

учебник для **XXI** века

В. К. Плакунов

ОСНОВЫ
ЭНЗИМОЛОГИИ

ОГЛАВЛЕНИЕ

Федеральная целевая программа
«Государственная поддержка интеграции высшего образования
и фундаментальной науки на 1997—2000 годы»

В.К. Плакунов

ОСНОВЫ ЭНЗИМОЛОГИИ

*Допущено Министерством образования Российской Федерации
в качестве учебного пособия для студентов высших учебных
заведений, обучающихся по направлениям подготовки бакалавров и
магистров «Биология», «Экология и природопользование», «Химическая
технология и биотехнология», и направления подготовки дипломированных
специалистов «Биология», «Физиология», «Микробиология»,
«Биотехнология», «Биоэкология»*

Москва • 2001
«Логос»

УДК 577
ББК 28.072
ПЗ7

Рецензенты:
Доктора биологических наук
профессора *И.М. Грачева* и *Д.Г. Звягинцев*

В.К. Плакунов

ПЗ7 Основы энзимологии. — М.: Логос, 2001. — 128 с.: ил.
ISBN 5-94010-027-9

Рассмотрены основные положения науки энзимологии — биохимии белков-ферментов и других посредников биохимических процессов. Содержит не только общую характеристику ферментативной активности, но и разделы, связанные с регуляцией метаболизма и физиологических функций клеток.

Для студентов вузов. Представляет интерес для научных сотрудников, не получивших фундаментальной биохимической подготовки.

ББК 28.072

Издание осуществлено при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Государственная поддержка интеграции высшего образования и фундаментальной науки на 1999—2000 гг.»

ISBN 5-94010-027-9

© Центр «Интеграция», 2001



Содержание

Предисловие	5
Введение	6
Глава 1. Строение и состав живой клетки	10
1.1. Клеточные стенки и клеточные мембраны	10
1.2. Состав мембранных липидов	12
1.3. Природа и состав жирных кислот в мембранных липидах	17
Глава 2. Понятие о компертментации в живой клетке	19
Глава 3. Ферменты — катализаторы биохимических реакций	24
3.1. Общие представления о ферментативном катализе	24
3.2. Сравнение химического и ферментативного катализа	26
3.3. Методы изучения специфичности ферментов	28
3.4. Природа связей между молекулами фермента и субстрата	30
3.5. Принципы классификации и номенклатуры ферментов	30
Глава 4. Кинетика действия ферментов	32
Глава 5. Ингибирование ферментов	37
Глава 6. Принципы биоэнергетики	39
6.1. Пути и механизмы преобразования энергии в живых системах	39
6.2. Классификация энергетических процессов	40
6.3. Роль АТФ и ТЭП в запасании энергии	41
6.4. Первичные и вторичные генераторы ТЭП	44
6.5. Энергетический заряд и энергетическая эффективность роста	45
6.6. Основные типы сопряжения энергетических и конструктивных процессов	46
Глава 7. Аэробные энергетические процессы	48
7.1. Аэробное дыхание. Дыхательная цепь	48
7.2. Обратный перенос электронов	50
7.3. Эволюция путей аэробного метаболизма	52
Глава 8. Анаэробные энергетические процессы	54
8.1. Анаэробное дыхание	54
8.2. Брожения	57
Глава 9. Фотосинтез	60
9.1. Основные процессы фотосинтеза, доноры электронов	60
9.2. Путь углерода в фотосинтезе. Цикл Кальвина	61
9.3. Бесхлорофильный фотосинтез	62
9.4. Фоторецепция	63

Глава 10. Процессы конструктивного метаболизма	64
10.1. Взаимосвязь энергетических и конструктивных процессов в клетке	64
10.2. Азотфиксация	67
Глава 11. Регуляция биосинтеза белков на этапе транскрипции ...	70
11.1. Основные определения	70
11.2. Уровни регуляции	71
11.3. Регуляция биосинтеза белков	71
11.4. Особенности процесса репликации	71
11.5. Транскрипция генетической информации	73
11.6. Регуляция процесса транскрипции	74
Глава 12. Регуляция биосинтеза белков на этапе трансляции	84
12.1. Регуляция на этапе биосинтеза и сборки компонентов аппарата трансляции	84
12.2. Регуляция на этапе функционирования аппарата трансляции	88
12.3. Регуляция биосинтеза белков путем посттрансляционной модификации	90
12.4. Регуляция круговорота белков путем избирательного протеолиза	90
Глава 13. Регуляция активности белковых посредников биохимических процессов	93
13.1. Регуляция активности белковых посредников путем их ковалентной модификации	93
13.2. Регуляция активности белковых посредников путем нековалентного взаимодействия с эффекторами	95
13.3. Регуляция активности белковых посредников путем пространственного разобщения и взаимодействия с мембранами	98
Глава 14. Транспорт субстратов и продуктов	100
14.1. Механизмы клеточной проницаемости	100
14.2. Организация транспортных систем	102
14.3. Способы сопряжения транспорта с энергией метаболизма	103
14.4. Регуляция транспортных процессов	105
14.5. Транспорт веществ из клетки в среду: секреция и экскреция	109
Глава 15. Регуляция клеточного деления и скорости роста клеток	112
15.1. Последовательность событий в процессе деления клетки	112
15.2. Накопление критической клеточной массы и репликация ДНК	113
15.3. Построение новой клеточной оболочки	113
15.4. Построение клеточной перегородки	116
15.5. Характер взаимосвязи процессов клеточного деления	117
15.6. Взаимодействие регуляторных механизмов при управлении скоростью роста микроорганизмов	119
Литературв	126



Предисловие

Настоящий учебник посвящен рассмотрению основ энзимологии, т.е. принципов функционирования белковых посредников биохимических процессов — ферментов и других компонентов, осуществляющих катализ реакций, транслокацию и узнавание субстратов.

Понятие «энзимология» в настоящее время расширено в связи с двумя основными обстоятельствами. Во-первых, экспериментальным путем доказано, что ферментативными свойствами обладают не только белки, но и рибонуклеиновые кислоты (так называемые рибозимы). Во-вторых, среди белковых посредников биохимических процессов обнаружены не только ферменты (катализаторы биохимических реакций), но и клеточные компоненты, «узнающие» и «транслоцирующие» (компоненты систем таксиса, транспортных систем и т.д.), которые прямо не катализуют никаких химических реакций. Предметом энзимологии в настоящее время можно считать описание любых посредников биохимических процессов, а в ее задачу входит изучение физических и химических основ функционирования этих посредников и их физиологической роли в живом организме.

Автор старался избегать дублирования прекрасных многотомных учебников по общему курсу биохимии, существующих в настоящее время, многие из которых переведены на русский язык, и для изложения выбрал те разделы биохимии, которые, по его мнению, необходимы для формирования биохимического мышления у читателей, главным образом, студентов химических и микробиологических вузов, специализирующихся в области экологии и биотехнологии. Этим, в частности, объясняется большой удельный вес материалов и множество примеров из области биохимии микроорганизмов, играющих основную роль в биотехнологических процессах.

Немаловажный фактор при выборе материала и, особенно, степени детализации его изложения — представления автора о том, в каких разделах биохимии он считает себя наиболее компетентным.

Материалом для данного учебника послужили лекции по общей биохимии и энзимологии, которые автор длительное время читал в Московской химико-технологической академии им. Д.И. Менделеева и на биологическом факультете Московского государственного университета, где он имел возможность контролировать усвояемость материала и вносить в текст лекций необходимые улучшения и дополнения.



Введение

Предмет и задачи биологической химии. *Энзимология* — это часть биохимии, предметом биохимии являются *живые системы*, а в ее задачу входит изучение *химических основ жизни*, т.е. химического состава и структуры компонентов живых систем, а также природы протекающих в них химических реакций. Главной целью биохимии является не простое описание химических процессов в живых системах, а выяснение взаимосвязи молекулярной структуры и биологической функции.

Очевидно, что *предмет* биохимии — в одном ряду с другими химическими и биологическими науками (биоорганической химией, молекулярной биологией, физиологией и т.д.), изучающими живые системы, тогда как *задачи* перекрываются лишь частично.

Границы между этими науками в настоящее время достаточно условны в некоторых областях, что усиливается применением общих методов исследования (например, методов генетической инженерии). Биохимия составляет *фундамент* этих наук (см. рис. 1).

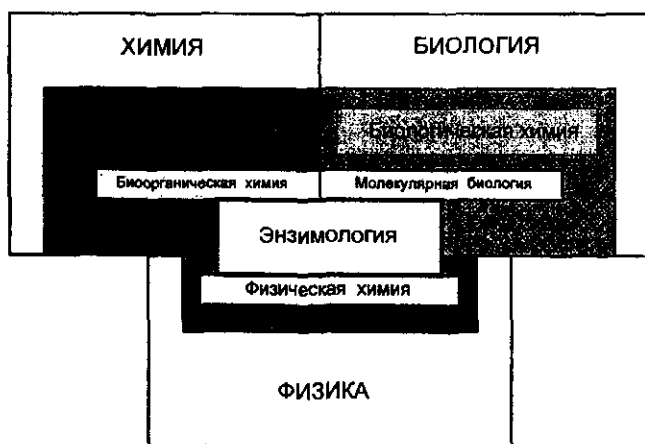


Рис. 1. Схема расположения энзимологии в системе других наук

Основные этапы развития биохимических знаний. Развитие биохимии было невозможно без открытия главных законов природы для неживых систем и изучения фундаментальных основ физики и химии этих систем.

В конце XVIII в. А. Лавуазье и П. Лаплас показали, что основные законы сохранения вещества и энергии справедливы и для биологических объектов.

Выделение химическими методами большого количества новых индивидуальных веществ из живых организмов и установление того факта, что все они содержат углерод, положило начало *органической химии*, основателем которой можно считать Ж. Гей-Люссака, изучившего методом сжигания состав многих углеводов и белков.

В 1824 г. Ф. Вёлер синтезировал щавелевую кислоту, в 1828 г. — мочевины, опровергнув виталистическую точку зрения, что органические вещества могут быть продуктом только живых организмов. Правда, Ф. Хеннель синтезировал этанол до открытий Ф. Вёлера, однако, образующие этанол дрожжи до работ *Л. Пастера* не считались живыми организмами.

В XIX в. И. Берцелиус впервые использовал термин *катализатор* и сформулировал основные принципы катализа, после чего стало ясно, что пepsин слюны, пepsин желудочного сока и амилаза солода являются биологическими катализаторами. К концу XIX в. были достигнуты большие успехи в развитии неорганической, органической и физической химии, сформулированы законы термодинамики, генетические принципы наследственности (Г. Мендель) и получила признание доктрина эволюции (Ч. Дарвин). В начале XX в. Э. Фишер разработал методы выделения мономеров из белков и полисахаридов, установил структуру и оптические конфигурации многих из них, продемонстрировал специфичность действия ферментов и, таким образом, положил начало многим направлениям биохимии. Сам термин *биохимия* был введен в 1903 г. К. Нейбергом.

Однако в первой половине XX в. биохимики уделяли главное внимание малым молекулам (мономерам) и *составу* биополимеров, а *функционирование* биополимеров стало предметом интенсивного изучения лишь в середине и второй половине XX в.

Термин *энзим* был введен в 1870-е годы К. Кюне (от *en zyme* — в закваске) для обозначения компонентов дрожжевой клетки, осуществляющих химические превращения субстратов. *Ферментами* в то время назывались живые микроорганизмы. Однако в русскоязычной научной литературе для обозначения белковых катализаторов термин фермент является более употребляемым в настоящее время.

Вопрос о том, что химические превращения субстратов катализируются определенными веществами, которые могут функционировать как внутри клеток («организованные» ферменты Л.Пастера), так и вне клеток («неорганизованные» ферменты Ю.Либиха и К.Бернара), окончательно был решен в 1897 г. Г. и Э.Бухнерами, осуществившими процесс брожения с помощью экстракта из клеток дрожжей.

Широкое изучение физико-химических свойств ферментов и механизма их функционирования стало возможным только после разработки методов получения ферментов в гомогенном состоянии. Первый индивидуальный кристаллический фермент (уреаза) получен Д.Самнером в 1926 г.

Последующее выделение в индивидуальном состоянии ряда других ферментов привело к формулировке правила: «все ферменты — белки», которое было опровергнуто только в 70-е годы в результате открытия ферментативных свойств РНК (например, РНКазы Р, участвующей в процессинге тРНК). Такие ферменты получили название рибозимы.

Главные этапы развития биохимии связаны с именами ряда ученых, многие из которых работали в России: А.Н.Баха (перекисная теория биологического окисления), В.И.Палладина (теория дегидрирования), В.А.Энгельгарда (открытие АТФ), А.И.Опарина (гипотеза возникновения жизни), А.Н.Белозерского (исследование нуклеиновых кислот), К.Функа (витамины, авитаминоз), Г.Эмбдена и К.Мейергофа (механизм гликолиза), Г.Кребса (цикл трикарбоновых кислот), А.Сцент-Дьёрди (основы биоэнергетики), А.Ленинджера (окислительное фосфорилирование), П.Митчелла (хемиосмотическая теория) и многих других современных биохимиков.

Принципы классификации семейства биохимических наук. Основным принципом является классификация по объекту исследования, в результате чего выделяют биохимию:

*животных,
растений,
микроорганизмов.*

В свою очередь, каждая из этих наук может включать более мелкие подразделы, например биохимию *насекомых, водорослей, грибов* и т.д. Иногда в качестве объектов рассматривают классы химических соединений, выделяя биохимию *белков, целлюлозы* и др.

Как принцип классификации можно выделить область применения биохимических подходов, например существует термин *техническая биохимия*.

Иногда подчеркивается тот или иной аспект проблемы, включаемый в сферу действия данной области науки. Это приводит к появлению таких «гибридов», как *физическая биохимия*. Не вдаваясь в терминологическую казуистику, мы лишь констатируем сложившуюся ситуацию, выражающуюся, в частности, в существовании монографической литературы с указанными названиями.

В свою очередь, биохимия включается в более широкие понятия, например, *физико-химическая биология*, объединяющая родственные физические, химические и биохимические разделы соответствующих наук: физики, химии и биологии (рис. 1).

Значение биохимии для биотехнологии. Биохимические процессы лежат в основе очень многих технологических производств пищевой, медицинской и микробиологической промышленности. В настоящее время технологические процессы, осуществляемые с помощью живых организмов или их компонентов, называют *биотехнологией*. В этом смысле биохимия составляет фундаментально-научную основу биотехнологии, и биохимические знания абсолютно необходимы для разработки рациональной схемы соответствующего производства.



Глава 1. Строение и состав живой клетки

Все живые организмы состоят из клеток и подразделяются на *одноклеточные* и *многоклеточные*. Популяция одноклеточных организмов включает клетки одного типа или небольшого количества типов, тогда как у многоклеточных организмов клетки специализированы. По типу строения клетки подразделяются на *прокариотические* и *эукариотические* (рис. 2).

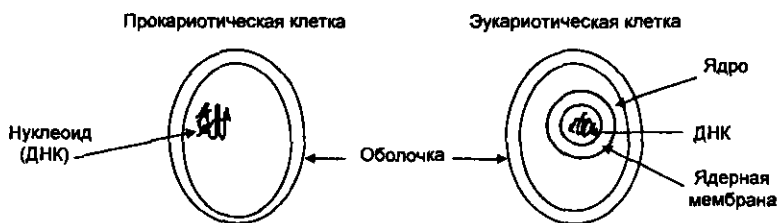


Рис. 2. Упрощенная схема строения прокариотической и эукариотической клеток

Все клеточные организмы имеют сходный химический состав и содержат три основных типа макромолекул: *ДНК*, *РНК* и *белки*, а также *полисахаридные* и *липидные* компоненты. Кроме того, в клетках присутствуют переменные количества низкомолекулярных веществ — субстратов и продуктов энергетических и конструктивных процессов (*аминокислоты*, *сахара*, *нуклеотиды* и др.). В среднем около 80% клеточной массы составляет вода.

1.1. Клеточные стенки и клеточные мембраны

Как правило, клетки окружены двумя оболочками: *клеточной стенкой* и *цитоплазматической мембраной*, для эукариотических клеток применяют название *плазмолемма*.

Клеточная стенка обеспечивает механическую прочность клетки, придавая ей жесткую (*ригидную*) структуру, благодаря чему

клетка выдерживает высокое внутреннее осмотическое давление (5–20 МПа). Кроме того, клеточная стенка может обуславливать некоторую степень избирательной проницаемости для низкомолекулярных веществ, а также способность взаимодействовать с другими клетками, вирусами и физическими поверхностями. Строение клеточной стенки у разных организмов имеет свои особенности.

Клетки большинства тканей *многоклеточных животных* не содержат выраженной клеточной стенки. *Растительные клетки*, напротив, имеют очень сложную клеточную стенку, построенную из *целлюлозных микрофибрилл*, погруженных в матрикс (из *пектина и гемицеллюлоз*).

Клеточные стенки *дрожжей и мицелиальных грибов* состоят из гомо- и гетерополисахаридов (*глюканов, хитина*) и *маннан-белкового комплекса*, выполняющего антигенную роль. Толщина этих слоев достигает 1 мкм.

Особенности клеточных стенок *бактерий* связаны со способностью бактерий окрашиваться по Граму. Клеточная стенка *грамположительных* бактерий построена в основном из гетерополисахарида *муреина* (пептидогликана), содержащего аминокислотные «мостики». В состав клеточной стенки входят также *тейхоевые кислоты* (рибит- или глицеринтейхоевые), ковалентно связанные с мурамовой кислотой пептидогликана. У *грамотрицательных* бактерий слой муреина невелик, но в клеточной стенке присутствует *наружная мембрана*, построенная из *фосфолипидов, белков и липополисахарида*, обеспечивающая некоторую степень избирательной проницаемости и содержащая рецепторы фагов и антигены. Толщина клеточной стенки составляет от 15 до 80 нм. Существуют бактерии, полностью лишенные клеточной стенки (*микоплазмы*). У представителей *архебактерий (архей)* в клеточной стенке отсутствует муреин (иногда содержится отличающийся по составу *псевдомуреин*), а осмопротекторную роль выполняет слой *гликопротеинов* (рис. 3).



Рис. 3. Схема строения клеточной стенки у бактерий разных таксонов

Цитоплазматическая мембрана состоит из белков и липидов в соотношении от 1 : 4 (в *миелине*, мембране нервных волокон) до

4 : 1 (в мембранах бактерий). Во многих мембранах присутствуют небольшие количества углеводов (до 5%) и следы РНК, а также неорганические катионы (в основном Ca^{2+} и Mg^{2+}). Существенную часть мембран составляет *вода* — она участвует в формировании гидрофобных (энтропийных) связей между компонентами мембраны. Еще в 1930 г. Д. Даниэлли предложил модель мембраны в виде двойного липидного слоя или *бислоя*. Развитием этих представлений является *жидкостно-мозаичная модель*, предложенная С.Д. Сингером и Г. Николсоном в 1972 г., согласно которой мембранные белки подразделяются на *периферические* (слабо связанные с мембраной) и *интегральные* (локализованные в липидном бислое). Последние свободно плавают в «липидном море», перемещаясь в латеральном направлении (в плоскости мембраны), но неспособны «пронырнуть» на противоположную ее сторону. Таким образом, мембраны оказываются *асимметричными*, по крайней мере, в отношении белкового состава. Асимметрия наблюдается и в расположении липидов в мембране, но менее выражена. Некоторые из интегральных белков имеют *трансмембранную* ориентацию и выполняют функции переносчиков (*транслокаторов*) субстратов или сигналов. Схема подобной мембраны представлена на рис. 4.

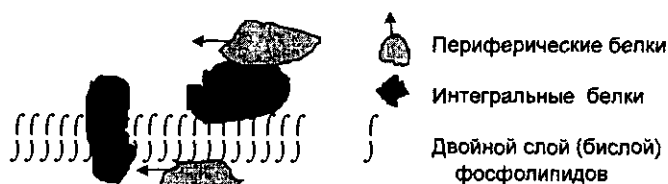


Рис. 4. Упрощенная жидкостно-мозаичная модель цитоплазматической мембраны

1.2. Состав мембранных липидов

Основная часть мембранных липидов представлена *фосфолипидами*, в основе которых лежит *глицерин-3-фосфат*. Такие фосфолипиды называют *фосфоацилглицеринами*. В их молекуле гидроксильные группы глицерина при C_1 и C_2 этерифицированы жирными кислотами, а остаток фосфорной кислоты либо остается свободным, как в *диацилглицерин-3-фосфате* (или *фосфатидной кислоте*), либо этерифицирован спиртовыми гидроксилами серина, этаноламина, холина, инозита, глицерина или глицерина и лизина. Соответственно они называются: *фосфатидилсерин*, *фосфатидилэтаноламин (кефалин)*, *фосфатидилхолин (лецитин)*, *фос-*

фатидилинозит, фосфатидилглицерин, лизилфосфатидилглицерин. Объединение молекул фосфатидной кислоты и фосфатидилглицерина дает *дифосфатидилглицерин (кардиолипин)*, обладающий иммунологическими свойствами (рис. 5).

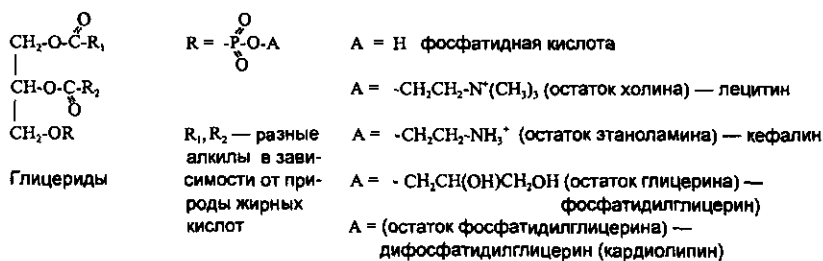


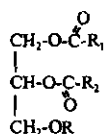
Рис. 5. Химическая структура мембранных фосфолипидов

Удаление одной из ацильных групп приводит к *лизофосфолипидам*, которые обладают выраженными поверхностно-активными свойствами и могут, например, способствовать эмульгированию жиров в кишечнике (*лизолецитин*).

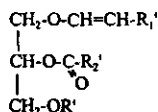
Мембраны грамположительных бактерий содержат все эти фосфолипиды (кроме лецитина), тогда как у грамотрицательных бактерий основным, а то и единственным мембранным фосфолипидом является фосфатидилэтаноламин.

Соотношение различных классов фосфолипидов в мембране существенно зависит от условий выращивания организма. Например, при снижении pH среды в мембранах бактерий начинают преобладать положительно заряженные фосфолипиды (аминоацилфосфатидилглицерины, фосфатидилэтаноламин), наличие которых существенно уменьшает проницаемость мембраны для протонов. В большинстве случаев фосфолипиды представляют собой *сложные эфиры* глицерина или других многоатомных спиртов *sn-1,2-конфигурации*, но существуют липиды, в которых одна из спиртовых групп глицерина образует простую эфирную связь с алкилами или алкенами. Необычные липиды найдены у большой группы прокариот, так называемых *архебактерий* (или *архей*), в качестве *простых эфиров* глицерина (*sn-2,3-конфигурации*) и длинноцепочечных *C-20, C-40-гидроизопреноидных спиртов (полипренолов)*, точнее, *дифитанилдиглицериновых дизэфиров* или *дифитанилдиглицериновых тетраэфиров* (рис. 6).

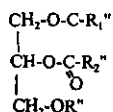
Мембрана, образованная тетраэфирами, уже не может рассматриваться как двойной липидный слой в истинном значении этого понятия и не подвергается расщеплению по гидрофобной



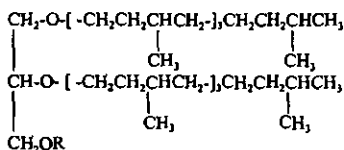
Глицериды



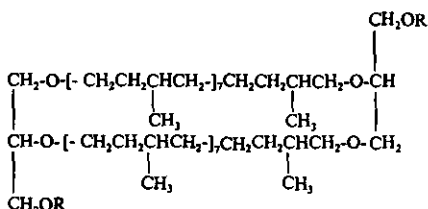
1-алкенилглицериновые эфиры (плазмалогены) (нервная ткань, моллюски анаэробные бактерии)



1-алкилглицериновые эфиры (рыбы)



Диэфир (2,3-ди-О-(3,7,11,15-тетрамилгексадецил)-sn-глицерин) (архебактерии: галобактерии, метаногены)



Тетраэфир (архебактерии: термоацидофилы, метаногены)

Рис. 6. Химическая структура фосфолипидов, содержащих простую эфирную связь в сравнении со сложнэфирными глицеридами

сердцевине методом «замораживания-скальвания» (*freeze-fracture*). Она более устойчива к стрессовым воздействиям окружающей среды, что позволяет микроорганизмам, имеющим такие мембраны, существовать в экстремальных условиях pH и температуры (*экстремофилы*). У термофилов дополнительная стабилизация достигается формированием в полипренольной цепи пятичленных циклов, уменьшающих вращательную подвижность углеводородных цепей.

Кроме фосфолипидов, построенных на основе глицерина, в клетках эу- и прокариот встречаются фосфолипиды, которые являются производными диолов: *этиленгликоля*, *1,2- и 1,3-пропандиолов*, *1,3-, 1,4- и 2,3-бутандиолов*, а также *1,5-пентандиола*. Среди диольных липидов встречаются моно- и диацильные производные — это сложные эфиры различных жирных кислот; простые эфиры, смешанные

алкильные (или алкенильные) и ацильные производные, диольные аналоги фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и др. Обычно содержание диольных липидов составляет только 0,5–1,5% содержания глицериновых липидов. Но некоторые морские моллюски и иглокожие содержат в тканях примерно равные количества производных глицерина и этиленгликоля. Содержание диольных липидов уменьшается в течение зимы, поэтому они предположительно могут использоваться как запасные вещества. Замечено также их увеличение в процессе регенерации печени у крыс.

Другим классом «безглицериновых» липидов являются *сфинголипиды*, основу которых составляет алифатический аминокспирт *сфингозин* (или *дигидросфингозин*) (рис. 7). Построенные на его основе *церамиды* широко распространены в тканях растений и животных, но количество их незначительно. Они обнаружены также в пиялях *Escherichia coli*. *Сфингомиелины* входят в состав нервной ткани, липидов крови и некоторых других компонентов клеток животных.

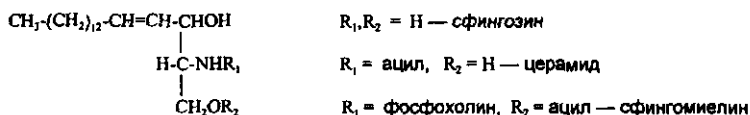


Рис. 7. Химическая структура сфинголипидов

В большинстве биологических мембран содержатся также *гликолипиды*. В клетках животных они, как правило, являются производными сфингозина, у которого к первичному гидроксилу присоединен остаток сахара или олигосахарида. Если сахарами являются глюкоза или галактоза, такие липиды называются *цереброзидами* (особенно много их в тканях мозга). Если углеводной частью является олигосахарид, речь идет о *ганглиозидах* (выделены из ганглий, мозга и ряда других тканей). Ганглиозиды найдены также в пиялях некоторых бактерий (*Neisseria*) и определяют прилипание этих патогенов к поверхности клеток животного организма. У прокариот (в основном у грамположительных бактерий и цианобактерий) гликолипиды также содержат глюкозу, галактозу и маннозу. Их количество в мембранах невелико, но при лимитировании фосфором может возрастать, при этом гликолипиды, по-видимому, замещают фосфолипиды. Наконец, в мембранах большинства эукариот (а также у *Mycoplasma*) содержатся стероиды, в основном *холестерин* (у животных), *эргостерин* (у дрожжей) и *стигмастерин* (у растений). Микоплазмы неспособны синтезировать стерины, но требуют присутствия их в среде для стабилизации клеточной мембраны.

Таблица 1. Природа жирных кислот в липидах клеток животных

Группы кислот	Конфигурация					
Насыщенные	С-16, пальмитиновая	С-18, стеариновая	С-20, арахидиновая	С-22, бегеиновая	С-24, лигноцеринная	С-12, 14 и С-26, 28 в следовых количествах
Мононенасыщенные	Как правило, цисконфигурация С-16, пальмитолеиновая (цис-9-гексадеценовая)	С-18, олеиновая (цис-9-октадеценовая) С-18, вакценовая (11-октадеценовая) транс — у животных, цис — у бактерий	Нет	Нет	Нет	Нет
Полиненасыщенные	Как правило, дивинилметановая группировка	С-18, линолевая (цис, цис-9, 12-октадекадиеновая С-18, линоленовая (9, 12, 15-октадекатриеновая)	С-20, арахидиновая (5, 8, 11, 14-эйкозатетраеновая) Предшественник простагландинов, встречается также у грибов	Нет	Нет	Нет

1.3. Природа и состав жирных кислот в мембранных липидах

Природа жирных кислот в липидах мембран зависит как от вида организма, так и от условий его существования. Наиболее часто встречающиеся жирные кислоты липидов животных, растительных и прокариотных клеток перечислены в табл. 1, 2 и 3.

С увеличением числа двойных связей значительно снижается температура плавления жирных кислот (а также содержащих эти кислоты липидов) и повышается их растворимость в неполярных растворителях. Поскольку функциональная активность мембранных белков регулируется фазовым состоянием липидов мембраны (как правило, в жидком состоянии их активность выше), при *снижении температуры* в мембране должно *повышаться содержание ненасыщенных кислот*. Благодаря постоянству внутренних условий (гомеостазу) животного макроорганизма влияние температуры на жирнокислотный состав липидов обычно проявляется слабо, но, например, в липидах нижних конечностей пингвинов повышено содержание ненасыщенных жирных кислот.

Таблица 2. Природа жирных кислот в липидах клеток растений

Группы кислот	Конфигурация		
Насыщенные	С-16, пальмитиновая	С-18, отсутствуют	С-12,14 и С-26, 28 в следовых количествах
Мононенасыщенные	Нет	С-18, рицинолевая (12-окси-цис-9-октадеценовая), в касторовом масле С-18, крепининовая (с тройной связью) у сложноцветных	—
Полиненасыщенные	Нет	Как правило, с конъюгированными двойными связями С-18, элеостеариновая (цис-9,11,13-октадекатриеновая) С-18, линолевая и линоленовая	—

Таблица 3. Природа жирных кислот в липидах клеток прокариот

Группы кислот	Конфигурация
Насыщенные	В основном С-16 — С-18, а также разветвленные, циклопропановые, окси- и другие кислоты
Мононенасыщенные	С-16, пальмитолеиновая С-18, цис-вакценовая
Полиненасыщенные	Только у цианобактерий

В мембранах прокариот разнообразие жирных кислот довольно велико. Особенностью бактерий является наличие *разветвленных* и *циклопропановых* кислот. У некоторых грамположительных бактерий (например, *Micrococcus luteus*) 90% жирных кислот липидов составляют разветвленные кислоты, а ненасыщенные кислоты практически отсутствуют. Грамотрицательные бактерии содержат смесь насыщенных и ненасыщенных кислот с преобладанием С-16 и С-18 кислот, а также циклопропановые кислоты (например, *лактобацилловую кислоту*). Пути их биосинтеза показаны на рис. 8.

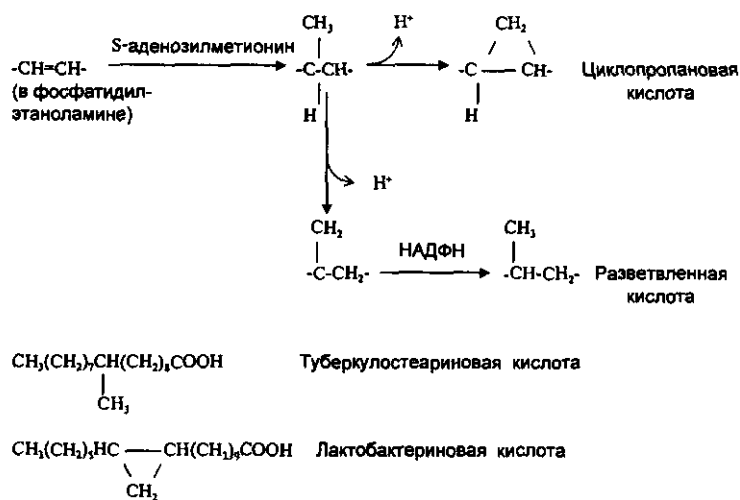


Рис. 8. Схема биосинтеза разветвленных и циклопропановых кислот

Изменение температуры существенно влияет на соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в мембранах прокариот, при этом снижение температуры культивирования приводит к увеличению доли ненасыщенных кислот. Предельными случаями являются *психрофилы*, растущие при температурах, близких к 0°C , у которых присутствуют практически только ненасыщенные жирные кислоты, а также *термофилы* (привычная температурная среда выше 60°C) — у них все жирные кислоты липидов насыщенные.

Тем не менее состав жирных кислот фосфолипидов у бактерий при культивировании в стандартных условиях достаточно постоянен, и его можно использовать как таксономический признак — в интересах классификации или при анализе состава микробных сообществ без изолирования в чистых культурах отдельных представителей.



Глава 2. Понятие о компартментации в живой клетке

Распределение веществ или процессов по внутриклеточным изолированным «отсекам» называют *компартментацией* (от англ. compartment — отсек). В клетках эукариот таких отсеков, изолированных внутриклеточными мембранами, — *органелл* много, а у прокариот они встречаются сравнительно редко. Один из примеров — *периплазматическое пространство* между цитоплазматической и наружной мембранами у грамотрицательных бактерий (см. рис. 3).

Для изучения структуры, состава и функции органелл необходимо, как правило, изолировать их из клетки в чистом виде. Обычно это достигается методом *дифференциального центрифугирования* после разрушения клеток в механических или ультразвуковых *гомогенизаторах* (табл. 4).

Таблица 4. Распределение клеточных компонентов при дифференциальном центрифугировании гомогената животных клеток

Фракция	Центробежное ускорение, тыс. g	Время центрифугирования, мин	Ферментативная активность
Обломки клеток, ядра	1–6	10	Синтез нуклеиновых кислот
Митохондрии	10–15	20	Энергетические процессы
Лизосомы и др.	15–20	30	Гидролитические и др. ферменты
Микросомы (эндоплазматич. ретикулум)	100	60	Синтез белка
Растворимая (супернатант)	—	—	Гликолиз, обмен жирных кислот и др.

Основные различия между клетками прокариот и эукариот по составу и способам компартиментации обобщены в табл. 5.

Таблица 5. Различия между клетками эукариот и прокариот по строению и наличию органелл

Структура или компонент	Эукариоты		Прокариоты
	Животные	Растения	
Ядро (нуклеоплазма)	+	+	-
Гистоны	+	+	(+)
Митоз и мейоз	+	+	-
Внехромосомная ДНК в органеллах в плазидах	+	+	-
	-	(+)	+
Эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи	+	+	-
Митохондрии	+	+	-
Хлоропласты	+	+	-
Лизосомы	+	+	-
Микротельца: пероксисомы глиоксисомы гликосомы	+	+	-
	-	+	-
	+	-	-
Вакуоли	+	+	-
Микротрубочки и микро- филаменты	+	+	(+)
Жгутики	+	+	+
Реснички	+	(+)	-
Хитосомы (у грибов)	-	-	-
Карбоксисомы	-	-	(+)
Гидрогеносомы	(+)	-	-
Целлюлосомы	-	-	(+)
Аэросомы	-	-	(+)
Пили, фимбрии, простеки	(+)	(+)	+

Примечание. Знак «+» означает присутствие признака у многих представителей; знак «-» означает отсутствие признака; знак «(+）」 означает редкую встречаемость признака.

Кратко охарактеризуем основные процессы и органеллы (в алфавитном порядке).

Аэросомы — однослойные везикулы, мембрана которых построена только из белка. Способствуют повышению плавучести клеток, так как в них содержится газовая фаза, совпадающая по составу с газовой фазой окружающей среды.

Вакуоли — мембранные образования, служащие для поддержания тургорного давления, запасаания различных веществ, а также выполняющие лизосомные функции.

Внехромосомная ДНК. В митохондриях и хлоропластах содержится ДНК, образующая нуклеоид бактериального типа. Заключенная в ней генетическая информация не дублируется в ядерной ДНК и способна к автономному выражению в белках посредством собственных систем транскрипции и трансляции (включающих рибосомы 70 S бактериального типа).

У прокариот внехромосомная ДНК организована в виде *плазмид*, которые могут существовать и реплицироваться автономно или в интегрированном в хромосому состоянии (например, в виде *профага*).

Гидрогеносомы — окружены однослойной мембраной и содержат комплекс пируватдегидрогеназ (у трихомонад).

Гистоны — представляют собой положительно заряженные (основные) белки, входящие в состав *хромосом* в комплексе с ДНК (обнаружены также у архебактерий).

Гликосомы — окружены однослойной мембраной и содержат ферменты гликолиза (у некоторых протозойных микроорганизмов, в частности у возбудителей сонной болезни).

Глиоксисомы — разновидность пероксисом — место локализации ферментов глиоксалатного шунта, участвующих в превращении запасных жиров в углеводы. Поэтому они тесно ассоциированы со *сферосомами*, жирозапасающими органеллами растительных клеток.

Жгутики и реснички представляют собой аппарат, определяющий подвижность клеток или их способность создавать поток окружающей среды к органам поглощения пищи. Жгутики эукариот и прокариот сильно различаются по строению и составу.

Карбоксисомы — окружены однослойной мембраной и содержат ключевые ферменты фиксации углекислоты в цикле Кальвина (у фототрофных и некоторых хемолитотрофных прокариот).

Лизосомы — мембранные везикулы, содержащие гидролитические ферменты, участвующие в круговороте белков, полисахаридов, липидов и нуклеиновых кислот. Для предотвращения неорганизованного действия этих ферментов они заключены в орга-

неллу, окруженную однослойной мембраной. Некоторые наследственные болезни связаны с недостаточностью лизосомных ферментов.

Микротрубочки и микрофиламенты, по-видимому, исполняют роль *цитоскелета* и формируются из белка *тубулина*. Они входят в состав *центриолей*, играющих важную роль в делении ядра, а также в состав *жгутиков* и *ресничек*.

Митоз — деление ядра, сопровождающееся удвоением числа хромосом; *мейоз* — деление ядра без удвоения числа хромосом, в результате чего образуются *гаплоидные* клетки.

Митохондрии являются местом осуществления окислительных процессов, в них локализованы ферменты цикла трикарбоновых кислот, дыхательная цепь, система окислительного фосфорилирования. В клетках содержится от 1 до нескольких тысяч митохондрий. Митохондрии содержат внехромосомную ДНК, способны к самовоспроизведению и, возможно, ведут свое начало от прокариотических клеток (*эндосимбиотическая гипотеза*). Однако часть белков этих органелл кодируется ядерными генами, поэтому они не культивируются автономно. У прокариот сходные по функциям структуры, происходящие из цитоплазматической мембраны, называют *мезосомами*.

Пероксисомы — органеллы, окруженные однослойной мембраной и содержащие ряд окислительных ферментов, а также каталазу, разрушающую перекись водорода, образующуюся в процессе окисления. Могут рассматриваться как более древние аналоги митохондрий и играют важную роль в обмене липидов.

Пили, фимбрии представляют собой выросты поверхности клеток и бывают простые и половые. Простые пили построены из белка *пилина* и играют важную роль в прикреплении бактерий к субстрату. На поверхности клетки их может быть 50–400 штук. Половые пили (1 на клетку) используются в процессе конъюгации. Выросты клеток, содержащие цитоплазму, называют *простеками*.

Они служат для увеличения поверхности клеток, прикрепления к субстрату или участвуют в почковании клеток.

Хитосомы — место локализации хитинсинтетазы, встречаются у грибов. Осуществляют функцию переноса микрофибрилл хитина к клеточной стенке.

Хлоропласты содержат хлорофилл и осуществляют процесс фотосинтеза у растений. Как и в митохондриях, в них содержится собственная ДНК. Аналогичные по функциям бактериальные структуры называют *хроматофорами*, а также *тилакоидами* и *хлоросомами*. В отличие от хлоропластов они не содержат ДНК и происходят из цитоплазматической мембраны.

Целлюлосомы — содержат комплекс ферментов и липидов. Определяют присоединение бактерий к целлюлозным субстратам и их расщепление.

Эндоплазматический ретикулум — это внутриклеточная сеть взаимосвязанных, ограниченных мембраной трубочек и пузырьков. Мембрана эндоплазматического ретикулума образует единое целое с ядерной мембраной. Если на наружной поверхности эндоплазматического ретикулума адсорбированы рибосомы, его называют шероховатым, если нет — гладким. Шероховатый эндоплазматический ретикулум — место синтеза секретируемых белков, которые попадают внутрь его каналов, а затем поступают в «цистерны» аппарата Гольджи (*диктиосомы* у растений), откуда переносятся внутри мембранных везикул либо в плазмалемму, либо в мембрану вакуолей (тонопласт) и секретируются внутрь вакуолей или в окружающую среду (*экзоцитоз*).

Ядро (нуклеоплазма) эукариотических клеток окружено двойной мембраной (*плазмалеммой*), содержащей поры (*поросомы*). В ядре присутствует *ядрышко* (место синтеза РНК и сборки рибосом). В отличие от ядра *нуклеоид* прокариотических клеток не отделен мембраной от цитоплазмы и представляет собой комплекс ДНК, РНК и белков.



Глава 3. Ферменты — катализаторы биохимических реакций

Реакции, протекающие в живых организмах, подчиняются общим законам химии, однако отличаются высокой специфичностью и отсутствием побочных продуктов. Эта особенность определяется свойствами белковых посредников биохимических реакций — ферментов, выполняющих роль катализаторов. Для понимания роли ферментов как биологических катализаторов необходимо остановиться на некоторых общих особенностях катализируемых химических реакций.

3.1. Общие представления о ферментативном катализе

Каждая химическая реакция характеризуется энергией активации (ΔG), т. е. свободной энергией, которую нужно придать реагирующим молекулам, чтобы произошло химическое превращение (при столкновении молекул с недостаточной свободной энергией химическая реакция не происходит). Таким образом, энергия активации — это энергетический барьер, который нужно преодолеть, чтобы произошла реакция.

В процессе химических реакций молекулы вступают в так называемое *переходное состояние*, характеризующееся менее устойчивой структурой и наибольшей свободной энергией. Катализаторы снижают свободную энергию переходного состояния и, стабилизируя его, облегчают протекание реакции.

Определение катализатора как вещества, снижающего энергию активации, неточно. На самом деле катализатор вступает во взаимодействие с реагирующими веществами и направляет реакцию по новому пути с низкой энергией активации (рис. 9).

Следует учитывать, что в энергии активации присутствует не только энтальпийная (ΔH , тепловая) составляющая, но и энтропийная (ΔS , мера упорядоченности системы). Высокая энтальпийная составляющая свидетельствует о том, что для формирования переходного состояния необходимо существенное ослабление химических связей. Для многих химических реакций механизм акти-

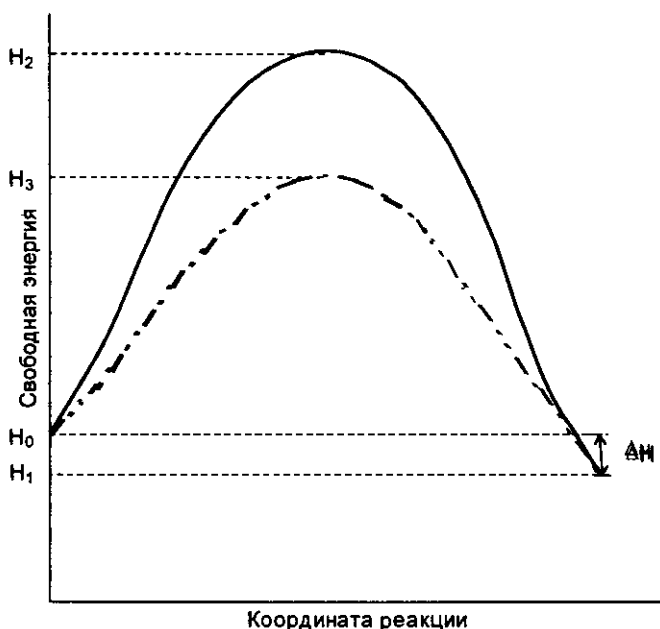


Рис. 9. Диаграмма переходного состояния химической реакции:

H_0 — энтальпия (тепловая энергия) исходных субстратов; H_1 — энтальпия продуктов реакции; $\Delta H^{\#1} = H_2 - H_0$ — энергия активации некатализируемой реакции; $\Delta H^{\#2} = H_3 - H_0$ — то же для катализируемой реакции, причем $\Delta H^{\#1} > \Delta H^{\#2}$; $\Delta H = H_0 - H_1$ — тепловой эффект реакции: если $\Delta H > 0$ — реакция экзэргоническая (экзотермическая, протекает самопроизвольно с выделением тепла), если $\Delta H < 0$ — реакция эндэргоническая (эндотермическая, требует затраты энергии)

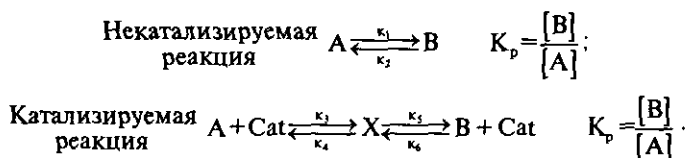
вазии молекул, по-видимому, сходен, так как ΔH для них практически совпадает и составляет около $50 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$. Высокая энтропийная составляющая встречается реже и означает, что в процессе формирования переходного состояния молекулы должны принять строго определенную конформацию.

Таким образом, правильное определение понятия *катализатор* можно сформулировать следующим образом.

Катализатором называется вещество, ускоряющее химическую реакцию, но само в этой реакции не расходующееся. Функция катализатора состоит в том, что он реагирует с исходными веществами, образуя промежуточное соединение (новое переходное состояние), которое подвергается дальнейшему превращению с пониженной энергией активации. В результате образуются продукты реакции и регенерируется катализатор.

Следует напомнить, что катализатор только *ускоряет достижение равновесия* в химической реакции, но не изменяет его по-

ложения (т. е. соотношения субстрата и продуктов). Присутствие катализатора не вызывает термодинамически невозможной реакции и не влияет на выход продуктов, поскольку катализатор не взаимодействует с продуктами реакции:



Из этих уравнений следует, что константа равновесия реакции (K_p) не зависит от присутствия катализатора, а следовательно, изменению константы скорости прямой реакции в присутствии катализатора всегда сопутствует соответствующее изменение константы скорости обратной реакции. При этом соблюдается принцип *микроскопической обратимости*, т.е. *механизм обратной химической реакции должен быть строго обратным механизму прямой реакции*. В отношении ферментов это означает, что прямая и обратная реакции должны протекать в одном и том же активном центре фермента.

3.2. Сравнение химического и ферментативного катализа

Механизмы химического и ферментативного катализа принципиально не различаются. Однако при нормальных «физиологических» условиях (рН и температуре) в водных растворах ферменты значительно более эффективны (*сильнее снижают свободную энергию переходного состояния*), чем обычные химические катализаторы. Кроме того, ферменты, как правило, катализируют только *один из возможных путей превращения субстратов*, тогда как в ходе обычных химических реакций образуется смесь продуктов.

Еще более существенным моментом является то, что ферменты обладают чрезвычайно высокой *стереоспецифичностью*, различая, например, оптические изомеры и даже изотопы одного и того же элемента. Это связано с особенностями структуры активных центров ферментов и конформационной «гибкостью» их молекул. Д. Кошланд сформулировал концепцию *индуцированного соответствия*, согласно которой при связывании специфического субстрата происходит такое изменение *конформации* фермента, которое перемещает каталитические группы в положение, обеспечивающее эффективное протекание реакции.

Доказательства конформационных изменений в молекуле фермента при взаимодействии с субстратом получены методами *ядерного магнитного резонанса* и *рентгеноструктурного анализа*. Например, при взаимодействии *карбоксипептидазы А* с «плохими» (отличающимися по химической структуре) субстратами происходит перемещение остатков двух аминокислот: тирозина и глутаминовой кислоты, которые предположительно участвуют в каталитическом процессе, на 15 и 2Å соответственно. Этих перемещений достаточно для проявления макрофизических изменений: растрескивания кристаллов фермента при добавлении субстрата.

Такие конформационные изменения могут быть имитированы веществом, не являющимся субстратом данного фермента. Отсюда становятся понятными факты стимулирующего (ингибирующего) влияния молекул, не участвующих непосредственно в ферментативной реакции. Например, *формиат* ускоряет перенос аминокислоты с *аланина* на *2-оксоглутарат* с участием *трансаминазы*, тогда как при использовании в качестве донора аминокислоты *глутамата* формиат оказывает отрицательное воздействие (см. схему на рис. 10).

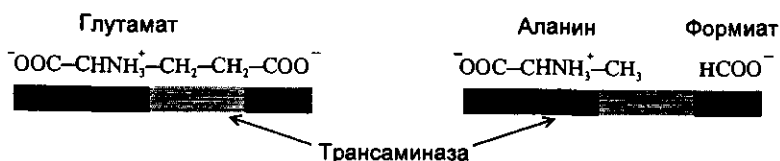
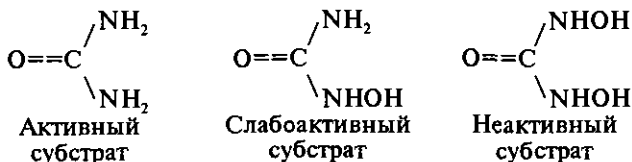


Рис. 10. Влияние формиата на активность трансаминазы

В молекуле фермента предполагается существование двух центров связывания субстрата (для цвиттерной и анионной частей). Когда субстратом служит аланин, один центр остается свободным, а формиат, связываясь с ним, обеспечивает оптимальную конформацию фермента. Глутамат сам перекрывает оба центра, а формиат в этом случае конкурирует за анионный центр с глутаматом и снижает активность фермента

Насколько велика специфичность действия ферментов? Рассмотрим некоторые примеры.

1. Фермент *уреаза* обладает практически абсолютной специфичностью к своему субстрату *мочевине*; только при замене одного из атомов водорода в аминокислотной группе на OH сохраняется частичная активность:



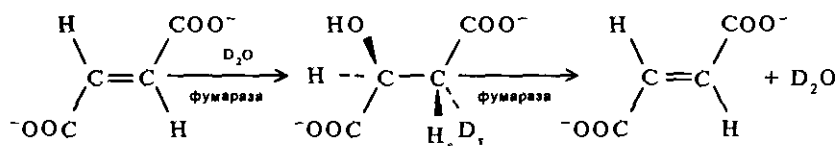
2. Фермент *сукцинатдегидрогеназа* допускает замену только одного атома водорода в CH_2 -группе на атом Cl (но не других галогенов или OH).

3. Встречается *групповая специфичность* ферментов, например в отношении стереоизомеров. Так, *оксидазы-D-аминокислот* малоспецифичны в отношении химической природы аминокислоты, но не действуют на их L-изомеры.

Известны примеры необычайно высокой специфичности.

4. Ферменты могут «различать» *атомы изотопов* одного и того же элемента, причем скорость реакции *выше* в случае более легких изотопов. Этот эффект особенно заметно проявляется в случае более тяжелых, чем H, элементов (S, P). На этом, в частности, основано определение «биогенного» или «абиогенного» происхождения продуктов круговорота углерода, серы, фосфора.

5. Некоторые ферменты обладают настолько высокой стереоспецифичностью, что могут «различать» *две одинаковые группы в симметричной молекуле* субстрата, а также *каждый из атомов водорода, входящих в состав CH_2 -группы*. Например, реакция взаимопревращения *малата* и *фумарата* протекает таким образом, что отщепляется (или присоединяется) только атом H, находящийся в *про-R-положении*, тогда как атом H, находящийся в *про-S-положении*, не затрагивается.



Доказательством абсолютной стереоспецифичности фермента служит полное удаление дейтерия из молекулы малата в процессе его превращения в фумарат.

3.3. Методы изучения специфичности ферментов

Обычно степень специфичности ферментов оценивают на основании их способности катализировать превращения *аналогов главного субстрата*. Но применяемые подходы не всегда можно признать корректными, поэтому абсолютно необходимо соблюдать следующие условия.

1. Фермент должен быть высокоочищен, он не может содержать даже следов других ферментов, действующих на сходные субстраты. Использовать фермент следует в минимальной концентрации.

2. Субстраты максимальной чистоты не должны содержать других веществ, на которые действует данный фермент. Оптические изомеры нужно исследовать отдельно, так как присутствие одного из них может влиять на превращение другого (например, D-аспарагин конкурентно подавляет дезаминирование L-аспарагина, катализируемое аспарагиназой).

3. Необходимо использовать серию концентраций каждого субстрата и вычислить кинетические параметры (K_m и V_{max}). В случае субстратов, способных к ионизации, следует определить зависимость кинетических параметров от pH.

4. Если в ферментативной реакции участвует более одного субстрата (например, донор и акцептор), необходимо изучить специфичность фермента по отношению к субстратам каждого из этих рядов.

5. Особый случай может быть обусловлен наличием у одного и того же фермента двух или более активностей в соответствии со схемой:



Здесь необходимо доказать, что дополнительная активность не связана с присутствием другого фермента. Можно использовать следующие критерии:

— эти активности не должны разделяться *разными* методами фракционирования;

— должно сохраняться постоянное количественное соотношение активностей в процессе инактивации фермента (путем нагревания, облучения, изменения pH, действия ингибиторов и т.д.);

— при одновременном добавлении субстратов (в концентрациях, близких к насыщающим) *общая скорость* должна быть *меньше* суммы скоростей, измеренных для каждого субстрата отдельно.

Очевидно, что два последних критерия справедливы только для ферментов, имеющих *общий каталитический центр* для изучаемых субстратов. При наличии двух разных каталитических центров их свойства могут настолько различаться, что имитируется реакция смеси ферментов. С другой стороны, физико-химические свойства двух разных ферментов могут оказаться настолько близкими, что их не удастся разделить методами фракционирования. Поэтому убедительным доказательством может служить только комплексное исследование.

3.4. Природа связей между молекулами фермента и субстрата

При наличии в молекулах субстратов *заряженных групп* (например, у аминокислот) связывание их с ферментами происходит преимущественно за счет *электростатических сил*. При этом распределение зарядов в молекулах субстрата и фермента должно быть *комплементарным* (т. е. положительно заряженным участкам фермента должны соответствовать отрицательно заряженные группы субстрата, и наоборот).

При отсутствии заряженных групп у *гидрофильных* (полярных) субстратов (например, сахаров) взаимодействие должно быть обусловлено *водородными связями*.

В случае незаряженных *гидрофобных* (неполярных) субстратов (например, содержащих углеводородные цепи) взаимодействие должно быть обусловлено *гидрофобными* (вандерваальсовыми) силами.

В случае *металлоферментов* взаимодействие с субстратами может быть обусловлено образованием *координационных связей* между лигандными группами субстрата и атомом металла.

Доказательством природы связи субстрата и фермента (кроме физических и физико-химических методов) может служить подавление активности фермента (связывания субстрата) специфическими ингибиторами (комплексонами, поливалентными ионами, веществами, разрушающими водородные или гидрофобные связи).

3.5. Принципы классификации и номенклатуры ферментов

Для корректного описания ферментов необходимо знать их обозначение по современной классификации. В соответствии с решением Международной комиссии для каждого фермента установлен код, состоящий из четырех чисел, разделенных точками. Первое число означает, к какому из шести основных классов относится фермент; второе указывает подкласс (как правило, природу донора); третье — подподкласс (как правило, природу акцептора); четвертое число — это порядковый номер фермента в его подподклассе. Основными группами ферментов в настоящее время принято считать следующие классы.

1. *Оксидоредуктазы*, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. В названиях используются термины *дегидрогеназа* или *редуктаза*, а если акцептором является молекулярный кислород, то *оксидаза*.

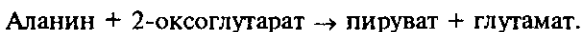
1.1 — действуют на СНОН-группу доноров;

1.1.1 — акцепторами служат NAD^+ или NADP^+ .

Таким образом, первый фермент этого класса — **алкогольдегидрогеназа** обозначается так: **1.1.1.1 Алкоголь: NAD оксидоредуктаза**



2. *Трансферазы*, катализирующие перенос тех или иных групп, например *аминотрансферазы*: **2.6.1.2 L-аланин** — оксоглутарат аминотрансфераза



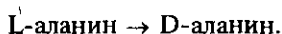
3. *Гидролазы*, катализирующие перенос групп на молекулу воды, например **3.1.2.1 Ацетил-СоА-гидролаза**



4. *Лиазы*, катализирующие образование двойных связей или присоединение по двойным связям, например: **4.1.3.1 трео-D-изоцитрат глиоксилат-лиаза** (изоцитратлиаза)



5. *Изомеразы*, катализирующие изменение геометрической или пространственной конфигурации молекул, например: **5.1.1.1 Аланинрацемаза**



6. *Лигазы*, катализирующие соединение двух молекул, сопровождающееся гидролизом богатой энергией связи, например: **6.2.1.1 Ацетат: СоА лигаза**



Несмотря на общепринятые требования к обозначению названий ферментов в научной литературе (в соответствии с международной классификацией), нередко встречаются и старые, более простые названия ферментов.

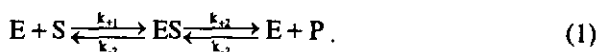


Глава 4. Кинетика действия ферментов

Кинетические исследования ферментативных реакций необходимы не только для количественного определения ферментов и сравнения скоростей их функционирования, но, в еще большей степени, для расшифровки механизмов ферментативных реакций. В этих целях прежде всего необходимо уметь корректно вычислять кинетические параметры ферментативных реакций, оценивать конкурентный или неконкурентный характер действия ингибиторов. Рассмотрим основные уравнения, описывающие ферментативную кинетику и способы вычислений. Основное внимание будет уделено не строгости математического вывода уравнений, а правильному их использованию для получения достоверных результатов.

При выводе кинетических уравнений (в частности, уравнения Михаэлиса—Ментен) количественно характеризующих ферментативную активность, обычно делают следующие допущения.

1. Фермент и субстрат образуют фермент-субстратный комплекс за счет сил *физической природы*. Из этого комплекса в дальнейшем освобождаются фермент и продукт. Таким образом, *химической реакцией* является только второй этап — распад фермент-субстратного комплекса:



2. Концентрация субстрата обычно значительно выше концентрации фермента. Поэтому при рассмотрении *начальных* скоростей реакции, когда концентрация продукта очень низка ($[P] = 0$), обратимостью второй стадии можно пренебречь. Следовательно, $[ES] = \text{const.}$, а скорость образования продукта равна (по уравнению реакции первого порядка):

$$V = k_3 [ES]. \quad (2)$$

3. Константа диссоциации определяется соотношением:

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}. \quad (3)$$

Поскольку общая концентрация фермента $[E_0]$ равна сумме концентраций свободного фермента $[E]$ и фермента, связанного в комплекс $[ES]$, то

$$[E_0] = [E] + [ES] \text{ или } [E] = [E_0] - [ES]. \quad (4)$$

С другой стороны, из уравнения (3) следует:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_s}.$$

Подставляя значение $[E] = [E_0] - [ES]$ из (4), получаем:

$$[ES] K_s = [E_0] [S] - [ES] [S] \text{ или } [ES] = \frac{[E_0][S]}{K_s + [S]}. \quad (5)$$

Подставив выражение (5) в уравнение скорости $V = k_{+2} [ES]$, получим:

$$V = \frac{k_{+2}[E_0][S]}{K_s + [S]}. \quad (6)$$

В уравнении (6) выражение $k_{+2} [E_0]$ можно рассматривать как *максимальную* скорость, достигаемую, когда концентрация фермент-субстратного комплекса численно равна общей концентрации фермента (т. е. когда весь фермент связан в комплекс). Следовательно:

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_s + [S]} \text{ или, принимая } K_s = K_m, \quad V = \frac{V_{\max}}{1 + K_m/[S]}. \quad (7)$$

Выражение (7) есть не что иное, как уравнение Михаэлиса—Ментен для ферментативной кинетики, а величина $K_m = K_s$ представляет собой *меру сродства фермента к субстрату*. Численно она равна такой *концентрации субстрата*, при которой начальная скорость ферментативной реакции составляет *половину максимальной скорости*. Уравнение (7) графически выражается гиперболой (рис. 11).

Для практического определения кинетических параметров этот график неудобен, к тому же требует использования концентраций субстрата, «насыщающих» фермент, что не всегда достижимо при ограниченной растворимости субстрата. Поэтому обычно стремятся преобразовать уравнение Михаэлиса—Ментен в такую форму, чтобы графически оно изображалось прямой линией. Чаше

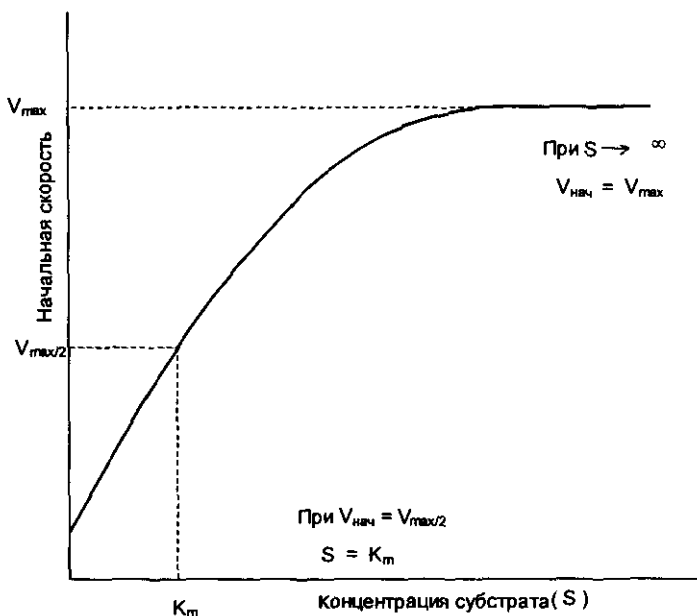


Рис. 11. График Михаэлиса—Ментен

всего для этого используют метод Лайнуивера—Берка, представляя уравнение Михаэлиса—Ментен в виде уравнения прямой линии ($y = a + bx$):

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + S}{V_{max} S} = \frac{K_m}{V_{max} S} + \frac{S}{V_{max} S} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S}.$$

Последнее выражение называют уравнением Лайнуивера—Берка и для расчета кинетических параметров используют график, построенный в координатах: $1/V$ против $1/S$. В результате получается прямая, отсекающая на оси ординат отрезок, равный $1/V_{max}$, а на продолжении оси абсцисс отрезок, равный $-1/K_m$ (рис. 12). Однако следует отметить, что при использовании графика Лайнуивера—Берка точки в области высоких концентраций субстрата располагаются слишком густо, а положение прямой линии во многом зависит от точек в области низких концентраций субстрата, где определение скорости менее надежно. Кроме того, реаль-

* В научной литературе в целях упрощения, концентрации компонентов принято обозначать без квадратных скобок, т.е. $[S] = S$.

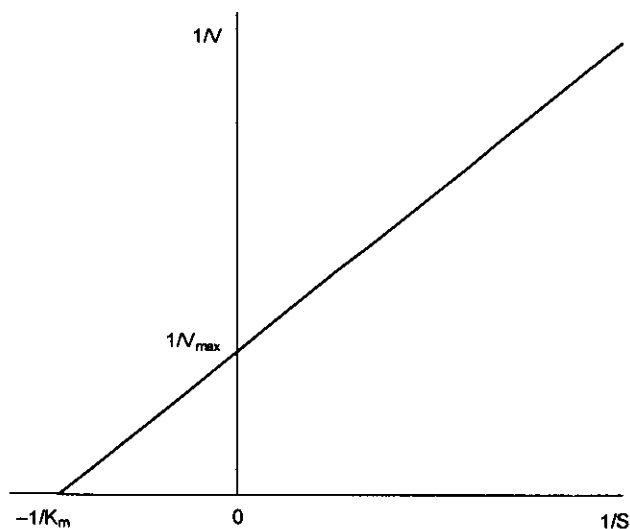


Рис. 12. График Лайнуивера—Берка

ные экспериментальные данные не всегда адекватно аппроксимируются в виде прямой линии.

Поэтому предложено еще несколько приемов для определения кинетических параметров. Метод Эди—Хофсти также основан на преобразовании уравнения Михаэлиса—Ментен. Умножив обе части уравнения на V_{max} и преобразовав, получим:

$$\frac{V_{max}}{V} = 1 + \frac{K_m}{S} \quad \text{или} \quad V_{max} = V + K_m \frac{V}{S} \quad \text{или} \quad V = V_{max} - K_m \frac{V}{S}.$$

График этого уравнения в координатах V против V/S представляет собой прямую линию, отсекающую на осях ординат и абсцисс отрезки, равные V_{max} и V_{max}/K_m соответственно (рис. 13).

В некоторых случаях (при сильном варьировании результатов определения скорости ферментативной реакции) для вычисления кинетических параметров удобнее использовать метод Эйзенталя и Корниш—Боуден, основанный на преобразованном уравнении Михаэлиса—Ментен:

$$V_{max} = V + \frac{V}{S} \cdot K_m.$$

В этом случае для каждого значения V и S строится прямая в координатах V и S . Точка пересечения всех этих прямых имеет координаты: V_{max} (ордината) и K_m (абсцисса) (рис. 14).

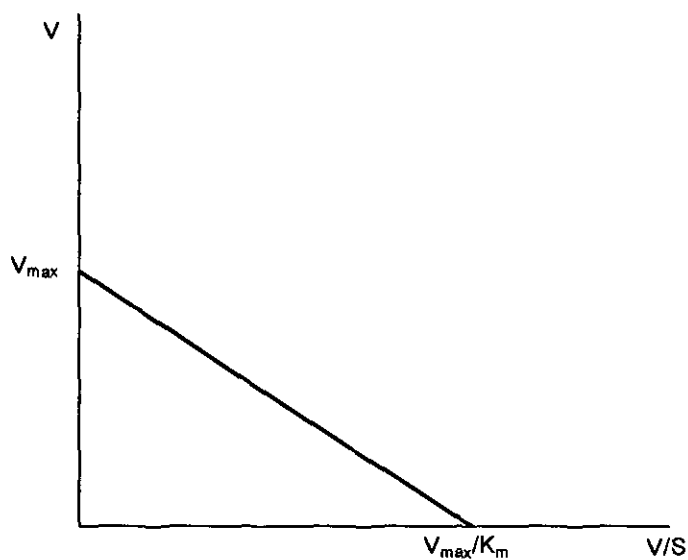


Рис. 13. График Эди—Хофсти

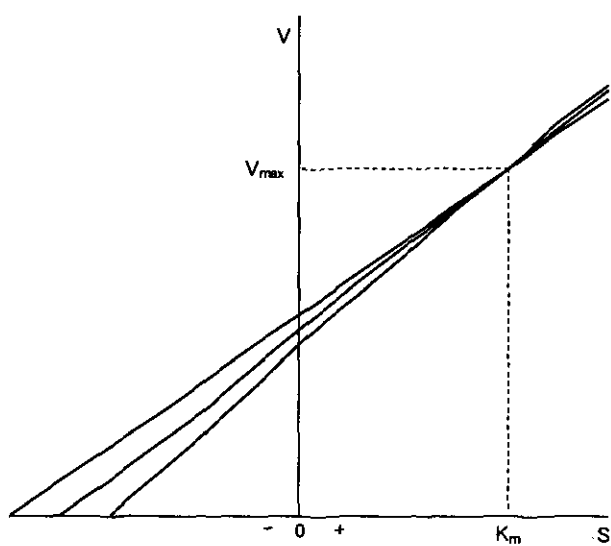


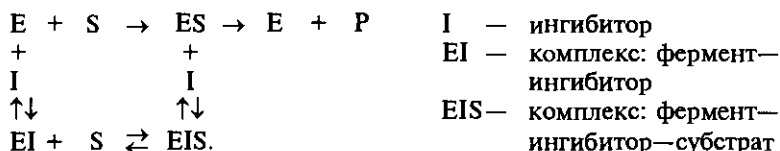
Рис. 14. График Эйзенталя и Корниш—Боуден



Глава 5. Ингибирование ферментов

Изучение подавления активности ферментов служит одним из способов расшифровки механизма их действия. Подходом к решению последней задачи является изучение специфичности действия ферментов. В свою очередь, это требует корректного измерения кинетических параметров в присутствии изучаемого аналога субстрата. Рассмотрим способы определения *характера взаимоотношений* субстратов, их аналогов и ингибиторов ферментативной активности путем вычисления ряда кинетических параметров.

Ингибиторы ферментов можно разделить на две основные группы: *обратимые* и *необратимые*. После удаления (например, путем диализа) ингибитора первого типа активность фермента восстанавливается; во втором случае ингибитор удалить не удастся или активность фермента не восстанавливается даже после удаления ингибитора (наступает денатурация ферментного белка). Необратимое ингибирование достигает максимума, когда весь фермент связан с ингибитором. Обратимое ингибирование достигает состояния равновесия, положение которого определяется *константой ингибирования* (K_i), характеризующей сродство фермента к ингибитору. Схема обратимого ингибирования приведена ниже:



При этом, если константа диссоциации комплекса $K_s = K_m$ равна:

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

то константа ингибирования определяется следующим соотношением:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}.$$

При конкурентном ингибировании субстрат и ингибитор связываются с одним и тем же активным центром фермента. В присутствии ингибитора снижается сродство фермента к субстрату (повышается величина K_m). Величина V_{\max} не изменяется, так как при «насыщающей» концентрации субстрат вытесняет ингибитор из комплекса с ферментом.

При *неконкурентном ингибировании* субстрат и ингибитор связываются с разными центрами фермента. При этом величина K_m не изменяется, а величина V_{\max} снижается.

Возможны также промежуточные или альтернативные случаи, например, когда ингибитор связывается не с ферментом, а с фермент-субстратным комплексом, как в случае *бесконкурентного ингибирования*, при котором изменяются оба кинетических параметра.

Для определения типа ингибирования обычно используют график Лайнуивера—Берка, полученный для данного субстрата в отсутствие и в присутствии ингибитора.

При конкурентном ингибировании, если определена величина K_m в присутствии ингибитора (обозначим ее K_{mi}), можно рассчитать константу ингибирования (K_i) по следующей формуле:

$$K_{mi} = K_m \left(1 + \frac{I}{K_i} \right); \text{ отсюда } K_i = \frac{K_m I}{K_{mi} - K_m}.$$

При неконкурентном ингибировании с помощью определения измененной величины V_{\max} ($V_{\max i}$) можно рассчитать K_i по следующей формуле:

$$V_{\max i} = \frac{V_{\max} K_i}{K_i + I}; \text{ отсюда } K_i = \frac{V_{\max i} I}{V_{\max} - V_{\max i}}.$$



Глава 6. Принципы биоэнергетики

Все биохимические процессы в клетке взаимосвязаны и взаимозависимы, тем не менее часть из них преимущественно выполняет функцию построения клеточного материала, а часть — снабжения источниками энергии этих «строительных работ». Поэтому принято разделять биохимические процессы на два основных типа: *ассимиляционные (конструктивные)*, называемые *анаболизмом*, включающим синтез низкомолекулярных предшественников и построения из них молекул биополимеров, и *диссимиляционные (энергетические)*, называемые *катаболизмом*, состоящим в обеспечении источника энергии, «энергетического привода», приводящего в движение анаболизм.

Рассмотрим основные механизмы процессов трансформации энергии в клетке, т. е. механизмы катаболических процессов.

6.1. Пути и механизмы преобразования энергии в живых системах

Главная задача *энергетического метаболизма* — аккумуляция энергии, полученной в результате окислительно-восстановительных превращений субстратов в такую форму, которая может быть использована для роста клеток и осуществления всех их функций.

Основными формами аккумуляции энергии в клетках являются *трансмембранная разность электрохимических потенциалов ионов* (в основном ионов H^+ и Na^+), а также «*макроэргические*» химические соединения (главным образом, нуклеозидтрифосфаты, фосфоенолпируват, ацилфосфаты, неорганический пирофосфат и др.).

В клетках, как и в неживых системах, самопроизвольно протекают только те химические процессы, которые приводят к *уменьшению свободной энергии* системы, т. е. той доли общей энергии, которая может быть превращена в работу ($\Delta G < 0$). Такие реакции называют *экзергоническими*. Напротив, если $\Delta G > 0$, то реакция не может протекать самопроизвольно, так как требует притока энергии (*эндэргонические* реакции).

Кратко рассмотрим основные уравнения химической термодинамики.

Уравнение Гиббса описывает взаимосвязь между свободной энергией, энтальпией и энтропией:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S,$$

где ΔH — изменение энтальпии;
 ΔS — изменение энтропии.

При *реакциях в растворах* изменение свободной энергии определяется уравнением:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + 2,303 RT \lg K_{\text{eq}},$$

где R — газовая постоянная (1,987 кал/моль · К);
 T — абсолютная температура (°К);
 K_{eq} — константа равновесия химической реакции.

При *стандартных условиях* (давление 1 атм, температура 25°С или 298°К и рН 7,0) каждая химическая реакция характеризуется свободной энергией, вычисляемой по формуле (в состоянии равновесия $\Delta G = 0$):

$$\Delta G^\circ = -2,303 RT \lg K_{\text{eq}} \text{ или } \Delta G^\circ = -1,363 \lg K_{\text{eq}} \text{ ккал/моль}^{-1} \text{ при } 25^\circ\text{C}.$$

При *окислительно-восстановительных реакциях* изменение свободной энергии определяется уравнением:

$$\Delta G^\circ = \Delta G^\circ_{\text{ок}} - \Delta G^\circ_{\text{ред}} = nF (E'_{0_{\text{ок}}} - E'_{0_{\text{ред}}}),$$

где n — количество переиспущенных электронов;
 F — число Фарадея: заряд одного моля электронов (23062 кал · моль⁻¹ · В⁻¹);
 E'_0 — стандартный окислительно-восстановительный потенциал (рН 7,0) для окислителя и восстановителя, В.

Эти уравнения удобно применять при расчетах. Например, можно подсчитать, сколько энергии выделяется в результате дыхания (которое условно можно рассматривать как окисление NADH кислородом):

$$E'_{0_{\text{ред}}} \text{ для системы } \text{NAD}^+/\text{NADH} \text{ равен } -0,32 \text{ В};$$

$$E'_{0_{\text{ок}}} \text{ для системы } \text{O}_2/\text{H}_2\text{O} \text{ равен } +0,815 \text{ В};$$

$$n = 2,$$

таким образом,

$$\Delta G = 2 \cdot 23\,062 \text{ кал} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{В}^{-1} [0,815 - (-0,32)] \text{ В} = 52351 \text{ кал/моль}.$$

6.2. Классификация энергетических процессов

Энергетические процессы в нефототрофных организмах подразделяются на *аэробные* и *анаэробные* в зависимости от участия или не участия в них молекулярного кислорода.

Аэробное дыхание — энергетический процесс, при котором конечным акцептором электронов окисляемого субстрата, передающихся по электрон-транспортной цепи, является *молекулярный кислород*.

В *анаэробном дыхании* конечными акцепторами электронов становятся другие окислители: нитрат-, сульфат-анионы, катионы металлов, органические вещества.

Брожение — энергетический процесс, при котором электроны передаются непосредственно от донора к акцептору *без участия электрон-транспортной цепи*: гликолиз, молочнокислое брожение и др.

Перечисленные процессы можно классифицировать на основе *механизма образования АТР*, являющегося основным макроэргическим соединением, запасующим энергию в своих химических связях. Различают образование АТР в результате переноса электронов по дыхательной цепи — *окислительное фосфорилирование*, а также образование АТР в процессах, не связанных с переносом электронов по цепи (брожения и др.) — *субстратное фосфорилирование*. В настоящее время первый тип процессов (т. е. окислительное фосфорилирование) правильнее называть *образованием АТР за счет трансформации энергии трансмембранного электрохимического потенциала (ТЭП)* или сокращенно — *мембранным фосфорилированием*.

У *фототрофных* организмов (растений, фотосинтезирующих бактерий) основным способом запасаания энергии является *фотофосфорилирование*, т. е. образование АТР за счет трансформации энергии ТЭП, формируемого путем утилизации световой энергии.

6.3. Роль АТР и ТЭП в запасаании энергии

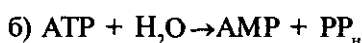
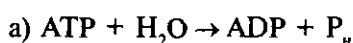
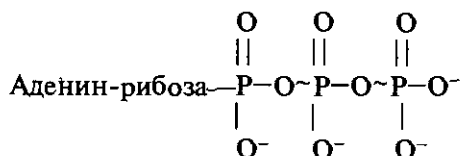
АТР был открыт в 1929 г. К. Фиске и И. Суббароу, а в 1930 г. В. Энгельгард показал возможность его образования в процессе переноса электронов по дыхательной цепи. В 1941 г. Ф. Липман выдвинул концепцию, рассматривающую АТР как «конвертируемую энергетическую валюту».

Почему в процессе эволюции именно АТР выпала такая роль? Для этого есть несколько причин, обусловленных свойствами данного соединения.

1. *Изменение свободной энергии* при гидролизе фосфоангидридных связей довольно велико — около 10 ккал/моль. Когда необходима энергия *меньшая* или *равная* 10 ккал/моль, гидролиз идет по

реакции А. Если необходима энергия ненамного большая, чем 10 ккал/моль — по реакции Б. При необходимости энергии, значительно превышающей 10 ккал/моль, используется несколько молекул АТФ в одном процессе. Иногда дополнительная энергия выделяется при сорбции АТФ на ферменте.

Гидролиз



AMP

ADP

ATP

2. Скорость неферментативного гидролиза АТФ мала, т. е. молекула химически стабильна, и запасенная в ней энергия не рассеивается в виде тепла при спонтанном гидролизе. Однако замена Р на Аз резко повышает лабильность. Этим обстоятельством объясняется ингибиторное действие арсената (AsO_4^{3-}) на энергетический метаболизм: конкурируя с ортофосфатом, он включается вместо него в АТФ, а образовавшееся соединение подвергается спонтанному гидролизу.

3. Малые размеры молекулы АТФ позволяют ей свободно проникать в различные участки клетки, в то же время цитоплазматическая мембрана для нее непроницаема, следовательно, «утечка» АТФ не происходит.

4. «Выбор» АТФ как нуклеотида был вызван, по-видимому, необходимостью взаимодействия с белками, так как взаимодействие белков с моно- и полинуклеотидами лежит в основе жизнедеятельности.

5. «Выбор» в качестве пуриновой части молекулы аденозина, вероятно, обусловлен его промежуточными электроннодонорными и акцепторными свойствами, что обеспечивает взаимодействие с широким кругом партнеров. Кроме того, среди азотистых оснований аденин наиболее устойчив к действию ультрафиолета, что могло иметь значение на ранних этапах формирования живых систем.

При описании механизма образования АТФ путем мембранного фосфорилирования в настоящее время общепринятой является хемиосмотическая теория сопряжения окисления и фосфорилирования, предложенная П. Митчеллом в 1961 г. Согласно этой тео-

рии в «сопрягающих» мембранах локализованы два типа систем («насосов», pumps), способных к транслокации протонов: *электрон-транспортная цепь* и *H⁺-АТРаза*, координированная работа которых приводит к формированию *трансмембранной разности электрохимического потенциала протонов* (ТЭП, protonmotive force), — а затем АТР. Таким образом, первичной формой запасаения энергии при дыхании является ТЭП (рис. 15).

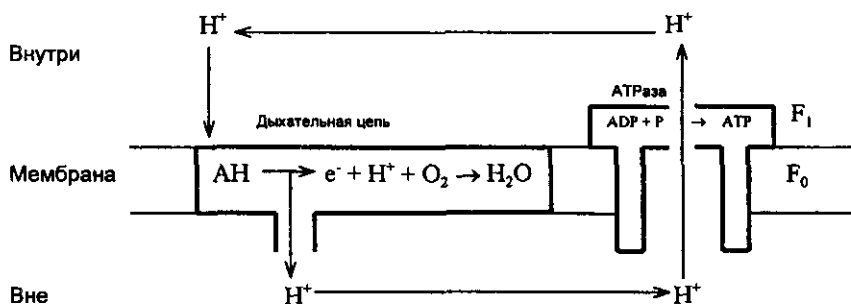


Рис. 15. Схема циркуляции протонов

В процессе дыхания протоны окисляемого субстрата выбрасываются из мембраны с помощью протонных насосов дыхательной цепи во внешнюю среду (или периплазму) в случае прокариот, а в случае эукариот — в межмембранное пространство митохондрий. Поскольку мембрана непроницаема для протонов, их возврат в клетку возможен только через канал АТРаза (и другие транспортные каналы), при этом АТРаза трансформирует энергию ТЭП в АТР (или энергия ТЭП непосредственно используется для обеспечения других эндэргонических процессов: транспорта, движения и др.)

Количество энергии, запасенной в форме ТЭП ($\Delta\mu_{H^+}$), прямо пропорционально количеству транслоцированных протонов: $\Delta G = n\Delta\mu_{H^+}$ и складывается из двух составляющих: химической (градиента рН, ΔpH) и электрической (разности электрических потенциалов, $\Delta\phi$):

$$\Delta\mu_{H^+}/F = \Delta p = \Delta\phi - 2,3(RT/F)\Delta pH \text{ (мВ)},$$

где $2,3RT/F = Z = 59 \text{ мВ}$ при 25°C ;

Δp — протондвижущая сила (pmf);

$$\Delta pH = pH_{\text{out}} - pH_{\text{in}} < 0.$$

Для образования АТР необходима ΔG около 250 мВ (перенос двух протонов). Примерно такая величина ТЭП и создается на мембранах митохондрий и прокариотических клеток, хотя вклад каждой из составляющих различен. Например, у ацидофильных бактерий ТЭП практически полностью состоит из ΔpH , а у алкалофилов — из $\Delta\phi$ (из-за того, что внутриклеточный рН постоянен и не очень сильно отклоняется от 7).

Важно отметить, что АТРазный комплекс может не только утилизировать ТЭП с образованием АТР, но и формировать его за счет гидролиза АТР, осуществляя таким образом взаимное превращение этих двух форм энергии.

6.4. Первичные и вторичные генераторы ТЭП

Первичные генераторы используют энергию света или химических связей субстратов для формирования ТЭП. АТР в этих процессах не участвует. К первичным генераторам ТЭП относятся:

дыхательная цепь, содержащая от 1 до 3 протонных насосов;
 фотосинтетическая цепь, содержащая 1—2 протонных насоса;
 бактериородопсин галофильных архебактерий (архей);

системы экскреции кислых продуктов брожения у бактерий (например, лактата) в неионизированной форме.

Вторичные генераторы используют энергию АТР (или аналогичного макроэнергетического соединения) для формирования ТЭП. Они представляют собой H^+ -АТФазы, основной функцией которых является не синтез, а гидролиз АТР. Такие АТРазы характерны для цитоплазматической мембраны анаэробных бактерий, плазмалеммы клеток эукариот, мембраны вакуолей (тонопласта) растений и грибов.

Таким образом, основные пути трансформации энергии в клетке можно суммировать в виде схемы (рис. 16).

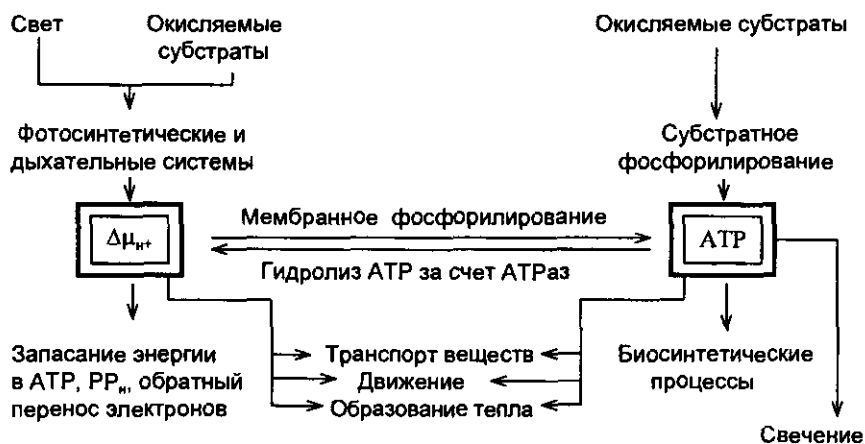


Рис. 16. Схема трансформации энергии в живой клетке

6.5. Энергетический заряд и энергетическая эффективность роста

Количество АТР, образующегося в разных метаболических путях, различается во много раз. Так, при *катаболизме глюкозы* по гликолитическому пути с последующим включением цикла трикарбоновых кислот и дыхания (с тремя пунктами сопряжения окисления и фосфорилирования) образуется *38 моль АТР на моль глюкозы*.

У некоторых бактерий (типа *Escherichia coli*) в дыхательной цепи существует лишь два пункта сопряжения и количество образованного АТР составит *26 моль на моль глюкозы*. Сам по себе гликолиз в анаэробных условиях приводит к образованию лишь *2 молей АТР на моль глюкозы* (например, у молочнокислых бактерий).

Не только общее количество синтезированного АТР, но и расход АТР на образование единицы биомассы сильно зависит от типа метаболизма. Так, например, при выращивании бактерий на среде с глюкозой *1 моль АТР* обеспечивает образование *27 г биомассы*, тогда как на среде с CO_2 (в качестве единственного источника углерода) *1 моль АТР* — только *5 г биомассы*. При различных типах *анаэробных брожений* выход биомассы на моль синтезированного АТР все же достаточно постоянен и составляет около *10*. Этот показатель получил обозначение $Y_{\text{АТР}}$ и используется для характеристики роста наряду с *экономическим коэффициентом* (отношением массы образовавшихся клеток к массе использованного субстрата).

Определенная часть клеточной энергии затрачивается на процессы, не связанные непосредственно с ростом. Их называют *процессами поддержания жизнедеятельности* (осмотическая работа, подвижность, обновление клеточного материала и т.д.). Затраты на поддержание жизнедеятельности составляют 10—20% всех энергетических расходов.

Важное значение имеет не только абсолютное количество АТР в клетке, но и *соотношение компонентов аденилатной системы*, так как АТР, АДФ и АМФ являются мощными регуляторами метаболических процессов. Д. Аткинсон ввел понятие *энергетического заряда* (ЭЗ), как меры «заполнения» аденилатной системы макроэргами:

$$\text{ЭЗ} = 1/2 \frac{2\text{АТР} + \text{АДФ}}{\text{АТР} + \text{АДФ} + \text{АМФ}} = \frac{\text{АТР} + 0,5\text{АДФ}}{\text{АТР} + \text{АДФ} + \text{АМФ}}$$

Теоретически ЭЗ может варьировать от 0 до 1, однако реально в *экспоненциально растущих клетках* он составляет 0,8—0,9, а при снижении его величины до 0,5 клетка погибает.

6.6. Основные типы сопряжения энергетических и конструктивных процессов

Первоначально биологи подразделяли все живые организмы по типу питания на две группы: *автотрофов* (типичный пример — растения, которые обходятся без органической пищи) и *гетеротрофов* (животные, нуждающиеся в ней).

В настоящее время применяется более детальная классификация, основанная на указании *природы источника энергии* и *природы источника углерода*. Соответственно, в названии типа питания организма используются следующие обозначения:

Вид энергии	Донор электронов	Источник углерода
Химическая — хемо-	Органические вещества — органи-	Органические вещества — гетеротроф
Световая — фото-	Неорганические вещества — лито-	Неорганические вещества — автотроф

Таким образом, по этой классификации растения следует отнести к *фото-лито-автотрофам*, а животных — к *хемо-органогетеротрофам*. Всего же при сочетании этих характеристик возможны восемь основных типов соотношений между энергетическими и конструктивными процессами (табл. 6).

Некоторые организмы способны осуществлять только одии из перечисленных типов питания (например, растения и животные),

Таблица 6. Основные типы питания

Источник энергии	Донор электронов	Источник углерода	Тип питания	Организмы-представители
Химические реакции	Неорганические вещества	CO ₂	Хемолитоавтотрофия	Прокариоты (водородные, нитрифицирующие и др. бактерии)
		Органич. вещества	Хемолитогетеротрофия	Прокариоты (водородные, метановые и др. бактерии)
	Органические вещества	CO ₂	Хеморганавтотрофия	Прокариоты (метилотрофы, окисляющие формиаг)
		Органич. вещества	Хемоорганогетеротрофия	Животные и многие прокариоты

Источник энергии	Донор электронов	Источник углерода	Тип питания	Организмы-представители
Свет	Неорганические вещества	CO ₂	Фотолитоавтотрофия	Растения, цианобактерии, пурпурные и зеленые бактерии
		Органич. вещества	Фотолитогетеротрофия	Прокариоты (некоторые цианобактерии, пурпурные и зеленые бактерии)
	Органические вещества	CO ₂	Фотоорганавтотрофия	Прокариоты (некоторые пурпурные бактерии)
		Органич. вещества	Фотоорганогетеротрофия	Прокариоты (галобактерии, цианобактерии, пурпурные и зеленые бактерии)

тогда как другие могут переключаться с одного типа питания на другой (бактерии). Последние организмы называют *факультативными* (например, некоторые цианобактерии способны существовать как фотолитоавтотрофно, так и хемоорганогетеротрофно).



Глава 7. Аэробные энергетические процессы

По отношению к молекулярному кислороду организмы подразделяются на *аэробов* (для которых кислород необходим) и *анаэробов* (для которых кислород безразличен или токсичен). В свою очередь, аэробы и анаэробы подразделяются на *облигатные* (обязательные) и *факультативные* (не обязательные) (см. схему, рис. 17). Некоторые облигатные аэробы могут существовать при содержании кислорода, равном его содержанию в атмосфере (21%) или превышающем эту величину (до 50%), но встречаются те, которые не переносят уровень кис-

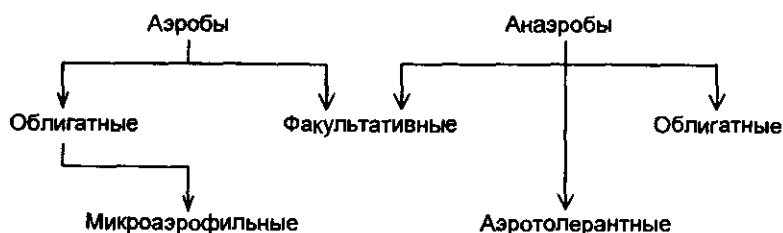


Рис. 17. Классификация организмов по степени аэробности и анаэробности

лорода, превышающий несколько процентов (*микроаэрофилы*). В свою очередь, некоторые анаэробы, хотя и не используют кислород, но переносят его высокие концентрации в окружающей среде (*аэротолеранты*). Ряд микроорганизмов может резко менять чувствительность к кислороду в зависимости от типа питания, например *водородные бактерии* при выращивании в гетеротрофных условиях аэротолерантны, а в автотрофных — *микроаэрофильны*.

7.1. Аэробное дыхание. Дыхательная цепь

При *аэробном дыхании* в качестве конечного акцептора электронов используется *молекулярный кислород* (см. § 6.2). Аэробное дыхание характерно для большинства животных и растений и широко распространено в мире прокариот. На первом его этапе

субстраты подвергаются *дегидрированию* с помощью специфических ферментов — *дегидрогеназ*. Образующиеся в результате дегидрирования восстановленные NADH или FAD (FMN) вступают в *дыхательную цепь* (рис. 18).

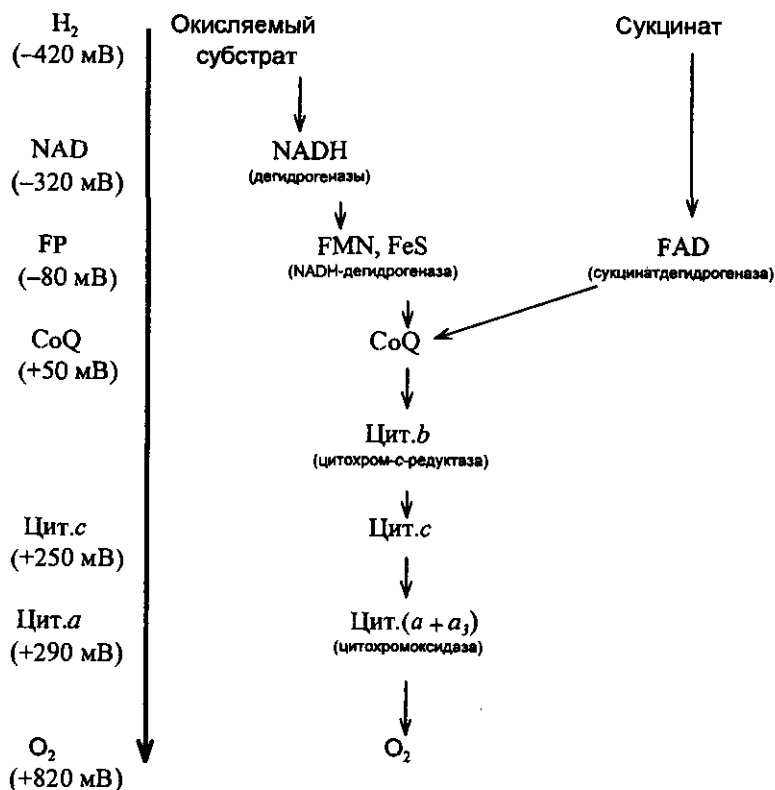


Рис. 18. Упрощенная схема дыхательной цепи

Показана дыхательная цепь, характерная для митохондрий и некоторых бактерий. В такой цепи «протонными насосами», создающими ТЭП, являются NAD- и сукцинатдегидрогеназы, цитохром-с-редуктаза и цитохромоксидаза:

NAD — никотинамид-адениндинуклеотид; FP — флавопротеины, содержащие FMN (флавоинмононуклеотид) или FAD (флавоин-адениндинуклеотид) и FeS (железо-серные центры); CoQ — кофермент Q (убихинон); Цит.в,с,а — соответствующие цитохромы

Основной субстрат дыхания — *восстановленный NAD* — образуется в результате катаболизма сахаров, органических кислот, аминокислот и других субстратов в процессе функционирования метаболических путей, которые прямо не зависят от присутствия кислорода и могут осуществляться в анаэробных условиях. К ним

относятся гликолиз и другие пути метаболизма сахаров, цикл трикарбоновых кислот, системы окисления жирных кислот и др. Полученный в результате дегидрирования субстратов NADH частично используется в конструктивных процессах (в том числе — после передачи водорода на NADP путем трансгидрогеназной реакции), а в основном окисляется через дыхательную цепь.

Природу компонентов дыхательной цепи и порядок их расположения определяли химическими, физико-химическими и биохимическими методами, среди которых важное место занимают дифференциальная спектрофотометрия и ингибиторный анализ. Их сочетание позволяет определить, какие именно компоненты участвуют в окислении данного субстрата и какова последовательность их расположения в дыхательной цепи.

Специфическими ингибиторами дыхания служат следующие вещества:

ингибиторы NADH-дегидрогеназы: барбитураты (пример — амитал — 5-этил-5-изоамилбарбитурат натрия, обычно используемая концентрация 10^{-3} M);

ротенон (инсектицид, получаемый из растительного сырья, 10^{-6} M);

ингибитор цитохром-с-редуктазы: антимицин А (10^{-6} — 10^{-7} M);

ингибиторы цитохромоксидазы: HCN (10^{-3} M), CO (50% в газовой фазе).

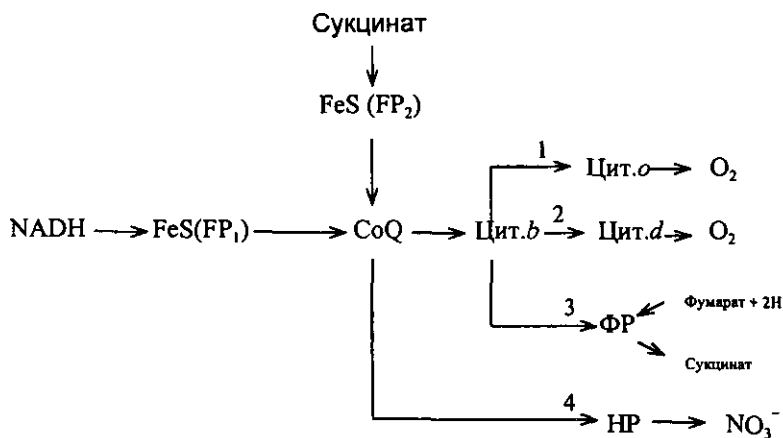
Однако существует и цианид-резистентное дыхание.

Блокирование переноса электронов ингибитором приводит к тому, что переносчики, находящиеся на участке, предшествующем ингибируемому, переходят в восстановленное состояние (в результате продолжающего притока водорода и/или электронов от предшествующих компонентов дыхательной цепи), тогда как переносчики, находящиеся после ингибируемого участка, переходят в окисленное состояние (в связи с оттоком электронов на кислород (кроме самого конечного пункта цепи)).

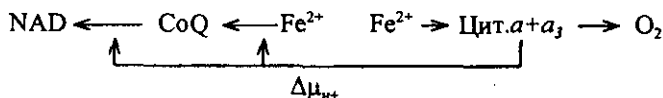
В отличие от митохондрий, состав дыхательной цепи у прокариот часто зависит не только от вида микроорганизма, но и от типа его питания, а также от содержания кислорода в газовой фазе. Примером может служить дыхательная цепь *Escherichia coli* (рис. 19а).

7.2. Обратный перенос электронов

В тех случаях, когда окисляемые субстраты — доноры электронов и протонов имеют высокий окислительно-восстановительный



а)



б)

Рис. 19. Схемы:

а) дыхательной цепи *Escherichia coli*. Обозначения, как на рис. 18. Путь 1 реализуется в аэробных условиях. Путь 2 существует в микроаэробных условиях (при низком содержании кислорода). Пути 3 и 4 функционируют в анаэробных условиях с использованием в качестве конечных акцепторов электронов (и протонов) фумарата (ФР — фумаратредуктаза) или нитрата (НР — нитратредуктаза).

б) обратного переноса электронов (на примере дыхательной цепи *Thiobacillus ferrooxidans*, с упрощениями)

потенциал (например, Fe^{2+} , +420 мВ), они включаются в дыхательную цепь на уровне цитохромного звена (в данном случае — цитохромоксидазы). Это приводит к тому, что, во-первых, в дыхательной цепи остается только один пункт сопряжения, и для обеспечения энергетических потребностей клетки она должна функционировать с высокой скоростью (скорость дыхания *Thiobacillus ferrooxidans* в пересчете на 1 мг белка в семь раз выше, чем у митохондрий). Во-вторых, для восстановления NADP используется обратный перенос электронов за счет ТЭП, создаваемого на цитохромоксидазном участке (рис. 19б).

7.3. Эволюция путей аэробного метаболизма

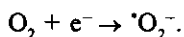
Системы дыхания современных организмов являются продуктом длительной эволюции жизни от *анаэробных* к *аэробным* условиям. Принято считать, что первичная атмосфера Земли носила восстановительный характер и практически не содержала кислорода. В нее входили такие газы как CO_2 , CH_4 , N_2 , NH_3 , H_2 и некоторые другие — в меньших количествах. Поэтому первые живые организмы, скорее всего, были *анаэробами*.

Основная масса кислорода образовалась, по-видимому, в результате жизнедеятельности *фотосинтезирующих организмов* (подобия цианобактерий, а затем растений). Первые аэробные микроорганизмы могли появиться на Земле около 2 млрд лет назад в соответствии с последовательностью, отраженной на схеме:

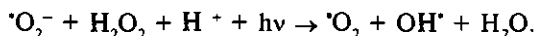
Анаэробы → фототрофы → аэротолеранты → аэробы → аэробы.
(факультативные) (облигатные)

На начальных этапах эволюции организмы вынуждены были *защищаться* от окислительного действия кислорода и, вероятно, не обладали способностью *запасать* энергию, выделяющуюся при окислении субстратов с участием кислорода. Защита могла осуществляться двумя основными путями: *пассивным*, т. е. переходом в экологические ниши, где кислород отсутствует, и *активным* — детоксикацией кислорода. Системы детоксикации сохранились и у современных организмов.

Одним из самых токсичных продуктов восстановления кислорода является *супероксидный анион-радикал*, образующийся при одноэлектронной реакции:

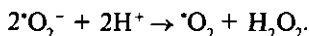


Такие анион-радикалы могут возникать в результате многих метаболических реакций: при взаимодействии с кислородом компонентов дыхательной и фотосинтетической цепей (восстановленных флавинов, хинонов, тиолов, железосерных белков и др.), а также абиогенно в результате фото- и электрохимических процессов в водной среде. Время жизни супероксидных анионов относительно велико, они могут проникать в клетки и превращаться в другие токсичные продукты: *гидроксильные радикалы* и *синглетный кислород*.



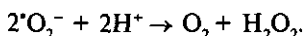
Радикал OH^\cdot образуется также при радиационном разложении воды и является самым сильным из всех известных окислите-

лей. Относительно синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) нужно отметить, что в норме электронные оболочки атома кислорода находятся в стабильном (триплетном) состоянии, однако при возбуждении (например, при поглощении кванта света) атом кислорода может переходить в синглетное состояние с повышенной реакционной способностью, которое возникает и при дисмутации супероксидного аниона:



Таким образом, клетке и в современных условиях необходимы защитные механизмы для детоксикации как супероксид-аниона, так и других форм «активного» кислорода.

Основными защитными ферментами являются *супероксиддисмутаза*, *каталаза* и *пероксидаза* (два последних фермента разрушают перекись водорода, предотвращая образование гидроксид-радикала). Супероксиддисмутаза катализирует реакцию с образованием невозбужденного, триплетного кислорода:



Некоторые клеточные пигменты (например, *каротиноиды*) также играют защитную роль, «перехватывая» синглетный кислород.

Только после выработки систем *защиты* эволюция могла приступить к созданию систем, которые позволили бы *утилизировать* энергию, полученную при окислении субстратов с участием кислорода. Результатом такой эволюции и являются современные *дыхательные системы*.



Глава 8. Анаэробные энергетические процессы

Наиболее распространенным способом получения энергии в анаэробных условиях являются различные виды брожений. В случае животных и растительных клеток это *гликолиз*, у прокариот типы брожений значительно разнообразнее.

И гликолиз, и некоторые другие анаэробные процессы диссимиляции являются лишь подготовительными этапами для последующих аэробных процессов получения энергии, и, как правило, животные и растительные клетки не могут расти только за счет анаэробных процессов катаболизма (за исключением некоторых паразитических форм). Среди прокариот, напротив, существует множество облигатно анаэробных форм, способных расти только за счет анаэробных способов получения энергии. Мы последовательно рассмотрим главные типы анаэробных энергетических процессов: *анаэробное дыхание, бескислородный фотосинтез и разные виды брожений*.

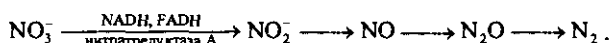
8.1. Анаэробное дыхание

Механизм этого процесса сходен с аэробным дыханием и также использует цепь переноса электронов. Однако конечным акцептором электронов служит не кислород, а другие неорганические или органические вещества. В зависимости от природы конечного акцептора различают *нитратное, сульфатное, карбонатное, фумаратное* типы дыхания и др.

Нитратное дыхание. От нитратного дыхания следует отличать *ассимиляционную нитратредукцию*, которая может происходить как в аэробных, так и в анаэробных условиях и служит для получения *аммонийной формы азота*, используемой в конструктивных процессах. Этот процесс осуществляется «растворимыми» ферментами: *нитратредуктазой* и *нитритредуктазой* и не связан с запасанием энергии. В процессе ассимиляционной нитратредукции не образуется летучих продуктов (молекулярного азота или его окислов):

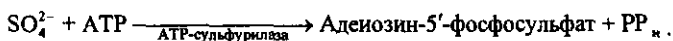


Нитратным дыханием, или *денитрификацией*, называется *диссимилиационная нитратредукция*, приводящая к образованию молекулярного азота с участием *цепи переноса электронов* и сопровождающаяся *запасанием энергии*. В этом случае ферменты локализованы в мембране:



Полностью этот процесс протекает у *бактерий-денитрификаторов* (более 70 родов), тогда как у *Escherichia coli* и некоторых других бактерий осуществляется только первая стадия динитрификации, приводящая к накоплению в среде нитритов. Денитрификаторы, как правило, являются факультативными анаэробами, и кислород подавляет диссимилиационную нитратредукцию (в отличие от ассимиляционной). Денитрификация приводит к большим потерям азотных удобрений из почвы, поэтому для подавления денитрификации почву необходимо рыхлить (повышение аэрации).

Сульфатное дыхание. Как и в случае нитратредукции существует *ассимиляционная сульфатредукция*, при которой *сульфат* восстанавливается до *сульфида* с последующим использованием в конструктивных процессах (для биосинтеза серосодержащих аминокислот и др.). Первой стадией является *активация сульфата*:



Полученный аденозин-5'-фосфосульфат (аденилилсульфат, APS) повторно активируется АТР:



Дважды «активированный» 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат (PAPS) подвергается восстановлению сначала до *сульфита*, а затем до *сульфида*. Такой путь восстановления сульфата присущ широкому кругу организмов.

При *диссимилиационной сульфатредукции* или *сульфатном дыхании* на первом этапе также образуется APS, который прямо восстанавливается до *сульфита*, а затем у разных организмов происходит либо одноступенчатое, либо трехступенчатое восстановление сульфита до *сульфида* (рис. 20).

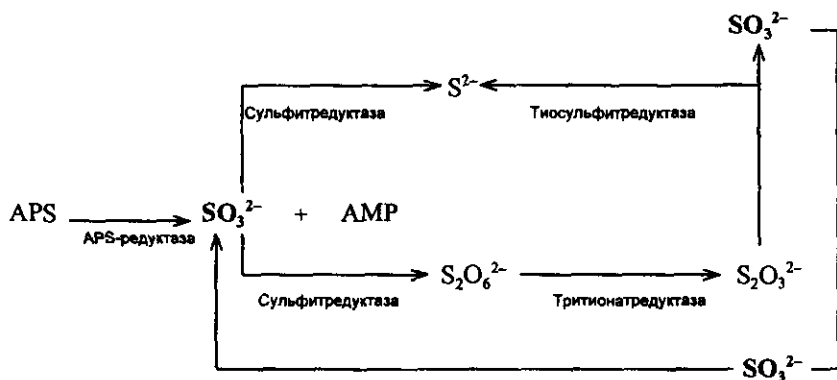
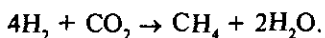


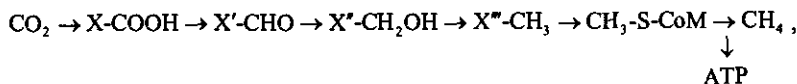
Рис. 20. Пути диссимиляционной сульфатредукции

Обнаружены три типа *сульфитредуктаз* (*десульфовиридин* — зеленого цвета, *десульфорубидин* — красного и *P-582* — коричневого), содержащих особый гем — *сирогем*. Другие сульфитредуктазы содержат цитохромы групп *s* или *b*. При использовании в качестве донора электронов *молекулярного водорода*, а для конструктивных процессов — *органических веществ* сульфатвосстанавливающие бактерии растут как *хемолитогетеротрофы* с образованием на 1 моль сульфата 3 молей АТФ, часть которых расходуется на активацию сульфата. Жизнедеятельность таких бактерий в природных условиях приводит к накоплению значительных количеств сероводорода (в водоемах), который может окисляться, образуя отложения серы. Эти бактерии вызывают также анаэробную коррозию металлов.

Карбонатное дыхание. При *карбонатном дыхании* в качестве конечного акцептора электронов используется CO_2 :



Как показано опытами с радиоизотопами, CO_2 акцептирует от водорода только *электроны*, так как *водород* метана происходит из *воды*. Процесс восстановления протекает ступенчато с использованием *цепи переноса электронов*, включающей дегидрогеназы, редуктазы и переносчики электронов, содержащие цитохромы *s* и *b*:



где CoM — кофермент М ($\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3\text{H}$, 2-меркаптоэтансульфокислота).

Карбонатное дыхание характерно для *метановых бактерий* (метаногенов), относящихся к архебактериям (археям). Многие из них могут использовать CO_2 в качестве единственного источника углерода, т. е. существовать *хемолитоавтотрофно*. Они являются *облигатными строгими анаэробами*. Показано образование АТР в процессе восстановления CO_2 до метана (ингибиторный анализ), но стехиометрия процесса не известна. В природных условиях метановые бактерии образуют метан в водоемах и болотах («болотный газ»), причем в некоторых полярных морях имеются отложения метана в виде кристаллогидрата. Метановые бактерии — один из главных компонентов систем очистки сточных вод. Они обитают также в рубце жвачных животных.

8.2. Брожения

Брожения — это такой тип энергетических процессов, при котором вещества, подвергающиеся химическим превращениям (как правило, органические), сами служат донорами и акцепторами электронов. Молекулярный кислород в этих процессах не участвует. Отсюда первое определение брожений, данное известным французским микробиологом Л. Пастером: «Брожение — это жизнь без воздуха».

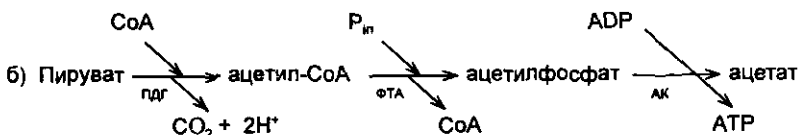
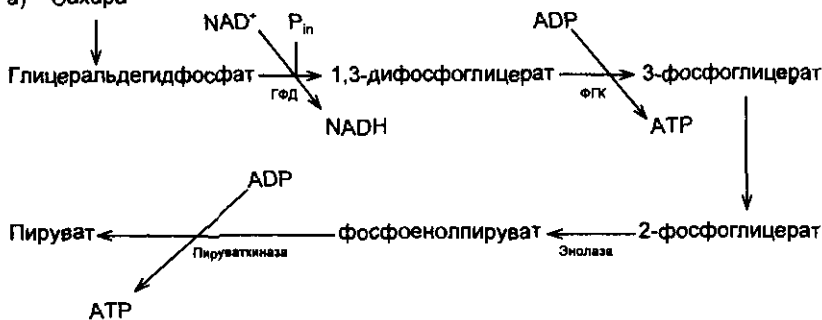
Запасание энергии при брожениях происходит либо путем *субстратного фосфорилирования* с образованием макроэргических соединений (АТР, РЕР), либо путем формирования ТЭП за счет экскреции неорганических ионов или кислых продуктов брожения. Несмотря на большое разнообразие типов брожений, которые обычно получают название по главному конечному продукту (*спиртовое, молочнокислое, маслянокислое, пропионовокислое, муравьинокислое, ацетон-бутиловое* и т.д.), субстратное фосфорилирование осуществляется в ограниченном количестве типовых реакций (рис. 21).

Наряду с субстратным фосфорилированием запасание энергии в процессах брожения может осуществляться путем формирования ТЭП. Так, некоторые облигатно анаэробные бактерии, осуществляющие брожения с образованием *метилмалонил-CoA*, способны формировать градиент ионов Na^+ ($\Delta p\text{Na}$) в процессе *декарбок্সилирования* этого соединения в *пропионил-CoA* (рис. 22).

Другим примером служит формирование градиента H^+ ($\Delta p\text{H}$) в процессе экскреции кислых продуктов брожения (уксусной, масляной, молочной кислот) (рис. 23). Вместе с анионом лактата через мембрану транслоцируются два протона (так называемый

Реакции окисления:

а) Сахара



Реакции расщепления, сопряженные с фосфорилированием:

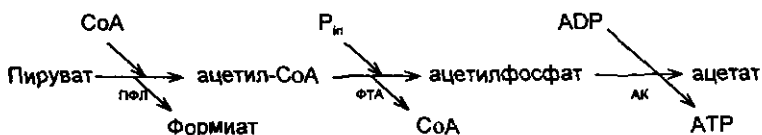


Рис. 21. Основные реакции субстратного фосфорилирования в брожениях

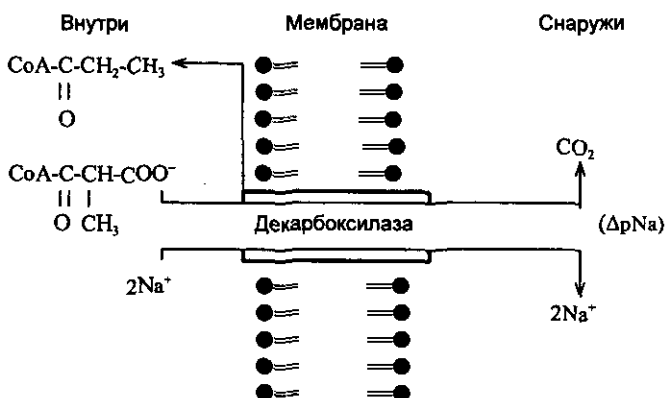


Рис. 22. Формирование $\Delta p\text{Na}$ за счет декарбоксилирования (на примере пропионовых бактерий *Propionibacterium modestum*)

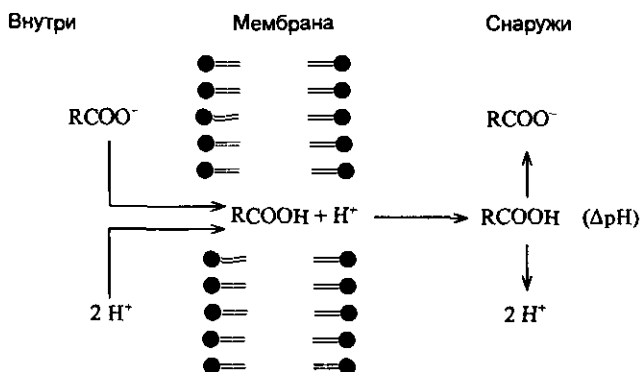


Рис. 23. Формирование ΔpH за счет экскреции органических кислот (на примере молочнокислых бактерий *Streptococcus cremoris*)

«симпорт»). Процесс может продолжаться до тех пор, пока концентрации лактата в среде и в клетке не сравняются. В результате создается ТЭП, который в дальнейшем может использоваться на энергетические нужды клетки.



Глава 9. Фотосинтез

До сих пор мы рассматривали организмы, которые для обеспечения конструктивных процессов используют энергию химических связей органических или неорганических веществ. Другая большая группа организмов способна обеспечивать конструктивный метаболизм за счет световой энергии в процессе, который получил название *фотосинтез*. Итак, *фотосинтез* — это процесс использования энергии светового излучения для построения живого вещества. Образование АТФ в процессе фотосинтеза называют *фотофосфорилированием*.

9.1. Основные процессы фотосинтеза, доноры электронов

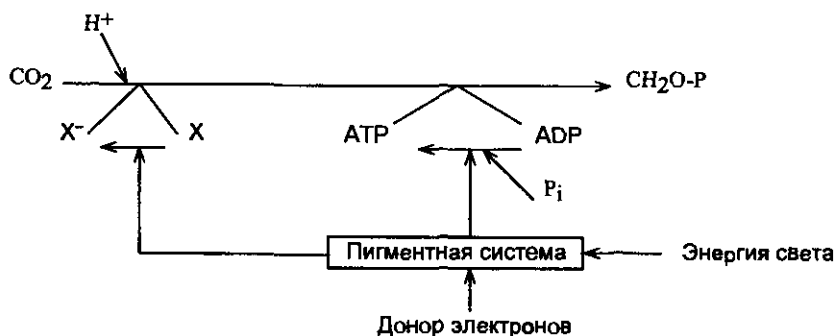


Рис. 24. Схема фотосинтетических процессов:

X и X⁻ — компоненты цепи переноса электронов, служащие восстановителями при фиксации CO₂; P_i — неорганический ортофосфат. Природа донора электронов зависит от вида организма

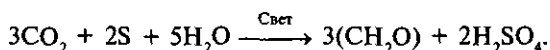
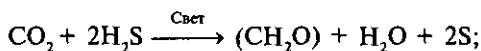
Окислительно-восстановительный потенциал *системы восстановителей фотосинтетической цепи (X⁻/X)* должен быть ниже -400 мВ (т. е. потенциала системы CO₂/CH₂O (CH₂O — обобщенная формула органических веществ — первичных продуктов фотосинтеза)). Обычные доноры электронов, используемые в фотосинтезе, не обладают столь низким потенциалом, поэтому для восстановления X необходим *обратный перенос электронов от молекулы*

пигмента (хлорофилла и др.) за счет энергии света. Донор электронов затем восполняет их дефицит в молекуле пигмента. Другой участок, на котором затрачивается энергия света, — *ресинтез АТФ*, расходуемого для «активирования» *продуктов фиксации CO₂*.

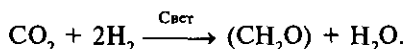
В случае *высших растений* и *цианобактерий* донором электронов является *вода*, в результате чего из нее освобождается кислород, т. е. фотосинтез в этом случае является *кислородным*, или *оксигенным*. Основными типами метаболизма здесь являются фотолитоавтотрофия (у растений и некоторых цианобактерий) или фотолитогетеротрофия (у других цианобактерий):



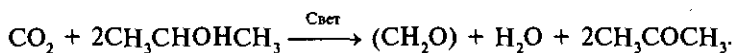
В случае ряда фототрофных прокариот (зеленых и пурпурных серных бактерий) донорами электронов являются *сероводород* или *сера*. Тогда фотосинтез является *бескислородным* или *аноксигенным*:



Некоторые *серные и несерные пурпурные бактерии* могут использовать в качестве доноров электронов *молекулярный водород*:



Наконец, *несерные пурпурные бактерии* используют в качестве донора электронов *органические вещества*. В этом случае основными типами метаболизма являются фотоорганавтотрофия и фотоорганогетеротрофия:

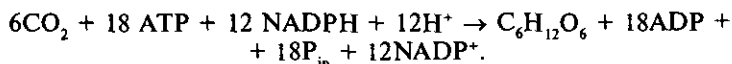


Таким образом, фотосинтез *растительного* и *бактериального* типа различается по: (1) природе пигментов (хлорофилл и бактериохлорофиллы); (2) использованию доноров электронов; (3) способности к выделению кислорода.

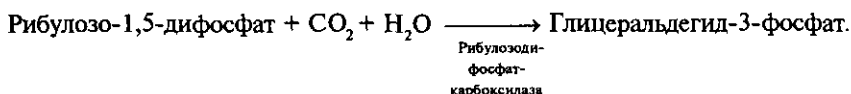
9.2. Путь углерода в фотосинтезе. Цикл Кальвина

Включение CO_2 в конструктивный метаболизм у фототрофов осуществляется в последовательности реакций. Она называется *циклом автотрофной фиксации углекислоты*, или *циклом Кальвина*, который сходен с *пентозофосфатным циклом* катаболизма саха-

ров у хемоорганогетеротрофов. Приведем суммарное уравнение этих реакций:



Для синтеза одной молекулы глюкозы здесь требуется 6 «оборотов» цикла (фиксация 6 молекул CO_2). В цикле Кальвина, по сравнению с пентозо-фосфатным циклом, для регенерации акцептора CO_2 необходимы две дополнительные реакции:



Дальнейшая последовательность реакций представляет собой «обращение» гликолиза, где в качестве восстановителя используется NADPH, что приводит к образованию глюкозы.

Аналогичный цикл фиксации CO_2 функционирует у *хемолитоавтотрофных* бактерий (у отдельных бактерий фиксация CO_2 идет по «обращенному» циклу трикарбоновых кислот, так называемому *циклу Арнона*).

У *растений* начальные ферменты цикла Кальвина локализованы в *хлоропластах*. В клетках *фототрофных бактерий* рибулозидифосфаткарбоксилаза найдена в *карбоксисомах*, хотя не исключено, что там она пребывает в латентном состоянии.

В процессе функционирования цикл Кальвина подвергается строгой метаболической регуляции. Особенно тонко регулируется активность *фосфорибулокиназы*, в частности, чувствительной к *энергетическому заряду* клетки (активность фермента подавляется избытком АМР) и к степени восстановленности NAD (фермент активируется NADH). Цикл работает эффективно только в условиях нормального снабжения энергией и восстановителями.

9.3. Бесхлорофильный фотосинтез

Особый тип фотосинтеза — без участия хлорофильных пигментов — обнаружен у *экстремально галофильных архебактерий*. Это единственный тип фотосинтеза, не включающий электронтранспортную цепь. Клетки галобактерий содержат особый белок — *бактериородопсин* (сходный со зрительным родопсином живот-



Глава 10. Процессы конструктивного метаболизма

В предыдущих главах нами рассмотрены способы и механизмы аккумуляции и трансформации энергии в клетке. Теперь кратко остановимся на основных путях построения *вещества клеток*, включающего как низкомолекулярные, так и высокомолекулярные продукты. В фундаментальных курсах биохимии подробно излагаются схемы метаболических путей, поэтому мы рассмотрим лишь некоторые принципиальные закономерности организации *конструктивных процессов*, называемые также *реакциями анаболизма*.

10.1. Взаимосвязь энергетических и конструктивных процессов в клетке

Взаимосвязь между реакциями, в результате которых энергия выделяется и может быть запасена в клетке, и теми, в которых она затрачивается на построение веществ клетки, удобнее всего рассмотреть на примере метаболизма глюкозы (и других сахаров), чаще всего выступающих в качестве «энергодающих» субстратов. При этом нужно иметь в виду два обстоятельства. Первое: в клетке на самом деле не существует резкого разграничения энергетических и конструктивных процессов. Как правило, в результате реакций катаболизма образуются такие промежуточные продукты, которые могут «подхватываться» ферментами анаболизма и использоваться для построения веществ клетки. Второе: в живой клетке широко применяется принцип организации биохимических процессов в виде *метаболических циклов*, когда исходный и конечный компоненты в реакции идентичны и циклы могут функционировать неопределенно длительное время при условии *притока субстратов и оттока продуктов*.

Рассмотрим пример, когда основным источником энергии и углерода служит глюкоза или содержащие глюкозу полисахариды (случай типичный для многих прокариот). Последовательность протекающих реакций изображена на рис. 26.

Утилизация полисахаридов начинается с их гидролиза (1). Гидролиз с участием *амилаз* приводит к образованию *олигосахаридов*

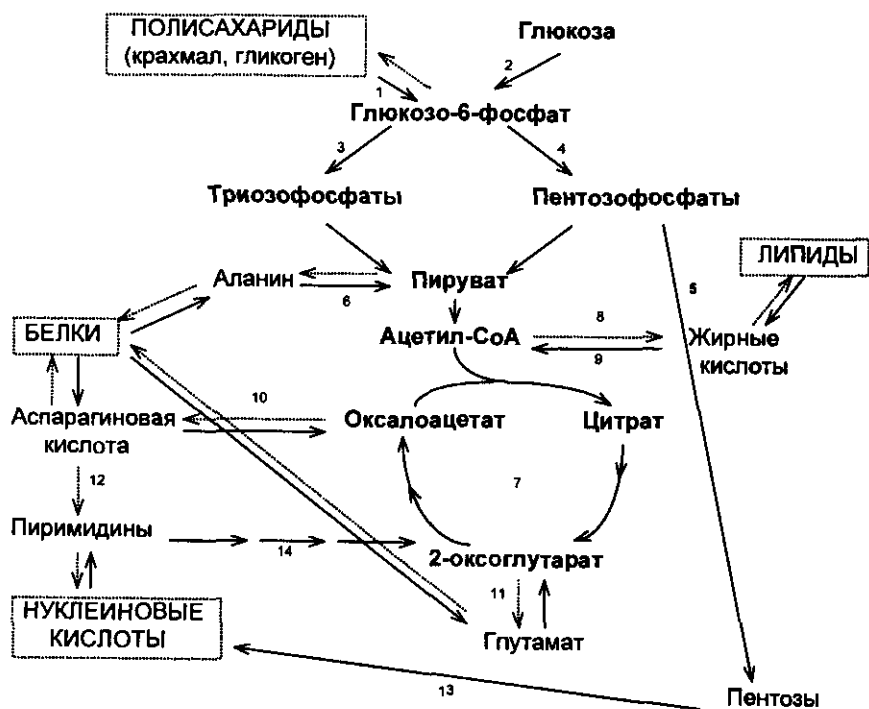


Рис. 26. Схема взаимосвязи энергетических и конструктивных процессов

и свободных сахаров, которые с помощью фосфорилаз превращаются в фосфорные эфиры сахаров. В случае глюкозы это чаще всего *глюкозо-6-фосфат*. Гидролиз с участием *фосфорилаз* сразу приводит к образованию фосфосахаров (подробнее — в главе 13). Обратная реакция — *синтез полисахаридов* — типичный анаболический процесс, протекающий с затратой энергии, смысл которого либо в образовании *запасных веществ*, либо в синтезе *структурных полисахаридов* (например, компонентов клеточной стенки). В этих случаях промежуточно образуются производные сахаров и нуклеотидов (например, *уридиндифосфатглюкоза*). Фосфорилирование свободной глюкозы катализируется *гексокиназой* (2). Этот процесс — первый этап *гликолиза* (3), где в результате через промежуточный синтез триозофосфатов образуется *пируват*. Он же получается и при функционировании *пентозофосфатного цикла* (4), или *пентозофосфатного шунта*, биосинтетическое значение которого состоит, в частности, в синтезе *пентоз* (5). Дальнейшие превращения пирувата приводят либо к синтезу *аланина* (6, чисто биосинтетический процесс), либо к образованию *ацетил-СоА*, «пи-

тающего» *цикла трикарбоновых кислот (ЦТК)* (7), значение которого рассмотрим подробнее чуть позже. При наличии готового аланина из него под действием соответствующей *деаминазы* вновь образуется пируват, вступающий в катаболические процессы. Ацетил-СоА может вступать на путь синтеза *жирных кислот* (8), приводящий, в конечном счете, к образованию *липидов*. В свою очередь, катаболизм липидов сопровождается их гидролизом с освобождением жирных кислот, которые далее деградируют до ацетил-СоА. Таким образом, ацетил-СоА находится в центре как катаболических, так и анаболических превращений многих субстратов, в частности углеводов и липидов (жирных кислот). Для завершения процесса окисления жирных кислот (до CO_2 и H_2O) ацетильные остатки, образующиеся в результате их β -окисления (9), необходимо также окислить. Это осуществляется в ходе ЦТК.

Представления о *цикле трикарбоновых кислот* сформулированы Х. Кребсом в 1937 г. (другое название процесса — *цикл Кребса*). ЦТК выполняет две важные задачи: 1) полное окисление многих субстратов (в том числе углеводов и жирных кислот, показанных на схеме), что обеспечивает клетку энергией, и 2) обеспечение промежуточных продуктов для синтеза ряда клеточных компонентов, в частности аминокислот — аспарагиновой и глутаминовой кислот, получаемых прямым аминированием кетокислот: оксалоацетата и 2-оксоглутарата (10 и 11 на схеме). Из них (и аланина) путем переаминирования могут быть получены многие другие аминокислоты, и в конечном счете — белки.

Возвращаясь к невозможности строгого разделения конструктивных и энергетических процессов, отметим, что относительные вклады гликолиза и ЦТК в энергетику и биосинтезы зависят от скорости роста организма. Изотопные исследования показали, что при высокой скорости роста *Escherichia coli* на среде с глюкозой ЦТК обеспечивает биосинтезы, тогда как гликолиз выполняет чисто энергетическую роль. При замедлении скорости роста их роли меняются: основная энергетическая функция принадлежит ЦТК, а гликолиз используется для гликогенеза, обеспечивая синтез и запасание полисахаридов в клетке. Такие пути метаболизма, играющие как энергетическую, так и конструктивную роль, принято называть *амфиболическими*.

Завершая рассмотрение схемы на рис. 26, отметим, что ЦТК вносит вклад в синтез всех важнейших биополимеров клетки, в том числе в синтез нуклеиновых кислот, через образование пиримидинов (12) и пуринов. Синтез пуринов осуществляется при участии пентозофосфатного шунта (предшественник *рибозо-5-фосфат*), но часть атомов углеродного скелета пуринов происхо-

дит из аминокислот: аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также формиата. Сахарная часть нуклеотидов происходит из пентоз (13), также образующихся в пентозофосфатном цикле. Пиримидины могут применяться и в энергетических процессах; их катаболизм протекает через образование метилмалонил-СоА, в конечном счете включающегося в ЦТК (14).

Пути синтеза этих и других компонентов клетки подробно изложены в фундаментальных курсах биохимии. На некоторых закономерностях синтеза биополимеров и механизмах регуляции этих процессов мы остановимся в последующих главах, а здесь рассмотрим имеющий чрезвычайно важное для конструктивного метаболизма значение процесс *азотфиксации*.

10.2. Азотфиксация

Азот относится к четырем элементам (С, Н, О, N) составляющим основу живого вещества (в количественном отношении). Однако подавляющая масса азота в биосфере представлена химически инертным молекулярным азотом атмосферы. Перевод его в форму, доступную для живых организмов, возможен тремя основными путями.

1. *Образование окислов азота* под воздействием электрических разрядов в атмосфере (во время грозы) — трудно поддается количественному учету, но вряд ли играет существенную роль в современных условиях.

2. *Образование аммиака* и окислов азота в химических реакциях в результате техногенных процессов, осуществляемых человеком и лежащих в основе производства азотных удобрений. По разным оценкам достигается связывание около $4 \cdot 10^7$ т азота в год.

3. *Фиксация азота* клетками бактерий, которая, как ни удивительно, примерно на порядок превышает результаты, достигнутые человеком в самых совершенных химических производствах — $2 \cdot 10^8$ т азота в год. Таким образом, совместная деятельность микроорганизмов приводит к связыванию ежегодно до 300 кг азота на гектар почвы.

Азотфиксация бактериями открыта С.Н. Виноградским в 1883 г. на примере выделенных из почвы бактерий, названных им в честь Л. Пастера *Clostridium pasteurianum*.

Фиксировать азот, т. е. превращать молекулярный азот в аммонийный, способны только *прокариоты*, и среди них это свойство распространено довольно широко. Процесс чрезвычайно энергоемок: для восстановления 1 молекулы N_2 необходимо затратить

12 молекул АТФ, иначе говоря, для ассимиляции 1 мг азота *Clostridium* перерабатывает 500 мг глюкозы.

Азотфиксация осуществляется с помощью фермента *нитрогеназы*, которая состоит из двух компонентов: малого (Fe-S-белка, *азоферредоксина*, чрезвычайно чувствительного к кислороду) и большого (Fe-Mo-белка, *молибдоферредоксина*). Некоторые нитрогеназы вместо или наряду с молибденом содержат ванадий.

Для функционирования нитрогеназы необходимы АТФ, ионы Mg^{2+} и восстановитель с низким окислительно-восстановительным потенциалом (ферредоксин или NADH) (рис. 27).

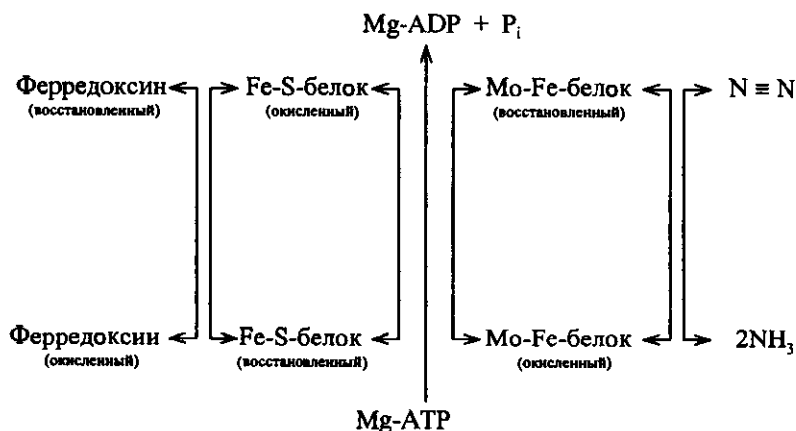
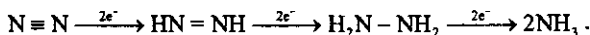
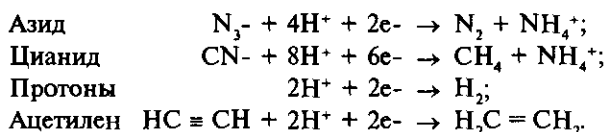


Рис. 27. Строение нитрогеназы и процесс азотфиксации: компоненты нитрогеназы — малый (Fe-S-белок) и большой (Mo-Fe-белок); P_i — неорганический ортофосфат

Для восстановления молекулы азота необходим перенос *шести* электронов, но за один цикл не может быть перенесено более *двух* электронов, поэтому процесс протекает не менее чем в *трех* последовательных стадиях:



При быстрой остановке реакции из инкубационной смеси удалось выделить гидразин. По-видимому, промежуточные продукты остаются прочно связанными с нитрогеназой, которая способна восстанавливать и ряд других соединений:



Способность нитрогеназы восстанавливать ацетилен в этилен позволила разработать простой метод определения нитрогеназной активности, весьма чувствительной к кислороду, за счет чего азотфиксация происходит либо у облигатно и факультативно анаэробных бактерий (*Clostridium*, *Klebsiella*), либо в анаэробных участках клетки аэробных бактерий (*Azotobacter*, *Rhizobium*). У *Rhizobium* азотфиксация происходит в клубеньках, образующихся на корнях бобовых растений после «заражения» растений этими бактериями. При этом клетки бактерий сильно видоизменяются, превращаясь в так называемые бактериоиды, а растения начинают синтезировать особый гемоглобин (*леггемоглобин*), которому приписывается способность защищать нитрогеназу от избытка кислорода. Известен также симбиоз покрытосеменных растений с азотфиксирующими актиномицетами, а голосеменных и папоротников — с цианобактериями. Урожайность злаковых заметно повышается в ассоциации с бактериями-азотфиксаторами рода *Azospirillum*. Азотфиксирующие штаммы *Klebsiella* обнаружены в кишечнике жителей Новой Гвинеи.



Глава 11. Регуляция биосинтеза белков на этапе транскрипции

Проблемы, связанные с регуляцией метаболических процессов — важнейшие в системе биохимических знаний, и делятся на два больших класса:

1. Представления о *молекулярных механизмах* процессов регуляции, которые являются, скорее, предметом *молекулярной биологии* и, частично, *молекулярной генетики* (см. схему на рис. 1).

2. *Феноменологическое* выражение последствий регуляторных событий, *определяющее направление* протекания биохимических процессов, что, собственно, и является предметом *биохимии*. Именно последний аспект проблемы будет лежать в основе представленного материала, но, учитывая небольшой объем пособия, ограничимся лишь некоторыми ключевыми вопросами. Для более детального ознакомления с проблемой следует обратиться к фундаментальным трудам (см. список литературы).

11.1. Основные определения

Регуляцией метаболизма называется управление скоростью биохимических процессов путем обратимого изменения *количества* белковых посредников, участвующих в этих процессах, или их *активности*.

Белковый посредник — более общий и точный термин, чем термин *фермент*. Хотя во многих биохимических процессах белковые посредники представляют собой именно ферменты — катализаторы химических превращений субстратов, но, например, в транспорте субстратов через биологические мембраны перенос опосредуется белками, не являющимися ферментами, так как они не катализируют каких-либо химических реакций, а обеспечивают *узнавание* и *транслокацию* субстратов.

В отдельных случаях роль посредника выполняют не белки, а рибонуклеопротеиды или сама РНК, но это, скорее, исключение.

11.2. Уровни регуляции

В соответствии с приведенным определением следует выделять два основных уровня *регуляции*:

биосинтеза белковых посредников;
их активности.

Оба уровня жизненно необходимы для организма, и мутанты с нарушением хотя бы одного, как правило, вытесняются из популяции.

11.3. Регуляция биосинтеза белков

Биосинтез белков складывается из процессов непосредственного построения и модификации белковой молекулы (трансляции и посттрансляционной модификации), а также из «подготовительных» процессов: *репликации* генетического материала и его *транскрипции*.

Репликация ДНК подробно рассматривается в курсах молекулярной биологии и фундаментальных учебниках биохимии. Мы остановимся лишь на некоторых принципиальных вопросах, имеющих значение для регуляции биосинтеза белка.

Необходимо отметить, что термин *хромосома* как место локализации ДНК применим только к клеткам *эукариот*, тогда как часто используемый термин *бактериальная хромосома* неточен и лучше говорить о *генофоре* или *нуклеоиде*, подразумевая под этими терминами ДНК-РНК-белковый комплекс.

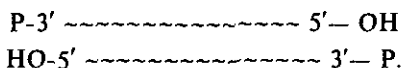
Еще точнее термин *геномный эквивалент*, так как часть ДНК в бактериальной клетке присутствует в нескольких копиях (хотя прокариоты *гаплоидны*, т.е. все копии локусов в ДНК идентичны). Если в бактериальную клетку поступает *дополнительный фрагмент ДНК*, несущий *новые аллели* тех же локусов (в процессах *конъюгации*, *трансформации* или *трансдукции*), то возникает так называемый *меродиплоид* (частичный диплоид).

11.4. Особенности процесса репликации

Как и в случае биосинтеза других биополимеров, процесс репликации ДНК включает три этапа: *инициацию*, *элонгацию* и *терминацию*. Для репликации характерны следующие особенности:

1. Она осуществляется по *полуконсервативному механизму* (т.е. одна из цепей служит матрицей для сборки другой), причем цепи

ДНК антипараллельны (3'конец содержит остаток ортофосфата — Р, а 5' конец — ОН) и последующей транскрипции подвергается только одна цепь:



2. Синтез, по-видимому, протекает *прерывисто* (с образованием *фрагментов Оказаки*) и в направлении 5' → 3'.

3. Каждая цепь начинается с РНК-затравки (*о-РНК*), фрагменты объединяются ДНК-лигазой с выщеплением РНК.

4. Система репликации является *мультиферментной*, в нее входят 2—3 ДНК-полимеразы, ДНК-лигаза, топоизомеразы, необходимые для расплетания цепей ДНК и последующей их сверхспирализации. Всего порядка 15 генетических локусов (обозначаемых *dnaA*, *dnaB*, *dnaC* и т.д.) кодируют тот или иной полипептид, необходимый для репликации.

5. Существуют четыре основных типа: синтез фрагментов, репликация плазмид (у прокариот), рекомбинационный синтез ДНК, репарационный синтез ДНК. В каждом из них участвуют как общие, так и специфические компоненты.

6. Нативная система репликации ДНК является *мембранной* и инактивируется при разрушении мембран. Поэтому для моделирования процесса репликации используются, как правило, упрощенные системы, полученные из бактериальных «условных» мутантов (например, температурочувствительных) или из «маленьких» (*tiny*) фагов (*φX174*, *G4*, *M13* и др.).

Регуляция процесса репликации ДНК наиболее строго осуществляется на этапе *инициации*. Репликация находится под *положительным* и *отрицательным* контролем, причем оба они скоординированы с клеточным делением.

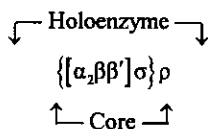
В общих чертах принцип такой регуляции можно сформулировать следующим образом. При *положительном контроле* происходит накопление *активатора* репликации до порогового, достаточного для инициации нового цикла репликации уровня. Пороговый уровень достигается при удвоении клеточной массы (незадолго до деления клетки) так, чтобы во вновь образовавшихся клетках процесс репликации был бы уже запущен и успел завершиться к моменту нового деления. При *отрицательном контроле* происходит накопление *ингибитора* инициации репликации, который должен синтезироваться лишь в ограниченном количестве вскоре после начала *предыдущего цикла* репликации. Такой ингибитор может быть продуктом гена, локализованного вблизи от точки начала репликации, транскрипция которого осу-

ществляется только в период репликации данного участка ДНК. В процессе роста клетки ингибитор «разбавляется», а к моменту удвоения массы клетки уровень его падает ниже критического, что позволяет клетке инициировать новый цикл репликации. Взаимодействие этих двух механизмов и должно координировать процессы репликации ДНК и деления клетки.

Реальные механизмы регуляции репликации еще не расшифрованы. У эукариот определенную роль в регуляции репликации, по-видимому, играют *гистоны*.

11.5. Транскрипция генетической информации

Этот этап биосинтеза белков состоит в «переписывании» информации, закодированной в ДНК, на олигонуклеотидную последовательность информационной РНК (иРНК) и осуществляется *РНК-полимеразой* (РНКП). Строение этого фермента лучше всего изучено у бактерий *Escherichia coli*. Это сложный белок с молекулярной массой 450 кДа. Его сердцевина (core) включает две идентичные α -субъединицы и две различные β -субъединицы (β и β'). В состав «полного» фермента (holoenzyme) входит также σ -субъединица, ответственная за процесс узнавания промотора и инициацию транскрипции. Наконец, существует еще один белковый компонент, обозначаемый ρ -фактор, который ответственен за правильную *терминацию* транскрипции. Таким образом, РНКП *Escherichia coli* и ряда других грамотрицательных бактерий выглядит следующим образом:



У *грамположительных* бактерий РНКП устроена еще сложнее. Например, в случае *Bacillus subtilis* она может содержать несколько σ -факторов, а у ряда архебактерий РНКП состоит из 9—10 компонентов, приближаясь по сложности строения к РНКП эукариот.

В клетках *эукариот* обнаружено по крайней мере три типа РНКП. Полимераза I (или А) находится в ядрышке и транскрибирует гены большинства рибосомных РНК (рРНК); полимеразы II (или В) — в нуклеоплазме и транскрибирует большую часть других генов; полимеразы III (или С) — гены транспортных РНК (тРНК) и одной из рРНК (5S рРНК). Кроме того, в митохондриях и хлоропластах эукариот присутствуют собственные РНКП.

Между тем собственно полимеразная реакция может осуществляться гораздо более простыми ферментами. Так, РНКП «нечетных» Т3 и Т7 фагов *Escherichia coli* состоит из единственного полипептида с молекулярной массой 110 кДа, а митохондриальная РНКП представляет собой полипептид с молекулярной массой 64 кДа.

По-видимому, сложное устройство бактериальной и, особенно, эукариотических РНКП, с одной стороны, обусловлено необходимостью «узнавать» большое число промоторов, а с другой — позволяет осуществлять многообразную регуляцию транскрипции в процессе функционирования этого фермента.

11.6. Регуляция процесса транскрипции

Исходя из возможности управления синтезом белковых посредников на этапе транскрипции, их можно разделить на три основные группы:

- 1) *конститутивные белки*, синтез которых не зависит от наличия (уровня) субстратов и продуктов;
- 2) *индуцибельные белки* — их синтез ускоряется в присутствии субстратов (или субстратных аналогов);
- 3) *репрессибельные белки*, синтез которых подавляется избытком конечного продукта данного метаболического пути.

Регуляция на этапе инициации транскрипции. В 1960-е годы Ф. Жакоб и Ж. Моно установили, что в явлениях *индукции* и *репрессии* принимают участие белковые факторы — *репрессоры*, продукты специальных генетических элементов — *генов-регуляторов (I-генов)*, способные в определенных условиях *тормозить* процесс транскрипции на этапе инициации, поэтому оба этих типа регуляции относят к *негативным*.

В *индуцируемом опероне* ген-регулятор кодирует *активный репрессор* (около 10 молекул на клетку), который блокирует транскрипцию, взаимодействуя с *операторным* участком ДНК и препятствуя продвижению РНКП. *Индуктор*, представляющий собой исходный субстрат данного метаболического пути или близкое к нему соединение (например, аллолактоза в случае *lac*-оперона), способен взаимодействовать с репрессором и *инактивировать* его, освобождая таким образом операторный участок ДНК. В результате РНКП начинает транскрипцию данного оперона. Эти события отражены в схеме (рис. 28а).

В *репрессируемом опероне* ген-регулятор кодирует *неактивный репрессор*, который может переходить в активное состояние и бло-

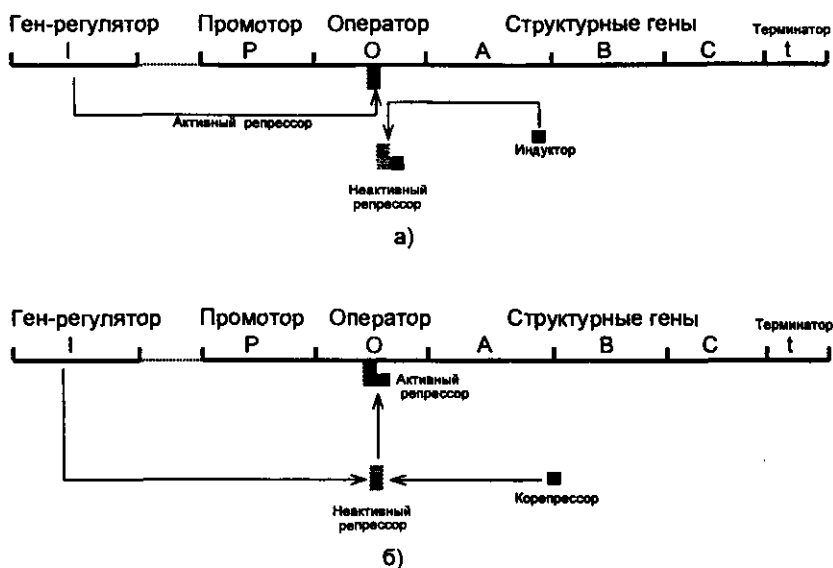


Рис. 28. Схемы индуцируемого оперона и процесса индукции (а) и репрессируемого оперона и процесса репрессии (б)

кировать транскрипцию, соединяясь с оператором, только после взаимодействия с избытком конечного продукта (*корепрессора*) данного метаболического пути (в случае биосинтетических путей таким корепрессором может быть, например, аминокислота). Процесс отражен в схеме, представленной на рис. 28б.

Большую роль в регуляции транскрипции играет так называемая *катаболитная репрессия* (старое название «глюкозный эффект»), которая проявляется в *диауксии* в процессе роста бактерий. Феномен диауксии обнаруживается, когда в среде присутствуют два субстрата (например, лактоза и глюкоза), причем ферменты, осуществляющие катаболизм одного из них (лактозы), индуцибельны, а ферменты, осуществляющие катаболизм другого (глюкозы), конститутивны. В этом случае сначала потребляется только глюкоза, тогда как индукция лактозных ферментов (β -галактозидазы) не происходит до тех пор, пока не будет потреблена основная часть глюкозы. Это отражается во временном замедлении (прекращении) роста культуры на тот период, который необходим для индукции и синтеза β -галактозидазы. Таким образом, несмотря на присутствие в среде индуктора (лактозы), альтернативный субстрат (глюкоза) препятствует индукции.

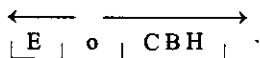
Механизм явления катаболитной репрессии состоит в следующем. Для индукции некоторых «слабых» оперонов, в том числе *lac*-операона, недостаточно инактивации отрицательного регулятора — репрессора. Необходимо и участие *положительного регулятора*, представляющего собой комплекс специального активирующего белка с циклической АМР (сАМР). Этот белок, активирующий транскрипцию, получил название БАК-белка или «белка, активирующего катаболитные гены» (английский эквивалент — CAP-protein, «catabolite gene activating protein»). БАК-белок представляет собой димер с молекулярной массой 45 кДа. Под действием сАМР он подвергается конформационным изменениям и приобретает повышенную способность связываться с промотором. Полагают, что присоединение комплекса сАМР-БАК к ДНК ослабляет спаривание Г-Ц-оснований, способствует частичному разделению спиралей ДНК и облегчает формирование иницирующего транскрипцию комплекса РНКП с ДНК. Уровень сАМР в клетке обратно пропорционален уровню АТР, и в присутствии легко метаболизируемых субстратов (глюкозы), способствующих повышению уровня АТР, сАМР «не хватает» для образования комплекса с БАК.

Тонкие механизмы регуляции уровня сАМР связаны с функционированием *фосфотрансферазной системы* транспорта сахаров и будут рассмотрены в главе, посвященной регуляции процессов мембранного транспорта.

Необходимо отметить, что у ряда бактерий роль глюкозы в катаболитной репрессии могут выполнять другие источники энергии (например, органические кислоты у псевдомонад, водород у водородных бактерий и т.д.), которые в этом случае тормозят катаболизм глюкозы.

В индуцибельных оперонах (регулонах, последний термин применяется к любому сочетанию генов, управляемых общим геном-регулятором) возможны и другие типы *положительной* регуляции, независимой от сАМР. Например, в *арабинозном* опероне *Escherichia coli* арабиноза (индуктор) не просто инактивирует репрессор, но превращает его в *положительный регулятор*. Аналогичное явление обнаружено в случае оперонов галактозы и рамнозы.

В *дивергентных регулонах* транскрипция протекает в разных направлениях и может быть некоординированной, т. е. осуществляться с разной скоростью. При этом возможно считывание с разных цепей ДНК. Примером служит *аргининовый оперон*: в его части, включающей 4 гена из 9, транскрипция трех генов (С, В, Н) осуществляется в одном направлении, а транскрипция другого гена — в противоположном:



Еще одним примером *положительной регуляции* процесса транскрипции является регуляция с участием *генов-«энхансеров»* (от англ. enhance — усиливать). Ранее считали, что этот тип регуляции характерен только для эукариот. Но в последнее время формально сходные механизмы обнаружены и у прокариот (табл. 7).

Таблица 7. Регуляция транскрипции у бактерий с помощью продуктов генов-«энхансеров»

<i>Микроорганизм</i>	<i>Белок-активатор</i>	<i>Активируемые гены</i>
<i>Escherichia coli</i>	AppY	Структурный ген кислой фосфатазы
«	MalT	Гены мальтозного оперона
«	MetR	Гены пути синтеза метионина
«	NarL	Гены нитратредукции
«	OmpR	Гены белков наружной мембраны
«	PhoB	Структурный ген щелочной фосфатазы
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VirG	Гены белков вирулентности
<i>Rhizobium meliloti</i>	FixG	Гены системы азотфиксации
<i>Salmonella typhimurium</i>	NtrC	Гены азотного метаболизма
<i>Bacillus subtilis</i>	DegU	Структурные гены экзоферментов

Особенность генов-«энхансеров» в том, что они проявляют свою стимулирующую активность независимо от ориентации и расположения относительно активируемого гена: могут находиться перед геном, за ним и даже внутри него.

Продуктами генов-«энхансеров» являются белки с молекулярной массой 25—30 кДа, способные связываться с промоторной областью. Как правило, такая система двухкомпонентна и включает «сигнальный» белок (его называют также *сенсорным*), способный «чувствовать» изменение условий окружающей среды (появление субстратов или продуктов, изменение физико-химических условий) и стимулировать синтез другого белка — «активатора», который и запускает транскрипцию искомого белкового посредника. Сказанное поясняет рис. 29, где изображена схема регуляции оперона *щелочной фосфатазы Escherichia coli*.

Перечисленные механизмы регуляции транскрипции на стадии *инициации* достаточно быстро реагируют на изменение внешних условий, однако управляют работой одного или небольшого числа оперонов в каждый момент времени.

Наряду с ними существуют механизмы *системной регуляции*, связанные с изменением функционирования одновременно большого числа оперонов.

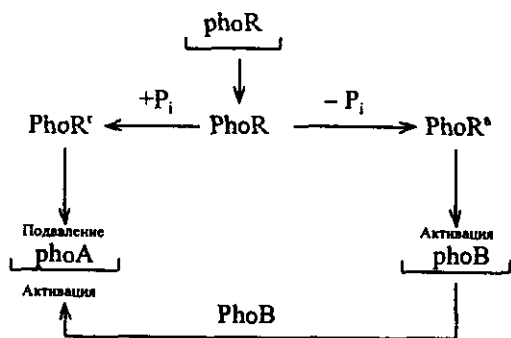


Рис. 29. Схема регуляции транскрипции структурного гена щелочной фосфатазы (*phoA*) *Escherichia coli*:

phoR – сенсорный ген; *phoB* – ген-«энхансер»; PhoR и PhoB – белковые продукты соответствующих генов; P_i – неорганический ортофосфат. В присутствии неорганического ортофосфата белок PhoR переходит в форму репрессора, подавляющего транскрипцию гена *phoA*; в отсутствие неорганического ортофосфата белок PhoR переходит в форму, стимулирующую транскрипцию гена «энхансера», продукт которого, PhoB активировывает транскрипцию *phoA*

В клетках эукариот это достигается путем конформационных перестроек хроматина (активный хроматин заметно менее компактен, чем неактивный), процессинга иРНК, а также за счет управления *трансляцией* путем формирования так называемых *информосом* (т.е. иРНК, трансляция которых «отложена» до необходимого момента путем аденилирования и формирования нуклеопротеинового комплекса).

В клетках прокариот системная регуляция осуществляется путем модификации специфичности работы РНКП посред-

ством изменения ее *компонентного состава* (а также посредством изменения конформации или структуры матрицы — ДНК, о чем см. далее по тексту). Эти механизмы вступают в действие, когда нужно активировать одновременно большое число новых промоторов (стрессовые воздействия, клеточная дифференцировка) или сменить матрицу (размножение фагов). Последний случай изучен наиболее подробно на примере фагов *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*.

В геноме бактериофагов присутствуют три типа генов: *ранние*, *средние* и *поздние*, классифицируемые на основании порядка их транскрипции в ходе развития фага. Ранние гены всегда транскрибируются РНКП клетки-хозяина, а в случае транскрипции средних и поздних генов возможно несколько вариантов:

1) среди продуктов ранних генов присутствует собственная фаговая РНКП, а также белки-ингибиторы РНКП хозяина. Таким образом, происходит *смена РНКП* («нечетные» фаги Т3, Т7 *Escherichia coli*);

2) среди продуктов ранних генов присутствуют *новые σ -факторы*, взаимодействующие с «сердцевиной» РНКП хозяина и обес-

печивающие транскрипцию средних генов. Среди продуктов средних генов, в свою очередь, присутствуют белки с функциями σ -факторов, которые обеспечивают транскрипцию поздних генов. Таким образом, происходит смена σ -факторов (фаг sP01 *Bacillus subtilis*);

3) среди продуктов «ранних» генов присутствуют белки, модифицирующие «сердцевину» РНКП хозяина, тогда как σ -фактор хозяина сохраняется («четные» фаги T2, T4 *Escherichia coli*).

Регуляция транскрипции путем образования специфических σ -факторов широко распространена и в бактериальных системах.

Особый σ -фактор (σ^{60} , число в индексе обычно обозначает молекулярную массу в кДа) контролирует транскрипцию ряда генов азотного метаболизма (в том числе гена глутаминсинтетазы, о регуляции активности которой будет идти речь в следующей главе). Наконец, существуют промоторы, активирующиеся только при 50°, в их транскрипции участвует фактор σ^E .

Примером системной регуляции является и регуляция процесса спорообразования у бацилл. В этот процесс вовлекаются сотни локусов, организованные в специальные структуры («споруланы») и разбросанные по всей молекуле ДНК. Одним из способов переключения роста на спорообразование служит изменение РНКП и, в первую очередь, ее σ -фактора (вместо σ^{43} синтезируется σ^{37}). Такая РНКП преимущественно транскрибирует «ранние» гены спорообразования, важную роль в котором играет также регуляция на уровне трансляции.

Другой пример системной регуляции у прокариот: при воздействии на микроорганизмы нагревания до супраоптимальной температуры (для *Escherichia coli* — 42°) наступает тепловой шок, вызывающий координированную индукцию «белков теплового шока». Транскрипция их локусов и образование главного фактора σ^{70} осуществляется под контролем минорного фактора σ^{32} (продукта гена *rpoH*). Среди «белков теплового шока» присутствуют белки *GroEL* и *GroES*, играющие ключевую роль в защите против шокового воздействия нагревания, по-видимому, путем контроля за формированием и поддержанием высокоупорядоченной конформации других белков. А белки *DnaK*, *DnaJ*, *DnaE* участвуют в сборке и стабилизации аппарата репликации.

Изменение специфичности «узнавания» РНКП локусов транскрипции может достигаться также путем взаимодействия регуляторных белков не с ДНК, а с самой РНКП. Кроме того, специфичность РНКП может изменяться под действием низкомолекулярных факторов типа гуанозинполифосфатов (ффГфф).

Этот механизм обеспечивает координацию процессов транскрипции и трансляции и подробнее будет обсуждаться при рассмотрении способов управления скоростью роста клеток.

Регуляция на этапе терминации транскрипции. РНКП может «узнавать» специфические последовательности ДНК, сигнализирующие об окончании транскрипции. Эта ее способность усиливается или модифицируется под влиянием особого полипептида — р-фактора, обеспечивающего нормальную терминацию.

Наряду с этим в составе ряда регулонов обнаружены так называемые *аттенюаторы* (от англ. attenuation — ослабление), т. е. участки ДНК, вызывающие *преждевременную* терминацию, также р-зависимую. Эти генетические элементы располагаются между оператором и первым структурным геном в регулонах, контролирующих биосинтез ряда аминокислот (фенилаланина, триптофана, гистидина, изолейцина, валина). Все аминокислотные регулоны, управляемые с помощью аттенюации, характеризуются *обогащением* участка иРНК, соответствующего расстоянию до аттенюатора (т.е. «лидерной» или *l*-РНК) кодонами той аминокислоты, которая служит отрицательным эффектором (например, в триптофановой *l*-РНК 2 кодона триптофана подряд, в гистидиновой *l*-РНК — 7 кодонов гистидина и т.д.).

Регуляция путем аттенюации основана на тесном сопряжении у прокариот транскрипции и трансляции, которые, как правило, протекают одновременно. В процессе трансляции синтезируемой иРНК рибосома, экранирующая около 10 нуклеотидов, может существенно влиять на конформацию транслируемой иРНК, а та, в свою очередь, на продвижение РНКП по матрице ДНК. При формировании «критической» конформации иРНК («терминирующей петли») наступает диссоциация РНКП от ДНК (преждевременная терминация, зависящая от р-фактора).

При *избытке* данной аминокислоты трансляция «лидерного» участка иРНК идет с нормальной скоростью, и в момент прохождения РНКП аттенюатора формируется «терминирующая петля» иРНК, что приводит к преждевременной терминации и диссоциации РНКП от матрицы ДНК. При *недостатке* данной аминокислоты трансляция «лидерного» участка иРНК тормозится, и рибосома «застревает» на сайте, обогащенном кодонами данной аминокислоты, препятствуя формированию «терминирующей петли». Поэтому РНКП успевает «проскочить» аттенюаторный участок и продолжает транскрипцию структурных генов.

Таким образом, если данный регулон управляется путем аттенюации, то в процессе считывания информации с ДНК образуются два типа транскриптов: нормальный, включающий структурные гены, и укороченный, состоящий только из *l*-РНК (рис. 30).

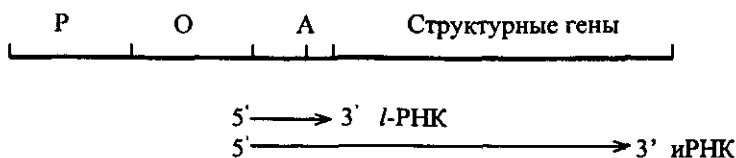


Рис. 30. Схема регуляции транскрипции путем аттенюации:
 P — промотор; O — оператор; A — аттенюатор; l-РНК — укороченный транскрипт;
 иРНК — нормальный транскрипт

Триптофановый оперон у *Escherichia coli* регулируется одновременно двумя негативными механизмами: репрессией и аттенюацией. При избытке триптофана они действуют аддитивно, практически полностью подавляя транскрипцию. Но даже в отсутствие репрессии (у мутантов с дефектом гена-регулятора) аттенюация снижает скорость транскрипции на 90% (рис. 31).

Гистидиновый оперон регулируется только посредством аттенюации. Аналогичная регуляция характерна для синтеза некото-

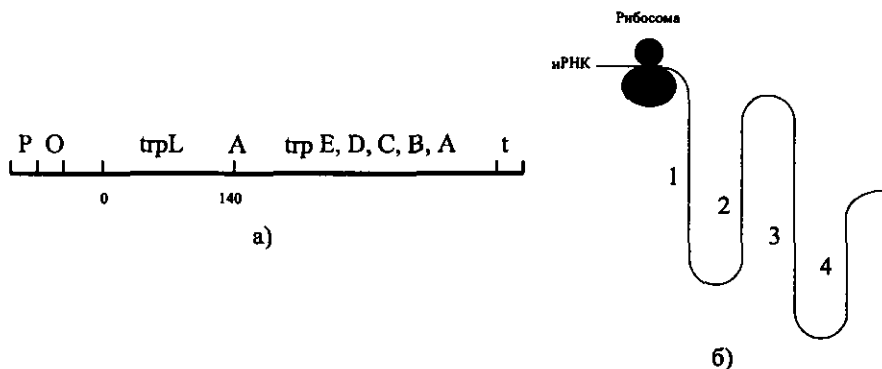


Рис. 31. Схема триптофанового оперона и структура транскрипта его «лидерного» участка у *Escherichia coli* (по Mandelstam et al., 1982): а) начальный отрезок *trp*-оперона; б) транскрипт «лидерного» участка (от 50 до 140 нуклеотида);

trp E, D, C, B, A — структурные гены; *trpL* — «лидерный» участок; цифрами указаны места потенциального формирования внутримолекулярных водородных связей.

На «лидерном» участке иРНК возможно образование трех типов петель: 1–2, 2–3, и 3–4. Сделано предположение, что только образование структуры 3–4 служит для РНКП сигналом терминирования и обрывает транскрипцию. В процессе трансляции растущей цепи «лидерного» участка иРНК рибосома перекрывает около 10 нуклеотидов и, таким образом, определяет, какая именно из вторичных структур иРНК реализуется в момент прохождения аттенюатора. При отсутствии в среде триптофана рибосома «застревает» на участке 1, где расположены два триптофановых кодона, способствуя формированию петли 2–3. В результате терминация предотвращается. При наличии избытка триптофана рибосома проходит до участка 2, где локализован терминирующий кодон «лидерного пептида, при этом петля 2–3 образоваться уже не может, и формируется петля 3–4, определяющая терминацию

рых аминоксил-тРНК-синтетаз (АРСа_з) и, возможно, ряда экзo-ферментов. Аттeнуатор присутствует также в гeнoмe фaгa λ. В этом случае эффект аттeнуатора может быть нейтрализован специальным регуляторным белком *антитерминатором*. Получены данные о том, что комплекс белка БАК с сАМР также может выполнять функцию антитерминатора, например в *gal*-опероне, и, таким образом, не только стимулировать инициацию транскрипции, но и предотвращать преждевременную терминацию.

Регуляция транскрипции путем изменения количества активной РНКП. РНКП может служить *отрицательным регулятором* своего собственного биосинтеза, и при относительном избытке в клетке ее дальнейшее образование тормозится. Координированно регулируется образование β-субъединиц, тогда как образование α-субъединиц и σ-фактора регулируется независимо. Поэтому в клетке может существовать избыток тех или иных субъединиц РНКП.

Возможна *иммобилизация* РНКП на матрице ДНК (вероятно, в момент терминации транскрипции РНКП не диссоциирует от матрицы) с переходом ее в *латентное* (скрытое) состояние. В определенных условиях (например, при переносе на богатую среду) латентная РНКП активируется, вызывая повышение скорости транскрипции. По некоторым данным, такая латентная РНКП может составлять до 50% всей РНКП клетки.

Регуляция транскрипции путем изменения конформации или структуры ДНК. Одним из способов *системной регуляции* транскрипции служит изменение степени *сверхспирализации* ДНК. В этом процессе участвует особый класс ферментов — *топоизомеразы*.

Релаксирующие топоизомеразы (например, ω-белок *Escherichia coli*) понижают степень сверхспирализации без затраты энергии и принимают участие в инициации репликации. По современной классификации их называют *топоизомеразы I*.

Белки, *повышающие* степень сверхспирализации ДНК (пример — ДНК-гираза *Escherichia coli*), зависят от АТФ и участвуют в репликации ДНК, а также необходимы для осуществления рекомбинаций и конъюгативной передачи генетического материала. Их называют *топоизомеразы II*.

Косвенным указанием на возможность изменения специфичности транскрипции при изменении степени сверхспирализации ДНК служит тот факт, что в присутствии ингибиторов ДНК-гиразы (антибиотиков: налидиксовой кислоты, новобиоцина, коумермицина) изменяется спектр синтезируемых белков, хотя сами по себе эти ингибиторы не влияют на процессы транскрипции или трансляции. Например, у *Escherichia coli* снижается синтез около 20 белков (в том числе щелочной фосфатазы), но одновременно стимули-

руется синтез других (например, репрессора *lac*-оперона), а образование некоторых белков (α -амилазы) остается на прежнем уровне.

Перестройка транскрипции при изменении степени сверхспирализации ДНК объясняется по крайней мере двумя причинами. Во-первых, может изменяться *специфичность узнавания промоторов* РНКполимеразой. Во-вторых, изменение сверхспирализованности должно приводить к изменению *силы взаимодействия* с ДНК регуляторных белков (например, присоединение *lac*-репрессора к сверхспирализованной ДНК энергетически более выгодно, чем взаимодействие с релаксированной ДНК).

Поскольку АТФ является необходимым компонентом для работы ДНК-гиразы, должна существовать связь степени сверхспирализации ДНК с *энергетическим зарядом* клетки, что открывает еще одну возможность для регуляции транскрипции.

Принципиально иной способ регуляции может быть осуществлен путем обратимого изменения структуры ДНК за счет выщепления подвижных генетических элементов (называемых *IS-элементами* и *транспозонами*), а затем встраивания их в другие места генома. При этом может меняться характер регуляции транскрипции как генетических локусов, входящих в состав перемещаемых участков, так и соседних с ними локусов. Возможно также встраивание генетического элемента в тот же участок ДНК, откуда он был выщеплен, но в инвертированном виде («задом наперед»). Такая инверсия используется иногда как способ регуляции развития фагов (фага *Mu Escherichia coli*), а также образования жгутиковых антигенов у сальмонелл (рис. 32).

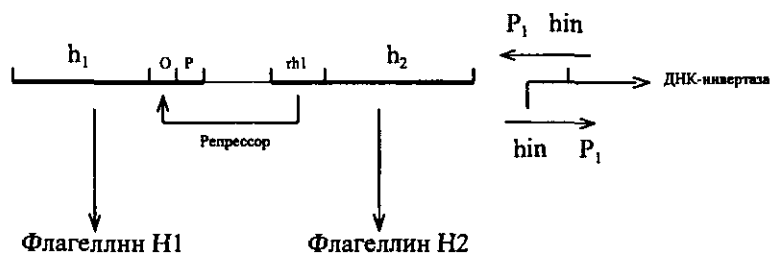


Рис. 32. Схема регуляции синтеза флагеллинов у *Salmonella typhimurium* (по Хесину 1985, с изменениями):

h_1 , h_2 — гены, кодирующие флагеллины H1 и H2 соответственно; rhl — ген-регулятор; hin — ген, кодирующий ДНК-инвертазу; P_1 — промотор для генов h_2 и rhl .

Когда промотор P_1 находится в благоприятной ориентации для транскрипции h_2 , rhl , образуется флагеллин H2, а синтез флагеллина H1 блокируется репрессором. При обратной ориентации не образуется ни флагеллина H2, ни репрессора, а транскрипция локуса флагеллина H1 осуществляется с собственного промотора. Изменение ориентации P_1 производится ДНК-инвертазой, кодируемой геном hin , активность которого не зависит от положения P_1 .



Глава 12. Регуляция биосинтеза белков на этапе трансляции

До недавнего времени считалось, что регуляция на уровне трансляции характерна почти исключительно для эукариот, где существует временное и пространственное *разобщение* транскрипции и трансляции в связи с наличием оболочки ядра и формированием долгоживущих, «защищенных» белками и РНК *информосом*, открытых А.С. Спириным.

Косвенным указанием на существование регуляции трансляции у прокариот является различие в скорости образования некоторых белков, кодируемых одним и тем же регулоном и транслируемых с общей *полицистронной матрицы* (иРНК), как, например, в случае субъединиц РНКП и некоторых рибосомных белков.

Существует потенциальная возможность регуляции скорости трансляции на двух этапах: на этапе *биосинтеза и сборки* компонентов аппарата трансляции и на этапе их *функционирования*.

12.1. Регуляция на этапе биосинтеза и сборки компонентов аппарата трансляции

Основными высокомолекулярными компонентами аппарата трансляции являются аминокил-тРНК-синтетазы («кодазы», АРСазы), транспортные РНК (тРНК), рибосомные РНК (рРНК), информационные РНК (иРНК), рибосомные белки и белковые факторы трансляции.

Аминокил-тРНК-синтетазы представляют собой довольно крупные (40—400 кДа) белки, чаще всего мультимерные (состоящие из субъединиц). Число их видов равно числу природных аминокислот. Уровень всех или большинства АРСаз регулируется координированно и пропорционален скорости роста. Избыток аминокислот не оказывает на синтез АРСаз прямого репрессивного действия. Значительная часть АРСаз эукариот ассоциирована с полирибосомами и организована в *полиферментные комплексы*. Поэтому в отношении их действуют регуляторные механизмы,

характерные для управления активностью ферментных ансамблей (см. гл. 13).

Транспортные РНК составляют около 10—15% всей клеточной РНК и кодируются 50—60 генетическими локусами. Биосинтез тРНК проходит промежуточное образование предшественников, которые затем укорачиваются и модифицируются — явление, называемое *процессингом*, или «созреванием» тРНК. Например, предшественник тирозиновой транспортной РНК (тРНК^{тир}) у *Escherichia coli* содержит 129 нуклеотидов, это на 44 нуклеотида больше, чем «зрелая» форма. Такой предшественник можно выделить из температурочувствительного (ts) мутанта с дефектом РНКаз. Он подвергается процессингу с участием двух РНКаз: Р и РIII (рис. 33а). Необходимо отметить, что РНКазы Р состоит из РНК (100—400 нуклеотидов) и белка, причем РНК сама по себе может выполнять функции фермента, катализируя процессинг, тогда как белок только стимулирует ее активность. Таким образом, РНКазы Р является пока не очень многочисленным примером *рибозима*, т. е. фермента, представляющего собой не белок, а РНК.

Следующим этапом процессинга многих тРНК является *модификация оснований*, которая осуществляется при помощи большого количества ферментов (более 60), поскольку даже одна и та же модификация основания, находящегося в разных участках молекулы тРНК, может осуществляться разными ферментами. Способы модификации на примере урацила приведены на рис. 33б.

Важно отметить, что в процессе эволюции (при возникновении более высокоорганизованных организмов) количество модифицированных компонентов в тРНК возрастало. Это указывает на важную регуляторную роль модифицированных изоакцепторных тРНК. Далее рассмотрим гипотезы, касающиеся возможных механизмов регуляции трансляции, основанных на использовании изоакцепторных тРНК.

Рибосомные РНК у эукариот представлены четырьмя типами: 28S, 18S, 5,8S и 5S, у прокариот тремя: 23S, 16S и 5S. Кроме того, в митохондриях и хлоропластах эукариот содержатся рибосомы, близкие по составу к прокариотическим. Геном *Escherichia coli* содержит 6—7 оперонов, включающих локусы всех трех рРНК, а также разное число локусов тРНК. В процессе транскрипции синтезируется общий транскрипт, подвергающийся процессингу (рис. 33в), который осуществляется в ходе транскрипции, так что общий транскрипт длиной 5600 нуклеотидов может быть выделен только в системе *in vitro* или у мутантов с дефектом РНКаз. РНКазы III (эндонуклеаза) «узнает» двунитевые участки («черешки петель»), соответствующие границам локусов транскрибируемых РНК. После

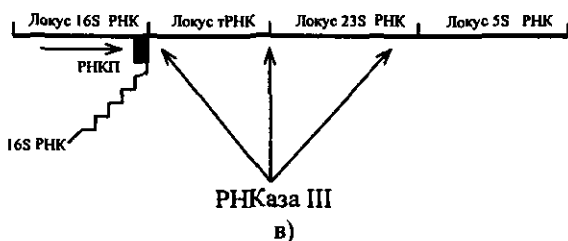
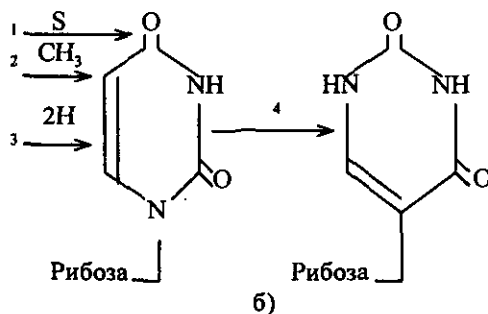
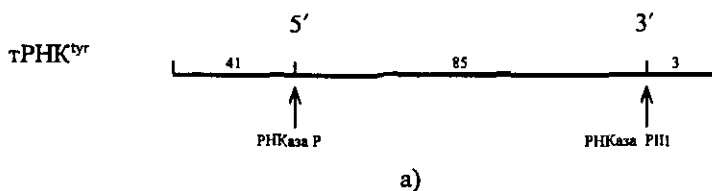


Рис. 33. Схема процессинга тирозиновой тРНК

На первом этапе с конца 5' удаляется 41-нуклеотидный фрагмент путем расщепления только-одной связи эндонуклеазой (РНКазой Р). Затем с конца 3' удаляется 3-нуклеотидный фрагмент с помощью еще одной эндонуклеазы (РНКаза РIII). Отщепленные фрагменты разрушаются другими нуклеазами (а).

Возможные способы модификации уридина в тРНК (б):

- 1 — замена кислорода на серу с образованием тиюридина;
- 2 — метилирование с образованием риботимидина;
- 3 — гидрирование двойной связи с образованием дигидроуридина;
- 4 — Изомеризация с образованием псевдоуридина.

Схема процессинга в ходе транскрипции локусов рРНК (в). РНКаза РIII расщепляет общий транскрипт, образуемый РНКП, непосредственно в ходе процесса сразу после завершения транскрипции очередного локуса

действия РНКаза РIII образуются не «зрелые» молекулы РНК, а их предшественники, которые подвергаются дальнейшему процессингу. В случае рРНК он может состоять, например, в метили-

ровании, которое обычно осуществляется после того, как рРНК включена в состав субчастицы рибосомы.

У некоторых эукариот процессинг 28S РНК состоит в удалении «лишнего» фрагмента (*интрона*) посредством *аутосплайсинга* (от англ. splice — сращивание концов), при котором РНК выполняет роль «псевдофермента» (еще один пример рибозима), катализирующего собственный процессинг в отсутствие белков-ферментов.

Ступенчатый процессинг позволяет осуществить регуляцию на каждом из этапов биосинтеза и сборки, а указанная организация локусов обеспечивает образование всех рРНК в равных соотношениях.

Синтез рРНК и рибосомных белков регулируется *координированно* и определяется *эффективностью работы* аппарата трансляции: например, при дефиците аминокислот транскрипция локусов, кодирующих рРНК и рибосомные белки, подавляется одновременно (сигналом служит гуанозин тетрафосфат). Подробнее об этом будет рассказано в главе, посвященной регуляции скорости роста.

Информационная (матричная) РНК у прокариот, как правило, полицистронна, а у эукариот — моноцистронна. Процессинг у эукариот состоит в вырезании *интронов* (некодирующих последовательностей) и в сплайсинге *экзонов* (кодирующих последовательностей). Затем происходит метилирование оснований (в среднем иРНК содержит один остаток метилированного аденина на четыреста остатков неметилированного аденина). На конце 5' достраивается специфическая группировка, так называемый «кэп» (*cap*), а на конце 3' последовательность из остатков адениловой кислоты, включающая до 100—400 нуклеотидов. Роль этой последовательности остается неясной. Поступившая в цитоплазму иРНК существует в виде нуклеопротеидного комплекса — *информосом* и в таком виде может сохраняться длительное время до наступления трансляции.

Для прокариот процессинг иРНК не характерен, хотя в некоторых иРНК архебактерий также обнаружены интроны, а у *Escherichia coli* полицистронный транскрипт локуса, включающего гены рибосомных белков L1, L7, L12 и гены β , β' -субъединиц РНКП, подвергается процессингу, в результате которого образуются отдельные иРНК для рибосомных белков и субъединиц РНКП.

У многих прокариот обнаружены также полиаденилированные иРНК (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Rhodospseudomonas capsulata*, *Rhodospirillum rubrum*, *Methanococcus vannielii*, *Caulobacter crescentus* и др.), содержащие от 5 до 180 остатков адениловой кислоты (для этого использовали мутанты, дефицитные по РНКазам). Показано, что они наиболее характерны для секретируемых белков.

Практически отсутствуют сведения о регуляции образования *белковых факторов трансляции*. У прокариот это факторы инициации (IF-1, IF-2, IF-3), элонгации (EF-Tu, EF-Ts, EF-G), терминации (RF-1, RF-2, RF-3). У эукариот их больше, они сложнее по строению: только факторов инициации насчитывается свыше восьми, зато фактор терминации всего один.

По полученным за последнее время сведениям, некоторые из этих факторов способны модифицироваться: например, у эукариот может происходить фосфорилирование фактора инициации eIF-2 и фактора элонгации EF-1, а также ADP-рибозилирование фактора EF-2, что, несомненно, влияет на скорость процесса трансляции. В случае прокариот обнаружено метилирование фактора элонгации EF-Tu *Escherichia coli*, однако регуляторное значение этого процесса неизвестно.

12.2. Регуляция на этапе функционирования аппарата трансляции

Регуляция может осуществляться как на этапе *инициации*, так и этапе *элонгации*.

1. Регуляция инициации. У прокариот регуляция инициации трансляции осуществляется путем специфического связывания регуляторных белков с инициаторным районом иРНК, в результате чего трансляция подавляется. Такая регуляция существует при развитии фага MS2, в процессе которого белок оболочки регулирует трансляцию матрицы РНК-репликазы. Аналогичный механизм действует при регуляции трансляции рибосомных белков *Escherichia coli*. Гены 52 рибосомных белков организованы в 16 оперонов, в ряде случаев они объединены с локусами компонентов РНКП и факторов трансляции, и для поддержания их независимого и координированного синтеза необходим механизм «обратной связи», в результате функционирования которого избыток рибосомных белков (L1, L10 и др.) подавляет собственную трансляцию. Иногда рибосома обнаруживает разное сродство к инициаторным участкам разных иРНК, благодаря этому инициация может также регулироваться самой рибосомой. Эта особенность бывает постоянной или регулируется специальными факторами, в результате обеспечивается дифференциальная скорость трансляции разных локусов полицистронной матрицы иРНК.

В некоторых специализированных эукариотических клетках двухцепочечная РНК (например, вирусного происхождения)

ингибирует трансляцию, вызывая активацию протеинкиназы, фосфорилирующей фактор инициации eIF-1.

Описана также возможность блокирования трансляции у прокариот путем присоединения к инициаторному участку иРНК особой комплементарной регуляторной РНК (*mic*-РНК).

Наконец, существует потенциальная возможность управления скоростью трансляции у прокариот на этапе инициации за счет изменения доступности (количества) инициаторной тРНК^{finet}, которая является обязательной для инициации.

2. Регуляция элонгации. Создается впечатление, что в биосинтезе биополимеров определяющей стадией является инициация, а этап элонгации регулируется в меньшей степени или совсем не регулируется (при наличии всех необходимых предшественников и кофакторов). Тем не менее существует несколько потенциальных возможностей регуляции этапа элонгации в процессе трансляции. Одна из таких возможностей состоит в избирательной трансляции матрицы иРНК за счет специфического набора изоакцепторных тРНК.

Для 20 природных аминокислот существует 61 значащий кодон. По правилу «неоднозначного соответствия» Крика, для их транслирования достаточно около 30 антикодонов. Однако в клетках значительно больше тРНК (для некоторых аминокислот по 3–6 типов тРНК), некоторые из них специфичны только к одному из кодонов. Если данная аминокислота в данном белке кодируется именно таким кодоном, то наличие или отсутствие соответствующей специфической тРНК будет определять возможность трансляции данной матрицы. В свою очередь, в клетке набор изоакцепторных тРНК может очень тонко регулироваться. Показано, например, что на разных фазах роста *Escherichia coli* или при переходе от хемотрофного к фототрофному типу питания у *Rhodobacter sphaeroides* наблюдается резкое изменение набора тРНК. Таким образом, данный способ регуляции можно рассматривать как еще один пример *системной регуляции*.

Другой пример относится к развитию фагов, в процессе которого наряду с изменением процесса транскрипции (см. гл. 11) блокируется трансляция иРНК организма-хозяина. В некоторых случаях (у *Escherichia coli*) это связано с модификацией рибосом, переставших «узнавать» иРНК хозяина (т. е. блокируется инициация трансляции), однако у эукариот это обусловлено модификацией факторов элонгации, для чего имеются специальные ферменты, осуществляющие фосфорилирование (в случае фактора EF-1) или ADP-рибозилирование (в случае фактора EF-2), что резко уменьшает сродство данных белков к рибосомам.

Что касается *терминации* трансляции, то специальные механизмы регуляции в этом случае не обнаружены (если не считать облигатной зависимости процесса от GTP). Однако необходимо отметить возможность «проскакивания» рибосомы через некоторые «слабые» терминирующие кодоны (например, UGA), что, с одной стороны, позволяет рибосоме транслировать полицистронные матрицы без диссоциации от иРНК, а с другой — обеспечивает образование небольшого количества более длинных полипептидов, могущих выполнять важную функциональную роль (например, при сборке фага Q β).

12.3. Регуляция биосинтеза белков путем посттрансляционной модификации

Посттрансляционная модификация (процессинг) белков менее распространена, чем процессинг РНК. Тем не менее известны случаи, когда при развитии некоторых вирусов трансляция полицистронной матрицы приводила к образованию общей полипептидной цепи, разрезаемой в дальнейшем на индивидуальные белки специфическими протеиназами. Кроме того, широко известен процессинг ряда ферментов (пищеварительных, инсулина и др.), превращающий их неактивные формы в активные.

У прокариот наиболее распространенным видом процессинга белков является удаление «сигнального» пептида из молекул *секретируемых белков*. Такие белки и ферменты (экзогидролазы, белки наружной мембраны и др.) содержат на NH₂-конце гидрофобный пептид из 15—30 аминокислот, который необходим для транслокации белка через цитоплазматическую мембрану в процессе его синтеза. После завершения транслокации «сигнальный» пептид удаляется специальной «сигнальной» пептидазой (подробнее об экзоферментах — в главе, посвященной процессам экскреции).

К группе процессов посттрансляционной модификации можно отнести ферментативное присоединение коферментов (биотина, флавинов, гема и др.) к готовой молекуле апофермента, а также, с некоторой долей условности, и формирование мультимерных белков из нескольких полипептидных цепей с участием *белков-шаперонов* (стресс-белков, белков «теплового шока»).

12.4. Регуляция круговорота белков путем избирательного протеолиза

Количественный и качественный состав белков в клетке может регулироваться не только на этапе их биосинтеза, но и на

этапе деградации. В нормально растущих клетках бактерий за клеточный цикл распадается несколько процентов существующих белков. Более высокая скорость круговорота белка характерна для термофильных организмов. В условиях голодания скорость распада возрастает в несколько раз. Протеолиз клеточных белков выполняет две важные функции. Во-первых, расщепляются ненужные в данный момент ферменты, функционирование которых могло бы вызвать дисбаланс метаболизма, и восполняется ресурс аминокислот. Во-вторых, ликвидируются «ошибочные» белки, возникающие в результате сбоя в биосинтетических процессах или за счет мутаций.

Протеолиз играет особенно важную роль в процессах клеточной дифференцировки, о чем, например, свидетельствует утрата способности к спорообразованию при дефекте синтеза протеиназ. Возможны два основных типа протеолиза: *АТР-независимый* и *АТР-зависимый*. Первый активируется в условиях голодания и не требует затраты энергии; второй действует постоянно и весьма избирательно. В эти системы, вероятно, включаются разные ферменты, так как некоторые ингибиторы протеиназ подавляют первый процесс и не влияют на второй. АТР-зависимый протеолиз, по-видимому, включает стадию «узнавания» аномального белка и введение в него метки, которой является специальный белковый агент — *убихитин*, после чего меченый белок подвергается деградации протеназами.

Механизм «узнавания» аномальных или нефункциональных белков неизвестен, скорее всего, важную роль в нем играют особенности третичной структуры белков, и замена даже одной аминокислоты сильно снижает устойчивость белка к внутриклеточному протеолизу. Последнее обстоятельство может существенно мешать получению *микроорганизмов-сверхпродуцентов*, у которых повышенное образование целевого продукта обусловлено мутациями по соответствующим ферментам. Такие ферменты будут восприниматься системой узнавания как аномальные и подвергаться протеолизу, что тормозит биосинтетические процессы, а иногда и рост микроорганизма. Специфический (АТР-зависимый) протеолиз может дополнять регуляцию по механизму катаболитной репрессии. Например, у некоторых дрожжей глюкоза не только *репрессировывает синтез* определенных ферментов (малатдегидрогеназы, ФЕП-карбоксилазы), но и стимулирует их *протеолитическую деградацию*, по-видимому, за счет индукции или активации соответствующей протеиназы. Решающую роль играет протеолиз в так называемой *SOS-регуляции*, т. е. активации SOS-регулона, включающего около 20 генов, которые индуцируются в ответ на некото-

рые повреждения ДНК и образуют продукты, участвующие в ее репарации. Среди этих продуктов присутствует белок *RecA*, участвующий в ряде клеточных процессов (рекомбинации, расщеплении АТР и продуктов деградации ДНК подвергает протеолитическому расщеплению белок *LexA*, репрессор SOS-оперона. Таким образом, при появлении в клетке продуктов деградации ДНК активируются процессы ее репарации.



Глава 13. Регуляция активности белковых посредников биохимических процессов

Регуляция активности готовых белковых посредников (ферментов) является более «быстродействующим» механизмом и раньше откликается на изменение внешних условий, чем регуляция биосинтеза этих посредников. Однако, как мы уже отмечали, оба уровня регуляции необходимы для координированного управления биохимическими процессами в клетке. В свою очередь, процессы регуляции активности белковых посредников можно разделить на две большие группы: регуляция активности путем обратимой ковалентной модификации посредника и регуляция активности без ковалентной модификации посредника.

13.1. Регуляция активности белковых посредников путем их ковалентной модификации

Отличие этого механизма регуляции от *посттрансляционной модификации* (на уровне биосинтеза белков) состоит в *обратимости* процесса и отсутствии изменения *длины полипептидной цепи*. Кроме того, и это особенно важно отметить, *обе формы — модифицированная и немодифицированная — активны*, хотя и различаются по величине активности и/или по регуляторным свойствам.

У эукариот самым распространенным способом модификации является *фосфорилирование*. Один из наиболее изученных примеров — процесс синтеза и распада *гликогена* (рис. 34).

Фосфорилирование ферментов, участвующих в синтезе и распаде гликогена, осуществляется киназами, которые сами активируются сАМР. Как уже отмечалось, концентрация сАМР в клетке обратно пропорциональна концентрации АТФ. Следовательно, *потребность в энергии* (накопление сАМР) приводит к фосфорилированию указанных ферментов, т. е. к *стимуляции гидролиза гликогена и торможению его синтеза*. Дополнительная стимуляция гидролиза достигается за счет активирующего эффекта АМР, который накапливается при снижении энергетического заряда клетки (дефиците энергии). Напротив, при накоплении глюкозо-6-фосфата, что свидетельствует об активном протекании энергетических процессов (гликолиза), гидролиз гликогена тормозится.

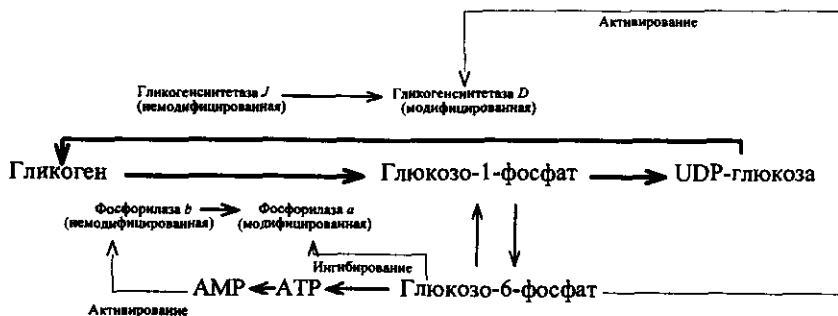


Рис. 34. Схема синтеза и распада гликогена.

Немодифицированная фосфорилаза *b* малоактивна и активируется АМР (т.е. при расходе энергии). Ее фосфорилированная форма, фосфорилаза *a*, напротив, высокоактивна и ингибируется глюкозо-6-фосфатом (т.е. при избытке энергии). Немодифицированная гликогенсинтетаза *J* высокоактивна, тогда как ее модифицированная форма, гликогенсинтетаза *D*, малоактивна и активируется глюкозо-6-фосфатом

У прокариот, как показано в последнее время, модификация белков путем их фосфорилирования также распространена достаточно широко. Так, в процессе инициации *спорообразования* у *бацилл* активируется транскрипция ряда генов, кодирующих белки, часть которых является протеинкиназами (продукты локуса *spoIIJ*), а часть — акцепторами фосфата (продукты локуса *spoOA*). Один из последних белков способен связываться с ДНК и, по видимому, является регулятором транскрипции. Фосфорилирование влияет на его регуляторные свойства. Этот же белок необходим для развития у клеток *Bacillus subtilis* состояния *компетентности* (т.е. способности поглощать из среды чужеродную ДНК). Путем фосфорилирования регулируется также активность некоторых белков у *Rhizobium*, участвующих в *фиксации азота*, а также в *транспорте* ди- и трикарбоновых кислот. Регуляция транспорта сахаров путем фосфорилирования компонентов *фосфотрансферной системы* обнаружена у *Escherichia coli*. Вообще же у этой бактерии найдено около 170 белков, способных фосфорилироваться.

Однако наиболее изученным примером регуляции путем ковалентной модификации является *аденилирование* и *уридилирование* ферментов в системе регуляции активности глутаминсинтетазы (ГС) (рис. 35).

Указанная регуляция активности ГС дополняется регуляцией на уровне биосинтеза фермента: немодифицированный белок РП через посредство других специальных белков подавляет транскрипцию локусов ГС. В свою очередь, эти белковые регуляторы могут

центров, сходных по природе и взаимодействующих между собой (*гомotropная кооперативность*). Здесь возможны два случая:

а) присоединение первой молекулы субстрата *облегчает* присоединение последующих молекул, и скорость реакции растет по экспоненциальному закону (*положительная кооперативность*). График зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата имеет S-образную форму;

б) присоединение первой молекулы субстрата затрудняет присоединение последующих молекул (*отрицательная кооперативность*).

Аналогичные механизмы регуляции действуют при трансмембранном транспорте некоторых субстратов (подробнее об этом в главе, посвященной транспорту субстратов).

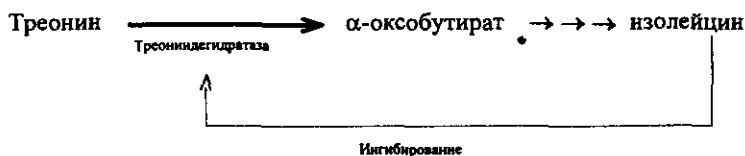
2. Взаимодействие с продуктами и другими эффекторами, отличными от субстратов. Ферменты, активность которых регулируется по этому механизму, должны иметь *различающиеся по природе* активные центры: *каталитический* (для взаимодействия с субстратом) и *регуляторный* (для взаимодействия с эффектором). Эти центры обычно размещены на разных субъединицах фермента (или в общем случае — *аллоsterического белка*), причем связывание эффектора с регуляторным центром влияет на конформацию каталитического центра и изменяет сродство к субстрату, которое, как правило, снижается (*гетеротропная кооперативность*). При этом возможны разные обстоятельства:

а) в *анаболических* (конструктивных) процессах конечный продукт метаболического пути, накапливаясь выше определенного уровня, подавляет свой биосинтез, ингибируя активность первого (или одного из первых) фермента данного пути («ретроингибирование» или *feed-back inhibition*) (рис. 36а);

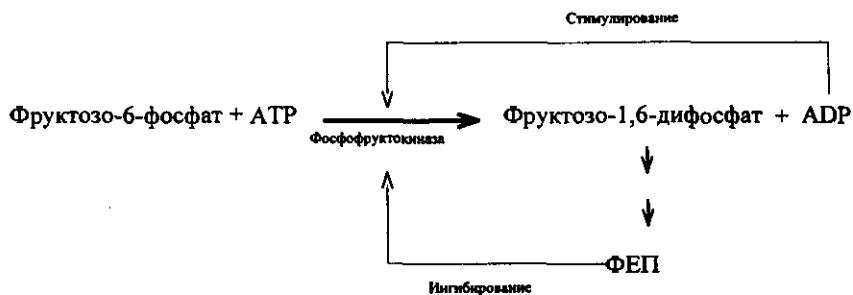
б) в *катаболических* (энергетических) путях метаболизма *отрицательными* эффекторами часто служат соединения, являющиеся *аккумуляторами энергии* (АТФ, ФЕП и т.д.), а другие *компоненты аденилатной системы* (ADP, AMP) могут выступать в качестве *положительных* эффекторов (рис. 36б). Таким образом, активность данных ферментов зависит от «энергетического заряда» клетки;

в) *амфиболические ферменты* (участвующие как в конструктивных, так и в энергетических процессах) могут регулироваться с помощью обоих механизмов (рис. 36в);

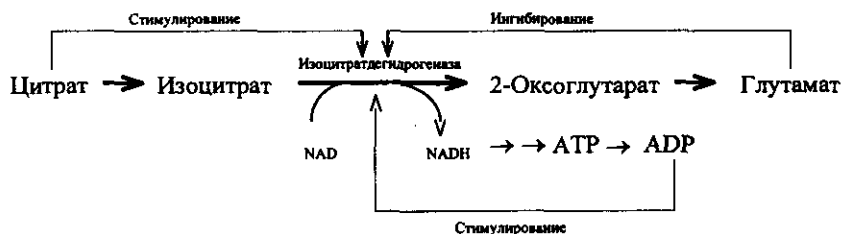
г) в *разветвленных биосинтетических* путях подавление одним из конечных продуктов активности фермента, катализирующего начальные этапы процесса, приводило бы к дефициту других продуктов данного пути. Поэтому необходима особая организация регуляторных процессов. Существуют две основные возможности.



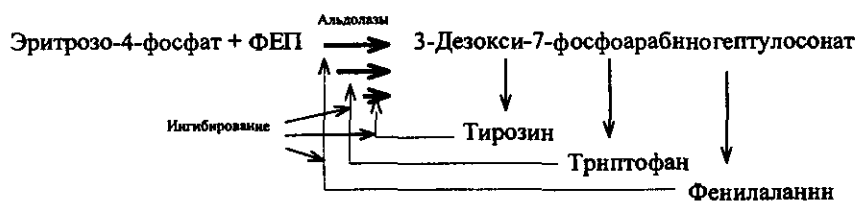
а)



б)



в)



г)

Рис. 36. Регуляция изолейцином своего биосинтеза по механизму отрицательной обратной связи (а), гликолитического пути отрицательными и положительными эфффекторами (б), амфиболического фермента, исоцитратдегидрогеназы, по типу анаболических ферментов (глутаматом) и катаболических ферментов АДФ (в) и разветвленного пути по механизму раздельного ингибирования изоферментов (альдолаз) каждым из конечных продуктов (г)

Во-первых, образование *изоферментов* («изозимов»), катализирующих начальную стадию пути, активность каждого из которых избирательно подавляется только одним из конечных продуктов. Примером может служить биосинтез ароматических аминокислот у *Escherichia coli*, в котором конечные продукты — тирозин, триптофан и фенилаланин — подавляют каждый активность одной из альдозаз, катализирующих первую реакцию пути (рис. 36г). Во-вторых, использование ферментов, имеющих несколько взаимодействующих регуляторных центров, каждый из которых специфичен только для одного из эффекторов. По отдельности они не оказывают существенного влияния на активность фермента, а при их совместном действии активность подавляется. Это так называемое *согласованное*, или *мультивалентное* ингибирование. Например, активность *аспартаткиназы* у *Escherichia coli* подавляется только сочетанием лизина, метионина и лейцина (изолейцина). Для *глутамиксинтетазы* обнаружено восемь кумулятивных эффекторов: аланин, глицин, гистидин, триптофан, ЦТР, АМР, карбамоилфосфат, глюкозамин-6-фосфат.

13.3. Регуляция активности белковых посредников путем пространственного разобщения и взаимодействия с мембранами

Механизмы первого типа (так называемая компартментация) более распространены у эукариот (см. гл. 2) в связи с локализацией ферментов в субклеточных органеллах: митохондриях, лизосомах и т.д. Однако и в клетках прокариот возможны определенные виды компартментации:

а) часть ферментного аппарата прокариот локализована в *периплазматическом* пространстве (между цитоплазматической мембраной и клеточной стенкой) (см. гл. 1). Таким образом, создается возможность регуляции активности ферментов путем управления скоростью проникновения в «отсек» субстратов или выхода из него продуктов;

б) ферменты, катализирующие серию последовательных реакций, могут формировать «ансамбль», локализованный либо в цитоплазме (дегидрогеназы α -кетокислот), либо в цитоплазматической мембране (ферменты дыхательной и фотосинтетической цепей). Продукты, образуемые на предыдущей стадии, «подхватываются» последующим ферментом без освобождения в среду. Для регуляторного действия конечного продукта доступен только последний фермент, но он может передавать эффект на предыдущие ферменты за счет кооперативных взаимодействий (в диссо-

цированном состоянии эти ферменты оказываются нечувствительными к эффектору). Существует представление о «метаболоне», т.е. комплексе ферментов, закрепленных на «подложке» (например, на структурном белке). Каталитические свойства в этом случае проявляются внутри ансамбля, а подложка реагирует на регуляторное действие эффекторов. Например, ни один из ферментов может не реагировать на данный эффектор, но в ансамбле, за счет конформационных изменений подложки, они становятся к нему чувствительными.

Важную роль в регуляции активности ферментов может играть их *взаимодействие с мембранами*. В мембранно-связанном состоянии физико-химические свойства ферментов (например, окислительно-восстановительный потенциал, чувствительность к катионам и др.) изменяются. Это явление называется *аллотопия*. Гидрофобные взаимодействия мембранных липидов и белков могут переводить последние в неактивное (латентное) состояние, а электростатические взаимодействия, напротив, вызывать активацию белков. В свою очередь, сила электростатического взаимодействия липидов и белков зависит от внутриклеточной концентрации электролитов, а следовательно, от состава среды, окружающей клетку, и от физиологического статуса последней. Таким образом, для регуляции ферментов по этому механизму существуют широкие возможности, хотя конкретные механизмы в силу трудно преодолимых методических препятствий пока изучены мало.

Суммируем рассмотренные регуляторные механизмы (табл. 8).

Таблица 8. Основные способы регуляции процессов метаболизма и природа эфффекторов

Тип процесса	Биосинтез белков				Активность белков	
	Индукция	Репрессия	Катаб. репрессия	Аттенюация	Гомотроп. кооперат.	Гетеротр. кооперат.
Энергетический	Да, субстрат, аналог (+)	Нет	Да, более выгодн. субстрат	Нет	Да, субстраты (+), (-)	Да, АТФ (-) АМР, АДФ (+)
Конструктивный	Нет	Да, конечные продукты (-)	Нет	Да, конечные продукты (-)	Нет	Да, конечные продукты (-)
Амфиболический	Иногда	Иногда	Иногда	Иногда	Да, субстраты, аналоги (+)	Да, конечные продукты (-) АТФ (-) АДФ (+)

Примечание: (+) — активирование; (-) — ингибирование



Глава 14. Транспорт субстратов и продуктов

С клеточной мембраной связан целый ряд важнейших метаболических процессов. Вот главные из них:

- 1) репликация ДНК;
- 2) биосинтез белков, липидов, компонентов клеточной стенки;
- 3) дыхание, фотосинтез;
- 4) клеточное деление;
- 5) мембранный транспорт, который и будет предметом рассмотрения в данной главе.

Мембранным транспортом будем называть транслокацию веществ через биологические мембраны с **обязательным** участием молекул-посредников: «подвижных переносчиков» или «каналообразующих» компонентов.

14.1. Механизмы клеточной проницаемости

Следует различать *пассивное* проникновение веществ через мембрану без участия посредников (*физическая диффузия*) и *активное* проникновение веществ через мембрану с участием посредников — собственно *транспорт* (поскольку латинское *transportare*, которое в переводе означает «перевозить», «переносить», подразумевает участие посредника: перевозчика или переносчика).

Пассивная проницаемость мембраны — это проникновение через нее веществ за счет теплового движения молекул. Конечным итогом такого процесса является уравнивание *внеклеточной* (S_o) и *внутриклеточной* (S_{in}) концентраций вещества. Начальная скорость физической диффузии зависит от внешней концентрации вещества (точнее — от градиента концентрации $\Delta S = S_o - S_{in}$), а изменение температуры (в пределах физиологической нормы) мало влияет на скорость процесса (поскольку он зависит от абсолютной температуры, K°).

Для большинства гидрофильных природных субстратов (сахаров, аминокислот, органических кислот в диссоциированном состоянии и др.) коэффициент диффузии через двойной липидный слой мембраны имеет очень низкую величину, поэтому скорость

их диффузии недостаточна для обеспечения нормального протекания метаболических процессов.

За счет физической диффузии осуществляется проникновение в клетки молекул *воды, некоторых газов* (кислорода, водорода, азота, но не углекислоты), а также *углеводородов (метана и его гомологов)* и *гидрофобных ксенобиотиков* (некоторых антибиотиков, ионофоров и др.).

В некоторых случаях истинного транспорта так же, как и при физической диффузии, происходит лишь уравнивание внешней и внутренней концентраций вещества. Такие процессы носят название *облегченной диффузии*. Они осуществляются с участием белков (переносчиков или каналообразователей), и скорость их достаточно велика. Типичным примером является проникновение веществ через наружную мембрану грамотрицательных бактерий с участием *белков-поринов*.

Значительно чаще транспорт приводит к заметному *концентрированию* транспортируемых веществ в клетке, так что $S_{in} \gg S_o$. Такой транспорт представляет собой термодинамическую работу и требует затраты энергии. Его называют *концентрирующим* или (менее правильно) *активным* транспортом (в действительности любой транспорт активен).

Особенностью транспортных процессов, в отличие от диффузии, является также их *стереоспецифичность*, в результате которой близкие по химической структуре вещества конкурируют при транспорте за общий переносчик (канал). Ограниченное количество молекул переносчика в мембране приводит к тому, что зависимость *начальной скорости* транспорта от *концентрации субстрата* описывается уравнением гиперболы, формально сходным с уравнением Михаэлиса—Ментен, описывающим ферментативную кинетику с аналогичными параметрами (K_m и V_{max}) (см. гл. 4):

$$V = \frac{V_{max}}{1 + K_m/S_o},$$

где V — начальная скорость транспорта; V_{max} — максимальная скорость при насыщающей концентрации субстрата (S_o); K_m — концентрация субстрата, при которой скорость транспорта равна половине максимальной. В этом случае говорят, что транспортный процесс подчиняется «кинетики насыщения».

Параметры K_m и V_{max} называют *параметрами транспортной системы*. K_m характеризует *сродство* транспортного посредника к субстрату, а V_{max} пропорциональна *количеству* посредника в мембране и *скорости* его функционирования. Для вычисления этих пара-

метров, как и в ферментативной кинетике, используют графики линейных аппроксимат уравнения Михаэлиса—Ментен (метод Лайнуивера—Берка и др. с теми же ограничениями).

14.2. Организация транспортных систем

Одной из первых моделей транслокации субстратов через биологические мембраны была модель «подвижного» переносчика, в которой предполагалось присутствие интегрального мембранного компонента, способного к образованию гидрофобного комплекса с гидрофильным субстратом, экранирующего последний от гидрофобной внутримембранной среды. Предполагалось, что образованный комплекс диффундирует на внутреннюю поверхность мембраны и там освобождает субстрат во внутриклеточную среду. По этому типу действительно осуществляется перенос ионов некоторыми ионофорами (валиномицином, моненсином и др.) (рис. 37а). Однако подобный механизм, как правило, не обеспечивает концентрирование субстрата в клетке. Вторая модель предполагает наличие в мембране гидрофильного канала, через который могут проникать субстраты. В отличие от малоспецифичных каналов, образуемых поринами, он должен обладать высокой специфичностью за счет «эстафетной» передачи субстрата от одного центра связывания к другому. Такой канал может стать асимметричным (например, при наложении ТЭП) и обеспечить концентрирование субстрата в клетке (рис. 37б).

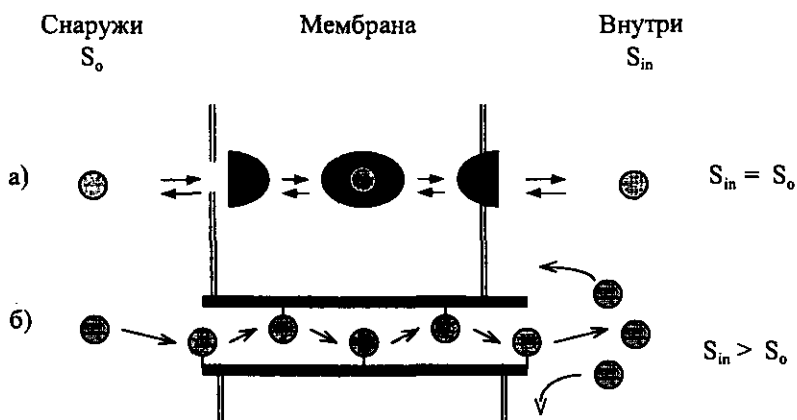


Рис. 37. Схема двух основных способов транслокации субстратов: модель «подвижного» переносчика (а) и трансмембранного «канала» (б)

Реальные транспортные системы часто включают более одного белкового компонента, а интегральные мембранные белки-«переносчики» многократно пересекают мембрану, образуя в ней сложную гидрофильную структуру. Молекулярные механизмы транслокации субстрата через такие структуры остаются до конца не расшифрованными.

По типу молекулярной организации транспортные системы можно разделить на два больших класса.

1. Транспортные системы, включающие *периплазматические связывающие белки*, которые обеспечивают «узнавание» и «доставку» субстрата к мембранному переносчику. Такие системы чувствительны к осмотическому шоку и зависят от энергии АТФ. К ним относятся системы транспорта некоторых аминокислот (глутамина), сахаров (арабинозы), неорганических катионов (K^+).

2. Транспортные системы, включающие только *интегральные мембранные компоненты* («мембранно-связанные» системы). Такие системы, как правило, осуществляют одновременный перенос (*симпорт*) субстрата и одновалентных неорганических катионов (H^+ или Na^+) и зависят от энергии ТЭП. К ним относятся системы транспорта большинства аминокислот, сахаров (лактозы), органических кислот и др.

14.3. Способы сопряжения транспорта с энергией метаболизма

Для концентрирования веществ внутри клеток необходимо превращение равновесного процесса «облегченной» диффузии в одновекторный процесс «активного» транспорта. Для этого необходима затрата энергии, т. е. создание своего рода «энергетического привода» для транспорта.

Сопряжение транслокации субстрата с энергией метаболизма осуществляется двумя основными путями.

1. Энергия может затрачиваться на такую *химическую модификацию субстрата*, которая делает его неспособным взаимодействовать с переносчиком на внутренней поверхности мембраны, а также проникать через мембрану чисто диффузионным путем, что предотвращает его «утечку» из клетки.

2. Энергия может затрачиваться на такую *модификацию переносчика*, которая делает его неспособным взаимодействовать с субстратом на внутренней поверхности мембраны, что также предотвращает «утечку» субстрата из клетки.

Системы первого типа фактически осуществляют первый (или один из первых) этапов метаболизма этих субстратов и поэтому называются системами векторного метаболизма или реакциями

переноса радикалов. К ним, например, относится *фосфотрансферазная* система транспорта сахаров и сахароспиртов (источник энергии — PEP), называемая также системой векторного фосфорилирования, и некоторые другие системы. Фосфотрансферазная система опосредует следующую цепь реакций (рис. 38).

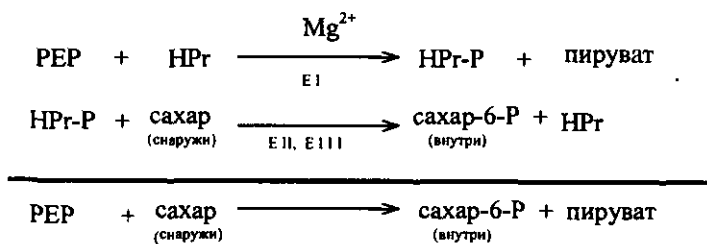


Рис. 38. Последовательность реакций векторного фосфорилирования в фосфотрансферазной системе:

PEP — фосфоенопируват; E I — фермент 1 (кодируется геном *pts1*); HPr — низкомолекулярный полипептид (кодируется геном *ptsH*) оперона *pts Escherichia coli*; E II — фермент 2, является сахароспецифичным «узнающим» компонентом, интегральным мембранным белком, осуществляющим транслокацию сахара через мембрану, сопровождающуюся фосфорилированием с помощью периферического белка E III, также специфичного к сахарам

Системы второго типа, в свою очередь, подразделяются на системы «первичного» активного транспорта, *генерирующие ТЭП* (дыхательная и фотосинтетическая цепи, декарбоксилазы, H^+ -АТФазы и др.) и системы «вторичного» активного транспорта, *использующие ТЭП* для транспорта органических и неорганических субстратов. В некоторых случаях, например в системах со «связывающими» белками, энергия АТФ непосредственно используется в транспорте субстратов. Системы «вторичного» активного транспорта распространены более широко и могут функционировать в соответствии с тремя основными механизмами (рис. 39).

Катионы транслоцируются в клетку по градиенту электрического потенциала путем своеобразного электрофореза (так называемый *унипорт* по Митчеллу).

Незаряженные соединения транслоцируются в клетку совместно с катионами H^+ или Na^+ (так называемый *симпорт*).

Анионы также могут транслоцироваться в клетку путем симпорта, присоединяя такое количество катионов, которого достаточно для перевода комплекса субстрата с переносчиком в положительно заряженную форму. Кроме того, анионы внешней среды могут обмениваться на внутриклеточные анионы (так называемый *антипорт*). По механизму антипорта могут транслоцироваться

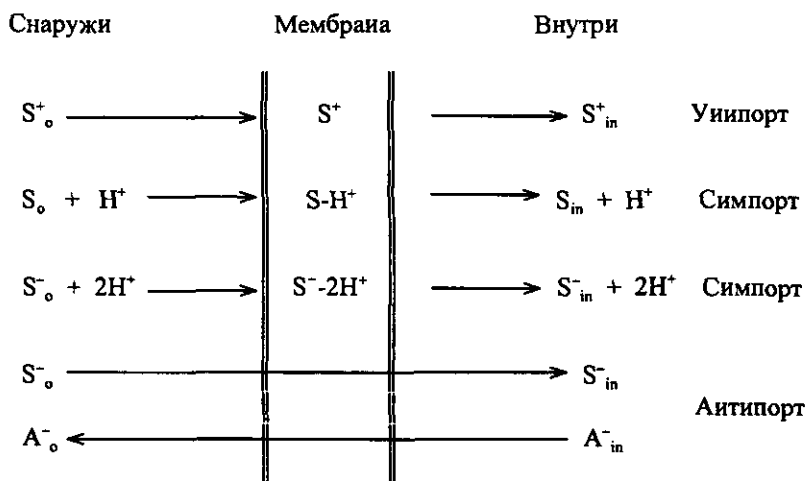


Рис. 39. Три основных типа сопряженного транспорта через биологические мембраны

ся и катионы, например у прокариот широко распространена система антипорта H^+ и Na^+ , а у эукариот — система антипорта K^+ и Na^+ (K^+ , Na^+ -АТФазы).

14.4. Регуляция транспортных процессов

Как и регуляция процессов внутриклеточного метаболизма, она осуществляется на двух уровнях: на уровне *биосинтеза* белковых посредников (переносчиков) и на уровне *функционирования* готовых посредников.

Основными механизмами регуляции биосинтеза переносчиков транспортных систем являются *индукция*, *репрессия* и *катаболическая репрессия* (см. гл. 11).

Как и в случае ферментов, по типу индукции и катаболической репрессии регулируется биосинтез компонентов тех транспортных систем, субстраты которых участвуют в *процессах катаболизма* (главным образом *сахаров* и *органических кислот*). По типу репрессии избытком субстрата регулируется главным образом биосинтез *аминокислотных транспортных систем*.

Особенность регуляции некоторых транспортных процессов состоит в том, что индукция осуществляется не внутриклеточным субстратом (как в классических случаях, в которых индуктор инактивирует внутриклеточный репрессор), а *внеклеточным субстратом*. Такая индукция называется *экзогенной* и требует нали-

чия промежуточного регуляторного интегрального мембранного белка, передающего сигнал индуктора на репрессор (рис. 40). Подобный тип индукции характерен, например, для транспортной системы гексозофосфатов, фосфоглицерата, некоторых трикарбоновых кислот, а также компонентов фосфотрансферазной системы.

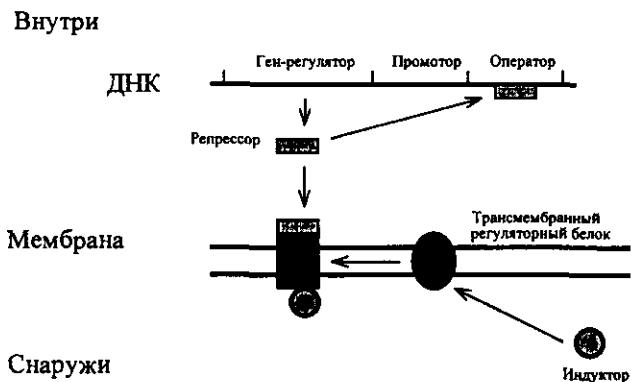


Рис. 49. Схема «экзогенной» индукции (ср. с рис. 28)

В данном случае индуктор, находящийся вне клетки, связывается не с репрессором, а с дополнительным регуляторным компонентом — трансмембранным белком, после взаимодействия с индуктором приобретающим способность связывать и инактивировать репрессор, запуская транскрипцию

Картина регуляции осложняется тем, что у многих организмов для одного и того же субстрата часто используется несколько транспортных систем, отличающихся по специфичности и величине кинетических параметров. Существуют системы с *узкой специфичностью*, предназначенные только для одного или небольшого числа сходных субстратов, и с *широкой специфичностью*. Например, у *Escherichia coli* существуют четыре системы для транспорта *ароматических аминокислот* (фенилаланина, тирозина и триптофана): три из них специфичны только для одной из этих аминокислот, а четвертая является общей для всех.

Регуляция *активности* белковых посредников транспортных систем может осуществляться способом *обратимой ковалентной модификации* (например, *фосфорилированием* регулируется активность фосфотрансферазной системы, а также K^+ , Na^+ -АТФазы) или путем *нековалентного взаимодействия с эффекторами*. В последнем случае, если эффектор взаимодействует с транспортной системой, находясь на той же стороне мембраны, что и субстрат, говорят о *цис-регуляции*. Например, отрицательная цис-коопера-

тивность обнаруживается при транспорте *пролина* у *Escherichia coli*: избыток субстрата тормозит свой собственный транспорт из среды. У галобактерий, наряду с обычными четырьмя транспортными системами для ароматических аминокислот, существует высокоспецифичная — для тирозина, обладающая очень высоким сродством к субстрату, активность которой подавляется избытком тирозина по бесконкурентному типу.

Если эффектор взаимодействует с транспортной системой, находясь по разные стороны мембраны относительно субстрата, говорят о *транс-регуляции* транспорта. Например, некоторые аминокислоты, в частности ароматические, находясь внутри клетки, тормозят свой собственный транспорт из среды.

События, связанные с регуляцией транспортных процессов, иногда оказывают существенное влияние на процессы метаболизма в целом. Ярким примером является участие фосфотрансферной системы в регуляции биосинтеза белков по типу катаболитной репрессии. Оказалось, что уровень сАМР у *Escherichia coli* облигатно зависит от функционирования фосфотрансферной системы, причем главную роль в этой связи играет специфический для глюкозы компонент Е I I I (рис. 41).

В отсутствие глюкозы все компоненты системы, в том числе и Е I I I, находятся в *фосфорилированном* состоянии за счет резерва РЕР. Фосфорилированный Е I I I, взаимодействуя с *аденилатциклазой*, переводит ее в активное состояние, в результате чего внутриклеточный уровень сАМР повышается и активизируется транскрипция «слабых» оперонов, в том числе систем транспорта и метаболизма других сахаров (т. е. снимается катаболитная репрессия).

Напротив, в присутствии глюкозы степень фосфорилирования Е I I I снижается в связи с переносом фосфорильного остатка на глюкозу в процессе ее транспорта. В результате уменьшается активность аденилатциклазы, снижается уровень сАМР и блокируется транскрипция ряда «сахарных» оперонов (т. е. наступает катаболитная репрессия).

Следует добавить, что нефосфорилированная форма Е I I I, по-видимому, может инактивировать транспортные системы других сахаров, предотвращая поступление последних в клетку, что еще более усиливает катаболитную репрессию.

Каков же механизм катаболитной репрессии в случае, когда подавляется синтез ферментов, ответственных за катаболизм самой глюкозы, а в качестве более выгодных в энергетическом смысле субстратов выступают, например, органические кислоты или водород? Ведь тогда участие фосфотрансферной системы не-

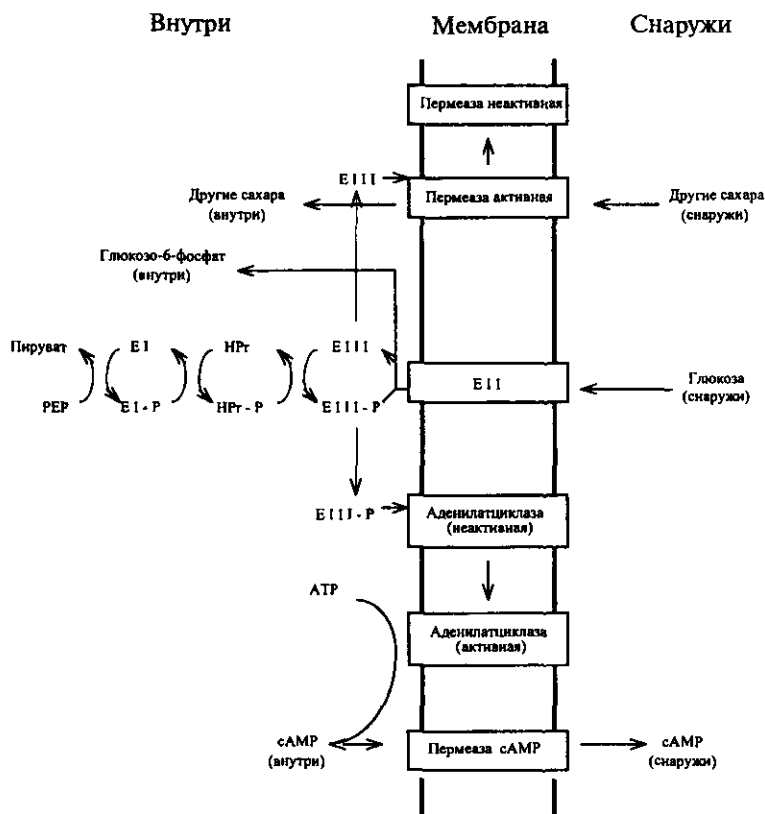


Рис. 41. Роль фосфотрансферной системы в катаболитной репрессии:

E I, HPr, E II, E III, — белковые компоненты системы, которые могут акцептировать фосфорильный остаток (P); E I и HPr — «растворимые» неспецифичные компоненты, E II и E III сахароспецифичны, причем E II выполняет роль транспортного «переносчика».

В процессе транспорта сахар (глюкоза) фосфорилируется и накапливается внутри клетки. Фосфорилированная форма E III — P, образующаяся за счет фосфоенолпирувата (PEP) в отсутствие глюкозы, активирует аденилатциклазу, свободная форма E III, накапливающаяся в присутствии глюкозы, подавляет активность транспортных систем других сахаров

возможно. Чтобы понять механизм явления, необходимо обратить внимание на нижнюю часть рис. 41, где изображена система экскреции cAMP. Значение этих систем для регуляции метаболизма мы рассмотрим подробнее в следующем параграфе, а здесь отметим только, что одним из способов снижения уровня cAMP может служить активирование его выброса из клетки, например наложением на мембрану ТЭП, т.е. путем «энергизации» мембраны, степень которой, естественно, будет выше всегда, когда использу-

ется более выгодный в энергетическом отношении субстрат. Таким образом, если субстрат обеспечивает энергетические потребности клетки и создает необходимую степень «энергизации» мембраны, он может (потенциально) вызывать подавление использования других субстратов, от которых зависит уровень сАМР в клетке (что и приведет к эффекту, сходному с катаболитной репрессией).

14.5. Транспорт веществ из клетки в среду: секреция и экскреция

До сих пор мы рассматривали процессы поступления веществ внутрь клеток. Однако очень большое значение имеют и обратные процессы — *выделение продуктов* из клеток.

Рассмотрим сначала процессы *секреции*, т. е. выделение из клетки белков (ферментов).

Секретируемые белки (*экзоферменты*) синтезируются в виде более длинных предшественников, которые подвергаются процессингу, как правило, на этапе транслокации через мембрану. Они содержат на NH_2 -конце так называемый *сигнальный пептид* из 15–30 аминокислот (преимущественно гидрофобных), которые удаляются специальной *сигнальной пептидазой*, локализованной в мембране. Транслокация белка через мембрану обычно протекает одновременно с трансляцией (*котрансляционная транслокация*), хотя известны случаи *посттрансляционной транслокации* (рис. 42). После образования сигнального пептида трансляция временно прекращается в результате присоединения к рибосоме нуклеопротеидного ингибитора (1) (еще один способ регуляции трансляции на стадии элонгации!) и полисомный комплекс перемещается к мембране, где локализован *аппарат секреции*, включающий *рецепторы* рибосомы и сигнального пептида. Происходит формирование трансмембранной «поры» (2). Сигнальный пептид закрепляется на своем рецепторе, и трансляция возобновляется, причем растущая пептидная цепь «проталкивается» через мембрану (3). Сигнальный пептид отщепляется сигнальной пептидазой, и «зрелая» молекула фермента отделяется от рибосомы (4). После завершения трансляции рибосомный комплекс покидает мембрану и диссоциирует на субчастицы для подготовки нового цикла трансляции (5).

Сходный механизм используется при образовании белков наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Такой белок содержит гидрофобную «якорную» последовательность, которая позволяет ему закрепиться в мембране, процесс его секреции часто называют *экспортом*.

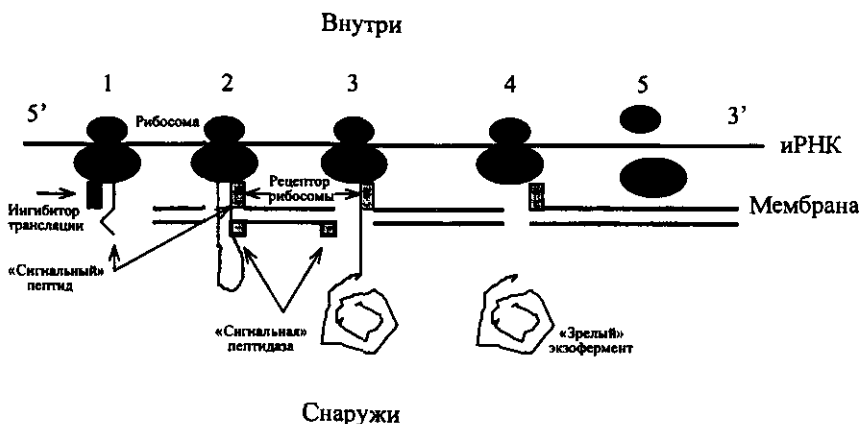


Рис. 42. Схема котрансляционной секреции экзофермента

У эукариот решающее значение в процессе секреции ферментов имеют эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи (см. гл. 2).

Для описания процесса выделения из клеток *низкомолекулярных веществ* используют термин *экскреция*. Она может выполнять три основные физиологические функции:

а) *удаление ингибитора* — токсичного для клетки вещества, продуцируемого эндогенно или поступающего из окружающей среды (например, антибиотика);

б) *удаление эффектора*, избыток которого нарушает нормальные физиологические процессы в клетке (например, индуктора или корепрессора);

в) *удаление конечного продукта метаболизма* с целью «сброса» окислительно-восстановительных эквивалентов, создания в среде резерва источников питания или запаса энергии в виде ТЭП (например, аминокислот, сахаров, органических кислот).

Дополнительные функции секреции могут состоять в выделении химических «сигналов», регулирующих физиологическое состояние популяции.

Хорошо изученными примерами экскреции *первого типа* являются транспортные системы, кодируемые плазмидами и опосредующие энергозависимое удаление антибиотиков-тетрациклинов, а также анионов арсената и катионов Cd^{2+} из клеток устойчивых к этим ингибиторам микроорганизмов.

Пример экскреции *второго типа* — так называемый выброс индуктора в системе метаболизма лактозы (кодируемой *lac*-опероном) под действием глюкозы, а также экскреция сАМР в результате повышения ТЭП. Оба эти эффекта представляют собой

дополнительные проявления регуляции метаболизма по механизму катаболитной репрессии.

Наконец, примером экскреции *третьего типа* может служить выделение лактата в процессе молочнокислого брожения, в результате чего происходит «сброс» восстановительных эквивалентов и формирование ТЭП (см. гл. 8).

Важное физиологическое значение регуляции внутриклеточного уровня низкомолекулярных веществ путем их экскреции из клетки позволяет рассматривать эти механизмы как особый уровень регуляции метаболизма, который мы предлагаем называть *мембранной регуляцией*.



Глава 15. Регуляция клеточного деления и скорости роста клеток

Существует понятие о *клеточном цикле* — последовательности событий от одного деления клетки до другого. Клеточный цикл прокариотической и эукариотической клеток различается весьма существенно. Учитывая большую сложность организации клеток эукариот, проще начать с рассмотрения механизмов регуляции процессов клеточного деления и роста клеток прокариот, тем более что в биотехнологических процессах все большее распространение получают культивирование эукариотических клеток (даже растительных и животных) с использованием подходов, применяемых для культивирования одноклеточных прокариот.

15.1. Последовательность событий в процессе деления клетки

Процесс *клеточного деления* у прокариот (а в значительной степени и у эукариот) включает следующие события в определенной очередности:

- 1) накопление «критической» клеточной массы (объема);
- 2) репликация ДНК генома;
- 3) построение новой клеточной оболочки (клеточной стенки и цитоплазматической мембраны);
- 4) построение клеточной перегородки (перетяжки);
- 5) расхождение дочерних клеток.

Некоторые из этих событий протекают одновременно, другие строго последовательно или вообще могут отсутствовать (как, например, построение клеточной стенки у микоплазм или расхождение клеток у сарцин и стрептококков).

Регуляция клеточного деления складывается из регуляции каждого из этих событий и организации их *взаимодействия*, при котором в клеточном делении устанавливается последователь-

ность процессов (например, в норме репликация ДНК должна завершиться до построения клеточной перегородки) и вырабатываются *сигналы* для инициации следующего по порядку процесса.

15.2. Накопление критической клеточной массы и репликация ДНК

Это необходимые подготовительные этапы собственно клеточного деления. Следует отметить, что размер клеток каждого микроорганизма, растущего сбалансированно в стандартных условиях, является достаточно постоянной величиной, чтобы служить одним из таксономических признаков. В.Д. Донаши даже ввел понятие элементарной клетки, т. е. наименьшей, возможной для данного микроорганизма. Таким образом, существуют механизмы, включающие процесс деления клетки при накоплении ее пороговой массы. Наличие такой связи (положительного и отрицательного контроля) мы уже обсуждали при рассмотрении регуляции репликации в гл. 11.

15.3. Построение новой клеточной оболочки

Необходимо различать *пролиферацию* цитоплазматической мембраны и клеточной стенки (т. е. динамику накопления в них нового материала на протяжении клеточного цикла) и *сегрегацию* поверхностных структур (т. е. способ включения нового материала в предсуществующие структуры, а именно, локализацию соответствующих центров, или *сайтов* включения новых фрагментов).

При изучении пролиферации используют, как правило, *синхронные культуры* микроорганизмов и изучают включение меченых радиоизотопами соединений (для мембранных белков — аминокислот, для мембранных липидов — глицерина, для мукопептида клеточной стенки — N-ацетилглюкозамина, диаминопимелиновой кислоты или лизина и т.д.) путем равновесного (в течение длительного срока) или импульсного (кратковременного) введения этих соединений.

Таким путем установлено, что включение белков в цитоплазматическую мембрану *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* следует сложной кинетике, свидетельствующей о запасании преобразованных белков в цитоплазме, в период *подготовки* клеточного деления и быстрой их *мобилизации* — в процессе построения клеточной

перегородки. В период деления возрастает активность некоторых литических ферментов (в частности, *муреингидролаз*), участвующих в образовании «брешей» в предсуществующем каркасе клеточной стенки, необходимых для включения новых ее фрагментов. Таким образом, регуляция активности этих ферментов осуществляется путем временного перевода их в скрытое (латентное) состояние с последующей мобилизацией в необходимый момент. Точных данных о механизмах такой регуляции нет, но можно полагать, здесь имеет место взаимодействие ферментов с мембранами (см. соответствующий раздел в гл. 13).

При изучении *сегрегации* поверхностных слоев также используют введение в эти структуры меченых предшественников с прослеживанием их судьбы через несколько поколений после переноса клеток на среду, не содержащую метки (так называемые эксперименты *pulse-chase*). Наблюдения обычно осуществляют методом электронно-микроскопической радиоавтографии, где в качестве метки используется тритий (H^3), который в силу небольшой энергии β -частиц дает на радиоавтографах короткие треки, удобные для определения мест локализации метки.

Другой подход — наблюдение за образованием и распределением *маркеров* структурных компонентов оболочки в течение нескольких поколений после их *индукции*. В этом случае удобно использовать специфические маркеры клеточной стенки (рецепторы фагов, колицинов, а также «матриксные» белки) или цитоплазматической мембраны (интегральные мембранные ферменты), или, наконец, такие общие маркеры, как жгутики.

Можно представить себе три основных способа локализации сайтов включения предшественников: *консервативный* (рис. 43а), *полуконсервативный* (рис. 43б) и *дисперсивный* (рис. 43в). В первом случае после второй генерации лишь четверть клеток содержит маркеры, во втором случае — половина клеток, а в третьем — все клетки.

Вопрос о механизме сегрегации поверхностных слоев можно считать более или менее однозначно решенным лишь для кокковидных форм бактерий в случае, если они характеризуются мономорфным клеточным циклом и делятся в одной плоскости (например, стрептококки). Для этих форм разные экспериментальные подходы дают сходную картину, указывающую на *полуконсервативный* способ сегрегации. Для палочковидных форм бактерий сведения о способе сегрегации противоречивы.

Однозначное установление локализации мест включения мембранных компонентов затрудняется их значительной латеральной

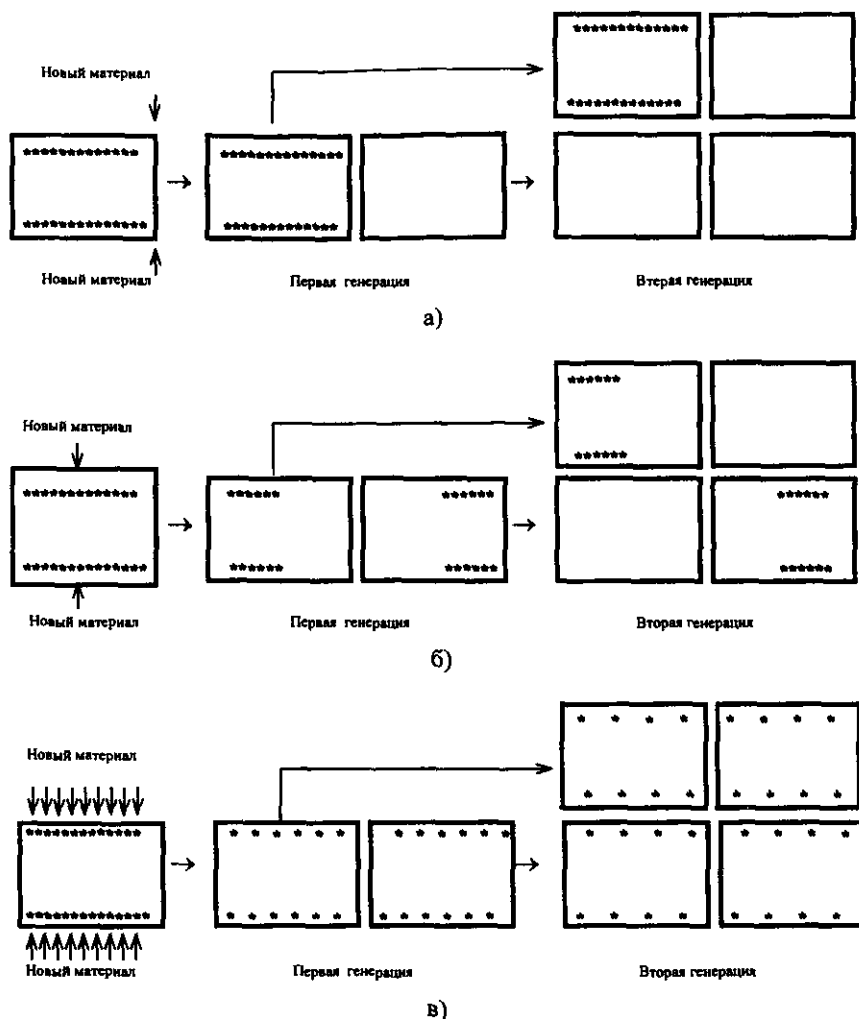


Рис. 43. Три основных способа сегрегации компонентов оболочки:

а) консервативный; б) полуконсервативный; в) дисперсивный; звездочками показаны маркеры

(в плоскости мембраны) подвижностью (за счет диффузии), составляющей, например, для липополисахарида наружной мембраны *Escherichia coli* около 1 мкм за 25 с. Кроме того, способ сегрегации может определяться скоростью роста микроорганизма: у медленно растущих клеток *Escherichia coli* он близок к биполярному, а у быстро растущих становится дисперсивным.

15.4. Построение клеточной перегородки

В изучении механизмов регуляции данного этапа клеточного цикла важную роль сыграли специфические мутанты, особенно мутанты *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*, образующие *миниклетки* (*min*-мутанты). Миниклетки возникают на полюсах нормальных клеток, имеют небольшие размеры и не содержат хромосомной ДНК. Однако у них нормальный аппарат транскрипции и трансляции, поэтому они могут быть использованы для изучения функционирования захваченных из материнской клетки плазмид, а также введенных извне искусственных генетических элементов, полученных методами генетической инженерии. Именно существование *min*-мутантов позволило сделать вывод, что сайт, ответственный за образование перегородки и локализующийся в процессе деления в экваториальной зоне клетки, сохраняется на полюсах дочерних клеток. В норме эти полярные сайты выключаются и могут функционировать наряду с вновь формирующимися экваториальными сайтами лишь у *min*-мутантов.

В любой из клеток *min*-мутанта одновременно существуют два функционально активных сайта построения перегородки, но в клеточном цикле срабатывает лишь один из них (рис. 44).

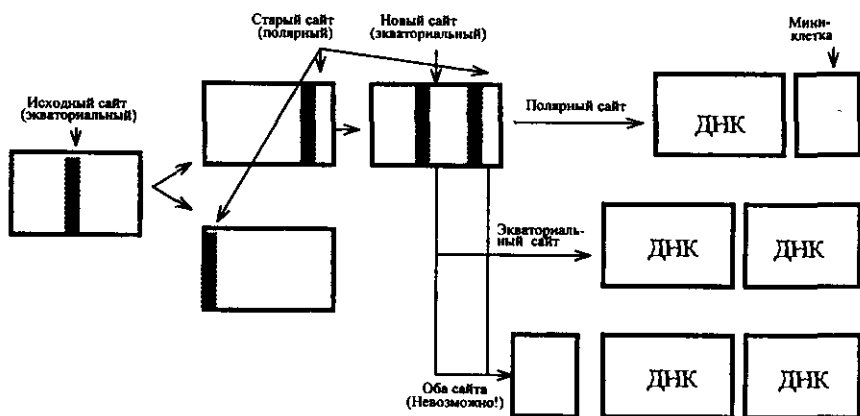


Рис. 44. Схема альтернативного выбора сайта построения клеточной перегородки

Оказалось невозможным образование одновременно трех клеток: двух нормальных и одной мини. Поэтому сделан вывод о существовании определенного компонента — *активатора* сборки клеточной перегородки. По-видимому, на протяжении клеточно-

го цикла образуется *ограниченное количество* (квант) этого активатора, достаточное для функционирования лишь одного сайта, и оно полностью расходуется в этом процессе.

Обнаружить существование такого кванта в нормальных клетках невозможно, так как количество квантов активатора и количество функционирующих сайтов у них совпадает, а у *min*-мутантов это количество превышает число квантов активатора.

15.5. Характер взаимосвязи процессов клеточного деления

Между процессом накопления критической массы клетки, репликацией ДНК и построением клеточной перегородки не обнаружено облигатно-реципрокной связи, при которой подавление одного из процессов тормозило бы другие и наоборот. Например, в случае *Bacillus subtilis* возможно построение перегородки и формирование клеток нормального размера после подавления репликаций ДНК налидиксовой кислотой. В результате одна из дочерних клеток не содержит ДНК. Кстати, такие клетки (как и миниклетки), не содержащие ДНК, нечувствительны к пенициллину, вызывающему лизис только активно растущих клеток, поэтому данный антибиотик можно использовать для получения их чистой популяции без ДНК для дальнейших исследований.

Можно получить и обратную картину, если ингибировать построение клеточной перегородки низкими концентрациями пенициллина G (у *Escherichia coli* сайт построения перегородки более чувствителен к этому антибиотику, чем сайты, ответственные за пролиферацию клеточной стенки). Аналогично действует повышение температуры в случае некоторых *ts*-мутантов. При этом рост клетки и репликация ДНК могут продолжаться, приводя к возникновению «многонуклеоидных» нитей (филамент), которые после удаления ингибитора фрагментируются на соответствующее число нормальных клеток.

Замечено, что клеточный цикл прокариот, таких как *Escherichia coli*, при росте на минеральной среде с глюкозой (время генерации около 60 мин.) можно подразделить на два основных периода. Они получили обозначения периодов *C* и *D*. Иногда в периоде *D* выделяют еще период *T* — время от появления первых признаков клеточной перегородки (перетяжки) до завершения клеточного деления (рнс. 45а).

Период *C* в норме занимает около 40 мин., фактически представляя собой время полной репликации генома *Escherichia coli*, которое мало зависит от скорости роста (даже если время генерации

меньше 40 мин.). В последнем случае инициация нового цикла репликации ДНК происходит до завершения клеточного деления, и дочерние клетки получают уже частично реплицированную ДНК, так что к моменту деления репликация успевает завершиться.

Период D занимает около 20 мин. — между моментом завершения репликации и моментом окончательного формирования клеточной перегородки (вар. 1 на рис. 45а).

Для нормального протекания клеточного цикла необходимо, чтобы в период C происходила не только репликация ДНК, но и синтез белка и РНК, так как ингибиторы транскрипции (рифампицин) и трансляции (левомецетин), введенные в течение периода C , тормозят клеточное деление и увеличивают время генерации. Если же ввести эти ингибиторы на период, не превышающий 15 мин., деление клетки завершается вовремя (вар. 2 на рис. 45а). Очевидно, что минимальная длительность периода D может быть равна периоду T , т. е. времени, необходимому для сборки перегородки. Эти выводы подтверждаются фактом, что данные ингибиторы, введенные в период D , не тормозят клеточное деление. Следовательно, предшественники, необходимые для построения клеточной перегородки, и другие белки, важные для завершения

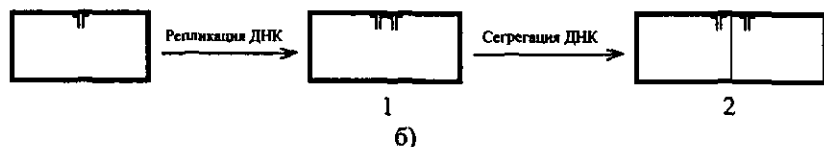
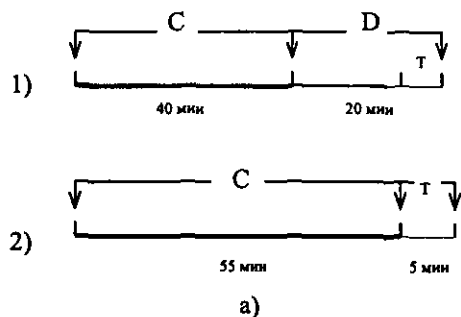


Рис. 45. Основные периоды клеточного цикла *Escherichia coli*. Пояснения в тексте (по Mandelstam et al.1982) (а); праеило «вето» для клеточного деления (б):

1 — после окончания репликации ДНК сегрегация не завершена, и клеточное деление «запрещено»; 2 — сегрегация ДНК завершена, построение перегородки и клеточное деление «разрешены»

деления клетки, синтезируются в период *S* и хранятся в резерве до начала сборки перегородки (что соответствует существующим представлениям о динамике пролиферации оболочки, приведенным в § 15.3).

Центральное место в проблеме регуляции клеточного деления занимает вопрос о природе сигнала, необходимого для запуска процесса сборки клеточной перегородки. Длительное время считалось, что этим сигналом является терминация репликации ДНК, однако рассмотренные нами свидетельства, указывающие на отсутствие облигатной связи между этими процессами, делают подобное заключение сомнительным.

Недавно установлено, что подавление *сегрегации* (расхождения) вновь синтезированных цепей ДНК, достигаемого в период *D* за счет сборки клеточной оболочки из предшественников, препятствует завершению клеточного цикла. Поэтому можно полагать, что для нормального построения клеточной перегородки от ДНК должен быть освобожден сайт, ответственный за сборку перегородки, локализованный в экваториальной части клетки и занятый ДНК сразу после завершения ее репликации (рис. 456). Отсюда вывод: регуляторное взаимодействие между репликацией ДНК и построением клеточной перегородки состоит в своеобразном правиле «вето» со стороны ДНК. Если нарушен процесс нормальной сегрегации реплицированной ДНК и соответствующее место в экваториальной области клетки занято, то сборка клеточной перегородки не может быть осуществлена и клеточное деление тормозится. Формально в этом случае наблюдается зависимость между репликацией ДНК и делением клетки.

15.6. Взаимодействие регуляторных механизмов при управлении скоростью роста микроорганизмов

Один из узловых вопросов, связанных с управлением скоростью роста микроорганизмов — о механизмах перестройки метаболизма микробной клетки при изменении состава питательной среды.

В хемостатной культуре регулирование состава среды (смена «лимитирующего» субстрата) позволяет получить клетки определенного химического состава а иногда и с заранее заданными свойствами. Например, в соответствии с данными табл. 9 для получения клеток, обогащенных белком, но со сниженным содержанием нуклеиновых кислот (что важно для кормовых и пищевых целей) целесообразно использовать лимитирование по фосфору.

При обогащении среды, допустим, путем добавления дополнительных питательных веществ (аминокислот), а в хемостатной культуре путем увеличения протока среды, скорость роста увеличивается до нового значения, которое, как правило, не является максимально возможным в силу неполной реализации потенциала клетки. Это происходит из-за наличия так называемых узких мест, т. е. биохимических реакций, ограничивающих скорость всего процесса, а выявляя их, можно получить максимальный выход биомассы и ценных для человека продуктов метаболизма (в случае использования микроорганизмов в биотехнологических процессах).

Таблица 9. Влияние различных видов лимитирования на состав клеток микроорганизма (типа *Escherichia coli*)

Лимитируемый источник	Состав клеток			
	Белок	Нуклеиновые кислоты	Липиды	Запасные вещества
Углерод	Не влияет	Не влияет	Снижает	Снижает
Азот	Снижает	Снижает	Повышает	Повышает
Фосфор	Не влияет или повышает	Снижает	Снижает	Повышает
Цинк	Не влияет	Снижает	Не влияет	Не влияет

Рассмотрим значение разных уровней регуляции, представленных на схеме (рис. 46), для управления общей скоростью роста организма.

Обычно скорость транспорта субстратов (7) более или менее точно сбалансирована со скоростью их метаболизма (для большинства сахаров и органических кислот), а иногда превышает ее (для аминокислот). В последнем случае в клетке формируется резерв (пул) субстратов, способный оказывать разнообразное, в том числе тормозящее, действие на метаболизм клетки, если отсутствует транс-регуляторное ингибирование транспорта этих субстратов из среды их внутриклеточным пулом. При некоторых условиях транспорт оказывается лимитирующим этапом метаболизма, например при дефиците в среде необходимых субстратов и кофакторов, особенно в случае организмов, не способных к синтезу данных веществ (*ауксотрофов*) или осуществляющих эти процессы с пониженной скоростью (*брадитрофов*). Аналогичная ситуация создается при недостаточной эффективности транспортных систем (*криптические мутанты*), даже если в среде избыток

субстрата. Этап *выделения продуктов* (8) может лимитировать рост, если продукт обладает ингибиторным или отрицательным регуляторным действием на метаболизм. В клетке при этом может вырабатываться специальный механизм (мембранный транспортный канал) для активного удаления таких веществ.

В тех случаях, когда транспортный процесс становится узким местом, лимитирующим общую скорость метаболизма, воздействие, активирующее транспорт или повышающее избирательную проницаемость клеточной оболочки, может положительно

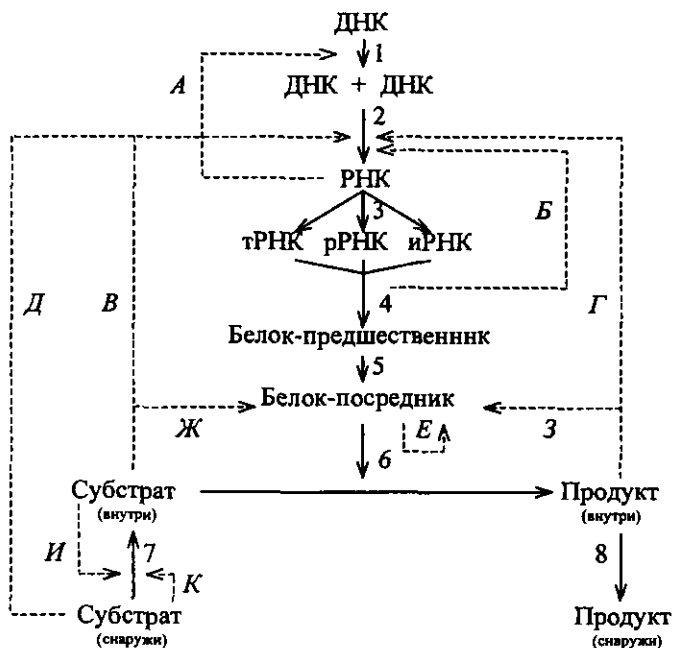


Рис. 46. Схема основных биохимических процессов и способов их регуляции:

1–5 — уровень биосинтеза белковых посредников; основные процессы: 1 — репликация, 2 — транскрипция, 3 — сборка аппарата трансляции, 4 — трансляция, 5 — посттрансляционная модификация; основные способы регуляции: А — участие транскрипции в репликации (РНК-затравка), Б — влияние трансляции на транскрипцию (аттенуация, «строгий» контроль), В — индукция, Г — репрессия, Д — экзогенная индукция; 6–8 — уровень функционирования белковых посредников; основные процессы: 6 — ферментативная активность, 7 — транспорт субстратов, 8 — экскреция продуктов; основные способы регуляции: Е — обратимая ковалентная модификация, Ж — влияние субстрата на активность фермента, З — влияние продукта на активность фермента, И — транрегуляция транспорта, К — цис-регуляция транспорта

Сплошными линиями показаны основные пути синтеза и функционирования белковых посредников, штриховыми линиями — основные механизмы регуляции. На схеме не обозначено, но подразумевается участие белковых посредников в процессах репликации, транскрипции, трансляции и транспорта

влиять на скорость роста организма. Этап *функционирования ферментов* (б) может оказаться рост-лимитирующим звеном метаболизма лишь при отсутствии в клетке необходимого количества фермента (либо у дефектных мутантов, имеющих малоактивный фермент). При этом быстро включаются компенсирующие механизмы: наступает индукция фермента или снимается репрессия его синтеза. Для конститутивных ферментов возможна стимуляция на уровне трансляции. Только при недостаточной эффективности всех этих регуляторных механизмов количество фермента может оказаться неадекватным условиям роста.

Во многих случаях несбалансированного роста наиболее вероятными претендентами на роль «узких мест» метаболизма являются *процессы синтеза макромолекул, особенно РНК и белка*. Этап *репликации* (1) редко выступает в качестве узкого места метаболизма, хотя скорость элонгации ДНК — величина достаточно постоянная, составляющая у *Escherichia coli* около 2000 пар нуклеотидов в секунду, и мало зависит от условий выращивания (в оптимальной области снабжения предшественниками). Это объясняется специальной организацией регуляторных механизмов, настроенных таким образом, что при улучшении условий питания повышается *частота инициации* новых циклов репликации ДНК. Поэтому, если время генерации меньше, чем период репликации ДНК (у *Escherichia coli* 35–40 мин.), то новые циклы репликации иницируются до завершения старых и в быстро растущих клетках ДНК присутствует в виде сильно разветвленной структуры, соответствующей по массе 3–8 эквивалентам генофора. При этом, очевидно, локусов, расположенных вблизи от точки начала репликации, в клетке значительно больше, чем расположенных ближе к точке терминции, что может вызывать повышение синтеза некоторых белков (эффект дозы гена). Однако чаще всего эффект дозы гена не проявляется из-за регуляции на уровне транскрипции и трансляции.

Менее определенной оказывается ситуация с *транскрипцией* (2). Длительное время считалось, что скорость элонгации в транскрипции является такой же постоянной величиной, как и в репликации. Но появляется все больше сведений о том, что в транскрипции она может варьировать.

Существует тесное сопряжение между элонгацией РНК в процессе транскрипции и элонгацией полипептидной молекулы в процессе *трансляции* (4), и выражается оно не только в пространственном сопряжении процессов, как это имеет место при аттенюации, но и в регуляторном воздействии через молекулы эффекторов. Торможение элонгации трансляции приводит к син-

тезу специфического эффектора *гуанозинтетрафосфата* (*ppGpp*), который существенно влияет на процесс транскрипции (рис. 47).

Дефицит энергии (АТФ) также тормозит гидролиз *ppGpp*, так как активность пирофосфатгидролазы АТФ-зависима (точнее, она зависит от ТЭП). Таким образом, при аминокислотном голодании не только стимулируется синтез *ppGpp*, но и тормозится его гидролиз.

Кроме этого механизма, по-видимому, существует еще один путь синтеза *ppGpp*, так как при дефиците источников энергии он накапливается даже в клетках мутанта *Escherichia coli* (*Rel⁻*). У некоторых бацилл и стрептомицетов установлен фактор (обозначенный *RelX*), независимый от рибосом, катализирующий синтез *ppGpp* при снижении уровня АТФ в клетке. Накопление *ppGpp* в клетках приводит к *резкому торможению* образования стабильных форм РНК (тРНК и рРНК (см. рис. 46 (3)) и, соответствен-

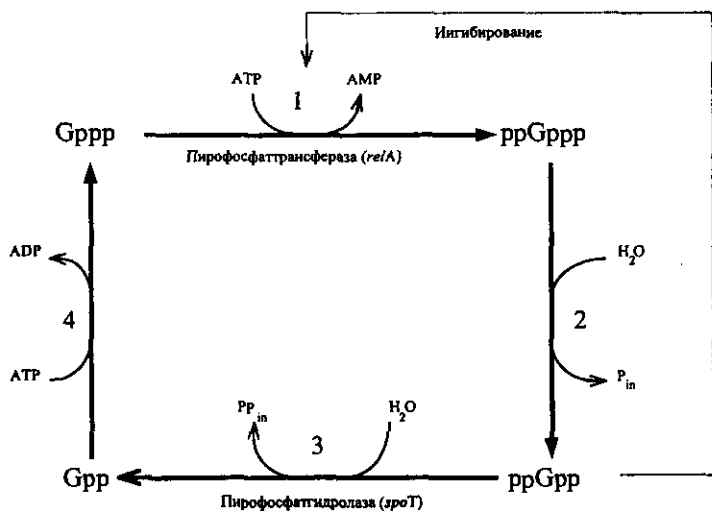


Рис. 47. Схема образования и распада гуанозинтетрафосфата (*ppGpp*)

Образование *ppGpp* инициируется при аминокислотном голодании и катализируется пирофосфаттрансферазой (продуктом гена *relA*) (реакция 1). Когда при дефиците аминокислот в акцепторный участок рибосомы попадает «незаряженная» РНК с кодоном, комплементарным кодо- ну матрицы, иРНК, указанный фермент, находившийся в латентном, связанном с рибосомой со- стоянии, активируется и катализирует синтез гуанозинпентафосфата (*ppGpp*), который подвергается быстрому гидролизу с участием 5-нуклеотидазы (продукта гена *gpp*) (реакция 2). В результате накапливается истинный эффектор — гуанозинтетрафосфат (*ppGpp*). Уровень *ppGpp* в клетке строго контролируется не только скоростью образования, аллостерически регулируемой самим *ppGpp*, но и скоростью распада под действием 3-пирофосфатгидролазы (продукта гена *spoT*) (реакция 3). Этот фермент, по-видимому, тоже связан с рибосомами, причем его активность подавляется «незаряженной» тРНК

но, к торможению формирования аппарата трансляции, избыточное количество которого в условиях голодания становится излишним и даже вредным. Это и есть так называемый *строгий контроль*. Одновременно подавляется транскрипция локусов рибосомных белков и факторов элонгации трансляции. Однако ррGpp оказывает и *положительное действие на транскрипцию*: он стимулирует транскрипцию некоторых аминокислотных регулонов (триптофанового, гистидинового), а также регулонов азотного метаболизма.

Кроме влияния на транскрипцию ррGpp регулирует *активность* ряда ключевых ферментов метаболизма, участвующих в образовании нуклеотидов, фосфолипидов, пептидогликана, в транспорте азотистых оснований и т.д. Наконец, ррGpp *активирует* некоторые протеолитические системы клетки, ускоряя внутриклеточный протеолиз.

Все изложенное делает понятной необходимость тонкой регуляции уровня ррGpp в клетке.

Необходимо отметить, что гуанозинполифосфаты аналогичного или иного строения обнаружены в клетках многих про- и эукариот, где они выполняют различные регуляторные функции (по-видимому, наряду с аденозинполифосфатами).

Таким образом, *сопряженный процесс транскрипции-трансляции* оказывается во многих случаях решающим этапом приспособления клетки к условиям голодания, например при переносе на бедную среду (так называемый *shift-down*).

При обратной ситуации — переносе клеток на богатую среду (*shift-up*) именно процессы сопряженной транскрипции-трансляции (особенно на этапе биосинтеза и сборки аппарата трансляции) являются наиболее узким местом метаболизма, лимитирующим общую скорость роста популяции.

После обогащения среды происходит «вспышка» синтеза белка (за счет мобилизации внутренних ресурсов, в частности пула рибосомных субчастиц), тРНК переходит в «заряженное» состояние, в результате резко снижается образование ррGpp и запускается быстрый синтез стабильных форм РНК (тРНК и рРНК), чему способствует множественная репрессия ранее функционировавших оперонов (в связи с наличием в богатой среде готовых конечных продуктов: аминокислот, азотистых оснований и др.). В итоге синтез белка и скорость роста увеличиваются, пока позволяет сопряженное функционирование процессов транскрипции-трансляции.

Из всего изложенного следует практический вывод, касающийся селекции и конструирования штаммов-продуцентов, спо-

собных к «сверхсинтезу» ценных продуктов. Например, для стимуляции синтеза аминокислот образование ррGpp оказывается полезным, поэтому более перспективными продуцентами могут оказаться штаммы *Rel⁺*. Напротив, конструирование штаммов, образующих белковые продукты (особенно «чужеродные» белки, например инсулин или интерферон у бактерий), предполагает необходимость подавления внутриклеточного протеолиза, что требует использования штаммов *Rel⁻* или других условий, подавляющих образование ррGpp.



Литература

Основная

1. Бендер М., Бергерон З., Комиама М. Биоорганическая химия ферментативного катализа. М.: Мир, 1987.
2. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. Т. 1–3.
3. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия. М.: Высшая школа, 1998.
4. Корнш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979.
5. Мецлер Д. Биохимия. М.: Мир, 1980. Т. 1–3.
6. Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот/Под ред. А.С. Спирна. М.: Высшая школа, 1990.
7. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987.
8. Спиринов А.С. Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка. М.: Высшая школа, 1986.
9. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. М.: Высшая школа, 1996.

Дополнительная

1. Албертс Б., Брей Д., Льюис Ж. и др. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 1–3.
2. Бохински Р. Современные воззрения в биохимии. М.: Мир, 1987.
3. Гекселер К., Экштайн Э. Аналитические и препаративные лабораторные методы. М.: Химия, 1994.
4. Громов Б.В. Строение бактерий. Л.: ЛГУ, 1985.
5. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. М.: МГУ, 1992.
6. Дебабов В.Г., Лившиц В.А. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. М.: Высшая школа, 1988.
7. Елинов Н.П. Химическая микробиология. М.: Высшая школа, 1989.
8. Ленинджер А. Основы биохимии. М.: Мир, 1985. Т. 1–3.
9. Плакунов В.К. Основные принципы регуляции метаболизма и скорости роста микроорганизмов//Промышленная микробиология / Под ред. Н.С.Егорова. М.: Высшая школа, 1989. С. 29–76.

10. *Практическая химия белка*/ Под ред. А. Дарбре. М.: Мир, 1989.
11. *Страйер Л.* Биохимия. М.: Мир, 1984. Т. 1–3.
12. *Уайт А. Хендлер Ф., Смит Э. и др.* Основы биохимии. М.: Мир, 1981. Т. 1–3.
13. *Хесин Р.Б.* Непостоянство генома. М.: Наука, 1985.
14. *Biochemistry of bacterial growth*/J.Mandelstam, K.McQuillen and I.Daves, eds. London etc.: Blackwell Sci. Publ., 1982.
15. *Methods in Enzymology* /F.Wold, K.Moldave, eds. N.Y., London: Academic Press, 1983. V.106, 107; 1986. V.130, 131.

Учебное издание

Плакунов Владимир Константинович

ОСНОВЫ ЭНЗИМОЛОГИИ

Учебное пособие

Редактор Т.А. Ларионова
Оформленне Е. Молчанова, С. Носова
Компьютерная верстка А.В. Егоровой

Изд. лиц. ИД № 01670 от 24.04.2000
Налоговая льгота – общероссийский классификатор
продукции ОК-005-93, том 2: 953000

Подписано в печать 28.11.2000. Формат 60x90/16.
Печать офсетная. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.
Печ. л. 8,0. Тираж 2000 экз. Заказ № 1895

Издательско-книготорговый дом «Логос»
105318, Москва, Измайловское ш., 4

Отпечатано с готовых диапозитивов заказчика
в Марийском полиграфическо-издательском комбинате
424000, г. Йошкар-Ола, ул. Комсомольская, 112

По вопросам приобретения литературы
обращаться по адресу:

105318, Москва, Измайловское ш., 4.

Тел./факс: (095) 369-5819, 369-5668, 369-7727

Электронная почта: universitas@mail.ru

Приглашаем в новый Интернет-магазин
«Университетская книга».

Его сетевой адрес: <http://www.chat.ru/~universitas/>

ISBN 5-94010-027-9



9 785940 100270

Книга видного ученого, доктора биологических наук В.К. Плакунова освещает новейшие научные воззрения на биологические катализаторы – ферменты, раскрывает их роль в биохимических процессах, мембранном транспорте, координации регуляторных механизмов в живой клетке. Изложение основано на результатах исследований автора, выполненных в научных учреждениях РАН, а также опыте преподавания курсов биохимии и энзимологии в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова.

Для студентов высших учебных заведений, научных работников и специалистов в области биохимии, энзимологии и биотехнологий.



Учебные издания серии «Учебник для XXI века» удостоены диплома XIII Московской международной книжной ярмарки 2000 г.

ISBN 5-94010-027-9



9 785940 100270