица, формилметионин) принимает непосредственное участие и временно входит в состав белок F_2 , который затем замещается 50S субъединицей, и формилметионил-тРНК оказывается в П-участке этой субъединицы. Для удаления белка F_2 затем необходимо расщепление ГТФ.

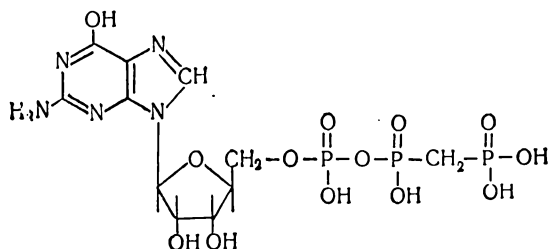
Процесс *элонгации* протекает в функционально активной рибосоме (70S рибосома, мРНК, формилметионил-тРНК). Вновь поступающий аминоацил-тРНК соединяется с аминоацильным участком (А-участок) на 30S субъединице, который расположен рядом со следующим кодоном на мРНК. Для осуществления этого процесса необходим ГТФ и цитоплазматический, нерибосомный белок-фактор EF—Т, который выделен в чистом виде и диссоциирует на две субъединицы T_u и T_s .

T_u является лабильным белком с молекулярной массой 42 000, содержит активную SH-группу и имеет сродство с ГТФ. T_s -белок с молекулярной массой 19 000. Образуется комплекс T_u -ГТФ, он взаимодействует с аминоацил-тРНК. При участии белка T_s образуется комплекс аминоацил-тРНК — T_u -ГТФ, который взаимодействует с А-участком рибосомы иницирующего комплекса. В результате аминоацил-тРНК присоединяется к А-участку рибосомы, белок T_u освобождается, а ГТФ расщепляется на ГДФ + P_i . Факторы T_u и T_s освобождаются и затем используются повторно. Затем аминогруппа аминоацил-тРНК соединяется с карбоксильной группой С-концевого аминокислотного остатка пептидил-тРНК. По механизму нуклеофильного замещения образуется пептидная связь. Освобождается тРНК. Но она остается связанной с пептидным участком (П-участок) рибосомы. Удлинившаяся на одну аминокислоту пептидил-тРНК оказывается связанной с амино-

ацильным участком (А-участок) 30S субъединицы. Образование пептидной связи происходит за счет энергии сложной эфирной связи аминоацил-тРНК, которая в ней была аккумулирована еще при образовании из аминокислотамида. Но эта реакция активируется белком пептидилтрансферазой. Предполагается, что в образовании пептидной связи принимают участие и другие ферменты.

Основным процессом роста полипептидной цепи является *транслокация*, когда совершаются механо-химические изменения. Этот процесс отличается большой сложностью, осуществляется в результате конформационных изменений, происходящих в 50S субъединице рибосомы за счет энергии расщепления ГТФ, и состоит в следующем. Удлинившаяся на одну аминокислоту пептидил-тРНК остается в А-участке около комплементарного кодона мРНК. В таком состоянии аминокислот-тРНК теряет сродство к А-участку на 30S субъединице, происходит транслокация. Пептидил-тРНК перемещается из аминокислотного в пептидный участок и вытесняет освободившуюся тРНК. Новая пептидил-тРНК переходит на П-участок 50S субъединицы, а мРНК смещается на один кодон и освобождает А-участок на 30S субъединице, куда должен «сесть» следующий аминокислот-тРНК. В процессе транслокации принимает участие специфический нерибосомный белок (фактор EF—G). При совместном его действии с рибосомным фактором расщепляется ГТФ на ГДФ и P_i . Действие EF—G проявляется только в присутствии прочно связанного рибосомного фактора. Роль EF—G-фактора полностью не выяснена. Но она, видимо, состоит в том, что присутствие этого белка и рибосомного фактора необходимо для расщепления ГТФ. Транслокация сопровождается изменением конфигурации 50S субъединицы и некоторым движением, раздвиганием субчастиц. Новая пептидил-тРНК стабильно удерживается П-участком 50S субъединицы и соединена с кодоном. Он передвигается вместе с мРНК, которая скользит по поверхности рибосомы и смещается на один триплет в направлении $3' \rightarrow 5'$. При этом А-участок на 30S субъединице освобождается и на него может акцептироваться следующий аминокислот-тРНК.

После акта транслокации G-фактор и образовавшиеся ГДФ и P_i выходят из рибосомы. Транслокацию можно остановить, если исключить G-фактор или ГТФ или отравить транслоказу фусидовой кислотой, или заменить ГТФ его аналогом — 5'-гуанозилметилendifосфатом:



В процессах взаимодействия транспортных РНК с рибосомами, по-видимому, существенную роль выполняет ЦЦА-концевая последовательность, характерная для всех тРНК.

Работы А. С. Спирина показывают, что трансляция осуществляется и неэнзиматически, без участия рибосомного фактора EF-G и ГТФ. Без этих факторов он наблюдал интенсивное образование полифенилаланина на полиуридилевой кислоте. Поэтому, видимо, расщепление ГТФ не является источником энергии. Роль ГТФ как компонента системы биосинтеза белка остается полностью невыясненной. Большой интерес представляют исследования по неэнзиматической трансляции с нативными мРНК.

Затем следует процесс *терминации (завершения)*. Таким образом, полипептидная цепь растет до тех пор, пока при продвижении вдоль мРНК рибосома не достигнет одного из терминирующих нонсенс-кодонов — УАА, УАГ, УГА. Причем на месте обрыва полипептидной цепи всегда стоят подряд два бессмысленных кодона. Возможно, что это вызвано надежностью окончания процесса биосинтеза белка. Сигналы от этих кодонов с мРНК воспринимаются двумя вне ribосомными белками — так называемыми высвобождающими факторами R_1 и R_2 . Эти белки имеют молекулярную массу в пределах 44 000—47 000. Фактор R_1 узнает, воспринимает сигнал от УАА, УАГ-кодонов, а R_2 — от УАА, УГА-кодонов. После этого расщепляется сложноэфирная связь конечной полипептидил-тРНК. Освобождается полипептидная цепь; в этом принимает участие, видимо, трансферазный центр. Предполагается, что скорость высвобождения пептидной цепи повышается также белком S. Затем распадается комплекс рибосома — мРНК. 70S рибосома диссоциирует на 50S и 30S субъединицы. Все эти компоненты могут принимать участие в биосинтезе новой полипептидной цепи. По модели А. С. Спирина, 50S и 30S субъединицы сочленены подвижным шарниром. 30S («подносчик») отходит от 50S («носителя»), вращается на шарнире и акцептирует из внешней среды аминоацил-тРНК, соответствующая триплету на мРНК. Снова, вращаясь на шарнире, 30S подносит аминоацил-тРНК к растущей полипептидной цепи. В отделении мРНК от рибосомы принимают участие два фактора. Один уже известный фактор транслкации G, а второй термостабильный, мало еще изученный белок. Диссоциация рибосомы на 50S и 30S субъединицы осуществляется с помощью фактора F_3 , который принимает участие, как известно, и в процессе инициации биосинтеза белка. Предполагается, что часть информационной РНК и строящейся полипептидной цепи, которые находятся между субъединицами рибосомы и закрыты ими, являются недоступными и защищаются от действия рибонуклеазы и протеолитических ферментов. Таким образом, в процессе трансляции принимают участие девять различных белков: F_1 , F_2 , F_3 — как факторы инициации; T_u , T_s , G — как факторы элонгации и R_1 , R_2 , S — как факторы терминации. Отделенная от рибосомой РНК может участвовать в биосинтезе новых полипептидных цепей. После этого она разрушается с помо-

щью специальной рибонуклеазы V. Предполагается, что мРНК может участвовать в биосинтезе такого количества полипептидных цепей, которое соответствует числу нетранслируемых нуклеотидных последовательностей в ее терминальном участке. Это обусловлено тем, что при каждой трансляции от мРНК отрывается по одной нетранслируемой последовательности.

Белоксинтезирующая система, таким образом, имеет очень сложное строение и состоит из большого числа различных белков, нуклеиновых кислот и других факторов. Несмотря на это система работает высокоэффективно. Например, в бесклеточной системе из микроорганизмов за минуту образуется полипептид из 500 аминокислотных остатков. Для своего функционирования эта система требует достаточно большого притока энергии, которая расходуется не столько на образование пептидной связи, сколько на другие процессы трансляции. На образование одной полипептидной связи расходуется энергия приблизительно в $91,7 \cdot 10^3$ Дж. Это очень высокий расход энергии для клетки. Но он, видимо, окупается точностью и надежностью системы трансляции генетической информации.

В связи с энергетикой трансляции заслуживает внимания неэнзиматическая трансляция при синтезе гомополимера полифенилаланина, которая протекает в присутствии параклормеркурибензоата при исключении ГТФ. Биосинтез белка у эукариотов в схеме остается таким же, как и у прокариотов. Некоторые различия состоят в том, что субъединицы рибосомы 80S у эукариотов имеют размеры 40S и 60S. Трансляция более чувствительна и легче подавляется хлорамфениколом у микроорганизмов и циклогексимидом — у высших организмов.

Рибосомы каким-то образом оказывают влияние на правильность считывания генетической информации и включение аминокислот в полипептидную цепь. Например, рибосомы из *E. coli* в зависимости от условий «допускали ошибки» (так называемое ложное кодирование) при включении аминокислот в процессе биосинтеза белка. Возможно, что при неблагоприятных условиях изменяется комплементарность оснований кодона-антикодона из-за конформационных изменений в рибосоме, ведущих за собой возмущения в матрице: ложное кодирование, включение одним кодоном нескольких аминокислот (например, УУУ включает наряду с фенилаланином также серин, тирозин, валин, лейцин, изолейцин). Этот процесс ускоряется рядом факторов — стрептомицин, этанол, понижение температуры, рН среды, ионы Mg^{2+} и др. Если ложное кодирование возрастает, то клетка может погибнуть. При ложном кодировании в рибосоме возрастает искажение во взаимодействии между кодоном и антикодоном, и это приводит к включению другой аминокислоты. Если между кодоном и антикодоном осуществляется взаимодействие на основе трех нуклеотидов, то кинетика ассоциации кодон-антикодон очень высока, возможность ложного кодирования падает. Если аминокислота удерживается на основе взаимодействия двух

нуклеотидов, то кинетика ассоциации кодон-антикодон низкая, возможность ложного кодирования возрастает. Кроме этого, чем быстрее идет включение аминокислот в полипептидную цепь, тем ложное кодирование больше возрастает.

Возможно, что состояние рибосом меняется в зависимости от процесса биосинтеза белка. Они диссоциируют, когда синтез белка заканчивается и субъединицы находятся в свободном состоянии. Когда же захватывается информационная РНК перед началом синтеза полипептидной цепи, субъединицы воссоединяются. А. С. Спирин подверг рибосомы диссоциации на РНК и белки. Последние затем были расфракционированы электрофорезом в полиакриламидном геле. Из большой субъединицы (50S) выделено 34 разных белка, из малой (30S) — 21 белок. В присутствии РНК и всех рибосомных белков осуществляется самосборка субъединиц рибосомы. Каждый белок строго соединяется со своим участком на полинуклеотидной цепи РНК. При этом восстанавливается биологическая функция субъединиц. Исходя из этого можно утверждать, что в нативных условиях в клетке рибосомы формируются путем самосборки. Единичные рибосомы (моносомы) обладают низкой активностью синтеза белка. Поэтому активный процесс биосинтеза белка протекает в рибосомах, которые сгруппированы числом до 20 и более в виде цепочки на одной линейной матрице с одинаковым расстоянием друг от друга. Рибосомы в таком состоянии называются *полисомами*.

В процессе биосинтеза белка рибосомы перемещаются вдоль полинуклеотидной цепи информационной РНК и считывают заключенную в ней информацию об очередности аминокислот в полипептидной цепи. Несколько десятков рибосом одновременно находятся на одной линейной матрице. Одни, после того как окончен синтез полипептидной цепи, сходят с матрицы, другие с противоположного конца начинают биосинтез новой цепи белка. Процесс биосинтеза белка у бактерий начинается сразу после образования информационной РНК, к которой тут же присоединяются рибосомы. В клетках высших организмов этот процесс не может начаться сразу, так как рибосомы и информационная РНК отделены друг от друга ядерной мембраной, нуклеоплазмой и цитоплазмой.

Подсчитано, что на одну рибосому, находящуюся на матрице, приходится две молекулы транспортной РНК. Это соответствует рассмотренному выше циклу биосинтеза белка в рибосоме. Остроумно и убедительно был решен вопрос о направлении движения рибосомы вдоль матрицы, т. е. направление считывания кода. Для этого синтезировали матрицы из нескольких нуклеотидов, составляющих определенные триплеты. На этих коротких матрицах получали в модельных опытах соответствующие олигопептиды. Например, на гексануклеотидной последовательности, состоящей из двух триплетов ААА и УУУ, в бесклеточной системе всегда синтезировался дипептид лизилфенилаланин. Но не был обнаружен фенилаланиллизин. На основании этого прямого эксперимента окон-

информационной РНК, заложенной в полисомах; синтез фибрина белка наступает через несколько дней после активного накопления информационной РНК, которая является долгоживущей. Биосинтез этого белка не зависит от актиномицина Д, подавляющего биосинтез РНК на ДНК-матрице. Имеются и другие не совсем ясные положения в процессе биосинтеза белка.

Поэтому нерешенным остается вопрос о возможности существования других путей биосинтеза белка, отличных от общепризнанных, с иными механизмами регуляции. Это следует также из того, что отмечены случаи, когда образовавшаяся очень длинная полипептидная цепь затем расщепляется и из нее образуется несколько различных белков. Это отмечено при образовании инсулина, молекула которого состоит из двух полипептидных цепей, возникших вследствие удаления фрагмента из середины единственной полипептидной цепи. Такая картина наблюдается при образовании различных вирусоспецифических белков, которые возникают из одной полипептидной цепи синтезируемой на РНК вируса полиомиелита. Из этого следует, что, видимо, существует иной способ синтеза молекулы белка, который является более экономичным, так как при этом нет нужды в затратах на повторные инициации и терминации. Установлены пути биосинтеза пептидной цепи без матричной РНК, которые отличаются от выше описанного рибосомного пути. Например, полипептиды, которые входят в клеточные стенки ряда бактерий и содержат некоторые *D*-аминокислоты, синтезируются в отсутствие рибосом и матричной РНК. При биосинтезе циклического декапептида грамицидина, содержащего некоторые аминокислоты также в *D*-форме, процессы инициации, элонгации, терминации и циклизации осуществляются с помощью ферментов, которые входят в сложную мультиферментную систему.

Имеется большое количество разнообразных ингибиторов, с помощью которых можно в известной мере управлять этапами трансляции и биосинтеза различных белков.

17. Регуляция биосинтеза белка. Изучение механизма регуляции биосинтеза белка в клетке является одной из самых важных проблем молекулярной биологии. Важность этой проблемы вытекает из многих биологических явлений. Например, микроорганизмы очень быстро приспосабливаются к изменившимся условиям; у высших организмов имеется строгая последовательность процессов роста, дифференциации клеток и формообразования во времени и пространстве; наследственные заболевания, строгая координация и последовательность многочисленных реакций и процессов; экономичность в расходовании веществ и энергии живой клеткой; опухолевая трансформация и многие другие биологические явления объяснимы только с точки зрения регуляции биосинтеза белка.

Как было сказано, в нуклеотидной последовательности ДНК заложена информация для биосинтеза всех белков. При этом большая часть генетической информации, заключенной в ДНК, заре-

прессирована, т. е. не реализуется в процессах биосинтеза белка. Таким образом, из поколения в поколение передается не только генетическая информация, но и система, которой она управляется. В связи с этим возникает вопрос, почему же в клетке непрерывно не идут процессы биосинтеза всех запрограммированных белков, белков-ферментов, а синтезируются только те, которые нужны клетке в данный момент. Мы еще далеки от понимания полной картины регуляции биосинтеза белка. Основным звеном в регуляции биосинтеза белка является информационная РНК. От подавления или активации биосинтеза мРНК, от скорости ее образования, продолжительности жизни, скорости распада будет зависеть динамичность регуляции биосинтеза белка. У бактерий мРНК быстро синтезируется и живет минуты или десятки минут. У многоклеточных мРНК живет часы или несколько суток или имеются мРНК долгоживущие. Наиболее короткоживущей мРНК у многоклеточных является мРНК гистонов, которая живет только в течение S-фазы митотического цикла.

Наиболее приемлемое объяснение регуляции биосинтеза новых белков, белков-ферментов, основывается на гипотезе оперона Ф. Жакоба и Ж. Моно, которую они создали в 50-х годах на основе генетических исследований на микроорганизмах. В основе этих представлений лежит индукция и репрессия биосинтеза белков-ферментов. Индуцибельный фермент может присутствовать в микробной клетке в следовых количествах, но при соответствующих условиях (изменение источника питания и др.) его содержание резко возрастает. Например, если *E. coli* дать вместо обычного источника питания глюкозы лактозу, то она в больших количествах синтезирует белок в β -галактозидазу. В этом случае мы имеем пример индукции биосинтеза фермента.

Ф. Жакоб и Ж. Моно детально изучили индукцию β -галактозидазы и сформулировали гипотезу оперона о природе регуляторных процессов (рис. 54). Было установлено, что на генетической карте *E. coli* имеется три участка нуклеотидной последовательности, которые оказывают влияние на биосинтез β -галактозидазы. Первый участок называется *структурным*, так как мутации в этом участке изменяют первичную структуру белка β -галактозидазы, изменяется аминокислотная последовательность и активность белка. Второй участок называется *регуляторным*. Эта последовательность молекулы ДНК *E. coli* кодирует биосинтез продукта, который ингибирует транскрипцию структурного участка. Третий участок *операторный*. Он регулирует считывание генетической информации со структурного участка. Если мутация наступает на регуляторном участке, то ингибирование транскрипции структурного участка становится невозможным. В результате этого биосинтез β -галактозидазы идет независимо от того, присутствует или отсутствует индуктор. Регуляторный участок молекулы ДНК *E. coli* кодирует синтез продукта, который диффундирует и может достигать любого структурного участка независимо от его локализации в ДНК, хромосоме.

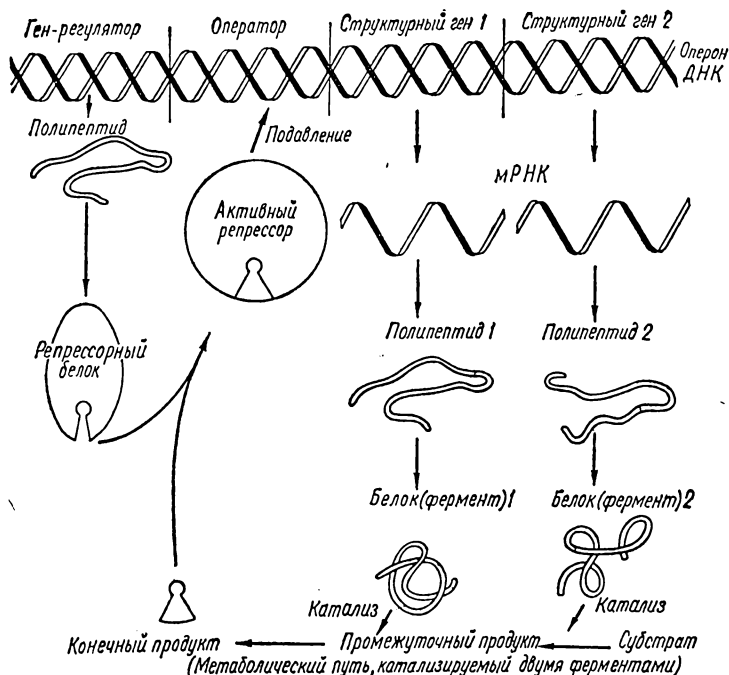


Рис. 54. Схема регуляции белкового синтеза (по Ф. Жакобу и Ж. Моно).

Таким образом, гипотеза оперона объясняет взаимосвязь в действии структурных и регуляторных последовательностей ДНК. Основным процессом является репрессия биосинтеза ферментов, а индукция наступает при снятии репрессии, т. е. тогда, когда регуляторный участок или продукт, синтез которого им контролируется, является неактивным и не репрессирует структурный участок. Исходя из этого, индукция биосинтеза белка β -галактозидазы осуществляется следующим образом. Если репрессор соединен с оператором, то он поддерживает его в заблокированном неактивном состоянии. Но репрессор в данном случае взаимодействует своим аллостерическим участком с субстратом (лактозой) и изменяет свою структуру и связь с оператором. Таким образом, субстрат, взаимодействуя с репрессором, включает оперон, и начинается наработка ферментов, которые атакуют субстрат. Когда последний будет полностью расщеплен, репрессор снова будет блокировать оператор, и синтез белков-ферментов прекращается. Но если в среде присутствуют все 20 аминокислот, из которых *E. coli* синтезирует белок, и экзогенно ввести еще одну из аминокислот, то прекращается образование ферментов, которые катализируют биосинтез этой аминокислоты. Этот пример демонстрирует репрессию биосинтеза фермента. Репрессии может подвергаться также группа ферментов.

Биосинтез индуцибельного фермента может подавляться путем катаболитной репрессии. Например, если в питательной среде будут присутствовать и глюкоза, и лактоза, то глюкоза как более легко используемый субстрат, катаболит будет подавлять биосинтез β -галактозидазы. Отсюда репрессия биосинтеза белка-фермента протекает таким образом. Регуляторный участок выдает информацию о биосинтезе белка-репрессора. Белок-репрессор с рибосомы поступает на тот структурный участок ДНК, который кодирует биосинтез фермента, контролируемого белком-репрессором. Белок-репрессор имеет центр узнавания и связывания с участком ДНК, который находится рядом со структурным участком. Этот участок связывания ДНК с белком-репрессором называется оператором. Оператор отличается от структурного и регуляторного участка и в хромосоме расположен таким образом, что контролирует транскрипцию отдельных сегментов с определенной функцией. Если оператор связывается с белком-репрессором, то подавляется транскрипция структурного участка и репрессируется биосинтез соответствующего фермента.

Как же протекает репрессия синтеза фермента конечным продуктом. В этом случае репрессор в обычном, свободном состоянии не активен и не взаимодействует с оператором. Когда репрессор взаимодействует с конечным продуктом, он переходит в активное состояние, связывается с оператором и тормозит транскрипцию структурного участка. Если белок-репрессор взаимодействует с индуктором, то он становится неактивным, начинается транскрипция структурного участка и биосинтез белка. Белок-репрессор имеет два участка, с помощью которых он связывается с индуктором и оператором. Участок связывания с оператором находится в активном состоянии только тогда, когда участок связывания с индуктором является свободным.

Таким образом, допускается существование двух типов белков-репрессоров для индукции и репрессии транскрипции. Но каждый тип белка-репрессора имеет по два участка связывания. Одним из них репрессор связывается с операторным участком. Но имеются случаи, когда один репрессор подавляет биосинтез нескольких ферментов — *координированная репрессия*. Например, гистидин подавляет биосинтез сразу десяти ферментов. Гистидин активным становится в виде гистидил-тРНК. Подавление синтеза всех ферментов цепи реакций одного цикла отмечено на ряде других оперонов. На лактозном опероне подавляется биосинтез трех ферментов, галактозном — трех, лейциновом — четырех, триптофановом — пяти, аргининовом — восьми. Наоборот, в ряде случаев один индуктор вызывает синтез нескольких ферментов — *координированная индукция*. Например, у *E. coli* метил- β -D-галактозид индуцирует биосинтез β -галактозидазы, β -галактозидпермеазы и β -тиогалактозидтрансацилазы. Каждый из этих трех ферментов кодируется своим структурным участком. Все три структурных участка составляют оперон. Таким образом, под опероном мы понимаем группу

структурных участков ДНК, взаимосвязанных и согласованно включаемых или выключаемых одним индуктором и репрессором.

В ряде случаев структурные гены одного оперона находятся на определенном отдалении друг от друга в различных участках хромосомы, и остается неясным, как осуществляется в этом случае регуляция биосинтеза белка. Ряд оперонов уже подробно изучен. Например, хорошо изученным является Лас-оперон, который состоит из трех генов, контролирующих гидролиз и транспорт β -галактозидов.

Одним из центральных вопросов регуляции биосинтеза белка является выделение репрессора и изучение его химического строения. В последнее время выделен ряд репрессоров: репрессоры синтеза аргинина, триптофана, Лас-оперона и др. Репрессор Лас-оперона *E. coli* является термолабильным белком, с молекулярной массой, равной 150 000, состоящей из четырех субъединиц. Взаимодействие этого белка с Лас-операторным участком ДНК *E. coli* отличается высокой константой ассоциации $2 \cdot 10^{-10}$ моль. Этот белок имеет сродство к последовательности зоны оператора ДНК и к субстрату, которые атакуются ферментами, образование которых контролируется структурными генами Лас-оперона. Репрессорный белок метилится 35S по метионину и цистеину и смешивался с ДНК *E. coli*, которая содержала последовательности, кодирующие биосинтез β -галактозидазы. ДНК вступала во взаимодействия с репрессорным белком и метилась 35S. В случае, когда ДНК была с дефектным оператором, она не вступала во взаимодействие с репрессорным белком. То же самое наблюдалось, когда в опыт была взята денатурированная ДНК.

Во взаимоотношении между репрессором и оператором большое значение имеет нуклеиново-белковое узнавание. Было изучено расположение аминокислотных остатков в N-конце Лас-репрессора и возможность образования ими водородных связей с основаниями оператора. Установлено, что белок-репрессор своими аминокислотными остатками (с 17 по 29) с помощью гидроксильных, амидных, карбоксильных групп может образовать 6—7 водородных связей с кетоаминогруппами только восьми пар оснований оператора. Кроме этого, могут образовываться ионные связи между остатками основных аминокислот и фосфорильными группами ДНК.

Таким образом, мы приближаемся к пониманию процессов репрессии и дерепрессии на молекулярном уровне. Как правило, белки-ферменты, кодируемые различными участками ДНК одного оперона, синтезируются в равных количествах. Но есть случаи, когда это правило не сохраняется. Например, при трансляции мРНК Лас-оперона β -галактозидазы может синтезироваться в 25 раз больше, чем β -тиогалактозидтрансацилазы. Механизм регуляции биосинтеза белков-ферментов одним опероном в неэквивалентных соотношениях остается непонятным. Функционирование Лас-оперона из *E. coli* было воспроизведено *in vitro*; при введении

в систему Лас-оперона, РНК-полимеразы, σ -фактора, репрессора и предшественников синтеза РНК шел процесс биосинтеза мРНК.

Установлено, что в регуляции транскрипции ряда оперонов большое значение имеет комплекс между цАМФ и ЦРБ (специальный белок-рецептор цАМФ). Транскрипция подавляется, если этот комплекс отсутствует. Рецепторный белок (ЦРБ) обладает основными свойствами, имеет молекулярную массу 44 000, по 22 000 в каждой субъединице. Имеет высокое сродство к цАМФ и при соединении с последним приобретает способность взаимодействовать с промотором, изменяет его структуру и ускоряет транскрипцию. Комплекс цАМФ—ЦРБ является, по-видимому, универсальным активатором транскрипции бактериальных оперонов, но содержание самого цАМФ также регулируется аденилциклазой и фосфодиэстеразой. Аденилциклаза у бактерий находится в мембранах и ее активация различными соединениями вызывается, видимо, аллостерическими переходами в ее молекуле. У высших организмов цАМФ является основным компонентом механизма регуляции с помощью гормонов и, возможно, других веществ с высокой биологической активностью.

Регуляция биосинтеза белка у микроорганизмов осуществляется также с помощью белков, так называемых σ -факторов, которые изменяют специфичность РНК-полимеразы. Например, у *B. subtilis* при переходе к спорообразованию исчезает σ -субъединица, модифицируется β -субъединица и появляется новая белковая частица, возможно, новый σ -фактор. В результате повышается транскрипция крупных рибосомальных цистронов ДНК. Механизм регуляции биосинтеза белка, изученный на микроорганизмах, в своей основе, видимо, может быть приложен с некоторыми особенностями и спецификой к высшим организмам и вирусам. Наиболее простая система регуляции транскрипции и трансляции представлена у РНК-фагов *E. coli* — R17, MS2 и др. Их нуклеотидная последовательность представлена участками, которые кодируют биосинтез трех белков: РНК-репликазы, белок оболочки, белок созревания. Фаговая РНК в клетке *E. coli* обеспечивает биосинтез РНК-репликазы, что способствует быстрому увеличению биосинтеза РНК-фага, а также белков оболочки и белков созревания. Этот процесс приобретает автокаталитический характер.

Белок оболочки выступает в роли регулятора. По достижении соответствующей концентрации он приостанавливает репликацию фаговой РНК. Регуляция осуществляется также наличием инициаторных участков перед цистронами РНК-фага, которые кодируют синтез белков РНК-репликазы, оболочки и созревания. Инициаторные участки имеют различное сродство с рибосомой, которое более выражено у участка (цистрона) белка оболочки. Поэтому последний синтезируется раньше, быстрее и выполняет роль регулятора. У Т-четных фагов *E. coli* (фаг Т4) последовательность транскрипции ДНК вируса регулируется с помощью субъединицы σ , входящей в состав РНК-полимеразы. Эта субъединица

изменяется и обуславливает изменение сродства РНК-полимеразы к соответствующим промоторам ДНК, с которых начинается биосинтез РНК. После инъекции ДНК-фага в *E. coli* σ -фактор РНК-полимеразы клетки-хозяина имеет сродство только к тем промоторам ДНК-фага, которые кодируют синтез белков, нужных для начала развития фага. Затем образуются другие σ -факторы, уже вирусные, которые имеют сродство к другим промоторам ДНК фага, обеспечивающим синтез других вирусных белков. У нечетных фагов (ТЗ) транскрипция регулируется не образованием новых σ -факторов, а биосинтезом целой специфической молекулы новой РНК-полимеразы.

Система индукции и репрессии биосинтеза белков имеет место и у высших организмов, но функционирует иначе. Об этом свидетельствует такой факт. Например, у *E. coli* скорость биосинтеза белка β -галактозидазы может увеличиться за несколько минут в 1000 раз, тогда как у дрожжей — только в 10 раз.

Черты отличия регуляции биосинтеза белка у высших организмов обусловлены межклеточными взаимодействиями, дифференциацией клеток, очень большой долей, которую занимают регуляторные области в молекуле ДНК; преобладанием в ДНК многоцистронных оперонов и другими причинами. Регуляция процесса индукции и репрессии биосинтеза определенных белков у высших организмов лежит в основе дифференциации клеток. Все диплоидные соматические клетки имеют идентичный геном. Но в процессе клеточного деления, дифференциации и развития организма осуществляется и регулируется временная реализация генетической информации. В зависимости от того, какие гены находятся в активном состоянии (дерепрессированы) и какие гены репрессированы, синтезируются определенные белки, обуславливающие дифференцировку клеток, подчиненную выполнению ими специфической функции. Репрессоры биосинтеза белков, обуславливающих дифференциацию клеток, являются более устойчивыми, так как во многих случаях не удается получить дерепрессию белкового синтеза у узкоспециализированных клеток и добиться обратной их дедифференцировки.

Пока нам мало известно об этих устойчивых, постоянно действующих репрессорах белкового синтеза. Если исходить из того, что в клетках прокариотов отсутствуют гистоновые белки и они не способны к дифференциации, то можно допускать, что у эукариотов роль постоянных устойчивых репрессоров выполняют основные гистоновые белки. Успех дальнейшего изучения молекулярных основ дифференциации во многом зависит также от объектов исследования. Примером клеточной дифференцировки, основанной на регуляции индукции и репрессии биосинтеза белков, является быстрая иммунная ответная реакция плазматических клеток высших животных на воздействие антигеном. Она аналогична быстрой ответной реакции микроорганизмов на изменение внешних условий, особенно источников питания. Иммунная реакция возникла на поздних этапах эволюции.

Известно, что при введении в тело животного различных антигенов (различные макромолекулы) в нем вырабатываются различные антитела. Для каждого антигена вырабатывается свое антитело (белок), который отличается аминокислотной последовательностью. В роли антител выступают иммуноглобулины. У человека в крови имеется четыре класса этих белков. Из них более важным и изученным является класс G. Эти иммуноглобулины имеют молекулярную массу 150 000, молекула их состоит из двух тяжелых и двух легких цепей, соединенных с помощью дисульфидных мостиков. Эти белки имеют два центра связывания антигена и обладают необычной гетерогенностью, что делает трудным их разделение и идентификацию. Для связывания каждого антигена клетка синтезирует специфический иммуноглобулин.

В первичной структуре иммуноглобулинов имеются некоторые закономерности. У тяжелых и легких цепей их молекулы С-концевая (константная) половина имеет одинаковую, а N-концевая различную последовательность аминокислот. N-Концевая, переменная, половина молекул иммуноглобулинов служит местом связывания антигена. В переменной половине легких цепей различие достигает сорока аминокислотных остатков, что допускает практически неограниченное (20^{40}) разнообразие иммуноглобулинов. Оно объясняется клонально-селекционной гипотезой, которая находит экспериментальное подтверждение. Гипотеза состоит в том, что в организме имеется громадное разнообразие клонов антителообразующих клеток, в каждой из которых нерепрессированным остается участок нуклеотидной последовательности, несущий информацию синтеза только определенного антитела. Антиген взаимодействует со специфическим антителом на поверхности клеток определенного клона, которые начинают интенсивно делиться, и количество необходимого антитела возрастает. Образование множества различных антител может синтезироваться при участии нескольких генов, кодирующих константные и переменные части молекул антител. Из этих генов может создаваться множество различных комбинаций, каждая из которых кодирует биосинтез определенного антитела.

Сделано немало попыток, исходя из гипотезы оперона Ф. Жакоба и Ж. Моно, выяснить природу индукторов и репрессоров транскрипции у многоклеточных организмов. Но они пока не принесли положительных результатов. В роли специфических репрессоров транскрипции у высших организмов, по-видимому, могут выступать гистоны, хотя они обладают недостаточной гетерогенностью и разнообразием. Регуляторная роль гистонов может возрасти на основе увеличения их гетерогенности путем метилирования, ацетилирования и особенно фосфорилирования. Но имеются случаи, когда ацетилирование не коррелирует с изменением интенсивности транскрипции. Не установлено зависимости матричной активности ДНК от метилирования гистонов. Фосфорилирование, видимо, имеет большее значение в дерепрессии транскрипции. Установлена,

в частности, связь между фосфорилированием и появлением у гистонов тканевой специфичности. Репрессорная роль гистонов подтверждается другими данными. Например, в семядолях гороха синтезируется запасной глобулин. Если из семян выделить хроматин, то он осуществляет ДНК-зависимый биосинтез РНК в присутствии РНК-полимеразы из *E. coli*. Если добавить *in vitro* компоненты белоксинтезирующей системы, то образуется глобулин, характерный для семядолей гороха. Если взять хроматин из апикальной меристемы, то он не синтезирует *in vitro* глобулин. При удалении гистона хроматин из апикальной меристемы осуществляет биосинтез этого белка.

На животных объектах было установлено, что при удалении гистонов перевариванием трипсином и папаином активируется синтез РНК и белков. При добавлении гистонов эти процессы подавляются. В роли активаторов и ингибиторов транскрипции у высших организмов могут выступать негистоновые белки хроматина, так как они более гетерогенны, тканеспецифичны, определяют тканевую иммуноспецифичность хроматина. Но данные о регуляторной роли кислых негистоновых белков недостаточно определены. Можно говорить о сложных взаимоотношениях гистонов и кислых белков, в которые они вступают при регуляции транскрипции.

Возможно, что кислые белки взаимодействуют с соответствующими участками ДНК. Свободные участки ДНК занимают гистоны. Негистоновые кислые и гистоновые белки могут образовывать комплексы. Например, кислые белки взаимодействуют с ДНК образованием с основаниями водородных и других связей. Это взаимодействие облегчается тем, что фосфорильные группы ДНК экранированы гистонами.

Допускается, что регуляторные функции могут выполняться РНК на основе нуклеино-нуклеинового узнавания и их специфического взаимодействия с определенными участками ДНК. Это приводит к связыванию НК с ДНК, плавлению последней на определенном участке и инициации транскрипции. Выделены РНК, которые обладают особенно высоким сродством к гистонам, связывают их и активируют транскрипцию, т. е. предполагается, что активация или подавление транскрипции осуществляется РНК в комплексе с белками активаторами или репрессорами.

Допускается существование специальной хромосомной РНК, которую называют векторной РНК, или РНК-наводчиком. Эта РНК наводит на определенные участки ДНК белки-активаторы или репрессоры, которые сами по себе не могут определить специфические участки ДНК, но активируют или ингибируют транскрипцию.

Система регуляции биосинтеза белка у высших организмов может осуществляться, как и у микроорганизмов, также с помощью различных РНК-полимераз, специфичность связывания которых с промоторами ДНК определяется наличием различных σ -факторов. Установлены различные РНК-полимеразы. В нуклеоплазме РНК-полимераза транскрибирует все участки ДНК хроматина, кроме

рибосомальных, транскрипция которых осуществляется второй, специфической РНК-полимеразой ядрышка. Иной специфичностью обладает РНК-полимераза митохондрий.

Неспецифическая регуляция не только транскрипции, но и многих других процессов у высших организмов осуществляется также с помощью циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). Зависимой от цАМФ является активность протеинкиназ, которые фосфорилируют гистоны и другие белки. Протеинкиназы находятся в неактивном ассоциированном состоянии с белком (*R*-фактором). Под влиянием цАМФ *R*-фактор теряет сродство к протеинкиназе, происходит ее диссоциация и фермент становится активным, происходит фосфорилирование гистонов и дерепрессия транскрипции. При этом репрессию можно восстановить, если подействовать гистонфосфатазой, которая фосфат отщепляет только от гистонов. Содержание цАМФ в клетке, в различных ее частях регулируется ферментами, которые катализируют ее синтез (аденилциклаза) и расщепление (фосфодиэстераза); системой мембран, ограниченно проницаемых для цАМФ; повышением активности аденилциклазы многими гормонами, другими соединениями с высокой биологической активностью и снижением активности фосфодиэстеразы; повышением транскрипции последовательности ДНК, ответственной за синтез аденилциклазы, с помощью тироксина и других соединений, а также более высокой проницаемостью через мембрану и медленной деградацией таких производных цАМФ, как дибутирил-цАМФ, 3' 5'-циклотуберцидинфосфат. Изменение содержания цАМФ под воздействием гормонов и других соединений на активность аденилциклазы у высших организмов является, видимо, широко распространенным способом гормональной регуляции. Таким образом, цАМФ выступает как медиатор для большого числа гормонов и негормональных факторов. Гормоны через регуляцию содержания цАМФ, прежде всего изменением активности аденилциклазы, оказывают влияние на фосфорилирование гистонов, других белков и на те процессы, которые с этим связаны. Циклический аденозинмонофосфат каким-то образом вмешивается и в процессы деления клеток. При опухолевой трансформации содержание цАМФ в клетке уменьшается. Дибутирил-цАМФ в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ моль тормозит деление опухолевой клетки. С помощью цАМФ и его производных удается вызвать дифференциацию опухолевых клеток.

Система регуляции транскрипции, биосинтеза белка, как видно, у высших организмов является более сложной, чем у прокариотов, и осуществляется большим числом факторов, некоторые из которых были рассмотрены выше. Все эти факторы обуславливают и определяют начало считывания РНК-полимеразой генетической информации. Считывание структурных участков ДНК может наступить только тогда, когда все эти факторы позволят осуществиться транскрипции очень большого акцепторного, регуляторного участка, который находится между промотором и первым геном. Многие факторы, разрешающие и регулирующие транскрипцию у

высших организмов, остаются неизвестными и являются целью дальнейших исследований.

Регуляция биосинтеза белка может осуществляться также на уровне трансляции. Например, триптофан подавляет образование триптофансинтетазы в 50—160 раз, тогда как скорость биосинтеза соответствующей мРНК уменьшается всего в несколько раз, т. е. управление биосинтезом белка более быстро и эффективно на уровне трансляции.

У высших организмов регуляция биосинтеза белка на уровне трансляции изучена еще недостаточно. Несомненно, что у них механизмы этой регуляции трансляции более сложны, чем у прокариотов. Можно предполагать, что регуляция осуществляется гетерогенностью рибосом и возможной их специализацией к определенным мРНК.

Регуляторную роль в биосинтезе белка на уровне трансляции выполняют транспортные РНК. В условиях резких изменений в обмене веществ в клетке возникают структурные модификации изоакцепторных тРНК, что приводит к приостановке трансляции определенных кодонов иРНК. Прекращение трансляции определенных кодонов иРНК может наступить также в результате связывания некоторых определенных аминоксил-тРНК с соответствующими гормонами. Скорость биосинтеза разных белков, возможно, регулируется числом модулирующих кодонов иРНК и интенсивностью, скоростью взаимодействия с ними соответствующих тРНК, а также изменением синтеза формилметионил-тРНК, с которой начинается биосинтез полипептидной цепи. Регуляция на уровне трансляции осуществляется также путем адаптации тРНК и аминоксил-тРНК-синтетаз к синтезу специфических белков, что особенно наглядно видно на узкокодифференцированных, специализированных тканях. Эта адаптация приводит к образованию необходимых аминоксил-тРНК и изменению скорости биосинтеза белковой молекулы.

Можно считать, что специфичность метилирования тРНК также изменяет их участие в биосинтезе белка, возможность образования функциональных белков, которые могут играть важную роль в клеточном росте и дифференциации, т. е. в данном случае тРНК выступают также как факторы регуляции биосинтеза белка. Эта их функция выполняется и иными путями: возникновением так называемых «недоделанных» и «денатурированных» форм тРНК. Первые возникают в результате отсечения лишних нуклеотидов с 5'-конца и ЦЦА последовательностей с 3'-конца от РНК-предшественника; вторые образуются в тканях голодающих, ненормально существующих животных (Г. Х. Мацука). При необходимости, в условиях нормального физиологического состояния, эти формы тРНК снова переходят в активное состояние, в результате конформационных изменений подвергаются ренатурации и включаются в биосинтез белка.

Неактивные формы тРНК теряют способность акцептировать аминокислоты. Биологический смысл и причины их образования,

возможно, обусловлены также изменением их вторичной и третичной структуры. Возможно, что это зависит, в свою очередь, от потери ионов Mg^{2+} , стабилизирующих вторичную и третичную структуры активных тРНК, или при голодании полностью не формируется протрансценная организация тРНК. Таким образом, активация, подавление синтеза тРНК, нарушение их структуры являются факторами регуляции биосинтеза белка на уровне трансляции. Но остается еще недостаточно изученным взаимодействие тРНК с ферментами, иРНК, рибосомами и другими компонентами белоксинтезирующей системы.

Из рассмотренного материала следует, что биосинтез белка эффективно регулируется у прокариотов и эукариотов на уровне транскрипции и трансляции. Регуляция транскрипции осуществлена в бесклеточной системе, которая состоит из лактозного оперона (ДНК бактериофага λ h80 d lac); РНК-полимеразы *E. coli* с σ -фактором, которым является λ белок-фермент, узнающий промотор, репрессора, индуктора, цАМФ и ее рецептора (CRP-белок).

Как видно, гипотеза оперона может быть применена и к животным, растительным клеткам с учетом, что у высших организмов в регуляции биосинтеза белка принимают участие также ядерные гистоновые и негистоновые белки и целый ряд других факторов. Таким образом, механизмы регуляции биосинтеза белка на молекулярном уровне, особенно у высших организмов, полностью не выяснены, и их изучение продолжается.

Список литературы

- Ананьева Л. Н. О существовании неравномерной повторяемости нуклеотидных последовательностей в ДНК высших организмов.— «Успехи совр. генетики», 1971, № 3.
- Ашмарин И. П., Федорова Н. А. На пути к реконструкции хроматина.— «Успехи совр. биохимии», 1973, № 15.
- Ашмарин И. П. Молекулярная биология. Л., «Медицина», 1974.
- Баев А. А. и др. Первичная структура валиновой транспортной РНК пекарских дрожжей.— «Мол. биол.», 1967, т. 1.
- Белозерский А. Н. Биохимия нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов. М., «Наука», 1976.
- Белозерский А. Н. Баховские чтения. М., Изд-во АН СССР, 1959.
- Биосинтез белка и нуклеиновых кислот (сборник). М., «Наука», 1965.
- Бирштейн Г. М., Птицын О. Б. Конформация макромолекул. Л., «Наука», 1964.
- Бреслер С. Е. Введение в молекулярную биологию. М., Изд-во АН СССР, 1963.
- Бреслер С. Е. Молекулярная биология. М., «Наука», 1973.
- Венкстерн Т. В. Первичная структура транспортных нуклеиновых кислот. М., «Наука», 1970.
- Волькенштейн М. В. Молекулы и жизнь. М., «Наука», 1965.
- Гаврилова Л. П., Спирин А. С. «Неэнзиматическая» трансляция.— «Журнал эволюц. биохим. физиол.», 1973, № 9.
- Георгиев Г. П. Регуляция синтеза РНК в клетках животных.— «Успехи совр. биол.», 1970, № 3.
- Гофштейн Л. В. Современные представления о гистонах и их функциях.— «Успехи совр. биол.», 1971, № 12.

- Дубинин Н. П. Актуальные проблемы современной генетики.— «Изв. АН СССР. Сер. биологич.», 1972, № 6.
- Дэвидсон Э. Действие генов в раннем развитии. М., «Мир», 1972.
- Дэвидсон Дж. Биохимия нуклеиновых кислот. М., «Мир», 1976.
- Жакоб Ф., Моно Ж. Биохимические и генетические механизмы регуляции в бактериальной клетке.— В кн.: Молекулярная биология, проблемы и перспективы. М., «Наука», 1964.
- Инграм В. Биосинтез макромолекул. М., «Мир», 1975.
- Информационные макромолекулы (сборник). М., «Мир», 1965.
- Иост Х. Физиология клетки. М., «Мир», 1975.
- Ичас М. Биологический код. М., «Мир», 1971.
- Кендрью Д. Нить жизни. М., «Мир», 1968.
- Киселев Л. Л., Никифоров В. Г., Астаурова О. Б. и др. Молекулярные основы биосинтеза белков. М., «Наука», 1971.
- Кочетков Н. К. и др. Органическая химия нуклеиновых кислот. М., «Химия», 1970.
- Крепс Е. М. О термине и предмете молекулярной биологии.— «Вестник АН СССР», 1970, № 10.
- Кричевская А. А., Георгиев Г. П. Ядерные рибонуклеопротениды, содержащие информационную РНК.— «Мол. биол.», 1973, № 7.
- Кушев В. В. Механизмы генетической рекомбинации. Л., «Наука», 1971.
- Леви А., Сикевич Ф. Структура и функция клетки. М., «Мир», 1971.
- Ленинджер А. Биохимия. М., «Мир», 1976.
- Манделес С. Установление первичной структуры нуклеиновых кислот. М., «Мир», 1975.
- Мацук Г. Х. Биологически активные и неактивные тРНК животных тканей (Автореферат докт. дис.). Киев, 1972.
- Мейнелл Г. Бактериальные плазмиды. М., «Мир», 1976.
- Микельсон А. В. Химия нуклеозидов и нуклеотидов. М., «Мир», 1965.
- Молекулярные основы биосинтеза белков (сборник). М., «Наука», 1971.
- Никифоров В. Г., Астаурова О. Б. Матричный синтез рибонуклеиновых кислот РНК-полимеразой.— В кн.: Молекулярные основы биосинтеза белков. М., «Наука», 1971.
- Нуклеиновые кислоты (сборник). М., «Мир», 1965.
- Овчинников Л. П., Спирин А. С. Рибонуклеопротенидные частицы цитоплазматических экстрактов животных клеток.— «Успехи совр. биол.», 1971, № 71.
- Пюльман Б., Пюльман А. Квантовая биохимия. М., «Мир», 1965.
- Пюльман Б. Электронная биохимия. М., «Наука», 1966.
- Рысков А. П., Фарамян В. Р., Георгиев Г. П. Структура ядерной ДРНК.— «Мол. биол.», 1972, № 6.
- Рид С. Возбужденные электронные состояния в химии и биологии. М., Изд-во иностр. лит., 1960.
- Специфичность химического мутагенеза (сборник). М., «Наука», 1968.
- Синтез и структура нуклеиновых кислот (сборник). М., «Мир», 1966.
- Спирин А. С., Белицина Н. В., Айтхожин М. А. Информационные РНК в раннем эмбриогенезе.— «Журнал общей биологии», 1964, № 25.
- Спирин А. С., Гаврилова Л. П. Рибосома. М., «Наука», 1971.
- Стент Г. Молекулярная генетика. М., «Мир», 1974.
- Стрэттвизер Э. Теория молекулярных орбит для химиков-органиков. М., «Мир», 1965.
- Седжер Р. Цитоплазматические гены и органеллы. М., «Мир», 1975.
- Транспортные рибонуклеиновые кислоты (сборник). Киев, «Наукова думка», 1976.
- Уотсон Дж. Молекулярная биология гена. М., «Мир», 1967.
- Уотсон Дж. Двойная спираль. М., «Мир», 1969.
- Финеан Д. Биологические ультраструктуры. М., «Мир», 1970.
- Хаггис Дж. и др. Введение в молекулярную биологию. М., «Мир», 1967.

Химия и биохимия нуклеиновых кислот (сборник). Л., «Медицина», 1968.
Чаргафф Э. Основания, входящие в состав дезоксирибозных и рибозных кислот у разных видов. В сб.: Химические основы наследственности. М., Изд-во иностр. лит., 1961.

Чаргафф Э., Дэвидсон Д. Н. Нуклеиновые кислоты. М., Изд-во иностр. лит., 1962.

Энгельгардт В. А. Интегрализм — путь от простого к сложному в познании явлений жизни. — Изв. АН СССР. Сер. биология, № 6, 1970.

Элементарные процессы генетики (сборник). М., «Наука», 1973.

Buller I. A. V. Nature, 1963, 199, 68.

Gamov G. Nature, 173, 318, 1954.

Griffith F. J. J. Hyg., 27, 113, 1928.

Gros F. et al. Colg Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 26, 111, 1961.

Doty P. Harwey Lectures, 55, 103, 1961.

Cairns J. J. Mol. Biol., 6, 208, 1963; Cold Spring Harbor Symp. in Quant. Biol., 28, 43, 1963.

Crick F. L. et al., Nature, 192, 1227, 1961.

Edgar R., Wood W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 55, 498, 1966.

Estbrook R. L. Biol. Chem., 227, 2, 1957.

Feughelman M., Wilkins M. N. F. Nature, 175, 834, 1955.

Franklin R. E., Gosling R. G. Molecular structure of nucleic acids: molecular configuration of Sodium thymonucleate, Nature, 171, 750, 1953.

Holley R. W. et al., Science, 147, 1462, 1965.

Jordan D. O. Chemistry of the Nucleic Acids, Washington, Butterworths, 1960.

Khorana H. G. The Nucleic Acids. v. 3, 105, 1960.

Kurland C. Ann. Rev. Biochem., 41, 377, 1972.

Lipmann F. Internat. Sympos. on regulatory mechanisms in nucleic acids and protein biosynthesis, Amsterdam, 1967; 177, Ann. Rev. Biochem., 1971, 40, 409.

Matthaei J. H., Jones O. W., Nirenberg M. W. Proc. Nat. Acad. Sci., US, 48, 66, 1962.

Meselson M., Stahl F. W. Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., 44, 671, 19, 58.

Sato T. et al., Mol. Biol., 16, 180, 1966.

Stephenson M. L., Zamecnik P. C. Proc. Nat. Acad. Sci., 7, 91, 1962.

Sueoka N. Cheng J. Mol. Biol., 4, 161, 1962.

Taylor A. L. Bacteriol. Rev., 1970, 34, 2, 155.

Vinograd J., Hearst J. E. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, 20, 372, 1962.

Watson J. D., Crick F. H. C. Nature 9171, 7379 and 9649, 1953.

Wilkins M. N. F., Stokes A. R., Wilson H. R. Molecular structure of nucleic acids: molecular structure of deoxypentose nucleic acids. Nature, 171, 738, 1953.

Whitehouse H. L. Towards an Understanding of Mechanism of Heredity Edward Arnold (Publishers) Ltd, London, 1969.

Zamenhof S., Ann. N. J., Acad. Sci., 81, 784, 1959.

Zamecnik P. C. et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 46, 811, 1960.

Глава VI

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

В 1838 г. голландский химик О. Мульдер, первым получивший научные сведения о белках, определивший в них содержание азота, назвал вещество, лежащее в основе их строения, протеином. Это название происходит от греческого «протос», что означает первый,

важнейший, и отражает понятие о белках (протеинах) как о непрерывном и обязательном компоненте всех живых организмов. Клетка в состоянии активного, экспоненциального роста содержит 50—80% белков в пересчете на сухое вещество. Сухой вес животных организмов состоит приблизительно на 45% из белков, а в мышце содержание белка достигает 80%. Более низкое процентное содержание белка в растительном организме объясняется значительным накоплением полисахаридных структурных компонентов и запасных веществ. Но не только количественное преобладание белков говорит о важной роли, которую они выполняют в живых системах. Белки выступают в роли регуляторов всех процессов, протекающих в клетке. В основе этой функции белков лежит их разнообразие и специфичность, которые позволяют им нести соответствующую информацию, распознавание определенных молекул и последующего взаимодействия с ними. На примере белков наиболее полно и убедительно видна связь между структурой молекулы и выполняемой ею функцией.

За последние 25 лет разработаны совершенные методы выделения, очистки, фракционирования и получения в химическом чистом виде индивидуальных белков, количество примесей в которых не превышает 0,01%. На основе этого достигнуты огромные успехи в изучении тонкой структуры белковой молекулы. Подробно, вплоть до определения положения отдельных атомов, изучена пространственная структура макромолекулы более чем шестидесяти белков.

Все молекулы одного белка имеют тождественное строение. Изменения последовательности аминокислот в полипептидной цепи могут наступить только вследствие мутации. При этом замена только одной аминокислоты на другую может в ряде случаев привести к очень значительным изменениям во вторичной и особенно третичной структуре макромолекулы белка и выполняемой ими функции.

Среди различных компонентов живых систем содержатся в значительных количествах также углеводы, липиды. Но в важнейших отправлениях живого, таких как рост и воспроизведение, решающую роль играют белки и нуклеопротеиды. Некоторые считают наиболее важными компонентами живых систем нуклеиновые кислоты. Но в основе роста и воспроизведения лежат процессы биосинтеза и распада белков и нуклеиновых кислот, которые определяются белками-ферментами. Образование и обмен нуклеиновых кислот зависят также от наличия соответствующих белков-ферментов.

Принцип строения белков состоит в соединении в длинную полимерную цепь аминокислотных остатков с помощью пептидных связей. Однако громадное разнообразие белков обеспечивается уже только тем, что полипептидные цепи состоят из 20 различных аминокислот. И если разнообразие белков не возрастало бы за счет конформаций полипептидных цепей, т. е. определенного их сворачивания, приводящего к третичной структуре, то и тогда только за счет различной последовательности 20 аминокислот возможно было бы образование бесконечного разнообразия белковых молекул.

В состав белковой молекулы может входить до нескольких сот аминокислотных остатков. Но если бы в молекулы белков входило только 100 аминокислотных остатков, то при этом могло бы возникнуть число различных вариантов полипептидных цепей, равное 20^{100} , т. е. теоретически нереализуемое в их существовании разнообразие белков. В состав клетки *E. coli* входит около 5000 различных органических соединений, из них около 3000 различных белков и около 1000 нуклеиновых кислот. В организме человека около 5 млн. различных белков, и не найдено ни одного идентичного с белком *E. coli*, хотя по функции они близки.

На земле насчитывается около 1 200 000 различных организмов, которые содержат приблизительно 10^{10} — 10^{12} различных белков и около 10^{10} нуклеиновых кислот. Сравнительно с этим миллион синтезированных человеком различных органических соединений составляет лишь ничтожную долю.

Поэтому громадное разнообразие и специфичность белков является молекулярной основой структурообразования, регуляции и многочисленных процессов в клетке, а также видовых и индивидуальных особенностей организмов. Исходя из этого основным подходом в изучении белков является выяснение тонкой их структуры в связи с выполняемой функцией. За последние три десятилетия в этой области достигнуты громадные успехи. С каждым годом мы узнаем полную аминокислотную последовательность все большего числа белков; выясняем роль последовательности аминокислот и их боковых групп в типе свертывания полипептидной цепи и образовании третичной структуры; все больше узнаем об активных участках и центрах на поверхности белков с различной функциональной активностью: ферментов, гормонов, антигенов и антител, токсинов, с механо-химическими, транспортными и другими свойствами.

Выполнение всех разнообразных функций белковой молекулы может быть понято только на основе знания ее структуры.

1. Структура белковых молекул. Белки представляют собой сополимеры большой молекулярной массы, состоящие из 20 различных аминокислот, соединенных пептидной связью. Молекулы белка содержат различное количество аминокислотных остатков, которое может быть определено как частное от деления молекулярной массы простого белка на 120, хотя не во всех белках имеются все 20 аминокислот. Гидрофобные аминокислоты, как правило, содержатся в больших количествах во всех белках. В фибриллярных белках их содержание достигает 93% (эластин), а в глобулярных может достигать 50%. Кроме 20 аминокислот, предшественников биосинтеза белковой молекулы, встречается в тканях более 150 различных аминокислот. Все они являются производными этих 20 аминокислот, и роль подавляющего большинства их остается невыясненной.

В 1920 г. была открыта первая из аминокислот, входящих в состав белка, — глицин, а в 1935 — последняя — треонин. Каждая

аминокислота содержит две активные функциональные группы: карбоксильная ($-\text{COOH}$) и аминогруппа ($-\text{NH}_2$), которые присоединены к одному и тому же атому углерода. Функциональные группы у всех аминокислот одинаковы. Поэтому аминокислоты отличаются друг от друга только по боковой цепи. Исходя из этого, все аминокислоты, кроме пролина и глицина, мы можем изобразить одной общей формулой: $\text{NH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$, где R обозначает



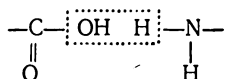
специфическую боковую группу атомов, строение которой различно у разных аминокислот.

С помощью активных групп $-\text{NH}_2$ и $-\text{COOH}$ аминокислоты

соединяются между собой кетоамидной связью $-\text{C}-\text{N}-$, которая

$$\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ -\text{C}-\text{N}- \\ || \\ \text{O} \end{array}$$

в этом случае называется пептидной связью и образуется с выделением молекулы воды:



Исключение составляют две аминокислоты — пролин и оксипролин, которые образуют кетоимидную связь. При этом >NH не является свободной и входит в состав кольцевой структуры.

Химическое строение и схема пространственного расположения атомов в остоле пептидной цепи может быть представлено с указанием длины связей и угла между ними следующим образом (рис. 55). Несмотря на индивидуальность каждой аминокислоты, все они могут быть разделены на группы в зависимости от свойств боковых цепей. К ним относятся группы неполярных алифатических аминокислот, неполярных ароматических, гидроксилсодержащих, кислых, основных, серосодержащих, иминокислот. Боковые группы аминокислот обладают различной реакционной способностью. Например, аспарагин и глутамин своей амидной группой ($-\text{CO}-\text{NH}_2$) могут образовывать две водородные связи. Карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой аминокислот при физиологических значениях pH находятся в ионизированном состоянии. В таком же состоянии находятся при этих условиях и основные боковые цепи аргинина и лизина. Атомы серы, входящие в состав цистеина и метионина, обладают различной реакционной способностью. Атом серы метионина — инертный, а цистеина обладает высокой активностью и соединяется с атомом серы другой молекулы цистеина, образуя так называемые дисульфидные мостики. В результате отдельные полипептидные цепи сшиваются с помощью ковалентных связей или образуются петли при связывании разных участков одной и той же полипептидной цепи. Это играет важную роль в определении конфигурации

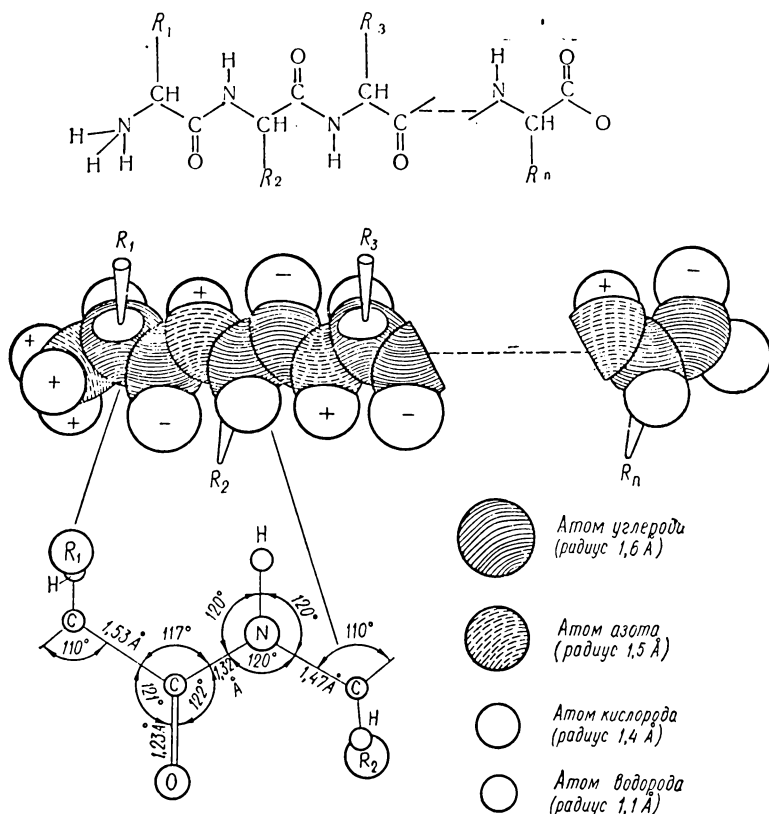


Рис. 55. Молекулярная модель остова пептидной цепи. Модель отражает взаимоотношение между молекулярными группами, а поверхности атомов в модели соответствуют внешним границам электронных оболочек. Внизу показаны длины связей и углы между ними.

белковой молекулы. Большое влияние на конформацию белка оказывает также пролин.

Суммирование свойств различных аминокислот, входящих в относительно различном количестве в полипептидную цепь, определяет структуру и функцию белковой молекулы. А содержание некоторых аминокислот является характерным для того или иного белка. Например, коллаген содержит очень много оксипролина. Однако если взять ряд белков, то в частоте встречаемости аминокислотных остатков наблюдается некоторая определенность. Во многих белках чаще встречаются аминокислотные остатки глицина, аланина, аспарагиновой и глутаминовой кислот. Это также наблюдается и в белках *E. coli*, в которых более часто встречаются перечисленные выше аминокислотные остатки. Возможно, что разная частота встречаемости обусловлена либо особенностями биосинтеза белка, либо их специальными функциями, либо особенностью эволюции.

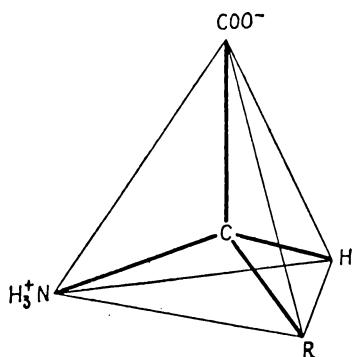
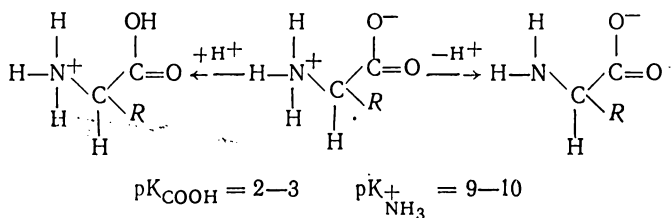


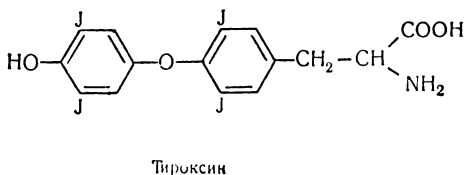
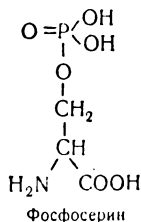
Рис. 56. Абсолютная пространственная конфигурация *L*-аминокислот, определенная с помощью рентгеноструктурного анализа.

Все белки состоят только из *L*-изомеров аминокислот, абсолютная пространственная конфигурация которых определена с помощью рентгеноструктурного анализа (рис. 56). *D*-Изомеры очень редко встречаются, но еще ни разу не были обнаружены в составе белка. Правые аминокислоты часто выступают в роли антиметаболитов и как субстраты взаимодействуют с ферментом, блокируя его активный центр. Как видно, в процессе эволюции произошел отбор левого изомера, что не нашло пока определенного объяснения. В условиях нейтральных значений рН аминокислоты несут одновременно положительный и отрицательный заряд, т. е. находятся в состоянии цвиттерионов:

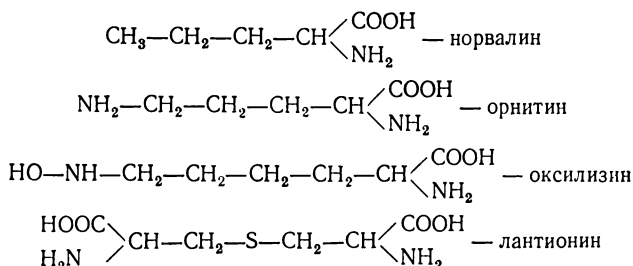


Если рН среды смещается в кислую сторону, то диссоциация карбоксильной группы подавляется и молекула аминокислоты приобретает положительный заряд. Если рН среды смещается в щелочную сторону, то происходит отрыв протона от аминогруппы, и аминокислота становится отрицательно заряженной. При определенном значении рН аминокислота может иметь одновременно положительный и отрицательный заряды. При этом заряды будут нейтрализоваться, и суммарный заряд аминокислоты будет равен нулю. В таком состоянии аминокислота находится в изоэлектрической точке и не перемещается в электрическом поле.

В некоторых белках встречаются редкие аминокислоты. Например, фосфосерин входит в состав фосфопротеинов, таких как казеин молока; тироксин — в гормон щитовидной железы и т. д.

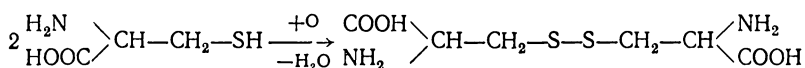


Ряд аминокислот находится в свободном состоянии или входит в состав полипептидов с небольшой молекулярной массой, которые часто являются антибиотиками — N-оксилизин, лантионин. Другие аминокислоты являются промежуточными метаболитами: норвалин, или аминовалериановая кислота, орнитин.

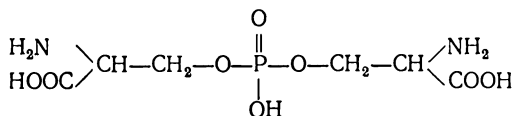


В состав белковой молекулы часто входят кроме полипептидных цепей другие химические группы или молекулы, которые называются *простетическими группами*. Примером такой группы может быть гем. Полипептидная цепь имеет аминогруппу на одном конце и он называется N-концом, а также карбоксильную группу на другом конце, который называется С-концом. Если макромолекула состоит из двух и больше цепей, то последние соединяются между собой с помощью боковых групп, между которыми возникают ковалентные связи.

Часто отдельные полипептидные цепи макромолекулы белка соединяются так называемыми дисульфидными мостиками, которые возникают с образованием ковалентной связи между двумя остатками цистеина:



Соединение, «сшивки», двух полипептидных цепей иногда происходит через образование двойных эфиров фосфорной кислоты с серином:



Этот тип «сшивки» часто наблюдается у фосфопротеинов.

Для изучения состава и структуры белков их необходимо выделить, разделить, очистить. В последнее время приемы разделения и выделения в чистом виде индивидуальных белков значительно усовершенствованы. Наиболее часто применяются методы разделения белков, основанные на их кислотно-основных свойствах, растворимости, размере их молекулы. На различии кислотно-основных свойств белков разработаны электрофоретический и ионообменный методы их разделения. Электрофоретическое разделение белков осуществляется методом движущейся границы в

водном растворе или методом зонного электрофореза в геле или другим поддерживающем носителе. Последний способ в виде диск-электрофореза в полиакриламидном геле является самым высокоразрешающим из всех аналитических методов и позволяет разделять сложную смесь белков на основе воздействия электрического поля и градиента pH в самом геле. С помощью этого метода можно разделять белки, отличающиеся на одну заряженную группу. Эффект разделения резко возрастает, если он ведется в полиакриламидном геле в присутствии детергента — додецилсульфата натрия. При этом белок становится отрицательно заряженным и денатурируется, а его молекула приобретает форму палочки, и происходит разделение белков по молекулярной массе. Этот способ начинает широко применяться для разделения белков по молекулярной массе и определения молекулярной массы сразу нескольких белков.

На основе суммарного заряда белки разделяются также на ионообменных смолах. Чаще применяются производные целлюлозы, которая несет либо положительно заряженные радикалы ($C_2H_5-NH^+-C_2H_5O-R$) — диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза); либо отрицательно заряженные группы ($R-O-CH_2-COO^-$) — карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза). Белок, посаженный на эти ионообменники, затем снимают (элюируют) буферами с разной pH или средой с разной ионной силой.

Белки можно разделять и другими методами, основанными на их растворимости в водных системах. В зависимости от pH среды белки будут принимать суммарный положительный или отрицательный заряд, от значения которого изменяется степень отталкивания друг от друга молекул белка и его растворимость. В изоэлектрической точке суммарный заряд белка равен нулю. Поэтому белок не растворяется и выпадает в осадок. Разные значения изоэлектрической точки у разных белков делают, таким образом, возможным их разделение изоэлектрическим осаждением.

Диссоциация ионизирующих групп глобулярных белков изменяется под влиянием нейтральных солей. Это приводит к изменению растворимости белка. Эффективность действия солей зависит от валентности ионов. Двухвалентные катионы обладают более высокой диссоциирующей способностью, поэтому более резко повышают растворимость белка. Но при более высокой концентрации снова снижают растворимость белка, и он выпадает в осадок, высаливается. Понижение диэлектрической постоянной воды добавлением в нее таких растворителей, как этанол, ацетон, приводит к повышению силы взаимодействия между противоположными зарядами в белковых молекулах, и они выпадают в осадок.

Белок можно отделить (очистить) от низкомолекулярных соединений диализом. Для этого неочищенный белок наливают в мешочек из полупроницаемой целлофановой мембраны и помещают в дистиллированную воду. Через мембрану проходят низкомолекулярные соединения, и их содержание в белке можно довести до следовых количеств.

Наиболее высокоэффективным и избирательным способом разделения белков является афинная хроматография. Этот способ состоит в том, что к какому-то сорбенту (сефадекс) пришивается соединение, которое имеет большое сродство к определенному белку и очень сильно, избирательно сорбирует его. Таким путем определенный белок можно сорбировать из сложной биологической смеси, а затем изменением рН, ионной силы, органическими растворителями элюировать, снять его с сорбента и получить в очищенном виде. При этом степень очистки белка только при одном пропускании через колонку достигает $1 \cdot 10^4$ — $5 \cdot 10^4$.

Одним из новых способов разделения белков является электрофокусировка. В его основе лежит создание с помощью двух амфолитов линейного градиента рН на протяжении трубки, в которой ведется разделение. Если включить вдоль трубки ток и нанести смесь белков, то последние будут по мере продвижения разделяться и собираться в тех зонах, где рН соответствует их изоэлектрической точке.

Высокой избирательностью обладает иммунологический метод разделения и идентификации белков, который основан на взаимодействии между антигеном и антителом. Чувствительность этого метода разделения белков возрастает при сочетании реакции преципитации (выпадение осадка при взаимодействии антигена с антителом) с электрофорезом в геле.

Наконец, одним из надежных и перспективных способов очистки белка является получение его в кристаллическом состоянии. Но этот способ является сложным, трудным. Кроме этого, не все белки удастся получить в кристаллическом виде. Но уже несколько сот белков выделены, очищены и получены в виде кристаллов.

О чистоте полученных индивидуальных белков судят по разным критериям. При повторной хроматографии можно убедиться в чистоте, однокомпонентности полученного белка. Если полученный белок при ультрацентрифугировании дает один пик, при электрофорезе образует одну зону, имеет определенную растворимость и другие физико-химические константы, то из этого следует, что мы имеем дело с чистым, идентифицированным белком. Если известна N-концевая аминокислота, то ее определение может служить также критерием чистоты белка. Об индивидуально чистом состоянии белков можно судить и по их разной функциональной активности (фермент, гормон и т. п.).

Ближайшим химическим анализом белка является определение его элементарного состава. Последний является достаточно близким у подавляющего большинства белков. Процентное содержание различных элементов в белковых веществах составляет: углерод — 50,6 — 54,5; кислород — 21,5 — 24,0; азот — 15,0 — 18,0; водород — 6,5 — 7,3; сера — 0,0 — 2,5. Как видно, содержание всех элементов, входящих в состав белков, более значительно колеблется у серы. Это свидетельствует о заметном изменении количества сульфгидрильных и дисульфидных групп, присутствие которых вносит значительный вклад в конформацию белковой молекулы.

Однако элементарный состав белков дает ограниченную информацию о их химической структуре и выполняемой ими функции. Для этой цели более важные и ценные сведения дает анализ аминокислотного состава белков. При этом получают данные о частоте повторения аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Вначале разделение и определение каждой из двадцати аминокислот, входящих в состав белковой молекулы, было сложнейшей задачей. На определение аминокислотного состава первого белка (β -лактоглобулин) было затрачено несколько лет. Поэтому чаще проводили суммарное определение содержания отдельных групп аминокислот. Например, основные аминокислоты (лизин, аргинин, гистидин) осаждали фосфорновольфрамовой кислотой и разделяли осаждением сернокислым серебром при различных значениях pH. Моноаминокислоты разделяли дробной перегонкой их эфиров и т. д. В последние годы разработаны хроматографические методы разделения и определения аминокислот. При двухмерном хроматографировании смеси аминокислот на бумаге каплю изучаемой смеси наносят в угол бумаги. Этим концом бумагу погружают в смесь двух растворителей, которые движутся либо вверх (за счет капиллярных сил), либо вниз (за счет сифонного эффекта). Аминокислоты при этом разделяются. Затем проводят разделение в перпендикулярном направлении. Для этого лист бумаги поворачивают на 90° и помещают в новую смесь двух растворителей. Затем бумагу обрабатывают раствором нингидрина. Место расположения аминокислот проявляется цветной реакцией, которая развивается между нингидрином и аминокислотой. Если в смеси имели место радиоактивные аминокислоты, то хроматограмма накладывается на лист бумаги, чувствительной к рентгеновским лучам. На местах расположения меченых аминокислот выявляются темные пятна. В связи с тем что гидролиз белка до аминокислот ведется в присутствии соляной кислоты, аспарагин и глютамин дезаминируются и проявляются как аспарагиновая и глютаминовая кислоты. Принцип хроматографии состоит в том, что многократно повторяется элементарный акт распределения вещества между подвижной и неподвижной фазами. В случае бумажной хроматографии водная фаза сорбирована бумагой, неводная движется по ее поверхности. Разделение аминокислот происходит в результате различных коэффициентов распределения веществ между этими фазами.

Разделение аминокислот можно проводить в тонком слое различных гелей. А если имеются большие количества аминокислот, то их можно разделять на колонках с крахмалом, силикагелем, ионообменными смолами. В результате получается хроматограмма распределения аминокислот гидролизата исследуемого белка.

В настоящее время весь процесс хроматографического анализа аминокислот автоматизирован и проводится без затрат ручного труда. Решающее значение в автоматизации анализа аминокислотного состава белков имели исследования В. Штейна и С. Мура, которые сконструировали автоматический анализатор аминокислот. В пер-

воначальном виде с помощью этого прибора можно было определить содержание отдельных аминокислот в 1 мг белка с точностью до нескольких процентов. Затем чувствительность метода повышалась и в настоящее время доведена для многих аминокислот до 0,1%. Весь анализ белкового гидролизата занимает 2—4 часа.

В качестве ионообменника был использован сульфатированный полистерол, который содержит группы SO_3H и представляет собой сильный хорошо диссоциирующий электролит. Эта смола при всех значениях pH является макромолекулярным анионом с группой SO_3^- и противоионом водорода в растворе. Смола обрабатывается щелочью для нейтрализации ее функциональных групп, которые переходят в SO_3^-Na^+ . Когда протекает сорбция аминокислот на смоле, то происходит обмен Na. Поэтому аминокислота должна иметь положительный заряд, т. е. быть катионом.

Гидролизат белка в фосфатно-цитратном буфере с pH-2 наносится на колонку. При этом все карбоксильные группы аминокислот оттитровываются и находятся в недиссоциированном разряженном состоянии: $-\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow -\text{COOH}$, а аминогруппы, наоборот, подвергаются протонированию и приобретают положительный заряд: $-\text{NH}_2 + \text{H}^+ \rightarrow -\text{NH}_3^+$. По мере прохождения через смолу аминокислот, которые несут NH_3^+ -группу, происходит связывание последней отрицательно заряженными группами смолы. У диамино-кислот имеется два положительных заряда, поэтому они адсорбируются более прочно. Затем начинается процесс элюции аминокислот с сульфополистерола. Процесс элюции основан на электрохимических свойствах аминокислот. Как слабые электролиты аминокислоты подвергаются электрической диссоциации. Аминокислоты имеют две константы диссоциации, а те, которые содержат диссоциирующие группы в радикале,— три константы диссоциации. Первая константа диссоциации для карбоксильной группы

находится в границах 3,5—5,5: $K_1 = \frac{C_{\text{COO}^-} \cdot C_{\text{H}^+}}{C_{\text{COOH}}}$; $pK_1 = 3,5$ —

5,5. Вторая константа электролитической диссоциации (pK_2) относится к группе NH_2 и находится в пределах 7—9: $-\text{NH}_2 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \rightleftharpoons \text{NH}_3^+$. Поэтому аминокислота будет иметь положительный заряд при pH меньше константы диссоциации (pK_1) и будет анионом при $\text{pH} > pK_2$, так как аминогруппа не заряжена. Но если значение pH среды будет больше pK_1 и меньше pK_2 , то аминокислота будет нести два заряда: и положительный, и отрицательный. В этом состоянии аминокислота не сорбируется на катионите, так как анионная группа несет отрицательный заряд и отталкивается от поверхности ионита. Таким образом, если pH буферного раствора будет приближаться к величине pK_1 , аминокислоты начнут сниматься с катионитной колонки. Поэтому все аминокислоты постепенно можно снять с колонки с ионообменной смолой двумя буферами с pH-3,5 и pH-5,5.

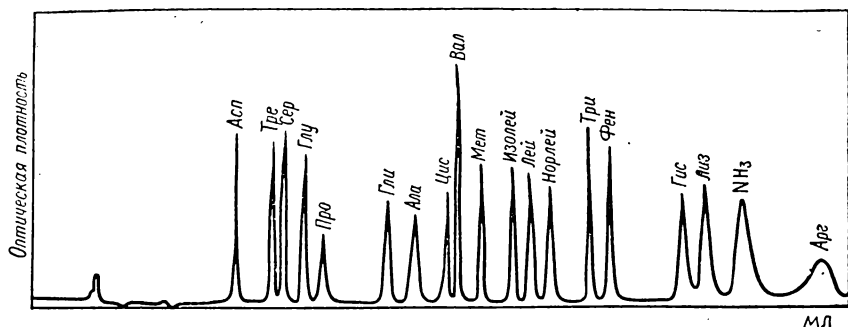
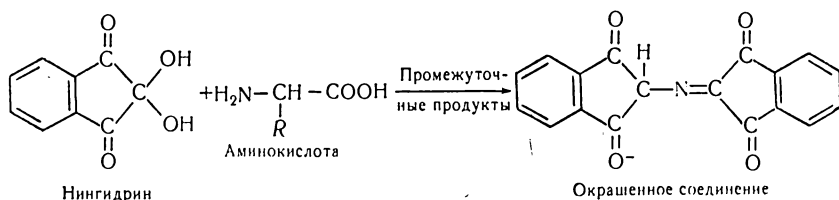


Рис. 57. Хроматограмма смеси аминокислот. Получена с помощью автоматического анализатора аминокислот.

При рН-3,1 первыми начинают элюироваться аспарагиновая кислота, треонин, серин. При подъеме рН до 5,1 элюируются остальные аминокислоты: пролин, глутаминовая кислота, глицин, аланин, валин, цистин, метионин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин. Основные аминокислоты (лизин, аргинин, гистидин), имеющие более выраженные основные свойства, выходят с колонки при рН около 11. В процессе элюции аминокислоты смешиваются с раствором нингидрина в трубке с диаметром около 1 мм, в термостате при 100° С. Осуществляется цветная реакция нингидрина с аминогруппой аминокислот с образованием малиновой окраски, кроме пролина и оксипролина, которые дают желтую окраску. Интенсивность окраски измеряется и записывается с помощью самопишущего гальванометра, который предварительно градуируется по одной из аминокислот. Нингидриновая реакция протекает таким образом:



Автоматизация анализа аминокислотного состава белков с помощью оригинального прибора, разработанного В. Штейном и С. Муром, облегчила решение трудной задачи аналитической химии белков. Выяснение структуры многих белков без автоматического анализатора было бы практически невозможным. В результате получается хроматограмма смеси аминокислот гидролизата белка (рис. 57).

Количественный анализ аминокислотного состава белка теперь стал обычным методом и широко применяется для характеристики того или иного чистого препарата белка. Однако несмотря на то, что различия в аминокислотном составе между фибриллярными

и глобулярными белками не особенно большие, в их свойствах имеются значительные различия. Тогда каким же образом можно объяснить, что сходные по общему составу аминокислот белки выполняют различную функцию высокоспецифических ферментов? Для ответа на этот вопрос необходимы сведения о последовательности аминокислот в полипептидной цепи, от чего зависит структура белка и его взаимодействие с другими соединениями.

Первичная структура белков. Под первичной структурой белков понимают последовательность, в которой аминокислоты расположены в полипептидной цепи белковой молекулы. Эта последовательность в значительной мере определяет структуру белка. Как из букв алфавита можно составить бесчисленное множество слов различных по смыслу, так и из 20 аминокислот можно образовать громадное разнообразие полипептидных цепей, молекул белка различных по структуре, свойствам и функции.

Аминокислотные остатки соединены между собой в полипептидной цепи ковалентными пептидными связями. Остаток — часть молекулы аминокислоты, которая остается после отщепления молекулы воды при образовании пептидной связи. Кроме этого, в понятие первичной структуры белков входят также ковалентные дисульфидные связи, которые соединяют атомы серы двух молекул цистеина. Эти дисульфидные связи цистина могут образовывать «мостики», «сшивки» между различными частями одной и той же полипептидной цепи и различными цепями. В этом случае они принимают участие в формировании также третичной структуры

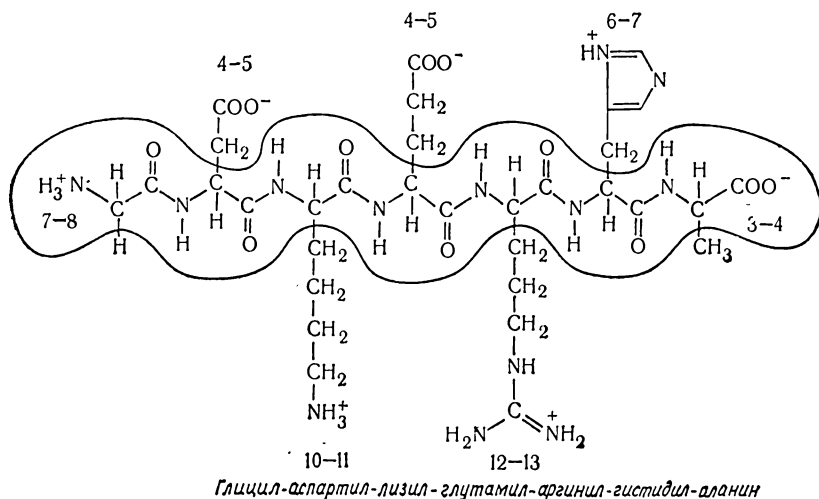
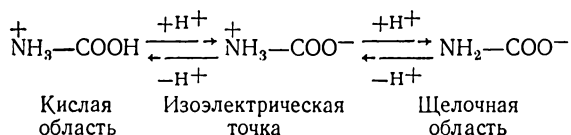


Рис. 58. Боковые цепи аминокислот, которые определяют суммарный заряд белковой молекулы. Заряды N-концевой и C-концевой групп незначительны по сравнению с зарядами, которые вносят боковые группы длинной полипептидной цепи.

белковой молекулы. Последовательность аминокислот в полипептидной цепи принято изображать таким образом (рис. 58). Свободная α -аминогруппа (N-концевая) стоит слева, а свободная α -карбоксильная группа (C-концевая) — справа. Как видно, полипептидная цепь представляет собой поливалентный ион, который несет большое количество положительных и отрицательных зарядов. Суммарный заряд молекулы белка определяется в основном зарядами, которые несут боковые цепи. При том отрицательный заряд создают такие аминокислоты, как аспарагиновая и глутаминовая, а положительный — лизин, аргинин и гистидин.

В зависимости от pH клеточной среды будет изменяться электрохимическая диссоциация COOH- и NH_2 -групп. Если pH будет смещаться в кислую сторону, то COO^- -группы будут оттитровываться ($\text{COOH}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{COOH}$) и белок начнет приобретать положительный заряд. Если pH будет смещаться в щелочную сторону, то NH_3^+ -группа превратится в NH_2 и белок примет отрицательный заряд. Если pH будет иметь промежуточное значение, т. е. будет находиться в изоэлектрической точке, то число отрицательных и положительных зарядов будет равным:



В физиологических условиях большинство белков несет отрицательный заряд, так как их изоэлектрическая точка лежит в кислой области. Однако имеется группа белков, протамины и гистоны, в составе которых содержится большое количество лизина, аргинина, несущих положительный заряд. Эти белки (гистоны) в физиологических условиях имеют положительный заряд и соединяются в хромосомах с кислотными группами дезоксирибонуклеиновой кислоты.

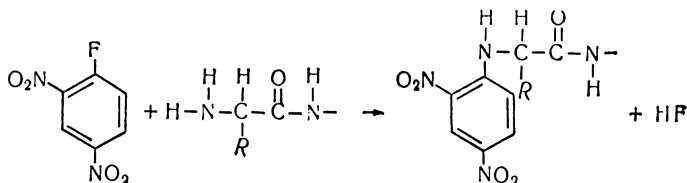
Исключительное значение представляет вопрос, имеют ли молекулы одного и того же белка абсолютно идентичную последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи, т. е. определенный специфический химический состав. Можно ли охарактеризовать конкретный определенный белок с помощью точных химических параметров или же только на основе статических методов как систему с неопределенным химическим составом. Для этого необходимо было определить последовательность аминокислот в полипептиде. Решение этого вопроса невозможно было на основе классических методов белковой коллоидной химии. Требовался принципиально новый подход. В результате десятилетнего упорного труда Ф. Сэнгеру в 1945 г. удалось найти и разработать новые аналитические методы, с помощью которых можно определять N-концевую аминокислоту в полипептидной цепи белковой молекулы и последовательность аминокислот в небольших пептидных фрагментах. Ф. Сэнгер установил первичную структуру инсулина. Молекула

инсулина состоит из А и В полипептидных цепей, между которыми имеется два дисульфидных мостика. В цепи А имеется еще внутри-цепочечная дисульфидная связь. А-Цепь содержит 21 аминокислотный остаток, В-цепь — 30 остатков. Сначала инсулин образуется в виде проинсулина из 84 аминокислотных остатков, от которого ферментативно затем отщепляется пептид из 32 аминокислотных остатков.

В настоящее время аминокислотная последовательность известна для нескольких сот белков. Техника белковой химии настолько совершенна, что расшифровка первичной структуры любого белка находится в пределах возможного.

В чем же состоит метод определения аминокислотной последовательности? Последовательными этапами этого метода являются: определение числа полипептидных цепей в молекуле; определение N-концевых и С-концевых аминокислот; частичный гидролиз белка; фракционирование полученных пептидов; определение последовательности аминокислот в каждом пептиде; определение последовательности полученных пептидов в белковой макромолекуле и восстановление структуры всего полипептида. Число цепей в макромолекуле белка устанавливается определением числа N-концевых или С-концевых групп. Определение N-концевых α -аминокислот белков или пептидов проводится с помощью ацилирования или алкилирования. Но алкилирующие агенты взаимодействуют не только с N-концевыми α -аминокислотами, но и с ϵ -аминогруппами лизина. Поэтому в гидролизате имеются также ϵ -N-ацил- или ϵ -N-алкилпроизводные лизина. Последние отделяются на основе щелочной реакции свободной α -аминогруппы ϵ -замещенного лизина. Они остаются в водном слое. А α -замещенные N-ацил- и N-алкилпроизводные моноаминокислот экстрагируются органическими растворителями из водного раствора.

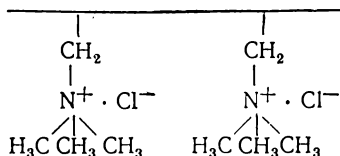
Ф. Сэнгер концевую аминогруппу пептида метил с помощью 2,4-динитрофторбензола (ДНФБ). Это соединение имеет желтую окраску. Такого же цвета получается динитрофенилпептид (ДНФ-пептид). При кислотном гидролизе связь между динитрофенильной



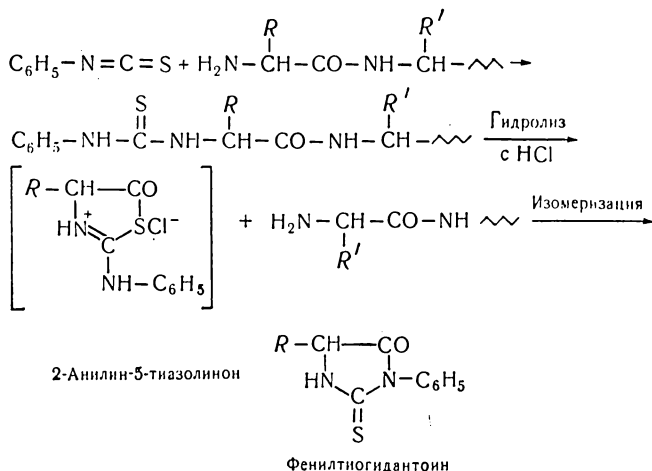
группой не разрывается. Поэтому ДНФ-аминокислоты легко обнаруживаются на хроматограммах по их ярко-желтой окраске и характерному для них значению R_f .

Полученная динитрофенил-N-аминокислота при диссоциации будет давать анион, который можно легко адсорбировать при нейтральном pH на ионообменной смоле, содержащей четвертичные

аммониевые основания:



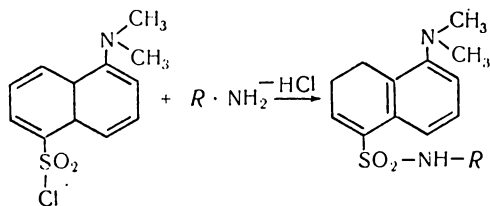
Аминокислоты, которые находились в середине полипептидной цепи, дают производные, которые ведут себя как цвиттерионы и при нейтральном значении pH не сорбируются на анионите. В результате мы избирательно сорбируем нужные нам динитрофенильные N-концевые аминокислоты и определяем их с помощью бумажной хроматографии по R_f , значение которого известно. Но для надежности определение можно вести также в присутствии соответствующего «свидетеля». N-Концевую α -аминокислоту можно определить другими реагентами, например, с помощью фенилизотиоциана а по методу П. Эдмана. При этом образуется сначала фенилтиоурейд, а из него, через нестойкий промежуточный продукт — 2-анилин-5-тиазолинон, возникает устойчивый 3-фенил-2-тиогидантоин. В ре-



зультате N-концевая α -аминокислота отделяется от полипептидной цепи. Этот процесс можно продолжать и отделять последующие N-концевые аминокислотные звенья, что является преимуществом метода Эдмана. Фенилтиогидантоины затем определяют бумажной хроматографией, обнаружением положения пятен с помощью ультрафиолетового света. Местоположение пятен можно определять окрашиванием иодом в присутствии «свидетелей», приготовленных из аминокислот.

Для определения N-концевых аминокислот применяется также довольно часто дансильное производное 1-диметиламинафталин-5-сульфонилхлорид (дансилхлорид). Оно реагирует с аминокисло-

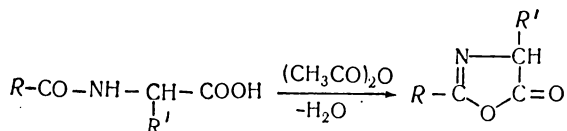
той с образованием соединения, обладающего желтой высокой степени флуоресценцией в ультрафиолетовом свете. Эта реакция име-



ет более высокую чувствительность и позволяет открыть 10^{-3} мкг аминокислоты, тогда как при определении с помощью 2,4-динитрофторбензола необходимо наличие 1 мкг аминокислоты. Высокая чувствительность этой реакции имеет огромное значение, так как в ряде случаев в наличии имеются незначительные количества анализируемого белка.

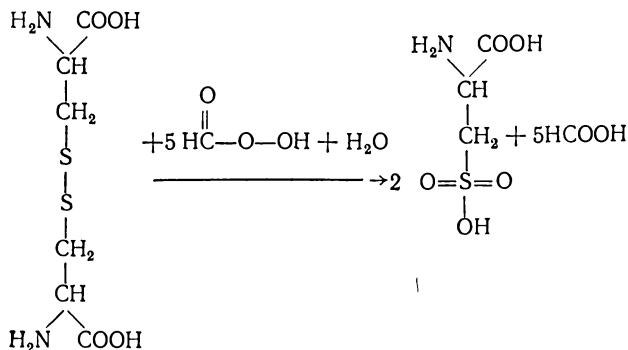
При определении N-концевых звеньев полипептидной цепи можно комбинировать рассмотренные выше реакции. Например, можно сначала определить концевое звено фенилтиогидантоинным методом, а следующее — с помощью 2,4-динитрофторбензола или дансильного производного. По фенилтиогидантоинному методу можно делать десятки определений N-концевых аминокислот с помощью сконструированного Эдманом прибора — секвенатора. Этот прибор позволяет вести анализ автоматически по заданной программе. Поэтому в настоящее время определение последовательности аминокислотных остатков в коротких полипептидах проводится довольно легко. В автоматический секвенатор загружается несколько миллиграммов полипептида. Протекают циклические реакции взаимодействия с изотиоцианатом и затем проводится расщепление безводной соляной кислотой. Полученное в каждом цикле фенилтиогидантоиновое производное аминокислоты разделяют хроматографией. Можно проводить 30 и более циклов. Каждый цикл занимает около 20 минут. Если определение N-концевых аминокислот в полипептидной цепи хорошо изучено и является достаточно надежным, то методы определения C-концевых аминокислотных остатков нельзя считать удовлетворительным. Еще не найдены для этого надежные химические реакции. C-Концевая аминокислота может быть определена по ее восстановлению до аминокспирта. После гидролиза полипептида только C-концевая аминокислота оказывается в виде аминокспирта, который определяется хроматографическим методом. Применяют также ферментативный гидролиз карбоксипептидазой. При этом отщепляется с C-конца пептидной цепи по одной аминокислоте. С помощью кинетического анализа скорости образования свободных аминокислот устанавливается концевая аминокислота. Если гидролиз пептида проводить карбоксипептидазой в меченой воде, то изотоп ^{18}O включается в карбоксильные группы всех освобождающихся аминокислот, кроме C-концевой, которая после этого определяется безошибочно.

Более надежно С-концевая аминокислота определяется с помощью специфической метки ее тритием. При взаимодействии с уксусным ангидридом (в смеси, состоящей из воды $^3\text{H}_2\text{O}$ и пиридина) С-концевая аминокислота циклизуется и образуется оксазолоновое кольцо

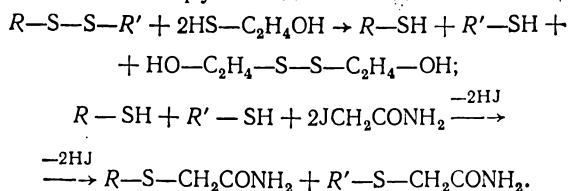


В этих условиях водород кольца обменивается на тритий, и концевая группа метится. Затем после гидролиза пептида смесь аминокислот разделяется хроматографией и определяется радиоактивность каждой аминокислоты на сцинтилляционном счетчике. Таким образом, определением N-концевых и С-концевых аминокислот мы можем установить как число полипептидных цепей в макромолекуле, так и последовательность аминокислотных остатков в небольших пептидах, которые получают при частичном гидролизе белков.

Если оказалось, что макромолекула белка состоит из нескольких полипептидных цепей, то сначала необходимо разделить цепи, которые соединены с помощью дисульфидных мостиков. Последние разрушаются окислением надмуравьиной кислотой, восстановлением сульфгидрильными соединениями. Если дисульфидные мостики



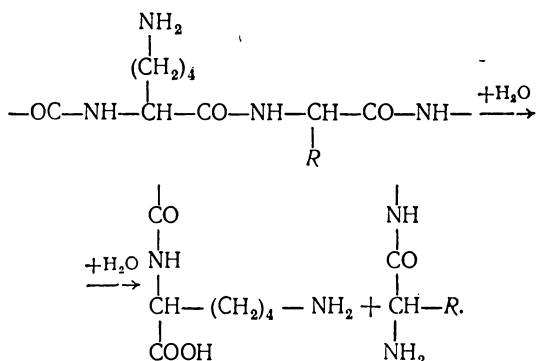
разрываются восстановлением, то образуется две молекулы цистеина. В этом случае необходимо защитить SH-группы от окисления. Для этой цели их алкилируют иодацетамидом.



Когда в макромолекуле белка разрушены дисульфидные мостики, полипептидные цепи могут быть разделены, если в этом есть необходимость. Следующим этапом является определение аминокислотной последовательности в полипептидной цепи. Для этого частично проводится гидролиз белков с помощью HCl или протеолитических ферментов. Но ферментативный гидролиз является специфичным, так как каждый фермент разрывает пептидные связи только между определенными аминокислотами. Загрязнения, которые приносятся в препарат белка ферментом, исключаются тем, что применяются нерастворимые препараты фермента на специальном носителе.

Многие белки не атакуются протеолитическими ферментами в нативном состоянии. Поэтому перед частичным гидролизом их надо подвергнуть денатурации.

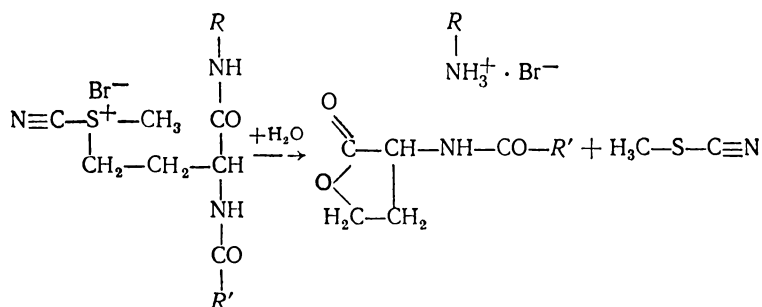
Наиболее строгое специфическое действие на полипептидную цепь имеет кристаллический трипсин, который избирательно разрывает, как правило, пептидные связи, образованные карбонильными группами остатков основных аминокислот — аргинина и лизина. Поэтому в результате гидролиза трипсином образуются пептиды с С-концевым аргинином или лизином, кроме пептида с С-концевым аминокислотным остатком изучаемой полипептидной цепи:



В результате триптического гидролиза полипептидная цепь с хорошей воспроизводимостью распадается на двадцать — тридцать пептидов. Кроме этого, трипсин является эндопептидазой, разрывает пептидную связь только в случае, если рядом имеется другая пептидная связь. Поэтому свободных аминокислот при триптическом гидролизе не образуется. Количество пептидов, образующихся при расщеплении белка трипсином, равно $n + 1$, где n — число аминокислотных остатков аргинина и лизина. Другие ферменты обладают более низкой специфичностью. Химотрипсин разрывает пептидные связи, образованные карбоксильными группами тирозина, фенилаланина, метионина, триптофана, а иногда и другими аминокислотами. Пепсин расщепляет связь, образованную аминогруппой тирозина, а иногда — глицина, аланина, глутаминовой кислоты. Получение с помощью этих двух ферментов

коротких пептидных фрагментов облегчает определение аминокислотной последовательности во всей цепи, так как при этом можно сравнивать пептиды с перекрывающимися последовательностями и располагать их в правильном порядке.

Если в состав пептида входит метионин, то его можно гидролизовать BrCN . При взаимодействии бромциана с метионином образуются сульфоны, и цепь легко гидролизуется по соседней пептидной связи. При этом образуется иминолактон. В этом случае разрыв полипептидной цепи абсолютно специфичен и происходит



по метионину.

Разделение смеси пептидов производится на ионообменной смоле со слабо кислотными карбоксильными группами. При pH около 3—4 карбоксильные группы смолы переходят в недиссоциированное состояние и все пептиды с нее снимаются. Если применить элюирующий буфер, то можно получить количественно все пептиды. Смесь пептидов может быть разделена также на основе их кислотно-основных свойств методом «отпечатков пальцев». Смесь наносится на лист хроматографического картона, пропитанный буфером. Затем ведется электрофорез в течение 10—16 час с электрическим полем 15—25 В/см. После этого в течение суток делают хроматографическое разделение в перпендикулярном направлении в смеси *n*-бутанол — ледяная уксусная кислота — вода в объемном соотношении 5 : 2 : 2. Скорость передвижения каждого пептида пропорциональна его растворимости в органическом растворителе. В результате проявления 0,1% раствором нингидрина положения пептидов обнаруживаются в виде окрашенных пятен — «отпечатков пальцев». Картина разделения хорошо воспроизводится при соблюдении соответствующих условий. В связи с тем что заряд, который несет каждый пептид, зависит от аминокислотных остатков, входящих в его состав, картина их электрофоретического и хроматографического разделения строго постоянна, специфична для каждого белка. Поэтому изменения или замещения даже одного аминокислотного звена в полипептидной цепи могут привести к изменениям картины «отпечатка пальцев».

Для разделения смеси пептидов достаточно широко применяется метод тонкослойной хроматографии. В этом случае разделение

Diagram illustrating the primary structure of the protein, showing a polypeptide chain with various amino acid residues (Фен, Вал, Асп, Гли, Гис, Лей, Цис, Сер, Тир, Про, Ала, Глу, Глн) and disulfide bonds (S-S) connecting different parts of the chain. The chain is labeled with Greek letters alpha and beta, and numbers 1, 21, and 30.

a — цепь, состоящая из 21 аминокислотного остатка; *в* — цепь из 30 аминокислотных остатков.

Изучение первичной структуры белка еще требует огромного труда. Расшифровка последовательности аминокислот в полипептидной цепи обычно весьма длительна. Ю. А. Овчинников и А. Е. Браунштейн расшифровали первичную структуру сложного белка — аспартаттрансаминазы, который состоит из 412 аминокислотных остатков. К настоящему времени расшифрованы структура многих белков и гормонов: вазопрессин, меланотропный и адренокортикотропный гормоны, гипофиза, глюкагон из поджелудочной железы, рибонуклеаза, инсулин, белок вируса гриппа, цитохром *c* и др. (рис. 59, 60,

309

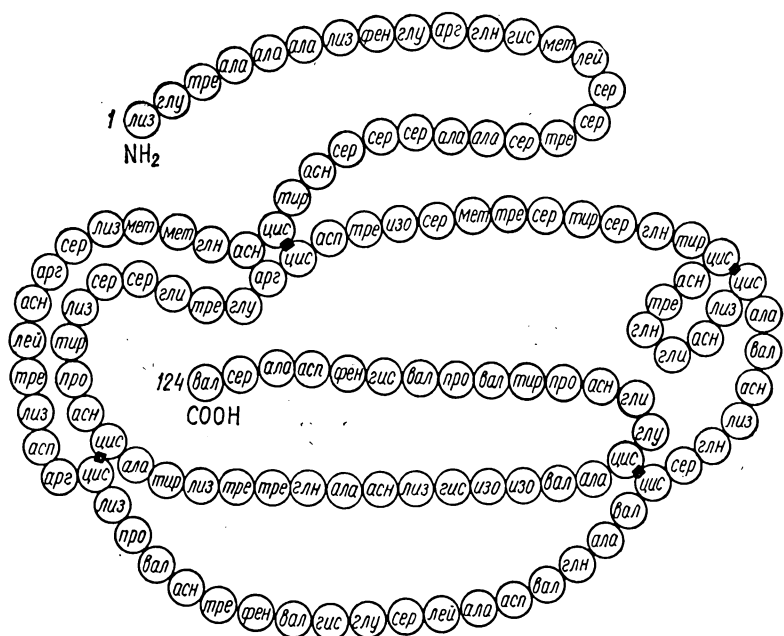


Рис. 60. Структурная формула рибонуклеазы, которая содержит четыре дисульфидных мостика, обозначенных черными квадратиками.

ческой нуклеотидной последовательностью дезоксирибонуклеиновой кислоты в процессах транскрипции и трансляции. Поэтому для понимания реализации генетической информации в биосинтезе специфического белка необходимо знание связи между аминокислотной последовательностью в полипептидной цепи и нуклеотидной последовательностью в молекуле ДНК. Полное знание первичной структуры белка необходимо для понимания пространственного строения конформации белковой молекулы и специфической функции, которую она выполняет. Если мы будем знать последовательность аминокислот в цепи полипептида, то тогда легко установить связь между фенотипическим функциональным проявлением и генетической информацией. Примером тому может служить уже рассмотренное выше изменение молекулярной структуры и функции белка гемоглобина на основе изменения генетической информации (мутации), что, как известно, ведет к изменению фенотипического проявления и возникновению патологического физиологического состояния организма, т. е. возникновению серповидноклеточной анемии.

Большую роль в изучении первичной структуры белка сыграли синтетические полипептиды. В настоящее время получены не только высокомолекулярные полипептиды с молекулярной массой около 100 000, но и синтезирован ряд белков, которые имеют нативную структуру белков и являются биологически активными.

получить полипептид инсулина из 51 аминокислотного остатка необходимо выполнить около 5000 операций.

Однообразие операций при искусственном синтезе белка натолкнуло Р. Меррифилда на мысль сконструировать автомат-синтезатор, с помощью которого осуществляется теперь синтез полипептидных цепей. Например, этот автомат синтезирует две цепи инсулина за несколько дней при обслуживании его одним человеком. С помощью этого автомата синтезирован также белок рибонуклеазы, состоящий из 124 аминокислотных остатков. Автоматический синтез полипептидных цепей можно осуществлять, произвольно меняя очередность аминокислотных остатков. Поэтому значение этого изобретения трудно переоценить.

Из данных, полученных по первичной структуре белка, вытекает важное биологическое обобщение, которое состоит в том, что белки совершенно неродственных организмов, но выполняющие одни и те же функции, имеют близкое строение. При этом чем дальше отстоят организмы друг от друга в филогенетическом отношении, тем число таких различий возрастает. Например, белок цитохрома *c* у человека отличается от того же белка обезьяны только по одной аминокислоте, у кролика — по 9 аминокислотам, у дрожжей — по 45 аминокислотам и т. д.

Выяснение полной первичной структуры некоторых белков дает ответ также и на вопрос о том, что в высокоочищенном препарате одного и того же белка все молекулы имеют абсолютно одинаковую последовательность аминокислот. Если бы в последовательности аминокислот были отклонения и вариации, то из данных, которые получаются при изучении строения различных фрагментов-пептидов, невозможно было бы построить единую последовательность всей полипептидной цепи. Отсюда следует, что в клетке в процессе биосинтеза определенного белка всегда обеспечивается специфическая последовательность включения аминокислот. Однако один и тот же белок, например инсулин, у различных животных абсолютно сходный по гормональной активности, имеет некоторые небольшие (по двум аминокислотным остаткам) различия. В этом заключен большой биологический смысл, который касается генетических проблем и химической эволюции.

Вторичная структура белков. Известно, что двойные связи обеспечивают жесткое соединение атомов, не допускают свободного вращения вокруг оси, т. е. изменение длины связи и угла между ними, тогда как атомы, соединенные простой, одинарной связью, допускают вращение вокруг ее оси, что позволяет соединению иметь

различные конформации. В боковых группах ($R-\overset{\overset{|}{\text{C}}}{\text{---}}\text{H}$), которые
|
примыкают к пептидной цепи, имеется две одинарные связи, вокруг которых возможно свободное вращение. Вследствие этого полипептидная цепь приобретает гибкость. Это позволяет пептидным цепям принимать соответствующую упорядоченную компакт-

ную конфигурацию. Но полипептидные цепи белков имеют только одну нативную конформацию. Это обусловлено тем, что пептидная связь между атомом углерода и азота (C—N) короче, чем эта же связь в других соединениях, т. е. она несет черты и свойства двойной связи, поэтому свобода вращения вокруг нее ограничена.

Конфигурация свертывания пептидных цепей в молекулах белка изучается с помощью рентгеноструктурного анализа, т. е. по рассеянию (дифракции) рентгеновских лучей кристаллом белкового препарата. Электроны структурных единиц кристалла рассеивают рентгеновские лучи. Излучение преимущественно рассеивается кристаллом в определенных направлениях, зависящих от межатомных и межмолекулярных расстояний внутри кристалла. При известной длине рентгеновских лучей по изменению дифракционных углов и интенсивностей рассеянного излучения можно определять в кристалле положение областей с повышенной электронной плотностью. По электронной плотности восстанавливается трехмерная структура молекулы. Структура определяется по сложной дифракционной картине с помощью современной вычислительной техники. Вместе с этим строятся молекулярные модели пептидных цепей, чтобы отыскать наиболее вероятную из возможных конфигураций.

Начиная с 1937 г. Л. Полинг и Р. Кори провели серию тщательных исследований дифракции рентгеновских лучей кристаллами аминокислот и небольших пептидов. На этой основе они строили модели, которые допускали свободное вращение вокруг одинарных связей и небольшие отклонения в их направлении. При этом Л. Полинг придавал большое значение водородным связям в поддержании кристаллической структуры. Вначале он старался не учитывать влияние боковых групп на вторичную структуру полипептидной цепи. Он предсказал, что полипептидная цепь должна иметь такую конфигурацию, которая будет способствовать возникновению наибольшего числа водородных связей между C=O и N—H—группами пептидной связи.

Шесть атомов амидной группы (рис. 62) расположены в одной плоскости, т. е. она компланарна. Это в значительной мере обусловлено связью между углеродом и азотом (C—N), которая имеет

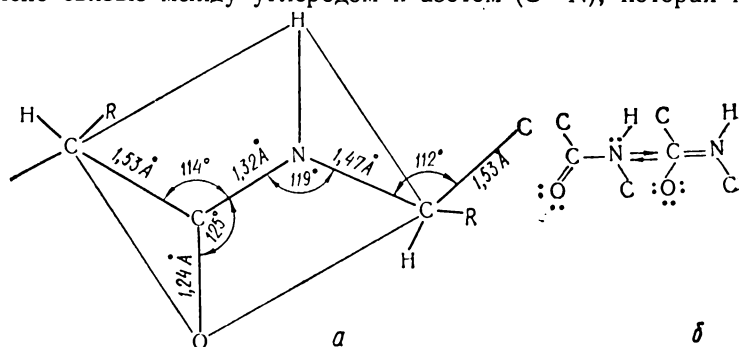


Рис. 62. Структура амидной группы полипептидной цепи:

a — рамка охватывает атомы, которые находятся в одной плоскости; *б* — характер C—N-связи.

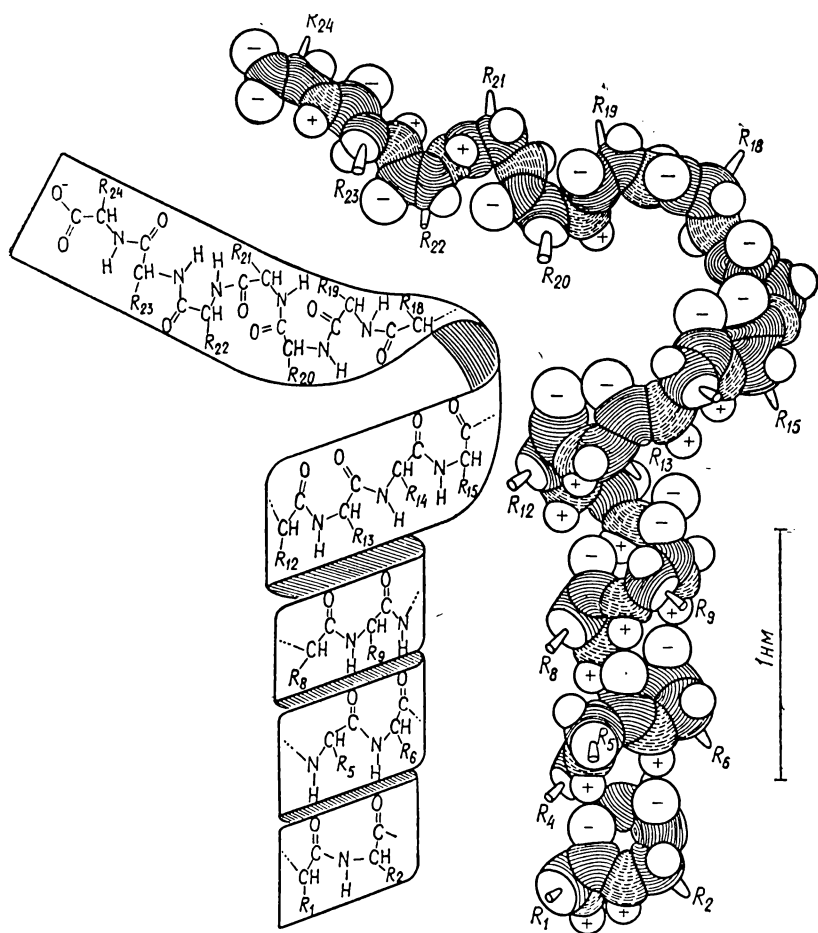
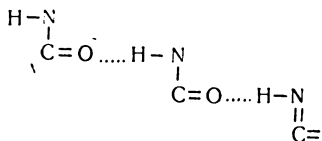


Рис. 63. Молекулярная модель остова пептидной цепи в виде правой α -спирали.

очень малую длину ($1,32 \text{ \AA}$), частично является двойной связью и имеет *транс*-конфигурацию, так как два асимметрических атома углерода расположены в противоположных углах амидной группы.

Если каждую амидную группу в полипептидной цепи несколько повернуть по отношению к соседней, то при этом будет возникать спиральная структура. Между витками такой спирали с помощью амидных групп могут образоваться водородные связи (рис. 63). При этом группа N—H является областью, несущей положительный заряд, а группа C=O — отрицательно заряженной областью. Поэтому атом водорода N—H -группы притягивается к кислороду C=O -группы, в последующих витках спирали. В результате между атомами водорода и кислорода образуются водородные связи. Каждая амидная группа может образовать с другой амидной группой

две водородные связи. При этом карбонильная группа каждого



остатка образует водородную связь с иминогруппой аминокислоты, расположенной от нее на расстоянии четырех аминокислотных остатков вдоль полипептидной цепи.

Таким образом, по модели Л. Полинга и Р. Кори, в α -спирали полипептидной цепи возникают водородные связи между всеми амидными группами, и это обеспечивает структуре максимальную стабильность. Пространственная конфигурация α -спирали имеет следующие характеристики (рис. 64). В одном полном витке укладывается 3,6 аминокислотных остатков, длина шага спирали равна 5,4 Å, а диаметр составляет 10,1 Å, в одной петле, скрепленной водородными связями, имеется три аминокислотных остатка; трансляция, т. е. перемещение вдоль оси на одну аминокислотную

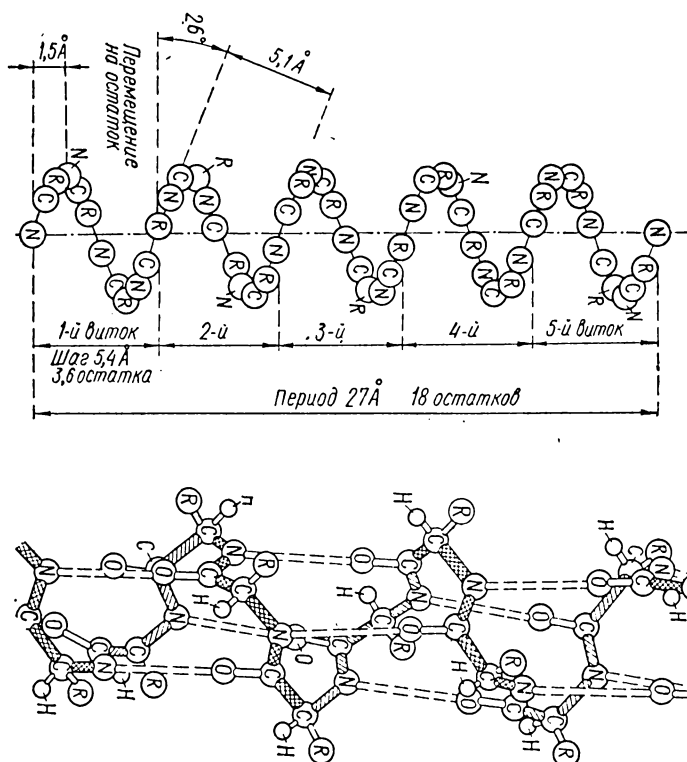


Рис. 64. Характеристика пространственной конфигурации α -спирали полипептидной цепи по модели Полинга и Кори.

группу, равна 1,5 А. Указанная размерность α -спиральной структуры подтверждена многими данными, полученными с помощью рентгеноструктурного анализа полипептидных цепей белков.

Возможно существование двух типов спирали — правой (правозакрученной) и левой (левозакрученной). Но все полученные на белках данные подтверждают наличие правозакрученной α -спирали. Препятствием для образования левозакрученной α -спирали *L*-аминокислотами являются боковые группы, которые оказываются слишком близко расположенными к карбонильным группам. Кроме этого, с помощью рентгеноструктурного анализа миоглобина обнаруживаются отдельные α -спиральные участки молекулы белка, закрученные в правую спираль. Измерения оптического вращения также показывают наличие правой α -спирали в различных белках. α -Спиральная структура, стабильность которой обеспечивает с образованием водородных связей, может быть недостаточно устойчивой в водной среде. Это объясняется тем, что вода конкурирует с белком за образование водородных связей. Стабильность белковой молекулы определяется также и другими силами, в частности взаимодействием между боковыми группами аминокислотных остатков, расположенных в различных участках полипептидной цепи. Таким образом, α -спиральная структура не всегда обладает высокой стабильностью, что обусловлено аминокислотным составом и их последовательностью. α -Спиральные участки с низкой степенью стабилизации служат местами, где происходит изгибание полипептидной цепи, и придают ей определенную лабильность.

Имеется ряд факторов, которые приводят к нарушению спиральной структуры полипептидной цепи белковой молекулы. Некоторые аминокислоты, такие как пролин и оксипролин, не укладываются пространственно в спиральную структуру. В этих участках направление полипептидной цепи изменяется на 103° и спиральная структура прерывается. Имеется обратная зависимость между степенью спирализации полипептидной цепи и содержанием в ней иминокислот — пролина и оксипролина. Регулярность вторичной структуры нарушается дисульфидными мостиками «сшивками». В этих участках создаются напряжения и спиральная структура нарушается. Среди других сил, ведущих к нарушению вторичной структуры белка, немаловажной является форма углеродного радикала боковых групп ряда аминокислот. Взаимодействие между этими радикалами сопровождается значительным возрастанием энтропии при малом изменении энергии. Эти радикалы стремятся собраться и образовать шарик, что приводит к уменьшению поверхностной свободной энергии. Это создает напряжение в полипептидной цепи и приводит к потере регулярной структуры. Кроме этого, между взаимодействием боковых групп аминокислотных остатков и тенденцией полипептидной цепи образовывать спираль имеет место антагонизм. Поэтому взаимодействие между остатками тирозина, глутаминовой и аспарагиновой кислот, путем образования водородных связей, приводит также к нарушению вторичной структуры белка

Спираль разматывается, изгибаются и образуются аморфные зоны. Неспирализованные аморфные части полипептидной цепи, видимо, также выполняют важную роль. Возможно, благодаря им цепи изменяют свое направление, а вся структура в целом приобретает определенную эластичность и гибкость.

Значение радикалов боковых групп аминокислотных остатков для спирализации можно проследить по оптическому вращению растворов полилизина и полиглутаминовой кислоты (рис. 65). Если pH среды смещается в кислую сторону, то каждый остаток лизина имеет положительный заряд. Это обуславливает их взаимное отталкивание и мешает образованию спирали. Если pH смещается в щелочную сторону, то боковые группы остатка лизина оказываются незаряженными и полипептид принимает структуру α -спирали. Но если температуру поднять до 20—35°, то наступает конформационный переход спираль — клубок, а выше 35° — образуется β -структура. Полиглутаминовая кислота, наоборот, в кислой среде теряет заряд карбоксильных групп, поэтому образует α -спираль, а в щелочной принимает структуру раскрученной гибкой нити. При переходе к щелочной среде вдоль α -спирали создаются электростатические силы отталкивания, рвутся внутримолекулярные водородные связи между пептидными группами, боковые группы отталкиваются друг от друга. Разрушается α -спиральная структура. Этот процесс наступает только при определенном pH и всего в пределах 0,2 единицы заканчивается.

По изменению оптического вращения можно определять процент спирализованной части полипептидной цепи. Большинство белков имеет α -спиральную структуру только в части пептидной цепи. Это обусловлено взаимодействием боковых цепей и рядом других факторов. Известен только один белок, тропомиозин, у которого наблюдается почти 100%-ная спирализация цепи. Поэтому под вторичной структурой белка следует понимать сочетание спирализованных участков с нерегулярными, аморфными переходами, в которых нарушены водородные связи.

Л. Полинг и Р. Кори при построении модели вторичной структуры белка пришли к заключению, что полипептидные цепи образуют два типа упорядоченной структуры. Первый тип структуры — α -спираль, в виде которой представлено большинство белков. Вторая

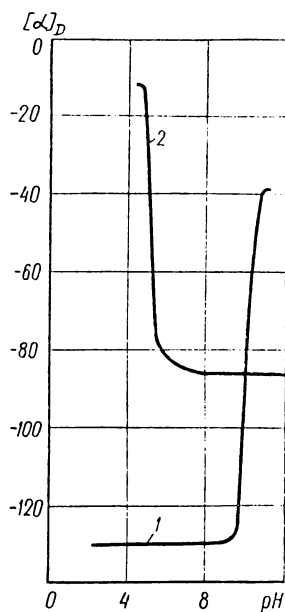


Рис. 65. Оптическое вращение растворов полилизина (1) и полиглутаминовой кислоты (2) в зависимости от pH. Спад кривой обозначает развертывание α -спирали.

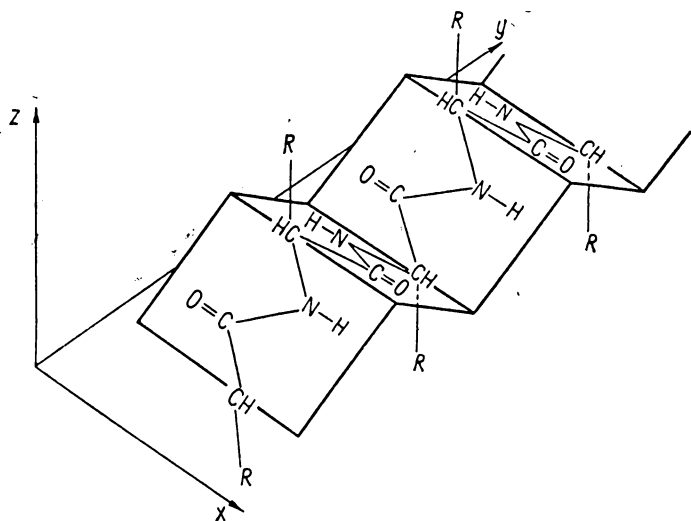


Рис. 66. Пространственная схема укладки β -структуры полипептидной цепи в форме «складчатого слоя».

упорядоченная конформация, в которую могут укладываться полипептидные цепи, была названа *складчатым слоем*, или *β -структурой*. В основе этой структуры лежит также образование водородных связей, но между имидными группами различных полипептидных цепей. При структуре складчатого слоя амидные группы остаются плоскими, а остов собирается в складки (рис. 66).

Водородные связи между CO- и NH-группами параллельно идущих полипептидных цепей идут под прямым углом к направлению цепей. Цепи могут иметь параллельное и антипараллельное направление. β -Структура редко встречается в белках, в частности, она имеется в белке шелка.

Иногда наряду с α -спиральной структурой макромолекулы белка имеют и β -структуру. В определении той или иной вторичной структуры макромолекулы белка решающее значение имеют водородные связи. Причем их значение возрастает, если белок находится в неполярном растворителе. Если же молекулу белка окружает полярный растворитель, который сам образует водородные связи с пептидными группами, то значение водородных связей в стабилизации вторичной структуры снижается. Вода по способности образовывать водородные связи с CO- и NH-группами занимает промежуточное положение. Устойчивость водородных связей ослабевает с повышением температуры, а при 40—50 $^{\circ}\text{C}$, как правило, они разрываются, и происходит разворачивание полипептидных цепей, денатурация белковой молекулы. У термофилов это происходит при более высокой температуре. При быстром затем охлаждении третичная структура не восстанавливается. При медленном охлаждении, отжиге нативная конформация белка может восстанавли-

ливаться. Аминокислотные остатки при этом медленно «узнают» друг друга, и восстанавливается структура с минимальной свободной энергией.

Зависимость структуры полипептидной цепи от растворителя, pH среды, состояния боковых групп особенно четко проявляется у синтетических полипептидов. Полярные растворители снижают значение водородных связей в поддержании вторичной структуры. Боковые группы при одноименном заряде приводят к потере регулярной структуры. Если боковые группы не заряжены, то в зависимости от их взаимодействия между собой и растворителем может быть спирализованная и β -структура. Если у полипептида боковая цепь представлена углеводородом, то он в воде имеет α -спиральную структуру. Когда боковые цепи имеют в своем составе гидроксил, то такой полипептид хорошо растворим в воде и образует клубок. Но если гидроксильные группы закрыты гидрофобным радикалом, то такой полипептид растворяется только в органических растворителях. Таким образом, один и тот же полипептид может принимать различные конформации в зависимости от состояния водородных связей и боковых групп, которые в сильной степени зависят от растворителя, pH среды, температуры.

С большой точностью можно определить в белке области с α - и β -структурой и их размеры только с помощью рентгеноструктурного анализа. Количество пептидных групп, которые образуют водородные связи, можно установить по дейтериевой и тритиевой метке. При этом имидный водород пептидной группы обменивается на водород воды (растворителя) быстро у низкомолекулярных полипептидов и медленно у высокомолекулярных пептидов. Измерением медленно обменивающегося водорода CO- и NH-групп определяется число внутримолекулярных водородных связей и степень регулярности полипептидной цепи. Например, в белке рибонуклеазы из 123 пептидных водородов 70 обменивается медленно. Следовательно, степень спирализации цепи составляет 57%. Процесс перехода белка от α -структуры к неупорядоченному состоянию — статистическому клубку — носит кооперативный характер.

Третичная структура белка. Если полипептидную цепь вытянуть, то она имела бы вид длинной тонкой нити. Но многие нативные белки имеют компактную форму. Форма молекулы глобулярных белков характеризуется отношением длины большой оси к малой $\frac{\delta}{\alpha}$. Размеры этих отношений находятся приблизительно в пределах от 4 до 20. Если полипептидная цепь будет иметь структуру α -спирали, то укорочение длины цепи будет явно недостаточным, чтобы молекула белка приняла почти сферическую форму. И действительно, полипептидная цепь белка вируса табачной мозаики, состоящая из 158 аминокислотных остатков, при образовании α -спирали имеет размер $10 \times 240 \text{ \AA}$, а размеры белковой молекулы этого вируса — $25 \times 75 \text{ \AA}$. Следовательно, вновь синтезированная полипептидная цепь должна специфическим образом, по своему

изгибаться и свертываться, чтобы могла образоваться характерная для этой молекулы белка компактная, пространственная организация. Эту пространственную организацию и называют третичной структурой. Именно все наиболее сложные и тонкие особенности структуры, отличающие одни белки от других, связаны с пространственной организацией белковой молекулы. Это следует также из исключительно высокой специфичности белков-ферментов, из взаимодействия между антигеном и антителом и что активность этих белков зависит от самых незначительных изменений в третичной структуре.

Полипептидная цепь, обладающая высокой энтропией, самопроизвольно образует третичную структуру с меньшей энтропией. Это обусловлено тем, что полипептидная цепь не является изолированной системой и одновременно в окружающей ее воде возрастает энтропийный член. Таким образом, вода обуславливает возникновение третичной функционально активной структуры белковой молекулы.

Белковая молекула в виде трехмерной структуры способна различать трехмерную структуру других молекул, их положение и тип групп, тип заряда и расстояние между ними.

Выяснение нативной трехмерной конформации белков в связи с выполняемой функцией с помощью дифракции рентгеновских лучей является одной из важнейших задач молекулярной биологии.

Таким образом, свертывание синтезирующихся полипептидных цепей, имеющих линейное строение, в компактные белковые молекулы происходит строго детерминировано. Белок приобретает характерную только для него уникальную структуру, т. е. та или иная полипептидная цепь в определенном физико-химическом окружении свертывается только одним способом и принимает ту форму, которая характерна для этого белка. Причем свертывание происходит с большой точностью, что обуславливает специфические функциональные свойства каждого белка. Если по первичной и вторичной структуре белки в принципе аналогичны и имеют общие главные черты, то по третичной структуре каждый белок имеет свое уникальное строение. Поэтому третичная структура макромолекул белков положена в основу условного деления их на фибриллярные, или волокнистые, и глобулярные, хотя между этими крайними формами макромолекул белков нет резкого различия, а существуют переходные формы. Примером первых может быть фиброин шелка, кератин ногтей, волос; вторых — сывороточный альбумин и глобулин. Промежуточное положение занимают миозин, фибриноген, проколлаген, которые входят в состав фибриллярных тел мышц, кожи, фибрина.

Когда синтезированная полипептидная цепь определенным образом свернулась, приобрела форму, которая свойственна нативной молекуле белка, вступают в действие силы, которые стабилизируют пространственную структуру образовавшейся глобулы.

Исключительно важным представляется возможность предсказания с помощью электронно-вычислительных машин третичной струк-

туры белковой молекулы на основе обработки информации о структуре полипептидной цепи. Аминокислотная последовательность определяет трехмерную структуру, которую принимает белковая молекула. Поэтому в основу предсказания третичной структуры белковой молекулы кладутся сведения о том, какие области полипептидной цепи могут оказаться пространственно сближенными, чтобы между ними установилось взаимодействие и возникли силы, стабилизирующие трехмерную организацию молекулы (О. Б. Птицын). Для этого используются параметры электростатического, стерического, вандерваальсового взаимодействия. Определяется конформация каждой пептидной связи, соответствующая минимальному значению свободной энергии. Эти исследования привлекают внимание.

Какие же это силы, которые приводят к образованию стабильности третичной структуры? Этими силами являются различные связи, возникающие между атомами боковых групп аминокислот. Их можно разделить на три вида: водородные, гидрофобные и ионные, а у некоторых белков и ковалентные связи — в виде дисульфидных мостиков, образованных двумя остатками кислоты цистеина. Общие положения о силах, стабилизирующих структуру белковой глобулы, были высказаны еще в 1944 г. С. Е. Бреслером и Д. Л. Талмудом. Ковалентные дисульфидные связи могут возникнуть произвольно при сближении на малое расстояние двух сульфгидрильных групп цистеина (рис. 67).

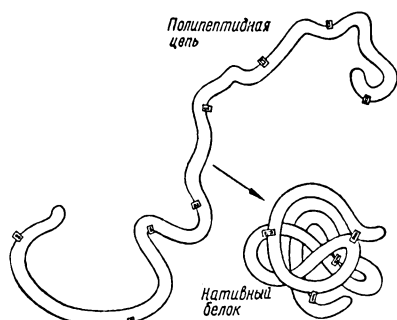
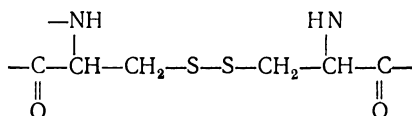
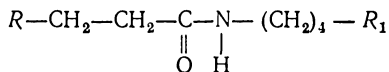


Рис. 67. Роль дисульфидных связей в образовании третичной структуры белковой молекулы. Остатки цистеина на полипептидной цепи обозначены светлыми квадратами. Дисульфидные связи в нативном белке представлены в виде светлых прямоугольников.



Дисульфидные связи можно разорвать действием окислителей (хлорная кислота), восстановителей (цистеин, меркаптоэтанол, дитиозеритрит), сульфитолизом (сульфат натрия). Дисульфидные связи необходимо разорвать всегда, когда приступают к изучению первичной структуры полипептидной цепи. Содержание дисульфидных связей не является обязательным для всех белков. Некоторые белки, например белок вируса табачной мозаики, белки Е. coli и другие, не содержат дисульфидных мостиков. Поэтому мы не можем считать эти связи как основные силы, стабилизирующие третичную структуру белка. Вместе с тем разрушение этих связей,

если они имеются в полипептидной цепи, приводит к потере биологической специфичности и уменьшению стабильности структуры белковой молекулы. Таким образом, если дисульфидные ковалентные связи присутствуют в молекуле, то они вносят значительный вклад в стабилизацию ее структуры. Например, в сывороточном альбумине человека имеется 17 дисульфидных связей, которые фиксируют компактную глобулу этого белка. Осевое отношение в полипептидной цепи альбумина равно 70, но в глобуле оно равняется только 4. Такие изменения в длине и ширине и форме, которую приобретает полипептидная цепь, происходят за счет сильной дисульфидной связи. В действии дисульфидных мостиков проявляется определенная двойственность. В частях полипептидной цепи, где образуются дисульфидные мостики, создается напряжение, что ведет к нарушению вторичной спиральной структуры. Но те участки, где имеется спиральная структура, благодаря дисульфидным сшивкам, меньше подвергаются разрушению тепловыми движениями. Дисульфидные связи могут возникать спонтанно или обратимо восстанавливаться. Например, если восстановить в рибонуклеазе дисульфидные связи меркаптоэтанолом в мочеvine с концентрацией 8 моль, то произойдет инактивация фермента. Если меркаптоэтанол и мочеvinу удалить, то происходит окисление сульфгидрильных групп кислородом воздуха и спонтанное, произвольное восстановление дисульфидных связей. А вместе с этим и почти полностью восстанавливается каталитическая активность рибонуклеазы. Из этого примера следует принципиальный вывод: информация способа свертывания и укладки полипептидной цепи рибонуклеазы, а также, видимо, и всех белков заложена в чередовании аминокислотных остатков, т. е. первичной структуре молекулы белка. Это принципиально важное положение подтверждается тем, что структура белков инсулина, глобулина, лизоцима, химотрипсина, пепсиногена и других ферментов таким же путем была нарушена, а затем восстановлена с сохранением их биологической активности. Ковалентные связи, стабилизирующие третичную структуру белка, могут возникать также между γ -карбоксильными группами остатков глутамина и ϵ -аминогруппами лизина.

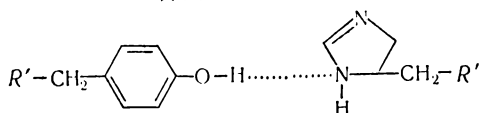


Такие связи называются *изопептидными* и образуются с помощью специального фермента — трансглутаминазы. Такой фермент обнаружен в плазме крови, где молекулы фибрина сшиваются с помощью изопептидных связей.

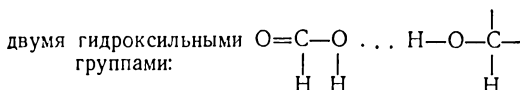
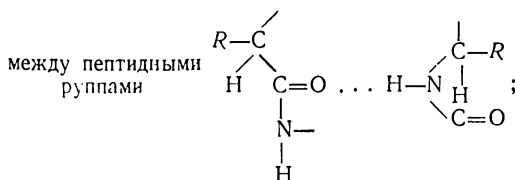
В стабилизации третичной структуры белковой молекулы важную роль выполняют полярные связи — водородные и ионные. Водородные связи относятся к числу более слабых и в водном растворе разрываются при затратах $6,3 \cdot 10^3$ Дж.

Водородные связи возникают между различными боковыми группами полипептидной цепи между атомами водорода и кислорода,

связанными ковалентно. При этом водород имеет положительный, а кислород отрицательный заряд. Такие связи возникают между остатками тирозина и гистидина:

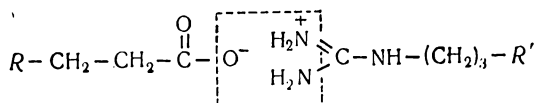


серина и аспарагиновой кислоты: $R'-CH_2-\text{O}-\text{H} \cdots \cdots \text{O}=\text{C}(\text{OH})-\text{CH}_2-R'$;



Водородные связи различаются своей прочностью, которая больше зависит от атома акцептора и от направления водородной связи.

Для физиологических условий, видимо, более выгодными являются связи, образованные атомом водорода, который ковалентно связан с кислородом и азотом. К полярным взаимодействиям относятся ионные или солевые связи, которые возникают между основными и кислотными боковыми группами полипептидной цепи. В образовании ионных или солевых связей участвуют основные группы: ε-аминогруппы лизина, гуанидиновые группы аргинина, аминогруппы N-концевых аминокислот полипептидных цепей, имидазольные группы гистидина и др. Эти основные группы взаимодействуют с кислотными карбоксильными группами глутаминовой, аспарагиновой кислот и C-концевых аминокислотных остатков. Примером может служить образование солевой связи между остатками глутаминовой кислоты и аргинина



Белки, по-существу, в клетке находятся в водном солевом растворе, поэтому при рассмотрении водородных и ионных связей необходимо учитывать, что вода конкурирует с межпептидными водородными связями, а ионы взаимодействуют с межпептидными ионными связями, т. е. полярные группы полипептидной цепи взаимодействуют не только между собой, но и с раствором. Однако водородные и ионные связи имеют большое значение в стабилизации третичной структуры белка. И это объясняется тем, что в клетке неполярные гидрофобные взаимодействия экранируют водородные

Наличие внутри молекулы белка небольших количеств воды подтверждается их компактной структурой, которая установлена рентгеноструктурным анализом.

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \dots \text{C} - \text{CH} - \text{N} \dots \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{C}_6\text{H}_5 \\ | \\ \text{C}_6\text{H}_5 \\ | \\ \text{H}_2\text{C} \\ | \\ \dots \text{CH} - \text{N} \dots \\ | \\ \text{O} \end{array}$$

824

ются слоем структурированной воды с кристаллоподобной структурой, как в кристалле льда, т. е. молекула воды в пограничном слое имеет меньше поступательных и вращательных степеней свободы, чем молекула воды в жидком состоянии.

Поэтому при взаимодействии гидрофобных остатков количество связанной с ними структурированной воды уменьшается. При этом за счет изменения энтропии высвобождается энергия, чем и определяется направление реакции. Для ориентации молекул воды на гидрофобной поверхности требуется затрата энергии. Поэтому при уменьшении структурированной воды в системе энергия выделяется. Отсюда слияние гидрофобных остатков обусловлено не только просто уклонением от соприкосновения с водой, а стремлением к уменьшению общей поверхности, находящейся в контакте с ориентированными молекулами воды. Стабилизация структуры мицеллы поддерживается энергией водородных связей, возникающих между молекулами воды. Это приводит к снижению энтропийного члена молекул воды, к возрастанию сродства и сил притяжения между гидрофильными частями молекул внутри мицелл. В результате такого гидрофобного взаимодействия стабилизируется структура мицеллы. В этом и состоит сущность гидрофобной связи. Таким образом, гидрофобные связи, взаимодействия—это существование специальной формы структурированной воды, покрывающей все жирные боковые цепи аминокислот, контактирующих с молекулами воды. Энергия для образования структурированного слоя очень большая, и это препятствует растворению гидрофобных остатков в воде и содействует слипанию этих остатков.

По-видимому, в кристаллической решетке воды, которая окружает гидрофобные остатки полипептидной цепи, имеются отверстия, в которые входят гидрофобные боковые группы белков. И это, очевидно, обуславливает тот большой вклад, который вносят слои структурированной воды в стабильность третичной структуры белковой молекулы. Поэтому разрушение структурированных слоев воды (температурой, мочевиной, другими реагентами) вокруг гидрофобных групп в молекуле белка приводит к его денатурации.

Таким образом, мы можем считать, что в молекуле белка имеются гидрофобные ядра, области, которые недоступны для растворителя, и там могут протекать реакции в неводных условиях. Гидрофобные взаимодействия слабые в отдельности, но при кооперативности многих таких взаимодействий представляют собой значительные силы стабилизации конформации молекулы белка.

На важность гидрофобных взаимодействий в полипептидной цепи впервые указывали Д. Л. Талмуд и С. Е. Бреслер. По их модели углеводородные неполярные радикалы образуют внутри белковой частицы углеводородную каплю, а гидрофильные и заряженные капли концентрируются на ее поверхности, и это приводит к образованию глобулы.

Г. Шерага установил, что энергетический эффект перехода отдельных углеводородных групп, окруженных водой, в углеводо-

родную каплю — «гидрофобное ядро» глобулы — имеет положительное значение. При этом резко возрастает энтропия. В результате изменение свободной энергии свертывания полипептидной цепи в глобулу $\Delta F = \Delta U - T\Delta S$ содержит отрицательное значение, вносимое углеводородными группами.

Все рассмотренные выше типы взаимодействия между атомами и группами атомов и силы, стабилизирующие третичную структуру белковой молекулы, были известны до работ Д. Кендрию и М. Перутца, которые с помощью метода рентгеноструктурного анализа подтвердили и расширили наши представления о конформации полипептида в белковой молекуле. Этот метод позволяет определить точные координаты атомов в молекуле белка, так как длины волн рентгеновских лучей соизмеримы с межатомными расстояниями. В результате анализа дифракций рентгеновских лучей путем математической обработки устанавливаются координаты всех атомов, из которых состоит молекула белка. На основе этих данных строится пространственная модель третичной структуры молекулы белка. Этот метод не устанавливает положение атомов водорода, их место воспроизводится по положению углерода, азота, кислорода, в котором они связаны. Структура определяется и рассчитывается на основании максимумов рассеяния. С этой целью сравнивается рентгенограмма нормальных кристаллов того или иного соединения и кристаллов, в которых имеется сильно рассеивающий атом или группа атомов. Такими атомами могут быть атомы тяжелых металлов, в частности ртути, которые имеют сродство к сульфгидрильным группам некоторых белков-ферментов. Тяжелые металлы, обладающие высокой электронной плотностью и интенсивно рассеивающие рентгеновские лучи, облегчают математический анализ получаемых дифракционных картин. Например, миоглобин имеет молекулярную массу 16 700, состоит из одной полипептидной цепи, 153 аминокислотных остатков. В миоглобин входит около 2500 атомов, дифракционная картина состоит из 25 000 рефлексов, которые анализируются с помощью быстродействующих вычислительных машин. Для надежности делают несколько изоморфных белковых производных. Тогда на основе сравнения достоверность возрастает. Такое замещение приводит к изменению интенсивностей максимумов рассеяния. Этот метод называется методом изоморфного замещения. С его помощью можно определить структуру белковых молекул. Соединение белка с тяжелым атомом должно быть изоморфно с исходным белком, т. е. кристаллизоваться в той же решетке. Распределение электронной плотности легче воспроизвести с небольших молекул. Точки, в которых электронная плотность максимальна, показывают координаты атомов. Примером может служить карта электронной плотности производного пиримидина (рис. 68).

Как видно, распределение электронной плотности в молекуле, 4,5-диамино-2-хлорпиримидина проявляется все более четко с увеличением степени разрешения. При разрешении в 1,1 Å достаточно четко выступает шестичленная кольцевая структура и заместители

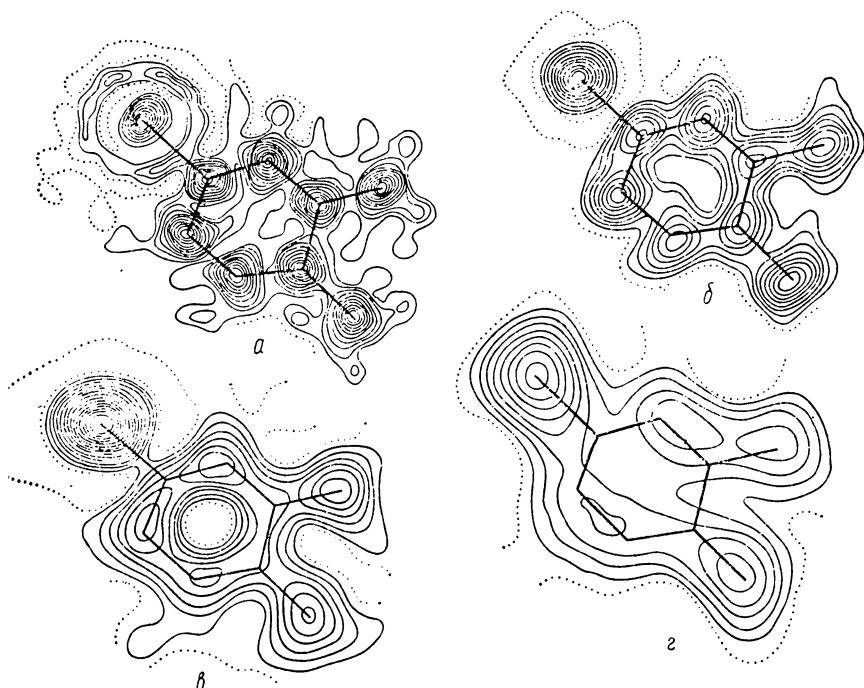


Рис. 68. Распределение электронной плотности в молекуле 4,5-диамино-2-хлорпиримидина. С возрастанием степени разрешения увеличивается четкость шести-членной кольцевой структуры (по Ходжкин):

а — разрешение в 1,1 Å; *б* — разрешение в 1,5 Å; *в* — разрешение в 2,0 Å; *г* — разрешение в 6,0 Å.

в положениях 2,4 и 5. Метод рентгеноструктурного анализа был применен сначала для изучения структуры сравнительно малых молекул (пенициллин, витамин B_{12}), а затем для изучения молекул белка.

Применение метода изоморфного замещения в рентгеноструктурном анализе явилось крупным шагом вперед в разработке этого метода и в исследованиях структурной химии белков. Дж. Кендрию в 1956 г. в Кембриджском университете приготовил производное миоглобина введением в его молекулу тяжелого металла и воспроизвел его третичную структуру (рис. 69). Структура молекулы воспроизведена в виде модели размером 3 м (с масштабом 1 Å = 5 см). На ней видны отчетливо первичный, вторичный и третичный уровни структуры. Молекула миоглобина состоит из восьми спирализованных участков, которые чередуются с неспирализованными участками в местах изгиба полипептидной цепи. Около 70% аминокислотных остатков миоглобина участвует в образовании α -спиральной структуры. Неспирализованные участки содержат много пролина. Внутри молекулы миоглобина удерживается менее четырех

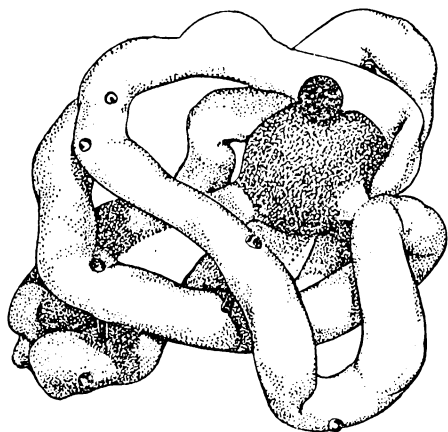


Рис. 69. Конформация цепи миоглобина на основе данных рентгеноструктурного анализа с разрешением 6 Å. Прямые участки имеют спиральную структуру, а участки в местах изгиба — неспирализованную структуру. Видно расположение гема (Kendrew, 1963).

молекул воды. На поверхности молекулы находится большинство полярных групп аминокислотных остатков, которые взаимодействуют с молекулами воды (связанная вода). Гидрофобные группы аминокислотных остатков находятся внутри молекулы. Многие полярные боковые группы сближены между собой на расстоянии 2—3,1 Å, которое позволяет им взаимодействовать между собой.

В 1958 г. М. Перутц установил трехмерную структуру более сложного белка — гемоглобина. Его молекула состоит из четырех субъединиц, каждая из которых близка по своему строению к молекуле миоглобина. Больше того, Перутцу удалось установить изменение формы гемоглобина в процессе образования комплекса с кислородом.

В 1965 г. Д. Филлипсу удалось установить положение всех атомов 129 аминокислотных остатков, входящих в полипептидную цепь лизоцима, и построить трехмерную модель этого фермента (рис. 70).

На этой модели видны места всех 129 аминокислот, составляющих молекулу лизоцима. Из них 55 остатков образуют α -спиральную структуру. По-видимому, конфигурация свертывания полипептидной цепи образуется, когда идет ее синтез на рибосоме. При взаимодействии белка лизоцима с его конкурентными ингибиторами образуется фермент-ингибиторный комплекс. С помощью рентгеноструктурного анализа этот комплекс можно определить и установить, таким образом, место расположения активного центра в молекуле белка (рис. 71). Полипептидная цепь уложена таким образом, что образуется ниша, в которой и располагается активный центр лизоцима, который взаимодействует с полисахаридным субстратом.

В связи с этим большой интерес представляет изучение методом рентгеноструктурного анализа белков-ферментов, активность которых регулируется с помощью аллостерического перехода. Эти белки имеют участки, которые связывают низкомолекулярные соединения, при этом происходят конформационные изменения и этим регулируется их функция. Однако эти конформационные изменения в белке-ферменте и характер их взаимодействия с низкомолекулярными регуляторами можно изучать только методом рентгеноструктурного анализа.

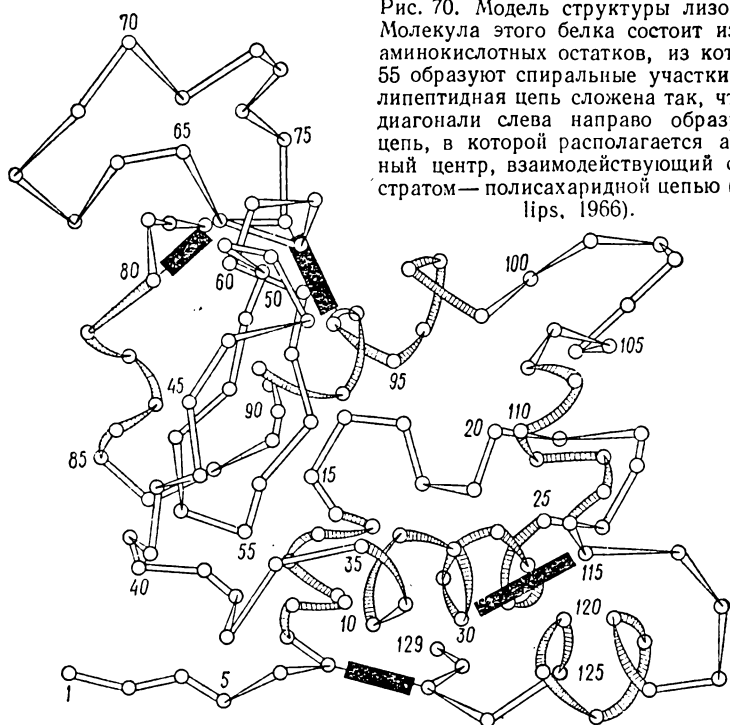


Рис. 70. Модель структуры лизоцима. Молекула этого белка состоит из 129 аминокислотных остатков, из которых 55 образуют спиральные участки. Полипептидная цепь сложена так, что по диагонали слева направо образуется цепь, в которой располагается активный центр, взаимодействующий с субстратом — полисахаридной цепью (Phillips, 1966).

Детальное представление о третичной структуре белков получается при разрешении в 1,5 Å. В этом случае мы можем наблюдать все уровни строения белковой молекулы: последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи, α -спирализованную структуру и β -структуру — участки, образующие складчатую структуру из параллельно и антипараллельно идущих цепей; способ свертывания и укладки полипептидной цепи в молекуле белка — третичную структуру.

К настоящему времени с помощью рентгеноструктурного анализа изучена вторичная и третичная структура белков, имеющих большую и малую молекулярную массу. С разрешением в 2 Å уста-

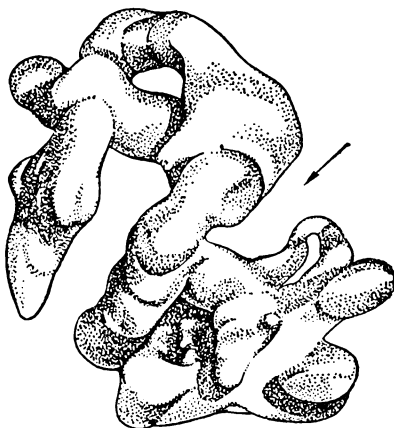


Рис. 71. Трехмерная модель лизоцима, построенная на основе данных рентгеноструктурного анализа с разрешением 6 Å. Стрелка показывает впадину, в которой находится активный центр фермента.

новлена структура рибонуклеазы, химотрипсина, химотрипсиногена, нуклеазы стафилококков, карбоксипептидазы, гемоглобинов, рубредоксина, карбоангидразы и др. С разрешением 2,8 Å воспроизведено строение лактатдегидрогеназы, папаина, инсулина, цитохрома b_5 , цитохрома c , эластазы, трипсина, субтилизина. Лактатдегидрогеназа — наиболее высокомолекулярный из этих белков, так как состоит из 4 субъединиц, в каждую из которых входит по 311 аминокислотных остатков. Кофермент НАД расположен в глубокой щели белковой молекулы фермента. Соединение кофермента с апоферментом вызывает структурные изменения. Некоторые группы смещаются на 12 Å. Конформационные изменения установлены также у лизоцима, когда он соединяется с полисахаридным субстратом. Кроме этого, с разрешением 5—6 Å изучено еще значительно большее количество белков. У этих белков-ферментов определено положение активного центра образованием фермент-субстратного и фермент-ингибиторного комплекса. Как правило, активный центр фермента расположен в углублении, поэтому в его состав входят активные группы аминокислотных остатков, расположенных в разных зонах частях полипептидной цепи. Гидрофобные группы располагаются, как выше было сказано, внутри молекулы. Поэтому они имеют большое значение в действии активного центра, в частности в его взаимодействии с субстратом. Таким образом, все ферменты мы можем разделить на две группы: с гидрофильным и гидрофобным окружением их активных центров. Поэтому действие этих групп ферментов осуществляется в гидрофобных или гидрофильных условиях. В зависимости от этого атакуются гидрофильные или гидрофобные субстраты.

Таким образом, третичная структура белковой молекулы является очень сложной и представлена, как правило, уникальной, специфической для каждого белка укладкой и свертыванием α -спиральных и β -складчатых участков, которые соединяются аморфными звеньями полипептидной цепи. Самым мощным, точным и высокоразрешающим способом изучения третичной структуры белковой молекулы является рентгеноструктурный анализ.

Четвертичная структура белков (ассоциация белковых субъединиц). Все белки, молекула которых состоит из одной полипептидной цепи, имеют только первичную, вторичную и третичную структуру. Четвертичную структуру могут иметь только те белки, в состав молекулы которых входит не одна, а две и больше полипептидных цепей. При этом полипептидные цепи могут быть идентичные и различные. Молекулы большинства крупных белков (с молекулярной массой свыше 50 000) состоят, как правило, из нескольких цепей, которые в среднем содержат от 100 до 300 остатков различных аминокислот и имеют молекулярную массу в пределах от 12 000 до 36 000. Чаще в таких белках содержится четное число полипептидных цепей. Они называются олигомерными белками, а входящие в их состав цепи — протомерами. Количество субъединиц можно определить по минимальной молекулярной массе.

Если в состав белка входит один или несколько атомов металла, то можно определить массу, которая приходится на один атом этого металла. Это и будет минимальная молекулярная масса, т. е. молекулярная масса одной субъединицы. Чтобы узнать число субъединиц в молекуле белка, надо разделить молекулярную массу на минимальную молекулярную массу.

Имеются белки, у которых функционально активная молекула, в свою очередь, состоит из субъединиц. Четвертичная структура белковой молекулы скорее связана и служит для выполнения биологической функции. Это объясняется тем, что четвертичная структура может возникать путем ассоциации субъединиц, а также диссоциировать, разделяться на субъединицы. При этом у разных белков теряется или, наоборот, приобретает функциональная активность. Например, дегидрогеназа фосфоглицеринового альдегида теряет активность, если две субъединицы, составляющие молекулу этого белка-фермента, объединяются. А белок щелочной фосфатазы, транслутаминазы, наоборот, приобретает активность, если его субъединицы объединяются.

Другие примеры. Белки миозин и актин выполняют функцию мышечного сокращения только тогда, когда они образуют волокна актомиозина.

Некоторые белки-ферменты представляют собой крупные комплексы. Например, глутаматдегидрогеназа является сложным комплексом, который при растворении диссоциирует на меньшие субъединицы, или лучше их назвать молекулы, которые сохраняют ферментативную активность и состоят также из нескольких полнпептидных цепей.

В связи с этим в понятие белковой молекулы необходимо вкладывать функциональный критерий, т. е. молекулой является единица, обладающая полной каталитической и регуляторной активностью. Тогда под субъединицей следует понимать две или три цепи, которые связаны между собой, но не обладают полной активностью по сравнению с белковой молекулой.

Если же основой понятия белковой молекулы считать химический критерий ковалентных взаимодействий, тогда мы должны допускать, что двуспиральная молекула ДНК состоит из двух молекул, а единица гемоглобина — из четырех молекул и т. д.

Четвертичная структура поддерживается водородными, ионными или солевыми и гидрофобными связями. Поэтому при нарушении нековалентных связей происходит потеря определенным образом уложенной в пространстве полипептидной цепи и она превращается в беспорядочный клубок, т. е. при нарушениях, которые не связаны с разрывом ковалентных связей, происходит денатурация, утрата специфической конформации белковой молекулы и утрата биологической активности. Четвертичная структура белковой молекулы только начинает изучаться и о ней сведений имеется еще недостаточно. Возможно, что более полное знание четвертичной структуры будет иметь большое значение для понимания функции

молекулярных структур, клеточных органелл, а также ферментов, многие из которых обладают четвертичной структурой.

Четвертичная структура белков лежит в основе понимания строения белков-ферментов. Многие изоферменты имеют четвертичную структуру и состоят из полипептидных цепей, имеющих некоторые отличия в строении. Например, лактатдегидрогеназа состоит из четырех различных полипептидных цепей. Изофермент лактатдегидрогеназы в сердечной мышце состоит из цепей ВВВВ, а скелетных мышц — АААА. Возможно, что биосинтез этих цепей осуществляется различной генетической информацией. В таком случае цепи В и А в изоформах лактатдегидрогеназы могут быть представлены в таких сочетаниях: ВВВВ, ВВВА, ВВАА, ВААА, АААА, т. е. лактатдегидрогеназа должна иметь пять различных форм.

Когда белок лактатдегидрогеназы был выделен и диссоциирован с помощью мочевины и подвергнут разделению электрофорезом, то оказалось пять изоформ этого фермента. Как видно, в клетке может быть образовано пять различных ферментов, отличающихся по физическим свойствам, всего из двух различных субъединиц. Биологический смысл этого явления, его роль в клеточной регуляции остается пока не совсем понятным. Возможно, что функциональная активность белков с четвертичной структурой осуществляется через конформационные изменения пептидных цепей.

Например, гемоглобин состоит из четырех цепей, конформация которых так соответствует друг другу, что они образуют структуру, близкую к сферической. В каждой из четырех цепей гемоглобина имеется по одной гемогруппе, которые между собой взаимосвязаны. Связывание O_2 каждой цепью повышает сродство к кислороду всей молекулы гемоглобина. Гемогруппы находятся друг от друга на расстоянии приблизительно 25 Å. Поэтому их взаимное влияние возможно на основе конформационных изменений в полипептидных цепях. Такое предположение подтверждается ранее известным фактом, что при насыщении кислородом кристаллы гемоглобина лошади принимают вместо гексагональной игольчатую форму.

М. Перутц методом рентгеноструктурного анализа установил, что, действительно, при связывании кислорода субъединицы гемоглобина поворачиваются друг к другу и атомы железа в β -цепях сближаются на 6,5 Å, а α -цепи удаляются друг от друга на 1 Å. Таким образом, мы достаточно подробно рассмотрели структуру белковых молекул, что очень важно для понимания их роли и функции. Все четыре уровня структуры взаимно связаны и вносят свой соответствующий вклад в функциональную активность белков. Каждая из структур белковой молекулы поддерживается в стабильном, устойчивом состоянии с помощью различных связей и взаимодействий. Первичная структура поддерживается сильными ковалентными амидными связями вдоль полипептидной цепи. Энергия этих связей приблизительно равна $418 \cdot 10^3$ Дж/моль. Вторичная структура стабилизируется в основном водородными связями, энергия которых ниже энергии ковалентных связей и составляет

около $21 \cdot 10^3$ Дж. Водородные связи образуются между пептидными группами одной и той же полипептидной цепи и различных цепей. Третичная структура поддерживается в стабильном состоянии различными связями и взаимодействиями; ковалентными, дисульфидными и изопептидными связями, которые возникают между остатками цистеина, а также аминокислотными остатками глутаминовой кислоты и лизина; водородными и ионными (солевыми) связями, а также гидрофобными взаимодействиями.

Четвертичная структура как ассоциация молекул белка, стабилизируется и поддерживается в нативном состоянии с помощью взаимодействия между различными функциональными группами, которые находятся в свободном состоянии на поверхности белковых глобул. Субъединицы, из которых складывается четвертичная структура, являются характерными и высокоспецифическими для каждой белковой молекулы. Образование крупной молекулы белка из субъединиц уменьшает число возможных ошибок при его биосинтезе. Кроме этого, дефектные субъединицы не могут участвовать в самосборке и элиминируются. Это обеспечивает экономию количества ДНК и информационной РНК. Четвертичная структура стабилизируется низкоэнергетическими взаимодействиями. Это обусловлено, видимо, аминокислотной последовательностью соответствующих участков полипептидной цепи, что обеспечивает белок-белковое узнавание и явления самосборки, характерные для белков с четвертичной организацией и для других надмолекулярных структур.

В зависимости от энергии связей и взаимодействия, которыми стабилизируются различные уровни структуры белковой молекулы, можно приложить соответствующее внешнее воздействие и разорвать эти связи. Вторичную и третичную структуру белков можно нарушить изменением температуры, смещением pH, действием агентов разрывающих водородные и ковалентные связи (мочевина, хлористый гуанидин, детергенты, трифторуксусная кислота, меркаптоэтанол, дитиозеритрит и др.). Это приводит к потере нативной структуры и денатурации белковой молекулы.

2. Некоторые физико-химические свойства белков. Белки имеют ряд физико-химических констант, по изменению которых можно судить о их чистоте, индивидуальности, о процессах, в которых они участвуют, и выполняют определенные функции. Большой размер, различные формы, высокая лабильность белковой молекулы потребовали разработку новых методов изучения их физико-химических свойств по сравнению с теми, которые применяются при изучении низкомолекулярных соединений.

Одним из наиболее важных физико-химических показателей белка является молекулярная масса. Молекулярная масса белков может быть определена различными методами: химическим путем, определением содержания элемента, который входит в этот белок. Например, молекулярная масса гемоглобина может быть определена по содержанию железа, инсулина — по цинку и т. д. Гемоглобин

млекопитающих содержит 0,34 г железа на 100 г белка. Атомная масса железа равна 56. Поэтому 0,34 г соответствуют 0,34/56 или 1/165 г-экв. Отсюда количество белка на 1 г-атом железа (56) равно $165 \cdot 100 = 16\,500$, что соответствует массе одной субъединицы. Масса четырех субъединиц равна 66 000. Или расчет можно вести таким образом. В миоглобине, в простетической его группе, имеется один атом железа и составляет 0,335% его массы. Тогда минимальная молекулярная масса этого белка будет равняться:

$$\frac{\text{Атомная масса железа}}{\% \text{ содержания железа}} \cdot 100 = \frac{56}{0,335} \cdot 100 = 16\,700.$$

Гемоглобин, содержащий четыре атома железа, будет иметь молекулярную массу, равную $4 \times 16\,700 = 66\,800$. Аналогичным образом можно определить молекулярную массу белка по аминокислоте, которая содержится в нем в минимальном количестве.

Имеются прямые методы определения молекулярной массы белковой молекулы. Один из них основан на динамической осмометрии. Для этого мешочек из полупроницаемой мембраны наполняется раствором белка и помещается в воду. Вода проникает внутрь мешочка и уровень жидкости в капилляре осмометра поднимается, пока гидростатическое давление не станет равным осмотическому давлению белкового раствора. Осмометр должен быть очень чувствительным, так как крупные белковые молекулы не могут образовывать в растворе высокой концентрации. Молекулярная масса определяется по осмотическому давлению. Зависимость между этими значениями выражается формулой:

$$M = \frac{c}{\pi} RT \quad (c \rightarrow 0),$$

где M — молекулярная масса; c — концентрация белка, г · л⁻¹; R — газовая постоянная (8,314 Дж/(моль · К)); T — абсолютная температура; π — осмотическое давление в атмосферах. Эта зависимость имеет место в случае, если мы имеем дело с очень разбавленными растворами. Поэтому осмотическое давление измеряется при нескольких концентрациях и экстраполируется к нулевой концентрации. Предварительно надо очистить белок от примесей, которые не способны проникать через мембрану, и определение вести при изоэлектрической точке, характерной для данного белка. Определение молекулярной массы по светорассеянию основано на том, что белковый раствор рассеивает падающий свет. Интенсивность рассеянного света увеличивается пропорционально числу и размеру белковых молекул и выражается равенством $1/M = Hc/\tau$, где M — молекулярная масса; c — концентрация (г/мл); H — коэффициент пропорциональности; τ — степень мутности. Подставляя значения H , c и τ , мы определяем молекулярную массу. Молекулярная масса очень часто определяется на основе седиментационного анализа, т. е. на основе седиментации (осаждения) белковых молекул под действием центробежного ускорения, в 200—250 тысяч раз превышающего земное притяжение. Осаждение

идет сверху вниз по центрифужной пробирке. Скорость передвижения границы осаждения регистрируется через определенные промежутки времени фотографированием с помощью оптического приспособления шлирен-методом.

Скорость осаждения выражается через седиментационный коэффициент (S):

$$S = \frac{dx/dt}{\omega^2 x},$$

где x — расстояние от оси вращения; ω — угловая скорость ротора, рад/с; t — время, с. Коэффициент седиментации выражают в единицах Сведберга (S). Единица Сведберга равна $1 \cdot 10^{-13}$ с. Отсюда, например, коэффициент седиментации $12S = 12 \cdot 10^{-13}$ с. Коэффициент седиментации для белков увеличивается с ростом молекулярной массы и находится в пределах от $1 \cdot 10^{-13}$ до $200 \cdot 10^{-13}$ с. Молекулярная масса (M) определяется по уравнению Сведберга:

$$M = \frac{RTS}{D(1 - \bar{v}\rho)},$$

где T — абсолютная температура; R — газовая постоянная, Дж/(моль · К); S — коэффициент седиментации; $\bar{v}$ — парциальный удельный объем белка, величина которого для белков находится в пределах 0,74; ρ — плотность растворителя; D — коэффициент диффузии.

Если получать значение S и D для ряда концентраций белка и экстраполировать их к бесконечному разбавлению, то получается коэффициент седиментации, который называется *константой седиментации* S° . Если форма белковой молекулы сильно вытянута и отличается от сферической, то при определении молекулярной массы по скорости седиментации (осаждения) получаются большие ошибки.

Более точные данные получаются при определении молекулярной массы с помощью седиментационного равновесия. Сущность этого метода состоит в том, что центрифугирование ведут при такой скорости вращения, когда седиментация (осаждение) и диффузия белковых молекул уравниваются, и система приходит в состояние равновесия. При этом устанавливается градиент концентрации белка вдоль пробирки. Измеряется концентрация в каких-то двух точках на различных расстояниях от оси вращения, данные вводятся в уравнение, по которому определяется молекулярная масса:

$$M = \frac{2RT \ln(C_2/C_1)}{\omega^2(1 - \bar{v}\rho)(x_2^2 - x_1^2)},$$

где C_1 и C_2 — концентрации белка в двух зонах пробирки на расстояниях x_1 и x_2 ; R — газовая постоянная; T — абсолютная температура; ω — угловая скорость ротора; ρ — плотность растворителя; $\bar{v}$ — парциальный удельный объем белка. Недостаток этого метода состоит в длительности определения той скорости вращения ротора,

при которой система приходит в равновесие. Чтобы уравновесить процессы седиментации и диффузии, необходимо иногда центрифугировать белок несколько суток.

Для определения константы седиментации, молекулярной массы, разделения молекул по их плотности широко применяется центрифугирование в градиенте плотности сахарозы или хлористого цезия. В случае сахарозы в пробирке создается градиент концентраций этого сахара. Сверху насливают анализируемый образец. При вращении горизонтально качающегося ротора (бакет-ротора) макромолекулы в пробирке сосредотачиваются в зоне, где их плотность совпадает с плотностью раствора сахарозы. По положению соответствующих белков-метчиков с известной константой седиментации определяется константа седиментации изучаемого белка. В случае хлористого цезия при длительном центрифугировании (до нескольких дней) создается градиент плотности вдоль пробирки. Определяется плотность для определенной зоны. При центрифугировании смесь макромолекул распределяется по соответствию их плотности определенной зоне раствора хлористого цезия.

У многих белков молекулярная масса определена методом ультрацентрифугирования. Для приблизительной оценки молекулярных масс широко применяется хроматография, основанная на принципе молекулярных сит. Для разделения молекул, имеющих различные размеры, используются сильно гидратированные полимеруглеводные материалы, изготовленные в виде гранул (сефадекс, агароза и др.). Через колонку, наполненную этим материалом, протекает раствор белка, и сферические молекулы разделяются по их размерам. Этот метод позволяет определить приблизительную молекулярную массу, которая может быть в пределах от нескольких сот до многих миллионов. Кроме этого, определение молекулярной массы какого-то белка можно проводить, не выделяя его из сложной смеси различных молекул.

Важными являются сведения о форме, конформации белковой молекулы. Более полные и надежные данные получают с помощью рентгеноструктурного анализа. Но метод этот очень сложен и применим только на белке в кристаллическом состоянии. Форма, конформация молекул белка в растворе может быть изучена по их диффузии и вискозиметрическим свойствам.

Устанавливается величина фрикционного коэффициента f/f_0 , где f — истинный коэффициент трения белка; f_0 — коэффициент трения белка в форме идеальных негидратированных шариков той же массы. Если величина фрикционного коэффициента близка к единице, то форма молекулы приближается к сферической. Если фрикционный коэффициент сильно отличается от единицы, то форма молекулы имеет вид палочки.

Для определения степени асимметрии макромолекул используется вязкость их раствора. Вязкость раствора белка определяют сравнением скорости его истечения через капиллярную трубку со скоростью истечения растворителя. Степень увеличения времени

истечения раствора белка является мерой его характеристической вязкости. Время сильно увеличивается в случае, когда белок имеет палочковидную форму молекулы.

При определении молекулярной массы динамическими методами исходят из допущения, что частицы, которые осаждаются, имеют форму, близкую к сфере. Нативные белки имеют иные формы, поэтому все вычисления являются приближенными. В связи с этим важно знать размер и форму молекул белка. Для этой цели начинает применяться электронный микроскоп, в помощью которого методом специального напыления можно определить форму и размер молекулы. А по размеру в ряде случаев можно определить и молекулярную массу.

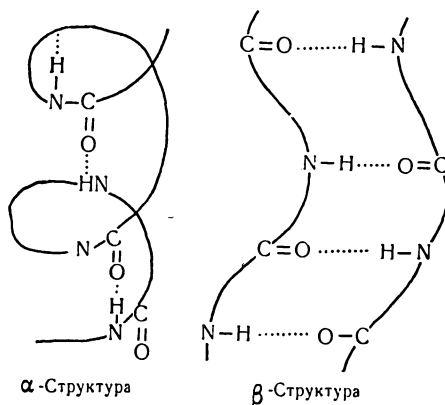
Применяются для напыления полистероловые шарики известного размера. Напыление на сеточку ведется смесью белка с шариками. Подсчитывается число молекул белка и шариков на данной площади. Потом определяют число белковых молекул, которые приходится на вес белка, распределенного на данной площади, по подсчету полистероловых частиц. Общее количество белка под электронным микроскопом нельзя измерить непосредственно. Его определяют косвенным методом, вводя в белковый препарат некоторое количество одинаковых полистероловых шариков известного размера. А затем можно установить молекулярную массу.

С помощью рентгеноструктурного анализа белковых кристаллов можно определить молекулярную массу и форму молекул. Из всех методов изучения структуры молекулы рентгеноструктурный анализ имеет самую высокую разрешающую возможность. К настоящему времени определена молекулярная масса, размер и форма молекул многих белков; эти параметры очень вариabельны у различных белков. Например, у инсулина эти значения равны 6000, рибонуклеазы — 13 000, гексокиназы — 96 000, гликогенфосфорилазы (мышечной) — 495 000, глутаматдегидрогеназы — 1 000 000, гемоцианина — 6 700 000, белка вируса кустистой карликовости томатов — около 10 000 000, вирус табачной мозаики — 40 000 000. Но он состоит из 2130 полипептидных цепей. Крупные молекулы белков обычно состоят из субъединиц. Если сравнивать молекулярные массы полипептидных цепей, то тут различия небольшие. Только у немногих белков масса одной полипептидной цепи превышает 100 000. Форма молекул белка различна и может быть сферической и в виде удлинённой палочки. Но в последнем случае, это обычно полимеры, состоящие из округлых субъединиц. Белковые молекулы, видимо — частицы с жесткой структурой, определенной формы, однородны и с определенной пространственной конфигурацией.

В изучении полипептидов и белков большое значение имеют их оптические свойства. Белки являются оптически активными и поглощают свет в ультрафиолетовой и инфракрасной областях спектра. Оптическая активность обусловлена присутствием ароматических и гетероциклических соединений, имеющих в своем составе

го, принято считать, вся полипептидная цепь находится в состоянии α -спирали.

С помощью инфракрасного дихроизма можно определить α - и β -структуру полипептидной цепи. Для этого изготавливаются препараты макромолекул белка в виде ориентированных пленок.



По инфракрасным спектрам поглощения можно судить о колебаниях некоторых групп, в частности $C=O$ - и $N-H$ -групп пептидной связи. Эти группы подвергаются валентным колебаниям (растяжению) и деформационным колебаниям (отклонение от плоской структуры). Когда молекулы белка представлены вытянутыми пептидными цепями, тогда $C=O$ - и $N-H$ -группы сильнее поглощают падающий поляризованный свет в том случае, если плоскость поляризации ориентирована параллельно направлению растяжения.

Поглощение за счет деформационных колебаний $N-H$ -группы увеличивается, когда растяжение перпендикулярно плоскости поляризации. Это приводит к дихроизму. Различают дихроизм параллельный и перпендикулярный. Если оптическая плотность белка выше в направлении, параллельном оси волокна, чем перпендикулярном, то называется параллельным дихроизмом. Если же оптическая плотность выше в направлении, перпендикулярном оси волокна, то дихроизм называется перпендикулярным. При этом у полипептидной цепи с α -структурой направление валентных колебаний параллельно оси макромолекулы, а с β -структурой — перпендикулярно этой оси.

По разности поглощения света, поляризованного параллельно и перпендикулярно оси ориентации белковой молекулы, можно установить, как направлены группы $N-H$ и $C=O$. Исходя из этого, можно определить α и β структуры исследуемого белка. По дихроизму в инфракрасной области, обусловленному различием поглощения в перпендикулярном и параллельном направлении относительно оси волокна, можно, например, судить о конформации α - и β -кератина. Существует определенная зависимость между максимумами поглощения, соответствующими валентным колебаниям

Связи	α -форма, см^{-1} ¹	β -форма, см^{-1}
C—O, валентные	1650 (1660 / $\parallel$)	1630 ($\perp$)
N—H, деформационные	1540 (1550 / $\perp$)	1520 (1525 / $\parallel$)
N—H, валентные	3290 (3300 / $\parallel$)	3280 (3300 / $\perp$)

¹ Электромагнитное излучение может быть охарактеризовано волновым числом — числом длин волн на 1 см. Отсюда длина волны в микрометрах равна 10 000 деленное на частоту волн. Например, частота 3000 см^{-1} соответствует длине волны в микрометрах: $10\,000 : 3000 = 3,3 \text{ мкм}$.

C—O и N—H, и деформационными колебаниями N—H-связей. Дихроизм валентных колебаний C—O-, N—H-связей в β -конфигурации говорит о перпендикулярном расположении этих групп по отношению к оси волокна. В α -конфигурации эти группы расположены, наоборот, параллельно оси волокна. С помощью инфракрасного дихроизма можно наблюдать за переходом макромолекулы фибриллярных белков из α -структуры в β -структуру и наоборот. Процесс перехода белка из одной структуры в другую более четко наблюдается у синтетических полипептидов, особенно тех аминокислот, которые имеют малые боковые группы. Инфракрасная спектроскопия, с учетом других свойств, в известной мере может служить способом определения трех основных конформаций белковой молекулы: α -спираль, β -структура, статистический клубок.

Белковые молекулы способны изменять плоскость поляризации света, что обусловлено присутствием в аминокислотах асимметрических атомов углерода.

Если электронная оболочка асимметрического атома поддается поляризующему влиянию со стороны групп с положительными или отрицательными зарядами (COO^- , NH_3^+), то может изменяться не только величина, но и знак оптического вращения. Такое влияние групп COO^- и N^+H_3 сильно выражено у аминокислот, где асимметрический атом углерода находится на близком расстоянии и подвержен влиянию этих групп, состояние и заряд которых резко изменяется в зависимости от pH среды.

Что касается белков, то все группы COOH и NH_2 в полипептидной цепи не заряжены, кроме N-концевого и C-концевого остатков. Но их заряд мало сказывается на электронной оболочке асимметрического атома. Таким образом, по физико-химическим критериям мы можем судить о чистоте, форме и размере молекул, о функциональной активности белков.

3. Функции, выполняемые белками. Белки в организме являются наиболее гетерогенной, разнообразной группой соединений, поэтому выполняют важнейшие функции, которые в основном определяют особенности обмена веществ и являются факторами проявления биологической специфичности. Возможно, этим объясня-

ется очень высокое содержание белков в клетках, находящихся в физиологически активном состоянии. В таких клетках содержание белка достигает 85% в пересчете на сухой вес.

Белки в клетке выполняют структурную функцию. Из них состоит остов клеточных органелл и различных других структур. Клетка расчленена на отдельные части — отсеки — с помощью белковых структур, липопротеидных мембран, которые обладают избирательной проницаемостью и выполняют специфическую каталитическую функцию в регуляции определенных метаболических циклов и цепей биохимических реакций. В клетке структурные белки представлены в значительных количествах. Например, частицы, которые осуществляют перенос электронов в окислительном фосфорилировании, содержат белков-ферментов (НАД-, НАДФ-ферменты, флавопротеиды, гемопротеиды) — 17%, растворимых белков — 33%, структурных нерастворимых белков — 50% (в том числе и липопротеиды). Роль структурных белков в частицах, переносящих электроны, сводится к пространственной организации ферментов. Аналогичную роль структурные белки выполняют и в других органеллах клетки: митохондри, рибосомы и др.

Белки наделены чрезвычайно важной способностью распознавания среди множества молекул только тех, которые обладают определенными свойствами, необходимыми для самосборки и самоорганизации биологических структур. Такие белки выполняют важную роль в самосборке сложных ферментных комплексов; цитоплазматических структур (рибосомы и др.); вирусных частиц, пластид и т. д.

Пока мы мало знаем о механизме самоорганизации и самосборки биологических структур на молекулярном уровне. Но с каждым годом все больше накапливается фактов о самоорганизации и самосборке. Изучение механизмов самоорганизации имеет исключительно большое как принципиальное теоретическое, так и практическое значение при создании современных технических устройств.

Белки являются специфическими регуляторами образования клеточной структуры и многочисленных процессов в клетке. Подавляющее большинство белков является биологически активными. Они выполняют каталитическую, гормональную, иммунологическую функции, выступая в роли антигена или антитела, являются физиологически активными соединениями, токсинами, агентами сократительной реакции, избирательного транспорта веществ и т. д.

Все до настоящего времени изученные ферменты являются белками. Белки выступают как ферменты или как апоферменты, хотя не исключена возможность, что каталитическими свойствами могут быть наделены другие макромолекулы.

Механохимические процессы, преобразования химической энергии в механическую осуществляются в клетке с помощью специальных белков. И хотя механохимические преобразования в клетке разнообразны, наблюдаются у организмов различных уровней эволюции, все они имеют одну и ту же молекулярную основу —

изменение механохимических белков — актина, миозина, тропомиозина. Эти белки с высоким коэффициентом полезного действия трансформируют химическую энергию соединений с макроэргическими связями в механическую работу, и этот процесс лежит в основе биологического движения.

Значительная часть веществ с токсическими свойствами, выделенных из растительных, животных тканей, микроорганизмов, являются белками и выполняют различную роль.

Белки обладают способностью генерировать электрический ток за счет энергии окисления питательных веществ или солнечного излучения. Это ведет к возникновению электрического потенциала на мембранах митохондрий хлоропластов. Электрический потенциал используется для выполнения различных видов клеточной работы или переносится вдоль мембран и служит транспортной формой энергии (В. П. Скулачев и сотрудники).

Белки являются одним из основных компонентов биологических мембран, выполняют в них структурную, каталитическую и регуляторную роли.

Специфика мембран, выполняемых ими функций определяется в основном их белковым компонентом. Белки выполняют другие разнообразные биологические функции и составляют молекулярную основу видовых и индивидуальных различий. Все эти функции различных белков будут рассмотрены более подробно в последующих главах.

Список литературы

Бреслер С. Е., Ерусалимский Б. Л. Физика и химия макромолекул. Л., «Наука», 1965.

Гаврилова А. П., Спирин А. С. «Неэнзиматическая» трансляция. — «Журнал эволюционной биохим. и физиол.», 9, 1973.

Гамов Ж., Рич А., Ичас М. Вопросы биофизики. М., Изд-во иностр. лит., 1957.

Гауровиц Ф. Химия и функция белков. М., «Мир», 1965.

Жакоб Ф., Моно Ж. Биохимические и генетические механизмы регуляции в бактериальной клетке. — В кн.: Молекулярная биология, проблемы и перспективы. М., «Наука», 1964.

Жакоб Ф., Вольман Э. Пол и генетика бактерий. М., Изд-во иностр. лит., 1962.

Ингрем В. М. Биосинтез макромолекул. М., «Мир», 1975.

Кендрью Дж. Нить жизни. М., «Мир», 1968.

Киселев Л. Л. Общая характеристика биосинтеза белков. — В кн.: Молекулярные основы биосинтеза белка. М., «Наука», 1971.

Киселев Л. Л. Соединение аминокислот с транспортными (адапторными) РНК — В кн.: Молекулярные основы биосинтеза белка. М., «Наука», 1971.

Краевский А. А., Готтих Б. П. Образование полипептидной цепи белковой молекулы на рибосомах. — В кн.: Молекулярные основы биосинтеза белка. М., «Наука», 1971.

Крик Ф. Н. С. Биологическое воспроизведение макромолекул. М., Изд-во иностр. лит., 1960.

Остерман Л. А. Регулирование биосинтеза белка на уровне трансляции. — «Успехи совр. биол.», 71, 3, 1971.

Перуц М. Дж. Молекулы и клетки, М., «Мир», 1966.

Рич А. и др. Биосинтез белка и его регуляция. М., «Мир», 1967.

- Спигельман С. Регуляторные механизмы клетки. М., «Мир», 1964.
- Спирин А. С. Рибонуклеиновые кислоты — состав, строение, биологическая роль. XIX Баховские чтения. М., «Наука», 1963.
- Anfinsen C. B., Haber E., Sela M., White F. H. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 47, 1309, 1961.
- Dickerson R. E., Geis J. The Structure and Action of Proteins, Harper and Row Publishers, New York, 1969.
- Edman P. A. Protein Sequenator, Europ. J. Biochem., 1, 1967.
- Kendrew J. C. The Three-dimensional Structure of a Protein Molecule Sci., Ann., 205, 96, 1961.
- Kendrew J. C. Myoglobin and the structure of Protein, Science, 1259, 1963.
- Merrifield R. H. Automated Synthesis of Peptides; Science, 150, 1969.
- Nemethy G., Scheraga H. J. Phys. Chem., 66, 1773, 1962.
- Nemethy G. Hydrofobe Wechselwirkung. Angew. Chem., 79, 260, 1967.
- Nirenberg M. W., Matthaei J. H. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 47, 1588, 1961.
- Pauling L., Corey R. B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 37, 205, 1951, 37, 251, 1951.
- Perutz M. F. Structure and function of haemoglobin, J. Mol. Biol. 13, 646, 1965.
- Perutz M. F., Kendrew J. C., Watson H. C. J. Mol. Biol., 13, 669, 1965.
- Phillips D. S. Scientific Amer. offprints. San Francisco, 1966.
- Sanger F. Biochem J. 39, 507 1945, Biochem. J. 45, 563, 1949.
- Scheraga H. Protein Structure. Acad. Press, New York, 1961.
- Spackman D., Stein W., Moore S. Analyt. Chem., 30, 1190, 1958.
- Stein W. H., Moore S. Chromatography, Scientific American offprints, San Francisco, W. H. Freeman and Co., 1951.
- Sund H., Weber K. Die Quartärstruktur der Proteine. «Angew. Chemie», 78, 217, 1966.
- Wolstenholme G. E. W., O'Connor M. Principles of Biomolecular Organisation, Little, Brown and Company, Boston., 1966.

ПРОБЛЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

В предыдущих главах мы познакомились с молекулярными основами жизни, молекулами, которые образуют биологическую структуру и обуславливают выполнение ею определенной функции.

Основными соединениями являются нуклеиновые кислоты, белки, полисахариды, липиды, а также ряд низкомолекулярных соединений, которые выполняют роль дисперсионной среды биологических систем, обеспечивают превращение энергии и различные пути метаболизма, выполняют регуляторную функцию и т. д.

Все эти компоненты, которые составляют высокоорганизованные биологические структуры, возникли абиотическим путем в результате длительной химической эволюции, которая поддается экспериментальному изучению. В настоящее время проведено большое число исследований, в которых имитировались, воспроизводились возможные источники энергии (ультрафиолетовое излучение, электрические разряды, тепло вулканических извержений, радиоактивность) на ранних этапах существования Земли, а также процессы, которые могли протекать в начале химической эволюции между различными неорганическими молекулами — метан, аммиак, водород, окись углерода и др. В результате этого можно считать, что абиогенным путем возникли в далеком прошлом современные биологические молекулы: аминокислоты, пурины, пиримидины, простые сахара, а затем белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды, липиды и др.

При этом считается, что важнейшим промежуточным соединением при образовании всех этих простых, низкомолекулярных органических веществ является цианистый водород, который легко образуется при взаимодействии метана или окиси углерода с аммиаком. Цианистый водород при взаимодействии с ненасыщенными углеводородами образует нитрилы, аминонитрилы, а затем аминокислоты и полипептиды. Если цианистый водород превращается в цианамид, дицианамид, то затем образуются пурины, аминокислоты, порфирины и конденсирующие агенты. Пиримидины образуются из цианацетиленом, предшественником которого является также цианистый водород. Конденсирующие агенты выполняли важную роль. Они способны вызывать поликонденсацию аминокислот, ортофосфатов с

отщеплением молекулы воды, что ведет затем к образованию пептидов и полифосфатов.

Образование из простых молекул биополимеров — белков, нуклеиновых кислот, липидов, полисахаридов осуществляется через один и тот же процесс — дегидратационную конденсацию, в результате которой образуется и выделяется молекула воды. Но в водных системах в присутствии воды гликозидные, пептидные и эфирные связи легко гидролизуются. Поэтому конденсация, соединение исходных мономеров и возникновение полипептидных, полинуклеотидных и полисахаридных цепей должно было осуществляться либо в безводной среде, либо в присутствии конденсирующих факторов, которые выводят из реакции предшественники образования воды.

В предбиологическом синтезе макромолекул функцию конденсирующих факторов могло выполнять производное цианистого водорода — дициандиамид или полифосфаты как предшественники аденозинтрифосфорной кислоты.

При имитации первобытных земных условий (источник энергии, смесь аминокислот, поликонденсирующий фактор) были получены структуры, названные протеиноидами, которые имели молекулярную массу около 10 000 дальтон, состояли из 18 различных аминокислот, обладали некоторыми каталитическими и гормональными свойствами. Также были воспроизведены условия, при которых возникали азотистые основания, рибоза, а затем образовались нуклеозиды, а также нуклеотиды в присутствии конденсирующих факторов — полифосфорные эфиры. Нуклеотиды полимеризовались при этом, но с помощью 2', 5'-фосфодиэфирных связей.

Каким же образом могли возникнуть матричные системы, обеспечивающие воспроизведение полимеров с определенной последовательностью мономеров? С этой целью было изучено взаимодействие между полиуридиловой кислотой и свободными аденозинмонофосфатами. Оказалось, что между последними и остатками уридиловой кислоты в полинуклеотидной цепи возникали водородные связи и самопроизвольно образовывалась спиральная структура. Если в смесь из полиуридиловой кислоты и свободных аденозинмонофосфатных нуклеотидов вводился карбодинимид (первобытный конденсирующий фактор), то при этом образовывалась полиадениловая кислота с 2', 5'-межнуклеотидными связями. Таким образом, наблюдается процесс, который мог осуществляться абиогенным путем, т. е. шла неферментативная матричная элементарная сборка полинуклеотида. Однако пока не удалось показать, что в роли матрицы могут выступать полипептидные цепи.

Одним из важнейших этапов химической эволюции является появление у возникших абиогенным путем макромолекул способности к самоорганизации, на основе которой формировались более высокоорганизованные биологические системы и прежде всего первые живые системы — клетки. Химическая эволюция становится

более или менее понятной на основе экспериментального изучения образования органических соединений в анабиотических первобытных условиях земли. Но переход химической эволюции в биологическую остается неясным.

Этот этап, вернее качественный переход в эволюции, не поддается экспериментальному изучению, воспроизведению процессов появления первичных самоорганизующихся живых систем. Очень трудно, видимо, установить, воспроизвести этот качественный переход от макромолекулярных и надмолекулярных комплексов к биологически активным живым системам, структурам, к клетке, даже в ее первоначальном виде.

Возможно, что переход осуществлялся на основе приобретения новых качеств макромолекулами, надмолекулярными комплексами при образовании структур более высоких уровней организации. При этом определенную роль, видимо, выполняют макромолекулы — носители информации, которыми могут служить нуклеиновые кислоты или белки. По этому вопросу имеется две гипотезы. Одна из них предполагает, что роль первого источника информации выполняли белки. Поэтому первые клетки в виде протобийонтов (А. И. Опарин) или микросфер (С. Фокс) существовали без нуклеиновых кислот. В этих примитивных клетках поток информации должен идти в направлении от белков к нуклеиновым кислотам, что не подтверждается экспериментами в абиогенных первобытных условиях, а также и в современных организмах.

Вторая — генная гипотеза. По этой гипотезе поток информации должен идти от нуклеиновых кислот к белкам. Эта гипотеза базируется на способности нуклеиновых кислот к изменениям, мутациям, к самовоспроизведению на основе заключенной в них информации биосинтеза белка, т. е. нуклеиновые кислоты уже несут в себе ряд черт, характерных для живого. Эта гипотеза находит подтверждение как в экспериментах, которые проводятся при имитации первобытных абиотических условий земли, так и исходя из современных представлений. При этом кладутся в основу такие факты: структура и размножение вирусов как простейших живых существ, находящихся на грани между живым и неживым; разнообразие функций, выполняемых нуклеотидами (предшественники нуклеиновых кислот, переносчики энергии, электронов, сахаров, липидов, ацилов и т. д.); способность нуклеиновых кислот в абиогенных условиях в присутствии конденсирующего агента выполнять функции матрицы для синтеза комплементарных полинуклеотидных цепей, а также способности примитивных тРНК и рРНК выполнять функцию ферментов в примитивном синтезе белка. На основе структурных и химических особенностей нуклеотидов, нуклеиновых кислот, видимо, могла возникнуть примитивная форма жизни. Первыми были гетеротрофные клетки, затем возникли клетки (сине-зеленые водоросли), способные усваивать энергию солнечного света и фиксировать азот атмосферы. С появлением кислорода возникло аэробное дыхание, а затем современная эукариотиче-

ская клетка. Таким образом, в настоящее время в современных организмах мы уже можем представить путь от молекул до образования сложной биологической структуры.

На основе различных низкомолекулярных веществ-предшественников, поступающих из внешней среды, синтезируются мономеры, которые на основе прочных ковалентных связей образуют стабилизированные крупные полимеры — макромолекулы. Последние на основе различных сил стабилизации, связей путем сборки и самоорганизации образуют надмолекулярные структуры, из которых возникают клеточные органеллы, клетки, целый организм.

Очень важную роль на всех уровнях организации, от молекул до образования сложной биологической структуры, имеют форма, размер, поверхность и другие свойства биомacroмолекул. Основным вопросом при этом остается механизм превращения информации, заложенной в ДНК в одномерной форме, в информацию функционально активных трехмерных структур, возникающих на основе полипептидных и полинуклеотидных цепей, их взаимодействия. При этом первичная структура полипептидной цепи предопределяет самопроизвольное образование специфической устойчивой третичной структуры с минимальным запасом свободной энергии. В образовании и стабилизации третичной структуры важную роль выполняет вода как уникальная дисперсионная среда, а также свойства самой полипептидной цепи, ее гибкость, относительная прочность пептидной связи, способность к образованию различных нековалентных связей между боковыми радикалами, их пространственные свойства, полярность.

Роль воды в формировании третичной структуры полипептидной цепи заключается в пространственной взаимной ориентировке ее гидрофобных и гидрофильных групп. Кроме этого, переход полипептидной цепи из первичной организации, не обладающей функциональной информацией, к третичной биологически активной структуре сопровождается понижением энтропии, обусловленным возрастанием энтропии водного окружения. Из этого следует, что возрастание энтропии водного окружения является важным фактором возникновения специфической третичной функционально активной структуры белковой молекулы. Разрушением или восстановлением нековалентных связей можно разрушать или восстанавливать третичную структуру полипептидной цепи.

Четвертичная структура белковой молекулы образуется в результате ассоциации самосборки полипептидных цепей, субъединиц.

Ассоциация субъединиц протекает самопроизвольно и сопровождается также снижением энтропии и повышением энтропийного члена в водном окружении. Таким образом, в первичной структуре белковой молекулы заложена информация, определяющая ее третичную и четвертичную конформацию. При этом информация о четвертичной структуре определяет ее устойчивую стабилизацию

и высокую специфичность в ассоциации только соответствующих субъединиц.

В полипептидной цепи заложена также информация самоорганизации надмолекулярных, многокомпонентных белковых структур, таких как триптофансинтетаза, дегидрогеназа α -кетокислот, комплекс синтетаз жирных кислот и др. Например, в состав надмолекулярного комплекса синтетаз жирных кислот из дрожжей входит семь ферментов, каждый из которых состоит из трех субъединиц. Из этого следует, что в полипептидных цепях, входящих в состав этого надмолекулярного комплекса, должна быть представлена информация о третичной, четвертичной структуре и о типе взаимодействия между всеми ферментами, составляющими этот многокомпонентный ферментный комплекс. Каждый из семи ферментов активен только в составе этого комплекса. Это, видимо, обусловлено изменениями в третичной структуре, которые возникают при образовании всей надмолекулярной системы синтетаз жирных кислот.

В первичной структуре молекул нуклеиновых кислот также заложена информация о более высоких уровнях их организации. Например, между кольцами гетероциклических азотистых оснований возникают π — π -взаимодействия. Образуется структура стопки, в которой ароматические группы располагаются друг над другом. Этому способствует закручивание сахарофосфатных цепей в двуспиральной молекуле нуклеиновой кислоты. Таким образом, в нуклеотидной последовательности уже представлена информация спиральной структуры.

Нуклеиновые кислоты и белки являются информационными макромолекулами, так как в последовательности нуклеотидов и аминокислот заложена определенная структурная или функциональная информация. Полисахариды и липиды не несут информации, так как построены из одинаковых повторяющихся мономеров.

Молекулы белков, нуклеиновых кислот, липидов также несут информацию самоорганизации при образовании биологических структур более высокого порядка — мембраны, рибосомы, митохондрии, вирусные частицы и др.

Например, взаимодействие белков и липидов при самоорганизации мембран осуществляется на основе нековалентных связей, при разрушении которых можно отделить многие липиды от их белковых компонентов. Например, мембрана бактерии *Mycoplasma laidlawii* с помощью детергентов была разделена на белковый и липидный компоненты. При удалении детергента наблюдается самоорганизация и восстановление мембранной структуры.

Процесс самоорганизации при образовании мембран наблюдается и у молекул липидов. Так, смесь полярных и неполярных липидов в водном окружении образует двойной липидный слой между двумя слоями воды. При этом возрастает энтропия водного

окружения. И в этом случае мы видим важную роль воды в образовании пространственной организации липидного слоя. Как видно, живые системы создают специфические трехмерные структуры на основе уникальных свойств воды.

Важно, что образовавшийся двойной липидный слой по толщине, электрическому сопротивлению, различной проницаемости обладает свойством нативных мембран. Если же двойной липидный слой соединить с белковым компонентом, то он приобретает другие свойства естественных мембран — потенциал действия, реакция на антибиотики и др.

На основе информации, кодирующей полипептидные и полинуклеотидные цепи, осуществляется самосборка, самоорганизация других более сложных структур, таких как рибосомы, вирусы, митохондрии и другие органеллы клетки. В процессе сборки биологических структур важное значение имеет взаимное узнавание между различными молекулами.

Проблема белково-нуклеинового узнавания — это частный случай сродства макромолекул, который лежит в основе самосборки биологических структур и взаимодействия веществ в метаболизме. Можно считать, что одна из причин узнавания состоит в процессе образования водородных связей между взаимодействующими молекулами, структурами. Структурные основы узнавания ДНК белками остаются еще полностью неизученными. Проблема узнавания находится в состоянии изучения на основе гипотезы нуклеотидно-аминокислотного кода. Принято считать, что в основе этого узнавания лежат стереоспецифические участки, где боковые радикалы, группа аминокислотных остатков кодирует связь с соответствующими основаниями полинуклеотидных цепей. Но боковые радикалы и группы не несут регулярной системы, поэтому предполагается, что в основе нуклеиново-белкового узнавания лежит код узнавания. Регулярной структурой в полипептидной цепи являются пептидные группы, способные образовывать упорядоченную структуру водородных связей с C—O, N—H и другими группами полинуклеотидной цепи. Поэтому предполагается, что основную роль в белково-нуклеиновом узнавании играет полипептидная цепь, ее пептидные связи. Белки в процессе узнавания выполняют, видимо, ведущую роль. Узнавание проявляется на разных уровнях организации: узнавание между молекулами, клетками, взаимодействием клетки с антигеном, определение компетентности клетки к различным факторам, соединение только клеток определенного типа и т. д.

Живые системы обладают уникальным свойством: они способны воспроизводить самих себя на протяжении длительного времени. Поэтому одной из важнейших задач молекулярной биологии является выяснение механизмов взаимодействия между молекулами, с помощью которых поддерживается живая система, ее воспроизведение и другие первичные отправления.

Глава VII

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СБОРКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР

Разнообразные высокоорганизованные биологические системы способны приспосабливаться к условиям внешней среды, что обуславливает их изменение и развитие. В основе этих процессов лежит механизм самосборки и самоорганизации. Механизмы самосборки и самоорганизации являются движущим фактором эволюции биологических систем. Но выяснение универсальных молекулярных механизмов самосборки сложных клеточных структур и образований стало реально возможным только после успехов молекулярной биологии, в частности на основе подробного изучения структуры белковой молекулы. Белковые молекулы имеют различную степень сложности. У одних белков молекула представлена одной полипептидной цепью, у других — несколькими субъединицами, каждая из которых, в свою очередь, может состоять из нескольких полипептидных цепей.

Образование, возникновение специфической формы белковой молекулы определяется ее первичной структурой. Самоорганизация и самосборка белковой молекулы (если она состоит из нескольких субъединиц) определяется аминокислотной последовательностью в полипептидной цепи. Возможно, существуют и какие-то другие силы, определяющие образование специфической пространственной структуры молекулы белка. Примером может служить процесс самоорганизации и самореконструкции молекулы рибонуклеазы. К. Анфинсен в белке рибонуклеазы разрывал дисульфидные мостики с помощью меркаптоэтанола, а затем с помощью 8 моль раствора мочевины получал развернутую полипептидную цепь. Но после удаления этих двух соединений из реакционной смеси наступал процесс самовосстановления, реконструкции нативной молекулы белка рибонуклеазы. Атомы серы «узнавали» необходимое взаимное положение, дисульфидные мостики восстанавливались в характерном положении и полипептидная цепь пространственно складывалась и принимала нативную конфигурацию. При этом молекула рибонуклеазы приобретала присущую ей ферментативную активность.

Процессы самоорганизации и реконструкции нативного состояния известны для многих других белков-ферментов. Возможно, что одной из возможных причин самоорганизации определенной пространственной конфигурации белковой молекулы является термодинамическая целесообразность, т. е. образование структуры с минимальной свободной энергией. Но если исходить из того, что белки-ферменты даже при пониженных температурах утрачивают свою нативную структуру, то можно предполагать, что существуют кроме термодинамических критериев другие причины, определяющие и стабилизирующие пространственную организацию полипептидной цепи белка.

Процесс реконструкции и самовосстановления специфической пространственной организации наблюдается и на белковых молекулах более сложного строения, т. е. состоящих из нескольких субъединиц. Такие белки также способны диссоциировать на составляющие их субъединицы и даже на отдельные полипептидные цепи, если их подвергнуть воздействию факторами, разрывающими водородные и дисульфидные связи (мочевина, меркаптоэтанол и другие). Если затем снять действие этих условий, то происходит самовосстановление, сборка, белок принимает нативную структуру и становится биологически активным. Например, молекула гемоглобина, состоящая из двух α -цепей и двух β -цепей, которые незначительно отличаются по своей структуре, способна довольно легко распадаться на составляющие ее цепи. α -Цепи и β -цепи в молекуле гемоглобина таким образом взаимно укладываются, что приобретают пространственную структуру, приближающуюся к сферической форме. Четыре полипептидные цепи находятся в определенных взаимоотношениях в процессе выполнения функции гемоглобином. Связывание кислорода гемоглобином сопровождается сближением одной пары субъединиц с другой парой; а высвобождение — их расхождением. После связывания кислорода субъединицы гемоглобина поворачиваются друг относительно друга и расстояние между атомами железа в β -цепях уменьшается на 6,5 Å, а между α -цепями — увеличивается на 1,0 Å.

Эти изменения в положении субъединиц гемоглобина в процессе связывания и освобождения молекул кислорода гемогруппами осуществляются с помощью конформационных изменений, которые наступают в полипептидных цепях. Это подтверждается также тем, что при изменении аминокислотной последовательности только в одном звене полипептидной цепи происходит резкое изменение конформации молекулы гемоглобина, и она принимает вытянутую, серповидную форму.

Субъединицы диссоциированного гемоглобина могут снова соединяться, и при этом восстанавливается нативная функционально активная структура.

Проблема самосборки сложных белковых молекул и субклеточных органелл и структур интенсивно изучается. Существует три типа сборки: самосборка, опосредованная сборка, направленная сборка. В процессах самосборки участвуют только те молекулы, из которых образуется структура. В этих молекулах заложена вся информация, необходимая для взаимного узнавания и образования соответствующей структуры. Другие молекулы в этом процессе не принимают участия.

Опосредованная сборка осуществляется между определенными молекулами, но с участием молекул иного типа, которые являются условием образования структуры, но сами не входят в ее состав. Возможно, что в процессе опосредованной сборки необходима затрата энергии активации молекул, являющихся компонентами возникающей структуры. Эту роль, видимо,

выполняют соответствующие ферменты¹ или другие активные соединения.

Направленная сборка протекает только в присутствии матрицы или затравки. В присутствии матрицы информация сборки точно передается от одной молекулы к другой. В случае затравки какая-то структура выполняет роль инициатора процесса сборки. Без затравки процесс не протекает. Эти три типа сборки и самоорганизации имеют место при образовании различных цитоплазматических структур, пластид, микротрубочек, ферментных комплексов, различных метаболических путей или биосинтезов определенных соединений, вирусных частиц.

1. Самосборка биологических структур. Самосборка наглядно демонстрируется на фибриллярном белке — коллагене, который имеет четвертичную структуру. Волокна коллагена состоят из многих белковых молекул. В растворе разбавленной уксусной кислоты волокна коллагена распадаются, диспергируют на отдельные белковые молекулы. Если к разбавленному раствору уксусной кислоты добавить 1% хлористого натрия, то происходит самосборка белковых молекул и восстанавливаются волокна коллагена.

Самосборка наблюдается на трансациетилазе. Этот сложный белок состоит из нескольких субъединиц и выполняет функцию переноса ацетила от липоевой кислоты к SH-группе кофермента А.

В уксусной кислоте белок диссоциирует на димеры, которые не обладают ферментативной активностью. В результате реассоциации димеров восстанавливается структура фермента и его активность.

Самосборка наглядно наблюдается также на полиферментном комплексе. Теперь известно, что большинство ферментов функционируют, когда они иммобилизованы на мембранной или другой клеточной структуре или образуют комплекс.

Примером самосборки может быть пируватдегидрогеназный комплекс, который состоит из двенадцати молекул пируватдекарбоксилазы, одной молекулы редуктазотрансацилазы липоевой кислоты и шести молекул дигидролипоат дегидрогеназы. Пируватдегидрогеназный комплекс при определенных условиях распадается, диссоциирует на составляющие его ферменты. Все компоненты этого полиферментного комплекса спонтанно собираются, и восстанавливается структура с полной нативной активностью. Таким образом, происходит самосборка идентичных субъединиц различных белков, из которых, в свою очередь, состоит сложный пируватдегидрогеназный комплекс.

Одним из самых сложных является медьсодержащий белок-гемоцианин, выполняющий функцию переносчика кислорода у моллюсков и членистоногих. У краба, например, этот белок состоит из тысячи идентичных субъединиц. Процесс самосборки был изучен на гемоцианине улитки и кальмара. Молекулы этих гемоцианинов содержат различное количество субъединиц, отличающихся по форме. Эти белки были дезинтегрированы и получена смесь

различных субъединиц этих белков. Очень важно, что наблюдалась селективная самосборка. Субъединицы узнавали только себе подобных и не происходило смешивания белков от различных организмов. Безусловно, что информация такой селективной самосборки заложена в первичной структуре полипептидной цепи.

Примером самосборки могут служить митохондриальные частицы, переносящие электроны. Эти частицы размером около 100 Å, в молекулярной массе около 1 400 000 состоят из одиннадцати компонентов, которые функционально объединяются в четыре комплекса в определенном порядке в зависимости от величины окислительно-восстановительного потенциала. Весь этот сложный комплекс при определенных условиях распадается на составляющие компоненты или собирается обратно в строгой последовательности с приобретением функциональной активности.

Самоорганизацией и самосборкой осуществляются процессы образования вирусных частиц. В этом случае наблюдается самосборка более сложных и больших по размеру биологических структур, состоящих из полимеров двух различных типов. Сам процесс восстановления структуры можно контролировать под электронным микроскопом, а нативность реконструированного вируса определять по его инфекционности.

Наиболее изученным вирусом является сравнительно простой и малого размера вирус табачной мозаики. Белковый компонент вируса состоит из 2130 одинаковых субъединиц, представляющих собой полипептидную цепь с α -спиральной структурой, которая при свертывании принимает форму эллипсоида. Частицы этого вируса имеют форму цилиндра, длина которого равна 3000 Å, а ширина — 160 Å (рис. 72). Подробно изучено его электронномикроскопическое строение, установлена последовательность 158 аминокислотных остатков в белковой субъединице, выяснена структура белкового компонента. α -Спиральная структура в белке субъединицы составляет от 25% до 35%. Но ее не следует смешивать со спиральным расположением всех субъединиц в вирусной частице.

В данном случае необходимо обратить внимание на то, что спиральная структура является характерной для организации биомолекул (полипептидные, полинуклеотидные цепи и т. п.). Это обусловлено силами взаимного притяжения между повторяющимися

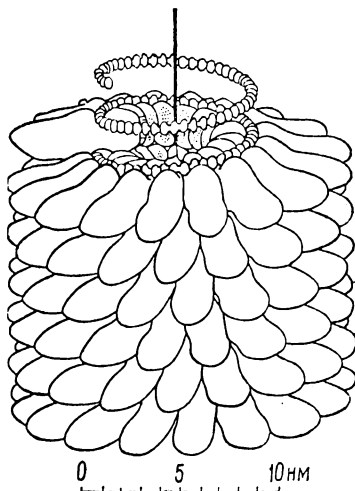


Рис. 72. Схема спиральной структуры вируса табачной мозаики, построенная на основе данных рентгеноструктурного анализа. Верхняя часть цепи РНК показана без поддерживающей ее белковой оболочки.

одинаковыми единицами. При этом каждая единица в пространстве должна ориентироваться по отношению к другой так, чтобы угол между плоскостями соседних связей был одинаковым вдоль всей цепи и соответствовал бы правому или левому повороту. Поэтому спиральная конфигурация будет благоприятной всегда, когда существует притяжение между повторяющимися единицами. В данном случае мы видим, что спиральная структура характерна для различных уровней организации макромолекул. Вирусная частица имеет молекулярную массу, равную $40 \cdot 10^6$. Причем на белковый компонент приходится 95% молекулярной массы частицы, а на долю рибонуклеиновой кислоты — 5%. Если поместить вирусную частицу в слабощелочной раствор, то она диссоциирует на белковые компоненты и на РНК. Молекулярная масса таких субъединиц равна $1 \cdot 10^6$. При переводе диссоциированной частицы вируса табачной мозаики в раствор с более низким рН происходит ее самосборка, восстанавливается нативная структура. Образуются частицы цилиндрической формы, с полостью внутри, наружными и внутренними размерами, характерными для нативной вирусной частицы. Самоорганизация и самосборка протекает таким же образом, как и в нативной вирусной частице. Субъединицы агрегируют в виде спиральной структуры с 16,5 субъединицами на виток. При этом самосборка и образование структуры вирусной частицы может протекать также и в присутствии только белкового компонента. Но в этом случае трубчатая структура будет неустойчивой и менее стабильной, чем целый вирус. Степень агрегации будет различной. Это, видимо, обусловлено присутствием рибонуклеиновой кислоты. Рибонуклеиновая кислота в вирусной частице табачной мозаики имеет вид спирали, расположенной внутри белковой оболочки, и представлена одноцепочечной структурой с молекулярной массой $2,4 \cdot 10^6$, состоящей из 6500 нуклеотидов и имеющей вид спирали с радиусом 40 Å и внутренним цилиндрическим каналом, равным 20 Å. Рибонуклеиновая кислота погружена в бороздку, которая образована белковыми субъединицами.

Цепь рибонуклеиновой кислоты является основой, на которой сцепление субъединиц соседних витков спирали усиливается, т. е. рибонуклеопротеидная структура является более устойчивой. В присутствии рибонуклеиновой кислоты всегда имеет место постоянная степень агрегации и вирусные частицы имеют одинаковую длину 3000 Å.

Причины и механизмы самосборки недостаточно изучены. Но если исходить из того, что рН среды оказывает большое влияние на ассоциацию и диссоциацию белковых субъединиц вирусной частицы, то можно эти процессы связать с активностью карбоксильных групп боковых радикалов полипептидной цепи. Между этими группами возникают водородные связи, и этим контролируется процесс самосборки. Возможно, что при этом участвуют карбоксильные группы боковых радикалов глутаминовой кислоты и их

константа диссоциации возрастает до 7,5. Поэтому самосборка белковых субъединиц не может проходить в условиях нейтральной и щелочной реакций и для этого необходимо участие рибонуклеиновой кислоты, ее гетероциклических азотистых оснований. При этом взаимодействие РНК с белковыми субъединицами энергетически неодинаково в различных участках палочковидной частицы. Энергия взаимодействия РНК с белком выше на концах частицы и это, видимо, объясняется особенностью нуклеотидной последовательности рибонуклеиновой кислоты, т. е. различные основания взаимодействуют с белком с разной силой. Исходя из этого мы можем говорить, что процесс самосборки закодирован в последовательности оснований РНК вируса. Это подтверждается также и данными по получению гибридных вирусов, которые состоят из РНК одного и белка другого штамма. Но в процессе репликации гибридный вирус образует белковые компоненты и частицы того штамма, от которого была взята рибонуклеиновая кислота. Таким образом, образование частиц вируса табачной мозаики является типичным примером самосборки, которая протекает в присутствии только компонентов, слагающих структуру.

На примере самосборки вируса табачной мозаики мы видим спонтанное, самопроизвольное специфическое объединение двух химически различных полимеров, что приводит к реконструкции и образованию «живого» комплекса, «живой» биологической системы, которую можно рассматривать как «организм».

Из этого следует, что на основе взаимодействия двух полимеров возникает структура более высокого уровня организации, которая приобретает новые свойства, качества, присущие живому.

Процессы самосборки других более сложных вирусов изучены недостаточно полно. Но их сборка, по-видимому, протекает с помощью нескольких дополнительных факторов. Все известные вирусные частицы имеют очень большое сходство в своей структуре. Сердцевина их состоит из нуклеиновой кислоты, а оболочка из белковых молекул. Поэтому предполагается, что вирусы имеют один и тот же молекулярный механизм самосборки, во всяком случае бактериофаги. Известно, что при поражении клетки вирусом самосборка вирусных частиц протекает в нативных условиях естественным путем. Можно допускать, что при этом в процессе самосборки могут участвовать как одни белковые компоненты, так и в сочетании с рибонуклеиновой кислотой. Но тогда будут собираться частицы различной устойчивости. В присутствии рибонуклеиновой кислоты будут возникать рибонуклеопротеидные структуры более стабильные и устойчивые. Отбор будет идти в сторону накопления именно этих вирусных частиц. Исходя из этого можно предполагать, что при нативном синтезе и сборке клеточных компонентов происходит аналогичный процесс накопления устойчивых структур.

В процессе эволюции биологических структур действовал тот же принцип отбора, т. е. отбирались те конформации, которые

имели низкую термодинамическую потенциальную энергию как более стабильные. В настоящее время ведутся интересные работы по сборке вирусных частиц из компонентов, полученных *in vitro*. Получен биологически активный вирус ϕ X174. Это делается следующим образом. В ДНК-полимеразной реакции синтезируют вирусную ДНК. С помощью РНК-полимеразы получают иРНК и синтезируют белки, необходимые для сборки фаговой частицы. Достаточно хорошо изучена самосборка рибосомных частиц, которые по своей структуре приближаются к более сложным вирусам. Процесс разборки рибосом при определенных условиях является обратимым. Во всяком случае продукты неполной разборки рибосом способны снова спонтанно воссоединяться и образовывать частицы, которые обладают белок-синтезирующей активностью. Самосборка активных рибосомальных частиц является примером самоорганизации сложных биологических структур. Но возможность самосборки рибосом зависит от степени разделения их на составляющие компоненты. Если разборка рибосомных частиц производится до удаления 50% структурных белков, т. е. до получения минисом, то этот процесс является обратимым. Рибосомы легко реконструируются и приобретают биологическую активность. Если к минисомам добавить отделенный от рибосом белок, то в присутствии ионов магния 28 S и 20 S минисомы специфически воссоединяются с белком и образуют 50 S и 30 S субъединицы рибосомы, способной синтезировать полипептиды.

Были предприняты попытки полностью «раздеть» РНК рибосом *E. coli*, т. е. удалить с них весь рибосомальный белок. Рибосомальная 23S РНК воссоединялась с белковым компонентом в два этапа. Были получены 50 S субъединицы, но они оказались биологически неактивными также и в случае прибавления к ним избытка 5 S РНК, при нагревании и в присутствии ионов Mg^{2+} . Но если брали 23 S РНК и рибосомальные белки из термофильной бактерии, то происходила реконструкция рибосомальных функционально активных частиц. Но при взаимодействии 16 S РНК с рибосомальными белками 30S субчастицы *E. coli* происходит полное реконструирование биологически активных 30 S субчастиц рибосомы. Более успешно самосборка 30S субчастиц протекает при высокой ионной силе (0,3 моль KCl), большой концентрации Mg^{2+} (0,02 моль) и повышенной температуре (37°). Процесс присоединения белка к РНК носит частично кооперативный характер. Самосборка начинается с образования рибонуклеопротеида, который при наличии почти полного набора белков остается биологически неактивным. При повышенной температуре этот функционально неактивный нуклеопротеид в результате пространственной реорганизации и присоединения нескольких дополнительных белков принимает компактную конфигурацию и становится биологически активным. Таким образом, самосборка рибосомной частицы проходит через формирование нуклеопротеидного тяжа и

его специфического сворачивания. Оба эти процесса взаимосвязаны и последняя стадия присоединения белка требует уже тяжа, имеющего специфическую конформацию. Можно считать, что образование рибосом в клетке представляет собой процесс самосборки, который проходит через ряд стадий, т. е. через несколько дефицитных по белку рибонуклеопротеидных частиц предшественников — неосом. Каждая последующая стадия состоит в кооперативном присоединении нескольких белков. При этом у *E. coli* ступенчатое образование рибосомальных 50 S и 30S субъединиц происходит через промежуточные рибонуклеопротеидные частицы: 23S РНК → 25S (28S) РНП → 32S РНП → 38 S РНП → 43 S РНП → 50 S; 16S РНК → 18 S — 22 S РНП → 26S — 28 S РНП → → 30 S. Можно считать, что рибосомы *in vivo* собираются ступенчато из рибосомальной РНК и различных рибосомальных белков.

Сборка 30S субъединиц протекает спонтанно в виде самосборки. Для сборки 50 S субъединиц, видимо, необходимо участие дополнительного фактора на одной из стадий процесса. Исходя из того что в рибосому входит большое число разнообразных белков, которые точно узнают свое место, необходимо допустить наличие организующего начала, которым может служить полинуклеотидная цепь РНК. Таким образом, рибосомальная РНК выполняет роль каркаса или матрицы для специфического размещения на ней молекул рибосомального белка.

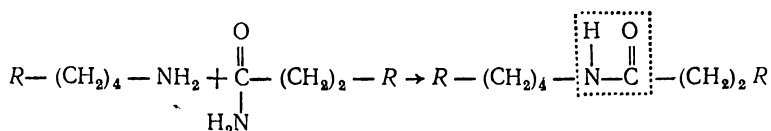
Нуклеотидная последовательность РНК при этом узнается определенным белком, т. е. рибосомальная РНК детерминирует набор и порядок расположения рибосомальных белков на первых этапах самосборки. Затем эту роль выполняют образовавшиеся рибонуклеопротеиды. Между белком и РНК имеет место кооперативный характер взаимодействия, который протекает одновременно отдельно между участками полипептидных цепей и РНК. Благодаря кооперативности самосборки рибосомная частица представляет собой стабильную, устойчивую систему, для разборки которой необходимо приложить энергию, пороги которой выше физиологических. Это гарантирует рибосому от изменений и искажений при различных воздействиях.

Самосборка рибосомальной частицы усложняется тем, что в ее состав должно войти много различных белковых субъединиц со строгим уникальным пространственным размещением. Исходя из этого для безошибочной сборки разных белковых субъединиц недостаточно только белок-белковых узнаваний, характерных для образования обычной четвертичной структуры белка. Поэтому роль ковалентно-непрерывного каркаса для размещения рибосомальных белков выполняет рибосомальная РНК, которая обеспечивает сборку разнообразных белковых субъединиц. Эту роль рибосомальная РНК продолжает выполнять и в процессе функционирования рибосомы. Сборка активных 30 S субчастиц рибосомы происходит и тогда, когда 16 S РНК и белки берутся из различных организмов. Это наблюдалось, когда белки 30 S субъединицы

брались из *E. coli*, а 16 S РНК — из *Azotobacter vinelandii*, *Micrococcus lysodeikticus* и др. Аналогичная картина наблюдалась и в случае, когда 16 S РНК брали от *E. coli*, а белки от других организмов. В обоих случаях образовывались гибридные 30 S частицы, активные в синтезе полипептидной цепи. Все рассмотренные случаи характеризуются тем, что сборка сложных макромолекул и биологических структур происходит без участия каких-либо других молекул или факторов.

2. Опосредованная сборка биологических структур. В ряде случаев сборка может проходить только в присутствии и под контролем внешних факторов, других молекул, которые не включаются в образующуюся структуру. Такая сборка называется опосредованной и в качестве примера может служить образование фибрина. Фибрин имеет молекулярную массу около 330 000 и составляет около 4% белков плазмы крови. Он состоит из шести полипептидных цепей: две А-цепи, две В-цепи, две С-цепи. Каждая пара цепей составляет одну глобулярную единицу молекулы фибрина.

Фибрин образуется из фибриногена после отщепления от него тромбином четырех пептидов: два пептида А типа по 14 аминокислотных остатков; два пептида типа В по 12 аминокислотных остатков. Тромбин гидролизует карбоксильные группы остатков аргинина или лизина. В фибриногене он разрывает четыре связи — аргинин — глицин. Отделение пептидов ведет к изменению свойств молекул фибриногена. Возникают мономеры фибрина, которые агрегируют, и образуется фибрин-полимер в виде сгустка крови. После отщепления пептидов заряд молекулы белка изменяется вследствие перераспределения зарядов на его поверхности. При этом появляются новые открытые участки на мономере фибрина. Это приводит к доминированию сил притяжения над силами отталкивания. Возникновение фибрин-полимера осуществляется в результате образования неполярных и водородных связей. Поэтому этот тип фибрина растворяется под воздействием факторов,рывающих водородные, ковалентные и дисульфидные связи. Растворимый фибрин в плазме превращается в нерастворимый под влиянием трансклутаминазы, которая образует при участии ионов Ca^{2+} изопептидные связи между фибрин-мономерами за счет ϵ -аминогрупп лизина и γ -карбоксильных групп глутамина. Причем актив-

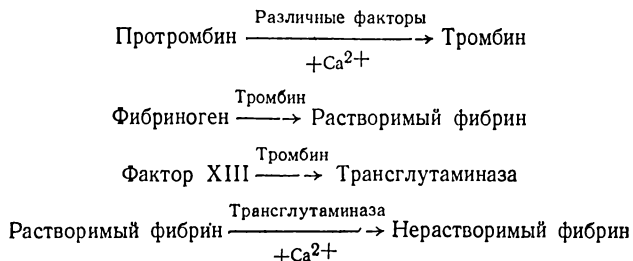


ная трансклутаминаза (фактор XIII) возникает также под влиянием тромбина.

Как видно, процесс образования нерастворимого фибрина является типичным случаем опосредованной структуры при участии

двух ферментов, которые в состав конечного продукта не включаются.

Белок вновь синтезированного на рибосоме фибриногена не имеет структуры, необходимой для образования нерастворимого фибрина. Для этого необходимо воздействие на него двумя белками-ферментами: тромбином и трансглутаминазой:



Нерастворимый фибрин, таким образом, возникает за счет образования поперечных изопептидных ковалентных связей между их молекулами.

Опосредованный тип сборки сложных белковых молекул и биологических структур в клетке, видимо, широко представлен. Таким путем, как образование нерастворимого фибрина, происходит формирование структуры других белков, в том числе пепсина, трипсина, химотрипсина.

Изменение конфигурации молекул белков этих протеолитических ферментов происходит также вследствие гидролиза пептидных связей. Причем этот процесс не всегда приводит к отделению пептида. Последний может оставаться связанным с основной частью белковой молекулы, но при этом происходят изменения вторичной и третичной структуры, и белок-фермент принимает новую конформацию, в результате чего активный центр становится доступным для субстрата или формируется заново.

В некоторых же случаях отщепление пептида приводит к потере активности фермента. Например, при отщеплении 20 аминокислотных остатков субтилизином от белка рибонуклеазы приводит к потере ее активности. Присоединение этого пептида к рибонуклеазе снова восстанавливает ее активность. Возможно, что многие активные белки (гормоны и др.) также вступают в процессы сборки с другими неактивными белками и делают их активными.

В клетке высших организмов представлена большая часть нерастворимых белков. Поэтому можно считать, что вновь синтезированные на рибосомах белки являются растворимыми, а затем в результате дальнейших процессов самосборки или опосредованной сборки образуются нерастворимые белки. Опосредованная сборка лежит также в основе спирализации, конденсации, плотной упаковки ДНК в зрелой частице фага, на стадии метафазы митотического цикла, в головке сперматозоида, в гетерохроматизированных участках интерфазного ядра и т. п. Конденсация ДНК во

всех этих случаях всегда связана с временной потерей ее генетической активности. Считается, что это связано с образованием конденсирующего фактора — белка, который после синтеза в определенном количестве взаимодействует с ДНК, и последняя уплотняется, претерпевает плотную упаковку.

У фагов плотно упакованная ДНК, возникающая в результате самосборки, взаимодействия с белком, имеет специфическую форму, присущую только определенному типу, и поэтому, видимо, выполняет роль стимула, запускающего морфогенетический процесс.

Но образование сложных биологических структур протекает, видимо, одновременно с помощью комбинированных, различных типов сборки. Это мы видим на примере сборки более сложно организованных фагов.

Ранее мы рассматривали (гл. V) более сложный процесс сборки структурных компонентов фага T4, поражающего *E. coli*. В этом случае мы наблюдаем, каким образом генетическая информация определяет молекулярные основы сборки очень сложных биологических систем, которые могут рассматриваться как морфогенетические процессы. Фаг T4 имеет около ста различных генов. Установлено, что у него участвует около сорока генов в кодировании определенных белков, необходимых для сборки нативных фаговых частиц.

На основе формирования так называемых дефектных фаговых частиц, изучения процесса образования из них нативных фагов самосборкой их частей (головка, отросток, фибриллы) получены новые важные сведения. Сборка осуществляется в строгой последовательности. Сначала соединяется путем самосборки головка с отростком без участия ферментов. Затем с помощью опосредованной сборки присоединяются фибриллы с участием соответствующего белка, образование которого контролируется геном № 9 фага. Фибриллы, в свою очередь, собираются с участием пяти белков. При сборке на основе кооперативных взаимодействий каждая включенная в структуру субъединица претерпевает конформационные изменения и становится способной к взаимодействию и связыванию со следующей субъединицей.

Таким образом, комбинированные типы сборки, видимо, лежат в основе образования сложных субклеточных структур, клетки, морфогенеза у высших организмов. Возможно также, что сложные клеточные органеллы могут образовываться из готовых блоков на основе их сборки на структуре-затравке, структуре-матрице.

3. Направленная сборка биологических структур. В настоящее время известен способ сборки биологических структур, который протекает только в присутствии инициатора процесса полимеризации. Этот способ называется направленной сборкой и он наблюдается в частности при образовании жгутиков у бактерий. Если из жгутиков бактерий *Salmonella* выделить белок флагеллин, то в присутствии фрагментов этих жгутиков он агрегирует. При

этом центром полимеризации флагеллина является конец фрагмента жгутика. Процесс полимеризации и агрегации флагеллина жгутиков разных штаммов *Salmonella* протекает с разной скоростью. В ряде случаев агрегация флагеллина определяется типом жгутиков, фрагменты которых выступают в роли инициаторов полимеризации. Но окончательная морфология жгутика определяется также и мономерными единицами белка флагеллина. Например, брали различные типы жгутиков *Salmonella* по длине волны их колебаний. Затем при реконструкции брали затравку и белок одного и того же типа. В результате образовывались жгутики этого же типа. Но если брали в роли затравки фрагменты от одного типа жгутика, а белок от другого типа, то получали жгутики с длиной волны колебаний, характерной для жгутиков, от которых был взят белок. Таким образом, возникновение одной биологической структуры обусловлено другой точно ей подобной структурой. В клетке флагеллин синтезируется под контролем информации, которую несет дезоксирибонуклеиновая кислота. Но информация полимеризации флагеллина и образования жгутиков частично идет от самих жгутиков. Такой способ сборки, видимо, широко представлен в клетке. Например, при сборке хлоропластов, митохондрий, имеющих свои самовоспроизводящие системы (ДНК, рибосомы), по-видимому, существуют также и другие компоненты, которые контролируют сборку клеточных структур.

В цитоплазме клеток известен ряд структурных элементов, характер сборки которых остается недостаточно выясненным. К таким структурам относятся микротрубочки, элементы митотического веретена и др. Происходит образование их методами самосборки, опосредованной сборки или направленной сборки пока не известно.

Весьма сложными и наименее изученными являются молекулярные механизмы функциональной организации самосборки мембран. Принято считать, что сборка этих структур идет по способу ауторепликации, когда липопротеиды в виде отдельных молекул или агрегатов встраиваются в готовые уже мембранные структуры. Например, комплекс, состоящий из внутренних мембран митохондрии и АТФ-азной активности, был дезагрегирован, а затем собран с частичным сохранением нативной структуры и биологической активности.

Биологические структуры являются строго определенными как по своему пространственному строению, так и по выполняемой ими функции. Поэтому процессы их сборки должны регулироваться с очень высокой точностью и воспроизводимостью. Это вытекает из строгой синхронности во времени и пространстве важнейших биологических процессов: клеточное деление, рост и дифференциация; образование различных органелл в клетке, удвоение различных клеточных структур и т. д. Однако о регуляции сборки клеточных структур мы знаем очень мало. Молекулярные механизмы сборки клеточных структур остаются слабо изученными. И хотя

такие клеточные структуры, как митохондрии, хлоропласты, хромосомы и другие, являются самовоспроизводящимися, тем не менее остаются непонятными механизмы их сборки.

Список литературы

- Калъвин М. Химическая эволюция. М., «Мир», 1971.
Кастлер Г. Возникновение биологической организации. М., «Мир», 1967.
Келленбергер Э. Молекулы и клетки, вып. 3. М., «Мир», 1968.
Поглазов Б. Ф. Сборка биологических структур. М., «Наука», 1970.
Принципы самоорганизации. М., «Мир», 1966.
Спирин А. С. и др. Некоторые проблемы макромолекулярной структуры рибонуклеиновых кислот. М., Изд-во АН СССР, 1963.
Спирин А. С. и др. Самосборка рибосомоподобных частиц из РНК и белка. Молекулярная биология, I, 1968.
Спирин А. С. Гаврилова А. П. Рибосома. М., «Наука», 1971.
Allen J. M., *Molecular Organisation and Biological Function*. New York, Harper and Row Publishers, Inc., 1967.
Fraenkel-Conrat H. *Scientific American* offprints, San Francisco, W. H. Freeman and Co., 1956.
Cross J. *Scientific American* offprints. San Francisco, W. H. Freeman and Co., 1961.
Henning U. *Multi-enzyme Complexes*. *Angew. Chim. Intern. Ed. Engl.* 5, 785, 1966.
Hosokawa K., Fujimura R., Nomura M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 55, 198, 1966.
Ivanov V. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 34, 803, 1969.
Lerman M. J. et al. *J. Mol. Biol.*, 15, 268, 1966.
Meselson M. et al. *J. Mol. Biol.*, 9, 696, 1964.
Nomura M., Erdmann V. A. *Nature*, 228, 744, 1970.
Ovchinnikov J. V. et al. *Biochem. Biophys., Res. Commun.*, 39, 217, 1970.
Stechelin T., Meselson M. L. *Mol. Biol.*, 16, 245, 1966.
Perutz M. G. *Scientific Amer* offprints San Francisco, 1964.
Wolstenholme G., O'Connor M. *Principles of Biomolecular Organisation*, Boston, Little Brown and Co., 1966.
Wood W. B., Edgar R. S. *Scientific American* offprints, San Francisco, W. H. Freeman and Co, 1967.

Глава VIII

МЕМБРАНА КАК УНИВЕРСАЛЬНАЯ ЭЛЕМЕНТАРНАЯ СТРУКТУРА КЛЕТКИ

В клетке имеется строгая регуляция перемещения веществ; протекают одновременно синтез и распад и другие противоположно направленные процессы в гидрофильных или гидрофобных условиях; различные вещества распределены неравномерно между субклеточными структурами; соединения, имеющие большое реакционное сродство, не вступают в химическое взаимодействие; имеет место активный транспорт веществ против градиента концентрации; осуществляются различные биоэлектрические явления, в частности потенциал действия на основе избирательного активного перемещения ионов; многие метаболические циклы пространствен-

но разделены; и т. п. Все это объясняется тем, что между окружающей средой и клеткой, а также между различными ее органеллами существует система специфических полупроницаемых барьеров — мембран. Одной из причин возникновения мембран могут быть уникальные свойства воды. Вода не является в ряде процессов оптимальной дисперсионной средой. Это могло быть причиной разделения внутриклеточного пространства на части образованием перегородок, мембран. С помощью сложной системы различных мембран клетка осуществляет свою биологическую активность. Мембраны составляют приблизительно две трети сухой массы клетки. На мембранах протекают фундаментальные процессы превращения и регуляции веществ и энергии. Прокариотические (предъядерные) клетки (например, сине-зеленые водоросли, бактерии) не имеют высокоорганизованных клеточных органелл, сформированного ядра, митохондрий, но у них четко представлена ламеллярная липопротеидная структура.

1. Типы мембран. Все мембраны клетки можно разделить на общие и специализированные. К общей относится плазматическая (клеточная) мембрана, или плазмалемма, которой окружена клетка. Она выполняет функцию барьера проницаемости и регулирует скорость передвижения различных веществ из окружающей среды в клетку и из нее. Клеточная мембрана является активным барьером проницаемости веществ, так как она содержит специфические каталитические, активные участки. Мембрана имеет толщину, равную 80—100 Å, и состоит из трех слоев различной электронной плотности. Внутренний слой обладает меньшей электронной плотностью. У большинства микробных клеток плазматическая мембрана покрывается клеточной стенкой, которая представляет собой мукополисахарид сравнительно простого строения. Но у многих прокариотов и растений клеточная стенка является многослойной структурой и образуется с участием специальных ферментов, которые соединяют отдельные субъединицы, мономеры в полимеры сложного строения. Клеточная стенка является продуктом секреции самой клетки и состоит у микроорганизмов из сахаров, аминокислот, аминокислот и липидов, а у растений — из высокополимеризованных углеводов. Если удалить клеточную стенку, то остается сферопласт — цитоплазма, окруженная клеточной мембраной.

Клеточная мембрана может иметь форму в виде выступов, выростов, выпячиваний и впячиваний. С помощью впячиваний клетка захватывает некоторое количество жидкости из окружающей среды (пиноцитоз). Так, гетеротрофная клетка получает метаболиты. Клеточная мембрана выполняет также роль связующего звена между клетками с помощью десмосом. Десмосомы представляют собой утолщения клеточных мембран, где проходят цитоплазматические нити, соединяющие цитоплазму двух смежных клеток.

Клеточная мембрана составляет единое целое, неразрывную систему с внутриклеточными мембранами и имеет с ними большое структурное сходство. Таким образом, все мембраны клетки в

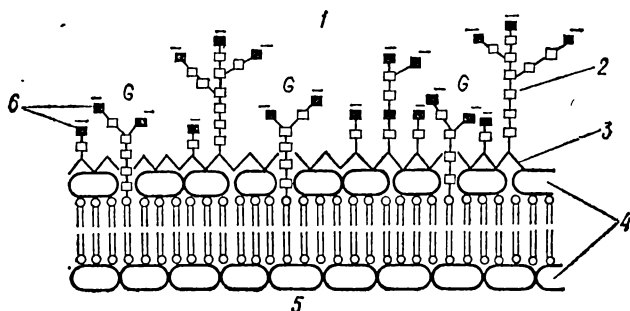


Рис. 73. Схема модели большой мембраны. Показаны не только липопротеидная структура, но и поверхностная оболочка на ее наружной стороне (Lehninger, 1968):

1 — межклеточное пространство; 2 — боковые цепи олигосахаридов; 3 — гликопротеидный комплекс; 4 — структурный белок; 5 — цитоплазма; 6 — остатки сиаловой кислоты.

принципе имеют одинаковое молекулярное строение. Исходя из этого мы можем говорить об универсальности структуры, которая лежит в основе построения различных мембран клетки. Все содержимое клетки пронизано сетью разной формы полостей, окруженных мембранами. Эта сеть называется эндоплазматической сетью и является универсальной для всех эукариотов. Клеточная мембрана соединяется с мембранами эндоплазматической сети и представляет с ними единое целое. Мембраны эндоплазматической сети имеют шероховатую (гранулярную) и гладкую (агранулярную) поверхности. На поверхности шероховатых мембран размещаются рибосомы. Эндоплазматическая сеть имеет различную форму в зависимости от типа клетки, ее физиологического состояния, этапа индивидуального развития. Эта сеть в клетках мышц особенно сильно развита и называется саркоплазматической сетью. Эндоплазматическая сеть выполняет роль транспортных каналов, по которым идет передвижение веществ внутри клетки и между клетками.

Эндоплазматическая сеть, в свою очередь, образует единую систему с мембранами ядра, комплекса Гольджи, органеллой в виде системы пузырьков, ограниченных мембранами и расположенных вблизи ядра. Функция аппарата Гольджи полностью не выяснена, но она может быть связана с биохимическими реакциями, для прохождения которых необходимы мембраны.

Ядерная оболочка представлена двумя мембранами — наружной и внутренней. В процессе деления ядра ее оболочка отсутствует. В конце деления вновь образуется. В оболочке имеются поры, которые, возможно, служат для переноса макромолекул из ядра в цитоплазму. На наружной мембране имеются рибосомы, и она переходит в мембрану эндоплазматической сети. Таким образом, клетка эукариотов имеет переплетающуюся систему мембран, которая, с одной стороны, связывает ядро с цитоплазмой, а последнюю с внешней средой; а с другой, делит клетку на отдельные части, компартменты, имеющие свою специфичность. Клетки высокоорга-

низованных организмов содержат различные общие и специализированные мембранные системы. У бактерий имеется одна сложная мембрана, но в ней представлены все типы мембранных систем, которые имеются у более организованных организмов.

Плазматическая мембрана отличается от клеточной стенки, не имеющей мембранной структуры. Особенно четко клеточная стенка представлена у микроорганизмов и растительной клетки (рис. 73). Плазматическая мембрана отделяет внутреннюю среду клетки от внешней, регулирует поступление ионов, молекул в клетку и из нее. В плазматической мембране специализированных клеток размещены гликолитические и другие ферменты и белки, необходимые для выполнения специфической функции.

В эндоплазматической сети осуществляются многие биохимические процессы: синтез белков, жирных кислот, фосфолипидов, процессы детоксикации и др. У высших организмов белоксинтезирующая система связана с эндоплазматической сетью, а у бактерий находится в особых выступах плазматической мембраны.

Ядерная мембрана принадлежит к общим мембранным системам, и представлена у всех организмов, хотя у бактерий хромосома не окружена общей мембраной.

Мембранные системы митохондрий и хлоропластов не обнаружены у одноклеточных организмов, но функционально эквивалентные структуры у них имеются в виде субъединиц, локализованных в выступах плазматической мембраны. В специализированных клетках плазматическая мембрана приспособлена к выполнению соответствующих функций: пищеварения, всасывания, передачи нервных импульсов, секреции, избирательного поглощения и т. д. Эндоплазматическая сеть специализированных клеток также образует мембранную систему, приспособленную к выполнению определенной функции: сократительной, транспортировки ионов и т. п.

2. Структурная организация мембран. Мембраны представляют собой замкнутые системы в виде трубок, полого шара, колбы, диска, полость которых заполнена жидким содержимым, и ограничены поверхностным липопротеидным структурированным слоем. Их структурированный поверхностный слой, возможно, в ряде мембран представлен повторяющимися липопротеидными частицами. Мембраны отличаются динамичностью и пластичностью, что видно, в частности, из их способности изменять свой объем. Стабильность структуры мембран поддерживается связями относительно низкой энергии, которые легко разрываются ультразвуком, ионной силой. В мембране, видимо, имеются повторяющиеся единицы, выполняющие разную функцию, которая определяется характером набора белков, их специфической ферментативной активностью. Например, масса элементарной частицы внутренней мембраны митохондрий с диаметром $150 \text{ \AA}$ равна $1,3 \cdot 10^6$. В ее состав входит ок. 30 молекул белка с молекулярной массой 250 000 и около 600 молекул фосфолипида с молекулярной массой около 800. Форма мембран определяется взаимной конформацией их компонентов

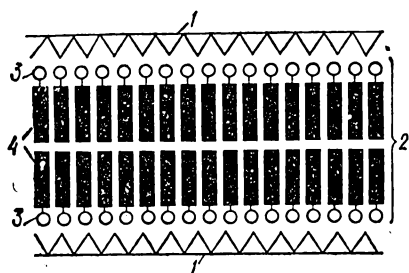


Рис. 74. Схема трехслойной структуры клеточной мембраны:

1 — белковый слой; 2 — липидный слой; 3 — гидрофильная; 4 — гидрофобная части молекулы липида.

с минимальной свободной энергией, более устойчивой в физиологических условиях.

Химический состав биологических мембран давно известен. Они образуются вследствие взаимодействия белков и липидов. Но молекулярная структура и организация этих двух типов соединений в связи с выполняемой мембраной функцией остается полностью невыясненной. Липиды в мембране выполняют роль цементирующего инертного фактора.

Но не исключается и их функциональная роль. Из плазматической мембраны выделен ряд белков-ферментов, которые соединены и удерживаются липидным компонентом. Для каждого типа мембран является характерной величина соотношения между специальными типами полярных липидов, и это контролируется на генетическом уровне. Для мембран являются также характерными типы структурных белков. Присутствие в мембране липидного компонента было установлено еще в двадцатые годы нашего столетия в результате анализа мембран эритроцитов (клеточные тени). Оказалось, что в эритроцитах содержится такое количество липидов, которого достаточно для того, чтобы покрыть их поверхность бимолекулярным слоем. Затем позднее, при измерении силы поверхностного натяжения между белком и маслом, оказалось, что она равняется приблизительно силе поверхностного натяжения клетки. Поэтому было сделано предположение, что в состав клеточной мембраны входит также белок.

После этого была высказана гипотеза о элементарной мембране, состоящей из бимолекулярного липидного слоя, в котором гидрофобные части молекулы направлены внутрь друг к другу, а гидрофильные — к белковым слоям, лежащим по обе стороны от липидного слоя (рис. 74). Белок представлен мономолекулярным слоем, полипептидные цепи находятся в β -конфигурации. Толщина мембраны составляет 75 Å, из них 35 Å занимает липидный слой и по 20 Å два белковых слоя. При электронно-микроскопическом изучении лиофилизированного материала оказалось, что более лабильным является средний липидный слой. Это легко объяснить, так как бимолекулярный липидный слой стабилизируется слабыми силами вандерваальсовых взаимодействий. Изучение химического состава было проведено также на мембранном материале бактериального протопласта (тени бактериального протопласта), миелиновой оболочке нерва, мембранах митохондрий и других объектах.

В настоящее время можно получить также мембраны ядра, эндоплазматической сети, ламеллы хлоропласта и др. Тени бактериальных протопластов получают, также как и тени эритроцитов,

разрушением протопластов в гипотоническом растворе с последующим центрифугированием и осаждением мембранного материала. Клеточная стенка бактерий перед этим гидролизруется ферментами и остается бактериальная клетка, ограниченная цитоплазматической мембраной.

Содержание белков в мембранах эритроцита составляет 60—70% (вместе с белками-ферментами активного переноса), в бактериальной цитоплазматической мембране *Staphylococcus aureus* — около 40% (в том числе белки некоторых ферментов), в миелиновых оболочках нерва — от 20 до 40%, в мембранах митохондрий — 50—60% (вместе с белками-ферментами цепи переноса электронов). Содержание липидов в этих мембранах составляет соответственно: 37%, 20%, 60% и 50%.

Большое внимание при изучении химического состава мембран уделяется основным компонентам — белкам и липидам. Но имеются данные о присутствии в мембранах углеводов, нуклеиновых кислот. Однако нет уверенности в том, что наличие этих соединений является следствием недостаточной очистки мембран при их выделении. Особенно это касается рибонуклеиновой кислоты, так как рибосомы иногда остаются вместе с выделенными мембранами.

В мембранах обнаруживаются катионы (например, магния), которые выполняют роль факторов, стабилизирующих их структуру. Магний присутствует в кислой фракции фосфолипидов, с которыми он может образовывать хелатные комплексы и уплотнять их укладку в мембране. В состав мембран также входит вода и находится в них в особом «нежидком», связанном состоянии, в котором она не вымораживается при понижении температуры. Удаление воды приводит к изменению белок-белковых и белок-липидных

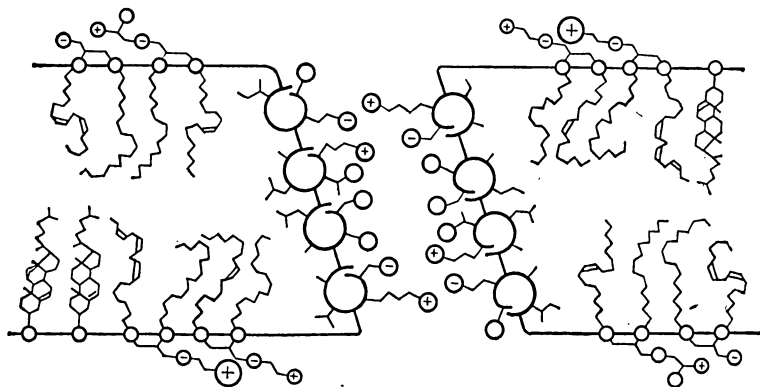


Рис. 75. Схема включения молекул белка в бимолекулярный слой полярных липидов. В результате изменения вторичной и третичной структуры белка образуются водные каналы с полярными группами белка. Двухвалентные ионы (Ca^{2+}) могут служить связующим звеном между отрицательно заряженными группами. При низких концентрациях Ca^{2+} поры расширяются и увеличивается проницаемость мембран для воды и ионов.

взаимоотношений. Допускается, что связанная вода также выстилает в мембранах поры слоем около 22 Å и определяет через нее транспорт веществ (рис. 75).

До настоящего времени остается окончательно невыясненным относительное расположение компонентов мембран и характер связи между ними. Если исходить из того, что в процессе выполнения функции отдельными частями мембраны происходит изменение связей и взаимоотношений между ее компонентами, то вопрос становится чрезвычайно сложным. Поэтому в настоящее время следует говорить о взаимоотношении между главными компонентами мембраны — белками и липидами.

Известно, что структура белковых молекул определяется и стабилизируется с помощью сочетания ковалентных, водородных, электростатических, гидрофобных связей и сил вандерваальсовых взаимодействий. Липиды имеют полярные и неполярные группы и радикалы, что придает их молекуле выраженную полярность и способность к упорядоченной ориентировке в пространстве и образованию структур. В стабилизации структуры мембран играют основную роль электростатические силы и силы вандерваальсового и гидрофобного взаимодействия. Неполярные группы липида взаимодействуют с водой, которая принимает структурированное состояние на гидрофобных участках. В результате происходит выталкивание воды и взаимное притяжение этих участков. При этом повышается энтропия, уменьшается свободная энергия системы.

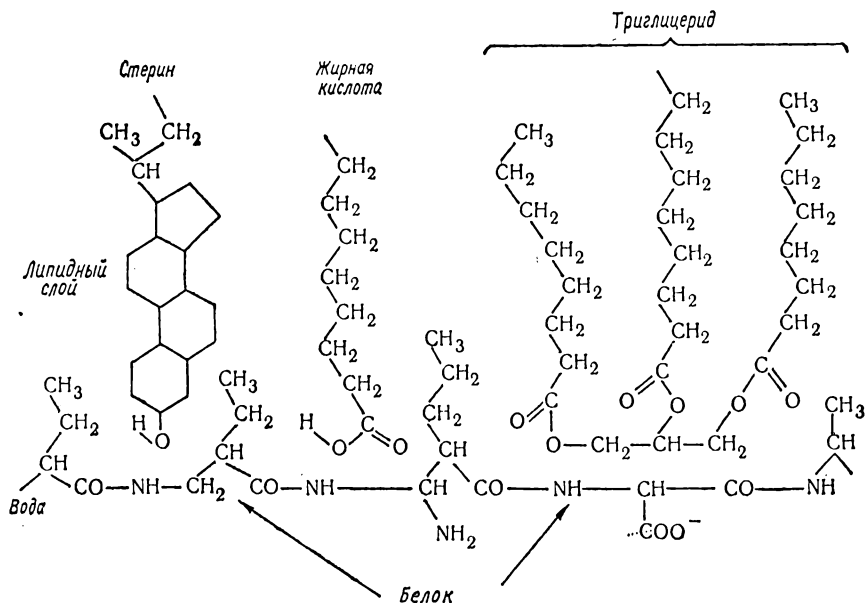


Рис. 76. Возможное строение клеточной мембраны. Взят произвольный набор аминокислот (по Danieli).

Таблица 6. Липидный состав различных мембран, % (по Брэнтону и Парку)

Липиды	Миеллин	Хлоропласт	Эритроцит	Митохондрии
Фосфолипиды	32	10	55	95
Холестерин	25	0	25	5
Сфинголипиды	31	0	18	0
Гликолипиды	0	41	0	0
Прочие	12	50	2	0

Взаимодействие между белком и липидом в мембранах стабилизируется в основном гидрофобными силами. При этом углеводородная часть молекулы фосфолипида проникает в гидрофобную область белковой молекулы, а полярная — в поверхностную сторону расположения белковой молекулы (рис. 76). Устойчивость этих связей зависит от длины и структуры углеводородного радикала липида, от температуры и нечувствительна к ионной силе. Липиды в среднем составляют около 30% сухого веса мембраны и представлены фосфолипидами, сульфополипидами, гликолипидами. Если удалить из мембраны фосфолипиды с помощью соответствующих органических растворителей, то она теряет свои функциональные свойства. Это, возможно, объясняется тем, что оставшиеся при этом белки образуют агрегаты. Для каждого типа мембраны характерен свой состав липидов (табл. 6). Например, митохондриальная мембрана содержит фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, кардиолипин. Последний в мембранах эндоплазматической сети не обнаружен.

Как видно, полярные липиды — фосфолипиды, а среди них фосфатидилхолин (лецитин), являются наиболее распространенными компонентами мембран, тогда как нейтральные липиды (триглицериды, эфиры холестерина) представлены в очень малых количествах. Некоторые липиды встречаются только в определенного типа мембранах: гликолипиды — в хлоропластах, кардиолипин — во внутренних мембранах митохондрий. Очень заметно различие в липидном составе мембран хлоропластов и митохондрий, что обусловлено их функцией.

Одним из необходимых и обязательных свойств фосфолипидов, входящих в состав мембран, является их бимодальность, т. е. такое расположение их молекул, при котором гидрофобные остатки обращены в одну сторону, а гидрофильные, полярные — в другую. Это диктуется необходимостью взаимопроникновения молекул белка и липида при образовании мембран. Видимо поэтому соотношение между фосфолипидами и белком в различных мембранах остается приблизительно одинаковым. А соотношение между белком и нейтральным липидом непостоянно. Нейтральные липиды скорее размещаются в гидрофобной области фосфолипидов, изменяют ее. Этим они оказывают косвенное воздействие на взаимоотношение между белками и липидами в мембране.

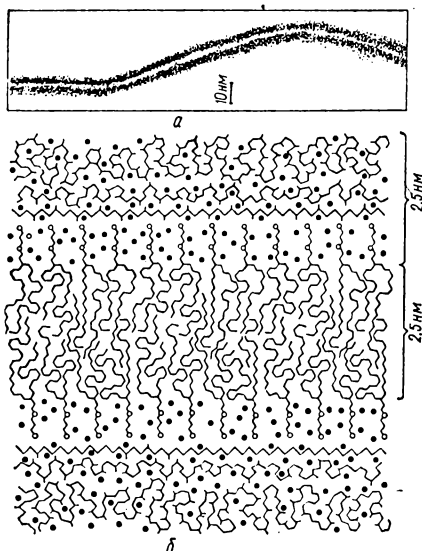


Рис. 77. Пластинчатая структура, которая обнаруживается в липидно-белково-водном комплексе:

а — электронная микрофотография; *б* — схема молекулярного строения. Эта структура почти идентична элементарной мембране, найденной в клеточных мембранах. Черные точки показывают отложения окиси осмия на поверхности полярных групп.

Для образования мембран необходима двумерная упаковка, которая достигается с помощью фосфолипидов. Вторым основным компонентом биологических мембран является белок. Приблизительно 50% всех белков мембраны составляют структурные белки. Структурные белки оказались одинаковыми для различных мембран. Они обладают характерными для них физическими и химическими свойствами.

В водной среде образуют нерастворимые агрегаты, т. е. обладают гидрофобными свойствами: способны образовывать гидрофобные связи с фосфолипидами, связывать малые молекулы (НАД, АТФ и др.); легко дезагрегировать при взаимодействии с додецилсульфатом и т. п. При взаимодействии с другими белками мембраны образуют водорастворимые комплексы. Например, при гидрофобном взаимодействии структурный белок митохондрий с миоглобином, некоторыми цитохромами образует водорастворимые комплексы. При электростатическом взаимодействии гемсодержащего белка со структурным белком мембран митохондрий имеет место соотношение 1 : 1. Такая величина соотношения наблюдается между каталитическими и структурными белками внутренней и внешней митохондриальной и других изученных мембран.

Молекулярная организация мембран, характер взаимодействия между белками и липидами остается полностью неизученным. В связи с этим представляют интерес данные, полученные с помощью липопротеидных моделей. Например, очень близок, если не идентичен структуре элементарной мембраны, липидно-белково-водный комплекс (рис. 77). Этот комплекс под электронным микроскопом дает изображение в виде двух темных линий, между которыми расположен оптически менее плотный слой. Более светлый, бимолекулярный слой липидов имеет толщину около 25 Å и два более темных слоя, состоящих из молекул белка, — по 25 Å. Общая толщина липидно-белково-водного комплекса равна 75 Å, т. е. такая же, как у нативных мембран. Белки при этом взаимодействуют главным образом с полярными липидами с помощью водо-

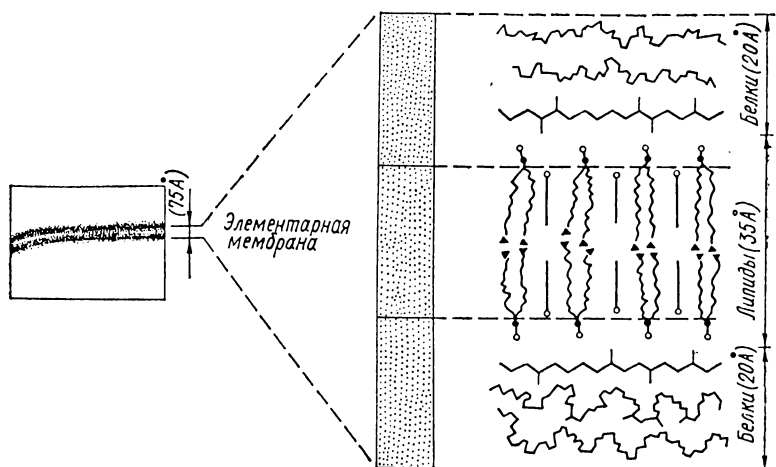


Рис. 78. Возможное строение элементарной мембраны. Электронная микрофотография (слева). Справа — основные группы фосфолипидов (холин, этаноламин) в виде светлых кружков; фосфатные группы фосфолипидов (темные кружки); концевые участки цепи жирных кислот фосфолипидов (треугольники); холестерин — светлые кружки с вертикальными линиями (Dayson, Danielly, 1952; Robertson, 1962).

родных и ионных связей. С неполярными липидами белки взаимодействуют с помощью соединения с полярными липидами. На бимолекулярном слое полярных липидов белок может адсорбироваться без изменения структуры. Если в бимолекулярный слой липида белок будет внедряться, то это неизбежно приведет к изменению его третичной и четвертичной структуры. Если это белок-фермент, то может произойти изменение третичной структуры в той части молекулы, где расположен активный центр. Возможно, что белок полностью утратит вторичную и третичную структуру, и тогда полипептидные цепи будут располагаться среди фосфолипидных полярных групп. Углеводородные боковые цепи белка будут направлены в сторону липида, а полярные — в сторону водной фазы. Таким образом, пока признается трехслойная структура биологической мембраны по Г. Даусону, Д. Даниелли и Д. Робертсону: белок — липид — белок (рис. 78). При этом гидрофобные концы молекул в бимолекулярном липидном слое направлены друг к другу, а гидрофильные — в обе стороны к белковым слоям. С помощью рентгеноструктурного анализа изучена внешняя миелиновая мембрана и подтверждена ее трехслойная структура. Непрерывный липидный слой шириной около 50 Å с внутренней и наружной стороны окружен водно-белковым слоем. Полярные группы фосфолипидов обращены к белковой фазе, а гидрофобные образуют внутреннюю часть липидного слоя.

Однако имеет место ряд данных, которые предполагают более сложное строение биологических мембран. Отношения белков к

липидам в разных мембранах сильно варьирует, что трудно согласовать с наличием элементарной мембраны, которая должна иметь единую структуру. Например, соотношение белка к липидам в миелине равно 0,25; хлоропластах — 1,0; эритроцитах — 1,5; внутренней мембране митохондрий — 3,0.

Изученные к настоящему времени мембраны имеют различный состав белков. Следовательно, они должны иметь различный набор ферментов. Значительные колебания имеются и в липидном компоненте. Установлено наличие мембран, в которых отсутствует липидный компонент.

Миелиновая оболочка заметно отличается от других мембран. Например, ее толщина равна 60 Å. И вообще толщина мембран значительно варьирует: от 50 до 60 Å в митохондриях и от 90 до 100 Å в клеточной мембране. Мембраны различаются также по форме. Они выполняют различные функции: биосинтез белка, диффузия различных малых молекул; активный транспорт ионов; регулирование работы «ионных ворот», механохимические преобразования и др. Выполнение ряда функций требует присутствия белков в состоянии третичной структуры. Это трудно объяснить, так как принято считать, что слой белка в мембране имеет толщину 20 Å и состоит из одной или двух полипептидных цепей с β-структурой. В мембранах обнаруживаются глобулярные субъединицы (митохондрии, хлоропласты).

Ряд факторов свидетельствует о том, что две стороны мембраны неодинаковы. Например, рибосома всегда связывается только одной стороной эндоплазматической сети, гранулы внутренних митохондриальных мембран располагаются тоже только на одной стороне.

Известно, что ферменты активны в состоянии определенной пространственной конфигурации, которая достигается для ряда ферментов в фиксированном состоянии на мембране.

Некоторые ферменты активны только в гидрофобной среде. Поэтому они будут проявлять активность только во внутреннем липидном слое мембраны. Отсюда мы можем заключить, что трехслойная структура мембран: белок — липид — белок — удовлетворительно отражает строение тех участков мембраны, которые выполняют только функцию изоляции клетки от окружающей среды. Что касается иных функций, то они выполняются другими участками мембраны, содержащими различные белки и липопротеиды.

Все эти данные говорят о том, что мембраны имеют более сложное строение. Поэтому высказаны предположения о другой возможной структуре мембран (рис. 79). При этом гидрофобные боковые цепи белков проникают во внутреннюю часть мембраны, где создаются гидрофобные условия среды, или полярные группы липидов вместе с полярными группами белков обращены к воде, а липиды образуют внутреннюю гидрофобную среду. По другой модели белки и липиды ассоциированы в глобулы, которые сохраняют гидрофиль-

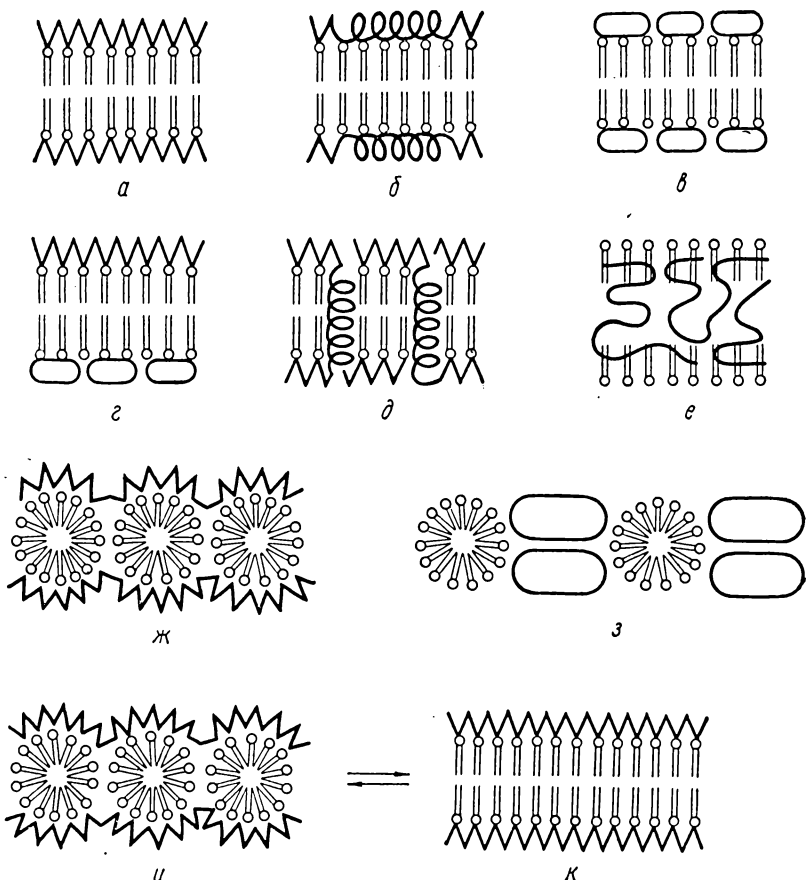


Рис. 79. Возможные модели молекулярного строения плазматической мембраны. В основу моделей *а — е* положена двуслойная липидная структура, а моделей *ж — к* — глобулярная организация (Lehninger, 1968):

а — белок в β -форме; *б* — α -спираль; *в* — глобулярный белок; *г* — асимметрия в расположении белка; *д* — каналцы и поры, частично пронизывающие белковый слой; *е* — белок внутри двойного слоя липидов; *ж* — липидные мицеллы с β -белком; *з* — липидные мицеллы с глобулярным белком; *и, к* — превращение глобулярной организации в двуслойную.

ные и гидрофобные свойства и расположены так, что между ними проходят полярные молекулы.

В последние годы все больше подтверждается фактами мозаичная структура мембраны. По этой модели существуют три группы белков, которые имеют глобулярную структуру, отличаются асимметрией своей молекулы и на разной глубине плавают и прерывают бимолекулярный липидный слой. Белки первой группы являются гидрофобными, неглубоко погружены в липидный слой. Белки второй группы имеют одну часть молекулы гидрофобную, а другую — гидрофильную, более прочно связаны и с трудом выделяются из

мембраны. Третья группа белков имеет два гидрофильных полюса, соединенных гидрофобным мостиком. Этот белок пронизывает бимолекулярный слой липида, в котором находится его гидрофобный мостик и обуславливает направленный транспорт веществ через мембрану. При этом липиды являются активными компонентами и вызывают конформационные изменения мембранных белков-ферментов.

По этой модели мембрана представляется жидкой, лабильной, динамичной структурой, обладающей молекулярной асимметрией и меняющейся во времени.

Некоторые из белков мембраны имеют липидное окружение. Например, белок цитохрома *c* окружен фосфатидилхолином, фосфатидилсерином, фосфатидилэтаноламином. Липиды расположены асимметрично. Фосфатидилхолин своей головкой расположен внутри мембраны, а фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин — наружу. Асимметричное расположение молекул липидов определяется не только зарядом, но формой и размером фосфолипидной головки. Поэтому не всегда нейтральные липиды расположены внутри, а полярные липиды — снаружи. Имеет место и иное их расположение.

Исходя из того что молекулярная структура компонентов биологических мембран отличается высокой подвижностью, их физические и химические связи изменяются в результате непрерывного взаимодействия с различными веществами, ионами, водой и другими молекулами, входящими и выходящими из клетки, можно предполагать более высокую динамичность и сложное строение надмолекулярной мембранной структуры.

Кроме этого, установлено, что на различных клеточных мембранах имеются примембранные менее гидрофобные слои, состоящие из белков, нелипидных компонентов, которые образуют структурный и функциональный комплексы мембраны.

Имеются также данные, указывающие на наличие внутреннего примембранного слоя, состоящего из материала, примыкающего с цитоплазматической стороны мембраны. Наличие примембранных слоев является структурной основой для размещения на мембранах различных мультиэнзимных систем, рецепторов и других функционально важных компонентов. Поэтому мембраны имеют большую (до 144 Å) толщину.

Остается невыясненным биогенез мембран, т. е. каким образом идет сборка этих структур из составляющих компонентов. Считается, что липопротеидные мембраны в процессе митоза делятся и растут затем в дочерних клетках. При этом липопротеидный комплекс из составляющих его компонентов возникает спонтанно без затраты энергии, т. е. мембраны развиваются на основе готовых, предшествующих матриц, затравок путем включения и самоорганизации белков, липидов, углеводных молекул, которые предварительно синтезируются в соответствующих органеллах клетки. Но решение этих вопросов станет возможным, когда будет достигнуто разделе-

ние мембран на составляющие компоненты и воссоздание их в нативном состоянии.

В настоящее время уже удается получить различные мембраны в высоко очищенном состоянии и в достаточных количествах для биохимического изучения. Биохимические исследования проводятся на мембранах эритроцитов, дрожжей, эндоплазматической сети и др.

Но условия выделения остаются еще недостаточно мягкими, чтобы получить мембраны с полным комплексом ферментов, свойственных нативному нормальному состоянию. Это объясняется тем, что части мембран связаны слабыми гидрофобными и электростатическими взаимодействиями и легко диссоциируют. Поэтому длительное время держалось представление о том, что гликолитические ферменты не связаны с мембранами. Но, как теперь известно, эти ферменты связаны с цитоплазматической мембраной. Видимо, трудно создать при выделении мембран условия, близкие к внутриклеточным.

3. Функции, выполняемые мембранами. Мембраны как полупроницаемые барьеры делят клетку на части, отсеки; окружают ее различные органеллы и таким образом, с одной стороны, разобщают, разделяют клеточную среду, так как являются проницаемыми для одних веществ и непроницаемыми для других, а с другой — связывают различные части клетки ее органеллы, так как служат путями движения и обмена веществ между ними.

Мембраны выполняют ряд важнейших функций: перенос веществ и ионов, различные биосинтезы, генерирование и проведение электрического тока, импульсов, участие в регуляторных механизмах клетки, трансформация энергии и т. д. Разность концентраций между жидкостью в полости мембраны и окружающей ее средой вызывает разность электрохимических потенциалов, обуславливает активный перенос ионов. Мембрана содержит ферменты, которые обеспечивают избирательный активный перенос молекул различных веществ. Важнейшей функцией мембран является их участие в определении строгой последовательности реакций метаболических процессов. Это обусловлено жесткими ограничениями в пространственном взаимоположении ферментов, катализирующих определенную цепь реакций.

Мембраны выполняют одну из важнейших функций регуляции переноса и обмена веществ как между клеткой и окружающей средой с помощью клеточной цитоплазматической мембраны, так и между различными частями и органеллами внутри клетки с помощью внутриклеточных мембран.

Мы имеем возможность рассмотреть подробно только наиболее важные и сравнительно хорошо изученные функции мембран в транспорте веществ и передаче нервного импульса. Мембраны ускоряют, замедляют и совсем исключают передвижение через нее различных веществ. Можно различными путями определить скорость проницаемости через цитоплазматическую мембрану различных

веществ по формуле: $K = \frac{V}{At} \ln \frac{C_{\text{нар.}} - C_{\text{вн}}}{C_{\text{нар.}} - C'_{\text{вн}}}$, где K — константа проницаемости; V — объем клетки; A — площадь клеточной мембраны, см^2 ; t — время, с; $C_{\text{нар.}}$ — концентрация проникающего вещества снаружи клетки; $C_{\text{вн}}$ — концентрация проникающего вещества внутри клетки в нулевое время; $C'_{\text{вн}}$ — концентрация проникающего вещества внутри клетки через t секунд. Например, вода проходит через клеточную мембрану со скоростью 10^{-4} см/с, т. е. в 100 000 раз медленнее скорости диффузии молекул воды в водном слое толщиной $75 \text{ \AA}$.

Проникновение веществ через цитоплазматическую мембрану может осуществляться с помощью различных механизмов на основе растворимости в липидах: в виде пассивной (свободной) диффузии, облегченной, или катализируемой, диффузии и активного переноса с затратой энергии. Передвижение веществ при пассивной (свободной) диффузии происходит спонтанно по градиенту концентрации, определяется перепадом этого градиента и направлено в сторону низкой концентрации.

Основным препятствием для прохождения веществ в этом случае является липидный бимолекулярный слой мембраны, т. е. граница раздела вода — липид. Чтобы его преодолеть, в диффундируемом веществе должны быть предварительно разорваны водородные связи, которые у него образованы с водой. Чем больше водородных связей в веществе и крупнее его молекула, тем оно хуже диффундирует через мембрану. Еще в ранних работах обращалось внимание на быстрое поступление в клетку веществ, хорошо растворяющихся в жирах. Нерастворимые в жирах вещества проникали в клетку медленно или совсем не проникали. Поэтому ученые приходили к выводу, что цитоплазматическая мембрана состоит преимущественно из жиров или жироподобных веществ, таких как фосфатидилхолин и других липидов. Растворимость различных веществ в липидах определялась по коэффициенту их распределения в эмульсии между оливковым маслом и водой. Коэффициент распределения = $\frac{\text{Концентрация в масле}}{\text{Концентрация в воде}}$. Позднее было установлено, что проницаемость различных веществ через клеточную мембрану зависит также от размера их молекул. Исходя из этих данных проницаемость различных веществ через цитоплазматическую мембрану можно представить следующим образом (рис. 80).

Однако проникновение малых молекул (вода, метанол и др.) через клеточную мембрану не соответствует их коэффициенту распределения между маслом и водой. Исходя из этого можно предполагать, что клеточная мембрана имеет поры, заполненные водой. Существует два представления о порах в мембране. Первое состоит в том, что поры являются постоянными образованиями, а второе — что поры представляют собой динамические образования. Они существуют короткое время и возникают в различных местах мем-

браны. Через поры проходят полярные вещества с малым размером молекул. Поры составляют 0,06% площади поверхности цитоплазматической мембраны и имеют диаметр от 0,35 до 0,8 Å, т. е. каждая пора с диаметром 0,7 Å окружена лишенной пор площадью 20 × 20 Å. Из этого следует, что проникновение различных веществ в клетку ограничивается незначительной площадью, которую занимают поры. Например, через мембрану вода диффундирует в 100 000 раз слабее, чем через слой воды в 75 Å. Но мочевина проникает в клетку в 100 000 раз медленнее воды, а ионы в 100 000 раз медленнее мочевины. Наиболее медленное проникновение ионов объясняется наличием в порах мембран электрических зарядов.

Преобладание положительных или отрицательных зарядов резко изменяет скорость поступления катионов и анионов. Обычно более быстро в клетку поступают катионы. Но иногда, например, через клеточную мембрану эритроцита анионы поступают быстрее катионов.

Пассивный перенос растворимых в липидах веществ через цитоплазматическую мембрану обусловлен градиентом концентрации между внутриклеточной и внешней средой. Но скорость проникновения некоторых веществ через цитоплазматическую мембрану (глюкоза, глицерин, мочевина, формамид и др.) нельзя иногда объяснить линейной зависимостью от разности градиента концентраций.

Например, глицерин поступает в растительную клетку со скоростью $2 \cdot 10^{-7}$ см/с, а в эритроцит человека — $2 \cdot 10^{-5}$ см/с, т. е. в сто раз медленнее. Оказалось, что поступление этого соединения зависит от водородных ионов в среде и достигает оптимального значения при pH 6,0—6,5. Ионы меди Cu^{2+} подавляют процесс поступления глицерина, что объясняется тем, что этот катион блокирует каталитический центр, в роли которого выступает имидазольная группа. Кроме этого, на основе конкурентного торможения скорость проникновения глицерина в клетку снижается в присутствии этиленгликоля. Все это говорит о том, что проникновение

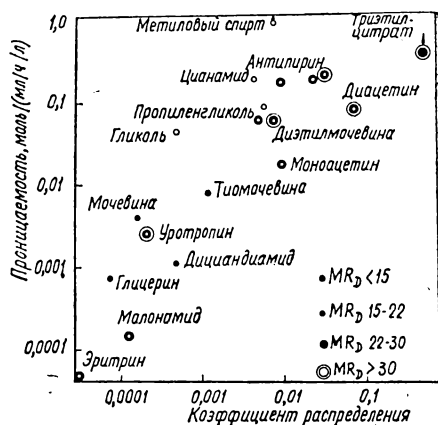


Рис. 80. Скорость проникновения различных веществ в клетку *Chara segetophylla* в зависимости от объема молекул, который определен по молекулярной рефракции (MR_D) и от коэффициента распределения различных молекул между водой и маслом. Проницаемость выражена долей общего числа молекул на 1 л раствора, которая проникает за 1 час через 1 см² мембраны (Collander, Bälund, 1933).

глицерина в клетку обусловлено катализом. У *E. coli* имеется система, которая обуславливает поступление в клетку галактозы. Эта система представляет собой генетически детерминированный белок-фермент. Предполагается, что в состав цитоплазматической мембраны входят ферментные системы, специализированные на переносе веществ. Такие биокаталитические системы называются пермеазами. Например, поступление аминокислот и других веществ в клетку контролируется специальными пермеазами.

Таким образом, в клетке имеются механизмы, которые ускоряют спонтанно протекающую пассивную диффузию. В этом случае передвижение веществ протекает с помощью облегченной диффузии. Облегченная диффузия протекает быстрее пассивной (свободной), что обеспечивается специфическими переносчиками, расположенными в мембране или на мембране. Переносчиками могут быть белки, липопротеиды. Облегченная диффузия протекает без затраты энергии в направлении падения химического градиента, который достигается либо полимеризацией, либо метаболизацией переносимого вещества. Переносчики облегченной диффузии специфичны, так как различают изомеры, подавляют конкурентными ингибиторами, ферментными ядами. Это свидетельствует о каталитическом характере в действии переносчиков облегченной диффузии и их аналогии с ферментами. Но здесь взаимодействие переносчика с субстратом скорее основано на аллостерических изменениях конформации их молекул, обуславливающих более быстрый переход этого комплекса через мембрану.

Сущность облегченной диффузии состоит в том, что при этом на внутренней или наружной стороне мембраны образуется легко обратимый комплекс: переносчик — субстрат, который образуется на основе нековалентных, более лабильных связей и проходит через мембрану быстрее, чем составляющие его компоненты. С помощью облегченной диффузии поступают в клетку из окружающей среды аминокислоты, сахара, ионы.

Известно, что константа равновесия между концентрацией проникающего вещества внутри и снаружи клетки ферментом не изменяется. При участии фермента только быстрее достигается равновесие между концентрациями соединений по обе стороны мембраны по сравнению с пассивной диффузией. Возможно, что перенос ионов осуществляется с помощью микроциклов — органических молекул циклического строения. Ю. А. Овчинников, В. Т. Иванов и др. считают, что таким переносчиком может быть циклический депептид валиномицин, состоящий из 6 аминокислот и 6 оксикислот. Это соединение образует с ионом калия комплекс (рис. 81), который растворим в липидах, и поэтому проходит через липидный слой мембраны благодаря наличию градиента концентрации. Таким образом, с помощью различных микроциклов, или ионофоров, через клеточную мембрану могут переноситься различные катионы.

Мы рассмотрели перенос веществ через мембрану, который осуществляется благодаря наличию градиента концентрации. Но

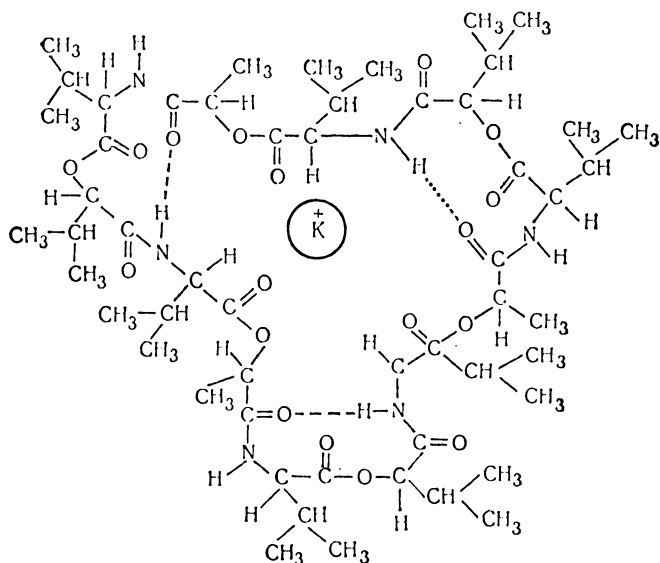


Рис. 81. Возможный механизм переноса ионов через клеточную мембрану с помощью микроциклов и ионофоров (Ivanov, 1969; Ovchinnikov, 1970).

наряду с этим способом в клетке широко представлен активный перенос молекул и ионов, который осуществляется против градиента концентрации. Например, концентрация ионов (в мэкв/л) Na^+ в межклеточной жидкости мышечной ткани составляет 145, а во внутриклеточной жидкости — 12; в плазме крови — 144, а в эритроцитах — 26. Концентрация ионов K^+ , наоборот, в межклеточной жидкости мышечной ткани равна 4, а во внутриклеточной жидкости — 155; в плазме крови — 5, а в эритроците — 150. В обоих этих случаях идет передвижение ионов калия в клетку, а ионов натрия — из клетки против градиента концентрации. Таким образом, клетка может концентрировать необходимые вещества в тысячи раз больше по сравнению с окружающей средой. Например, передвижение аминокислот в клетку может идти против градиента концентрации, превышающего в триста раз, а перенос ионов водорода в желудочный сок протекает против градиента, превышающего в миллион раз.

Активный транспорт веществ в клетку связан с затратой энергии на разрыв водородных связей, образованных с водой, на поступление против градиента концентрации. Система активного транспорта должна обладать специфичностью и переносить только нужные соединения и в определенном направлении.

Отличие передвижения веществ через мембрану облегченной диффузией от активного транспорта состоит в том, что перенос в первом случае идет по градиенту концентраций без прямой затраты

энергии, а во втором — против градиента концентрации в любом направлении с прямой затратой энергии на этот процесс.

При активном переносе происходит передвижение из пространства (системы), где концентрация вещества ниже, величина энтропии выше и запас свободной энергии ниже, в пространство, где концентрация вещества выше, энтропия ниже и запас свободной энергии выше. В случае пассивного переноса запас свободной энергии системы уменьшается, энтропия возрастает. Поэтому процесс активного переноса не может осуществляться спонтанно и требует затраты энергии. Изменение свободной энергии при переносе незаряженного вещества из области с низкой концентрацией в область с высокой концентрацией определяется по формуле $\Delta F = R \cdot T \ln \frac{C_2}{C_1}$, где R — газовая постоянная; T — абсолютная температура; C_1 — низшая концентрация вещества; C_2 — высшая концентрация вещества.

Величина изменения свободной энергии будет иметь, как правило, положительный знак, следовательно, процесс спонтанно протекать не может. Но если этот процесс будет сопряжен с системой, в которой уменьшается запас свободной энергии, то за счет этой энергии будет осуществляться активный транспорт вещества. Примером активного переноса может служить натриевый насос. Активное выделение ионов Na^+ из животной клетки осуществляется натриевым насосом. Когда выход из клетки ионов натрия сопряжен с поступлением в нее ионов K^+ , то в этом случае натриевый насос называют сопряженным нейтральным насосом. Когда выход из клетки ионов Na^+ не сопровождается поступлением в нее ионов K^+ , то создается градиент электрохимического потенциала. Этот натриевый насос называется электрогенным насосом, и с его помощью создается трансмембранный потенциал.

Наиболее изученной системой активного переноса является $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-АТФ-аза}$, активирующая выделение Na^+ из клетки и поступление K^+ в клетку. Эта система имеет молекулярную массу около 670 000, видимо, состоит из нескольких полипептидных цепей, находится в цитоплазматической мембране, действует на АТФ и активируется ионами натрия с внутренней стороны мембраны, а ионами калия — с наружной, т. е. с той стороны мембраны, откуда они транспортируются. Натриевый насос обеспечивает выделение Na^+ из клетки и одновременно является движущей силой активного переноса сахаров, аминокислот в клетку. Это каталитический способ переноса веществ, так как он сопряжен с затратой энергии извне, т. е. проникновение какого-то вещества через мембрану связано с затратой энергии для выполнения определенной работы. Сопрягающим фактором или источником энергии при этом выступает, как правило, аденозинтрифосфорная кислота, образование которой происходит при окислительном фосфорилировании. Поэтому активный перенос ионов и молекул сопряжен с клеточным

дыханием. Определенный ионный состав во внутриклеточной среде является необходимым условием для сохранения осмотического равновесия в клетке. Поддержание определенного соотношения между анионами и катионами важно для функционирования ферментов, регуляции водного обмена между клеткой и внешней средой и т. д.

Например, с ионами Na^+ выделяются и молекулы воды, в результате поддерживается постоянное осмотическое давление, несмотря на то что в клетке имеется множество крупных молекул, неспособных проникать через клеточную мембрану.

Мембраны имеют различную проницаемость для катионов и анионов, поэтому нет эквивалентного соотношения в их поглощении. Это приводит к поляризации мембраны, появлению на ней зарядов, между которыми возникает разность потенциалов до 0,1—0,2 В.

Понятно, что в основе активного переноса веществ лежит физико-химический процесс, который, однако, еще не удалось полностью изучить. Но с уверенностью можно сказать, что молекулярный механизм, с помощью которого осуществляется активный транспорт веществ и ионов, представлен в самой мембране. Это можно подтвердить многими примерами. Если из эритроцита удалить его содержимое, а оставшуюся клеточную мембрану заполнить соответствующим раствором, содержащим ионы и АТФ, то будет осуществляться перенос ионов Na^+ и K^+ так же, как в нативной клетке. Если из гигантского аксона кальмара удалить аксоплазму и заполнить его соответствующим раствором электролитов, то на такой мембране наблюдается перенос ионов против градиента концентраций. Кроме этого, здесь удастся зафиксировать потенциал покоя и потенциалы действия с проведением нервного импульса.

Применением метода меченых атомов установлено, что поступление ионов в клетку не всегда сопровождается осмотическими явлениями. Поэтому принято считать, что в мембране имеются поры, несущие электрические заряды и обуславливающие переход через нее ионов. Поры состоят из белковых субъединиц, которые встроены в липопротеидную мембрану и образуют гидрофильный канал (рис. 82). Канал может быть поляризованным, в состоянии покоя, и деполяризованным, при развитии потенциала действия. В поляризованном состоянии гидрофильные каналы закрыты для Na^+ и K^+ . Избирательность пор для Na^+ определяется отрицательным зарядом, который несут в порах карбоксильные группы, а для K^+ — отрицательным зарядом фосфатных групп.

Проницаемость через мембраны определяется также размером пор и гидратированных молекул и ионов. Известно, что размер атома у натрия меньше, чем у калия и хлора. Однако в гидратированном состоянии больший размер имеет атом натрия. Поэтому ион Na^+ проникает с большим трудом через поры мембраны. Например, радиус гидратированного иона натрия равен 0,25, калия — 0,198, хлора — 0,193 нм.

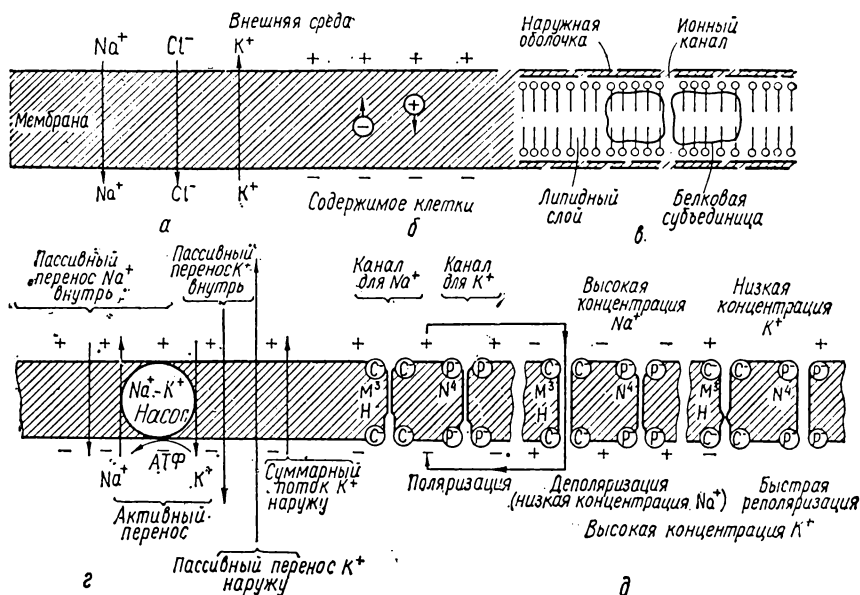


Рис. 82. Возможное молекулярное строение плазматической мембраны в связи с транспортом ионов (Woodbury, 1969):

а — градиент концентраций; б — градиент потенциала; в — структура мембраны; г — равновесие потоков ионов Na и K; д — зависимость каналов от потенциала.

Путем пассивной диффузии ион Na^+ поступает со скоростью около $5 \cdot 10^{-10}$ см/с, а ион K^+ — $5 \cdot 10^{-9}$ см/с. Перенос вещества начинается с присоединения и образования комплекса с переносчиком, в роли которого выступает белок, скорее белок-фермент. При этом с наружной стороны мембраны проникающее вещество под влиянием фермента изменяется таким образом, что становится растворимым и подвижным в компонентах, составляющих мембрану. На внутренней стороне мембраны этот комплекс расщепляется и высвобождается переносимое вещество.

Один из этапов переноса вещества через мембрану может осуществляться на основе принципа сопряжения. Этим процессом может быть образование на внешней стороне мембраны комплекса, состоящего из метаболита и переносчика. И если этот процесс протекает с повышением свободной энергии, то тогда на внутренней стороне мембраны процесс высвобождения переносимого вещества должен протекать спонтанно, без затраты энергии извне. Но может быть и наоборот: спонтанно протекает процесс на наружной стороне мембраны и с затратой энергии на внутренней. Таким образом, при поступлении веществ в клетку большое место занимает совместный транспорт. Он состоит в том, что поступление осуществляется одновременно с участием систем облегченной диффузии и активного транспорта. Хорошо изученной такой системой является зави-

симое поступление аминокислот и сахаров от транспорта ионов натрия.

В клетку сахара, аминокислоты поступают с помощью облегченной диффузии, зависимой от Na^+ . Движущей силой при этом является электрохимический градиент, вызванный разной концентрацией ионов Na^+ . Поэтому сахара и аминокислоты могут поступать против градиента концентраций. По достижении внутренней стороны мембраны на ней начинает работать система активного транспорта, которая переносит Na^+ на наружную сторону и активируется энергией, выделяемой при окислении поступившего в клетку сахара. Создается благоприятный концентрационный градиент ионов Na^+ и это, в свою очередь, приводит к еще более интенсивному поступлению в клетку аминокислот и сахаров. Таким образом, в данном случае работает система активного выброса ионов Na^+ из клетки, которая рассматривается как первичная система активного транспорта. И одновременно работает облегченная диффузия, обусловленная активным переносом ионов Na^+ , и ее называют вторичной системой активного транспорта. В обоих этих случаях должно участвовать химически активное вещество, которое выполняет роль переносчика энергии или групп, т. е. соединения с макроэргическими связями. В роли такого соединения чаще выступает аденозинтрифосфорная кислота.

Активный транспорт через мембрану носит каталитический ферментативный характер. Это подтверждается наличием специфических центров ферментов в мембране. Последние обнаруживаются с помощью конкурентного торможения, отравления соответствующих групп, выполняющих роль активных центров. Например, глицерин в человеческие эритроциты поступает против градиента концентрации с помощью механизма активного транспорта. 1,3-Пропандиол ($\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$) как аналог глицерина в 100 раз сильнее связывается с активным центром фермента и поэтому является конкурентным ингибитором транспорта глицерина в эритроцит. Этот процесс подавляется также ионами меди (10^{-7} моль), ртути и *n*-хлормеркурибензоатом. Роль активного центра фермента в данном случае выполняет гистидин, который расположен в N-конце полипептидной цепи и легко образует комплексы с металлами. Наличие гистидина в активном центре фермента доказывается необратимым ингибированием активного переноса глицерина с помощью динитрофторбензола и фенилизотиоцианата, которые, как известно, являются реагентами на N-концевые группы белков.

О сопряжении переноса ионов и молекул с энергией клеточного метаболизма говорит присутствие в мембране эритроцита специфической АТФ-азы, которая активируется ионами натрия и калия. Кардиотонический гликозид убаин ингибирует эту атефазную реакцию. При этом замедляется выделение натрия из клетки, что приводит к ее набуханию. $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -активируемая АТФ-аза векториально расположена в мембране. Согласно теории П. Митчелла,

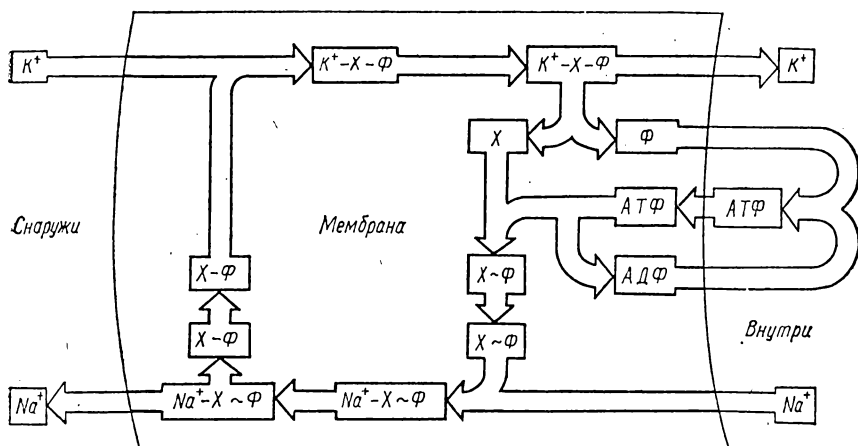


Рис. 83. Схема активного переноса Na^+ и K^+ через мембрану.

АТФ-аза катализирует гидролиз АТФ на внутренней стороне мембран. При этом ионы H^+ остаются по одну сторону мембраны, а OH^- — по другую, происходит разделение зарядов. Внутренняя сторона приобретает кислую реакцию, а внешняя — более щелочную. Комплекс АТФ — АТФ-аза выполняет функцию переносчика. Na^+ связывается на внутренней стороне мембраны и высвобождается на ее наружной стороне. При переносе K^+ действует механизм противоположного направления. В результате возникает громадная разница концентраций калия внутри клетки и вне ее. Например, при внешней концентрации калия $5 \cdot 10^{-5}$ моль Е. coli накапливает его в своих клетках в концентрации в 4000 раз больше. Однако такое соотношение концентраций калия имеет место только в состоянии активного роста в экспоненциальной фазе. В стационарном состоянии концентрации калия выравниваются. Компенсационным эквивалентом потоку калия является встречный поток катиона Na^+ . Таким образом, перенос ионов K^+ в клетку и ионов Na^+ из клетки против градиента концентраций осуществляется двумя противоположно действующими переносчиками за счет притока энергии извне. Механизм этого переноса представлен на рис. 83.

Калий образует комплекс $\text{K}^+ - \text{X} - \text{Ф}$ с фосфорилированным белком-ферментом ($\text{X} - \text{Ф}$). Пройдя через мембрану, этот комплекс распадается на ее внутренней стороне с высвобождением калия и белка-фермента (X). После этого с затратой энергии извне за счет фактора сопряжения, в роли которого выступает АТФ, образуется фосфорилированный белок-фермент. Он содержит макроэргическую связь $\text{X} \sim \text{Ф}$. АТФ при этом расщепляется с помощью АТФ-азной реакции. Между активированным переносчиком спонтанно возникает комплекс с $\text{Na}^+ - \text{Na}^+ - \text{X} \sim \text{Ф}$. Пройдя через мембрану

из клетки наружу, этот комплекс распадается, и Na выделяется во внешнюю среду. АТФ возникает с помощью АТФ-генерирующей системы, которая находится в самой мембране, а скорее в цитоплазме.

До сих пор мы рассматривали перенос ионов и молекул через клеточную мембрану. Но у всех организмов (за исключением бактерий и некоторых видов грибов) имеются различные внутриклеточные мембраны, с помощью которых осуществляется и регулируется транспорт веществ между клеточными структурами и их взаимодействия. Имеется непрерывность, взаимосвязь внутриклеточных мембран между собой и с цитоплазматической мембраной. Все это делает возможной связь между внешней средой и внутриклеточным пространством. Клетка с помощью каналов в цитоплазматической и в других мембранах общается с внешней средой. Пores или каналы имеются и в мембране, окружающей ядро. Через них проникают вещества из ядра в цитоплазму и наоборот. Вся клетка, таким образом, делится на пространства внутри мембран и вне их. Пространства, ограниченные мембранами, между собой взаимосвязаны и образуют эндоплазматическую сеть. Поэтому клетка не является изолированной от окружающей среды с помощью мембран. Наоборот, с помощью каналов, имеющих в мембранах, клетка общается с внешней средой. Связь клетки с внешней средой наблюдается также в случаях, когда клеточная мембрана образует впячивание, которое увеличивается, края мембраны смыкаются и образовавшийся пузырек отшнуровывается. Пузырек перемещается внутрь клетки, там разрушается, а находящиеся в нем вещества усваиваются.

Внутриклеточные мембраны находятся в динамическом состоянии. В клетке непрерывно происходит перемещение веществ, различных структур (например, митохондрий). В некоторых полярных клетках идет поглощение веществ на ее одной стороне, а выделение — на другой. При этом имеет место направленное течение с одной стороны клетки к другой. Этот процесс осуществляется сокращением и растяжением мембраны и требует затраты энергии извне. Процессы сокращения и растяжения наиболее подробно изучены на митохондриальной мембране. При взаимодействии с АТФ (10^{-3} моль) митохондриальная мембрана сокращается. Набухание и растяжение происходит в процессе передачи электронов вдоль цепи от субстратов дыхания к кислороду. Следовательно, процессы образования АТФ и переноса электронов являются источником покрытия энергетических затрат, необходимых для сокращения и набухания митохондриальных мембран. Для сокращения митохондриальных мембран необходимо присутствие ионов магния и специфического белка, так называемого фактора сокращения. Затрата энергии при сокращении митохондриальных мембран идет на конформационные изменения соответствующих белков, входящих в состав мембраны. При этом изменяется их способность взаимодействовать с анионом или катионом. Если белок приобретает отрицательные заряды, то это способствует поглощению катионов.

Транспорт незаряженных молекул, например сахаров, осуществляется во время набухания митохондрий. При их сокращении наоборот, этот процесс резко ослабевает, а вследствие этого снижается интенсивность окислительного фосфорилирования. Таким образом, изменением проницаемости мембраны, ее набуханием и сокращением регулируется процесс дыхания, окислительного фосфорилирования в митохондриях. Но проницаемость митохондриальной мембраны контролирует и гликолитический распад молекулы глюкозы. В условиях, когда энергетические затраты клетки обеспечиваются запасами АТФ, образующегося только при окислительном фосфорилировании, митохондриальная мембрана сокращается и становится не проницаемой для АТФ и других факторов гликолиза (НАД). В результате гликолиз не протекает. Если в клетке АТФ не хватает, то ее концентрация в митохондриях снижается, проницаемость митохондриальной мембраны возрастает и АТФ, НАД поступают в цитоплазму и начинается процесс гликолиза. Это один из многочисленных примеров регулирования метаболических процессов и их взаимосвязи в клетке, ее органеллах, которые осуществляются путем изменения активного переноса различных молекул, ионов, ферментов, коферментов и т. д.

Переносчики облегченной диффузии и активного транспорта обладают специфичностью к переносимым соединениям. Так, активное передвижение аминокислот осуществляется различными специфическими системами — пермеазами. Это объясняется значительным разнообразием боковых радикалов аминокислот. Например, А-система обладает большим сродством к аланину, глицину; L-система обладает более высоким сродством к аминокислотам, имеющим больший размер и длину боковых радикалов. Имеются другие системы активного транспорта, более специфичные к основному или дикарбоновому аминокислотам, и отдельная транспортная система для β -аланина и его сульфoаналога — таурина. У *E. coli* обнаружено одиннадцать различных специфических активных центров, участвующих в переносе аминокислот.

По отношению к сахарам системы облегченной диффузии и активного транспорта также характеризуются определенной специфичностью, которая выражается в предпочтении пираноз, которые имеют D-форму; группы замещения не должны быть по размеру больше метильных; лучше переносятся молекулы, имеющие конформацию кресла с экваториальным расположением гидроксильных групп, и т. д.

Биологическое значение специфичности систем транспорта веществ подчинено, видимо, тому, чтобы затормозить поступление близких по структуре к субстратам соединений, которые могут выступать в роли конкурентных ингибиторов, в частности при биосинтезе необходимых белков.

Известен ряд ингибиторов облегченной диффузии и активного транспорта веществ (флоридзин и др.). Можно считать, что многие ингибиторы активности ферментов являются также ингибиторами

систем активного транспорта веществ. Например, ингибиторы тиоловых ферментов одновременно подавляют систему переноса глюкозы, что говорит о наличии в этой системе сульфгидрильных групп. Подавление системы переноса глюкозы снимается введением тиолов. Ингибирование транспорта глицерина устраняется добавлением гистидина и т. д.

Некоторые пермеазные системы выделены и выяснена их белковая природа. Для этого выделяют с помощью детергента (третон X—100 и др.) белок из мембраны и сажают на какой-то адсорбент (ДЭАЭ-целлюлоза и др.), затем пропускают смесь меченых сахаров и устанавливают специфичность белка пермеазы. Для большей убедительности флоридзином или другим ингибитором можно снять обратно сахар с белка пермеазы. Таким образом, был изучен белок пермеазы, который нарабатывается *Las*-опероном *E. coli* при замене источника питания глюкозы на β -галактозид. Выделены также белки пермеаз, связывающих кальций, *L*-арабинозу, глюкозу, нейтральные аминокислоты и др.

В мембранах эритроцитов, нервных клеток имеется белок ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-активируемой АТФ-азы. Белок этот очень трудно выделяется и при экстрагировании липидов из мембраны теряет активность. Он обуславливает поступление ионов калия и натрия против градиента концентраций в присутствии АТФ.

В кристаллическом виде получен белок пермеазы, переносящей сульфат. При выращивании *Salmonella* на среде с недостатком сульфата индуцируется синтез этого белка, который выделяется описанным выше образом. Этот белок с молекулярной массой 30 000 расположен на поверхности мембраны, имеет высокое сродство к ион-сульфату (кинетика связывания равна $2 \cdot 10^{-8}$ моль). Это только один из компонентов сложной системы переноса сульфата. Из бактерий выделен также белок НРг с молекулярной массой около 9000, который сопрягает транспортную систему переноса сахаров с источником энергии. Белок по гистидину фосфорилируется фосфоенолпируватом с образованием фосфор-НРг. Молекула сахара другим белком переносится на внутреннюю сторону мембраны и там реагирует с фосфор-НРг с образованием активного сахар-6-фосфата.

Можно считать установленным, что при переносе веществ через плазматическую мембрану основным барьером являются липиды либо в виде бимолекулярного слоя, покрытого белком, либо в виде липидно-белковой мозаики. Поэтому гидрофильные группы транспортируемых веществ экранируются в структуре переносчика, что способствует процессу переноса через липидный слой мембраны.

Пока нет удовлетворительного объяснения механизма переноса веществ через мембрану с помощью систем облегченной диффузии и активного транспорта. Но одной из наиболее правдоподобных является гипотеза подвижного переносчика. Она состоит в том, что в мембране имеется активный центр, состоящий из белка

гранслоказы и низкомолекулярного белка транслокатора, выполняющего функцию кофермента. Этот белковый комплекс имеет размеры, равные толщине мембраны, легко обратим, и его активный центр может свободно обращаться во внутреннюю и наружную стороны мембраны. При облегченной диффузии движущим фактором переноса вещества является градиент концентрации по обе стороны мембраны, а в случае активного транспорта — источник энергии. Непрерывный быстрый транспорт веществ от одной клетки к другой у многоклеточных организмов, по-видимому, обусловлен наличием цитоплазматических мостиков между клетками.

Мембраны выполняют важную роль не только в установлении и поддержании разности концентраций веществ между окружающей средой и клеткой, а также между ее частями, но они способны поддерживать взаимоотношения между клетками на основе принципа стимул — реакция, вырабатывать и проводить электрические сигналы, что зависит от проницаемости и способности мембран активно перемещать ионы за счет энергии извне. Такой способностью обладают мембраны не только нервных клеток, но и клеток растений и других организмов.

Таким образом, взаимоотношения между клетками с помощью мембран осуществляются как на основе химических веществ (медиаторов), поступающих от одной клетки к другой, так и на основе электрических импульсов. Первый способ связи осуществляется сравнительно медленно; второй — очень быстро, так как скорость распространения электрического импульса достигает более 100 м/с. Электрический импульс передается от одной к другой нервной клетке по ее аксону до соответствующего эффекторного органа, изменяя его функциональное состояние. Аксон заключен в миелиновую оболочку, которая представляет собой разросшиеся шванновские клетки, плазматическая мембрана которых как бы много раз обернута вокруг аксона. Последний, таким образом, изолируется от лежащих вокруг него клеток.

Нервное волокно представляет собой образование, состоящее из большого числа аксонов. Например, по зрительному нерву передается информация с помощью более миллиона аксонов. Поэтому по нервному волокну одновременно может передаваться множество импульсов, поступающих от многих клеток. Для нервной клетки характерно наличие мембранного потенциала. Причиной его возникновения может быть асимметрическое распределение ионов на внутренней и наружной сторонах мембраны; ее полупроницаемость и различная проходимость через нее ионов, в зависимости от концентрации; различная концентрация ионов Na^+ , которая поддерживается его активным транспортом с помощью натриевого насоса, расположенного на внутренней стороне мембраны. Мембранный потенциал может достигать большого значения, до 0,1 В, при толщине мембраны около 100 Å (что составляет 100 000 В/см). Нервные и мышечные клетки обладают способностью запасать электрическую энергию и расходовать ее, переходя в возбужденное

функционально активное состояние. Этот процесс подробно изучен на отрезке гигантского аксона кальмара. Если взять часть длинного отростка нейрона и поместить его в морскую воду, то он остается живым в течение нескольких часов и способным проводить нервный импульс. Если из аксона удалить отсасыванием аксоплазму и вместо нее ввести раствор необходимого ионного состава, то при этом сохраняется способность проведения импульса. Диаметр отрезка аксона достигает 1 мм, что делает возможным вводить в него микроэлектроды и удалять из него аксоплазму.

Различие в концентрации ионов в клетке и окружающей ее среде обусловлено работой калиево-натриевого насоса. Это является причиной возникновения скачка потенциала на мембранах в результате неэквивалентного потока катионов и анионов и разделения положительных и отрицательных зарядов. Между внутренней и наружной поверхностями мембраны аксона кальмара имеется разность потенциалов, равная 60—90 мВ. Положительно заряженной является наружная, а отрицательно заряженной внутренняя поверхность мембраны. Эта разность потенциалов называется потенциалом покоя. Явление это широко распространено и имеет место в различных клетках. Потенциал покоя обусловлен различной скоростью проникновения ионов Na^+ и K^+ через мембрану. В стационарном состоянии диффузионный поток калия направлен наружу, и он протекает быстрее, чем поток ионов натрия внутрь клетки. Это приводит к снижению положительного заряда внутри клетки. В результате мембрана со стороны содержимого клетки несет отрицательный, а снаружи — положительный заряд. Потенциал покоя — это равновесие между активным поступлением K^+ в клетку и активным вытеснением Na^+ из клетки.

Величину разности потенциалов между наружной и внутренней стороной мембраны можно определить по уравнению Нернста:

$$E = \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{K}_{\text{вн}}^+]}{[\text{K}_{\text{нар}}^+]},$$

где E — разность потенциалов, В; R — газовая постоянная (8,314 Дж/моль/К); T — абсолютная температура; F — число Фарадея ($9,648 \cdot 10^4$ К/моль); (K^+) — термодинамическая активность (при физиологических концентрациях приближается к молярной концентрации); n — заряд частиц (в данном случае равен единице).

Таким образом, ход процессов метаболизма в клетке делает мембрану как бы заряженным гальваническим элементом, разность потенциалов которого является условием образования и распространения электрического импульса или потенциала действия. Если раздражать аксон пропусканием электрического тока перемещением отрицательных зарядов через мембрану снаружи внутрь, то мембрана еще больше поляризуется. Если ток будет иметь обратное направление, то мембрана деполяризуется. Если деполяризовать потенциал покоя до так называемого порогового значения

(с 90 мВ до 40 мВ), то возникает ответная реакция. При этом в определенных точках мембраны происходит выделение медиаторов (ацетилхолин и др.). Особо изменяется разность потенциалов и происходит обращение полярности мембраны, и она произвольно становится проводящей. Эта ответная реакция называется *спайком*, или *потенциалом действия*, возникает электрический импульс, который распространяется по нервному волокну, значительно превышает сам стимул, имеет амплитуду, характерную для той или иной клетки. Потенциал действия остается постоянным и распространяется с большой скоростью. Передача импульса обуславливается перераспределением зарядов на поверхности мембраны, а не прохождением электрического тока.

Увеличение интенсивности и длительности раздражения сверх 50 мВ не имеет значения для ответной реакции. Потенциал действия, его величина и скорость распространения не изменяются. При этом мембрана обладает способностью генерировать большое число друг за другом следующих потенциалов действия. Таким образом, при снижении на короткое время мембранного потенциала в нервной клетке повышается проницаемость через нее ионов Na^+ . При этом наступает кратковременное локальное обращение поляризации, которое распространяется за счет обусловленной им деполяризации соседнего участка мембраны. Потенциал покоя восстанавливается благодаря временному повышению проницаемости в отношении K^+ . При этом нервная клетка становится вновь возбуждаемой. Нервный импульс передается на сравнительно большие расстояния. Как возникновение, так и передача нервного импульса обусловлены изменениями в $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -обмене.

Если мы сообщаем электрический импульс, то инициируем в нервном волокне местную деполяризацию мембран, а затем этот процесс самоподдерживается. При этом движение K^+ и Na^+ направлено в сторону равновесия. Но мембрана и при генерации потенциала действия, и при восстановлении потенциала покоя выступает барьером к установлению равновесия ионов Na^+ и K^+ . В процессе локальной деполяризации мембраны ее проницаемость для ионов Na^+ резко возрастает, а потенциал в несколько раз увеличивается и становится самоподдерживающимся, и импульс распространяется вдоль нерва.

Возможный механизм проведения импульса может быть построен на основе гипотезы местных токов. При местном изменении мембранного потенциала, деполяризации мембраны ее наружная сторона, заряженная отрицательно, соприкасается с положительно заряженным участком. Ток, который возникает между этими участками, вызывает перераспределение положительных и отрицательных зарядов, происходит восстановление начальных условий. В точках перехватов Ранвье нервное волокно соприкасается с окружающим раствором. В этих точках происходит ретрансляция местных токов, и импульс от перехвата к перехвату распространяется на большое расстояние.

Передачу нервных импульсов ранее связывали с образованием в нервных окончаниях различных химических веществ, которые выполняют роль медиаторов. Например, ацетилхолин сильно активирует, вызывает гиперстимуляцию в возникновении нервных импульсов и мышечное сокращение. Но ацетилхолин разрушается холинэстеразой и гиперстимуляция не наступает. Если каким-либо или другим ингибитором подавить активность этого фермента, то возникновение гиперстимуляции нервных импульсов ацетилхолином приводит животное к гибели. Обнаружены и другие химические медиаторы — адреналин, норадреналин, глутаминовая кислота и др. С помощью ацетилхолина можно вызвать потенциал действия в мышечной клетке, для чего достаточно 10^{-5} моль, что говорит о его очень высокой активности.

Еще нет полных представлений на молекулярном уровне о возникновении и передаче нервного импульса. Возможно, что медиаторы выступают в данном случае как аллостерические эффекторы. Они вызывают в белковых субъединицах мембран конформационные изменения, которые обуславливают проводимость электрического сигнала. О наличии конформационных изменений свидетельствуют изменения физической структуры мембраны. Так, вдоль поверхности мембраны изменяется двойное лучепреломление, светорассеяние. Эти изменения возникают синхронно с распространением электрического импульса. Липидный слой мембраны (при градиенте потенциала нейрона, равном в возбужденном состоянии 10^5 В/см) приобретает структуру жидкого кристалла. Когда эта сила электрического поля падает, происходит плавление липидного компонента мембраны и возникает ее проводимость. Возможно, что во всех биоэлектрических явлениях сохраняются такие принципы, как действие ионного насоса, избирательная проницаемость, специфические кратковременные изменения ионной проводимости мембраны. Но молекулярный механизм всех этих явлений остается невыясненным.

Список литературы

- Бейкер П. Е. Молекулы и клетки, вып. 3. М., «Мир», 1968.
 Грин Д., Гольдбергер Р. Молекулярные аспекты жизни. М., «Мир», 1968.
 Робертсон Дж. Структура и функция клетки. М., «Мир», 1964.
 Соломон А. К. Структура и функция клетки. М., «Мир», 1964.
 Холмеч Н. Живая клетка. М., Изд-во иностр. лит., 1962.
 Хокин Л. Е., Хокин М. Р. Молекулы и клетки, вып. 2. М., «Мир», 1967.
 Фрей-Висслинг А., Мюлеталер К. Ультраструктура растительной клетки. М., «Мир», 1968.
 Benedetti E. L. Cell membrane organization. First Internat. Symp. Cell Biol. and Cytopharmacol., Venice, 1969.
 Collander R., Bärilung H. Acta. Bot. Fenn. 11, 1, 1933.
 Davson H., Danielli J. F. The Permeability of Natural Membranes, 2d ed, London, Cambridge University Press, 1952.
 Harris E. J. Transport and Accumulation in Biological System, New York, Academic Press, 1960.
 Ivanov J. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 34, 803, 1969.

- Lehninger A. L. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 60, 1069, 1968.
Mitchell P. Translocations through Natural Membranes, Advances in Enzymol., 29, 33, 1967.
Ovchinnikov J. et al. Biochem. Biophys. Commun., 39, 217, 1970.
Stein W. D. The Movement of Molecules Across Cell Membranes, New York, Academic Press, 1967.
Woodbery J. W. In: Basis mechanisms of Epilepsia, 4, 1969.

Глава IX

МЕХАНОХИМИЧЕСКИЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ И БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДВИЖЕНИЕ

Движение — одно из фундаментальных свойств живых организмов. Внешне оно имеет самые разнообразные формы проявления. Однако в основе различных форм биологической подвижности лежат механохимические превращения с одним и тем же молекулярным механизмом прямого преобразования химической энергии в механическую работу.

Механизмы двигательных реакций у живых организмов интенсивно изучаются на протяжении последних тридцати лет. Однако трудность и сложность этой проблемы определяется еще и тем, что не созданы модели, с помощью которых можно было бы воспроизвести непосредственное превращение химической энергии в механическую.

Биологическое движение является характерным для организмов всех ступеней эволюции органического мира. В настоящее время известны и достаточно хорошо количественно изучены колебательное, циркуляционное, ротационное, фонтанирующее и другие типы движения протоплазмы. Все эти типы движения осуществляются упорядоченно и могут переходить друг в друга. Движение наблюдается на отростке бактериофага при поражении клетки-хозяина и инъекции в нее дезоксирибонуклеиновой кислоты; на ресничках и жгутиках; при расхождении хромосом; сокращении поперечнополосатых мышц у высших животных и т. д.

В основе биологического движения у различных организмов лежат структуры, сократительные системы, образованные, по-видимому, близкими сходными белковыми компонентами. В настоящее время можно выделить три различных типа сократительных механизмов: мышечное сокращение, движение ресничек и жгутиков, движение и расхождение хромосом при митозе и мейозе.

Энергетика сократительного процесса, а также молекулярные и структурные перестройки, происходящие при этом, наиболее обстоятельно изучены на поперечнополосатых мышцах, которые являются эффективными и универсальными сократительными механизмами с высокими техническими характеристиками.

Механохимическую функцию при сокращении и расслаблении мышцы выполняют актин, миозин и другие белки, конформация которых при этом изменяется. Промежуточные химические реак-

ции, которые сопровождают эти изменения и обеспечивают приток энергии для их осуществления, в настоящее время остаются еще недостаточно выясненными. Но несомненно, что структурную и функциональную роли при прямом превращении химической энергии в механическую работу выполняют сократительные белки, которые выделяются в группу актомиозиноподобных белков.

Важное значение в развитии исследований по выяснению структурных и биохимических основ биологического движения сыграли работы В. А. Энгельгардта и М. Н. Любимовой. Еще в 1939 г. они установили, что АТФ-азная активность неотделима от миозина и теряется в условиях, при которых миозин денатурируется. АТФ-азная активность меняется параллельно способности миозина взаимодействовать с актином. Актин-миозин при добавлении АТФ сокращается и производит механическую работу. Позже было установлено, что АТФ-азной активностью обладает именно миозин, который расщепляет АТФ: $\text{АТФ} \xrightarrow{\text{Миозин}} \text{АДФ} + \text{Ф}_n$.

Работы В. А. Энгельгардта сыграли важную роль в изучении мышечных белков. Они показали необходимость развития исследований по изучению молекулярных свойств миозина, актина и других белков мышечной клетки. Но понимание первичных процессов механизмов сокращения и расслабления мышечного волокна невозможно без понимания его ультраструктуры и функции.

В настоящее время детально изучена ультраструктура мышечного волокна, что облегчает выяснение механизмов биологического движения.

1. Ультраструктура и функция мышечного волокна. Какова же ультраструктура мышечного волокна, изученного с помощью электронного микроскопа и рентгеноструктурного анализа? Поперечнополосатая мышца состоит из многоядерных клеток удлинённой формы, которые называются мышечными волокнами. Плазматическая мембрана этих клеток называется сарколеммой. В мышечных клетках имеется также эндоплазматическая сеть, которая называется саркоплазматической сетью. Волокна или клетки состоят из различных сократительных элементов — миофибрилл, которые собраны в виде параллельных пучков. Миофибриллы состоят из повторяющихся единиц — саркомеров, а саркомеры — из дисков двух типов. Миофибриллы окружены внутриклеточной жидкостью — саркоплазмой. В саркоплазме представлены различные соединения



Владимир Александрович Энгельгардт.

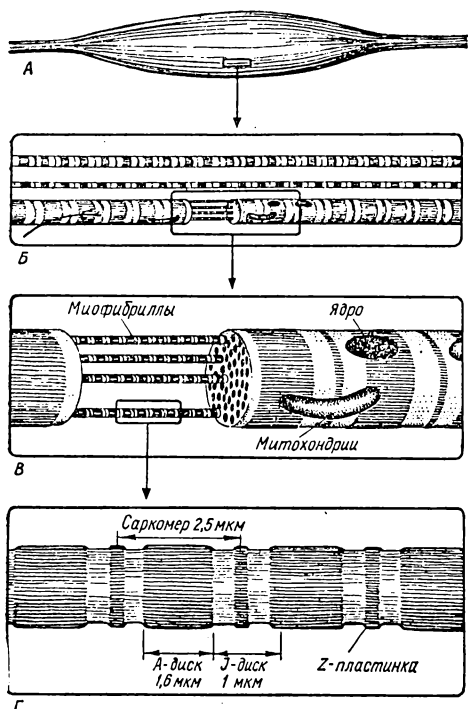


Рис. 84. Структура поперечнополосатой мышцы:

Мышца (А); мышечные волокна (Б); миофибриллы (В); миофибрилла, состоящая из поперечно расположенных повторяющихся единиц — саркомеров (Г). Саркомеры состоят из анизотропных дисков (А) и изотропных дисков (I), которые разделены на две части пластинкой (Z).

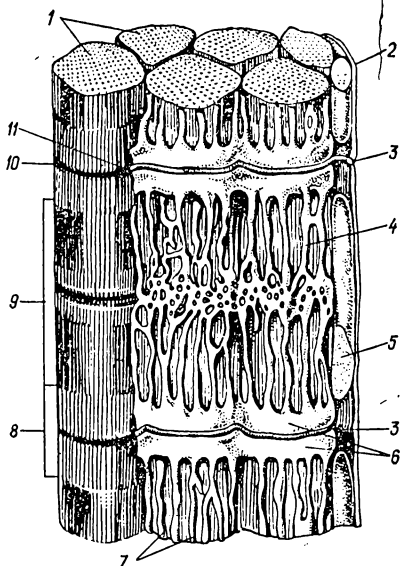


Рис. 85. Схематическое изображение структурных элементов поперечно-полосатой мышцы (по Фосету и Блюму):

1 — миофибриллы; 2 — сарколемма; 3 — поперечные трубочки; 4 — саркоплазматическая сеть; 5 — митохондрия; 6 — концевые цистерны; 7 — трубочки саркоплазматической сети; 8 — I-диск; 9 — A-диск; 10 — Z-пластинка; 11 — триада.

необходимые для осуществления акта сокращения: АТФ, креатинфосфат, гликоген, гликолитические ферменты и др. На рис. 84 представлено строение поперечнополосатой мышцы, полученное с помощью фазово-контрастного микроскопа. Миофибриллы являются сократительным аппаратом мышц. А энергия для их сокращения поставляется многочисленными митохондриями, в значительном количестве упорядоченно расположенными вдоль миофибрилл. Миофибриллы состоят из толстых и тонких нитей. Нити взаимно расположены таким образом, что возникает гексагональная упаковка (см. рис. 86). Периодичность строения миофибрилл совпадает с периодичностью мембранной системы саркоплазматической сети (рис. 85). Между миофибриллами располагается два набора пузырьков в виде поперечных трубочек, образованных впячиванием клеточной мембраны, и саркоплазматическая сеть из связанных между собой поперечных и продольных пузырьков. Поперечные

трубочки связаны с клеточной мембраной и не связаны с саркоплазматической сетью. В присутствии АТФ, поставляемого митохондриями, наступает сокращение миофибрилл. Миофибрилла под электронным микроскопом представляется следующим образом. Саркомер как единица структурной организации мышцы расположен между двумя *Z*-пластинками (рис. 86). К *Z*-пластинке прикреплены тонкие *I*-нити. С двумя системами тонких нитей перекрываются толстые *A*-нити. Через центр *A*-нитей проходит *M*-линия. На поверхности толстых нитей имеются выступы, которые отсутствуют в средней части нити, в псевдо-*H*-зоне. Отсюда *A*-диск, или анизотропный диск, состоит из толстых *A*-нитей, а *I*-диск, или изотропный диск, — из тонких *I*-нитей двух соседних саркомеров. Каждая толстая нить окружена шестью тонкими нитями (рис. 86, *г*). Поэтому на продольных срезах саркомера между толстыми нитями видны две тонкие нити. В процессе сокращения изменяется ширина *I*-диска и *H*-зоны, а ширина *A*-диска остается постоянной (рис. 86, 87). Если мышцу зафиксировать в состоянии сокращения, то степень перекрывания тонких и толстых нитей саркомера увеличивается. При сокращении мышцы ширина *A*-диска остается постоянной, а *I*-диска — сужается. Расстояние между *Z*-пластинкой и краем *H*-зоны не изменяется. Длина тонких и толстых нитей при сокращении

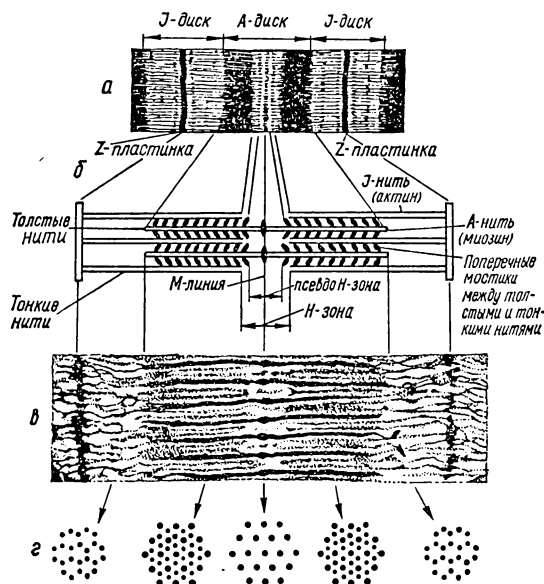


Рис. 86. Электронно-микроскопическое изображение деталей структуры саркомера (по Хаксли):

а — малое увеличение структуры саркомера; *б* — диски, как результат перекрывания тонких и толстых нитей; *в* — детали структуры нитей при высоком разрешении; *г* — поперечные срезы саркомера на разных уровнях, где видно взаимное расположение тонких и толстых нитей и поперечных мостиков. На срезе, параллельном толстым нитям, видны две тонкие нити между каждой парой толстых.

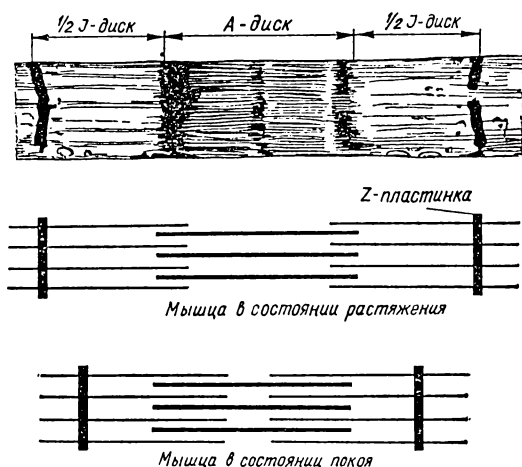
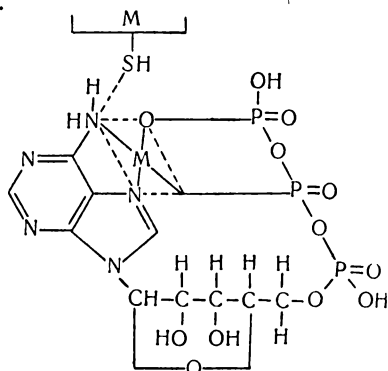


Рис. 87. Изменения в I-диске и H-зоне в зависимости от состояния мышцы. На различных стадиях сокращения мышцы ширина A-диска остается постоянной, а ширина I-диска и H-зоны изменяется.

ся в бороздках двойной спирали актина и этим придает структуре дополнительную стабилизацию. При обработке мышечного волокна глицерином при 0° клеточная мембрана разрушается, растворимые белки экстрагируются и остаются сократительные белки — актин, миозин и тропомиозин. Таким образом, получается модель сократительного аппарата мышцы. Эта модель занимает промежуточное положение между синтетическими актомиозиновыми нитями и интактным мышечным волокном.

Молекула миозина имеет утолщенный конец (голова) и тонкую часть (хвост). В утолщенной части содержится каталитический центр АТФ-азы. АТФ-азная реакция протекает при условии, если образуется комплекс с актином. При этом миозин соединяется с АТФ с помощью SH-группы.



также не изменяется, но степень их перекрытия возрастает.

При обработке мышцы растворами, извлекающими миозин, под микроскопом не обнаруживается A-диска и исчезают под электронным микроскопом толстые нити. Следовательно, последние состоят из миозина. Если удалить из мышцы и актин, то исчезают и тонкие нити. Вместе с актином всегда в постоянном соотношении удаляется и тропомиозин. Следовательно, тонкие нити состоят из актина и тропомиозина. Последний располагает-

Толстые нити взаимодействуют с тонкими с помощью поперечных мостиков на утолщенных концах (головках) миозиновых молекул. Поэтому при объяснении сокращения миофибрилл, исходя из гипотезы скользящих нитей, следует допустить, что в основе этого процесса лежит противоположная их полярность. Экспериментально было подтверждено, что действительно толстые нити имеют противоположную полярность, и это обуславливает движение тонких нитей в противоположных направлениях. Тонкие нити, лежащие по обе стороны от Z-пластинки, имеют также противоположную полярность. При сокращении миофибрилл никаких изменений в длине тонких и толстых нитей не происходит. Если исходить из объяснения сокращения на основе модели скользящих нитей, то конформационные изменения, обуславливающие движение, происходят в поперечных мостиках. Мостики располагаются по спирали, на один виток которой приходится шесть мостиков.

Каким же образом можно объяснить сокращение мышцы на молекулярном уровне? Оно может быть понято только на основе детального изучения структуры и функции белков, входящих в мышечную клетку.

2. Структура и функция сократительных белков. Белки мышечных клеток составляют около 20% их сырой массы. Они могут быть разделены на растворимые и нерастворимые в воде. Растворимые в воде белки находятся в основном в саркоплазме. Среди них представлены и белки гликолитических ферментов.

Нерастворимые в воде белки находятся в миофибриллах, имеют фибриллярную структуру, очень высокую молекулярную массу. Эти белки отличаются сложным строением и обладают способностью к спонтанной самоорганизации. Из них три главных белка — миозин, актин, тропомиозин — составляют основную массу (до 90%) нерастворимых в воде белков миофибрилл. Их структура и функция изучены более полно. В миофибриллах в последнее время обнаружены еще три белка: тропонин, α -актинин; β -актинин, роль которых менее изучена. Число белков, выделяемых из миофибрилл, все время возрастает. Белки миофибрилл сами по себе не обладают способностью сокращаться. Сократительная способность миофибрилл обусловлена строго упорядоченным взаиморасположением и взаимодействием входящих в их состав белков.

Одним из важнейших белковых компонентов мышечного волокна является *миозин* — белок, который экстрагируется из охлажденной мышцы холодным раствором 0,6 моль KCl. Содержание его достигает 50% всего белка миофибрилл. Если раствор миозина в 0,5 моль KCl выливать через узкое отверстие в чистую воду, то из этого белка образуются нити. Молекула миозина имеет высокое содержание заряженных боковых цепей. Дикарбоновые (аспарагиновая и глутаминовая) кислоты составляют около 18% всех аминокислотных остатков. Это обуславливает высокую плотность одноименных зарядов и придает молекуле миозина структуру в виде вытянутой нити. Содержание основных аминокислот в этом белке достигает

16%. Поэтому миозин имеет высокое сродство к катионам (Ca^{2+} , Mg^{2+}) и, как правило, в мышце присутствует в виде соли магния. Молекула этого белка имеет вид головки с длинным хвостом и состоит из двух идентичных полипептидных цепей. Каждая цепь имеет приблизительно 1800 аминокислотных остатков и молекулярную массу в пределах 200 000—225 000. Большая часть полипептидной цепи (до 60%) находится в конформации α -спирали. Эти две цепи с помощью водородных связей соединены в молекулу. Водородные связи можно разорвать с помощью концентрированных растворов мочевины, 5 моль гуанидина, и тогда молекула миозина диссоциирует на две полипептидные цепи. Молекула миозина имеет двухспиральную структуру с молекулярной массой около 470 000, сильно вытянута, длина ее достигает 1600—1800 Å, ширина 25 Å. Две полипептидные цепи α -спиральной конфигурации закручены одна вокруг другой и образуют суперспираль. Головка миозина представлена глобулярной структурой и, как предполагается, состоит из двух коротких полипептидных цепей. Это согласуется с общим видом молекулы миозина. Молекула миозина имеет 22 SH-группы, которые различаются по чувствительности к алкилированию. При связывании, блокировке чувствительных SH-групп АТФ-азная активность миозина возрастает, а при связывании менее чувствительных — теряется. АТФ-азная активность миозина проявляется в головке его молекулы. Два каталитических участка имеют SH-группы, различные по чувствительности к алкилированию.

При обработке миозина протеолитическими ферментами (трипсин, папаин, химотрипсин) его молекула распадается на фрагменты. При обработке трипсином или химотрипсином образуется два фрагмента — тяжелый меромиозин и легкий меромиозин.

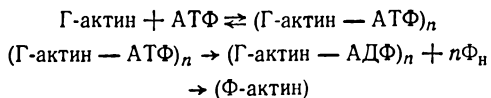
Тяжелый меромиозин имеет молекулярную массу около $3,5 \cdot 10^5$ и состоит из утолщенного конца (головы) с диаметром 95 Å длиной 275 Å и короткого палочковидного хвоста с диаметром 25 Å. При обработке папаином разрываются другие полипептидные связи и образуются иные фрагменты. Легкий меромиозин имеет молекулярную массу около $1,5 \cdot 10^5$ и представляется на электронной микрофотографии в виде прямого палочковидного стержня. При обработке тяжелого меромиозина трипсином его утолщенная часть распадается снова на два идентичных фрагмента с молекулярной массой около 120 000, длиной 90 Å. АТФ-азная активность миозина сосредоточена в утолщенной части тяжелого меромиозина. Миозин в головке имеет два участка, обладающие АТФ-азной активностью, и с их помощью он связывается с актином при образовании актомиозина. Это имеет исключительное значение для процесса взаимодействия между миозином и актином на стадии сокращения.

В определении АТФ-азной активности и в связывании миозина с актином имеют большое значение SH-группы миозина. В последнее время установлено, что к миозину нековалентной связью присоединен низкомолекулярный белок. Он является компонентом миозина, сосредоточен в его головке и отделяется от него при высо-

ком значении рН концентрированными растворами мочевины, гуанидина вследствие разрыва водородных связей. При отщеплении этого низкомолекулярного белка миозин теряет АТФ-азную активность и способность связывания с актином. Между молекулами миозина имеет место сильно выраженное сродство, что обуславливает спонтанную их агрегацию при образовании толстых нитей миофибрилл.

Вторым важнейшим белком мышечных клеток является актин. Актин выделяется экстракцией водой из ацетоновых препаратов и составляет около 25% белка мышцы. Этот белок существует в мономерной глобулярной форме (Г-актин). В воде, не содержащей солей, актин устойчив. Но при повышении ионной силы добавлением 0,1 моль KCl и 0,5 моль $MgCl_2$ при $pH = 7$ Г-актин спонтанно полимеризуется и образуется Ф-актин. При этом происходит, видимо, продольная ассоциация молекул Г-актина. Этот белок способен соединяться с миозином только в полимеризованном состоянии (Ф-актина). Образование Ф-актина сопровождается присоединением актином молекулы АТФ и ее гидролизом. При этом образующийся АДФ остается связанным с мономерами Г-актина в цепи Ф-актина. В молекуле актина содержание кислых аминокислотных остатков достигает 13%, а основных — 12%. В мономерной форме актин относится к глобулярным белкам, имеет молекулярную массу около 50 000, диаметр — 55 Å. Молекула Г-актина состоит из одной полипептидной цепи с семью сульфгидрильными группами, обладающей способностью связываться с одной молекулой АТФ. В молекуле актина обнаруживается аминокислота — ϵ -N-метиллизин. На N-конце актин имеет блокированную NH_2 -группу в виде N-ацетиласпарагиновой кислоты. Одна молекула актина прочно связывает один ион Ca^{2+} , что, видимо, говорит о значении этого катиона в инициации мышечного сокращения и активности АТФ-азы.

Процесс превращения Г-актина в Ф-актин является примером образования фибриллярных структур полимеризацией глобулярных субъединиц. Этот процесс может быть представлен следующим образом:



Роль АТФ в этом процессе состоит, видимо, в изменении и стабилизации конформации молекулы мономера, более благоприятной для агрегации. При этом мономеры Г-актина приобретают больший объем в составе полимера (Ф-актин). Молекула Ф-актина состоит из двух цепей спирально закрученных друг на друга, в результате чего возникает суперспираль, имеющая толщину около 60 Å. Такой диаметр двуцепочечной молекулы Ф-актина совпадает с диаметром тонких нитей миофибрилл. Если актин экстрагировать,

то исчезают тонкие нити миофибрилл. Это является одним из доказательств того, что тонкие нити состоят из актина.

Тропомиозин является третьим основным фибриллярным белком миофибрилл и составляет около 5% от всего белка мышечного волокна. Молекулярная масса тропомиозина около 50 000. Этот белок отличается особенно высоким содержанием кислых аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Аминокислотные кислоты составляют около 27%, а основные — 18% всех аминокислотных остатков. Обнаружено два белка — тропомиозин А и тропомиозин В. Тропомиозин А, или парамиозин, нерастворим в воде, выделен из запирательной мышцы моллюска. Этот белок удерживает миозинные мостики между тонкими и толстыми нитями миофибрилл в сокращенном состоянии мышцы. Тропомиозин В является водорастворимым белком. С помощью меченых антител установлено, что он локализован в I-дисках и является важным составным компонентом тонких нитей миофибрилл, где он образует, видимо, комплекс с Ф-актином. Он расположен в бороздке, которая образована в молекуле Ф-актина при закручивании двух его полипептидных цепей. Тропомиозин В имеет молекулярную массу около 130 000, состоит из двух полипептидных сильно α -спирализованных цепей с молекулярной массой около 70 000. Цепи содержат свободные сульфгидрильные группы, закручены одна вокруг другой и образуют суперспиральную структуру. Палочковидная форма тропомиозина В сходна с хвостовой частью молекулы миозина.

Кроме миозина, актина и тропомиозина в миофибриллах обнаружены другие белки. Наиболее определенно установлено, что в состав мышечного волокна входят белки тропонин, α -актинин, β -актинин и др.

Тропонин находится в составе тонких нитей и является одним из компонентов I-дисков. Этот белок имеет молекулярную массу около 86 000, связан в виде комплекса с тропомиозином В и является условием проявления его активности. Комплекс тропонин—тропомиозин В может взаимодействовать с актином, и возникает тройной комплекс: тропонин—тропомиозин В—актин. Тропонин, видимо, является фактором связывания Ca^{2+} . Мышечное сокращение возбуждается свободными ионами Ca^{2+} . Поэтому тропонин, видимо, изменяет чувствительность актина и миозина к кальцию и участвует в инициации процесса сокращения. С тропонином, видимо, связан еще один белок — β -актинин, который входит в состав тонких нитей. В состав тонких нитей входит также белок α -актинин, выполняющий функцию сшивки.

Актомиозин. Как видно, саркомер, повторяющаяся единица миофибриллы сократительного элемента мышцы, состоит в основном из трех белков — миозина, актина, тропомиозина. Из них важнейшие белки миозин и актин структурно разобщены, так как являются основными компонентами толстых и тонких нитей миофибрилл. Поэтому выяснение механизма взаимодействия между этими белками важно для понимания процесса мышечного сокра-

щения. Актин и миозин имеют различные химические свойства и легко взаимодействуют друг с другом. Если экстрагировать миозин и актин и создать концентрацию раствора солей, близкую к той, которая имеется в мышечном волокне, то эти два белка образуют комплекс актомиозин в виде крупного полимера, и вязкость раствора возрастает. При добавлении к такому раствору аденозинтрифосфорной кислоты вязкость раствора уменьшается до исходной (рис. 88). Это объясняется тем, что комплекс актин—миозин при этом распадается, с течением времени вязкость раствора снова повышается, так как миозин гидролизует АТФ. Актомиозиновый комплекс стабилизируется силами электростатического взаимодействия и имеет вид длинной нити (около 20 000 Å; диаметр 150 Å).

Если мы возьмем нити, состоящие только из актина или миозина, то они не сокращаются в присутствии АТФ. Если мы будем выдавливать раствор актомиозина в разбавленный раствор хлористого калия, то получим очень длинные нити. Если же эти нити получать в виде монослоя на поверхности воды, затем собрать их в пучки, то получим нечто напоминающее мышечное волокно. В присутствии АТФ и солей эта модель сокращается, выполняет механическую работу, и на ней можно изучать процесс сокращения мышечного волокна. Таким образом, не сами по себе миозин и актин, а соответствующий способ их соединения и взаимодействия лежат в основе образования сократительного аппарата мышцы.

Актомиозиновый комплекс в присутствии АТФ и Mg^{2+} диссоциирует. Но после расщепления всей АТФ происходит обратный процесс реагрегации, обусловленный, видимо, SH-группами, находящимися в головке миозина и соответствующих участках молекулы актина.

Процесс ассоциации и реассоциации актомиозинового комплекса осуществляется образованием и разрывом поперечных связей. В актомиозиновом комплексе молярное отношение Г-актина и миозина приблизительно равно единице (1 : 1). Ф-актин — полимер из глобул Г-актина. Поэтому нить Ф-актина может связывать многие молекулы миозина. При этом установлено, что актиновые нити связываются только с головкой молекулы миозина. Из этого следует, что поперечные мостики в актомиозиновом комплексе образуются глобулярной головкой молекулы миозина. Это подтверждено экспериментально. При обработке актиновых нитей тяжелым меромиозином его молекулы строго определенно ориентируются по

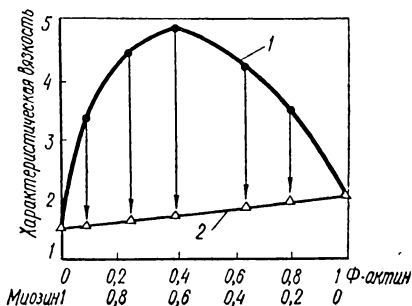


Рис. 88. Диссоциация актомиозина в присутствии АТФ (по Керекьярто): Характеристическая вязкость: 1 — различных смесей миозина и Ф-актина, без АТФ; 2 — актомиозина при добавлении АТФ.

отношению актиновых нитей. Головки тяжелого меромиозина располагались по актиновым нитям на одинаковых расстояниях, почти равных длине шага двойной спирали актина. Когда брали легкий меромиозин, то он не присоединялся к актиновым нитям.

Экспериментально установлено на летательной мышце насекомого, что при ее расслаблении мостики занимают перпендикулярные положения по отношению к оси нитей, а после сокращения — переходят в наклонное положение. В основе изменения положения поперечных мостиков лежат конформационные изменения составляющих их белковых молекул. Циклическое повторение образования и разрушения поперечных мостиков, зацепления и разрыва между поперечными мостиками и актиновыми нитями обуславливает процесс мышечного сокращения и расслабления.

3. Механизм мышечного сокращения. Механизм мышечного сокращения на молекулярном уровне полностью не выяснен. Основной остается гипотеза скользящих нитей, с которой согласуются многие полученные экспериментальные данные. Принципиальное отличие этой гипотезы состоит в том, что она основывается не на сокращении или конформационном изменении одного какого-то специфического белка, а на взаимном изменении положения и взаимном перемещении различных белков по отношению друг к другу.

Подытоживая, мы можем считать, что мышечное сокращение осуществляется следующим образом. Электрический импульс возбуждает мышечную клетку. При этом в мышечной клетке сначала образуются актиновые и миозиновые комплексы — тонкие и толстые нити миофибрилл, которые затем взаимодействуют между собой и перемещаются по отношению друг к другу. Эти процессы протекают спонтанно, в присутствии АТФ и обусловлены, по-видимому, первичной структурой белковых молекул. Электрический импульс распространяется по сарколемме, по обе стороны которой поддерживается разность потенциалов, равная приблизительно 60 мВ. Электрический импульс повышает проницаемость сарколеммы для K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , происходит исчезновение трансмембранного потенциала, т. е. деполяризация. Электрический импульс распространяется по всей клетке и все мышечные волокна сокращаются. Высокая скорость возбуждения осуществляется с помощью трубчатых впячиваний сарколеммы, которые проходят или по Z-пластинкам или около соединения А- и I-дисков и находятся в соприкосновении со всеми миофибриллами мышечной клетки. Эти трубчатые впячивания образуют так называемую Т-систему, которая также деполяризуется, и электрический импульс сообщается всем саркомерам. Между местами соединения А- и I-дисков имеются пузырьки (цистерны), окруженные мембраной. Эти пузырьки сообщаются между собой и образуют саркоплазматическую сеть. Пузырьки проходят рядом с трубочками Т-системы и находятся в контакте с ними.

Электрический импульс увеличивает проницаемость саркоплазматической сети, и ионы Ca^{2+} переходят из пузырьков в саркоплаз-

му, концентрация их в ней возрастает с $5 \cdot 10^{-7}$ моль до $5 \cdot 10^{-6}$ моль. Это является сигналом для взаимодействия АТФ с толстыми и тонкими нитями и сокращения. После сокращения сарколемма и саркоплазматическая сеть снова поляризуются, восстанавливается трансмембранный потенциал около 60 мВ. Ca^{2+} оказывается снова в пузырьках саркоплазматической сети. При этом выступы миозиновых нитей не прикрепляются к актиновым, цикл прикрепление — освобождение не функционирует, мышца приобретает снова длину, характерную для состояния покоя. Расслабление мышцы можно вызвать, если в ней Ca^{2+} связать каким-либо соединением.

Таким образом, в мембранах саркоплазматической сети представлена система активного переноса кальция, которая имеет много общего с другими системами транспорта через клеточные мембраны. Перенос ионов Ca^{2+} в пузырьки против градиента концентрации осуществляется с помощью АТФ-зависимого кальциевого насоса в мембране за счет энергии расщепления АТФ. Явление изоляции ионов кальция при сокращении называют фактором расслабления или релаксации. В последнее время установлено, что изоляция Ca^{2+} осуществляется также в митохондриях мышечной клетки.

Процесс сокращения мышцы осуществляется таким образом. Например, у кролика скелетные мышцы имеют толстые нити длиной 15 000 Å, шириной — 100 Å. Молекулы миозина в толстой нити расположены так, что их головы направлены наружу от М-полосы по спирали, образуют поперечные мостики, с помощью которых осуществляется контакт с тонкими нитями. Тонкие нити состоят в основном из Ф-актина и имеют длину около 100 000 Å, а толщину — 60 Å. Г-актин является при этом структурной и функциональной единицей, так как в основе сокращения лежит взаимодействие между Г-актиновыми единицами и головками миозина.

Молекулярный механизм мышечного сокращения, видимо, состоит в следующем. Между головками молекул миозина толстых нитей и Г-актиновыми единицами тонких нитей имеются поперечные мостики. Конформационные изменения, возникающие в мостиках головок миозина в присутствии АТФ, приводят к изменению их положения по отношению к тонким нитям. Эти мостики расположены вдоль миозиновой нити через каждые 143 Å под углом 60°, образуя спираль с шагом, равным 429 Å. Каждый мостик может соединяться и разъединяться с активным центром Г-актиновых единиц тонких нитей. Мостики в расслабленном состоянии мышцы находятся под прямым углом по отношению к тонким нитям. После сокращения они занимают положение под острым углом по отношению к тонким нитям. Мостики, по-видимому, наклоняются вперед и назад, таким образом как бы шагают по тонким нитям и продвигают их на определенное расстояние.

Цикличность образования и разрушения поперечных мостиков обуславливает перемещение тонких нитей в любом направлении. Пусковой механизм этого процесса состоит в том, что ионы Ca^{2+}

поступают в саркоплазму, активируют АТФ-азу миозина, расщепляется АТФ, происходят конформационные изменения в полипептидных цепях головок миозина.

Таким образом, цикл реакций, лежащих в основе направленного движения нитей, протекает между выступами на миозиновых нитях (мостиках) и актиновыми нитями. Эти процессы разделяются на этапы: образование мостиков, конформационные изменения в них, в результате которых образуется сила, обуславливающая движение и; наконец, освобождение. Чем больше мостиков соприкасается с тонкими актиновыми нитями, тем больше развивается сократительная сила мышцы. В процессе сокращения периодически повторяется взаимодействие концов миозиновых мостиков с новыми субъединицами актиновых волокон. При каждом новом шаге расщепляется одна молекула АТФ, и продвижение по актиновому волокну равно 50—100 Å. Мышца при раздражении может укорачиваться. Это приводит к уменьшению ее напряжения, так как число мостиков между толстыми и тонкими нитями уменьшается. Энергия выделяется только в момент процесса прикрепления освобождения, когда мостик находится в напряжении. Выполнение работы неразрывно связано с высвобождением энергии.

Максимальное напряжение в мышце возникает в момент, когда наступает максимальная степень перекрывания тонких и толстых нитей. При дальнейшем растяжении мышцы, степень перекрывания толстых и тонких нитей уменьшается. То же самое наблюдается, когда длина мышцы меньше оптимальной, это приводит к уменьшению напряжения мышцы, что объясняется перекрыванием тонких нитей, прикрепленных к двум соседним Z-пластинкам. В этом случае становится невозможным перекрывание толстых и тонких нитей (рис. 89).

Длина мышцы при сокращении может уменьшиться в два раза, но объем ее не изменяется. Мышца обладает способностью к преобразованию энергии с высоким коэффициентом полезного действия. Работа мышцы зависит от ее массы. Чем больше масса, тем большую работу мышца может выполнять. Один грамм мышечной ткани производит работу, равную $5 \cdot 10^{-2} - 10^{-1}$ Дж. При этом источником химической энергии является АТФ, свободная энергия которой при гидролизе уменьшается на $41,8 \cdot 10^3$ Дж/моль. Коэффициент полезного действия мышцы равняется 70%, т. е. для механической работы используется $29,3 \cdot 10^3$ Дж. Эти данные подтверждаются при определении расхода АТФ в одном цикле мышечного сокращения с помощью динитрофторбензола, блокирующего фосфорилирование АДФ креатинфосфатом. При этом подавляются активные группы белка креатинфосфокиназы замещением их динитрофенольными остатками.

Однако до настоящего времени на молекулярном уровне остаются полностью нераскрытыми процессы сокращения и расслабления мышечного волокна. Остается неясным, как используется свободная энергия, которая высвобождается при разрыве макроэргической фосфат-

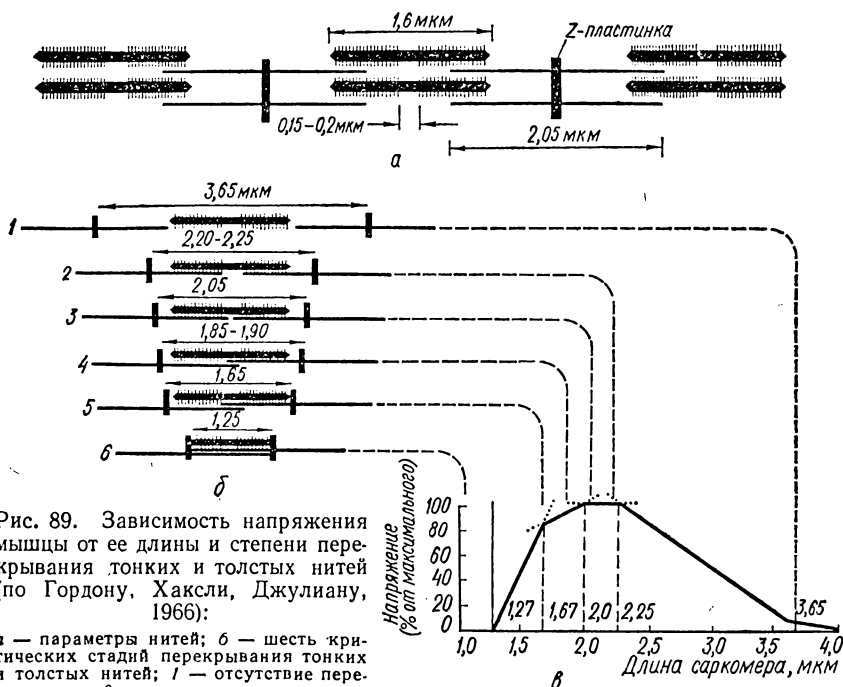
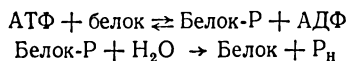


Рис. 89. Зависимость напряжения мышцы от ее длины и степени перекрывания тонких и толстых нитей (по Гордону, Хаксли, Джулиану, 1966):

а — параметры нитей; б — шесть критических стадий перекрывания тонких и толстых нитей; 1 — отсутствие перекрывания; 2 — максимальное перекрывание тонких нитей с зоной толстых нитей, несущей выступы; 3 — максимальное перекрывание нитей; 4 — перекрывание тонких нитей, равное ширине зоны толстых нитей, где выступы отсутствуют; 5 — степень сокращения, при которой толстые нити сталкиваются с Z-пластинками; 6 — степень перекрывания, когда концы толстых нитей смыкаются; в — график зависимости напряжения от длины мышцы. Видна связь формы кривой со степенью перекрывания тонких нитей и зоной толстых нитей, несущей выступы.

ной связи. Но основная энергия при этом не рассеивается, а используется для выполнения механической работы. Можно предполагать, что это осуществляется через конформационные изменения мышечных белков за счет энергии химических связей АТФ. Видимо, АТФ сначала взаимодействует с белком мышцы, последний фосфорилируется, изменяет свою конформацию и при этом совершается механическая работа. В процессе расслабления мышцы фосфат превращается в свободную фосфорную кислоту. Процессы цикла сокращение — расслабление протекают по схеме:



Если с помощью ингибитора разобщить отщепление фосфатной группы от механохимических процессов, то нарушается сокращение мышцы. Элементарный акт мышечного сокращения состоит в возникновении силы тяги при соприкосновении головки тяжелого меромиозина с актином. Эта сила возникает за счет конформационного перехода в глобулярной части меромиозина в результате его фосфорилирования. Глобулярный конец меромиозина создает усилие поворотом относительно оси волокна или своей деформацией.

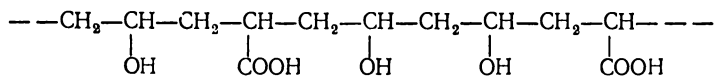
Таким образом, мы в данном случае имеем пример, когда свободная энергия химической реакции вызывает достаточно протяженные изменения конформации белковой макромолекулы. Причиной этих изменений являются кулоновские силы электростатического взаимодействия между зарядами, которые несут молекулы белка.

подавляющее большинство мышц сокращается один раз в ответ на каждый импульс, поступающий от двигательного нерва. Такие мышцы называются синхронными. Но мышцы насекомых сокращаются много раз в ответ на один нервный импульс. Такие мышцы называются асинхронными. Они отличаются слабым развитием или отсутствием саркоплазматической сети, наличием Т-системы, имеют два набора волокон. С помощью одного крыло поднимается, а другого — опускается. Сокращение одного набора волокон обуславливает растяжение второго.

Имеются мышцы, которые сокращаются и остаются в этом состоянии длительное время. Такие мышцы есть у моллюсков; они называются запирательными, содержат много тропомиозина А, который удерживает мостики между миофибриллами и актиновыми нитями в сокращенном состоянии мышцы.

Физическую сущность механохимических процессов сокращения мышечных белков можно проследить на модели высокомолекулярных полимерных электролитов. Состояние полимерных электролитов определяется энергией электростатического отталкивания зарядов, которые несут ионогенные группы полимерных цепей. Состоянием полимера полиэлектролита можно управлять, если изменять заряды его ионогенных групп. Если мы возьмем полимер полиэлектролит, основанный на слабой кислоте, то ее степень ионизации можно изменять добавлением щелочи. При ионизации электростатические силы полимера будут возрастать, он будет растягиваться и объем геля возрастает, а при разрядке, наоборот, электростатические силы уменьшаются и полимер будет сокращаться. Сокращение и растяжение геля происходит во все стороны и он способен выполнять механическую работу.

На этой основе В. Кун и А. Качальский создали модель мышечного волокна. Работа этой модели осуществлялась за счет энергии диссоциации слабой кислоты, т. е. за счет перестройки ионов водорода и карбоксильных групп. Был получен сополимер акриловой кислоты и винилового спирта.



При обработке глицерином между цепями в ряде точек сополимера возникают эфирные связи. Полимер становится нерастворимым в воде.

Если такой сополимер поместить в HCl (pH-2), то карбоксильные группы его оттитровываются, устраняются силы отталкивания

отрицательных зарядов вдоль оси сополимера. Нить сокращается, происходит свертывание цепочек в клубки. Волокно сокращается в два раза и совершается работа около $2,5 \cdot 10^{-1}$ Дж/г. Это близко к работе, выполняемой мышечным волокном. Аналогичная картина, видимо, происходит в головке меромиозина. Но структура белковой молекулы поддерживается действием разных сил. Стабилизация вторичной и третичной структуры происходит за счет уравнивания сил притяжения и отталкивания, что соответствует минимальному значению свободной энергии. Поэтому при изменении зарядов на белковой молекуле изменяется ее конформация, создается сила тяги и совершается механическая работа.

4. Энергетика мышечного сокращения. Мышца способна выполнять большую механическую работу и расходовать на это значительные количества АТФ. При этом расход энергии строго соответствует объему выполняемой работы, т. е. мышца способна функционировать эффективно, с высоким коэффициентом полезного действия. Это становится возможным при наличии соответствующих механизмов регуляции мышечного сокращения. Мышца может получать внезапно большие количества энергии за счет креатинфосфата у высших организмов и аргининфосфата — у беспозвоночных. При быстром потреблении креатинфосфата мышечной клеткой его запасы пополняются при помощи аденозинтрифосфорной кислоты. Последняя синтезируется за счет энергии, заключенной в мышечном гликогене. Но при более интенсивном мышечном сокращении наблюдается недостаточность в обеспечении мышцы кислородом, чтобы поддерживать соответствующий уровень аэробного метаболизма гликогена.

Однако мышца приспособлена к сокращению и в анаэробных условиях. В этом случае в ней накапливается молочная кислота и наступает состояние мышечного утомления. Тем не менее в случае интенсивной работы за счет гликолиза мышца может обеспечить локальное образование аденозинтрифосфорной кислоты. Молочная кислота, которая при этом накапливается, у высших организмов удаляется из мышцы током крови, в других тканях организма подвергается окислению или превращается снова в гликоген. Энергетический обмен в мышце может быть представлен в виде схемы (рис. 90). Таким образом, при мышечном сокращении, при преобразовании химической энергии в механическую работу используется аденозинтрифосфорная кислота. Постоянная концентрация последней поддерживается за счет энергии креатинфосфата,



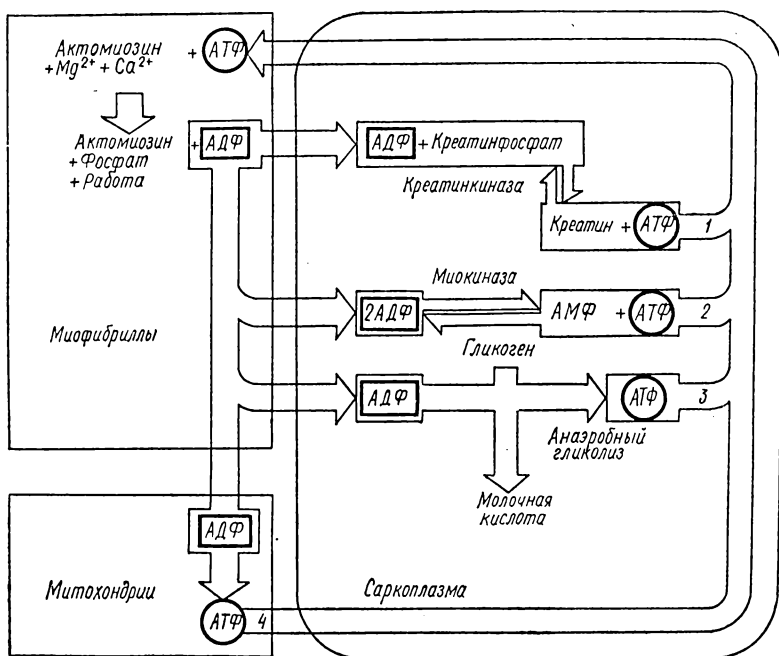


Рис. 90. Энергетика механохимических преобразований в мышце (по Сикевичу 1959).

Четыре системы синтеза АТФ (1—4).

который используется для превращения АДФ в АТФ. При нормальной работе мышца покрывает свои энергетические расходы только за счет аэробного метаболизма, в процессе которого образуется АТФ в многочисленных митохондриях, представленных в мышечной клетке. При высокой нагрузке, интенсивной работе мышца из-за недостатка кислорода не покрывает потребности в АТФ. Тогда АТФ синтезируется в процессе анаэробного метаболизма.

Миофибрилла и митохондрия находятся в функциональной связи. При сокращении мышечного волокна АТФ превращается в АДФ, которая затем транспортируется в митохондрии, стимулирует их работу и является акцептором фосфата. В результате образуется АТФ, которая снова включается в цикл превращений в миофибрилле, и т.д.

Таким образом, сокращение мышцы сопровождается уменьшением креатинфосфата. Но если ингибировать креатинфосфаткиназу (процесс переноса фосфатного остатка от АТФ на креатин), то наблюдается уменьшение АТФ. Из этого следует, что первичным источником энергии для мышечного сокращения является АТФ. Но процесс переноса фосфатного остатка от креатинфосфата на АДФ осуществляется настолько эффективно и быстро, что очень трудно обнаружить убыль АТФ.

Тем более, что для поддержания мышцы в активном состоянии необходимо расщепить около 10^{-3} моль АТФ на 1 г мышц в течение 1 мин. Установлено, что при рН-6, что имеет место в саркоплазме, равновесие реакции креатинфосфат + АДФ $\rightleftharpoons$ креатин + АТФ сильно сминуто вправо, т. е. быстрое убывание креатинфосфата способствует синтезу АТФ. АТФ может образовываться в мышечной клетке также за счет энергии, которая высвобождается путем расщепления углеводов. Каким образом энергия расщепления АТФ используется при мышечном сокращении? Эта энергия необходима для сокращения мышцы и поддержания ее в расслабленном состоянии. При сокращении АТФ расщепляется АТФ-азой, представленной в поперечных мостиках головок миозина. Энергия используется для перемещения мостиков. Эта АТФ-аза ингибируется ионами Mg^{2+} , связанного с миозином, и активируется ионами Ca^{2+} , связанного с актином. При сокращении Ca^{2+} выталкивается из саркоплазматической сети, что снимает действие Mg^{2+} , повышается активность АТФ-азы, высвобождается энергия, возникают конформационные изменения белков миозиновых нитей и продвижение тонких нитей.

Расслабление мышцы наступает при пониженной активности АТФ-азы, которая отмечается при уменьшении концентрации Ca^{2+} и усилении ингибирующего действия Mg^{2+} . Возрастает концентрация АТФ, при которой происходит диссоциация комплекса актин — миозин, изменяется конформация этих белков и теряется возможность их взаимодействия. Но эти представления еще требуют более обстоятельного экспериментального подтверждения.

Как видно, основное внимание при изучении механохимических преобразований и биологического движения было сосредоточено на мышцах животных, которые обладают наиболее выраженными сократительными способностями. Выяснена тонкая структура миофибрилл, взаимодействие основных сократительных белков, высказаны предположения о структурных и энергетических основах механизма сократительного процесса. Но структурная организация мышцы очень сложна, и это затрудняет изучение механизма сократительного процесса. Поэтому в таких случаях используются другие элементарные механохимические преобразовательные системы.

5. Элементарные механохимические преобразовательные системы. Одним из таких объектов исследования, в котором представлены элементарные механохимические преобразовательные системы, является плазмодий миксомицет *Physarum polycephallum*, у которого отмечено выраженное ритмическое движение протоплазмы со скоростью до 1 мм/с. В связи с этим из плазмодия был выделен актомиозиноподобный белок. При добавлении АТФ к актомиозиновому экстракту из слизистого гриба вязкость падает, а затем повышается. Повышение вязкости прямо пропорционально увеличению активности АТФ-азы, т. е. интенсивности отщепления неорганического фосфата от АТФ (рис. 91). Белок плазмодия был

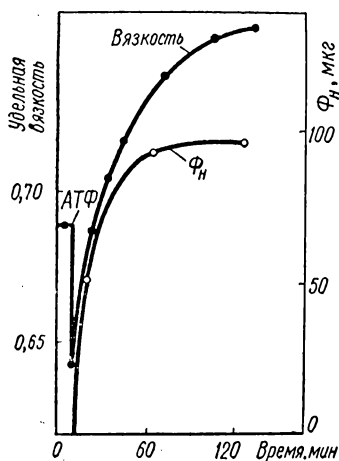


Рис. 91. Наличие актомиозиновой системы в слизистом грибе *Physarum polycephalum*. Резкое падение и медленное восстановление вязкости после добавления АТФ. Гидролиз АТФ и появление неорганического фосфора идет параллельно восстановлению вязкости (по Леви).

очищен и оказалось, что он сам обладает АТФ-азной активностью. Другие свойства этого белка были близкими к свойствам актомиозина мышцы. После многократной очистки этого белка переосаждением сернокислым аммонием был получен препарат высокой чистоты и назван миксомиозином, который участвует в движении протоплазмы плазмодия. АТФ-азная

активность миксомиозина, как и актомиозина, чувствительна к *n*-хлормеркурибензоату и восстанавливается цистеином, что говорит о том, что в состав активного центра фермента входит SH-группа. Из плазмодия слизистого гриба был выделен белок, очень близкий по свойствам к актину мышц. В дистиллированной воде он находится в Г-форме, а при добавлении АТФ и KCl полимеризуется в Ф-форму, которая имеет двуспиральную структуру, напоминающую Ф-актин мышцы. Один моль Ф-актина плазмодия также превращает один моль АТФ в АДФ: $n\Gamma\text{-актин} + n\text{АТФ} \xrightarrow{0,3 \text{ моль KCl}} n\text{Ф-актин-АДФ} + n\text{Ф}_\text{н}$. При полимеризации Ф-актина в присутствии ионов Mg^{2+} он с постоянной скоростью расщепляет АТФ

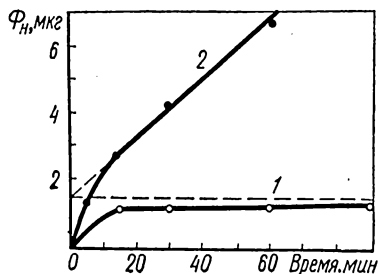


Рис. 92. АТФ-азное действие Ф-актина (по Оосава, 1967):

1 — количество неорганического фосфата ($\text{Ф}_\text{н}$; прерывистая линия) эквивалентно количеству Г-актина. В отсутствие Mg^{2+} плазмондальный Г-актин полимеризуется в Ф-актин; при этом эквивалентное количество АТФ превращается в АДФ; 2 — плазмондальный актин в присутствии Mg^{2+} приобретает АТФ-азное действие и с постоянной скоростью гидролизует АТФ.

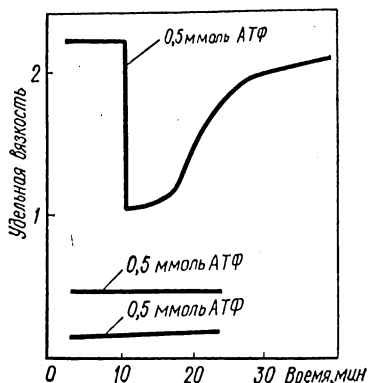


Рис. 93. Влияние АТФ на вязкость актомиозина, полученного соединением актина из слизистого гриба *Physarum* и миозина из поперечнополосатой мышцы кролика (по Оосава, 1966):

Актин — нижняя линия; миозин — средняя; актомиозин — верхняя. Вязкость резко возрастает после соединения актина с миозином и падает при добавлении АТФ.

(рис. 92): $\text{АТФ} \xrightarrow[2 \text{ м/моль } \text{MgCl}_2]{\text{Актин } 0,1 \text{ моль } \text{KCl}} \text{АДФ} + \text{Ф}_n$. Сходство между актином плазмодия и актином мышцы установлено также по аминокислотному составу, по способности сополимеризоваться и давать Ф-актин с промежуточной вязкостью, по образованию актина плазмодия с миозином мышцы актомиозинового комплекса, который понижает вязкость при добавлении АТФ (рис. 93).

Из плазмодия слизистого гриба был выделен также миозин, который является близким по своим свойствам с миозином мышцы.

Если ввести в плазмодий слизиевой плесени АТФ, то гелевый слой протоплазмы переходит в золь и это сопровождается более активными протоплазматическими токами, т. е. движение плазмодия обусловлено теми же силами, что и движение амебы — переходом золь — гель, вызываемым актомиозиноподобным белком.

Ротационное движение протоплазмы наблюдается также у водоросли *Nitella flexilis*. Из водоросли был выделен препарат белка, обладающий высокой АТФ-азной активностью в присутствии ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} . В присутствии *n*-хлормеркурибензоата активность сначала возрастает, видимо, из-за стерических причин. Но дальнейшее повышение концентрации этого сульфгидрильного яда, обеспечивающее полное связывание SH-группы АТФ-азы, вызывает подавление активности этого белка.

Вязкость этого белка падает в присутствии АТФ, но по мере ферментативного расщепления АТФ вязкость возрастает. АТФ-азная активность этого белка и действие АТФ на вязкость препарата фермента показывает на его сходство с актомиозиноподобными белками. Актомиозиноподобные белки обнаружены в ряде других изученных объектов животного и растительного происхождения. Последние хотя и не способны к активному движению, но обладают выраженным движением протоплазмы. Все это говорит о наличии идентичных двигательных механизмов в клетках всех живых организмов. Можно предполагать, что молекулы сократительного белка кортикального геля клетки водоросли вытянуты вдоль направления движения протоплазмы. Эти молекулы входят во временную связь с молекулами золя с помощью водородных связей или через циклические переходы групп $-\text{S}-\text{S}-$ и 2SH , так как ПХМБ останавливает ротационное движение, а цистеин активирует его. После этого молекулы геля сокращаются и вызывают передвижение молекул золя. Затем после расслабления цикл возобновляется и осуществляется непрерывный поток протоплазмы. Но это иной процесс, по сравнению со скольжением нитей актина вдоль миозиновых нитей.

Наиболее простыми двигательными аппаратами являются жгутики бактерий, сперматозоидов, водорослей и многих простейших, а также реснички некоторых тканей.

У жгутиков волнообразное движение начинается у основания и распространяется к его концу. Таким образом, клетка передвигается в жидкой среде. Реснички совершают колебания в одной

плоскости и происходит или движение клетки, или ток окружающей жидкости.

Реснички и жгутики эукариотов являются клеточными придатками. Ресничками называют короткие и более жесткие образования клетки, а жгутиками — образования более длинные, обладающие волнообразным движением. Эти понятия имеют переходное значение. Реснички имеют толщину 0,2—0,25 мкм и 5—10 мкм в длину, жгутики достигают длины 150 мкм. Реснички обычно распределены равномерно по всей поверхности клетки, а жгутики находятся на определенных ее участках. Реснички растут на месте, где в клетке расположены базальные тельца-кинетосомы, и этот процесс контролируется геномом. Через кинетосому из клетки в ресничку и жгутик поступают АТФ и другие вещества.

Реснички совершают волнообразные (ундулирующие) и гребковые (маятникообразные) движения, которые строго координируются, в результате все реснички совершают однообразное движение. Реснички всех видов построены из микротрубочек по типу $9 + 2$, когда девять сдвоенных трубочек (дублетов) расположено по кругу снаружи, а в центре находится две трубочки. Наружные микротрубочки имеют выступы. Реснички растут из цитоплазмы, в результате оказываются покрытыми клеточной мембраной. Движение ресничек и жгутиков эукариотов обуславливается конформационными изменениями белков за счет энергии расщепления АТФ. Если к выделенным ресничкам или жгутикам добавить АТФ и ионы магния, то наблюдается движение этих структур за счет гидролиза АТФ в девяти наружных волокнах. Реснички и жгутики имеют сходное химическое строение и состоят из белка и липидов. Последние входят, видимо, в состав мембраны. Белки слабо растворяются в воде, содержат много аспарагиновой и глутаминовой кислот, обладают АТФ-азной активностью.

Из наружных волокон выделено три белка, два из них имеют высокую молекулярную массу и обладают магнием-зависимой АТФ-азной активностью. Эти белки называются динеинами, при дифференциальном центрифугировании оседают при разной скорости, имеют разную константу седиментации и их обозначают 30S- и 14S-динеинами.

Если у наружных волокон удалить выступы, то с ними взаимодействует 30S белок, и выступы восстанавливаются. 30S белок, видимо, выполняет роль АТФ-азы. Третий белок, выделенный из наружных волокон, имеет константу седиментации 4S. Белок, выделенный из жгутиков сперматозоидов, обладает АТФ-азной активностью, которая сосредоточена в хвостовой его части. Здесь же обнаружена сукциндегидрогеназа, что способствует более быстрому обеспечению аденозинтрифосфорной кислотой сократительного аппарата. Эта АТФ-аза относится к тиоловым ферментам, так как ПХМБ в концентрации 10^{-3} моль снижает ее активность до 70%, а цистеин восстанавливает ее. Ферментативные свойства белков из ресничек и жгутиков имеют большое сходство. Сократи-

тельные белки ресничек и жгутиков имеют сходство с актомиозином поперечнополосатых мышц, но они не являются тождественными. Белок ресничек и жгутиков имеет более простое строение. Однако физические и химические процессы, обуславливающие движение и сокращение мышечных волокон, являются сходными, т. е. имеется принципиальное сходство в механизме двигательных процессов органелл и мышц. В основе волнообразного движения жгутиков лежат сокращения всех белков и компонентов, входящих в их состав. Движение ресничек осуществляется таким образом. Одна группа микрофибрилл сокращается и растягивает микрофибриллы другой группы. Сокращение последних возвращает ресничку в исходное положение.

Источником энергии для движения ресничек является АТФ, которая расщепляется белками наружных фибрилл, обладающих АТФ-азной активностью. Снабжение ресничек энергией контролируется базальными тельцами. Движение жгутиков осуществляется за счет энергии всей клетки: запасом АТФ в ней. Например, пурпурная бактерия *Rhodospirillum* движется в сторону источника света, так как при этом в процессе фотосинтетического фосфорилирования образуется АТФ.

Жгутики бактерий имеют особенности в строении и механизме осуществления движения. Эти образования возникают из цитоплазмы, не имеют, видимо, мембраны базального тельца. Они не имеют структуры типа $9 + 2$, а состоят из палочковидных фибрилл или вытянутых спиралей. Белок, выделенный из жгутиков, близок по составу аминокислот к белку ресничек.

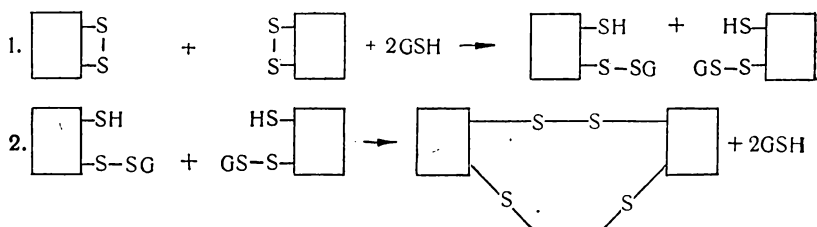
Жгутики бактерий имеют меньшую толщину, чем жгутики клеток высших организмов; не имеют своего механохимического аппарата. Движение осуществляется за счет энергии АТФ базальных гранул, которыми прикреплены жгутики. Жгутики при центрифугировании отделяются, не обладают подвижностью и в присутствии АТФ. Белок жгутиков бактерий называется флагеллином. Он имеет молекулярную массу около 40 000, не расщепляет АТФ. В кислой среде этот белок расщепляется на субъединицы. Эти субъединицы при соответствующей ионной силе и рН среды произвольно образуют структуру, близкую или идентичную естественным жгутикам. Жгутик состоит из трех белковых закрученных флагеллиновых нитей. Флагеллин выделен, очищен. Он легко агрегирует, что лежит в основе образования жгутика. Жгутики состоят из строго упорядоченных белковых молекул. Рентгеноструктурный анализ говорит о сходстве флагеллина с миозином. Таким образом, одним из отличий жгутиков и ресничек эукариотов от жгутиков бактерий состоит в том, что последние не имеют своей двигательной механохимической системы.

Механохимические превращения лежат также в основе сложных и скоординированных движений хромосом при митотическом делении клетки. Расхождение осуществляется с помощью веретена, состоящего из специфического белка. Молекулярный механизм

этого явления остается полностью невыясненным. Из изолированного ахроматинового аппарата был выделен белок, который по аминокислотному составу имел некоторое сходство с мышечным актином и обладал аденозинтрифосфатазной активностью.

Изучение биохимических и физико-химических свойств митотического аппарата еще не позволяет определенно говорить о ходе всех реакций, лежащих в основе сократительного процесса и движения. Предполагается, что митотический аппарат возникает в результате образования межмолекулярных белковых связей $-S-S-$, которые стабилизируют фибриллы веретена. Это подтверждается тем, что изолированный митотический аппарат легко растворяется в тиогликолате, *n*-хлормеркурибензоате вследствие восстановления и разрыва связи $-S-S-$.

Схематически процесс желирования белка в результате превращения внутримолекулярных связей $-S-S-$ в межмолекулярные по Д. Мейзиа может быть представлен таким образом:



Хотя за последние годы ведется интенсивное исследование физико-химических механизмов движения митотического аппарата, но еще много остается неясного в процессах возникновения ахроматической структуры, биохимии движения хромосом и других двигательных реакций; а также в дифференцировании сложной структуры митотического аппарата. При растяжении митотического аппарата наблюдается увеличение двойного лучепреломления, что говорит о возрастающей ориентации субъединиц.

Для изучения фибриллярных образований ахроматинового аппарата разработан ряд методов его изолирования. Митотический аппарат легче выделяется из интенсивно делящихся клеток 30—40%-ным этанолом при температуре -10° . Цитоплазма затем диспергируется дигитанином или другим мягким детергентом. Но при этом методе выделения митотического аппарата происходит денатурация и как бы «фиксация» веретена. Более мягким способом выделения митотического аппарата является метод, основанный на наличии в белке веретена дисульфидных мостиков, которые стабилизируют его структуру. Метод состоит в том, что концентрированным раствором глюкозы (1 моль) разрушают клетки дробящегося яйца морского ежа в присутствии дитиодигликоля, который защищает митотический аппарат.

На этом принципе разработано несколько методов выделения митотического аппарата. В частности, применение вместо этанола

гексиленгликоля позволяет выделить митотический аппарат в близком к интактному состоянию.

Сухое вещество митотического аппарата на 90% состоит из белка, а остальные 10% составляют РНК, липиды, полисахариды. Белок веретена обладает высокой АТФ-азной активностью, и это говорит о сходстве процессов, протекающих в веретене и мышце при их сокращении. Из веретена выделено несколько белков. Основным структурным компонентом митотического аппарата является белок, состоящий из монодисперсных частиц, имеющих молекулярную массу 880 000. Кроме этого, в состав веретена входят белки с молекулярной массой 110 000, 34 000 и 68 000. Последний, видимо, является димером белка с молекулярной массой 34 000. Белки веретена содержат много пролина, поэтому полипептидная цепь имеет небольшие участки α -спиральной структуры.

Митотический аппарат образован большим числом микротрубочек, которые находятся в белковом матриксе. Между микротрубочками веретена имеются поперечные мостики. Исходя из этого можно проводить аналогию между механизмами сокращения мышцы и веретена на основе гипотезы скольжения. Но микротрубочки содержат только один тип белка, поэтому для объяснения движения хромосом больше подходит гипотеза динамического равновесия. По этой гипотезе длина микротрубочек изменяется в результате включения или удаления субъединиц, из которых они состоят. Это подтверждается изменением двойного лучепреломления структуры веретена при расхождении хромосом на различных фазах митоза. Изменение длины микротрубочек сходно с превращением Г-актина в Ф-актин, и оно также обусловлено присутствием АТФ, хотя роль его в этом случае не совсем понятна.

Формирование веретена происходит, видимо, из широко представленных в клетке сократительных структур, так называемых микронитей, или микрофиламентов, диаметр которых колеблется около 40—50 Å. Предполагается, что микронити имеют однообразную структуру во всех клетках, так как образуются, видимо, из Ф-актина или другого близкого к нему белка. Микронити особенно широко представлены в клетках, которые участвуют в морфогенетических процессах и движении. Но остается не совсем ясным процесс сокращения этих нитей, в которых не обнаруживается миозин. Возможно, что в основе и других внутриклеточных движений лежит процесс образования и распада микротрубочек и их взаимодействия.

Бактериофаги как наиболее простые образования являются удобными объектами также для элементарного изучения физико-химических особенностей сократительных процессов. Наиболее характерно и четко сократительные структуры представлены и были изучены у бактериофага Т2. Сократительные процессы и движение в основном представлены в хвостовой его части. Хвост бактериофага Т2 имеет вид жесткой полый трубки, окруженной белком. В процессе адсорбции фага на клетке-хозяине хвостовой чехол

укорачивается в два раза, а в ширину увеличивается на 30%. Процесс сокращения носит скачкообразный и необратимый характер. В основе строения чехла лежит спирально свернутый тяж, состоящий из последовательно связанных между собой белковых молекул. Укорочение чехольного тяжа при сокращении вызывает, видимо, появление вращательных сил, за счет которых происходит поворачивание стержня, что способствует проникновению его через оболочку клетки.

Белок чехла образует структуру, которая сокращается при соприкосновении бактериофага с клеткой хозяина. Этот белок по своим свойствам агрегировать имеет сходство с актином мышц животных. Одновременно по агрегации в присутствии двухвалентных ионов и взаимодействию с миозином он отличается от свойств актина мышц животных.

Фаги не имеют своего обмена веществ, поэтому возникает вопрос об энергетике сократительных процессов хвостового чехла бактериофага. Оказалось, что в хвостовой части фага имеется белок, который обладает аденозинтрифосфатазной активностью. АТФ-азным свойством обладает миозинподобный белок, он локализован в хвостовом отростке бактериофага и, видимо, выполняет важную роль в сократительном движении в процессе внедрения в бактериальную клетку. При взаимодействии бактериофага с бактериальной клеткой наблюдается интенсивный гидролиз нуклеозидтрифосфатов. Это, видимо, необходимо для поддержания четвертичной структуры белков хвостового чехла в растянутом состоянии.

Четвертичная структура сократительного белка бактериофага представляет собой спираль. При расщеплении аденозинтрифосфатов происходит сокращение, в основе которого лежит агрегационный процесс, сходный с полимеризацией актина в мышце, т. е. процесс полимеризации, лежащий в основе укорочения *I*-диска в мышечном волокне, имеет сходство с агрегацией белка чехла отростка бактериофага. При сокращении, видимо, происходит изменение четвертичной и третичной структуры чехольного белка, что ведет к изменению конформации его полипептидных цепей. При этом наблюдается переход α -конфигурации белка в β -конфигурацию.

Отчетливо выраженного движения у растений не наблюдается. Однако у этих организмов двигательная реакция также представлена не только в митотическом аппарате, протоплазме, но более активными формами движения. Примером может быть раскрывание и закрывание цветов, движение листьев мимозы, в которых раздражение распространяется со скоростью от 2 до 15 мм/с и др. Известно, что передача возбуждения с нерва на мышцу у животных организмов осуществляется с помощью медиатора, роль которого выполняет ацетилхолин. Предполагается, что у растений медиатором служит мезоинозит.

В основе двигательной реакции у растений и животных лежат, видимо, близкие физико-химические и энергетические механизмы.

Об этом свидетельствуют данные о наличии аденозинтрифосфатазной реакции у растительных организмов в органах с активными формами движения. Механохимические превращения и биологическое движение интенсивно изучается, накоплен большой фактический материал о молекулярной организации сократительных белков, их функции. На этой основе разработаны гипотезы о механизме сократительной реакции. Подробно изучена третичная и четвертичная структура актина и белков простейших сократительных систем (хвостовой чехол бактериофага, жгутиков и др.). Однако остается недостаточно изученной первичная и вторичная структура сократительных белков. Недостаточное знание различных уровней структурной организации этих белков является известным тормозом в познании механизма сокращения. Актиноподобные и миозинподобные белки являются, видимо, обязательными факторами сократительной реакции во всех случаях механохимических преобразований и в различных формах движения. Об этом свидетельствует наличие актомиозина в различных организмах (от клеток зеленой водоросли *Nitella flexilis* до тканей животных).

По внешнему проявлению биологические формы движения разнообразны: движение амёбы, цитоплазмы, различных органелл, хромосом, мембран (пиноцитоз), сокращение мышцы и т. д. Но молекулярные механизмы, видимо, во всех случаях сходны или одинаковы.

Таким образом, биологическое движение можно объяснить исходя из механизмов: скольжения нитей относительно друг друга; укорочения нитей их спирализацией; вставкой и удалением субъединиц, составляющих белок. В изучении механохимических превращений при биологическом движении получено много фактов о структуре и молекулярном механизме сократительного аппарата, об энергетике мышечного сокращения. Но остается полностью непонятным важнейшее звено сократительного акта — каким образом энергия химических связей, освобождающаяся при расщеплении аденозинтрифосфорной кислоты, используется для механической работы, какая субмолекулярная организация лежит в основе мышечного сокращения.

Список литературы

- Биофизика мышечного сокращения (сборник). М., «Наука», 1966.
В о р о б ь е в В. И. О некоторых новых аспектах механохимических явлений. ДАН СССР, 137, 1961.
Г е й л ь б р у н Л. Динамика живой протоплазмы. М., Изд-во иностр. лит., 1957.
Г и л е в В. П. Изменение структуры саркомера в процессе сокращения поперечнополосатого мышечного волокна. — «Биофизика», № 6, 1961.
Л ю б и м о в а М. Н., Э н г е л ь г а р д т В. А. АТФ-аза и миозин мышц. «Биохимия», № 4, 1939.
Л ю б и м о в а М. Н. К характеристике двигательной системы растения *Mimosa pudica*. В кн.: Молекулярная биология, проблемы и перспективы. М., «Наука», 1964.

Поглазов Б. Ф. О механизме элементарных движений живых существ. «Успехи современной биологии», № 51, 1961.

Поглазов Б. Ф. Структура и функции сократительных белков. М., «Наука», 1965.

Сент-Дьердьи А. О мышечной деятельности. М., Медгиз, 1947.

Хаксли Х. Е. Молекулы и клетки. М., «Мир», 1967.

Хилл А. Механика мышечного сокращения. М., «Мир», 1972.

Энгельгардт В. А., Любимова М. Н. К механо-химии мышц. «Биохимия» № 7, 1942.

Энгельгардт В. А. Химические основы двигательной функции клеток и тканей.— «Вестн. АН СССР», № 1, 1957.

Энгельгардт В. А. Фосфорная кислота и функция клетки.— «Изв. АН СССР», сер. биол., 2, 1945.

Allen R. D., Kamian N. Primitive Motile Systems in Cell Biology. New York Academic Press, Inc. 1964.

Huxley H. E. J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 631, 1957. Scientific. Amer. offprints, San Francisco, 1965.

Huxley H. Proc. Roy. Soc. B, 160, 442, 1964. Science, 164, 1356, 1969.

Katchalsky A. Elementary mechanochemical processes. Contractile polymers, Pergamon press, London, 1960.

Kuhn W. Experientia, 5, 319, 1949.

Глава X

ВОСПРИЯТИЕ, ПРЕОБРАЗОВАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭНЕРГИИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ СИСТЕМАМИ

Стационарное состояние, кажущаяся стабильность биологической системы поддерживаются не прекращающимся притоком свободной энергии извне. Если приток энергии извне прекращается, это приводит к возрастанию энтропии, дезорганизации и смерти биологической системы.

Из второго закона термодинамики следует, что всякая изолированная система спонтанно стремится к состоянию с меньшей степенью организации, к увеличению энтропии, в то время как энтропия, степень дезорганизации биологических систем уменьшается. Это объясняется тем, что биологическая система является открытой, неизолированной и постоянно обменивается с внешней средой веществом и энергией. За счет притока энергии уменьшается энтропия биологической системы.

В процессе эволюции в биологических системах выработались механизмы, с помощью которых энергия воспринимается из окружающей среды, преобразуется из одной формы в другую и используется для выполнения различных видов внутриклеточной работы. Все эти системы делятся на две группы. Системы, служащие для восприятия внешних воздействий и их преобразования в электрический импульс или другую форму энергии. Эта энергия затем может быть использована клеткой. Ко второй группе относятся системы, которые производят или используют АТФ или другие макроэргические соединения. Эти системы имеются в клетках всех организмов без исключения. С помощью этих систем образуется АТФ, идет синтез белков, нуклеиновых кислот, углеводов, осуществляется движение веществ и т. д.

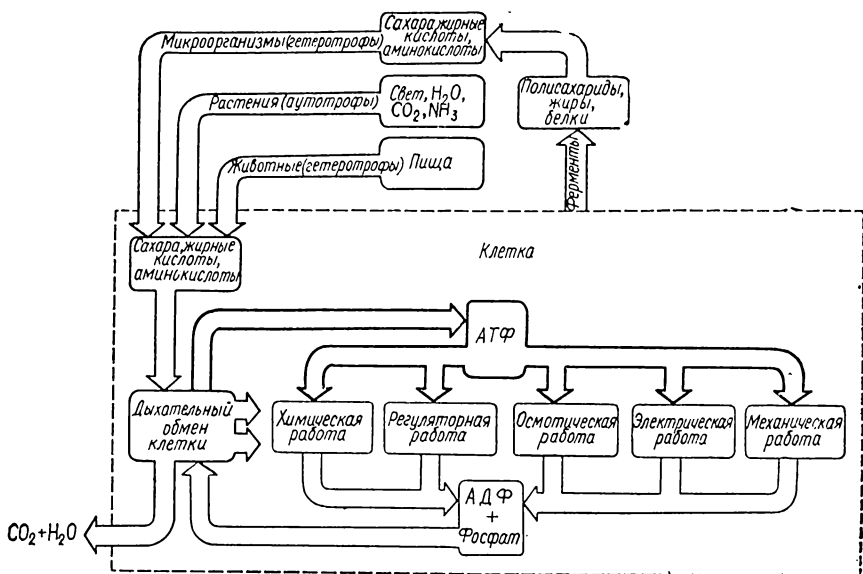


Рис. 94. Схема путей образования АТФ и превращения содержащейся в ней энергии в химическую работу.

По использованию энергии животные и растительные организмы мало отличаются друг от друга. Но они отличаются по первичному источнику энергии. Растения являются автотрофами и способны воспринимать и преобразовывать энергию электромагнитных колебаний потока солнечного излучения. За счет этой энергии они синтезируют углеводы, жиры, белки. Животные — гетеротрофы, и получают эти соединения с пищей. Энергия, которая заключена в химических связях углеводов, жиров, белков, непосредственно не может быть использована для выполнения той или другой работы в клетке. Поэтому эти группы веществ в дыхательном обмене подвергаются расщеплению, а затем окислению. В результате образуется аденозинтрифосфорная кислота. Макроэргические связи АТФ являются универсальным источником энергии для многочисленных эндергонических процессов в клетке (рис. 94).

Структура клетки как единицы биологической активности способна выполнять различные функции, для осуществления которых необходим приток энергии и совершение различных видов работы. Клетка выполняет большую химическую работу, в результате происходит синтез биологически важных биомакромолекул. При этом макромолекулы обладают большим запасом энергии, имеют меньшую энтропию, чем исходные соединения.

Биологические системы избирательно поглощают вещества из окружающей среды. Поэтому концентрация различных соединений, элементов в клетке иногда значительно отличается от их концентрации в окружающей среде. На поддержание такого различия в

распределении веществ внутри и вне клетки тратится значительное количество энергии.

Известно, что цитоплазматическая мембрана неодинаково заряжена на своей наружной и внутренней сторонах, в результате чего возникает и поддерживается определенный электрический потенциал. Это требует также затраты энергии и выполнения электрической работы. Механохимические преобразования, лежащие в основе процессов биологического движения, требуют непрерывного притока энергии на выполнение механической работы. Многочисленные процессы синтеза и распада в клетке между собой связаны и соподчинены наличием строгой регуляции, что ведет к большей упорядоченности системы, уменьшению ее энтропии и требует затраты энергии извне. Таким образом, согласованность, скоординированность биохимических процессов, осуществляемая регуляторными механизмами клетки, поддерживается затратой энергии на выполнение соответствующей работы. Затрата энергии необходима также на выполнение ряда других биологических функций.

В развитии молекулярных представлений об энергообеспеченности биологических систем важно выяснение тех соединений, которые способны трансформировать энергию в процессе переноса электронов по цепи последовательных окислений и восстановлений. Особое значение имеет определение типа молекул, выполняющих биологическую функцию транспорта, трансформации и аккумуляции энергии. Однако эти вопросы отличаются чрезвычайной сложностью и пока что трудно поддаются изучению и пониманию на молекулярном уровне.

Можно выделить важнейшие системы, с помощью которых живая клетка высвобождает, преобразует и аккумулирует энергию. В основе действия этих систем лежит общий процесс преобразования энергии окисления в энергию макроэргической связи аденозинтрифосфорной кислоты.

Эволюционно более старым и, видимо, поэтому более общим для животных, растительных и бактериальных клеток является гликолитический процесс. При этом дважды фосфорилированная молекула шестиуглеродного сахара расщепляется на две молекулы триозы. Анаэробное окисление последних сопрягается с фосфорилированием и образованием аденозинтрифосфорной кислоты. При этом молекула, которая подвергается окислению, одновременно является и акцептором неорганического фосфата.

Более сложный механизм сопряжения первичного окисления и фосфорилирования представлен в митохондриях и хлоропластах. В этих органеллах сопряжение окисления с фосфорилированием осуществляется в структурированной цепи переноса электронов.

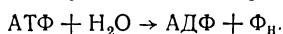
Молекулы, осуществляющие преобразование энергии в клетке, сопрягающие окисление с синтезом аденозинтрифосфорной кислоты, фиксированы в пространстве с помощью жесткой структурированной матрицы. Молекулы, преобразующие энергию, переходят из одной формы в другую, претерпевают физические и химические

изменения. Эти молекулы отличаются способностью обратимо превращаться, благодаря чему они периодически возвращаются в исходное состояние, и процесс становится циклическим. Как правило, ферментативные реакции в клетке связаны между собой, протекают в строгой последовательности с образованием промежуточных продуктов, которые являются продуктом одной и субстратом другой реакции. Строгая направленность ферментативных реакций имеет большое значение для переноса химической энергии в изотермической живой системе.

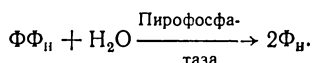
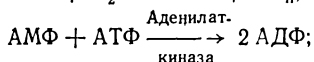
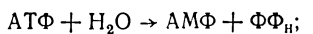
В зеленом листе растений в преобразовании энергии электромагнитных колебаний солнечного света в энергию химических связей принимает участие хлорофилл; в сетчатке глаза содержатся специальные пигменты, превращающие световую энергию в электрическую; в мышечных клетках механическая работа осуществляется за счет химической энергии с помощью актомиозина и т. д.

В основе энергообеспечения клетки лежит адениловая система, которая состоит из аденозинди- и аденозинтрифосфорных кислот. Эта система выступает в роли сопрягающего фактора между процессами, которые сопровождаются выделением энергии, и реакциями, протекающими только при поступлении энергии извне.

Функционирование адениловой системы состоит в фосфорилировании АДФ неорганическим фосфатом и образовании АТФ. Эта реакция требует затраты энергии около $41,8 \cdot 10^3$ Дж/моль. Обратная реакция (дефосфорилирование АТФ) осуществляется гидролизом связи, удерживающей последний остаток фосфорной кислоты, и образованием АДФ и неорганического фосфата:



Если гидролизу подвергается вторая пирофосфатная связь АТФ, то образуется АМФ и неорганический пирофосфат:



Сумма этих реакций: $2\text{АТФ} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{АДФ} + 2\text{Ф}_\text{н}$, т. е. образуются те же конечные продукты. Но расщепление АТФ до АМФ и пирофосфата энергетически более выгодно. При этом в физиологических условиях выделяется большее количество энергии, что может иметь решающее значение в осуществлении ряда высоко эnderгонических реакций.

В клетке содержание АТФ поддерживается фосфорилированием АДФ как за счет внешней энергии, так и внутриклеточными системами, выполняющими роль резервуаров энергии. Такой системой может быть креатинфосфат — креатин, которая способна обмениваться активным фосфорилом ($\sim\text{Ф}$) с адениннуклеотидами. В состоянии покоя эта система фосфорилируется аденозинтрифосфатом.

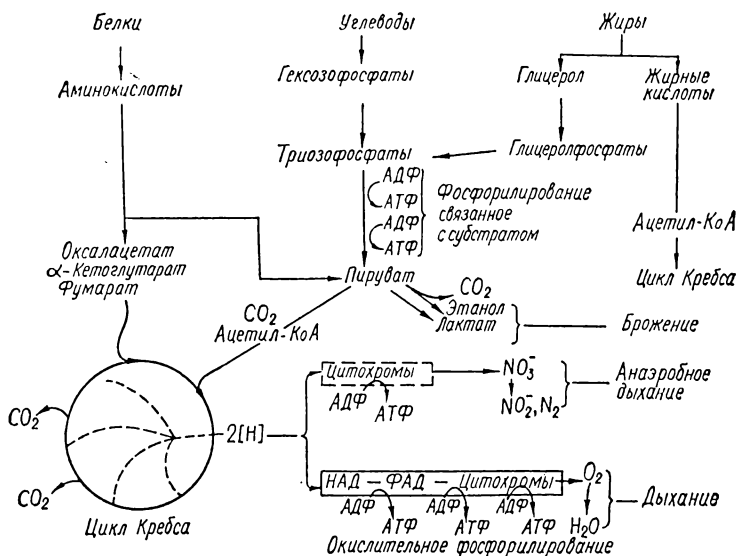


Рис. 95. Этапы гетеротрофного образования АТФ.

А в состоянии активной деятельности клетки АДФ фосфорилируется этой системой: $\text{АТФ} + \text{креатин} \rightarrow \text{АДФ} + \text{креатинфосфат}$.

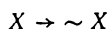
Роль датчиков активного фосфила ($\sim\Phi$) может выполнять также аргининфосфат, полифосфаты. Образование АТФ может осуществляться первично за счет энергии солнечного излучения — автотрофно или вторично за счет энергии, выделяемой при анаэробном или аэробном расщеплении биополимеров с высоким энергетическим потенциалом, т. е. гетеротрофно.

Незначительное место в энергетике живых систем занимает хемосинтез, когда источником энергии являются процессы аэробного или анаэробного окисления некоторых неорганических соединений. Этот тип энергетике клетки имеет место у некоторых бактерий.

В случае образования АТФ автотрофными организмами аккумуляция энергии осуществляется с помощью хлорофиллов, каротиноидов и других пигментов, поглощающих свет. При образовании АТФ у гетеротрофных организмов аккумуляция энергии осуществляется в два этапа. Биополимеры расщепляются соответствующими ферментами до субстратов, которые способны подвергаться окислительному фосфорилированию (рис. 95). На втором этапе осуществляется собственно окислительное фосфорилирование. При этом происходит сопряжение экзергонической реакции окисления (отнятие электрона от субстрата) с эндергонической реакцией фосфорилирования АДФ, присоединением неорганического фосфора. Окислительное фосфорилирование является центральным процессом биологического образования энергии. В реак-

ции энергетического сопряжения роль восстановителя выполняют либо соответствующие метаболиты — субстраты соответствующих окислительных ферментов, либо сам окислительный фермент или его кофермент цепи переноса электронов. В зависимости от этого в первом случае мы имеем окислительное фосфорилирование, которое называется субстратным фосфорилированием, т. е. на уровне субстрата, а на втором — окисление в цепи окислительных ферментов, переноса электронов. Цепь переноса электронов состоит из комплекса ферментов. Первый фермент этой цепи восстанавливается (присоединяет электрон), а последний фермент окисляется, отдавая электрон конечному акцептору (кислороду).

В физиологических условиях энергетика клетки осуществляется в основном фосфорилированием в окислительной цепи. Вспомогательную роль выполняет субстратное фосфорилирование. Но АТФ сразу не образуется в окислительном акте. За счет энергии окисления сначала активируется неизвестный акцептор X .



Роль акцептора X выполняют, видимо, различные компоненты. Все они способны в состоянии $\sim X$ передавать энергию на АДФ. Остается неизвестной природа этого компонента, которому приписывается важнейшая роль при образовании АТФ в процессах окислительного и фотофосфорилирования.

Одним из общих свойств энергетического обмена является строгая структурная организация, пространственная обособленность и внутриклеточная локализация механизмов накопления и использования энергии. Процессы сопряжения окисления с фосфорилированием — основного механизма трансформации, накопления энергии в клетке — всегда связаны с мембранными структурами. У высших зеленых растений трансформация световой энергии осуществляется в мембранах хлоропластов, а перенос электронов и дыхательное фосфорилирование в клетках животных и растений осуществляется ферментами, локализованными в перегородках и гребнях внутренней мембраны митохондрий. У бактерий энергия накапливается и локализуется в цитоплазматической мембране.

Что касается ферментов и кофакторов, осуществляющих гликолитическое, субстратное фосфорилирование, то они находятся в растворимой фракции цитоплазмы клетки. Допускается, что эти ферменты также локализованы на внутриклеточных мембранах, но связаны с ними лабильными слабыми силами, которые разрушаются при гомогенизации ткани и выделении ферментов.

Процессы использования энергии также связаны с наличием специализированных структур. Использование химической энергии для механической работы осуществляется с помощью сократительных белков с АТФ-азной активностью. Активный транспорт веществ через мембраны осуществляется с помощью локализованных в них белков-ферментов. В случае, если ферменты, расщепляющие АТФ, в связи с выполнением определенной работы

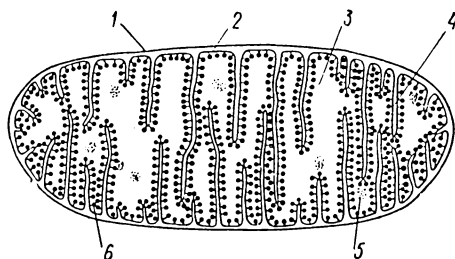


Рис. 96. Схема строения типичной митохондрии:

1 — наружная мембрана; 2 — внутренняя мембрана; 3 — матрикс, 4 — кристы; 5 — внутримитохондриальные тельца; 6 — частицы внутренней мембраны

переводятся в раствор, то у них сохраняется АТФ-азная активность, но выделяемая при этом энергия не используется на определенный вид работы, а рассеивается в виде тепла. В процессах биосинтеза энергия, выделяемая при расщеплении молекулы АТФ, не претерпевает трансформации. Поэтому и в растворе энергия, выделенная при гидролизе АТФ, используется в процессе биосинтеза. Из этого

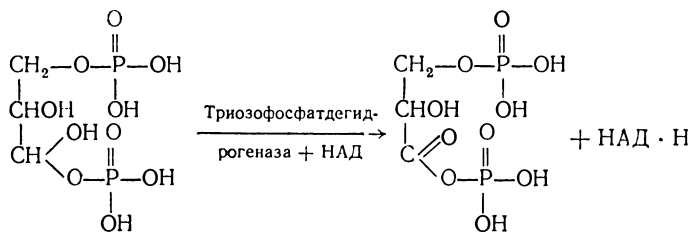
следует, что энергетический обмен протекает в клетке на определенной структуре только в тех случаях, когда выполнение функции связано с трансформацией энергии. Если же затрата энергии связана с осуществлением более простых реакций и процессов, то они протекают в присутствии отдельных ферментов или их комплексов. Таким образом, восприятие, преобразование и использование энергии является одной из фундаментальных функций клетки. Это свойство клетки обуславливает ее существование, так как поддержание процессов жизнедеятельности требует затраты энергии.

В клетке имеется три системы, которые преобразуют энергию окисления в энергию макроэргических связей АТФ. Такими системами являются гликолитическая, митохондриальная и хлоропластная. Процессы трансформации, преобразования энергии в митохондриях и хлоропластах протекают на определенных структурах. Митохондрии обнаружены в клетках животных, высших растений, у водорослей, простейших, но их нет у бактерий. Схема строения митохондрии представлена на рис. 96. Наружная мембрана митохондрий гладкая, а внутренняя имеет складки и впячивания (кристы). Впячивания иногда вдаются в тело митохондрии настолько, что достигают противоположной стенки. Предполагается, что в наружной мембране локализованы ферменты трикарбонового цикла и субстратного фосфорилирования. На внутренней мембране расположены ферменты и факторы электронотранспортной цепи и сопряженного окислительного фосфорилирования.

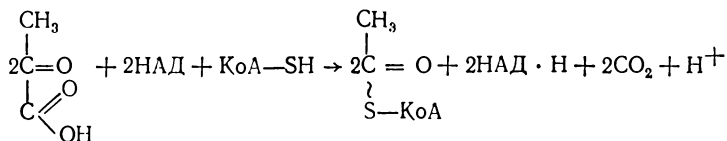
Основная функция митохондрии состоит в преобразовании энергии. Этот процесс протекает в три этапа. На первом этапе на наружной мембране образуются восстановленные продукты (доноры электронов) — янтарная кислота и восстановленный НАД Н. Эти доноры электронов возникают в результате окислительных реакций в цикле трикарбоновых кислот; при окислении β -оксипутирата, холина. На втором этапе на внутренней мембране осуществляется перенос электронов по электронотранспортной цепи, который сопровождается образованием промежуточных продуктов с

макроэргическими связями. На третьем этапе энергия макроэргических промежуточных продуктов используется для образования аденозинтрифосфорной кислоты или выполнения той или иной работы (перенос ионов через мембрану, перенос водорода от восстановленного НАД и т. д.).

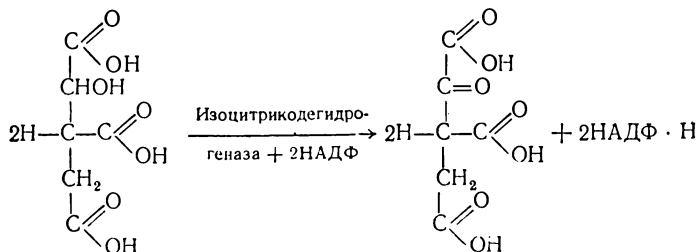
1. Образование доноров электронов. Восстановленные продукты на первом этапе образуются в процессе гликолиза и цикле трикарбоновых кислот. Восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (НАД) образуется в реакции окисления 1,3-дифосфоглицеринового альдегида в 1,3-дифосфоглицериновую кислоту.



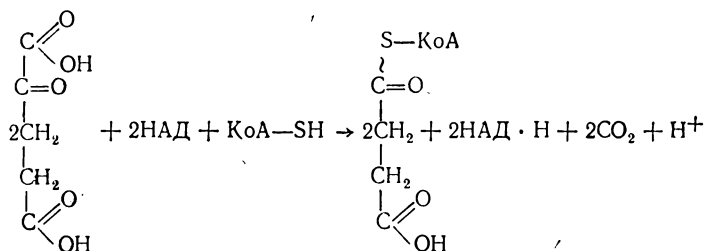
Но восстановленные продукты (доноры электронов) образуются в основном в окислительно-восстановительных реакциях цикла трикарбоновых кислот. Две молекулы НАД восстанавливаются в процессе окислительного декарбоксилирования двух молекул пировиноградной кислоты, образовавшихся в процессе гликолиза.



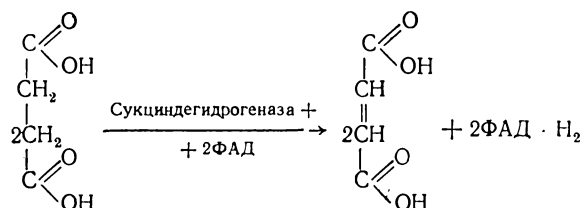
На этапе окисления изолимонной кислоты образуются две молекулы восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ · Н).



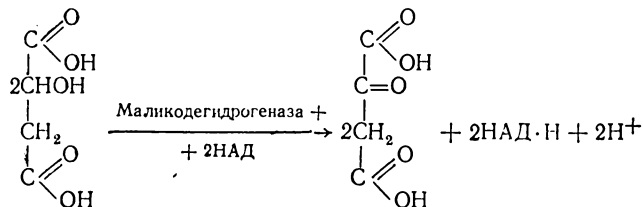
В результате окислительного декарбоксилирования α -кетоглutarовой кислоты восстанавливается две молекулы НАД.



Две молекулы флавинадениндинуклеотида (ФАД) восстанавливаются на этапе окисления янтарной кислоты в фумаровую.

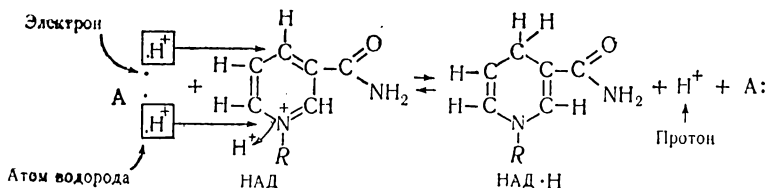


И наконец, еще две молекулы НАД восстанавливаются при окислении яблочной кислоты в щавелевоуксусную.

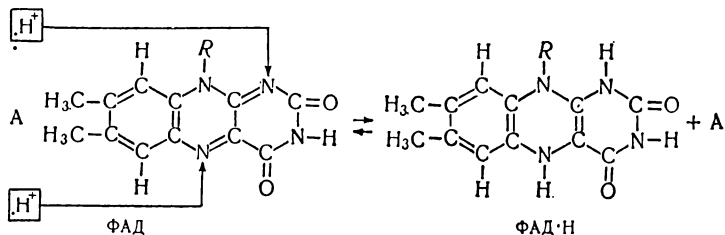


Таким образом, в цикле трикарбоновых кислот восстанавливается шесть молекул НАД, две молекулы НАДФ и две молекулы ФАД, которые затем служат донорами электронов.

В процессе восстановления НАД пиридиновое ядро присоединяет от субстрата (А) два электрона и одно ядро атома водорода. Второе ядро водорода в виде протона H^+ выделяется в окружающую среду:



Флавиновым коэнзимом является ФАД, активная группа которого представлена изоаллоксазиновым ядром. Перенос водорода с субстрата А при этом осуществляется следующим образом:



Образование доноров электронов для цепи переноса электронов может проходить также с помощью других подобных окислительных реакций и за счет окисления ряда метаболитов (β -оксибутират, холин и др.). Предполагается, что образование доноров электронов происходит с помощью окислительно-восстановительных ферментов на внешней мембране митохондрий. Образование восстановленных продуктов (доноров электронов) можно свести к нескольким типовым реакциям, в результате которых выделяется водород. Первым типом реакций является окисление предельного соединения в непредельное, например: $\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \rightarrow \text{COOH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH} + 2\text{H}$. В этих реакциях акцептором водорода являются флавиновые коферменты [ФМН, ФАД]. В качестве субстрата может выступать также жирный ацил-КоА.

Вторым типом реакций может быть окисление спирта в кетон или альдегид, например: $\text{COOH}-\text{CHON}-\text{CH}_2-\text{COOH} \rightarrow \text{COOH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{COOH} + 2\text{H}$. По такому принципу окисляются молочная, яблочная, изолимонная, β -оксимасляная кислоты, жирный оксиацил-КоА, этанол. В роли акцептора водорода выступают НАД или НАДФ. Наконец, по третьему типу реакций окисляется кетон в карбоксил, например: $\text{CH}_3-\text{CO}-\text{COOH} + \text{HS}-\text{КоА} \rightarrow \text{R}-\text{CO}-\text{S}-\text{КоА} + 2\text{H} + \text{CO}_2$. По такому типу окисляются α -кетоглутаровая, пировиноградная кислоты. Первичным акцептором является липоевая кислота, которая затем передает электрон на НАД. Первичный акцептор водорода определяется величиной окислительно-восстановительного потенциала. Если редокс-потенциал реакции окисления находится около нуля, то первичным акцептором водорода является флавиновый кофермент, имеющий потенциал около $-0,1$ В. При потенциале окисления, близком к $-0,3$ В первичным акцептором водорода являются коферменты НАД или НАДФ, редокс-потенциал которых равен $-0,29$ В. Потенциал окисления-восстановления липоевой кислоты равен $-0,6$ В. При реакции окислительного декарбоксилирования редокс-потенциал находится также в пределах $-0,6$ В. Поэтому первичным акцептором водорода в этой реакции является липоевая кислота.

Как видно, вместо многих метаболитов, которые могут быть субстратами дыхания, образуется всего три переносчика водорода:

НАД⁺, флаavin или липоевая кислота. В данном случае имеет место принцип химической универсальности в биохимических процессах. Он выражается в процессе унификации, уменьшении числа субстратов дыхания. Таким образом, подготовительный этап в превращении энергии в митохондриях заканчивается образованием трех восстановленных продуктов (доноров электронов). В виде этих соединений сохраняется значительное количество энергии, которое небольшими порциями освобождается при переносе водорода и электронов по электронотранспортной цепи от НАД · Н к кислороду.

Второй этап (перенос электронов по цепи) в преобразовании энергии в митохондриях протекает на ее внутренней мембране.

2. Цепь переноса электронов. Электрон восстановленных НАД, НАДФ, ФАМ, ФАД переносится по электронотранспортной цепи на кислород. Это можно представить в виде реакции $\text{НАД} \cdot \text{H}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{НАД} + \text{H}_2\text{O}$.

Реакция переноса двух электронов с субстрата на атом кислорода является высоко экзергонической. Стандартное изменение свободной энергии этой реакции достигает $209 \cdot 10^3$ Дж, за счет которых может образоваться шесть высоко энергетических фосфатных связей. Но перенос электрона с восстановленного НАД на кислород осуществляется не сразу, а в результате нескольких реакций, с помощью цепи транспорта электронов, так как биологические системы приспособились к низким энергетическим переходам.

Цепь переноса электронов — это условное название цикла реакций, в результате которых электрон от донора передается конечному акцептору (кислороду). Например, два электрона от пировиноградной кислоты (донора) передаются на акцептор (НАД), который восстанавливается (НАД · Н). Затем следует ряд реакций окисления-восстановления, в результате которых эти два электрона переносятся на конечный акцептор — кислород, и образуется молекула воды.

Полная цепь переноса электронов в митохондриях состоит приблизительно из восьмидесяти белковых молекул. Из них около двух третей молекул выполняют структурную роль и функцию сопряжения. Остальные молекулы выполняют роль катализаторов окислительно-восстановительных реакций, переносчиков электронов. Простетическими группами белков переносчиков электронов являются флаavin, гем, медь, негеминовое железо. С помощью кислородного микроэлектрода и благодаря высокой разрешающей способности двулучевого спектрофотометра было определено восстановленное и окисленное состояние переносчиков электронов и установлено их последовательное расположение в цепи. Перенос электрона от окисляемого субстрата на восстанавливаемый кислород в настоящее время представляется следующим образом (рис. 97).

Большинство субстратов окисляется с участием дегидрогеназ, которые отнимают от него два иона водорода и два электрона. Дегидрогеназы состоят из белкового компонента и простетической

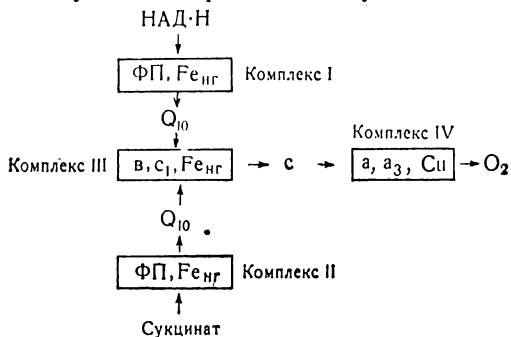
Но эта реакция термодинамически невыгодна. Если НАД⁺ превратить в какое-то фосфорилированное производное с большим положительным редокс-потенциалом, то взаимодействие с сукцинатом станет термодинамически осуществимым.

В системе переноса электронов имеет место структурированность, которая выражается в наличии четырех комплексов цепи переноса электронов. Комплексы — это субъединицы, элементы электронотранспортной цепи, которые при выделении сохраняют способность переноса электронов. Каждый комплекс примерно на 64% состоит из белков и на 36% из липидов, в основном фосфолипидов. Последние играют важную роль, так как их удаление приводит к потере способности переноса электронов. Если липид снова ввести в цепь, то транспорт электронов восстанавливается. Это обусловлено, видимо, тем, что фосфолипиды являются основным компонентом формирования мембран. Белки и липиды связаны друг с другом в мембранах с помощью гидрофобных сил. Гидрофобные силы занимают большое место и при взаимодействии между собой белков.

Из этого следует, что в комплексах цепи переноса электронов существуют неполярные участки, которые являются недоступными для воды. Если мы посмотрим на редокс-группы цепи переноса электронов, то и они имеют гидрофобные свойства. Например, кофермент Q_{10} , имеющий длинную углеводородную цепь, не растворим в воде. Возможно, поэтому кофермент Q_{10} , свободно перемещаясь в липидной фазе, переносит электроны между I и III, II и III комплексами электронотранспортной цепи.

Часть молекулы флавина, гема, является гидрофобной. Многие боковые группы полипептидной цепи белков, выполняющих роль переносчиков электронов, также обладают неполярными свойствами. Наличие гидрофобных областей в электронотранспортной цепи делает также более устойчивыми в неводной среде различные промежуточные продукты, которые при этом образуются.

Схематически комплексы цепи переноса электронов могут быть представлены следующим образом: Связующими звеньями, вы-



полняющими «челночную» функцию являются кофермент Q_{10} и цитохром c .

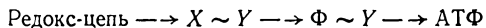
Первый в переносе электронов осуществляет связь между комплексами I и III, II и III. А цитохром *c* выполняет ту же роль между III и IV комплексами. Кофермент Q_{10} и цитохром *c* легко отделяются от комплексов и способны свободно передвигаться в липидном слое мембраны.

Комплекс I окисляет НАД · Н убухиноном (Q_{10}). Центральное место занимает в этом комплексе НАД · Н-дегидрогеназа, которая является флавопротеидом. В комплексе II с помощью другого флавопротеида — сукцинатдегидрогеназы — восстанавливается кофермент Q_{10} и окисляется янтарная кислота. Кофермент Q_{10} в свою очередь окисляется цитохромом *b*. Последний IV комплекс окисляет цитохром *c* кислородом воздуха. Этот комплекс состоит из цитохромов *a*, a_3 и медь-протеида.

Каждый комплекс содержит около пяти белков с простетическими группами, с помощью которых осуществляются окислительно-восстановительные реакции. Эти функционально связанные белки расположены в строгой последовательности, что обуславливает передачу электронов в определенном направлении. Передача электрона объясняется различными гипотезами. Предполагается, что белковые молекулы претерпевают конформационные изменения и частично поворачиваются; или их редокс-группы могут перемещаться благодаря гибкости боковых цепей белковой молекулы. Такая флуктуация обеспечивает контакт между соседними группами цепи переноса электронов. В первом, третьем и четвертом комплексах цепи переноса электронов поток электронов сопряжен с синтезом АТФ.

Ферменты-переносчики электронов проявляют большую специфичность не к структуре донора или акцептора электронов, а к величине их окислительно-восстановительного потенциала. Поэтому можно применять искусственные доноры и акцепторы электронов для изучения промежуточных этапов окислительной цепи.

Использование энергии, которая освобождается в электроно-транспортной цепи, может идти различными путями. Основным является путь, который ведет к накоплению энергии в макроэргических связях АТФ:



Но макроэргические промежуточные продукты ($X \sim Y$) клеткой могут быть использованы для осуществления других процессов. Поэтому в клетке должны существовать регуляторные механизмы, определяющие пути использования энергии, продуцируемой в редокс-цепи.

Кроме основного, генерального, имеются альтернативные пути использования энергии, заключенной в макроэргическом промежуточном комплексе $X \sim Y$. Эта энергия может быть затрачена на образование тепла, активный перенос веществ, обратный транспорт электронов, на осуществление трансгидрогеназной реакции, изменения объема митохондрий и т. д.

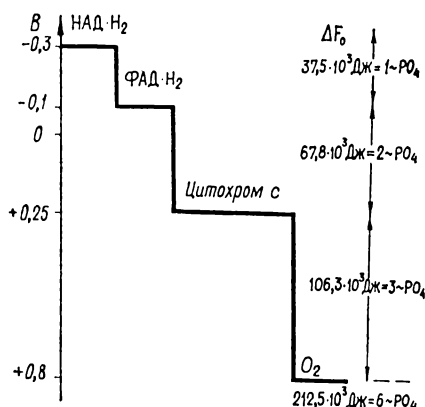


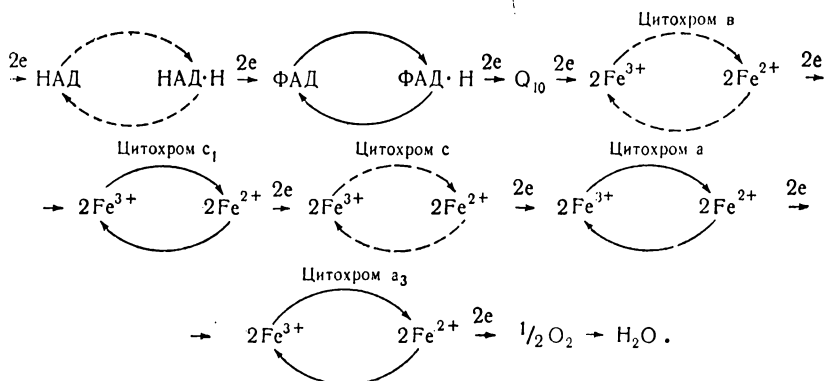
Рис. 98. Связь между стандартным падением потенциала и изменением свободной энергии электрона.

3. Образование соединений с макроэргическими связями. Общая разность потенциалов всей электронотранспортной цепи (при $pH=7,0$ и $30^\circ C$) достигает $1,2$ В. При переходе от одного переносчика к другому электрон постепенно, небольшими порциями теряет потенциал. Падение потенциала связано с изменением свободной энергии, что можно выразить формулой $\Delta F_0 = n \cdot F \times \Delta E_0$, где ΔF_0 — стандартное изменение свободной энергии; n — число электронов (в данном случае $n = 2$, т. к. с НАД переносится два электрона на один атом кислорода); F — электрическая ем-

кость равна $96,5 \cdot 10^3$ Дж на вольт-эквивалент; ΔE_0 — стандартное изменение потенциала или стандартное падение потенциала.

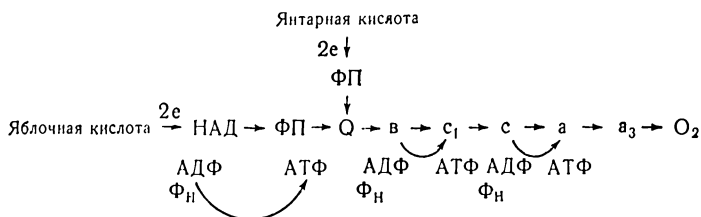
Схематически связь между стандартным падением потенциала и соответствующим стандартным изменением свободной энергии для двух электронов представлена на рис. 98. Уменьшение потенциала электрона в виде небольших перепадов и изменение свободной энергии небольшими порциями, имеет видимо биологический смысл, состоящий в том, что эффективность использования энергии при этом возрастает по сравнению с однократным падением потенциала между субстратом и кислородом. По мере падения потенциала выделявшаяся свободная энергия трансформируется в химическую форму, удобную для использования клеткой.

В трех комплексах электронотранспортной цепи падение потенциала электрона сопровождается образованием первичных макроэргических промежуточных продуктов. В этих комплексах происходит сопряжение процесса окисления и фосфорилирования. При-

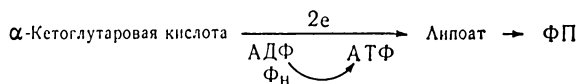


нято считать, что эти процессы протекают при окислении НАД · Н, восстановленной формы цитохрома *b* и, по-видимому, восстановленного цитохрома *c*.

На приведенной схеме реакции сопряжения и фосфорилирования обозначены пунктирной линией. При переносе двух электронов через электронотранспортную цепь в каждом из указанных пунктов образуется по одной молекуле АТФ. Таким образом, при окислении НАД · Н образуется три молекулы АТФ на каждый атом кислорода, восстановленного до воды. Но если донором электрона является янтарная кислота, то на каждый атом кислорода образуется по две молекулы АТФ. Это объясняется тем, что электрон переносится не на НАД, а сразу на флавопротеид. Схематически это можно представить следующим образом. Но если донором



электрона является α -кетоглутаровая кислота, то возникает 4 молекулы АТФ, так как при окислении самого субстрата с участием НАД возникает также одна молекула АТФ или ГТФ, т. е. образование АТФ или ГТФ происходит в результате субстратного фосфорилирования.



В. А. Белицер предложил способ оценки энергетического выхода при окислении субстрата по отношению количества эстерифицированного фосфора к поглощенному кислороду яблочной кислоты. Это отношение в случае окисления НАД ($\text{НАД} \cdot \text{Н} \rightarrow \text{O}_2$) равняется трем, α -кетоглутаровой кислоты — четырем, янтарной кислоты — двум. Для оценки эффективности окислительного фосфорилирования определяют убыль неорганического фосфата и поглощение кислорода митохондриями в присутствии субстрата. Таким образом, в функционально активных митохондриях окисление субстратов цикла трикарбоновых кислот сопровождается процессом фосфорилирования. Если исключить из инкубационной смеси неорганический фосфат и АДФ, то окисление органических кислот цикла Кребса и образование АТФ приостанавливаются. При этом все переносчики переходят в окисленное состояние. Добавление АДФ активирует процесс окисления и фосфорилирования и переносчики электронов восстанавливаются. Это явление называется *эффектом акцептора фосфата*.

При добавлении АДФ восстановление переносчиков электронов наступает уже через несколько секунд. Это говорит о том, что между переносом электронов и фосфорилированием имеет место химическое сопряжение. Поэтому можно вызвать обращение не только потока электронов, но и энергии в системе фосфорилирования. Например, если к инкубационной смеси добавить янтарную кислоту и АТФ, то НАД восстанавливается. Это объясняется следующим образом: электроны обычно переносятся с янтарной кислоты на флавопротеид, а затем — на цитохром *b*. Но добавление АТФ приносит в систему энергию, которая вызывает поток электронов против электрохимического потенциала. Поэтому под действием энергии АТФ электроны направляются на НАД-редуктазу, и НАД переходит в восстановленное состояние (НАД · Н).

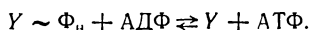
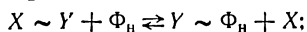
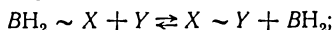
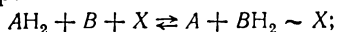
Каким же образом в электронотранспортной цепи обеспечивается сопряжение окисления с фосфорилированием? Какой механизм фосфорилирования? В понимании этого фундаментального процесса остается много неизвестного, несмотря на то, что он является предметом интенсивного изучения широким кругом исследователей.

Необходимо напомнить, что ферменты фосфорилирования локализованы в грибовидных выростах внутренней мембраны митохондрий. Эти выросты являются структурным условием для окислительного фосфорилирования в электронотранспортной цепи. Подобные выросты обнаружены также на цитоплазматической мембране бактерий и в хлоропластах растений.

Окислительное фосфорилирование впервые было открыто В. А. Энгельгардтом (1930). А несколько позже (1939) В. А. Белицер показал, что фосфорилирование сопряжено с переносом электронов по дыхательной цепи. Окислительно-восстановительные ферменты встроены в сопрягающую мембрану. Ступенчатое падение энергии электрона трансформируется в энергию макроэргических связей АТФ. Хотя молекулярный механизм окислительного фосфорилирования остается неизвестным, но предполагается, что сопряжение переноса электронов с фосфорилированием происходит с помощью гипотетического промежуточного продукта, принимающего участие в обоих типах реакций.

Для переноса электрона присутствие неорганического фосфора не является обязательным. Отсюда гипотетический промежуточный продукт не содержит в себе ни АДФ, ни Φ_n . Допускается, что восстановленный переносчик электронов (AH_2) взаимодействует с другим переносчиком *B* при участии неизвестного промежуточного продукта *X*. При этом переносчик *B* восстанавливается (BH_2) и одновременно между BH_2 и *X* образуется макроэргическая связь $BH_2 \sim X$, энергия которой равняется $(33,4—41,8) \cdot 10^3$ Дж/моль. $BH_2 \sim X$ взаимодействует со вторым гипотетическим интермедиатом *Y* и возникает промежуточный продукт $X \sim Y$. Затем $X \sim Y$ взаимодействует с Φ_n , освобождается *X* и образуется $Y \sim \Phi_n$. А при участии последнего фосфорилируется АДФ и возникает АТФ. Интермедиат *Y* переходит в свободное состояние. Отсюда

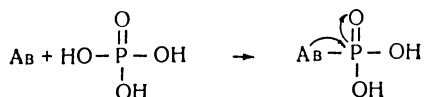
гипотетическое соединение $X \sim Y$ сопрягает переносчики электронов и фосфорилирующие ферменты. X и Y не входят в состав переносчиков электронов. Гипотетическая схема механизма сопряжения переноса электронов с фосфорилированием может быть представлена следующим образом:



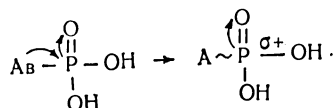
Предполагается, что роль X могут выполнять O , N , Ca , S , а Y — P и C . Роль переносчиков энергии могут выполнять фосфорилированные или ацилированные белки-ферменты, которые несут большое количество свободной энергии и обычно участвуют в реакциях переноса фосфорильных и ацильных остатков.

Главным невыясненным моментом окислительного фосфорилирования остается механизм возникновения первого богатого энергией промежуточного соединения, синтез которого сопряжен непосредственно с трансформацией энергии электрона. В связи с объяснением энергетического сопряжения высказано две группы гипотез. Исходя из первой группы гипотез при переносе электронов генерируются промежуточные соединения, богатые энергией; согласно второй — при переносе электронов промежуточные макроэргические соединения не образуются. Движущей силой в этом случае является трансмембранный потенциал, возникающий в результате разделения ионов H^+ и OH^- на наружной и внутренней стороне мембраны. Макроэргическая связь является ангидридной и возникает между одним из двух переносчиков электронов и третьим компонентом — сопрягающим фактором. Энергия промежуточных макроэргических соединений используется, как правило, для образования АТФ, а также может расходоваться на транспорт ионов, механохимические процессы и т. п.

Наиболее ранней гипотезой о механизме возникновения первого богатого энергией соединения является предположение Ф. Липмана о прямом использовании химической энергии, которая выделяется в результате окисления-восстановления переносчиков электронов. Эта энергия используется для образования макроэргической химической связи $X \sim Y$. Поэтому промежуточных превращений энергетических эквивалентов в другие, нехимические формы энергии не происходит, т. е. с помощью энергии окисления активируются определенные группировки в молекуле. Это объясняется таким образом. Восстановленный переносчик электрона (A_B) осуществляет нуклеофильную атаку атома фосфора фосфорной кислоты. При этом происходит перераспределение электронной

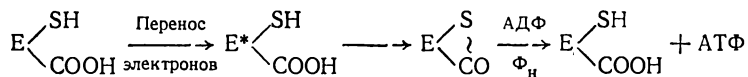


плотности в молекуле. Недостаток электронов на фосфоре устраняется излишком электронов на восстановленном переносчике электронов. Последующее окисление этого промежуточного продукта снижает электронную плотность в области связи $A-P$. В результате этого возникает макроэргическое соединение, т. е. активный фосфорил с электрофильным центром.



Активный фосфорил затем переносится на АДФ. Необходимо отметить, что дыхательные переносчики электронов достаточно хорошо изучены. Однако до сих пор пока не удалось обнаружить ни одного фосфорилированного переносчика электронов. Но если исходить из этой гипотезы, то фосфорилированных переносчиков электронов должно быть несколько в соответствии с пунктами сопряженного фосфорилирования. Гипотеза химического сопряжения не получила подтверждения биохимическим путем.

Вторая группа гипотез (П. Бойера и Д. Грина и др.) исходит из механохимического принципа энергетического сопряжения. Согласно механохимическим (конформационным) гипотезам, химическая энергия окисления сначала используется на выполнение механической работы, а затем преобразуется в энергию промежуточного продукта $X \sim Y$. По одной из этих гипотез (П. Бойер) окисление и фосфорилирование сопрягается с помощью изменения конформации белка-фермента, который принимает участие в переносе электрона и энергии. За счет энергии окисления белковая молекула фермента принимает напряженную структуру и сохраняет большое количество свободной энергии. Затем, при возвращении в исходное положение, эта энергия выделяется и используется для образования соединения с макроэргическими связями ($X \sim Y$). Таким соединением может быть тиозфир, который возникает при взаимодействии карбоксильной и сульфгидрильной групп белковой молекулы: Эта и другие

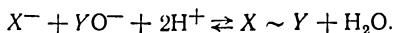


механохимические гипотезы также не нашли достаточно экспериментального подтверждения.

Одним из объяснений механизма сопряжения окисления с фосфорилированием является хемиосмотическая гипотеза энергетического сопряжения П. Митчелла. Исходя из схемы этой гипотезы энергия окисления трансформируется в разность электрических потенциалов или градиент осмотической концентрации ионов на сопрягающей мембране. Ионы водорода проходят через митохондриальную мембрану только с помощью системы активного транспорта. Это является одним из положений, на которых основана

хемиосмотическая гипотеза сопряжения в процессе окислительного фосфорилирования.

Окисление и фосфорилирование связаны через электрохимический потенциал водорода на сопрягающей мембране (рис. 99). Предполагается, что какой-то донор водорода (AH_2) у внешней стороны сопрягающей мембраны митохондрии окисляется переносчиком электронов. Два электрона ($2e$) переносятся по электронотранспортной цепи на другую сторону. Предполагается, что цепь переносчиков электронов расположена поперек мембраны. $2H^+$ остаются снаружи митохондрий. На противоположном конце электронотранспортной цепи $2e$ передаются соответствующему акцептору водорода (B). Последний присоединяет $2H^+$ из водной фазы матрикса митохондрии. Таким образом, с помощью акцептора водорода (B) окисляется одна молекула AH_2 , в результате чего $2H^+$ выделяются во внешнее пространство, а $2H^+$ поглощаются из внутреннего пространства митохондрий. Обратное перераспределение ионов H^+ вызывается процессом фосфорилирования. Образование одной молекулы АТФ сопровождается выделением двух ионов водорода ($2H^+$) в матрикс митохондрии и поглощением двух ионов водорода ($2H^+$) из немитохондриального пространства, т. е. биосинтез АТФ протекает на основе электрохимического градиента ионов H^+ , который поддерживается передачей электронов и окислением в дыхательной цепи. Исходя из этой гипотезы также постулируется образование богатого энергией предшественника АТФ из анионов X^- и YO^- :



Расщепление предшественника $X \sim Y$ является обратимым процессом и протекает в том месте митохондриальной мембраны, где происходит сопряжение окисления и фосфорилирования.

Из внутренних мембран митохондрий выделены два белка, которые выполняют функцию факторов сопряжения. Белок F_1 с молекулярной массой около 280 000 обладает АТФ-азной активностью, которая видимо активирует перенос остатка фосфорной кислоты на АДФ. Второй белок F_0 , видимо, обуславливает высокую чувствительность фосфорилирования к олигомицину. Действие АТФ-синтазы и образование высокоэнергетического предшественника АТФ ($X \sim Y$) схематически представляется таким образом (рис. 100).

Образование трех молекул АТФ при окислении НАД · Н на основе гипотезы П. Митчелла объясняется тем, что дыхательная цепь

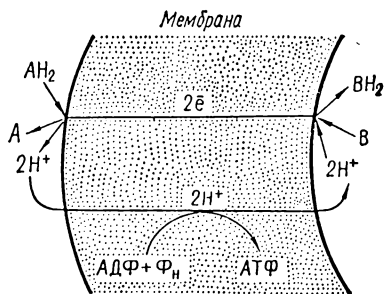


Рис. 99. Схема хемиосмотического принципа энергетического сопряжения окисления и фосфорилирования (Mitchell, 1966).

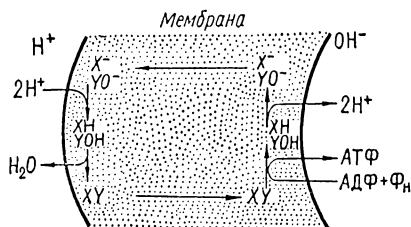


Рис. 100. Схема использования АТФ-синтетазой электрохимического потенциала H^+ для синтеза АТФ (Mittchell, 1966).

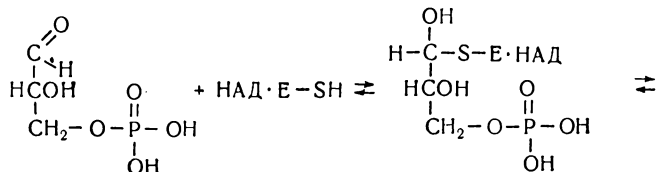
представлена тремя актами трансмембранного переноса электронов в одном направлении, чередуется с тремя актами трансмембранного переноса атомов водорода в противоположном направлении. Гипотеза П. Митчелла находит экспериментальное подтверждение в исследованиях последнего времени.

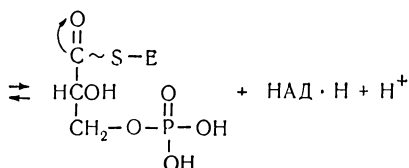
Таким образом, механизм фосфорилирования в электронотранспортной цепи на молекулярном уровне в целом остается неизвестным.

Однако достаточно полно изучены механизмы аккумуляции энергии в макроэргических связях аденозинтрифосфорной кислоты, особенно при фосфорилировании на уровне субстрата. При субстратном фосфорилировании роль донора электронов выполняет низкомолекулярный субстрат. Последний может находиться в связи с окислительным ферментом или коферментом или в свободном состоянии. АТФ при этом образуется за счет окисления субстрата (альдегида, кетона и др.). Субстратное фосфорилирование протекает в растворимой системе и не требует присутствия структурного носителя. Роль донора электронов при окислительном фосфорилировании выполняет сам окислительный фермент (кофермент). Образование АТФ при этом сопряжено с циклическим окислением и восстановлением фермента (кофермента). Субстратное образование АТФ является характерным для гликолитического расщепления углеводов до карбоновых кислот. В этом процессе имеется две окислительные реакции, в которых идет образование АТФ. АТФ возникает в результате переноса остатка фосфорной кислоты с 1,3-дифосфоглицериновой кислоты и с енольной формы фосфопирувиноградной кислоты на АДФ.

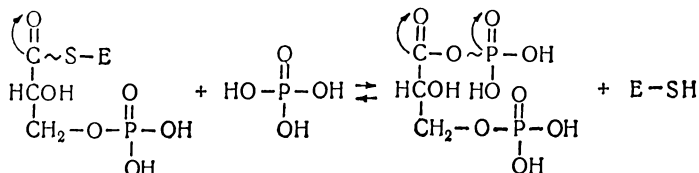
Первая реакция протекает в несколько этапов. Сначала образуется комплекс из $НАД^+$ и дегидрогеназы фосфоглицеринового альдегида $НАД^+ + E-SH \rightleftharpoons НАД \cdot E-SH$. С этим комплексом взаимодействует 3-фосфоглицериновый альдегид. Протекает окислительно-восстановительная реакция между $НАД \cdot E$ и 3-фосфоглицериновым альдегидом, который выступает в роли донора электрона.

В результате этой реакции возникает восстановленный $НАД \cdot H$ ($НАД \cdot H$) и фермент, который ацилирован остатком 3-фосфоглицериновой кислоты. За счет окисления альдегидной группы

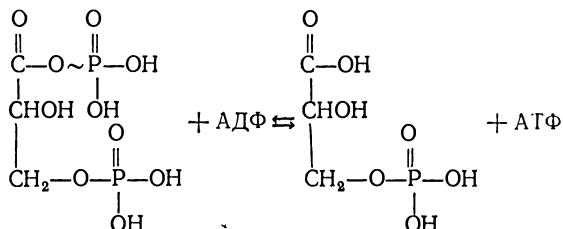




в кислотную между сульфгидрильной группой дегидрогеназы фосфоглицеринового альдегида и карбоксильной группой возникает макроэргическая связь. Затем ацилированный фермент фосфорилируется. Затем, с помощью образовавшейся 1,3-дифосфоглице-



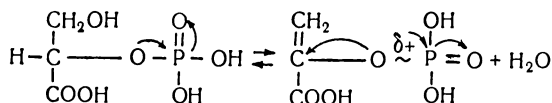
риновой кислоты, АДФ фосфорилируется до АТФ. Акцептором



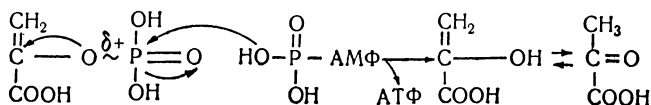
электрона является в данном случае НАД^+ , а в роли фактора сопряжения X выступает SH -группа дегидрогеназы фосфоглицеринового альдегида. Роль первичного соединения, богатого энергией ($\sim X$), выполняет ацилфермент.

Более простой механизм субстратного фосфорилирования в гликолизе имеет место при окислении енольной формы фосфоглицериновой кислоты.

В этом случае весь процесс протекает в два этапа. Сначала отщепляется молекула воды от 2-фосфоглицериновой кислоты. В резуль-



тате этого уменьшается электронная плотность на атоме фосфора фосфоенолпировиноградной кислоты. Это делает ее фосфорный остаток более реакционноспособным. Он подвергается нуклеофильной атаке со стороны АДФ и образуется АТФ.



Таким образом, происходит внутримолекулярное окисление, в результате чего образуется макроэргическое соединение. При этом роль донора электронов, акцептора электронов и акцептора энергии (X) выполняют различные части молекулы 2-фосфоглицериновой кислоты, а ее енольная форма является первичным богатым энергией соединением ($\sim X$).

Субстратное фосфорилирование также сопрягается с окислительным декарбоксилированием кетокислот. Этот процесс протекает в несколько стадий с участием тиаминпирофосфата (ТПФ), липоевой кислоты и КоА. При этом донором электронов является оксиалкил ТПФ, акцептором электронов — липоевая кислота, первичным богатым энергией соединением — ацил-ТПФ.

Таким образом, биосинтез АТФ при расщеплении и окислении молекулы глюкозы осуществляется фосфорилированием на уровне субстрата и при переносе электрона через систему окислительно-восстановительных ферментов и коферментов. При полном окислении одной молекулы глюкозы образуется 38 молекул АТФ, из них 30 молекул синтезируются в цикле трикарбоновых кислот. Изменение свободной энергии при превращении глюкозы в CO_2 и H_2O равно $2876,8 \cdot 10^3$ Дж. Для образования макроэргической химической связи АТФ необходимо затратить около $33,4 \cdot 10^3$ Дж. За счет энергии, заключенной в 1 моль глюкозы, может образоваться:
$$\frac{2876,8 \cdot 10^3 \text{ Дж}}{33,4 \cdot 10^3 \text{ Дж}} = 86 \text{ моль АТФ.}$$
 Отсюда производительность, коэффициент полезного действия, окисления глюкозы составляет
$$\frac{38 \cdot 100}{86} = 44\%.$$

Как видно, молекулярный механизм субстратного фосфорилирования в основном выяснен, тогда как механизм фосфорилирования, сопряженного с переносом электронов, остается неизвестным.

Последний способ образования АТФ протекает или за счет энергии, заключенной в субстрате окисления при дыхании, или за счет энергии света при фотосинтезе. Эта энергия освобождается ступенчато, малыми порциями при переносе электрона по электронотранспортной цепи. Последняя состоит из системы окислительно-восстановительных ферментов и коферментов, встроенных в структуру сопрягающих мембран. Такие мембраны представлены в митохондриях, тилакоидах хлоропластов, клеточной мембране аэробных бактерий, хроматофорах.

Таким образом, накопление энергии в клетке в виде АТФ осуществляется в процессах фотосинтеза, дыхания, гликолиза. Запасание энергии за счет квантов света при фотосинтезе протекает в результате циклического и нециклического фотофосфорилирования. В процессе длительной химической эволюции выработались совершенные биологические структуры и процессы улавливания, аккумуляции и трансформации энергии электромагнитных колебаний солнечного излучения. Световая энергия превращается в химическую, которая является более удобной формой для осуществления

различных биохимических процессов. Энергия запасается в виде сложных органических веществ, количество которых на земле ежегодно накапливается около 10^{10} тонн. Кванты света улавливаются с помощью фотосинтетических пигментов, в основном хлоропластов.

Живые организмы способны извне поглощать, преобразовывать и использовать энергию. Они поглощают из внешней среды энергию в более удобной форме и выделяют в менее пригодной форме. Эта полезная, удобная для усвоения форма энергии называется свободной энергией, которая способна выполнять работу. Поглощая энергию извне, биологическая живая система повышает и поддерживает структурную организацию, степень организации внешней среды при этом понижается. При этом живая система не находится в равновесии с внешней средой. Она находится в некотором стационарном состоянии, которое поддерживается равенством скоростей переноса вещества и энергии из внешней среды в живую систему и обратно. Таким образом, живая система является неравновесной открытой системой, которая способна использовать свободную энергию внешней среды, при этом повысить степень своей организации и энтропию окружающей среды.

Живая система является изотермической (т. е. все ее части имеют практически одинаковую температуру), поэтому она неспособна использовать тепловую форму энергии для выполнения работы. Живая система поглощает извне электромагнитную энергию в виде квантов, преобразует ее в химическую форму и использует для выполнения различных видов клеточной работы.

Атом или молекула при столкновении с фотоном мгновенно (за 10^{-15} с) переходит в возбужденное состояние, в котором находится около 10^{-9} — 10^{-8} с. Поглощенная энергия кванта затем преобразуется в тепло или испускается в виде света (флуоресценция) и потом переходит в основное состояние. Энергия квантов высокоэффективно поглощается хлорофиллом, молекулы которого, как известно, имеют систему сопряженных двойных связей.

Поглощенная энергия делокализуется в электронной структуре хлорофилла. При этом пигмент с максимумом поглощения 700 нм (P_{700}) выступает в роли фотохимического реакционного центра, захватывает экситоны — кванты энергии возбуждения и теряет сам затем электрон. За счет энергии поглощенного кванта в молекуле пигмента P_{700} его электрон переходит на более высокий энергетический уровень и положительный потенциал $+40$ В пигмента изменяется на отрицательный — 0,60 В. В результате этого молекула P_{700} становится хорошим донором электрона, передает его на переносчик Z, на ферредоксин и затем на НАДФ⁺, восстанавливает его, а сама переходит в основное состояние. На пигменте P_{700} возникает электронная дырка, вакансия, и он приобретает снова положительный потенциал и способность акцептировать электрон. В результате всего этого возникает индуцированный поток квантов света, транспорт электронов через цепь переносчиков. Существуют циклический и нециклический потоки электронов, которые поддер-

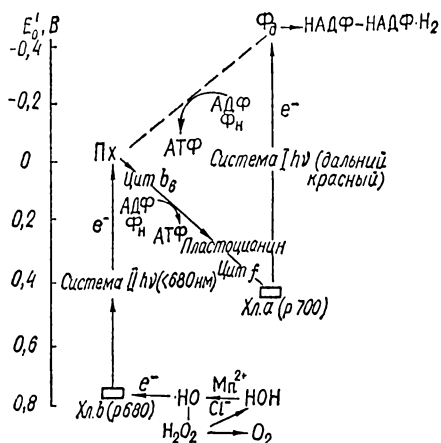
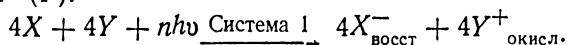


Рис. 101. Схема переноса электронов в процессе фотосинтеза.

живаются с помощью двух различных световых реакций: фотосистема I и фотосистема II (рис. 101). Фотосистема I индуцируется квантами с большей длиной волны, а фотосистема II — квантами с более короткой длиной волны. Фотосинтетическая единица системы I состоит приблизительно из 200 молекул хлорофилла *a*, пластохинона, цитохромов *f*, *b₆*, ферредоксина, каротиноидов, пластоцианина, НАДФ, флавина и пигмента P_{700} , который отводит электроны из системы и передает их в цепь переносчиков. Основная функция системы I состоит в образовании сильного восстановительного

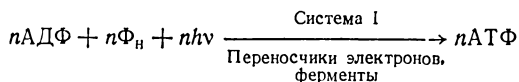
агента (*X*), необходимого для фиксации углекислоты и слабого окислителя (*Y*):



В фотосистеме II, состоящей приблизительно из 200 молекул хлорофилла *a* и 200 молекул хлорофилла *b*, *c* или *d*, еще, по-видимому, имеется пигмент, который выполняет роль реакционного центра и также отводит электроны из системы. Фотосистемы I и II образуют в тилакоидах мембраны хлоропласта комплекс — квантосому. Частицы первой и второй фотосистем имеют различную плотность и легко разделяются при центрифугировании в градиенте плотности. Функция системы II состоит в образовании слабого восстановителя и сильного окислительного агента, необходимого для выделения кислорода при действии света. Эта реакция активируется ионами Mn^{2+} и Cl^- : $4X' + 4Y' + nh\nu \xrightarrow{\text{Система II}} 4X_{\text{восст}}'^- + 4Y_{\text{окисл.}}'^+$

В процессе переноса электронов в реакциях восстановления и фосфорилирования обе фотосистемы связаны между собой. В реакционном центре фотосистемы I возбужденный пигмент P_{700} отдает электрон в цепь переносчиков, в результате восстанавливается $НАДФ^+$. Альтернативным путем движения электрона в фотосистеме I является его перенос через цепь передатчиков (цитохром *b₆*, цитохром *f*, пластоцианин). Электрон, потеряв часть энергии, возвращается на пигмент P_{700} . Это циклический поток электрона. Но сначала электрон с пигмента P_{700} попадает на переносчик *Z* (восстановительный потенциал — около 0,55 В), а затем на ферредоксин (восстановительный потенциал — около 0,432 В, т. е. на 0,1 В более отрицательный, чем потенциал системы $НАДФ \cdot H \rightarrow НАДФ^+$). Ферредоксин является белком с молекулярной массой у разных организмов от 5000 до 13 000. Его активный центр состоит

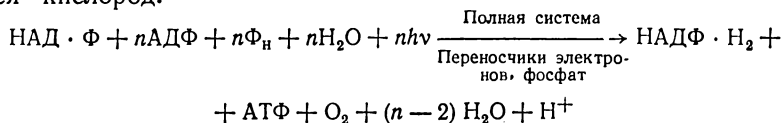
из атомов железа, которые пространственно стабилизированы сульфгидрильными группами цистеина. Окислительно-восстановительный потенциал — 0,4 В. НАДФ⁺ восстанавливается ферредоксином в присутствии белка ферредоксин-НАДФ⁺-оксидоредуктазы, представляющей собой флавопротеид. В результате падения потенциала электрона при переходе его от ферредоксина через пластохинон и другие переносчики электронов (цитохромы *b₆*, *f*, пластоцианин) к окисленному хлорофиллу (P₇₀₀) образуется АТФ.



В этом случае имеет место циклическое фотофосфорилирование, когда энергия света приводит только к образованию АТФ. Ни окислитель, ни восстановитель при этом не образуются. Циклическое фотофосфорилирование осуществляется только первой пигментной системой. При этом электрон проходит путь: хлорофилл P₇₀₀ → → ферредоксин → цитохром *b₆* или пластохинон → цитохром *f* или пластоцианин → хлорофилл P₇₀₀.

При поглощении кванта света в реакционном центре фотосистемы II возбужденный электрон передается к акцептору Q, а затем через систему переносчиков (пластохинон, цитохромы *b₆*, *f* и пластоцианин) попадает на пигмент P₇₀₀ и заполняет образовавшуюся на нем электронную дырку. При переходе электрона через систему переносчиков он теряет часть энергии, за счет которой образуется, видимо, две молекулы АТФ. Переход реакционного центра фотосистемы II в восстановленное состояние происходит присоединением электронов, возникающих при разложении молекулы воды, которое сопровождается выделением кислорода. Система переносчиков электрона от воды к пигментам реакционного центра фотосистемы II остается почти неизученным. Таким образом, при нециклическом транспорте электрон переходит через две фотосистемы.

Функционирование фотосистемы II, видимо, связано с системой I. При этом происходит сопряжение восстановления окислителя, образовавшегося в системе I фотохимическим путем P₇₀₀, с окислением восстановителя (восстановленный ферредоксин). В результате этих реакций образуется НАДФ · Н и АТФ и выделяется кислород.



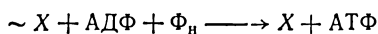
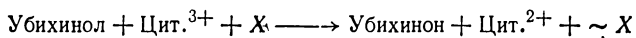
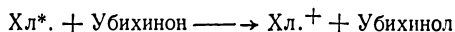
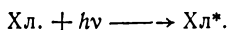
Окисленный хлорофилл P₇₀₀ в данном случае восстанавливается восстановленным цитохромом *f* и пластоцианином, которые, в свою очередь, восстанавливаются с помощью пластохинона и цитохрома *b₆*. Восстановление последних осуществляется системой II в результате перевода в возбужденное состояние хлорофилла *b* с последующим испусканием электрона. Энергия от хлорофилла *b* передается

на неизвестный механизм, с помощью которого осуществляется перенос электрона от воды к окисленному пластохинону и цитохрому b_6 . Окислению подвергаются две молекулы воды, и выделяется молекула кислорода.

Таким образом, две фотохимические реакции приводят к накоплению энергии. При этом в результате передачи электронов между цитохромами происходит высвобождение части энергии и биосинтез АТФ. Остаются еще окончательно невыясненными места сопряжения при передаче электрона в обеих фотосистемах с образованием АТФ. По всей вероятности эти места находятся на участке между пластохиноном и пигментом P_{700} при циклическом и нециклическом потоках электронов.

Для образования молекулы АТФ необходимо затратить до $41,8 \cdot 10^3$ Дж/моль свободной энергии. Это соответствует падению потенциала электрона на 0,43—0,61 В. Можно сказать, что образование АТФ протекает при передаче электрона от пластохинона до цитохрома f . Стандартное падение окислительно-восстановительного потенциала между пластохиноном (0,11 В) и цитохромом f (0,36 В) составляет 0,25 В. Таким образом, при окислении одного электрона имеет место явно недостаточный перепад окислительно-восстановительного потенциала между пластохиноном и цитохромом для образования молекулы АТФ. Но необходимый перепад потенциала и выделение свободной энергии $41,8 \cdot 10^3$ Дж/моль может быть получено от двух электронов. В таком случае фосфорилирование будет термодинамически возможным на участке между пластохиноном и цитохромом f .

Нераскрытым остается молекулярный механизм сопряжения переноса электронов с фотофосфорилированием. Пока это объясняется на основе гипотез, рассмотренных нами выше применительно к сопряжению фосфорилирования с окислением в электронотранспортной цепи при дыхании. Механизм циклического фотофосфорилирования схематически может быть представлен следующим образом:



Поток, преобразование и аккумуляция энергии при фотосинтезе остаются также недостаточно выясненными. Если исходить из стандартной свободной энергии биосинтеза глюкозы, равной $+2867,5 \cdot 10^3$ Дж, то для восстановления молекулы CO_2 до (CH_2O) нужно затратить $+476,5 \cdot 10^3$ Дж. Если принять за эквивалент энергии кванта солнечного света $175,6 \cdot 10^3$ Дж, то для осуществ-

ления этой реакции восстановления CO_2 потребуется энергия около трех квантов.

Из реакции темнового этапа при фотосинтезе следует, что для восстановления одной молекулы углекислоты необходимо расщепление трех молекул АТФ и окисление двух молекул восстановленного НАДФ · Н. Две молекулы НАДФ · Н в первой фотосистеме могут образоваться при прохождении четырех электронов, которые образуются в результате поглощения энергии четырех квантов. Если считать, что при передаче электрона от второй фотосистемы к первой (к пигменту P_{700}) имеет место два пункта фотофосфорилирования, то тогда для образования четырех молекул АТФ необходимо прохождение двух пар электронов. Но один электрон в реакционных центрах фотосистем отщепляется за счет поглощения энергии, которую несет один квант. Таким образом, для образования двух молекул НАДФ · Н и трех молекул АТФ (необходимых для восстановления молекулы CO_2) требуется расход энергии около 8 квантов.

Механизм фотофосфорилирования в принципе сходен с механизмом окислительного фосфорилирования, что следует из того, что оба эти процесса подавляются одними и теми же ингибиторами: 2,4-динитрофенол, карбонилцианидфенилгидразон, дезаспидин, флоридзин и др. Кроме этого, имеется сходство между фактором сопряжения, белком F_1 при окислительном фосфорилировании и выделенным из хлоропластов белком, который необходим для фотофосфорилирования, хотя молекулярного механизма образования АТФ из АДФ в обоих типах фосфорилирования мы пока не знаем.

Как видно, запасание энергии на основе сопряженного переноса электронов с фосфорилированием приобрело преобладающее значение в биологических системах. Но этот способ накопления и превращения энергии возник, видимо, в результате длительной эволюции. На ранних этапах эволюции органического мира запасание энергии могло осуществляться неэнзиматически, фосфорилированием АДФ за счет энергии средних длин волн ультрафиолетовых лучей, которая поглощалась аденином. Сам аденин на ранних этапах мог также синтезироваться неэнзиматически из CO_2 и NH_3 за счет энергии ультрафиолетовой части спектра солнечного света. Но молекула аденина при поглощении энергии солнечного света отдает ее в виде тепла или путем высвечивания. Поэтому имеет место низкий коэффициент использования этой энергии на образование таких богатых энергией соединений, как фосфориаденин, энергия которого теряется при атаке его H^+ и OH^- ионами. В химической эволюции на основе аденина, рибозы и фосфата за счет энергии ультрафиолета мог возникнуть нуклеотид. В этом случае богатые энергией $\text{O} \sim \text{P}$ -связи защищены гидроксильными группами, которые или отталкивают OH^- -группы или нейтрализуют H^+ .

Позже, когда появился в атмосфере кислород и ультрафиолетовые лучи стали поглощаться атмосферой, выработалась современная система акцептирования, трансформации и использования энер-

гии в хлоропластах с помощью фотосинтезирующих систем: $h\nu \rightarrow$
 $\rightarrow$ пигмент $\rightarrow$ электронотран-
спортная цепь $\rightarrow$ АТФ. Позже этот принцип образо-
вания и аккумуляции энергии стал основным также и в процессе
окислительного фосфорилирования в митохондриях.

Таким образом, центрами восприятия, аккумуляции и преоб-
разования энергии в клетке в основном являются митохондрии и
хлоропласты. Эти органеллы обособлены от клеточного содержимого
мембраной. В связи с этим возникает вопрос об их автономности и
способности к существованию вне клетки. Можно считать, что эти
органеллы полуавтономны и как вирусы способны к воспроизведе-
нию только в условиях клетки. Эти структуры имеют ДНК, ко-
торая отличается от ядерной по нуклеотидному составу, низкой
молекулярной массе (10^6), кольцевой структурой молекулы и со-
ставляет всего около 1% от ядерной ДНК.

Известно, что на ДНК митохондрий комплементарно синтези-
руется РНК. Митохондрии и хлоропласты имеют все компоненты
белоксинтезирующей системы и способны синтезировать белок.
Митохондрии с помощью своих ДНК, рибосом, РНК могут синте-
зировать только структурные белки крист внутренней мембраны.
Эти белки несут информацию сборки липидов, ферментных и дру-
гих белков, входящих в состав мембран. Другие белки синтезируют-
ся на основе информации, идущей от ДНК ядра.

Митохондрии и хлоропласты по ряду признаков близки к сине-
зеленым водорослям, бактериям. Поэтому высказывается предполо-
жение, что хлоропласты и митохондрии являются потомками бак-
терий и водорослей, которые в процессе эволюции вступили в сим-
биоз с клеткой эукариотов, а затем стали ее составной частью.
Эти две органеллы имеют много общего. Квантосома хлоропласта
соответствует элементарной единице внутренней митохондриальной
мембраны. Внешняя мембрана митохондрий и хлоропластов содер-
жит ферменты пентозного, гликолитического циклов. Мембраны
содержат приблизительно одинаковое количество белков и липидов.
Цепь переноса электронов имеет большое сходство по компонентам,
составляющим электронотранспортную цепь. Митохондрии и хлоро-
пласты одинаково реагируют на различные ингибиторы переноса
электронов.

Таким образом, биологические системы обладают способностью
образовывать специфические соединения, обладающие большим
количеством свободной энергии. Избыток свободной энергии полу-
чается от солнца в виде квантов света и запасается в виде химичес-
кой (АТФ) и электрической (НАДФ · Н) энергий, т. е. в формах,
в которых клетка может ее использовать для активного переноса
ионов, различных биосинтезов, осуществления различных процес-
сов жизнедеятельности. Эта энергия должна непрерывно поступать
в живые системы извне, иначе они будут самопроизвольно прибли-
жаться к равновесию и смерти.

Список литературы

- Белицер В. А., Цыбакова Е. Т. О механизме фосфорилирования, сопряженного с дыханием. «Биохимия», № 4, 1939.
- Белицер В. А. Химические превращения в мышце. Медгиз, 1940.
- Бовэ Ж. М. Термодинамика биохимических процессов. Изд-во «ВИНИТИ». М., 1962.
- Кальвин М. Химическая эволюция и происхождение жизни.— В сб.: Возникновение жизни на земле. Изд-во АН СССР, 1957.
- Клотц И. Энергетика биохимических реакций. М., «Мир», 1970.
- Кребс Г., Корнберг Т. Превращение энергии в живых системах. М., Изд-во иностр. лит., 1959.
- Ленинджер А. Живая клетка. М., Изд-во иностр. лит., 1962.
- Ленинджер А. Митохондрия. М., «Мир», 1966.
- Любимов В. И. Ферредоксина и их биологическая роль.— «Успехи биол. химии», № 7, 1965.
- Рабинович Е. И. Молекулы и клетки, вып. 2. М., «Мир», 1967.
- Рэкер Э. Биоэлектрические механизмы. М., «Мир», 1967.
- Рэкер Э. Молекулы и клетки, вып. 4. М., «Мир», 1969.
- Сент-Дьердьи А. Биоэнергетика. М., Изд-во Физ-мат. лит-ры, 1960.
- Сент-Дьердьи А. Биоэлектроника. М., «Мир», 1971.
- Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. Изд-во АН СССР, 1962.
- Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке. М., «Наука», 1969.
- Фосфорилирование и функция. (Сборник). Л., Изд-во ИЭМ, 1960.
- Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Bodmin, Glynn. Research, 1966.

Глава XI

БИОЛОГИЧЕСКИЙ КАТАЛИЗ И РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ ФУНКЦИИ

1. Роль ферментов в биокатализе. Биологический катализ осуществляется с помощью ферментов. Все ферменты являются белками. В последние годы в ряде публикаций сообщалось о том, что найдены ферменты небелковой природы. Однако ни одно из этих сообщений при тщательном изучении не подтвердилось. Поэтому можно считать, что одной из важнейших функций белков является биологический катализ, регуляция клеточного метаболизма.

Обнаружено множество разнообразных белков-ферментов. Считается, что даже в более просто организованной бактериальной клетке число ферментов достигает двух-трех тысяч. Можно утверждать, что каждая реакция в клетке катализируется своим ферментом. Это говорит о высокой специфичности биологического катализа, что определяется уникальной структурой белковой молекулы определенного фермента. Молекулярное структурное соответствие фермента субстрату лежит в основе его специфического действия. Ферментативные реакции характеризуются стопроцентным выходом без образования побочных продуктов, тогда как реакции, осуществляемые в лабораторных условиях, как правило, не дают стопроцентного выхода продуктов и сопровождаются образованием побочных продуктов. Такая эффективность ферментативных реакций

обусловлена исключительно высокой степенью комплементарности, соответствия между активным центром фермента и субстратом.

Взаимодействие определенного фермента только со «своим» субстратом является показателем специфичности действия, которая является характерной чертой биологического катализа.

В настоящее время известно около тысячи различных ферментов, и все они обладают специфическим каталитическим действием. Но не все ферменты имеют одинаковую степень специфичности. Одни обладают абсолютной специфичностью и действует только на одно какое-то соединение, и не способны катализировать даже самые близкие его производные или изомеры. Другие ферменты обладают групповой специфичностью и активируют определенную группу соединений. Например, L-малатдегидрогеназа отщепляет водород только от L-яблочной кислоты. Специфичность действия у этого фермента настолько высокая, что он не способен атаковать даже D-изомер яблочной кислоты. Другой фермент, фумараза, катализирует присоединение молекулы воды к фумаровой кислоте, т. е. к *транс*-изомеру, и не активен по отношению к малеиновой кислоте — *цис*-изомеру. Другие ферменты, такие как алкогольдегидрогеназа, окисляют первичную спиртовую группу ($R - OH$) независимо от радикала R , к которому она присоединена. Ряд ферментов имеет относительную групповую специфичность и разрывают не один тип связи. Например, трипсин, который гидролизует пептидную связь и действует как эстераза.

Известно, что органические соединения углерода являются стабильными, отличаются высокой устойчивостью при умеренной температуре, нормальном давлении и pH, близком к нейтральному. Однако в условиях клеточной среды многочисленные органические соединения под действием ферментов легко переходят в активированное состояние и вступают в различные реакции, которые протекают с большой скоростью, т. е. многие устойчивые органические соединения углерода в клетке становятся в физиологических условиях высоко реакционноспособными только после того, как они вступят во взаимодействие и связь с ферментами. Скорость биохимических реакций, как правило, очень высокая. Некоторые ферменты в одну минуту могут превратить от ста до миллиона и выше молекул одного соединения (субстрата) в другое соединение (продукт реакции). Скорость ферментативной реакции (число оборотов) зависит также и от размера и сложности молекулы субстрата. Если субстрат представлен небольшой молекулой (перекись водорода), то эта реакция может активироваться и протекать с большой скоростью. Ферментативное превращение более крупных и сложных молекул, как правило, протекает с меньшей скоростью.

Два соединения вступают во взаимодействие только при возникновении активированного комплекса между ними, на образование которого необходима затрата энергии. В результате взаимодействующие молекулы приобретают достаточное количество энергии, сближаются друг с другом и пространственно взаимно ориентиру-

ются таким образом, что между ними возможно возникновение новых ковалентных связей.

Белковая часть фермента обуславливает высокую эффективность и специфичность реакции тем, что обеспечивает соответствующую ориентировку и активацию реагентов. При этом белок-фермент и субстрат реакции, видимо, претерпевают определенные конформационные изменения, а активные группы фермента приходят в соприкосновение и взаимодействие с субстратом. Сама химическая реакция обычно осуществляется за счет кофермента, простетической группы, активной группы фермента. Химическая реакция и возникновение новых ковалентных связей наступают в результате флуктуации взаимодействующих атомов, групп при сближении их на расстоянии нескольких десятков нанометров. Но размеры белковых макромолекул, как известно, достигают нескольких сотен нанометров. Из этого становится понятным, что роль самой белковой молекулы состоит в соответствующей пространственной ориентации взаимодействующих атомов, групп. На поверхности белковой молекулы имеются центры их каталитической активности, роль которых могут выполнять боковые группы полипептидной цепи. Эти группы могут располагаться в различных частях полипептидной цепи. Но в результате ее специфического свертывания и образования третичной структуры эти группы могут быть сильно сближенными друг с другом. Это подтверждается тем, что каталитическая активность белковой молекулы очень чувствительна к действию денатурирующих факторов, нарушающих их третичную структуру. Например, при взаимодействии двух субстратов, имеющих связи $A-B$ и $C-D$, последние будут пространственно ориентироваться макромолекулой фермента таким образом, что атомы этих субстратов будут за счет каталитически активных центров фермента сближены друг с другом. Роль фермента при этом сведется к снижению энергии активации биохимической реакции.

С помощью биомacroмолекулы фермента и его активных центров создается специфическое химическое окружение вокруг тех групп субстрата, которые должны вступить в реакцию. Эти группы приобретают способность претерпевать различные химические превращения. Специфика фермента при этом направляет, индуцирует лишь тот тип химических изменений, который должен претерпеть соответствующий атом или группа субстрата. Роль фермента при этом сводится к тому, чтобы снизить энергию активации, преодолеть энергетический барьер, расслабить и разорвать связи $A-B$ и $C-D$ во взаимодействующих субстратах. Это обуславливает возникновение новых ковалентных связей $A-C$ и $B-D$.

При этом фермент образует с субстратом комплекс фермент — субстрат. После окончания реакции фермент регенерирует и снова вступает в реакцию взаимодействия с другой молекулой субстрата. Этим объясняется высокая эффективность действия фермента, представленного в биологических смесях обычно в низких концентрациях. Важно, что энергия образования фермент-субстратного

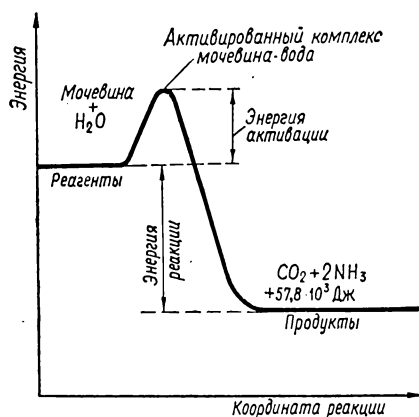
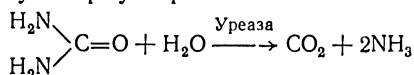


Рис. 102. Энергетическая кривая гидролиза мочевины. Образование продуктов реакции энергетически выгодно. Но образование активированного комплекса при комнатной температуре задерживается из-за низкого энергетического уровня молекул воды и мочевины.

Таким образом, биологический катализ подчиняется тем же законам, что и всякий неферментативный катализ. Он имеет очень высокую эффективность в снижении энергии активации, преодолении энергетического барьера и отличается тонкой специфичностью. На основе высокой специфичности своего действия при низких концентрациях ферменты выполняют в клетке также важную, вторую, регуляторную роль.



Концентрация различных ферментов в клетке зависит от процессов, которые они катализируют. Если катализируется какой-то процесс ключевого центрального значения, то количество фермента может исчисляться тысячами молекул на клетку. Но если катализируется процесс, лежащий в стороне от основного направления метаболизма, то количество фермента может исчисляться сотнями молекул.

Специфичность действия является одним из важнейших свойств ферментов. Это позволяет определять количество фермента в биологическом препарате, в котором примеси составляют значительную величину. Такая возможность зависит от очень высокой специфичности фермента, который узнает и взаимодействует только со «своим» специфическим субстратом, если он находится даже в сложной смеси со многими другими соединениями. Скорость взаимодействия реакции зависит от концентрации фермента, которая определяется его чистотой. Степень чистоты фермента определяют величи-

комплекса ниже энергии возникновения промежуточных продуктов, когда в реакции не участвует катализатор. Отсюда при какой-то определенной температуре в присутствии фермента в реакцию может вступать большее количество молекул. Но фермент не выполняет термодинамической функции в реакции и не поднимает ее на более высокий энергетический уровень. Он только ускоряет наступление реакции. Например, реакция расщепления мочевины уреазой ускоряется в 10 000 000 раз по сравнению с некатализируемой реакцией. Абсолютная скорость реакции составляет 10^4 с^{-1} , т. е. одна молекула уреазы расщепляет за секунду 10 000 молекул мочевины (рис. 102).

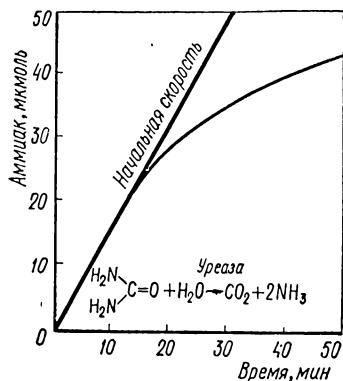


Рис. 103. График определения начальной скорости действия фермента, в данном случае уреазы, определяется построением касательной к кривой, проходящей через начало координат.

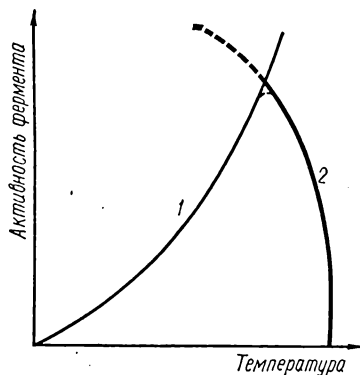


Рис. 104. Зависимость активности фермента (начальная скорость) от температуры. Часть кривой 1 показывает зависимость активности фермента от температуры, а часть кривой 2 — зависимость скорости денатурации белка фермента от температуры.

ной отношения начальной скорости реакции к общему количеству присутствующего в препарате белка. Эта величина отношения называется удельной активностью фермента, которая возрастает по мере повышения чистоты. Если достигается состояние, когда величина удельной активности не увеличивается, то это говорит о полной очистке фермента. Но начальная скорость ферментативной реакции определяется также многими другими факторами: концентрация субстрата, величина pH, температура, буферная «смесь», ионная сила. Все эти факторы должны обусловить состояние полного насыщения фермента, т. е. когда начальная скорость реакции будет пропорциональна концентрации фермента и отношение скорости реакции к концентрации фермента будет носить линейный характер. Поэтому определение активности фермента необходимо проводить именно на этой стадии реакции, так как при более высокой концентрации фермента такого его насыщения может не быть и скорость реакции не будет линейно изменяться в зависимости от концентрации фермента.

Начальную скорость ферментативной реакции определяют касательной к кривой, проходящей через начало координат. Например, для разложения мочевины уреазой начальная скорость реакции будет иметь такой вид (рис. 103).

Как уже было сказано, ферменты являются белками. Это следует из того, что при обработке препарата белка одного фермента другим ферментом, который расщепляет белок (протеиназа), исчезает ферментативная активность. Кроме этого, ферментативная активность теряется при денатурации белка-фермента. Белковая природа ферментов подтверждается также зависимостью их активности от температуры. При этом действие температуры проявляется в

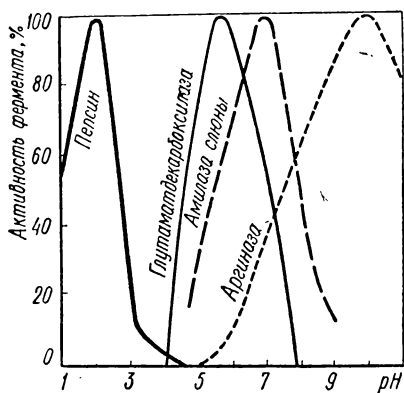


Рис. 105. Зависимость активности ферментов от pH.

изменении скорости реакции, которую катализирует фермент, и изменении скорости денатурации самого белка. Это графически можно изобразить таким образом (рис. 104). Как видно, денатурирующий эффект температуры носит кооперативный характер, имеет очень большой энтропийный член.

Ферменты, как белки, являются поливалентными ионами. Поэтому в зависимости от величины pH будет находиться диссоциация боковых цепей в молекуле белка-фермента, особенно тех, которые взаимодействуют с

субстратом. Величина pH будет определять концентрацию молекулы белка-фермента. От pH среды зависит диссоциация субстрата. Отсюда активность фермента в сильной степени зависит от pH среды. При этом максимальная активность у разных ферментов наступает при различном значении pH (рис. 105).

Ряд ферментов в клетке по разным причинам присутствуют иногда в неактивном состоянии, в виде предшественников. Затем они превращаются в активные ферменты. Например, трипсиноген является неактивным, но при отщеплении от него короткого пептида в его молекуле происходят структурные изменения, и она приобретает характерную активность трипсина. Но в состав многих ферментов входят соединения или элементы (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}), определяющие их активность. Эти соединения называются простетическими (активными) группами, или коферментами. Многие ферменты, катализирующие реакции окисления-восстановления, имеют простетические группы. Гидролитические ферменты, как правило, не имеют небелковых компонентов.

Но решающую роль в катализе выполняет белковая часть фермента. Это видно из того, что каталитическая активность железа в 10 млрд. раз ниже каталитической активности каталазы. Активность гема в 10 раз выше активности одного железа. Синтезированное соединение (Fe^{3+} -триэтиленetetрамин) в тысячу раз менее активное, чем каталаза (рис. 106). Таким образом, резкое возрастание каталитической активности железа и гема в разложении перекиси водорода при соединении с белком говорит о том, что последний имеет решающее значение в определении каталитической активности.

Простетическая группа с одними ферментами прочно связана, а с другими — слабо, и может быть легко от них отделена обычным диализом. Такие простетические группы, которые легко отделяются от своего белка, называют, как правило, *коферментами*. Кофер-

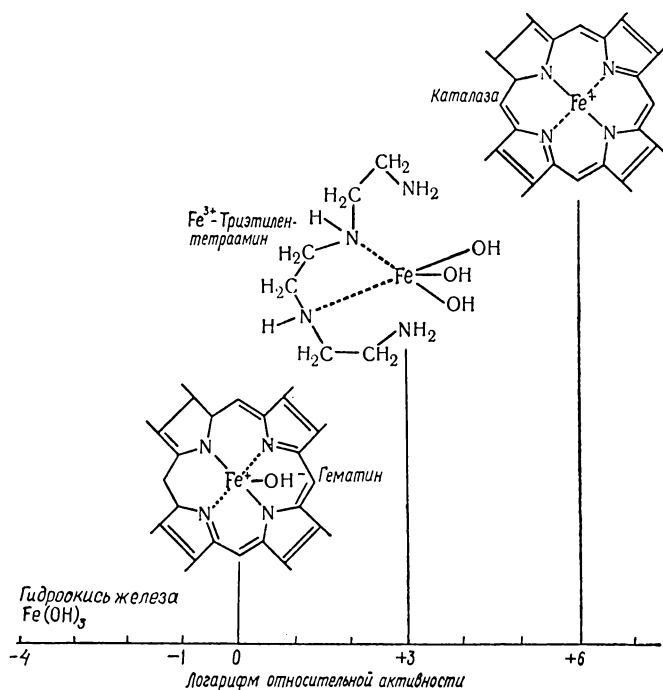


Рис. 106. Активность разных катализаторов реакции разложения перекиси водорода (по Вангу).

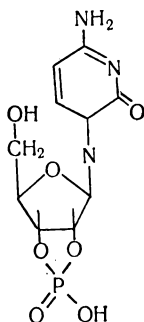
менты выполняют различную роль. Например, коферменты ферментов, катализирующих реакции окисления-восстановления, являются сами акцепторами электрона или водорода от субстратов, которые при этом окисляются. Простетические группы ферментов, активирующих реакции переноса групп, отрывают их от одних субстратов и передают другим. Ряд металлов выполняет роль связующего звена, к которому и присоединяются и фермент и субстрат. Роль простетических групп выполняют многие витамины. Возможно, что роль последних обусловлена именно тем, что в их отсутствии не может образоваться кофермент, соответствующий фермент, и это приводит к выпадению определенной реакции, процесса, к нарушению метаболизма и биологической функции. Растительные клетки способны синтезировать все органические соединения, необходимые как коферменты, а животные, как правило, не обладают такой способностью.

Роль первичных функциональных групп у ряда ферментов выполняют также металлы Cu, Fe, Co, Mn, Mg, Mo, Zn. Все эти элементы, как правило, относятся к переходной группе периодической системы и имеют незаполненные d -орбиты. Поэтому они способны образовывать дополнительные координационные связи с атомами, которые имеют неподеленную электронную пару и являются донорами

электронов. В результате образуются комплексные соединения между ионами металла и молекулами (лигандами, аддендами). Это сопровождается глубокой перестройкой электронной оболочки. В результате этого происходит отток электронного облака, ослабление связи в молекуле субстрата, снижение энергии ее активации. Образование комплексов между ионом металла фермента и субстратом можно наблюдать по изменению его оптической плотности.

Ферменты, в состав которых входит металл, легко отравляются реагентами, обладающими способностью образовывать комплексы. Например, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) легко образует комплексы с металлом фермента. Металл имеет различную прочность связи с белком фермента. Если связь металла с белком слабая, то мы имеем металло-белковый комплекс. Металл может быть удален с помощью диализа или комплексообразователя. Фермент при этом теряет активность. Если металл и белок прочно связаны, то мы имеем металлопротеин. Металл не удаляется диализом или комплексообразователем.

Из всего этого следует, что в каталитической реакции участвует не вся макромолекула фермента, а только ее часть. Это подтверждается данными по изменению активности ряда ферментов. Например, при отщеплении (с помощью протеазы субтилизины из *B. subtilis*) пептида между 20 и 21 аминокислотным остатком от *N*-конца цепи рибонуклеазы утрачивается ее ферментативная активность. Но остаточный белок молекулы рибонуклеазы сохраняет способность связывать субстрат 2', 3'-ангидридцитидиловой кислоты.

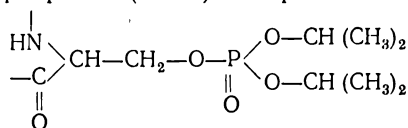


Но если остаточный белок рибонуклеазы соединить с пептидом, отщепленным субтилизином, в эквимолекулярных количествах, то происходит самосборка, восстановление структуры и функции фермента. Наоборот, искусственное пришивание различной длины полипептидов к боковым группам полипептидной цепи рибонуклеазы, даже до увеличения ее молекулярной массы в 1,5 раза, не изменяет активности фермента. Иное действие на активность рибонуклеазы оказывает удаление трех аминокислотных остатков с *C*-конца полипептидной цепи с помощью карбоксипептидазы и четырех аминокислотных остатков с помощью пепсина. В первом случае

удаляются валин, серин, аланин. Активность рибонуклеазы не изменяется. Во втором случае удаляется кроме этих трех аминокислот еще и аспарагиновая кислота. Активность рибонуклеазы теряется. Следовательно, аспарагиновая кислота, занимающая 121 место в полипептидной цепи рибонуклеазы, входит в состав ее активного центра.

При действии бромуксусной кислотой на молекулу белка рибонуклеазы атакуется гистидин в 12 и в 119 положениях и активность фермента теряется. Следовательно, в активный центр этого фермента входят остаток аспарагиновой кислоты и два остатка гистидина — 12 и 119-й. Эти остатки гистидина, находящиеся в цепи на значительном расстоянии друг от друга, оказываются сближенными благодаря своеобразной укладке полипептидной цепи при образовании третичной структуры молекулы рибонуклеазы. Основными силами, стабилизирующими третичную структуру, в данном случае являются дисульфидные мостики. При восстановлении —S—S-связей β-меркаптоэтанолом теряется активность рибонуклеазы. Этот процесс обратим. И окисление SH-группы приводит вновь к образованию —S—S-связей и восстановлению активности фермента.

Участие в катализе только части молекулы фермента может быть определено также с помощью отравления фермента специфическими ядами. Например, активные центры дыхательных ферментов (железо гема) связываются окисью углерода, HCN, NaN₃, Na₂S; сульфгидрильные и карбоксильные группы — соединениями кадмия или ртути; металлосодержащие ферменты связываются с комплексообразователями (этилендиаминтетрауксусная кислота — ЭДТА и др.); серин ферментов эстеразного действия связывается диизопропилфторфосфатом (ДФФ) с образованием эфира.



При этом в реакцию вступает именно серин активного центра, т. е. реакция является результатом каталитического действия самого фермента. В активный центр эстераз также входит гистидин, который может быть связан с помощью хлорметилкетон, которые активно атакуют имидазол.

Все это подтверждает, что каталитическая активность представлена и обусловлена только частью макромолекулы фермента. Это находит подтверждение также с помощью метода рентгеноструктурного анализа. Важно, что у большинства ферментов активный центр расположен в нишах, находящихся в глубине белковой молекулы. Но, как уже было ранее отмечено, гидрофильные боковые группы белковой молекулы направлены наружу и расположены на ее поверхности. Гидрофобные, наоборот, направлены внутрь и расположены в глубине центральной части молекулы.

Таким образом, активные центры многих ферментов находятся в гидрофобном окружении, и воде к ним нет доступа. Поэтому каталитические реакции в этом случае протекают в безводных условиях. Отсюда все ферменты, исходя из структуры их активных центров, окружающей среды, а также строения и физико-химических свойств молекулы субстрата, можно разделить на две группы — гидрофильного и гидрофобного действия. Примером может служить гемоглобин, который сорбирует и удерживает кислород с помощью двухвалентного железа гема (Fe^{2+}). При окислении железа до трехвалентного состояния (Fe^{3+}) теряется способность железа присоединять и удерживать кислород, и гемоглобин переходит в метгемоглобин. Для окисления железа необходимо присутствие воды: $\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{HO}_2$. Оказалось, что железо в геме находится длительное время в двухвалентном состоянии и способно удерживать кислород потому, что гем находится в нише, в глубине белковой молекулы и окружен гидрофобными аминокислотными остатками. В результате доступ воды к активному центру становится невозможным. Если в результате мутации в окружении гема происходит замена гидрофобных боковых групп полипептидной цепи на гидрофильные радикалы, то к активному центру поступает вода, обуславливая быстрое окисление двухвалентного железа в трехвалентное, и гемоглобин теряет способность выполнять свою функцию.

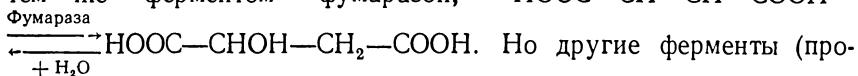
Но если биохимический процесс является многоступенчатым, то для его осуществления необходимо наличие нескольких простетических групп, каждая из которых функционирует на определенном этапе (цепь переноса электронов, процессы декарбоксилирования, окисления гипоксантина и др.).

В состав молекул некоторых ферментов входит не одна, а две и больше субъединиц. В этом случае активность фермента определяется характером связи этих субъединиц. Субъединицы могут существовать в двух сходных, но не идентичных формах (α и α' , β и β'). Тогда фермент будет активным в состоянии различных форм $\alpha\beta'$, $\alpha'\beta$.

Такие родственные группы ферментов называют *изозимами*. Отличие их объясняется четвертичной структурой, т. е. определенной комбинацией составляющих олигомер субъединиц. Активный центр фермента может состоять из групп, которые находятся в двух различных субъединицах. В этом случае фермент будет активным, когда субъединицы соединены. Имеются ферменты, которые состоят из большого числа субъединиц и представляют собой ферментные комплексы. Сложные ферменты могут состоять из идентичных и неидентичных субъединиц. Активный центр или часть его может быть в каждой субъединице, а может находиться также не во всех субъединицах, или в одной молекуле белка-фермента имеется два активных центра разной структуры и функции. Кроме этого, одни сложные ферменты активны, когда их субъединицы соединены вместе, другие, наоборот, активны в состоянии разъединенных

субъединиц. Из этого следует, что сложные ферменты, ферментные комплексы несут в себе еще большие возможности регулирования их активности и управления процессами метаболизма. Подавляющее большинство ферментов находится внутри клетки. Но имеются ферменты, которые выделяются вне клеток. К ним относятся ферменты микроорганизмов, которые они выделяют во внешнюю среду обычно для расщепления какого-то сложного соединения и др.

Во всех клетках содержатся основные ферменты, которые катализируют биосинтез белка, РНК, ДНК, гликолиз и т. п. Но некоторые ферменты характерны только для определенного типа клеток и обуславливают их функциональную особенность. Каждой клетке характерно абсолютное и относительное содержание различных ферментов. Реакции, катализируемые ферментами, могут быть обратимыми и необратимыми. Например, гидратация фумаровой кислоты и дегидратация яблочной кислоты катализируется одним и тем же ферментом — фумаразой, $\text{HOOC}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ —



Но другие ферменты (протеолитические, амилаза и т. д.) не способны ресинтезировать исходные сложные соединения (белки, крахмал и др.) из продуктов расщепления. Как правило, сложные соединения синтезируются с помощью одних ферментов, а расщепляются иными путями.

2. Фермент-субстратный комплекс и кинетика ферментативного катализа. В процессе реакции фермент и субстрат соединяются и образуют фермент-субстратный комплекс. При этом активность фермента зависит не только от его количества, но концентрации субстрата. Пропорциональность между активностью фермента и его концентрацией будет до тех пор, пока концентрация субстрата будет достаточной для того, чтобы обеспечить весь фермент каталитической работой. Скорость ферментативной реакции растет пропорционально повышению концентрации субстрата. Но при некоторой концентрации субстрата скорость реакции становится постоянной. Дальнейшее повышение концентрации субстрата не вызывает увеличения скорости реакции. Это состояние носит название *насыщения субстратом*. Скорость ферментативной реакции в этих условиях определяется концентрацией фермента.

Л. Михаэлис и М. Ментен зависимость между количеством субстрата и активностью фермента обосновали количественно. Значение константы Михаэлиса (K_m) зависит от структуры молекулы субстрата, pH, температуры, выражается размерностью моль/л и равна концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции составляет половину от ее максимальной скорости. С помощью константы Михаэлиса выражается степень сродства фермента к субстрату. Из этого следует, что, в известной мере, можно говорить о комплементарности между структурой субстрата и активного центра фермента. Если исходить из того, что закон действия масс можно применить к образованию фермент-

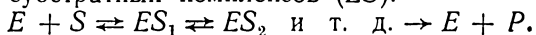
субстратного комплекса, то это можно выразить таким образом:

$E + S \xrightleftharpoons[R_3]{R_1} ES \xrightarrow{R_2} E + P$, где E — свободный фермент, S — субстрат, ES — фермент-субстратный комплекс, P — продукт реакции, R_1, R_2, R_3 — константы скорости в соответствующих реакциях. При этом допускается, что в реакции участвует только один субстрат. Если их несколько, то концентрация всех их, кроме одного, постоянна.

Обратная реакция $E + P \rightarrow ES$ незначительна и ею пренебрегают. Количество свободного фермента также пренебрегается, так как допускается, что концентрация фермент-субстратного комплекса (ES) достигла предельного значения. Считается, что в продукт превращено только очень малое количество субстрата, которым можно пренебречь. Эти допущения характерны для начальной скорости реакции. Температура, рН, ионная сила, буфер являются постоянными. Все эти условия достаточно легко могут быть соблюдены и поэтому скорость ферментативной реакции можно описать с помощью двух параметров, характеризующих данную фермент-субстратную систему. Этими параметрами является предельная или максимальная скорость реакции при бесконечно большой концентрации субстрата (V) и константы Михаэлиса (K_m): $v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$,

где v — скорость ферментативной реакции, V — предельная (максимальная) скорость при бесконечно большой концентрации субстрата, $[S]$ — концентрация субстрата в молях на 1 л раствора, K_m — константа Михаэлиса в моль/л. Это уравнение выражается графиком, который имеет форму равнобочной гиперболы (рис. 107). Чем круче идет кривая, т. е. чем быстрее достигается предельная скорость с увеличением концентрации субстрата, тем меньше значение константы Михаэлиса.

Возникновение фермент-субстратного комплекса можно наблюдать по спектрам поглощения, если ферменты имеют окраску (рис. 108). Спектр поглощения фермента изменяется при взаимодействии с субстратом. На основании таких изменений было установлено, что во время реакции могут возникать несколько промежуточных фермент-субстратных комплексов (ES).



Теория Михаэлиса приложима и к таким реакциям. Это, видимо, обусловлено тем, что скорость ферментативной реакции ограничивается одной стадией. О природе комплекса ES , кинетике ферментативных реакций, структуре макромолекул можно получить дополнительные сведения с помощью так называемого метода температурного скачка. Если создать резкие скачки температуры, то можно наблюдать весьма кратковременные эффекты продолжительностью около 10 мкс.

Константа Михаэлиса соответствует концентрации субстрата, при которой $v = \frac{V}{2}$. Но определение предельной скорости очень

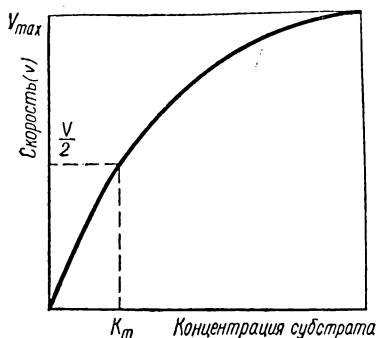


Рис. 107. Кривая, описываемая уравнением Михаэлиса — Ментен. Если подставить в это уравнение $v = V/2$, то получим константу Михаэлиса (K_m).

сложно. Поэтому V и K_m могут быть определены методом экстраполяции с помощью графика двойных обратных величин, который представляет собой прямую. С помощью этого метода можно определить, ложатся ли экспериментальные точки на графике в зависимости $\frac{1}{v}$ от $\frac{1}{[S]}$ на прямую линию, т. е. подчиняется ли ферментативная реакция теории Михаэлиса. При помощи этого графика можно определить значение K_m и V . Константа Михаэлиса (K_m) — это константа сродства между ферментом и субстратом. Ее физический смысл определяется механизмом действия между ферментом и субстратом.

3. Механизм действия ферментов. Известно, что имеет место чрезвычайно высокая степень усиления скорости реакций при биологическом катализе. В присутствии белка-фермента скорость реакции может возрасть на пятнадцать — двадцать порядков, по сравнению со скоростью реакции, в которой не участвует биокатализатор. Остаются непонятными механизмы, причины, которые обуславливают такое ускорение биохимических реакций, катализируемых белками. Но определились общие подходы, которыми необходимо руководствоваться при изучении механизма биологического катализа. Прежде всего, ферменты снижают энергию активации и повышают скорость реакции. Примером может служить разложение перекиси водорода. В отсутствие катализатора разложение перекиси протекает при энергии активации, равной 75×10^3 Дж/моль, в присутствии железа $54 \cdot 10^3$ Дж/моль, а при участии каталазы — $17 \cdot 10^3$ Дж/моль. Вторым важным общим свойством биологического катализа является высокая специфичность. Фермент способен узнавать очень незначительные

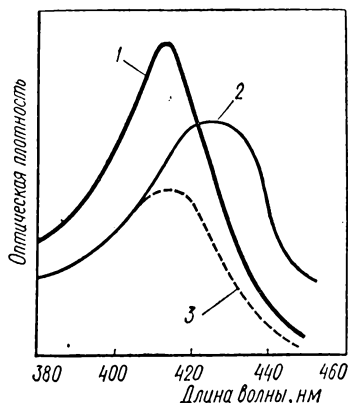


Рис. 108. Изменение оптической плотности белка-фермента при образовании фермент-субстратных комплексов (по Чансу, 1949):

1 — пероксидаза; 2 — фермент-субстратный комплекс 11, имеющий красную окраску; 3 — фермент-субстратный комплекс 1 — зеленую окраску.

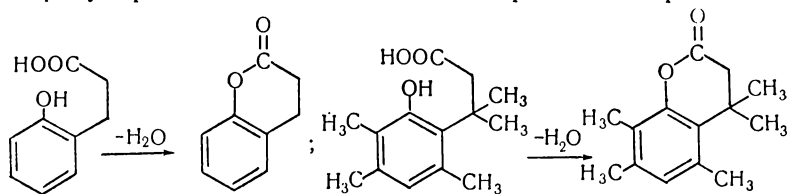
различия в структуре субстрата. И наконец, ферментативный катализ в клетке очень тонко регулируется.

Основная и важнейшая задача молекулярной биологии состоит в том, чтобы дать объяснение явлению снижения активации под влиянием ферментов исходя из их высокой специфичности действия. Еще не создана общая теория биологического катализа, на основе которой можно было бы объяснить ферментативное действие. Но сформулирована концепция активного центра, которая позволяет на молекулярном уровне представить в целом проблему биокатализа. Исходя из этой концепции в молекуле фермента имеется один или несколько участков, в которых субстрат тесно соприкасается с ферментом и происходит катализ. Активный центр фермента, принято считать, состоит из небольшого числа реактивных атомов или групп. Роль реактивных групп выполняют аминокислотные остатки полипептидной цепи белковой молекулы фермента или простетические группы, входящие в его состав. Конформационные изменения фермента приводят к возникновению напряжения в структурах субстрата. Изменение структуры субстрата, фермента и его активного центра установлено на белке карбоксипептидазы, лизоцима. Возникает, таким образом, индуцированное соответствие фермента субстрату. Связыванию субстрата с ферментом способствует также возникновение в них реактивных конфигураций. При взаимодействии с субстратом в белке-ферменте возникают изменения третичной структуры. В результате создается большее соответствие фермента к субстрату. Такое индуцированное соответствие фермента и субстрата зависит от строения их молекул и изменения их конформации. У большинства ферментов белок претерпевает конформационные изменения при взаимодействии с субстратом, ингибитором, коферментом. Это подтверждает гипотезу индуцированного соответствия Кошланда о конформации белков-ферментов при соединении с субстратом. На молекулу субстрата, который присоединяется к активному центру, электростатическое действие оказывают участки молекулы фермента, расположенные за пределами активного центра. Это определяет соответствующий субстрат, который присоединяется к тому или иону ферменту. Поэтому у ряда ферментов в состав активного центра входят одни и те же группы, но активируются различные субстраты. Можно считать, что более узкая специфичность фермента зависит от частей его молекулы, которые находятся за пределами активного центра.

Функциональная группа активного центра пространственно фиксирована на поверхности молекулы фермента. Это способствует тому, что при присоединении к ферменту субстрат изменяет свою форму, и реактивность связи или группы возрастает. Таким образом, создается активированный комплекс, который способствует появлению нового соединения, т. е. продукта реакции, с иной структурой и степенью сродства к активному центру фермента.

Атомы в молекуле субстрата связаны электронными орбитами. Эти орбиты в процессе катализа разрываются, и возникают новые

ковалентные связи. Поэтому субстрат должен пройти через активированное состояние, барьер, при котором разрываются старые связи. Это происходит в результате увеличения расстояния между атомами или группами, образующими эти связи, т. е. в результате снижения энергии активации, что осуществляется удлинением и ослаблением связей в субстрате. Это происходит за счет специфической ориентировки субстрата с помощью активированного состояния реактивных групп и возникновения реактивных конфигураций в субстрате и ферменте. Возникновение реактивной конформации субстрата, таким образом, состоит в облегчении электронных перестроек, ведущих к его активированию. Примером значения конформационных изменений молекулы для скорости ее внутримолекулярных перестроек может служить образование лактонного кольца у гидрокумариновой кислоты и ее метилированного производного.



В случае метилирования гидрокумариновой кислоты вносится большой вклад в энтропийный фактор активации, и в ее молекуле происходят конформационные изменения. В результате этого скорость замыкания лактонного кольца возрастает на одиннадцать порядков. Аналогичная картина, видимо, происходит в субстрате при образовании фермент-субстратного комплекса. Переходное активированное состояние возникает в результате перехода электрона к более электрофильному компоненту. При этом образуется два иона, обладающие определенной более высокой реакционной способностью. Активированное состояние может возникнуть также без передачи электрона одному из компонентов. В этом случае переходное, активированное состояние имеет свободнорадикальное происхождение. Функциональные группы активного центра фермента при этом облегчают процесс активации, разрыв электронной орбиты.

Термодинамическое соответствие между ферментом и субстратом является условием снижения энергии его активации. Допустим, что субстрат имеет четыре связи. Каждая связь обладает способностью вращаться вокруг некоторой оси. Поэтому субстрат находится в неупорядоченном состоянии с высокой степенью энтропии, с высоким энергетическим порогом активации. Молекула субстрата находится в вибрирующем состоянии, представляет собой неупорядоченную систему. Для уменьшения вибрации групп в молекуле необходим приток энергии, делающей систему более упорядоченной. Для прохождения реакции необходимо фиксированное состояние связей, которые должны занять определенное положение, т. е. должны быть фиксированы с помощью фермента. При этом

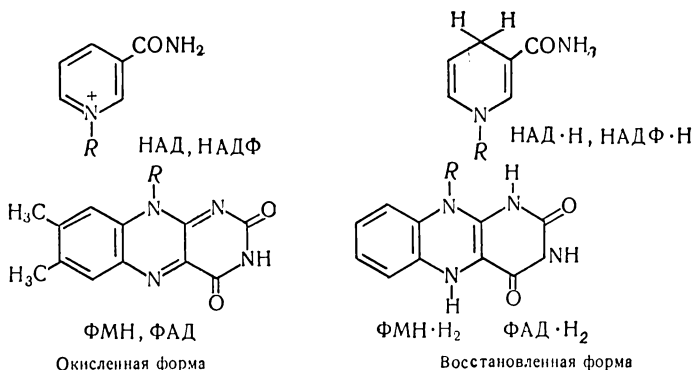
происходит падение энтропии, возникает упорядоченный субстрат. Происходит снижение энергии активации реакции.

Если все группы (связи), с помощью которых субстрат взаимодействует с ферментом, находятся в фиксированном, упорядоченном состоянии, то величина энергии активации снижается до нуля. Отсюда соответствие фермента и субстрата устраняет энтропийный барьер, который препятствует течению реакции. Таким образом, чем выше соответствие субстрата, тем больше устраняются в нем вибрационные флуктуации с помощью фермента, тем больше снижается энергия активации.

Возможность протекания реакции в сильной степени зависит от концентрации, различия между уровнями энергии молекулы перед химической реакцией (основное состояние) и во время взаимодействия (переходное состояние). Если различие уровней большое, энергетический барьер между основным и переходным состояниями высокий, то возможность протекания реакции будет небольшая. Образование фермент-субстратного комплекса приводит к сближению энергетических уровней в основном и переходном состояниях и способствует течению реакции. При многоступенчатом катализе суммарная энергия активации уменьшается постепенно, по этапам процесса. Поэтому многоступенчатый катализ имеет кинетическое преимущество перед одноактным.

Концепция активного центра, положенная в основу объяснения механизма действия ферментов, подтверждается экспериментальными данными. В частности, в настоящее время расшифрован на молекулярном уровне механизм участия в биокатализе функциональных групп активных центров ряда ферментов.

В ферментах, катализирующих биологическое окисление, ведущую роль выполняют коферменты, содержащие никотинамид и изоаллоксазиновое ядро. Катализ осуществляется циклическим окислением-восстановлением пиримидинового и изоаллоксазинового ядер.



С помощью этих коферментов осуществляется перенос электронов, механизм которого поддается непосредственному изучению

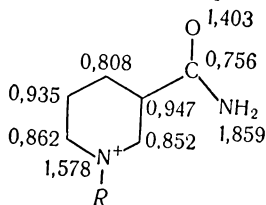
методами квантовой химии. Действие этих коферментов может быть объяснено на основе энергии наивысшей заполненной молекулярной орбиты и энергии наинизшей незаполненной молекулярной орбиты.

У окисленных НАД и ФМН наинизшая незаполненная орбита расположена довольно низко (соответственно — 0,356 и —0,343). Это говорит о том, что НАД и ФМН в окисленном состоянии имеют высокое сродство к электрону, являются очень сильными акцепторами электронов. Энергия наивысшей заполненной молекулярной орбиты расположена также сравнительно низко: НАД — 1,032; ФМН — 0,496. Поэтому окисленный НАД и ФМН являются плохими донорами электронов.

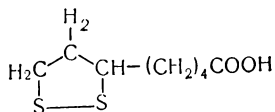
У восстановленных НАД и ФМН имеет место обратное распределение энергии на обеих орбитах. Энергия наинизших незаполненных орбит резко повышается и приводит к потере электроноакцепторных свойств. Энергия наивысших заполненных орбит также повышается, и молекула становится хорошим донором электронов.

Таким образом, мгновенная перестройка энергетических уровней наинизшей незаполненной и наивысшей заполненной молекулярных орбит НАД и ФМН обуславливает их электронодонорную и электроноакцепторную функции.

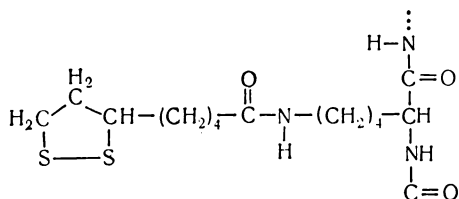
Переход НАД из окисленного в восстановленное состояние ($\text{НАД}^+ \rightarrow \text{НАД} \cdot \text{H}$) в дыхательной цепи может осуществляться прямым переносом иона водорода субстрата к окисленному коферменту. В этом случае перенос иона водорода регулируется не энергией самой низшей незаполненной орбиты окисленного НАД, а, вероятно, его электронными характеристиками, т. е. зарядами атомов, которые являются местами ионных атак. Исходя из распределения зарядов по атомам в молекуле НАД^+ ион водорода должен акцептироваться на атоме углерода кольца в четвертом положении, имеющего наиболее положительный заряд:



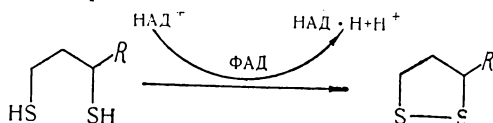
Механизм действия цитохромов близок к механизму действия рассмотренных коферментов. Достаточно полно изучен механизм акцептирования электрона и переноса ацильных групп с помощью липоевой кислоты (1,2-дителилан-3-валериановая кислота), которая



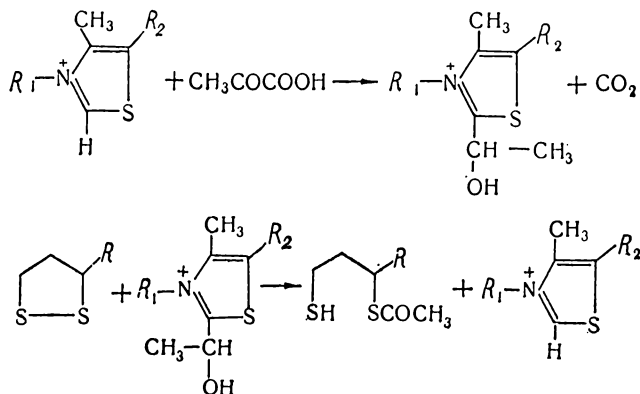
с белком связана, видимо, через образование пептидной связи с ϵ -аминной группой лизинового остатка.



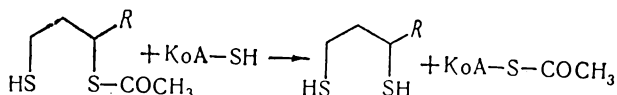
Каталитический цикл липоевой кислоты состоит в ее окислении и восстановлении, при котором осуществляется восстановительное ацилирование окисленной формы липоевой кислоты при взаимодействии с кетокислотой. Восстановленная липоевая кислота превращается в окисленную с помощью флавинового фермента, который затем передает электрон НАД^+ . Но окисленная липоевая кислота



ацилируется с помощью тиаминпирофосфата (ТПФ). Последний в результате декарбоксилирования кетокислоты превращает ее в альдегид, образует с ним комплекс, который служит восстановителем окисленной липоевой кислоты.



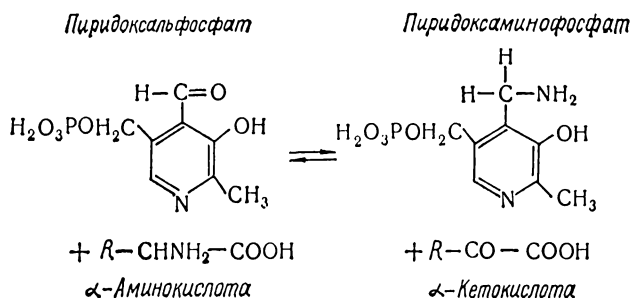
После этого происходит перенос ацильной группы с атома серы липоевой кислоты на тиоловую группу кофермента А.



Таким образом, функция липоевой кислоты состоит в ацильном переносе, который она осуществляет в восстановленной форме, а

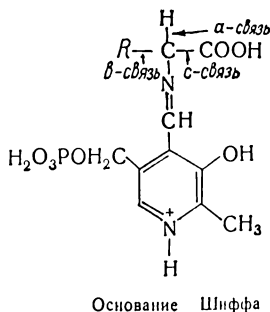
также в переносе водорода, в результате которого происходит образование окисленной формы липоевой кислоты, необходимой для осуществления следующего ацильного переноса.

Выяснен механизм действия ряда ферментов, которые катализируют перенос групп в реакциях расщепления и синтеза. К ним относятся также ферменты, у которых роль простетической группы выполняет пиридоксаль-5'-фосфат. Наиболее часто пиридоксальфосфат катализирует реакции переаминирования, в результате которых α -аминокислота превращается в α -кетокислоту. Но, кроме этого, пиридоксальфосфат активирует реакцию декарбоксилирования и рацемизации аминокислот. Он также участвует в конденсации индола и серина с образованием триптофана; в α -, β -дегидратации серина; в β -, γ -десульфировании гомоцистеина и образовании серина из глицина.



Функциональную роль в молекуле пиридоксальфосфата выполняет углеродный атом карбонильной группы. С помощью этой группы кофермент, связанный с белком, соединяется с аминогруппой субстрата. А. Е. Браунштейн, М. М. Шемякин разработали теорию, с помощью которой объясняется механизм действия пиридоксальных ферментов.

На первом этапе альдегидная группа пиридоксала реагирует с аминогруппой аминокислоты, образуется альдимин (основание Шиффа). Важно, что альдимин образуется с сопряженными связями.



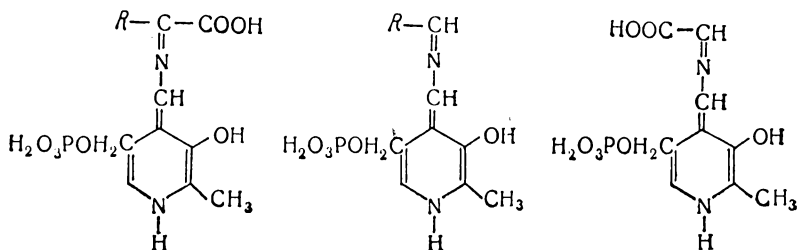
π -Электроны в таких соединениях обладают большой подвижностью, и различные группы могут атаковать также ковалентные

связи. Это обуславливает образование реакционноспособных молекул, в которых связи слегка ослабевают и разрываются.

Шиффово основание подвергается различным перестройкам, в зависимости от каталитического влияния белка, с которым связан пиридоксальфосфат. Как видно, в кольце имеет место сильно электрофильный заместитель (*N*). Это приводит к смещению электронов вдоль сопряженных связей, обуславливает лабильность молекул аминокислот и различные их превращения. Если разрывается α -связь, то катализируется реакция таутомерии. При этом происходит смещение электронов в сторону кольца, молекула поляризуется и происходит отрыв от нее протона H^+ . В случае удлинения, ослабления и разрыва c -связи происходит декарбоксилирование. В молекуле аминокислоты, соединенной с пиридоксальвым коферментом, могут ослабевать и разрываться другие связи, например гидроксильной группы, и тогда будет иметь место дегидратация и т. д. Но чаще осуществляется разрыв $C-N$ -связи, и тогда происходит дезаминирование или переаминирование.

Остается непонятным, почему осуществляются различные альтернативные превращения аминокислот. Выбор направления превращения, видимо, определяется белковой молекулой, так как во всех случаях остается та же простетическая группа фермента.

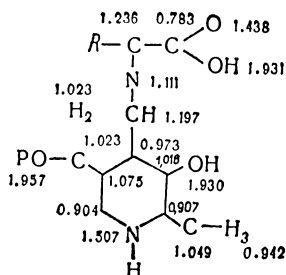
Роль кофермента, которая состоит в перемещении химических групп, выполняет пиридоксальфосфат. Молекула же белка-фермента ориентирует кофермент и определяет положение реагирующих молекул в пространстве. На основе квантовомеханических исследований дано энергетическое объяснение механизма пиридоксального катализа. Оказалось, что в результате ослабления и последующего разрыва одной из связей (*a*, *b*, *c*) возникает одно из переходных состояний основания Шиффа. У этих переходных оснований



появляется большая способность к образованию сопряженных системы, чем у исходного основания Шиффа. Это приводит к повышению энергии резонанса (достигающего 0,1—0,5 В, т. е. 8,36—41,8 Дж/моль) и обуславливает переход α -аминокислот в активированное состояние. Это подтверждается также иным распределением электронной плотности при возникновении переходных оснований Шиффа.

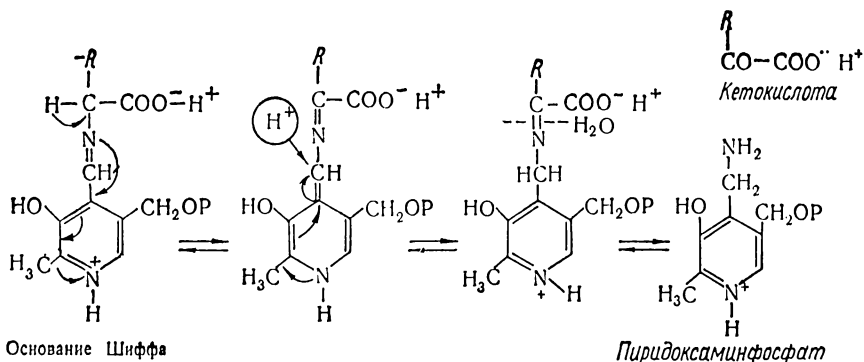
В случае расслабления и разрыва α -связи, в результате чего происходит отрыв протона, имеет место такое распределение элект-

ронной плотности:



Приблизительно такое же распределение зарядов имеют и другие переходные основания.

Как видно, свободные валентности атомов углерода (в цепи С_{альд}-N_{амин}-С_а вне кольца) очень велики, и это делает их более высоко реакционноспособными к атаке электрофильных атомов, групп. В результате к этим атомам присоединяются протоны. Если протон акцептируется на С_а, то происходит рацемация. При присоединении протона к углероду альдегидной группы происходит гидролиз и образуется аминокислота и пиридоксамин, т. е. имеет место переаминирование.



Таким образом, в ферментативном пиридоксальном катализе важная роль принадлежит переходному основанию, которое приобретает сильную электронную активацию и способность легкого участия в реакции.

У многих ферментов активный центр состоит из групп, роль которых выполняют боковые цепи ряда аминокислотных остатков полипептидной цепи белка-фермента. Среди таких ферментов наиболее полно изученными являются рибонуклеаза, химотрипсин, ацетилхолинэстераза и др. С помощью рентгеноструктурного анализа структура химотрипсина расшифрована с разрешением 2 Å (рис. 109). Активный центр фермента состоит из остатка серина 195 и гистидина 57. Вблизи от гистидина 57 расположена концевая NH₃⁺-группа, которая, видимо, взаимодействует с карбоксильной

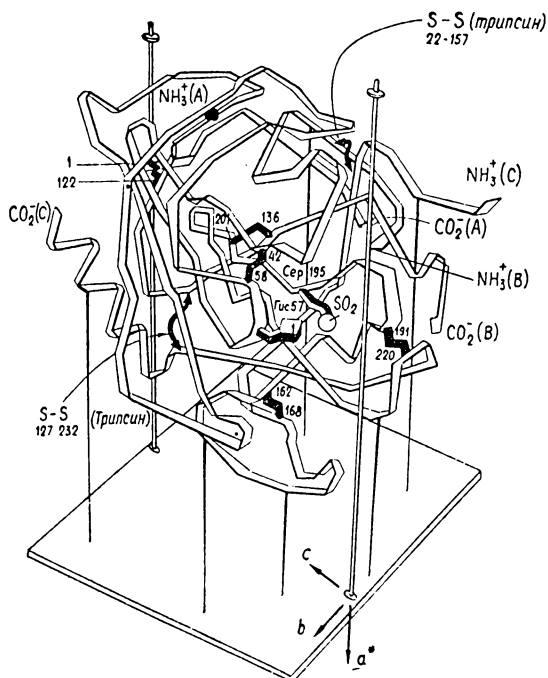
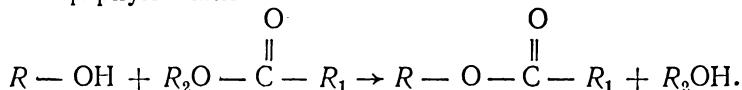


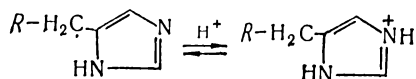
Рис. 109. Структура химотрипсина, установленная на основе данных рентгено-структурного анализа при разрешении 2 Å (по Блоу).

группой аспарагина 194. Стабильность молекулы белка-фермента обеспечивается силами дисульфидных и водородных связей.

Химотрипсин катализирует гидролиз пептидной и эфирной связей. При этом сначала образуется промежуточное соединение — ацилфермент. При этом от эфира отщепляется спирт, а кислотный остаток с гидроксилом серина активного центра химотрипсина образует эфирную связь:



Затем активируется молекула воды и кислотный остаток отщепляется от серина. В этом процессе важную роль выполняет гетероцикл гистидина — имидазол, который, как известно, способен легко отдавать протон и отрывать его от других соединений, в том числе и содержащих гидроксильную группу.



Возможно, поэтому гистидин входит в состав активных центров ряда ферментов (ацетилхолинэстераза, трипсин, химотрипсин и др.).

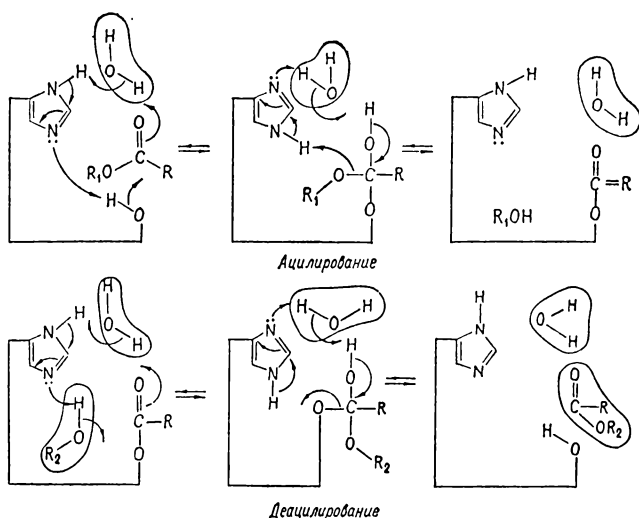


Рис. 110. Механизм действия химотрипсина (по Малеру и Кордесу).

бонуклеаза и др.). Химотрипсин на рибосоме образуется в виде неактивного белка химотрипсиногена, состоящего из 245 аминокислотных остатков. При образовании третичной структуры в молекуле фермента возникает пять дисульфидных мостиков. При отщеплении от химотрипсиногена трипсином четырех аминокислотных остатков образуется активный химотрипсин. В химотрипсине имеется небольшой спирализованный участок, состоящий из восьми аминокислотных остатков. Активный центр фермента образуется в результате свертывания полипептидной цепи таким образом, что пространственно совмещенными оказываются два остатка гистидин в 57 и 195 положениях и аспарагиновая кислота в 102 положении.

Механизм действия химотрипсина (трипсина) на эфиры может быть представлен таким образом (рис. 110). Если химотрипсином (трипсином) расщеплять нитрофенилацетат, то гидроксильная группа серина устойчиво ацилируется, и, таким образом, фермент теряет активность. Фермент становится активным только после деацилирования.

Гидролиз пептидной связи начинается также с переноса ацильной группы на серин, а затем происходит расщепление ацил-фермента как промежуточного соединения. Модель этого процесса показана на рис. 111. При этом гидроксил серина и имидазол вступают в реакцию с пептидной связью (а). Возникает связь между карбонильной группой пептидной связи и гидроксилом серина. Это сопровождается переносом протона с гидроксильной группы серина на азот гистидина. Связь между углеродом и азотом пептида ослабевает и разрывается. Протон от имидазола переносится на азот N-концевой аминокислоты (б). При этом имидазол находится в иной

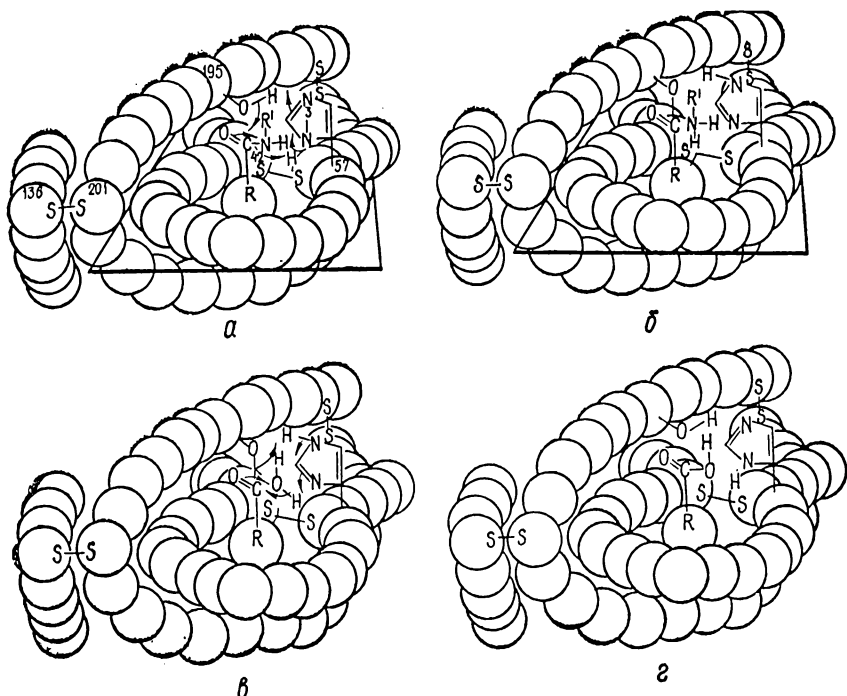


Рис. 111. Модель α -химотрипсина, построенная на основе последовательности аминокислот:

а — гидроксил серина и имидазол вступают в реакцию с пептидной связью; *б* — протон от имидазола переносится на азот N-концевой аминокислоты; *в* — молекула воды взаимодействует с сериновым эфиром; *г* — C-концевая часть пептида отделяется.

таутомерной форме, т. е. водород связан с азотом в положении 3. Молекула воды взаимодействует с сериновым эфиром (*в*). Образуется связь кислород — углерод, а эфирная связь серина разрывается. Для восстановления гидроксильной группы серина используется водород в положении 3 имидазола. Атом водорода из воды переходит к азоту в положение 1 имидазольного кольца гистидина. C-Концевая часть пептида ($R - COOH$) отделяется (*г*).

Активный центр фермента находится в свободном состоянии и начинается новый цикл реакций расщепления пептидной связи. Хорошо изучен механизм действия других ферментов (рибонуклеаза, лизоцим, ацетилхолинэстераза и др.).

Таким образом, экспериментальные данные, которые получены до сего времени по изучению механизма действия ферментов показывают, что биокатализ осуществляется следующим образом. Активный центр фермента взаимодействует с субстратом. Образуется фермент-субстратный комплекс. Под влиянием субстрата в активном центре наступают конформационные изменения. В молекуле субстрата происходит деформация некоторых связей при взаимодействии с ферментом. В непосредственной близости к связи, кото-

рая разрывается в процессе катализа, находятся высокореакционноактивные группы — боковые цепи фермента.

Важнейшим в биокатализе остается вопрос о снижении энергии активации. Снижение энергии активации является следствием изменения конформации молекулы белка-фермента. При этом снижение энергии активационного процесса протекает без изменения энтропии белка-фермента.

Все это приводит к возникновению различного состояния между белком-ферментом и его активным центром. После присоединения субстрата создается неравновесная система. В результате этого в молекуле субстрата соответствующая связь удлиняется, разрывается и наступает релаксация молекулы белка-фермента, т. е. ее возвращение к равновесному состоянию. Остается не совсем ясным, откуда берется энергия, за счет которой осуществляется релаксация. Возможно, что источником этой энергии является часть энергии, которая выделяется при разрыве соответствующей связи в молекуле субстрата.

Механизм действия ферментов интенсивно изучается. Применение методов рентгеноструктурного анализа и радиоспектроскопии в сочетании с использованием субстратов и ингибиторов позволяет получить надежные сведения о механизме ферментативного катализа. Уже выяснено строение активных центров многих ферментов. Определены группы, атомы и радикалы, которые ответственны за осуществление специфических реакций.

В состав активных центров изученных до сего времени ферментов часто входят такие боковые группы полипептидной цепи, как остатки аспарагина, гистидина, серина, цистеина, глутамина, лизина, метионина, а также С- и N-концевые группы, аминокислотные остатки. При этом в основе взаимодействия функциональных атомов и групп лежат процессы нуклеофильного и электрофильного или кислотно-щелочного катализа.

4. Авторегуляция биологического катализа и управление клеточной функцией. Саморегуляция биологических систем осуществляется в основном с помощью белков, которые способны воспринимать изменения во внутриклеточной и внешней среде. В результате этого в макромолекуле белка возникают структурные и конформационные перестройки, которые обуславливают изменение ее активности, самонастройку и участие в регуляции метаболизма живой системы. Самонастройка более четко выражена у активных белков, в частности, обладающих каталитическими свойствами. Такие белки с помощью высокочувствительных участков в их молекуле способны воспринимать химический или другой сигнал, т. е. информацию, и преобразовывать ее в регуляторный эффект. Последний реализуется генетическим или метаболическим путем. В результате этого биологическая система, благодаря самонастраивающимся белкам-ферментам, собирает информацию о биохимической и биофизической обстановке в клетке. Затем в соответствии с требованиями внешней и внутренней среды определяются

генетические и метаболические возможности, которые должны быть реализованы для достижения максимальной экономии обмена веществ и энергии в организме.

Таким образом, с помощью белков устанавливаются в биологической системе информационные связи между химически несвязанными и несвязуемыми процессами. Например, белок-апорепрессор имеет два рецепторных участка, одним из которых узнает оператор и связывается с ним. Другой служит для взаимодействия с метаболитом, гормоном, биологически активным соединением или другими эффекторами. Взаимодействие белка-апорепрессора с эффекторами изменяет его конфигурацию, а отсюда и сродство к оператору. После этого становится возможным взаимодействие белка-апорепрессора с оператором, что ведет к изменению в реализации генетической информации.

Из многих соединений в клетке только белки и нуклеиновые кислоты являются информационными макромолекулами, так как в последовательности нуклеотидов и аминокислот заложена определенная структурная или функциональная информация.

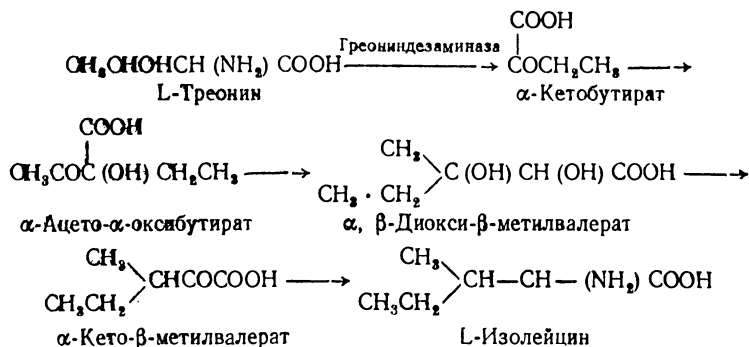
Полисахариды и липиды не несут информации, так как построенные из одинаковых повторяющихся мономеров.

Явление самонастройки белков-ферментов выработалось в эволюции как важное средство регуляторных механизмов живой клетки и ее адекватной ответной реакции на внешнее воздействие. Клетка как единица биологической активности обладает способностью к самоорганизации, которая проявляется в самовоспроизведении, самосборке и саморегуляции. При этом все процессы в клетке подчинены принципу максимальной экономии вещества и энергии, что достигается с помощью специфических белков-катализаторов вырабатываемых самой клеткой.

Регуляция биокатализа в клетке осуществляется с помощью сложных мультиферментных систем, которые катализируют важнейшие реакции.

Существует три типа мультиферментных систем. Первый тип — когда мультиферментная система растворена и диссоциирована в цитоплазме. Ферменты работают независимо друг от друга. Промежуточные соединения находят свой фермент путем диффузии. Более высокоорганизованная мультиферментная система представляет собой устойчивый комплекс из тесно связанных между собой нескольких разных ферментов. При диссоциации такого комплекса составляющие его ферменты теряют активность. Наконец, к третьему более высокоорганизованному типу мультиферментных систем относятся комплексы ферментов, связанных с надмолекулярными структурами — мембранами. Процессы и реакции с помощью мультиферментных систем протекают с большей скоростью и в строго определенном направлении и последовательности. Мультиферментные системы саморегулируют скорость всех реакций многоступенчатого процесса. При этом регулятором выступает, как правило, конечный продукт цепи реакций.

Метаболиты, выполняющие функцию регуляторов активности ферментов, называются *эффекторами*. В их роли могут выступать разные малые молекулы, в том числе и конечный продукт цепи реакций. Если содержание последнего превышает определенную концентрацию, то срабатывает механизм ингибирования по принципу обратной связи. Конечный продукт подавляет активность фермента, катализирующего превращение субстрата, и изменяет скорость всего многоступенчатого процесса. Таким образом, скорость всего процесса регулируется концентрацией конечного продукта. Примером такой саморегуляции в мультиферментной системе может служить превращение *L*-треонина в *L*-изолейцин. Изолейцин специфично



ингибирует активность треониндеаминазы, тогда как другие аминокислоты и близкие по химическому строению соединения не подавляют активности этого фермента. Как правило, в саморегулирующихся ферментных системах подавляется активность фермента, катализирующего первую реакцию. Этот фермент называют *регуляторным*, или *аллостерическим*. Аллостерическое регулирование активности фермента осуществляется эффекторами, т. е. соединениями, которые имеют иную структуру и свойства по сравнению с субстратами, кофакторами и иногда с продуктами реакции.

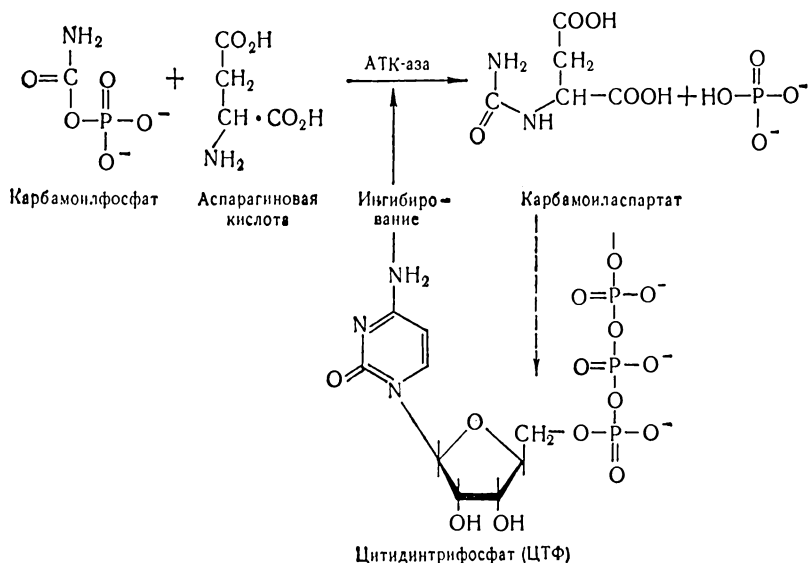
Регуляторный фермент может катализировать также первую реакцию, которая находится в месте разветвления многоступенчатого процесса. Регуляторные ферменты отличаются более сложным строением и их молекулы состоят больше, чем из одной полипептидной цепи. Регуляторные ферменты называют гомотропными, когда их активность контролируется концентрацией субстрата. В этом случае субстрат является также и эффектором и повышает активность фермента. Гомотропные регуляторные ферменты имеют не менее двух участков в своей молекуле для связывания субстрата. Один из этих участков является каталитическим центром. Гетеротропными ферментами называются такие, активация и ингибирование которых определяется действием не субстрата, а других специфических эффекторов. Некоторые регуляторные ферменты относятся одновременно к гомо- и гетеротропным; их активность зависит как от субстрата, так и от действия других эффекторов.

Гетеротропные ферменты имеют кроме каталитического центра для взаимодействия с субстратом еще один центр на некотором удалении для связывания эффектора.

В рассмотренном выше примере треониндеаминаза имеет два центра: один для связывания с субстратом — треонином, а другой для взаимодействия с конечным продуктом — изолейцином. Мультиферментные системы являются самоорганизующимися системами. Например, система синтеза жирных кислот состоит из семи различных ферментов, каждый из которых состоит из трех полипептидных цепей. Если 21 полипептидная цепь, из которых состоит мультиферментная система, находится в собранном виде, то она проявляет активность. В диссоциированном состоянии активность утрачивается. Таким образом, ассоциация субъединиц в комплексе является одним из условий выполнения биологической функции на основе информации, которая поступает от трехмерной конформации каждой полипептидной цепи; от характера взаимодействия между тремя цепями в каждом из семи ферментов; от взаимодействия между всеми семью ферментами. Гетеротропные регуляторные ферменты имеют центр для взаимодействия с эффектором. Его называют *центром аллостерической регуляции активности фермента*.

Эффекторы имеют иное структурное строение, чем субстрат, поэтому они не взаимодействуют с активным центром фермента и не являются его конкурентным ингибитором.

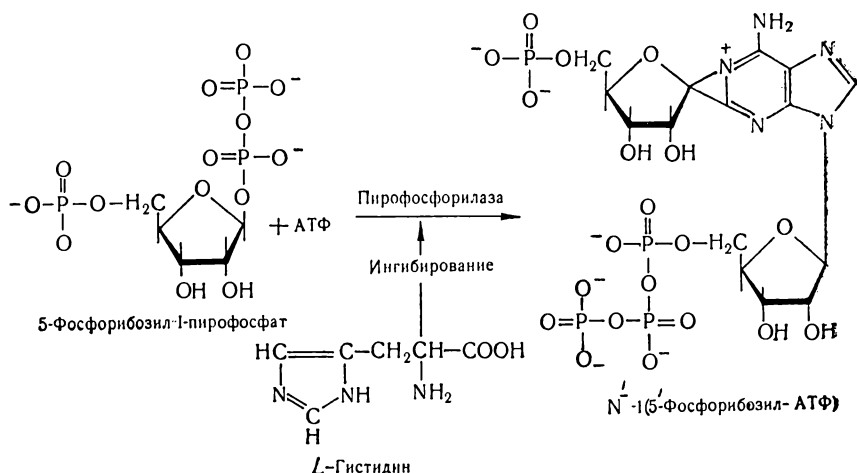
Механизм аллостерической регуляции активности ферментов интенсивно изучается. Эти ферменты отличаются тем, что представлены крупными молекулами, состоящими из отдельных субъединиц. Поэтому они очень трудно выделяются в чистом виде и поддаются изучению. Наиболее изученным ферментом с аллостери-



ческим регулированием активности является аспартаткарбамоил-трансфераза (АТК-аза) или аспартаттранскарбамилаза. Она является первым ферментом цепи реакций биосинтеза пиримидинов и нуклеотидов из аспарагиновой кислоты. Ее активность регулируется цитидинтрифосфатом (ЦТФ). Этот фермент представлен глобулярным белком с молекулярной массой $3 \cdot 10^5$. При действии на него солями ртути или нагреванием происходит диссоциация АТК-азы на восемь субъединиц с молекулярной массой $9,6 \cdot 10^4$ и $3 \cdot 10^4$. Однако в диссоциированном состоянии активность фермента возрастает. Оказалось, что большая субъединица несет только каталитический центр фермента и не ингибируется ЦТФ. Наоборот, малая субъединица не имеет каталитического центра, но взаимодействует с ЦТФ с помощью центра аллостерического регулирования активности АТК-азы.

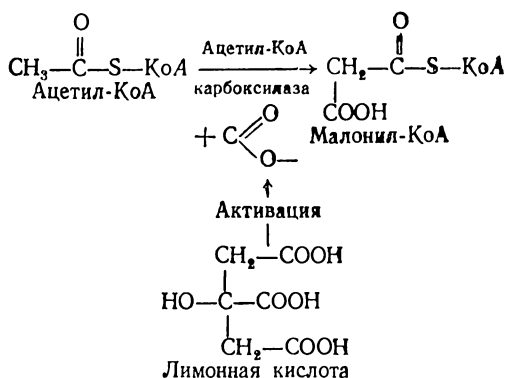
Процесс связывания ЦТФ с малой субъединицей АТК-азы легко прослеживается по поглощению в области 298 нм, соединенным с белком. Если смешать малые и большие субъединицы в присутствии SH-соединений (меркаптоэтанол), то восстанавливается способность АТК-азы взаимодействовать с субстратом и ингибитором. Происходит самоорганизация молекулы аспартаттранскарбамилазы, она реконструируется и приобретает каталитические и регуляторные свойства. Из этого следует, что в состав молекулы АТК-азы входит два различных активных белка. В нативном состоянии они выполняют биохимическую функцию АТК-азы.

Аллостерическим ингибированием регулируется также активность фосфорибозил-АТФ-пирофосфорилазы, которая активирует первую реакцию в процессе биосинтеза гистидина. И в этом случае активность фермента подавляется конечным продуктом (гистидин), который не имеет структурного и химического сродства с исходными продуктами (5-фосфорибозил-1-пирофосфат и АТФ):



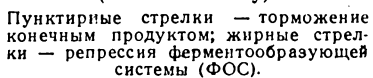
Пирофосфорилаза при нагревании также теряет способность взаимодействия с ингибиторами, а каталитические свойства сохраняются. Однако при этом не происходит диссоциации молекулы фермента на субъединицы. Поэтому в данном случае потеря активности пирофосфорилазы при нагревании объясняется наступлением конформационных изменений в белке этого фермента. Из этого следует, что пока остается не совсем ясным механизм аллостерической регуляции активности ферментов.

К числу примеров аллостерического регулирования каталитической активности может быть отнесена реакция карбоксилирования ацетил-КоА карбоксилазой:



Ацетил-КоА-карбоксилаза выделена в чистом виде. Молекулярная масса, установленная центрифугированием, составляет $1 \cdot 10^8$. При диализе против хлористого натрия в *трис*-буфере диссоциирует на неактивные субъединицы. В присутствии цитрата эти субъединицы ассоциируют и восстанавливается активность фермента. Фермент в неактивной форме имеет частицы с диаметром не более 100—300 Å и константой седimentации 20s. В активном состоянии в присутствии лимонной кислоты частицы фермента представлены в виде нитей с диаметром до 400 Å, константой седimentации 46s, длиной 70—100 Å. Таким образом, регуляция активности ацетил-КоА-карбоксилазы осуществляется изменением структурной организации ее молекулы. Это, в свою очередь, определяет направление метаболизма в сторону биосинтеза или жиров или углеводов.

Значение саморегуляции биологического катализа (рис. 112) можно проиллюстрировать также на обмене нуклеотидов. Как видно, аденозин-5-фосфат синтезируется превращением гуанозин-5-фосфата через инозин-5-фосфат и аденилосукцинат. Аденозин-5-фосфат фосфорилируется, образуется АТФ. Но АТФ тормозит первую реакцию этого процесса — превращение гуанозин-5-фосфата в инозин-5-фосфат. Далее, гуанозин-5-фосфат возникает из инозин-5-фосфата через ксантозин-5-фосфат. Но гуанозин-5-фосфат подавляет фермент, активирующий окисление инозин-5-фосфата в



Явление саморегуляции активности биомакромолекул, по-видимому, имеет широкое распространение. Оно достаточно хорошо изучено также на макромолекуле ДНК. Как известно, часть молекулы ДНК выполняет функцию синтеза информационных РНК. Но эта активность и функция ДНК контролируются нуклеотидными

последовательностями в ней, которые выполняют роль оператора и регуляторную функцию. Выходит, что в биологически активных макромолекулах одна часть выполняет определенную функцию, а вторая — является регулятором этой функции. Видимо, этим можно объяснить, что молекулы многих ферментов, особенно тех, которые имеют четвертичную структуру, значительно крупнее, чем их субстрат. Это вызвано тем, что в молекуле фермента может быть несколько регуляторных центров, каждый из которых получает информацию и взаимодействует с определенным эффектором. В результате возникает сигнал, импульс, который реализуется изменением четвертичной структуры белковой молекулы и ее функциональной активности.

Молекулы ферментов четвертичной структуры со многими регуляторными центрами способны собирать через соответствующие эффекторы большой объем информации. Поэтому, как правило, катализируют наиболее узловые, важные реакции и процессы, стоящие или в начале, или на разветвлении, или сопряжении различных путей метаболизма. Это обеспечивает регулирование всего метаболического цикла.

Но регуляторные центры, видимо, должны быть и у более просто устроенных ферментов, входящих в мультиферментные системы. В этом случае наличие регуляторных центров вызвано необходимостью узнавания соседних ферментов в общем полиферментном комплексе. Поэтому каждый фермент мультиферментной системы занимает строго определенное свое место. Например, белок цитохрома *c* имеет кислую, а цитохромоксидазы — щелочную реакцию. Химическое сродство определяет их положение и взаимодействие в электротранспортной цепи дыхательного процесса окисления субстрата. Таким образом, фермент выступает как самонастраивающаяся система. Его каталитическое действие определяется специальными участками, с помощью которых он узнает биохимическую обстановку в клетке и автоматически включается во взаимодействие с субстратом.

Самонастройка фермента, по-видимому, является одним из условий согласованности в течении многочисленных реакций и процессов в клетке. Активность ферментов регулируется изостерически — изменениями непосредственно в каталитическом центре и аллостерически, когда изменения происходят в регуляторном центре. Такое деление ферментов носит условный, временный характер, так как, видимо, будут обнаружены у всех белков-ферментов центры регуляции их каталитической функции. На основе наличия регуляторных центров у ферментов становится понятным явление их изоморфности. Как известно, в одном и том же организме один и тот же фермент может быть представлен различными формами (изозимами, изоферментами), которые активируют одну и ту же химическую реакцию, но имеют различное строение своей молекулы. Это объясняется тем, что изозимы имеют одинаковый каталитический центр и отличаются регуляторными участками.

Взаимодействие регуляторных участков с эффекторами (продукт реакции, биологически активное соединение и др.) обуславливает различные конформации в молекуле различных белков изоферментов. В результате этого изоэтимы одного организма, локализованные в различных тканях или частях клетки, в различной степени активизируются или тормозятся одним и тем же эффектором. Примером может быть различная степень торможения лактатдегидрогеназы продуктом реакции — пируватом; малатдегидрогеназы-щавелевоуксусной кислотой и т. д.

В основе аллостерической регуляции активности белков-ферментов лежит наличие разнообразия в них функциональных групп и различный характер их взаимоположения и взаимодействия. Боковые группы полипептидной цепи, представленные различными аминокислотными остатками, имеют различную структуру, химические и физические свойства. Кроме этого, аминокислотные остатки различно ориентированы друг по отношению к другу, по-разному стабилизированы в полипептидной цепи и имеют различную пространственную ориентацию. Все это обуславливает уникальную конформацию белковой молекулы, ее способность к узнаванию и к специфическим, разнообразным химическим реакциям. Функцию аллостерического фермента можно рассмотреть на примере гемоглобина, который состоит из двух α - и двух β -цепей. Функциональная субъединица при этом состоит из одной α - и одной β -цепи. Присоединение молекулы кислорода к α -цепи вызывает в ней конформационные изменения, которые, в свою очередь, вызывают изменение конформации и β -цепи, что приводит к повышению ее сродства и соединению гема с кислородом. Насыщение кислородом одной функциональной субъединицы ($\alpha\beta$) вызывает затем изменения конформации в α - и β -цепях второй субъединицы и связывание их с кислородом. Таким образом, все четыре гема молекулы гемоглобина соединяются с кислородом, и он переходит в оксигемоглобин. Четвертичную структуру имеют, видимо, не только сложные белки-ферменты, но и другие белки, состоящие из различных полипептидных цепей, которые кодируются различными последовательностями ДНК.

В основе самонастройки, авторегуляции биологического катализа лежит способность белков узнавать различные эффекторы, получать от них информацию, перерабатывать ее, осуществлять взаимодействие с различными молекулами. Можно считать, что у белковой молекулы шире и в большей степени представлена способность узнавания и специфического взаимодействия, чем ее каталитические свойства.

Каков же механизм действия аллостерических эффекторов? Каким образом они тормозят или активируют действие ферментов? Молекула аллостерического фермента разделена на функционально различные единицы. Одни из них выполняют роль каталитических центров. Другие взаимодействуют с веществами эффекторами, выполняют роль рецепторов и являются регуляторными

центрами активности фермента. Регуляторных центров может быть несколько. Причем каждый из них специфичен для определенного эффектора, особенно в тех случаях, когда в роли последних выступают соединения с различной структурой и свойствами. Каким образом при аллостерическом ингибировании один центр, расположенный в одной части молекулы белка-фермента, оказывает влияние на другой, расположенный от него на определенном удалении? Это может происходить только через изменения третичной и четвертичной структуры белковой молекулы. В результате этого изменяется положение и ориентировка в пространстве активного центра и его связь с субстратом.

Это определяется конформационными изменениями белковой молекулы. Например, такие изменения наступают в белке фосфоорилазы при ее взаимодействии с АМФ и АТФ. При взаимодействии АМФ с центром аллостерического регулирования в молекуле фосфоорилазы наступают конформационные изменения, в результате активный центр фермента взаимодействует с гликогеном, который расщепляется на глюкозо-1-фосфат. Наоборот, при взаимодействии аллостерического центра фосфоорилазы с АТФ происходят иные конформационные изменения, и процесс расщепления гликогена подавляется. Как правило, субстрат и ингибитор оказывают противоположное действие на четвертичную структуру белка-фермента.

Установлены также с помощью рентгеноструктурного анализа изменения третичной структуры, наступающие в субъединицах молекулы гемоглобина в процессе присоединения к нему кислорода.

Таким образом, ферменты как самонастраивающиеся системы являются важнейшими факторами регуляции метаболизма клеточной функции, выполнение которой основывается на координации многочисленных реакций во времени и пространстве. Регуляция клеточной функции на уровне ферментов осуществляется с помощью контроля их биосинтеза и активности. Количество синтезируемого фермента определяется генетическими факторами, а его активность другими условиями в клетке. Например, активность фермента зависит от количества субстрата; наличия кофактора и его состояния (окисленная и восстановленная формы и т. д.); от связи с определенными клеточными структурами, мембранами; от конформации молекулы фермента и его доступности субстрату и т. д.

Более чувствительной является регуляция активности фермента. Изменение активности основано на прямом воздействии на фермент и поэтому осуществляется в более короткое время. Это обеспечивает быструю ответную реакцию и регуляцию метаболических процессов. Регуляция действия ферментов изменением их количества осуществляется на генетическом уровне более сложными и длительными процессами. Регуляция клеточной функции через изменения активности фермента осуществляется особенностями взаимодействия фермента с метаболитами (субстрат, конечный продукт) и мо-

дификацией ферментной активности, изменением самой структуры фермента, образованием ферментных комплексов.

Ферменты действуют в условиях структурной клеточной организации. Поэтому даже те ферменты, которые по современным представлениям находятся в клетке обособленно и действуют вне пространственной организации, взаимодействуют с другими белками и образуют комплексы, называемые *микроструктурами*. Например, пируватдегидрогеназный комплекс, который осуществляет окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты, состоит из трех различных белков-ферментов. Эти ферменты взаимодействуют между собой с помощью водородных, дисульфидных и гидрофобных связей. Реакция окислительного декарбоксилирования пирувата осуществляется этим комплексом только тогда, когда составляющие его компоненты прочно связаны между собой.

Изменения ферментативной активности метаболитами занимают важное место в регуляции клеточной функции. Скорость и направление метаболических реакций в большой степени зависят от присутствия субстрата и продукта реакции.

Повышение концентрации субстрата вызывает повышение активности ферментативной реакции. Накопление определенного количества продукта реакции, как правило, тормозит каталитическую активность фермента.

В случае же, когда процесс состоит из цепи реакций и когда продукт одной реакции является субстратом второй, накопление определенного количества конечного продукта обуславливает, по принципу обратной связи, торможение фермента, катализирующего первую реакцию, приостанавливая весь процесс.

В этих случаях мы имеем пример аллостерического ингибирования, или ретроингибирования. Регуляция клеточного метаболизма на основе изменения количества белка-фермента осуществляется на генетическом уровне, т. е. на уровне транскрипции. Биосинтез нового белка-фермента при этом регулируется на основе индукции и репрессии в реализации генетической информации. В этом случае малые молекулы вызывают не изменение активности фермента, а оказывают определенное влияние на соответствующий участок нуклеотидной последовательности ДНК, который определяет биосинтез того или иного белка.

Наиболее полное объяснение механизма регуляции биосинтеза нового белка-фермента дано на основе уже рассмотренной выше гипотезы оперона, сформулированной Ф. Жакобом и Д. Моно. Изменение количества белка-фермента может осуществляться и на рибосомном уровне (трансляции), т. е. на уровне регуляции самих процессов биосинтеза белка. В этом случае факторами регуляции является количество специфических транспортных РНК, число и активность рибосом и др.

Как видно, малые молекулы — метаболиты выступают в клетке в роли регуляторов биологического катализа либо ингибиторов активности фермента по принципу обратной связи, либо репрессоров

биосинтеза белка-фермента, который активирует субстрат определенного метаболического пути, т. е. продукты ферментативных реакций, метаболиты, регулируют скорость этих реакций и свой собственный биосинтез, оказывая влияние на поведение и функцию клетки. Таким образом, ферменты как самонастраивающиеся системы являются важнейшими средствами авторегуляции метаболизма и клеточной функции.

Список литературы

- Бернхард С. Структура и функция ферментов. М., «Мир», 1971.
Блюменфельд Л. А. Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода. Изд-во «Сов. Наука». М., 1957.
Волькенштейн М. В. Молекулы и жизнь. М., Изд-во АН СССР, 1964.
Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., «Мир», 1966.
Дегли С., Никольсон Д. Регуляция обмена веществ.— В кн.: Метаболические пути. М., «Мир», 1973.
Леви А., Сикевич Ф. Структура и функция клетки. М., «Мир», 1971.
Механизм и кинетика ферментативного катализа. (Сборник). М., Изд-во АН СССР, 1964.
Нейландс Д. ж., Штумпф П. Очерки по химии ферментов. М., Изд-во иностр. лит., 1958.
Сикевич Ф. О значении внутриклеточной структуры для регуляции обмена. В кн.: Регуляция клеточного обмена. М., Изд-во иностр. лит., 1962.
Ферменты. (Сборник). М., «Наука», 1964.
Чанс Б. Количественная сторона регуляции дыхания. В кн.: Регуляция клеточного обмена. М., Изд-во иностр. лит., 1962.
Brady R. O., Gurin S. J. Biol. Chem., 199, 421, 1952.
Dixon M. Multienzyme Systems. London. New York, Cambridge Univ. Press, 1949.
Koshland D. E. Advances Enzymol., 22, 45, 1960.
Lypen F. Biochem. J., 102, 381, 1967.
Stadtman E. R. Allosteric Regulation of Enzyme Activity. In: Advances Enzymology, New York, Interscience Publishers, Inc. 28, 41, 1966.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3

Часть первая

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОНИМАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Г л а в а I.	Электронная структура атомов и молекул в связи с их ролью в биологических системах	10
	1. Электронная структура атомов	11
	2. Взаимодействие между атомами	15
	3. Смещение электронов	33
	4. Господствующее положение элементов 2 и 3 периодов таблицы Д. И. Менделеева в биологических системах	35
	<i>Список литературы</i>	41
Г л а в а II.	Физико-химические особенности дисперсионной среды биологических систем	42
	1. Электронная структура воды	42
	2. Физические и химические свойства воды в связи с ее ролью в биологических системах	46
	3. Растворяющая способность воды	49
	4. Диссоциирующая способность воды	52
	5. Роль воды в переносе зарядов	56
	<i>Список литературы</i>	56
Г л а в а III.	Термодинамика биологических систем	59
	1. Первый закон термодинамики	60
	2. Второй закон термодинамики	61
	<i>Список литературы</i>	75

Часть вторая

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ЖИЗНИ

Г л а в а IV.	Малые молекулы в биологических системах	77
	1. Соединения углерода и некоторые их свойства	77
	2. Углеводы	80
	3. Макроэргические соединения	84
	4. Липиды	86
	5. Роль липидов в образовании клеточных структур	94
	6. Химическая эволюция и биохимическая универсальность	99
	<i>Список литературы</i>	105

Г л а в а V.	Нуклеиновые кислоты, их структура и функции	106
	1. Химическое строение нуклеиновых кислот	107
	2. Электронная структура мономеров нуклеиновых кислот	115
	3. Макромолекулярная структура нуклеиновых кислот	123
	4. Некоторые физико-химические свойства нуклеиновых кислот	141
	5. Процессы денатурации и ренатурации нуклеиновых кислот	145
	6. Реакции присоединения и замещения у нуклеиновых кислот	156
	7. Определение первичной структуры нуклеиновых кислот	161
	8. Выделение, фракционирование и определение нуклеиновых кислот	165
	9. Репликация и биосинтез ДНК	170
	10. РНК-зависимый биосинтез ДНК	179
	11. Биосинтез РНК	181
	12. ДНК-зависимый биосинтез РНК	182
	13. РНК-зависимый синтез РНК	191
	14. Полинуклеотидфосфорилаза	193
	15. Ферментативный гидролиз нуклеиновых кислот	196
	16. Биологические функции нуклеиновых кислот	202
	17. Регуляция биосинтеза белков	276
	<i>Список литературы</i>	287
Г л а в а VI.	Структура и функции белков	289
	1. Структура белковых молекул	291
	2. Некоторые физико-химические свойства белков	333
	3. Функции, выполняемые белками	340
	<i>Список литературы</i>	342
Часть третья		
ПРОБЛЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ		
Г л а в а VII.	Молекулярные механизмы сборки биологических структур	350
	1. Самосборка биологических структур	352
	2. Опосредованная сборка биологических структур	358
	3. Направленная сборка биологических структур	360
	<i>Список литературы</i>	362
Г л а в а VIII.	Мембрана как универсальная элементарная структура клетки	362
	1. Типы мембран	363
	2. Структурная организация мембран	365
	3. Функции, выполняемые мембранами	375
	<i>Список литературы</i>	391
Г л а в а IX.	Механохимические преобразования и биологическое движение	392
	1. Ультраструктура и функция мышечного волокна	393
	2. Структура и функция сократительных белков	397
	3. Механизм мышечного сокращения	402
	4. Энергетика мышечного сокращения	407
	5. Элементарные механохимические преобразовательные системы	409
	<i>Список литературы</i>	417

Г л а в а X.	Восприятие, преобразование и использование энергии биологическими системами	418
	1. Образование доноров электронов	425
	2. Цепь переноса электронов	428
	3. Образование соединений с макроэргическими связями . .	432
	<i>Список литературы</i>	447
Г л а в а XI.	Биологический катализ и регуляция клеточной функции	447
	1. Роль ферментов в биокатализе	447
	2. Фермент-субстратный комплекс и кинетика ферментативного катализа	457
	3. Механизм действия ферментов	459
	4. Авторегуляция биологического катализа и управление клеточной функцией	471
	<i>Список литературы</i>	482

Федор Леонтьевич Калинин

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Киев, Головное издательство
издательского объединения «Вища школа»

Редактор *Н. И. Ромась*
Обложка художника *Г. М. Балюна*
Художественный редактор *Е. Н. Прокофьев*
Технические редакторы *Н. А. Шалагина, Л. Ф. Волкова*
Корректор *Т. А. Левицкая*

Информ. бланк № 605

Сдано в набор 29.03.77. Подп. в печать 4.04.78. БФ 08704. Формат 60×90¹/₁₆.
Бумага типогр. № 2. Лит. гарн. Выс. печать. 30,5+0,25 (форз.) печ. л.
34,46+0,40 (форз.) уч.-изд. л. Тираж 7000 экз. Изд. № 2577. Зак. № 7—1414.
Цена 1 р. 30 к.

Головное издательство издательского объединения «Вища школа», 252054,
Киев-54, ул. Гоголевская, 7.

Отпечатано с матриц Головного предприятия республиканского производ-
ственного объединения «Полиграфкнига» Госкомиздата УССР, г. Киев,
Довженко, 3 в Киевской книжной типографии научной книги, Киев, ул.
Репина, 4. Зак. 8-516.

ИЗДАТЕЛЬСКОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ
«ВИЩА ШКОЛА»

Выпущены в 1977 г. для студентов вузов:

Деркач М. П., Гумецкий Р. Я., Чабан М. Е. **Курс вариационной статистики.** Пособие для студентов биологических факультетов университетов. 11 л. Язык украинский.

Мазурмович Б. Н., Коваль В. П. **Практикум по зоологии беспозвоночных.** Пособие для студентов биологических факультетов университетов. 16 л. Язык украинский.

Костюк П. Г. **Физиология центральной нервной системы.** Пособие для студентов биологических специальностей вузов. 25 л. Язык русский.

Харченко П. Д., Чайченко Г. М. **Физиология высшей нервной деятельности.** Пособие для студентов биологических специальностей вузов. 22 л. Язык украинский.

Лыпа А. Л. **Дендрология с основами акклиматизации.** Пособие для студентов биологических специальностей вузов. 13 л. Язык украинский.

Кучеренко Н. Е., Мирутенко В. И. **Основы молекулярной радиобиологии.** Пособие для студентов биологических специальностей университетов. 20 л. Язык украинский.