

На уровне организма в целом важнейшее значение имеет химическая сигнализация посредством гормонов, регулирующих поведение ряда систем, образующих организм. Гормоны во многих случаях воздействуют не только на клеточные мембраны, но непосредственно влияют на гены, на ДНК и, тем самым, участвуют в регуляции белкового синтеза (см. ниже и [71]). Так, гормон альдостерон регулирует прохождение ионов Na^+ и K^+ через клеточные мембраны. С помощью радиоактивной метки показано, что альдостерон проникает в клеточное ядро. Через некоторое время после того, как концентрация альдостерона стала внутри клетки максимальной, перемещение ионов через мембрану усиливается. Это происходит вследствие усилившегося синтеза специфического белка. Действительно, если клетки предварительно обработаны антибиотиком пуромицином, то гормон своего действия не оказывает. Между тем известно, что пуромицин блокирует действие генов, препятствует биосинтезу белка.

Активность гормонов связана во многих случаях с функционированием важного сигнального вещества живых клеток — циклической АМФ (см. ниже).

Все изложенное подтверждает общие положения современной биологии, согласно которым живой организм следует трактовать как весьма сложную химическую машину. Процессы сигнализации, регуляции, управления в такой машине реализуются посредством молекул на основе молекулярного узнавания.

§ 1.6. МОЛЕКУЛЯРНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА

Явления молекулярного узнавания, реализуемые посредством слабых взаимодействий, ответственны за совокупность регуляторных процессов в живой клетке, определяющих весь ход ее развития (см. гл. 9). Молекулярные взаимодействия формируют необходимые для регуляторных процессов обратные связи. Это относится, в частности, к функционированию аллостерических ферментов ([1], гл. 7). Здесь мы рассмотрим молекулярную регуляцию биосинтеза белка, регуляцию действия генов.

Синтез белка искажается при воздействии мутагенов на ДНК. Немутагенные вещества также могут существенно влиять на работу генов. Это ярко выражается в явлении так называемого *индуцированного синтеза ферментов*. Клетки *E. coli* дикого типа, растущие в среде из неорганических солей с негалактозидным источником углерода (с янтарной кислотой), почти не синтезируют фермент β -галактозидазу, катализирующий гидролиз галактозида — лактозы до глюкозы и галактозы. Добавление индуктора, например, метилтиогалактозида к растущей

культуре *E. coli* дикого типа увеличивает скорость синтеза β -галактозидазы в 10^3 раз. Галактозид служит индуктором синтеза, а дикий тип *E. coli* представляет собой индуцируемый тип. Имеются мутантные штаммы *E. coli*, синтезирующие β -галактозидазу и без действия индуктора. Такие мутанты называются *конститутивными*. Опыты с мечеными атомами показали, что индуцированный синтез фермента происходит *de novo* из свободных аминокислот. Индуктор воздействует на генетическую систему клетки. Жакоб и Моно провели генетический анализ индуцированного синтеза, исходя из простой гипотезы, получившей в дальнейшем веские подтверждения [72, 73]. Гипотеза состояла в том, что индуцированный синтез подавляется специфическим соединением, находящимся в цитоплазме. Это соединение — *репрессор* — синтезируется под контролем особого *гена-регулятора*. В дальнейшем было установлено, что репрессоры представляют собой белки [74, 75].

Репрессор действует на ген-оператор, управляющий переносом информации от нескольких структурных генов к синтезируемому белкам. При воздействии репрессора прекращается работа всей совокупности этих генов.

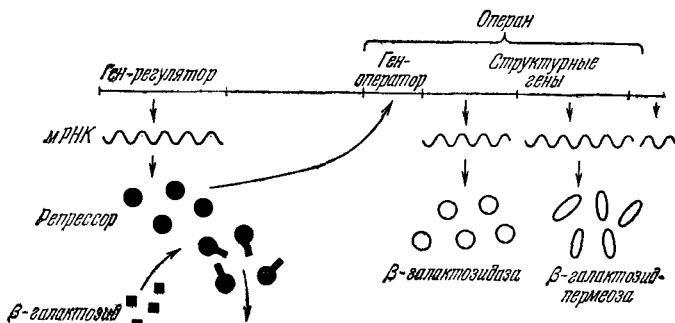


Рис. 1.9. Схема оперона.

Индуктор синтеза взаимодействует с белком-репрессором и выключает его влияние на ген-оператор. Возможен и противоположный процесс активации некоторым метаболитом неактивного репрессора. Такой метаболит называется *корепрессором*.

На рис. 1.9 показана схема описанной генетической системы. Группа структурных генов, контролируемая одним геном-оператором, называется *опероном*. В рассматриваемом примере репрессор β -галактозидазы контролирует синтез по крайней мере двух ферментов: β -галактозидазы и β -галактозидпермеазы. Второй фермент определяет скорость поступления β -галактозидов в бактериальные клетки сквозь мембраны. В отсутствие

β -галактозидпермеазы клетки *E. coli* не могут накапливать β -галактозидазу. Синтез двух ферментов необходимым образом коррелирован.

Описанная модель (оперон) полностью подтверждена генетическими исследованиями, доказавшими существование гена-регулятора и гена-оператора и установившими свойства соответствующих мутаций (см., например, [76], гл. 7). Синтез β -галактозидазы в *E. coli* контролируется так называемым Лак-опероном. На него действует Лак-репрессор — тетрамерный белок с молекулярным весом 150 000. На основе модели оперона проведено теоретическое рассмотрение химической дифференцировки системы, развивающейся в процессе онтогенеза (см. § 9.10).

В настоящее время известны системы, в которых один специфический репрессор воздействует на несколько несвязанных оперонов (см. также [77]).

Контроль гена-оператора над опероном, по-видимому, определяется тем, что синтез мРНК начинается с того конца оперона, который примыкает к соответствующему оператору.

Описанный способ контроля и регуляции биосинтеза белка у прокариотов еще не может обеспечить регуляторные нужды клетки. Белки, кодируемые одним и тем же опероном, могут требоваться в разных количествах и в разное время. Для понимания соответствующих регуляторных явлений необходимо детальное рассмотрение механизма синтеза мРНК на ДНК, протекающего с неизменным участием РНК-полимеразы (см. [78]). Процесс образования начала молекулы РНК существенно отличается от последующего роста ее цепи. Соответственно рационально рассматривать начало синтеза РНК (инициацию) и продолжение этого синтеза (элонгацию) как две самостоятельные стадии.

ДНК-зависимый синтез РНК подавляется рядом антибиотиков, таких, как актиномицин, которые блокируют матрицу ДНК [79]. Антибиотики группы рифамицина, напротив, действуют не на матрицу ДНК, но на РНК-полимеразу [80]. Установлено, что этот фермент содержит специфический центр, в котором связывается рифамицин. Центры связывания РНК-полимеразы с матрицей и рифамицином формируются различными полипептидами [81]. Рифамицин оказывает свое действие на стадии инициации, препятствуя образованию первой межнуклеотидной связи. Другие вещества ингибируют элонгацию, влияя на РНК-полимеразу. Напротив, актиномицин препятствует элонгации, взаимодействуя с ДНК, а не с ферментом [78].

Регуляция транскрипции далеко не всегда реализуется по схеме Жакоба и Моно посредством репрессора, негативного регуляторного фактора. В случае фаговых ДНК считывание определенных генов не происходит и в отсутствие каких-либо ре-

прессоров. Для включения этих генов необходимы позитивные регуляторные факторы.

При заражении клетки *E. coli* Т-четными фагами (Т2 и Т4) реализуется четко отрегулированная временная последовательность процессов транскрипции. Через несколько минут после заражения происходит выключение синтеза мРНК и белков клетки-хозяина и синтезируется несколько новых ферментов, необходимых для синтеза фаговой ДНК, а затем осуществляется синтез структурных белков фага. Как показал Хесин и его сотрудники, специфические фаговые мРНК появляются при фаговой инфекции не сразу, а последовательно [82, 83]. На ранних и поздних стадиях развития фага Т2 в клетке *E. coli* образуются отличающиеся друг от друга наборы мРНК, синтезируемые на разных группах генов. РНК-полимераза способна узнавать промоторы генов мРНК, образующиеся на ранних стадиях фаговой инфекции. Аналогичные группы «ранних» и «поздних» РНК обнаруживаются и при развитии фага Т4 [84]. Оказалось, что появление разных групп мРНК фага Т4 зависит от процессов синтеза белка и репликации фаговой ДНК.

Модели, предлагаемые для объяснения этих регуляторных явлений, исходят из рассмотрения сложной субъединичной структуры РНК-полимеразы, которая изменяется при воздействии белковых регуляторных факторов [74]. Детальные молекулярные механизмы временной регуляции белкового синтеза пока неизвестны. Так или иначе, эти механизмы должны определяться молекулярным узнаванием на уровне фермента и матрицы, на уровне молекул белков и нуклеиновых кислот.

Регуляторные воздействия на биосинтез белка реализуются, по-видимому, на всех его стадиях. Регуляции подлежит работа полимераз, аминоацил—тРНК-синтетазы и рибосом. Воздействия химических соединений на биосинтез далеко не сводятся к мутагенезу. Так, антибиотики влияют на трансляцию кода, воздействуя на рибосомы. Стрептомицин нарушает трансляцию в бесклеточной системе (см. [85]). Этот антибиотик внедряется в 30S субъединицы рибосомы.

Важным регулятором функциональности генов на уровне трансляции является *циклическая аденозинмонофосфорная кислота* цАМФ. Остановимся на свойствах этого вещества (см. [86, 87, 128]), структура которого показана на рис. 1.10. Циклическая АМФ функционирует как химический сигнал, регулирующий ферментативные реакции в клетках, запасующих сахара и жиры. Циклическая АМФ регулирует также транскрипцию генов. Впервые со свойствами цАМФ столкнулись при изучении активности гормона адреналина. Этот гормон повышает уровень сахара (глюкозы) в крови. Глюкоза поступает в кровь из клеток, запасующих животный крахмал—гликоген. Сложный

процесс воздействия адреналина состоит из многих стадий. Адреналин является медиатором лишь первой из них, активируя фермент аденилатциклазу. Под действием этого фермента АТФ трансформируется в цАМФ, активирующую фермент, действующий в первом звене последовательности реакций, завершающейся конверсией гликогена в глюкозу. Как показали Сазерленд и его сотрудники, цАМФ играет роль «вторичного мессенджера» — универсального внутриклеточного посредника при действии ряда гормонов — «первичных мессенджеров» [129].

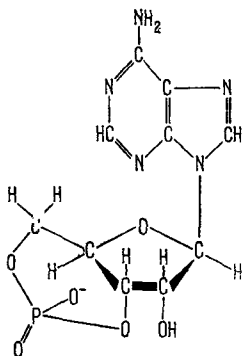


Рис. 1.10. Циклическая аденозинмонофосфорная кислота (цАМФ).

Циклическая АМФ присутствует в разнообразных клетках в количествах примерно в 1000 раз меньших, чем АТФ. Содержание цАМФ в клетке контролируется посредством ферментативной регуляции скорости ее синтеза из АТФ и превращения цАМФ в инертную нециклическую АМФ.

Эти малые количества цАМФ все же на два-три порядка больше количества гормона. Тем самым обеспечивается более чем 100-кратное усиление внешнего сигнала, действующего на клетку [128].

Воздействие цАМФ на гены состоит в стимуляции их активности в процессе транскрипции. Циклическая АМФ служит химическим триггером, включающим в ряде случаев процесс транскрипции гена. Ее действие состоит в связывании белка-рецептора цАМФ. Транскрипция начинается, когда комплекс цАМФ с белком-рецептором активирует некоторый промоторный участок ДНК в начале оперона (опыты проводились с *E. coli* и активировался оперон лактозы, Лак-оперон). РНК-полимераза присоединяется к активированному промоторному участку и затем перемещается вдоль цепи ДНК, организуя синтез мРНК. Комплекс цАМФ — рецептор не содействует транскрипции при наличии специфического белка, Лак-репрессора. Циклическая АМФ может стимулировать транскрипцию ряда различных оперонов. Действие цАМФ в клетках эукариотов иное, но она и здесь влияет на генетическую систему — на матричную активность хроматина (см. [128]).

Роль цАМФ действительно универсальна. Это вещество участвует в процессе зрительного возбуждения и регулирует агрегацию «общественных амёб». Разнообразие функций цАМФ демонстрируется различием между механизмом деградации гликогена и липидов, с одной стороны, и стимулированием транс-

крипции генов — с другой. Сформулирована гипотеза, согласно которой дифференцировка эмбриональных клеток может определяться содержанием в них цАМФ и цГМФ (а также неорганических катионов — щелочных, щелочно-земельных и Zn^{++}) [130].

Редупликация ДНК, происходящая на определенной стадии развития клетки, также представляет собой регуляторный процесс. В работах [88, 89] предложена гипотеза, согласно которой репликация ДНК индуцируется некоторым белковым веществом. Генетический элемент (хромосома или эписома) реплицируется как целое после такой индукции. Подобный элемент именуется *репликоном*.

В отличие от оперона репликон начинает функционировать под действием некоторого инициатора, а не индуктора, связывающего репрессор. Инициатор является не негативным, но позитивным регуляторным фактором. Циклическая хромосома ДНК бактерии или фага содержит структурный ген, ответственный за синтез активирующего белка, действующего на ген-репликатор. Возможно, что при этом происходит разрыв кольца и хромосома реплицируется как целое. Гипотеза репликона приводит к ряду генетических выводов о природе мутантов структурных генов и репликатора, подтверждаемых экспериментально [90]. Многие факты, включая результаты прямых электронно-микроскопических исследований, показывают, что во время деления бактериальной клетки инициатор связан с клеточной мембраной. Молекулярные процессы лежат в основе клеточных.

§ 1.7. БИОСИНТЕЗ БЕЛКА В КЛЕТКАХ ЭУКАРИОТОВ

Генетический аппарат многоклеточных организмов — эукариотов — иной, чем у бактерий — прокариотов, не имеющих ядер. Хромосомы эукариотов содержат не только ДНК, но и белки — они построены из нуклеопротеидов. Важнейшие белки хромосом — гистоны, представляющие собой основные белки, содержащие значительные количества лизина и аргинина (см. ниже стр. 45). Кроме того, в хромосомах присутствуют разнообразные негистоновые белки.

Все соматические клетки одного организма содержат один и тот же набор генов, тождественный набору генов в исходной зиготе. В то же время клетки различных тканей сильнее всего отличаются друг от друга и морфологически и функционально. Их различия сводятся к тому, что в разных клетках одного и того же организма функционируют различные белки. Это означает, что в разных клетках работают разные гены и молекулярный смысл дифференцировки, приводящей к специализации клеток эукариотов, состоит в регуляции работы генов.