

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.

В клетке данного сорта трансляция осуществляется лишь для малой доли генов.

Ряд фактов показывает, что модель оперона Жакоба и Моно, описанная в предыдущем параграфе, неприменима для эукариотов. В то же время общие принципы регуляции функционирования ДНК, впервые введенные в этой модели, сохраняют свое значение. Гены эукариотов действуют независимо друг от друга, но их совокупности образуют целостные регуляторные системы, которые можно назвать *транскриптонами*. Оперон есть бактериальный транскриптон.

Вследствие не преодоленных еще трудностей при расчленинии ДНК эукариотов на отдельные функциональные отрезки основные результаты, относящиеся к организации транскриптона, получены путем исследования РНК, синтезируемой на ДНК. В работах Георгиева и его сотрудников было показано существование в животных клетках нового типа РНК — ядерной РНК, которая является предшественником мРНК [91, 92]. Соответственно эта РНК обозначается как про-мРНК. Про-мРНК имеет очень большой молекулярный вес, она состоит в среднем из 10 000—15 000 нуклеотидов. мРНК, на которой строятся белки, состоит в среднем всего лишь из тысячи нуклеотидов.

Установлено, что про-мРНК превращается в мРНК, но при этом большая часть про-мРНК распадается. Участки про-мРНК, из которых получается мРНК, и распадающиеся участки синтезируются на разных участках ДНК.

Вся про-мРНК связана со специфическими белковыми частицами — *информоферами*. Комплексы про-мРНК с информоферами в синтезе белка не участвуют.

Исходя из этих фактов, Георгиев предложим модель транскриптона эукариотов, состоящего из большой акцепторной зоны и относительно малой структурной зоны, непосредственно ответственной за синтез одного или нескольких белков. Акцепторная зона не несет структурной информации, но содержит участки, взаимодействующие с регуляторными белками. В начале транскриптона, величина которого много больше оперона бактерий, находится промоторный участок, к которому присоединяется РНК-полимераза. Перемещение полимеразы вдоль транскриптона (и, следовательно, транскрипция) регулируется в результате взаимодействия регуляторных белков с акцепторными участками. Синтезируется гигантская про-мРНК, вблизи 3'-конца которой находится отрезок, соответствующий функциональной, структурной, мРНК. Затем происходит распад всей неинформационной части про-мРНК, а оставшаяся мРНК переносится из ядра в цитоплазму, где и служит матрицей для синтеза белков.

Эта модель обеспечивает гораздо более тонкую регуляцию действия генов, их блокирование и деблокирование, чем в слу-

чае прокариотов. Дело в том, что взаимодействие регуляторных белков и гистонов с акцепторными участками влияет на структуру хроматина и хромосом, определяя способ упаковки ДНК. От способа упаковки зависит возможность продвижения РНК-полимеразы вдоль транскриптона. Кроме того, и в отсутствие компактной упаковки нуклеопротеидов в растянутом транскриптоне присоединение регуляторных белков препятствует перемещению РНК-полимеразы.

В составе одного транскриптона имеются различные акцепторные участки, узнающие различные регуляторные белки. Тем самым, разные регуляторные белки могут влиять на работу данного транскриптона. И наоборот, разные транскриптоны могут узнавать один и тот же белок. Соответственно присоединение или отделение одного белка может включать или выключать целую совокупность транскриптонов.

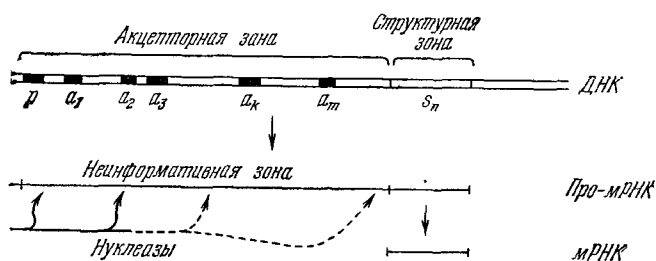


Рис. 1.11. Схема транскриптона.

p — промотор, a_1, \dots, a_m — акцепторные центры, s_n — структурные гены.

Большие размеры акцепторного участка ДНК и, значит, неинформационной части про-мРНК, оказываются необходимыми именно для осуществления тонкой и многообразной регуляции, без которой не мог бы существовать дифференцированный многоклеточный организм. Согласно модели Георгиева, мРНК лежит в конце гигантской про-мРНК. Поскольку имеются акцепторные участки, одинаковые у разных транскриптонов, то в начальной части про-мРНК должны находиться последовательно, одинаковые у различных про-мРНК. Это было подтверждено экспериментально [92].

Схема транскриптона по Георгиеву показана на рис. 1.11. Для понимания молекулярного строения транскриптона и, следовательно, хромосом, необходимо прежде всего исследовать взаимодействие ДНК с гистонами и негистоновыми белками. Гистоны состоят из ряда фракций — индивидуальных белков. Установлена первичная структура гистонов, выделенных из различных организмов. Почти для всех фракций эта структура

исключительно устойчива в эволюции. Так, гистоны H2 из гороха и из тимуса телят различаются лишь двумя аминокислотными остатками из ста двух [93, 94].

Постоянство первичной структуры гистонов, возможно, определяется тем, что у гистонов функциональна вся молекула: некоторые ее участки ответственны за связывание с ДНК, другие участки — за взаимодействия между белками (см., например, [95—97]). В каждой хромосоме содержится десятки тысяч одинаковых молекул гистона; небольшое изменение структуры локального комплекса гистон—ДНК может привести в результате многократного повторения к радикальному изменению структуры хромосомы в целом. Это также может существенно ограничивать скорость изменения первичной структуры гистонов в процессе эволюции. Данные, характеризующие структуру гистонов, приведены в [98, 99].

Гистоны, по-видимому, образуют солевые связи с фосфатными группами ДНК. Весовое соотношение гистоны/ДНК в дезоксирибонуклеогистоне из тимуса телят составляет 1,3/1, и в среднем число основных групп гистонов примерно равно числу фосфатных групп в связанной с ними ДНК. Предположительно α -спиральные участки гистонов располагаются в бороздке двойной спирали ДНК; неспиральные и неосновные остатки образуют петли [100]. Проведены детальные исследования конформационных свойств гистонов и нуклеогистонов [101].

В ходе развития клетки конформации хромосомных белков и их ДНК-комплексов изменяются, и геном испытывает функциональные изменения, становясь более или менее доступным действию регуляторных белков цитоплазмы. По-видимому, главная роль гистонов состоит именно в регуляции структуры хромосом, но не в регуляции дифференцированной транскрипции генов в клетках разного типа. В то же время установлены изменения состава и тонкой структуры хромосомных белков на разных стадиях развития клеток и их дифференцировки. Найдены клеточно-специфичные гистоны.

Общая ситуация достаточно сложна. С одной стороны, гистоны характеризуются относительно большим постоянством первичной структуры у разных видов. С другой стороны, в разных клетках не только варьирует относительное содержание основных гистоновых фракций, но наблюдаются видовая и тканевая специфичность ряда фракций. И то, и другое создает возможности регуляции активности генома, отсутствующие у прокариотов, но природа этой регуляции еще недостаточно изучена (см. [98, 102]).

Основная проблема молекулярной биофизики нуклеогистонов состоит в установлении структурных и функциональных характеристик взаимодействий гистонов с ДНК, в исследовании

соответствующих явлений молекулярного узнавания. Как уже сказано, характер этих взаимодействий изменяется во время развития клеток. На гигантских хромосомах двукрылых насекомых на определенной стадии развития появляются «пуффы» — вздутые участки, являющиеся локусами наиболее интенсивного синтеза РНК. В этих участках происходят конформационные и химические (фосфорилирование, ацетилирование, метилирование) изменения гистонов, что и обеспечивает изменение функциональности соответствующих генов. По-видимому, в «пуффах» гистоны слабее связаны с ДНК, они более доступны действию протеаз и легко отделяются. Соответственно в «пуффах» гистоны не мешают работе РНК-полимеразы. В нормальных условиях гистоны препятствуют транскрипции. Синтез РНК стимулируется их удалением из изолированных фракций хроматина.

Во всех организмах эукариотов хромосомы проходят митотический и, соответственно, мейотический цикл. В интерфазе митоза хромосомы невидимы в обычном микроскопе, генетический материал клеточного ядра представлен нуклеопротеидными хроматиновыми нитями, наблюдаемыми с помощью электронной микроскопии. В профазе хромосомы спирализуются и уплотняются, становясь хорошо видимыми в микроскопе. Дальнейшие события при митозе состоят в удвоении хромосом (в репликации ДНК) и в их расхождении к двум полюсам, расположенным на разных концах клеток. Митоз завершается делением клетки [104].

Хромосомы яйцеклеток позвоночных и некоторых насекомых на определенных стадиях роста представляют собой двойные нити, в которых на небольших расстояниях друг от друга располагаются вздутия, петли, именуемые *хромомерами*. Хромосомы принимают вид «ламповых щеток». На стадии «ламповых щеток» происходят интенсивные процессы биосинтеза — транскрипция и трансляция [105]. Добавление гистонов к хромосомам — «ламповым щеткам» вызывает исчезновение петель и резкое ингибирование синтеза РНК [106].

Георгиев исследовал механизм ингибирования синтеза РНК гистонами методом двойной радиоактивной метки. АТФ или ГТФ, меченные P^{32} -фосфатом, использовались для определения инициации образования цепи, а C^{14} -УТФ — для определения общей скорости ее роста. Добавление гистонов уменьшало соотношение C^{14}/P^{32} в синтезируемой РНК. Это показывает, что либо происходит уменьшение скорости роста цепи, либо образуются сравнительно короткие цепи, т. е. гистоны мешают движению полимеразы вдоль матрицы [107]. Матричная активность хроматина примерно в 10 раз меньше, чем свободной ДНК [108, 109]. Удаление определенных гистонов из хроматина

увеличивает его матричную активность, причем основную роль здесь играет гистон (см., например, [110]).

Хроматин и модельные комплексы ДНК с гистонами и негистоновыми белками исследовались с помощью богатого арсенала методов, в частности, методами спектроскопии [111, 112]. По-видимому, ДНК плотно упакована в дезокси-нуклеопротеидах (ДНП), и конформация ДНК в ДНП отлична от обычной *B*-конформации. Из химических данных следует, что гистоны расположены в основном в широкой бороздке ДНК и вне ее [113]. Из исследований модельных комплексов следует, что гистоны распределяются на ДНК равномерно — участки с большим содержанием гистонов чередуются с участками свободной или почти свободной ДНК [98]. Около половины ДНК «открыто», свободно от гистонов [131].

В отличие от гистонов, негистоновые белки (НГБ) хромосом содержат не основные, а кислотные остатки. НГБ характеризуются большой гетерогенностью — их молекулярные веса варьируют в широком интервале от 10 000 до 150 000. Они разнообразны функционально — в НГБ содержатся сложные ферментативные системы, в том числе полимеразы. Разнятся не только НГБ разных видов, но и разных тканей одного и того же вида [132].

Доказано, что изменение функции генов, их транскрипция в клеточном цикле сопровождается изменениями состава НГБ и их метаболизма. Стероидные гормоны, влияющие на транскрипцию, воздействуют на НГБ. Содержание НГБ в активной форме хроматина выше, чем в неактивной. Изменения НГБ происходят в клетках, зараженных и трансформированных вирусами, вызывающими рак.

Установлено, что некоторые НГБ способны узнавать специфические нуклеотидные последовательности в ДНК — они связываются с ДНК хозяина, но не с чужеродной ДНК. НГБ снижают ингибирующее влияние гистонов на транскрипцию.

Таким образом, НГБ, по-видимому, регулируют активность генов на уровне транскрипции. Свойства и строение НГБ изучены еще недостаточно, но то, что о них известно, позволяет сформулировать гипотезу о механизме их действия ([132—134], см. также [135]).

НГБ активно фосфорилируются. Фосфорилирование и дефосфорилирование модифицирует их свойства. Способность НГБ стимулировать синтез РНК в бесклеточной системе зависит от состояния их фосфорилирования. Гипотеза состоит в том, что ген включается присоединением негистонового белка к специфическому участку ДНК, репрессированному гистоном. НГБ фосфорилируется и приобретает отрицательные заряды. Поэтому он отталкивает также отрицательно заряженную ДНК

и покидает ее вместе с положительно заряженным гистоном. Остается свободный участок ДНК, способной к транскрипции в РНК [132].

В хромосомах взаимодействие ДНК с белками приводит к образованию «сверхспиральной» структуры, в которой молекулы ДНК свертываются в хроматиды со значительным уменьшением линейных размеров. Предложен ряд моделей нуклеогистоновой структуры хроматина. Крик и Круг разработали модель, в которой свертывание ДНК в хроматине определяется резкими изломами двойной спирали примерно через каждые 20 пар оснований [136]. Эта модель хорошо объясняет большую совокупность фактов.

Устройство «сверхспирали» хроматина зависит от природы и, в частности, от конформаций гистонов и негистоновых белков.

Цанев и Сендов предположили существование специфического кода для блокирования генов, считая, что кодирование определяется различными комбинациями пяти гистонов [114]. Эта гипотеза противоречит, однако, приведенным фактам, не свидетельствующим о регуляторной роли гистонов. Аргументы в пользу того, что гистоны ответственны за элонгацию цепи ДНК [115], также недостаточно убедительны.

Структура хроматина изучена недостаточно. Сведения о предлагаемых моделях и возможной связи структуры и функции содержатся в ряде обзоров (см., в частности, [116, 132—134]).

В то же время идея о «втором коде», определяющем регуляцию транскрипции, т. е. о коде соответствия между структурой регуляторного белка и структурой ДНК, обоснована в работе Гурского и соавторов [137]. Речь идет об универсальном коде для узнавания ДНК белком, т. е. о соответствии между аминокислотными последовательностями в стереоспецифичном участке регуляторного белка и последовательностью нуклеотидов в том участке ДНК, к которому этот белок присоединяется. В работе [137] предполагается, что участок регуляторного белка состоит из двух антипараллельных сегментов полипептидной цепи, образующих β -структуру. Узнавание основано на комплементарности этой структуры и последовательности пар оснований ДНК. Важное свойство такой последовательности состоит в асимметричном распределении гуанинов между двумя нитями ДНК. В предлагаемом коде шесть основных аминокислотных остатков (Сер, Тре, Асп, Гис, Гли, Цис) и их последовательность в стереоспецифичном участке белка определяет последовательность пар оснований, с которой данный белок преимущественно связывается. Код, разработанный на основе стереохимии, подтвержден на примере взаимодействия Лак-репрессора с Лак-оператором (см. стр. 40). Это единственный пока

случай белково-нуклеинового взаимодействия, для которого точно установлены и последовательность аминокислот в белке и последовательность оснований в ДНК ([139, 140], см. также [142]).

В этой главе мы остановились главным образом на явлениях молекулярного узнавания, т. е. на специфических взаимодействиях в биомолекулярных системах. Можно считать установленным, что в основе таких разнообразных явлений, как взаимодействие антиген — антитело, рецепция запаха, регуляция биосинтеза белка в прокариотах и эукариотах, а также во взаимодействиях клеток лежат в принципе сходные механизмы узнавания. Именно узнавание на внутримолекулярном, межмолекулярном и надмолекулярном уровнях должно рассматриваться как молекулярная основа биофизики. Особо важную роль здесь играет матричный синтез. В конечном счете молекулярные взаимодействия ответственны за основные особенности живых организмов — за ферментативный катализ биосинтеза белка и за регуляцию того и другого, за мембранный транспорт молекул, ионов и электронов, за механохимические процессы. Мы постоянно будем встречаться с этими взаимодействиями в последующем изложении.

Описанные в §§ 1.6 и 1.7 явления регуляции не стали еще предметом детальных физических исследований. Для этого пока не хватает биологической информации. Однако общие физические принципы регуляции намечены. В то же время уже установленные факты позволяют подойти к построению физико-математических моделей регуляторных процессов (см. гл. 9).