

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СО РАН

Н. А. ПОПОВА

ВВЕДЕНИЕ В БИОЛОГИЮ

Учебное пособие

Новосибирск

2012

УДК 57, 573, 577.32, 573.6
ББК 34.01, 34.03, 34.15.15, 34.15.23, 34.15.20

Попова Н. А. Введение в биологию. Учеб. Пособие / Новосиб. гос. университет. Новосибирск, 2012. ...с.

Учебное пособие посвящено рассмотрению молекулярно-генетического уровня организации жизни, записи и хранения генетической информации ее реализации в процессе транскрипции, трансляции и посттрансляционной модификации белков. Особое внимание уделено достижениям Международной программы «Геном человека», а также основам биотехнологии и генной инженерии. Обсуждаются проблемы трансгенеза, получения и внедрения трансгенных микроорганизмов, растений и животных, а также морально-этические аспекты новых биотехнологий. Отдельная глава посвящена методам и успехам генной терапии как новой области знаний, возникшей на стыке молекулярной биологии и медицины.

Приведенные в пособии иллюстрации заимствованы мной из открытых учебных сайтов Интернета. В полном объеме все презентации, которыми сопровождается курс лекций, можно найти на сайте кафедры цитологии и генетики ФЕН НГУ.

Учебное пособие рекомендовано как дополнение к курсу «Введение в биологию» для студентов 1 курса ФЕН НГУ, оно может быть полезно учащимся старших классов общеобразовательных школ для углубленного изучения биологии, а также для всех интересующихся биологией.

Рецензент д. б. н., профессор Г. М. Дымшиц

Издание подготовлено в рамках реализации *Программы развития государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Новосибирский государственный университет»* на 2009–2018 годы.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	
ГЛАВА 1. КЛАССИФИКАЦИИ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ.....	
ГЛАВА 2. ВИРУСЫ – ДОКЛЕТОЧНЫЕ ФОРМЫ ЖИЗНИ...	
2.1. Типы взаимодействия вируса с клеткой	
2.2. Почему вирусы вызывают заболевания?	
2.3 Современное состояние борьбы с вирусными инфекциями.....	
Глава 3. НАДЦАРСТВО ПРОКАРИОТ (PROCARIOTA)...	
3.1. Основные различия между прокариотами и эукариотами.....	
3. 2. Археи как особый домен прокариот	
3.3. Цианобактерии	
3.4. Эндосимбиотическая теория происхождения эукариот	
ГЛАВА 4. ВАЖНЕЙШИЕ БИОПОЛИМЕРЫ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ – БЕЛКИ И НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ	
4. 1. Белки. Структура и функции	
4.2. Структура нуклеиновых кислот	
4.3. Генетический триплетный код	
ГЛАВА 5. ГЕНЫ И ГЕНОМЫ	
5. 1. Геномы вирусов.....	
5. 2. Геномы прокариот.....	
5.3. Генетическая система митохондрий.....	
5.4.. Геномы эукариот.....	
Глава 6. РЕПЛИКАЦИЯ ДНК.....	
Глава 7. РЕПАРАЦИЯ ДНК.....	
Глава 8. ТРАНСКРИПЦИЯ.....	
Глава 9. ТРАНСЛЯЦИЯ	

Глава 10. ПОСТТРАНСЛЯЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ И РОЛЬ ЕЕ НАРУШЕНИЯ В ПАТОЛОГИИ	
Глава 11. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ	
Глава 12. МАНИПУЛИРОВАНИЕ ГЕНАМИ И ГЕНОМАМИ..	
Глава 13. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ.....	
Глава 14. РИСК ГЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ.....	
ОПАСНОСТЬ МНИМАЯ И РЕАЛЬНАЯ.....	
Глава 15. ГОМЕОСТАЗ.....	
Глава 16. БИОЛОГИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО РОСТА....	
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА.....	

ВВЕДЕНИЕ

Стремительное развитие биологической науки в XX в. ознаменовано разработкой принципиально новых методов исследования, направленных на изучение геномов. К ним относятся, прежде всего, технология рекомбинантных ДНК, включающая методы рестрикции ДНК на фрагменты, клонирование генов и клонирование кДНК, создание зондов для гибридизации, полимеразную цепную реакцию, секвенирование ДНК. Прогресс связан с автоматизацией многих методов исследования, созданием робототехники, компьютерных программ и соответствующего математического аппарата.

Созданы мощнейшие международные банки данных о последовательности нуклеотидов в ДНК разных организмов и о последовательности аминокислот в белках. Любой специалист может воспользоваться этой информацией. Эти достижения во многом обусловлены выполнением Международной программы «Геном человека».

Прочитана ДНК десятка видов вирусов, бактерий, грибов, а также ряда

многоклеточных организмов – арабидопсиса, нематоды, дрозофилы, полным ходом идет секвенирование ДНК риса, кукурузы, пшеницы. В начале XXI в. торжественно было возведено о расшифровке генома человека.

Появление технологии клонирования гена и переноса его в любой другой организм в составе реплицирующегося вектора позволило создавать организмы, которых на Земле не существовало. Эти методы обеспечили возможность манипулировать генами, хромосомами и геномами. На наших глазах современная биология превращается в науку, которая дала начало новым технологиям, преобразующим производство. В результате были созданы трансгенные микроорганизмы, растения и животные. Эти биотехнологические достижения можно сравнить с выходом человека в космос и с высадкой на Луну.

Биотехнология поистине стала производительной силой. Основную долю продуктов, созданных на основе генетической инженерии, составляют биопрепараты, получение которых другими путями затруднено и дорого. Так получены инсулин, интерферон, эритропоэтин, факторы роста и другие необходимые для лечения людей лекарственные препараты.

Развитие биотехнологии растений привело к конструированию растений с новыми полезными признаками – устойчивых к инсектицидам и гербицидам, растений, производящих белки животного происхождения. В качестве пищевых вакцин используются растения, производящие бактериальные или вирусные антигены.

В связи с развитием методов молекулярной биологии возникли новые направления в области медицины – генная диагностика и генная терапия. Стало возможным с высокой точностью диагностировать наследственные и ненаследственные заболевания, определять звенья развития патологии на уровне генов. Появилось и совершенно новое направление медицины, тесно связанное с молекулярной биологией, – генная терапия.

С развитием генных биотехнологий возникают морально-этические аспекты их применения, а также проблема биологической безопасности, кото-

рые беспокоят не только ученых, но и всю мировую общественность.

Глава 1. КЛАССИФИКАЦИИ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ

Нас окружает огромный мир живых существ – растений, грибов, животных и микроорганизмов. Все они – результат органической эволюции, создавшей удивительное биоразнообразие, включающее *тысячи* видов, разнообразие внутри каждого вида и разнообразие биоценозов. Таким образом, на любом уровне биологической организации – от генов до биоценозов – наблюдается колоссальное биоразнообразие. Биоразнообразие эволюционирует – исчезают какие-то виды, ученые открывают новые. Поэтому построение естественной системы органического мира является непрерывным процессом. Исследования в этой области постоянно углубляются и усложняются.

Классификация современного органического мира представляет собой отдельный раздел биологии, в задачи которого входит упорядоченное иерархическое расположение категорий организмов. Этот раздел биологии называется таксономией (от греческого *taxis* – закон, строй, расположение). Благодаря классификации, разнообразие мира предстает не как хаотическое нагромождение организмов, а как определенным образом упорядоченная система, изменяющаяся от простого к сложному. Систему органического мира изображают в двух основных вариантах: в виде родословного древа, ветви которого связаны родственными отношениями и соответствуют различным таксонам, или как перечень таксонов в иерархической последовательности. В настоящее время принята классификация организмов по особенностям их строения, представленная на рис. 1.



Рис. 1. Классификация организмов по сложности строения

Два крупнейших блока образуют доклеточные организмы (вирусы) и клеточные – все остальные. «Империя» клеточных организмов включает два надцарства – прокариоты – одноклеточные организмы, не имеющие ядра, и эукариоты- одноклеточные и многоклеточные организмы, в клетках которых есть ядро. Раньше к надцарству прокариот относили всех бактерий. Однако с появлением молекулярных методов, позволяющих изучать систему метаболизма и матричных синтезов прокариот, обнаружилось, что прокариоты распадаются на два домена - эубактерии – *Eubacteria* (часто для простоты пользуются старым термином бактерии - *Bacteria*) и археобактерии – *Archaeobacteria* (археи – *Archaea*). Таким образом, все клеточные живые существа представлены тремя главными макротаксонами – *Eubacteria*, *Archaeobacteria* и *Eucaryota*. Единственный макротаксон ядерных организмов – *Eucaryota* – делят на 4 царства: животные, грибы, растения и протисты.

Существует классификация организмов по тому, что они используют в качестве источника углерода для построения своих структур и откуда берут энергию для всех процессов жизнедеятельности. По источнику углерода все

организмы делятся на авто- и гетеротрофы, а по источнику энергии – на фото- и хемотрофы.

Организмы, которые используют CO_2 как единственный источник углерода, синтезируя органические вещества из неорганических, называются автотрофами. Автотрофы – это все зеленые растения, водоросли и ряд бактерий. Они являются первичными продуцентами органического вещества в биосфере и образуют первый трофический уровень в сообществах организмов. От них зависят существование всех других организмов на Земле и протекание биогеохимических циклов в круговороте веществ в природе. Фотоавтотрофы используют энергию квантов солнечного света и преобразуют ее посредством механизма фотосинтеза в энергию химических связей.

Фотосинтез – единственный процесс в биосфере, ведущий к увеличению свободной энергии биосферы за счет внешнего источника – Солнца и обеспечивающий существование всех живых существ на Земле. Ежегодно в результате фотосинтеза образуется 150 млрд. т органического вещества и выделяется 200 млрд. т свободного кислорода. Кругооборот кислорода, углерода, азота и других элементов, вовлекаемых в фотосинтез, создал и поддерживает атмосферу, необходимую для жизни на Земле. К фототрофным организмам относятся все зеленые растения и водоросли, а также некоторые бактерии: цианобактерии, зеленые, пурпурные бактерии, галофилы.

Хемоавтотрофы – это организмы, которые могут жить без Солнца, энергию для синтеза необходимых для жизни органических веществ они черпают из химических связей неорганических веществ, осуществляя процесс хемосинтеза. Хемоавтотрофы встречаются только среди прокариот. В качестве источника энергии они используют разнообразные химические вещества – водород, соединения серы, азота, железа и др. и запасают ее в виде АТФ. По субстрату для хемосинтеза бактерии делятся на водородные, серные, нитрифицирующие и т. п.

В противоположность автотрофам, гетеротрофные организмы используют в качестве источника углерода готовые органические вещества, из них же

они черпают и энергию. К этой группе организмов относятся животные, грибы, бесхлорофильные наземные растения и водоросли и большинство бактерий. Гетеротрофы разлагают вещества, синтезированные автотрофами, вместе с которыми образуют единую биологическую систему, связанную трофическими отношениями. Есть виды, совмещающие авто- и гетеротрофию. Фотогетеротрофы – это небольшая группа фотосинтезирующих бактерий, хемогетеротрофы – основная часть гетеротрофов, к которым относится и человек.

К классификации, которая наиболее полно объединяет все организмы, относится, деление их на аэробные и анаэробные. Аэробные организмы осуществляют все метаболические процессы при обязательном участии кислорода и не могут существовать без него, для анаэробных – кислород не только не нужен, но, более того, вреден.

На заре развития жизни на Земле существовали только анаэробы. С появлением в атмосфере Земли кислорода – сильного окислителя, реакционно активного и агрессивного вещества, анаэробы должны были или искать какие-то бескислородные ниши для жизни, либо приспособиться к жизни в новых условиях. Первым путем пошли бактерии, потомки которых существуют и поныне. Например, *Clostridium botulinum*, живущие в среде без доступа кислорода и выделяющие смертельный для человека яд – ботулин. Однако наиболее многочисленными оказались организмы, приспособившиеся к жизни в кислородной среде, использующие кислород для клеточного дыхания в результате чего они эффективнее стали извлекать энергию из окружающих веществ. В настоящее время на Земле преобладают аэробы.

Глава 2. ВИРУСЫ – ДОКЛЕТОЧНЫЕ ФОРМЫ ЖИЗНИ

В природе существует разнообразный мир неклеточных геномных паразитов – *вирусов, бактериофагов (фагов) и вирионов*, а также внегеномных кольцевых ДНК – *плазмид*, способных к воспроизведению своих геномов с

использованием молекулярно-генетических систем про- и эукариотических клеток. В связи с этой особенностью вирусов, фагов и вирионов для их обозначения иногда используют термин *полусамовоспроизводящиеся системы*.

Есть шутливое, но весьма удачное определение вирусов – это плохие новости в упаковке из белка. Формулировка вполне подходящая, так как пораженные вирусом клетки гибнут или развиваются в искаженном режиме. Именно благодаря патологическим проявлениям их жизнедеятельности и были открыты вирусы. Вирус в переводе с латыни означает яд. Классическое определение вируса – это неклеточная форма жизни, обладающая собственным геномом и способная к воспроизведению в клетках.

В свободном состоянии вирусы существуют в виде сложных нуклеопротеиновых комплексов – *вирионов*. Вирион состоит из ДНК или РНК, снаружи прикрытую белковым комплексом – капсидом. Капсиды сильно различаются по структуре у разных вирусов, но у всех они выполняют сходные функции - защищают вирусный геном от воздействия внешней среды и несут в своем составе рецепторы, необходимые для опознания и внедрения вируса в клетку хозяина. Вирусы, поражающие бактерии называются бактериофагами. Вирионы – геномные паразиты растений - капсида не имеют: их голая РНК проникает в клетки через естественные повреждения.

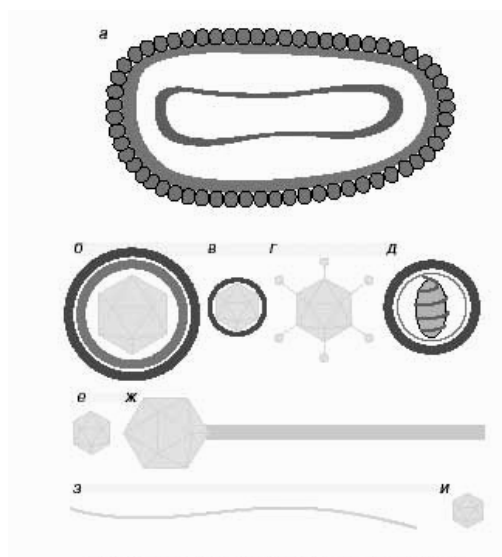


Рис. 2 Схематическое изображение вирусов.

а – вирус оспы, *б* – вирус простого герпеса, *в* – вирус гепатита В, *г* – аденовирус человека, *д* – вирус гриппа, *е* – вирус гепатита А, *ж* – бактериофаг лямбда, *з* – нитевидный фаг М13, *и* – фаг MS2

К автономным генетическим элементам относятся также плазмиды – автономно реплицирующиеся небольшие кольцевые молекулы двунитиевой ДНК – характерные в основном для прокариот (хотя встречаются плазмиды и у низших грибов). Многие плазмиды несут гены устойчивости к антибиотикам и гены метаболизма редко встречающихся веществ. Для размножения плазмиды также могут использовать репликативную машину хозяина. В отличие от вирусов, плазмиды не имеют капсида и количество их копий в клетке контролируется взаимодействием плазмидных и клеточных генов.

Плазмиды передаются от клетки к клетке при делении. Кроме того, при лизисе клетки плазмиды могут оказаться во внешней среде и быть поглощены другими клетками. Некоторые плазмиды могут инициировать особый процесс – *конъюгацию*. Гены таких плазмид кодируют белки-рестриктазы, вносящие в ДНК плазмиды одноцепочечный разрыв, и белки из которых строится конъюгационный мостик – *пиль*, соединяющий две клетки. В ходе конъюгации одна цепь ДНК переходит по пиллю из клетки-донора в клетку-реципиент. Затем происходит достройка комплементарной цепи. Такая конъюгация по своим последствиям напоминает половой процесс эукариот. Существует множество механизмов поддержания плазмид в клетке и контроля копийности плазмид.

Вирусы открыты в конце XX столетия. Первым был открыт вирус табачной мозаики нашим соотечественником профессором Д. И. Ивановским. То, что именно этот вирус открыт первым, обусловлено тем, что эти исследования финансировались табачной промышленностью. В основе этого открытия лежало определение единственной физико-химической характеристики – фильтруемости, т. е. способности проходить через фильтры, которые задерживают бактерии. Этот критерий ставил вирусы особняком от микроорганизмов. В дальнейшем для определения вирусов стали использовать введение

ние фильтрующихся агентов лабораторным животным. Фактически начал такое направление Луи Пастер, который вводил в мозг кролика материал от больного бешенством. Заслуга Пастера, в том, что, не имея представления о возбудителе, не зная, что это вирус, он создал для людей эффективную вакцину против бешенства. Эту историю Вы можете прочесть в моей книге «Новая иммунология», 2012. У человека первым обнаруженным вирусом является вирус желтой лихорадки, открытый американцем Уолтером Ридом, сотрудником Военной комиссии США по желтой лихорадке. В начале тридцатых годов XX века кроме лабораторных животных стали использовать куриные эмбрионы, а затем и системы культур клеток. По мере совершенствования и расширения спектра экспериментальных систем совершенствовались количественные методы определения вирусов, что обусловило выделение многих вирусов, вызывающих болезни у человека и животных. Далее было показано, что вирусы являются незаменимыми самой природой созданными моделями для решения общебиологических задач. Значение вирусов в развитии молекулярной генетики трудно переоценить. Они были использованы как простые генетические системы для изучения структуры и функции генов, расшифровки генетического кода. Этому способствовало обнаружение бактериальных вирусов – бактериофагов. В процессе исследований последствий заражения бактерий бактериофагами было установлено, что вирусы содержат в качестве генетического материала либо ДНК, либо РНК и были сформулированы многие основополагающие принципы молекулярной генетики.

Мир вирусов чрезвычайно разнообразен. Они поражают бактерии, растения и животных. Мы не можем быть уверены, что открыты все вирусы, скорее наоборот. Чаще всего их открывают как возбудителей болезней, а в этом отношении подавляющее большинство организмов не исследовано.

Формы вирусов разнообразны – среди них есть шаровидные, спиралевидные, нитевидные, палочковидные, похожие на сперматозоиды, и др. (рис. 2).

Размеры вирусов колеблются от 10 нм до 2 мкм. Морфологические особенности вирусов зависят от структуры клеток, которые они поражают. Так, бактериофаги имеют приспособление для протыкания стенки бактерии, похожее на шприц.

У вирусов разнообразны способы хранения генетической информации и ее реализации. Для этого они используют оба вида нуклеиновых кислот: ДНК и РНК во всех формах – односпиральных, двуспиральных, линейных и кольцевых. По этому признаку вирусы делят на ДНК-содержащие и РНК-содержащие. Как уже говорилось, наследственное вещество вируса упаковано в белковой оболочке – капсиде. У некоторых вирусов имеется в дополнение к этому еще и липидная мембрана с интегрированными в нее белками.

Особенность генетических процессов и конкретные способы выражения генетической информации вирусов будут описаны в гл. 5, посвященной основным генетическим процессам вообще. Если Вы заглянете туда – убедитесь, насколько разнообразны механизмы хранения и реализации генетической информации вирусов.

Классификация вирусов по Балтимору основана на особенностях структуры и функционирования их генома.

1. Вирусы с позитивным РНК (+РНК) геномом. К этой группе относятся вирусы полиомиелита, клещевого энцефалита, гепатита А. Наиболее просто устроен вирус кокосовой пальмы Каданг-Каданг. Его геном состоит из 246 н. одонитевой +РНК. После проникновения вируса в клетку РНК связывается с рибосомами и, выполняя функции мРНК, полностью транслируется с образованием полипротеина, который потом расщепляется. Кроме этого, на геномной +РНК как на матрице синтезируются цепи – РНК, на которых в свою очередь синтезируются комплементарные +цепи, которые используются как составная часть вирусных единиц потомства.

2. Вирусы с отрицательным РНК (–РНК) геном. Примерами этой группы служат вирусы гриппа, кори, бешенства. У вируса гриппа в

геноме 8 –РНК. У этих вирусов геномная РНК функционирует как матрица для и для транскрипции, и для репликации. В качестве мРНК выступает +транскрипт РНК, который транслируется в один полипептид, но при наличии сплайсинга с одного и того же участка –РНК может транскрибироваться несколько форм мРНК и, следовательно, несколько изоформ белка.

3. Вирусы с двунитевой РНК – реовирусы и ротавирусы. Содержат 10-12 фрагментов двунитевой РНК. Поражают растения и животных. После транскрипции образуются мРНК 10-12 генов, затем они транслируются. Кроме этого, каждая мРНК служит матрицей для синтеза комплементарной цепи, что ведет к образованию двухцепочечных фрагментов генома.

4. Ретровирусы обладают диплоидными, геномами, в которых обе цепи РНК частично соединены водородными связями. Эти вирусы используют в цикле развития обратную транскрипцию. Для этого вирион имеет в своем составе фермент – обратную транскриптазу, с помощью которого на РНК синтезируется копия ДНК. Затем образовавшаяся ДНК перемещается в ядро и интегрируется в геном хозяина. При этом экспрессия вирусных генов не обязательна. Если же она происходит, то интегрированная вирусная ДНК транскрибируется, РНК-продукты транскрипции транслируются с образованием полипротеинов, которые впоследствии расщепляются на отдельные вирусные белки. Последние включаются в состав вириона. Примерами ретровирусов являются вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), онковирусы (вирусы Гросса, Молони, Френд мышей, вирус папилломы человека и др.)

5. Вирусы с двунитевой ДНК – герпес, оспа, аденовирусы. Те из них, которые транскрибируются и реплицируются в ядре клетки-хозяина (вирус герпеса и аденовирусы), используют для транскрипции ферменты клетки. Геном вируса оспы представлен двунитевой

ДНК со своей ДНК-полимеразой, так как он реплицируется в цитоплазме, где нет клеточного фермента.

5. Вирусы с однонитевой ДНК – парвовирусы и бактериофаги. Для их размножения требуется синтез в ядре клетки ДНК-цепи, комплементарной одноцепочечной геномной ДНК, а затем наступает последующая транскрипция генома.

7. Вирусы с однонитевым ДНК-геномом, но использующие обратную транскрипцию – гепатит В, вирус мозаики цветной капусты. Сначала с помощью вирионной ДНК-полимеразы достраивается комплементарная нить ДНК. Затем идет транскрипция с образованием молекул РНК двух типов – мРНК, кодирующей белки, и геномной РНК, которую затем транскрибирует обратная транскриптаза, синтезируя геномную ДНК.

8. Вирусы с обоюдозначающей РНК

9. Вирусы с обоюдозначающей ДНК

2.1. Типы взаимодействия вируса с клеткой

1. Продуктивный, или литический тип (вирусы гриппа, полиомиелита, аденовирусы, вызывающие острые респираторные заболевания и др.). Несмотря на то что жизнедеятельность вирусов полностью зависит от энергетики, белоксинтезирующего аппарата и других систем клетки, многие вирусы ведут себя довольно самостоятельно. Репликация их генома происходит независимо от репликации ДНК клетки, и хотя они и используют для синтеза своих белков оборудование клетки, но по собственному расписанию. В результате вирусы нарабатывают множество собственных копий, блокируя при этом синтез основных генов хозяина. На заключительном этапе истощенная клетка гибнет и подвергается лизису, а множество вирионов оказываются во внешней среде.

2. Латентный тип. Вирусы ведут себя расчетливо, не губя клетку, которая их содержит, а относительно мирно с ней уживаются. Зараженная ими клетка

в течение всей жизни производит вирионы, при этом скорость ее роста и деления снижается. В результате развивается хронический воспалительный процесс, при котором «и волки сыты, и овцы целы », правда, не вполне здоровы.

3. Вирогения. Это такой тип взаимодействия вируса с клеткой, при котором геном вируса интегрируется в состав клеточной хромосомы. Вирусные гены как бы превращаются в клеточные. Вирус долго может не проявлять себя – он реплицируется вместе с ДНК клетки, но его гены не транскрибируются. При определенных обстоятельствах его гены начинают экспрессироваться, образуются вирусные частицы. Покидая клетку, они отпочковываются от ее мембраны, не убивая клетку. Однако свойства клетки могут при этом драматически меняться. Например, фаги, внедряясь в геном бактерии, могут существенно изменять ее свойства. Так, дифтерию у человека вызывает дифтерийная палочка, обладающая токсином, полученным ею от фага. В результате вирогении клетка может подвергнуться злокачественной трансформации. Именно так ведут себя онкогенные вирусы.

Онкогенные вирусы обнаруживаются среди как ДНК-содержащих, так и РНК-содержащих. К ДНК-содержащим онкогенным вирусам относятся полиомавирусы, аденовирусы, папилломавирусы, герпес-вирусы и вирусы группы гепатита В (HBV). Полиома- и большинство аденовирусов индуцируют опухоли у экспериментальных животных и трансформируют клетки *in vitro*, но с развитием опухолей у животных и человека не связаны. В противоположность этому некоторые аденовирусы, папилломавирусы, герпес-вирусы и вирусы группы гепатита В (HBV) имеют отношение к этиологии злокачественных опухолей у животных и человека. Трансформация клеток ДНК-содержащими вирусами осуществляется, как правило, в результате стабильной интеграции вирусной ДНК в геном клетки-хозяина. Однако геном папилломавируса находится в клетке в виде свободнореплицирующейся эпизомной ДНК, а не в интегрированном виде. В настоящее время в геномах онкогенных вирусов идентифицированы гены, которые принимают непосредст-

венное участие в малигнизации клеток.

Вирус Эпштейна – Барр (ВЭБ) выделен из клеток лимфомы Беркита. ВЭБ заражает В-лимфоциты. Лимфома Беркита встречается у детей в некоторых регионах Восточной Африки и Новой Гвинеи. Помимо вируса в этиологии этой опухоли по-видимому принимает участие митогенная активность, обусловленная постоянной стимуляцией В-лимфоцитов антигенами малярийного плазмодия, так как чаще всего лимфома наблюдается у больных малярией. Говоря о механизме развития лимфомы Беркита, нельзя не принимать во внимание, что при этом в В-лимфоцитах обнаруживается транслокация фрагмента хромосомы 8 в хромосомы 14, 2 или 22, каждая из которых кодирует гены иммуноглобулинов. Возможно, при такой транслокации клеточный ген *тус*, гомолог онкогена *тус* вируса, при переносе под активный промотор иммуноглобулиновых генов, сильно активируется, что может обусловить злокачественную трансформацию клеток. Похож на лимфому Беркита рак носоглотки, распространенный среди китайского населения Юго-Восточной Азии. Возникновение этой опухоли обусловлено очевидно сочетанием вирусного заражения с какими-то этническими и генетическими факторами. ВЭБ находят при этом в эпителиальных клетках.

Трансформация клеток под влиянием онкогенных вирусов представляет многоступенчатый процесс. По общей схеме вирусная ДНК встраивается в геном клетки случайным образом. После транскрипции трансформирующих вирусных генов РНК-полимеразой II, процессинга и переноса в цитоплазму происходит синтез вирусных белков, ответственных за малигнизацию клетки. Показано, что трансформирующие вирусные гены кодируют функции, подобные функциям нормальных клеточных генов, которые регулируют дифференцировку и пролиферацию клеток. Изменение работы последних может привести к малигнизации. Поэтому их называют клеточными онкогенами. На мой взгляд, совершенно не правильно.

Оногенные ретровирусы широко распространены среди позвоночных и являются возможной причиной возникновения опухолей у животных и чело-

века. Ретровирусы были обнаружены первыми среди инфекционных онкогенных агентов. В 1908 году датскими исследователями Эллерманом и Бангом удалось перенести лейкоз кур от одних птиц к другим с помощью бесклеточного фильтрата лейкозных клеток. Однако в то время лейкоз не относили к онкозаболеваниям. Поэтому первым признанным онкогенным ретровирусом стал открытый Раусом в 1911 году вирус саркомы цыплят, названный его именем. Вслед за этим обнаружены вирусы, вызывающие опухоли у мышей – Гросса, Френд, Молони, Биттнера и др.

Открытие в 1970 году Темином и Балтимором в составе ретровирусов фермента, осуществляющего синтез ДНК по матрице РНК (обратная транскриптаза или ревертаза), объяснило, каким образом РНК-содержащие вирусы внедряются в геном клетки. Некоторые ретровирусы существуют в форме провирусов в клеточном геноме и заражение ими происходит вертикально (эндогенные вирусы), другие могут распространяться горизонтально (экзогенные вирусы). Онкогенные ретровирусы содержат гены (онкогены), очень близкие по структуре высококонсервативным клеточным генам. Для репликации вируса они не нужны, но именно они играют главную роль в приобретении клеткой неопластического фенотипа. В группе ретровирусов есть такие, которые не содержат онкогенов и не вызывают развитие опухолей. Так, ретровирус ВИЧ не является онкогенным, а опухоли, возникающие у пациентов при развитии ВИЧ-инфекции (СПИД) являются результатом иммунодефицита, вызываемого поражением иммунной системы вирусом.

Ретровирусы сначала изучали исключительно как модель вирусного канцерогенеза и это направление исследований позволило открыть многие механизмы канцерогенеза. Одновременно с этим были сделаны важнейшие открытия в области молекулярной генетики, особенно в функционировании эукариотических клеток. Кроме этого, стратегия репликации ретровирусов, связанная с их внедрением в геном делает их незаменимыми векторами для переноса генетического материала в клетки с целью трансгенеза.

Когда была открыта группа хронических прогрессирующих, неизбежно

летальных инфекций человека и животных, характеризующихся спонгиозной энцефалопатией, ученые предполагали, что причиной их являются необычные, или неканонические, вирусы, обладающие странными свойствами, чрезвычайно устойчивые к физическим и химическим воздействиям. Поскольку при этих заболеваниях наблюдался длительный латентный период, возбудителей их называли также медленными вирусами. Впоследствии было показано, что эти заболевания передаются горизонтальным путем или являются генетически обусловленными, но в основе их развития лежат не вирусы, а инфекционные агенты нового типа, лишенные нуклеиновых кислот, представляющие собой белки – прионы. Заболевания называли прионовыми. О них подробнее в главе.....

2.2. Почему вирусы вызывают заболевания?

Вирусы вызывают заболевания, но это не является необходимым условием их существования, скорее это побочный эффект. Сначала вирус прикрепляется к рецептору на поверхности клетки-мишени и внедряется в нее. Наличием или отсутствием таких рецепторов объясняется видовая и тканевая специфичность вирусов. При продуктивном типе взаимодействия клетки гибнут, развивается воспаление. Это характерно для острых вирусных инфекций – клещевой энцефалит, полиомиелит, грипп, корь, оспа, гепатит и др. Однако вирусу «невыгодно» убивать свою жертву – удобнее получить возможность размножаться в ней постоянно. И действительно, некоторые вирусы живут в клетке до самой ее смерти, а иногда даже делают ее бессмертной (опухолевой). Такое сосуществование вируса с клеткой может принимать разные формы. Одна из них – латентное состояние вируса. Геном человека и животных напичкан латентными вирусами, которые могут пробудиться под воздействием факторов окружающей среды. Многие знакомы с таким типом взаимодействия вируса и хозяина на примере вируса герпеса, вызывающего «лихорадку» (так ее называют в быту) на губах. В латентной стадии вирус находится в клетках ганглия тройничного нерва. Его размножение подавле-

но. Однако различные внешние воздействия – охлаждение, перегревание, стресс приводят к транскрипции вирусной ДНК и образованию новых вирусных частиц. В результате поражаются нервные клетки и слизистая губ, в которую вирус попадает по нервному отростку. Это пример того, что латентная стадия вирусной инфекции очень чувствительна к внешним воздействиям.

Вирус может привести клетку к гибели, сам того не желая. Это за него делает иммунная система, а именно ее особые клетки – Т-киллеры. Они распознают зараженную вирусом клетку и, несмотря на то, что вирус не очень опасен, убивают ее. Последнее может оказаться роковым для организма. В таких случаях для лечения заболевания приходится подавлять функцию иммунной системы. Зараженные вирусами клетки могут пожертвовать собой ради спасения целого организма, включив программу апоптоза - запрограммированной клеточной смерти. Это тоже может отразиться на состоянии здоровья организма. Некоторые вирусы предпринимают активные действия, чтобы оставить в живых клетки, в которых они существуют. Так, онкогенные вирусы вызывают злокачественную трансформацию клеток. Зараженные клетки усиленно пролиферируют и образуют опухоль. При этом вирусы активно подавляют апоптоз клеток.

Вирусы могут нарушать специализированные функции клетки, не нарушая жизненно важных. Так, вирус лимфоцитарного хориоменингита мышей (ЛХМ) поражает клетки передней доли гипофиза. Оказалось, что вирус снижает транскрипцию гена гормона роста, не нарушая транскрипцию других генов. В результате у животных образуется на 50 % меньше гормона роста. Это вызывает удивление! Возможно, что и другие гормональные нарушения являются результатом персистентной вирусной инфекции и такой коварный тип стратегии выживания вируса лежит в основе многих заболеваний.

Для медицинской генетики очень важны аспекты инсерционного мутагенеза, связанные с действием ретровирусов. Они размножаются с помо-

щью обратной транскрипции. Их ДНК-копии встраиваются в различные участки генома, вызывая мутации. При своих перемещениях из клетки в клетку, а также от одного организма в другой они способны включать в свой геном клеточные гены. Так, они могут горизонтальным путем передавать наследственную информацию. Встроенные в геном ретровирусные последовательности находят в геноме всех позвоночных.

Вирусы привлекают внимание исследователей не только как возбудители опасных заболеваний и как мощные мутагенные факторы. Стратегия функционирования вирусов используется генными инженерами для переноса генов в разные организмы – трансгенеза. В этих случаях они являются молекулярными векторами. В данном качестве их используют для получения трансгенных растений, животных, бактерий и для генной терапии наследственных заболеваний человека, а также для получения рекомбинантных вакцин.

В последние годы в связи с приобретением многими патогенными для человека бактериями резистентности к химиотерапии антибиотиками возобновился интерес к использованию вирусов бактерий – бактериофагов для лечения бактериальных заболеваний. Бактериофаги обладают высокой специфичностью для определенного типа бактерий. В этом преимущество фаготерапии, но в этом же и ее недостаток. Одна мутация в геноме бактерий может сделать фаготерапию данным фагом не эффективной. Поэтому чтобы выиграть гонку изменчивости, используют смеси фагов. Кроме этого, применяют генноинженерные подходы к изменению фагов, специально предназначенных для фаготерапии.

Вирусы проявляют поразительную устойчивость к неблагоприятным внешним воздействиям и быстро приспосабливаются к ним. Для этого у них есть разнообразные приспособления. Главное из них то, что репликация вируса не является точной. Наблюдается запрограммированная «невнимательность» при репликации. Одна зараженная клетка продуцирует десятки тысяч вирусных частиц, среди мутантов могут оказаться более при-

способленные к изменившимся условиям. Практическую важность имеет приобретаемая способность таким образом менять свою внешность – поверхностные белки, чтобы стать неуязвимыми для иммунной системы. Преуспел в этом вирус иммунодефицита человека. Это обстоятельство затрудняет вакцинацию при СПИДе, а также гриппе. Благодаря высокой мутабильности, вирусы быстро приобретают устойчивость к лекарственным препаратам. Пока лекарство поступит в аптеку, среди вирусов уже размножатся устойчивые к нему формы.

2.3. Современное состояние борьбы с вирусными инфекциями

Главным средством борьбы с вирусными заболеваниями во всем мире является метод вакцинации, включающий главные средства защиты человеческого организма – иммунитет и иммунологическую память. До сих пор не до конца выяснены интимные механизмы иммунологической памяти, а между тем их активация применяется для борьбы с инфекционными заболеваниями еще с древних времен

Можно с уверенностью утверждать, что ни одно из достижений биологии и медицины не принесло человечеству столько пользы, сколько вакцинация, избавив его от страшных эпидемий чумы, холеры, оспы и других инфекционных заболеваний. С вакцинации против оспы началось зарождение иммунологии как науки, и именно в борьбе с этим заболеванием достигнуты наибольшие успехи.

Победа человечества над оспой вселяла надежду, на то, что ни один вирус уже не может угрожать человечеству. На этом благополучном фоне внезапное возникновение СПИДа, а также геморрагических лихорадок, вызываемых вирусами Марбург и Эбола, явилось поучительным уроком и для ученых, и для врачей.

В 1981 г. в Центре по контролю заболеваемости в США появился отчет местных органов здравоохранения, в котором указывалось, что за последние 8 месяцев в районе Лос-Анджелеса было диагностировано пять случаев

заболеваний пневмонией, вызванной простейшими *Pneumocystis carinii* (пневмоцистная пневмония). Это заболевание относится к числу оппортунистических инфекций, т. е. оно развивается лишь у людей с ослабленной иммунной системой. Но данное сообщение касалось развития заболевания у молодых мужчин, у которых не было видимых причин для недостаточного функционирования иммунной системы. В отчете указывалось, что все заболевшие были гомосексуалистами. Примерно в это же время в Центре появился еще один настораживающий отчет. На этот раз сообщалось об увеличении частоты заболеваемости редким видом злокачественной опухоли – саркомой Капоши. За 30 месяцев наблюдений в Нью-Йорке и Калифорнии было отмечено 20 случаев этого рака у мужчин-гомосексуалистов. У некоторых из них также была пневмоцистная пневмония и другие оппортунистические инфекции. Вскоре после этого врачи стали обращать внимание на необъяснимую хроническую лимфаденопатию, а также случаи лимфомы. Главное, что объединяло все эти заболевания, – это тяжелое поражение иммунной системы. Поэтому новое заболевание стали называть синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД). Вскоре была определена категория людей с повышенным риском заболеть СПИДом. Среди них оказались мужчины-гомосексуалисты, наркоманы, применявшие наркотики в инъекциях, и больные гемофилией. На основании этого было сделано предположение, что СПИД вызывается инфекционным агентом, скорее всего вирусом, который передается через кровь или при половых контактах. В дальнейшем было выяснено, что инфекционный агент может передаваться также от матери к детям в период беременности и кормления грудью, иглами для инъекций со следами крови и другими инструментами, используемыми в медицине. Таким образом, несмотря на существование группы повышенного риска, нет ни одной группы населения, которая была бы застрахована от опасности заражения СПИДом.

Несмотря на то что впервые СПИД был описан в 1981 г., заболевание возникло, очевидно, в Центральной Африке в начале 50-х гг. XX в. и затем

распространилось в страны Карибского региона, а оттуда в США и Европу. По приблизительным оценкам сегодня в мире 29 млн человек заражены вирусом иммунодефицита, а 1,5 млн уже умерли от СПИДа. Самый неблагополучный в этом отношении район – Африка, затем следуют Северная и Южная Америка. В Европе лидируют Испания, Италия, Франция и Германия. В России к 1 декабря 1997 г. официально зарегистрировано около 7 000 зараженных ВИЧ.

На фоне мрачной эпидемиологической картины резким контрастом выглядит поразительно быстрое открытие этиологического фактора заболевания (рис. 3) и накопление знаний о его патогенезе. За два года – с 1982 по 1984 – была выяснена картина заболевания и выделен ее возбудитель, а также разработан метод диагностики и установлена специфическая мишень вируса в организме человека. Ею оказались клетки иммунной системы – Т-хелперы и макрофаги. Поражение таких главных в развитии иммунного ответа клеток вызывает тяжелейший иммунодефицит, на фоне которого проявляются различные инфекционные заболевания.

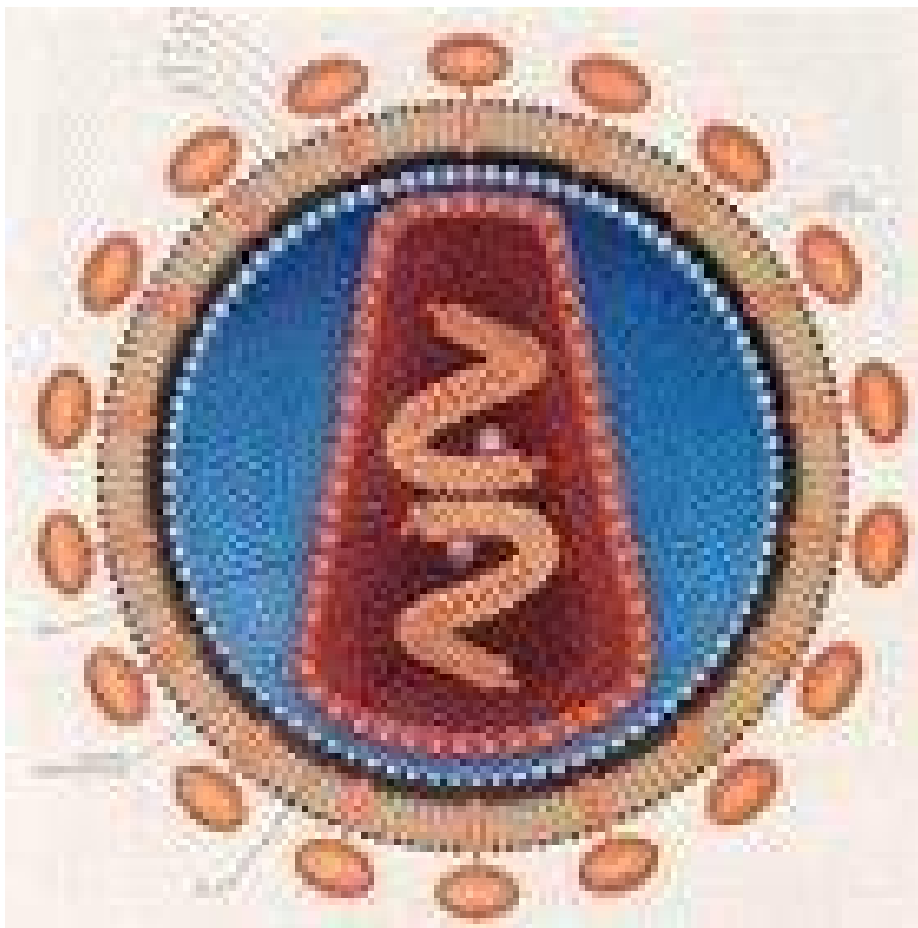


Рис. 3. Структура вируса иммунодефицита человека

Для СПИДа характерно развитие паразитарных заболеваний: пневмоцистного воспаления легких, токсоплазмоза с поражением мозга и развитием судорог и комы, поражения желудочно-кишечного тракта криптоспоридиями. Из вирусных заболеваний чаще всего встречаются вызываемые цитомегаловирусом пневмония, энцефалит и воспаление желудочно-кишечного тракта, а также инфекции, вызываемые простым герпесом. Для картины СПИДа свойственны множественные неврологические нарушения, проявляющиеся в постепенной потере памяти, способности к мышлению и координации движений.

В некоторых случаях от момента заражения СПИДом до гибели больного проходит не более двух лет. Однако, как правило, СПИД прогрессирует медленно. Такое разное течение заболевания может быть обусловлено

как различиями в вирулентности вируса, так и в активности иммунных механизмов. Показано, что в ответ на заражение ВИЧ иммунная система реагирует выработкой антител и цитотоксических *T*-лимфоцитов. Следовательно, какое-то время размножение вируса сдерживается, пока не наступит критическая стадия, когда иммунная система уже не справляется с ВИЧ. На заключительной стадии заболевания СПИДом по клинико-морфологическим признакам выделяют несколько синдромов: легочный, желудочно-кишечный, неврологический, поражения слизистых и кожи, ретинопатию и др. Поражения легких, зачастую смертельные, вызываются наиболее часто *Pneumocystis carinii* и цитомегаловирусом. Реже встречаются пневмонии, вызванные пневмококком, золотистым стафилококком, токсоплазмой, микобактериями туберкулеза. Летальность всех этих пневмоний высокая.

Неврологический синдром наблюдается у 80–90 % инфицированных ВИЧ. При этом, как правило, он обусловлен непосредственным заражением вирусом клеток нервной системы. Энцефалиты сопровождаются очагами демиелинизации. Частым у больных является грибковый криптококковый менингит или менингит, вызванный токсоплазмой и другой микрофлорой. Течение оппортунистических инфекций центральной нервной системы при СПИДе тяжелое, сопровождается слабоумием, припадками и параличами. Приблизительно у 70 % больных СПИДом обнаруживается саркома Капоши, очаги которой могут быть локализованы на коже и во многих внутренних органах. Если ко всему перечисленному добавить гепатиты, поражения почек, тимуса, селезенки, различного генеза лимфомы – все равно это будет неполный спектр клинических проявлений СПИДа, который постоянно расширяется. Например, отмечены новые виды злокачественных опухолей и поражений нервной системы.

Лечение ВИЧ-инфекции сводится к специфической противовирусной терапии, к борьбе с оппортунистическими и опухолевыми заболеваниями, к иммуномодулирующей и заместительной терапии.

В качестве мишени для воздействия на ВИЧ наибольшее внимание привлекает обратная транскрипция вирусной РНК. На сегодняшний день в распоряжении врачей имеется несколько препаратов, подавляющих обратную транскрипцию и, следовательно, репликацию вируса. К ним относятся азидотимидин, диданозин, зальцитобин.

Основными препятствиями к созданию вакцины против СПИДа являются:

1. Наблюдается постоянное мутирование и изменение поверхностных гликопротеинов. В отличие от других вирусов, представленных всего несколькими штаммами, ВИЧ существует в огромном числе генетических вариантов, так что фактически образуется непрерывное множество родственных штаммов. У некоторых больных популяция ВИЧ может изменяться в течение 2–4 недель.

2. На стадии интеграции вируса в геном хозяина ни естественные механизмы иммунитета, ни обусловленные вакциной не работают.

3. ВИЧ атакует клетки, ответственные за создание иммунитета.

4. Отсутствуют адекватные модели СПИДа на животных.

5. Существуют сложности при клинических испытаниях вакцины, связанные с этическими проблемами и нехваткой добровольцев.

На седьмом Международном симпозиуме по СПИДу в Италии в 1991 г. было сообщено, что в стадии испытания находятся 13 вакцин против СПИДа. Среди этих вакцин целый инактивированный вирус, живые рекомбинантные вирусы, рекомбинантная ДНК, синтетические пептиды, антиидиотипические антитела и др. Хотя обнадеживающих результатов в направлении создания эффективной вакцины еще мало, следует отметить, что разработано довольно большое число потенциальных вакцинных препаратов. Дело в том, что успех иммунизации на добровольцах порой очень трудно оценить. Этические нормы требуют, чтобы люди, на которых испытывается экспериментальная вакцина, были предупреждены о необходимости избегать контакта с больными СПИДом, и поэтому низкая заболевае-

мость среди них может быть обусловлена их разумным поведением или переходом на безопасный секс. Еще труднее оценить эффект вакцины на уже инфицированных людях. Поскольку инфекция развивается длительно, непонятно, сколько времени надо ждать, чтобы оценить, действует вакцина или нет.

Большие трудности возникают и с добровольцами. Во-первых, их мало. Во-вторых, если доброволец заболел СПИДом, то как различить, связано это непосредственно с введением вакцины или она не предоохранила его от заражения? Не грозит ли разработчикам вакцин быть втянутыми в бесконечные судебные разбирательства? Тем не менее создание вакцины – это самая высокая цель в области исследований СПИДа. Она объединяет усилия многих ученых из разных стран. Вряд ли вирус устоит перед такой атакой. (См. подробнее о СПИДе: Н. А. Попова, «Иммунология», Новосибирск.2006.)

Вирусы, вызывающие геморрагические лихорадки Марбурга и Эбола, оказались одними из самых патогенных для человека. Лишь вирус бешенства (кстати, родственник этих вирусов) превосходит их по смертности. Он вызывает 100 % гибель людей при отказе или невозможности ввести антирабическую сыворотку.

Основные вспышки геморрагических лихорадок произошли в Центральной Африке, в районах, которые знамениты и другими уникальными заболеваниями – вирусной лихорадкой Ласса, желтой лихорадкой, лихорадкой долины Рифт и СПИД.

В 1967 г. лихорадкой Марбурга заболели практически одновременно сотрудники фармзаводов в Германии и Югославии, работавшие с почками обезьян, экспортируемых из Уганды. У заболевших был выделен и идентифицирован вирус, который назвали в честь города, в котором он был обнаружен впервые. Следующий случай подобной болезни произошел с путешественниками в Зимбабве, недалеко от места отлова обезьян. Затем были случаи этого заболевания в Кении в 1980 и 1987 гг. со смертельным исхо-

дом. Заражение во всех случаях происходило также в месте отлова обезьян, однако тщательное обследование местности и обезьян вируса не выявило.

Лихорадка Эбола появилась впервые в Судане в 1976 г. Сначала были единичные случаи, затем несколько врачей заразились от своих пациентов. Сразу же проявилась высокая смертность, так напугавшая всех, что жители небольшого поселка, где все началось, бежали в джунгли. Вероятно, это и остановило эпидемию. Через несколько месяцев аналогичная вспышка произошла в Заире. Она приняла такие опасные масштабы, что президент Заира попросил помощи ВОЗ. Были предприняты самые жесткие карантинные меры – блокирование очага инфекции войсками. Выяснилось, что причиной заражения явилось употребление в пищу сырого мяса обезьян. Описаны также заражения этой болезнью при странных обстоятельствах. Так, мальчик-датчанин заболел лихорадкой Эбола после того, как побывал в пещере Китум. Позднее заболел и умер французский путешественник, также спустившийся в эту пещеру. Смертность от этой болезни составляет 80 %. После инкубационного периода, который продолжается 4–10 дней, болезнь начинается внезапно с головных болей, лихорадки и боли в мышцах. В дальнейшем состояние резко ухудшается – возникает тошнота, рвота, понос и множественные кровоизлияния. Кровь течет из мест уколов, появляется на слизистых. Смерть наступает спустя 2 недели от септического шока. Выздоровление (если оно наступает) сопровождается апатией, потерей веса. Обычно больной не помнит своих ощущений в период болезни.

Лучшие вирусологи мира были привлечены к расшифровке этиологического начала этого заболевания. Вскоре вирус был открыт, ему дали название Эбола – по названию реки, в районе которой заболевание появилось впервые.

Первой жертвой вирусов Эбола и Марбурга является иммунная система. Уменьшается количество лимфоцитов крови, лимфоидные органы выглядят опустошенными, затем присоединяется тромбоцитопения и поражения сосудов. Ни при каком другом вирусном заболевании не развивается

иммунодепрессия в такой степени. Несмотря на более чем двадцатилетнее изучение вирусов Марбурга и Эбола, до сих пор не разработано удовлетворительных вакцинных препаратов, не найдено ответов и на многие вопросы относительно патогенеза этих заболеваний, природных хозяев вирусов, причин высокой смертности и т. д. Сочетание довольно странных обстоятельств, сопутствующих началу этих заболеваний, переходящему в эпидемии, придает ореол мистики всему, что связано с этими вирусами. Именно поэтому книга Ричарда Принстона «Горячая точка», посвященная этим вирусам, стала в 1994 г. бестселлером, а снятый по ее мотивам фильм «Эпидемия» признан самым кассовым.

Другой неразрешимой проблемой для иммунной системы и для здравоохранения всей планеты являются гепатиты. Ежегодно в мире от патологии, связанной с вирусными гепатитами, включая цирроз печени и первичную карциному печени, умирает более 1 млн человек. Всего в мире 350 млн человек являются носителями вируса гепатита *B* и 150 млн – вируса гепатита *C*. Для сравнения, вирусом иммунодефицита человека инфицировано 30 млн человек. В России половину пациентов инфекционных клиник составляют больные гепатитом.

Вирусные гепатиты можно разделить на две большие группы: 1) передающиеся алиментарным путем, т. е. через грязные руки, продукты питания и т. д. Это гепатиты, вызываемые вирусами типа *A*, *E* и *F*. В группы повышенного риска заболеть этим типом гепатита входят работники сферы обслуживания, ресторанов, столовых и социальные группы с низким уровнем гигиены;

2) передающиеся парентеральным путем, т. е. через инъекции, медицинские инструменты и половым путем. Так передаются гепатиты типа *B*, *C* и *G*. Группы повышенного риска этих гепатитов составляют хирурги, стоматологи, больные гемофилией и лейкозами, а также наркоманы и проститутки.

Наибольшую опасность представляют гепатиты *B*, *C* и *G*. Если заболе-

вание протекает остро, то возможен смертельный исход, так как развивающийся иммунный ответ, а именно цитотоксические *T*-лимфоциты (а также натуральные киллеры), вызывают гибель зараженных вирусом гепатоцитов и разрушение печени. Если заболевание приобретает хроническое течение, долгое время после заражения человек может оставаться практически здоровым из-за высоких компенсаторных способностей печени. Тем не менее при этом развивается хронический гепатит, последствием которого может быть цирроз печени и первичная карцинома печени. В странах, где заболеваемость гепатитом *B* высока, проводится вакцинация против него. В результате заболеваемость и опасные осложнения снижаются.

Грипп – вирусное заболевание, ежегодно поражающее миллионы жителей нашей планеты. Грипп — болезнь, которая имеет много осложнений. Ни одна другая болезнь не может «похвастаться» таким огромным их количеством. Примерно сто человек из миллиона умирают. Во время пандемии 1918 года от гриппа, который называли испанкой, погибло около пятидесяти миллионов человек. больше, чем от ранений на всех фронтах первой мировой войны за четыре года. Никогда позже грипп не вызывал столь высокой смертности.

Геном вируса гриппа представлен 8 фрагментами линейной РНК. В соответствии с антигенной специфичностью поверхностных гликопротеидов гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы (НА) в настоящее время известно 16 подтипов НА и 9 подтипов нейраминидазы (НА). Молекулы этих гликопротеинов ответственны за связывание вируса с рецепторами клетки-хозяина. После попадания в цитоплазму вирусная РНК поступает в ядро, где реплицируется и транскрибируется. Синтез вирусных белков осуществляется белоксинтезирующим аппаратом клетки. Полностью готовые белки транспортируются в ядро где с (-)РНК образуют рибонуклеопротеины. Далее РНП доставляются к липидным рафтам, где происходит их упаковка и затем почкование вирусных частиц.

Вирусы, в отличие от их хозяев, проявляют паразитическую устойчи-

вость к неблагоприятным внешним факторам. Они легко приспосабливаются к неожиданно возникающим обстоятельствам, к токсичным для них химическим соединениям, в том числе лекарствам. За счет мощного капсида они устойчивы к кислому рН желудка, протеолитическим ферментам, детергентам и т. п. Мутагенные вещества также не так страшны им, как их хозяевам. Многие гены у вирусов дублированы, так что мутация может не затронуть хотя бы один белок..

Главная вирусная стратегия выживания – это высокая мутабельность, являющаяся основным препятствием для получения эффективных противовирусных препаратов. Пока новое лекарство поступит в аптеку, среди вирусов уже появятся штаммы, устойчивые к нему. Более того, могут появиться «вирусы-наркоманы», размножение которых зависит от лекарства. Это возможно в случае, когда новая мутация обуславливает синтез белка, нейтрализующего лекарство, но сам синтез белка поддерживается лекарством. Высокая мутабельность позволяет вирусам быстро менять свою антигенную внешность и становиться неузнаваемыми для иммунной системы. В погоне за изменяющимися вирусами иммунная система истощается. Вирусная инфекция, даже не поражающая клетки иммунной системы непосредственно, может вызвать глубокую иммунодепрессию. Показано, что после перенесенной кори иммунодепрессия сохраняется в течение, по крайней мере, 6 месяцев. Для других вирусных инфекций (герпес, гепатиты, геморрагические лихорадки) этот период гораздо длительнее. Таким образом, наблюдается замкнутый круг – угнетение иммунной системы, вызываемое экотоксическими факторами, делает организм более восприимчивым к инфекционным заболеваниям, а последние угнетают функции иммунной системы. Влияя на иммунную систему, вирусы могут быть пусковым механизмом в развитии аллергических и аутоиммунных заболеваний, а также злокачественных новообразований.

Формирование крупных иммунодефицитных популяций человека создает основу для формирования полирезистентных штаммов микроорганиз-

мов. Известно также, что у иммунодефицитных людей после химиотерапии происходит более быстрое повышение вирулентности самих возбудителей болезней. Так, выделенные из очагов кавернозной пневмонии у больных СПИДом бактерии *Rodococcus equi* в экспериментах на мышах оказались более патогенны, чем штаммы, полученные от больных с неизменной иммунной системой. Аналогичная ситуация наблюдается в популяциях микобактерий туберкулеза, герпесвирусов, токсоплазмы, кандидоза и других микроорганизмов, инфицирующих больных СПИДом. Устойчивые штаммы микроорганизмов могут распространяться и среди людей, не инфицированных ВИЧ, у которых иммунная система подавлена под влиянием неблагоприятных факторов окружающей среды. Иммунодефицитная популяция открывает ворота высококонтагиозным быстрым инфекциям. Таким образом, в истории инфекционных болезней человека возбудители быстрые инфекции (чума, холера, оспа) сменились медленными (СПИД). Кто знает, возможен ли после этого возврат к эпидемиям быстрых инфекций.

Глава 3. НАДЦАРСТВО ПРОКАРИОТ (PROCARIOTA)

Критерием деления организмов на два надцарства служит присутствие или отсутствие клеточного ядра. Прокариоты не содержат ядер, эукариоты имеют ядра. Между ними есть и другие различия, но это – главное.

Прокариоты существуют на Земле уже 4 млрд. лет. Им принадлежит исключительное значение для жизни на Земле; фактически, они составляют ее фундамент. Прокариоты выполняют основополагающую функцию в циклических превращениях основных химических элементов, необходимых для жизни – углерода, кислорода, азота, серы, фосфора, что собственно и представляет круговорот веществ. Определенные этапы этого процесса осуществляют исключительно прокариоты. Без прокариот ни почва, ни атмосфера, ни вода не были бы пригодными для жизни в той форме, в которой она сущест-

вует на Земле. К. Северинов, д.б.н., профессор университета Ратгерса (Сша) так сказал о планете Земля. "Надо понимать, что это планета не людей, это планета бактерий. Мы – маленькая надстройка. На нашей планете биомасса прокариот составляет 50-90%

от всей биомассы биоты. В человеческом организме количество прокариотических клеток сопоставимо

с числом эукариотических или больше.

Прокариоты представляют собой микроскопические организмы размерами в среднем 1–5 мкм. Они могут быть ауто- и гетеротрофами. По процессу обмена они делятся на хемо- и фототрофов. Типы обмена прокариот очень разнообразны. Среди них есть серообразующие, железисто-марганцевые, азотные, ацетатные и другие бактерии.

Прокариоты вездесущи. Они обитают в широких пределах, легко приспосабливаются к изменяющимся условиям среды и процветают там, где никто жить не может.

Метаболические реакции, которые используют прокариоты, чрезвычайно разнообразны. По этому свойству они превосходят все другие живые организмы. Только прокариоты способны усваивать азот воздуха, окислять серу, водород и другие химические элементы, образовывать метан и т.п. Для получения энергии прокариоты используют солнечные лучи (фототрофы) и разложение органических и неорганических соединений (хемотротрофы). По свойственному им типу питания прокариоты делятся на аутотрофы и гетеротрофы. Практически все природные, а также многие искусственные соединения разлагаются прокариотами. Поэтому велика их роль в деструкции веществ.

Прокариоты обладают рядом морфологических и физиологических особенностей, отличающих их от эукариот.

3.1. Основные различия между прокариотами и эукариотами

Прокариоты и эукариоты различаются по многим параметрам, главным из них является отсутствие у первых ядра. Это обстоятельство во многом обеспечивает и различия по другим признакам. Основные из них сведены в таблицу 1.

Кроме цитоплазматической мембраны, большинство прокариот имеют клеточную стенку, придающую им форму и прочность. Она представляет собой плотную оболочку, выполняющую функцию наружного скелета. Она спасает клетку от осмотического шока – несовместимого с жизнью изменения водно-солевого состава цитоплазмы за счет неконтролируемого обмена между водными растворами внутри клетки (цитоплазма) и вне ее через полупроницаемую клеточную мембрану. Наличие клеточной стенки не позволяет захватывать твердые крупные частицы пищи. Прокариоты вынуждены секретировать ферменты наружу, растворять пищу и питаться растворами, либо захватывать крупные органические молекулы (*пиноцитоз, пинотрофия*). Такой тип питания эффективен лишь при высокой концентрации веществ и высоким отношении поверхности клетки к ее объему. Известны прокариоты, например, микоплазмы, у которых клеточная стенка отсутствует. Многие из них являются облигатными паразитами эукариот, поэтому проблема защиты от осмотического шока для них не стоит.

Основной компонент оболочки – муреин, полисахарид, содержащий также и аминокислоты. По отношению к окраске по Граму (красителем генциан-виолет) все прокариоты делятся на грамположительные и грамотрицательные. Окрашиваются этим красителем все, но после обработки этанолом грамположительные остаются окрашенными, а грамотрицательные теряют окраску. Это связано с принципиально разным строением стенки. У грамположительных бактерий клеточная стенка представлена муреином в сочетании с тейхоевыми кислотами. У грамотрицательных есть еще одна дополни-

тельная внешняя мембрана. Снаружи многие бактерии окружены еще и слизистой капсулой, выполняющей защитную функцию. Клеточная стенка археобактерий состоит из производного изопрена – неопредельного пятиуглеродного углеводорода, т. е. химически она родственна полиэтилену. Клеточная стенка грибов состоит из полисахарида хитина.

Многие прокариоты образуют споры. Спорообразующими являются бациллы столбняка, чумы, ботулинуса и другие прокариоты. Споры, так же как и капсулы, предназначены для сохранения прокариот в неблагоприятных условиях. Они имеют утолщенную оболочку. Споры длительное время не размножаются – это покоящиеся клетки. При возвращении благоприятных условий они вновь начинают размножаться.

Геном прокариот компактен и невелик по размерам. Основная масса генетического материала представлена единственной кольцевой молекулой ДНК, которая находится в комплексе с белками. Лишь небольшое число видов бактерий имеют линейную хромосому (*Borellia burgdorferi*, *Streptomyces lividans*). Прокариоты относят к гаплоидным организмам. Помимо основной ДНК, в прокариотических клетках имеются автономные образования, содержащие кольцевые ДНК – плазмиды. В ДНК плазмид находятся гены устойчивости и резистентности к антибиотикам, гены токсинов и др.

Размножаются прокариоты бесполым способом, путем бинарного деления, которому предшествует репликация ДНК. Кольцевая ДНК прокариот прикреплена к клеточной мембране. После репликации каждая из вновь синтезированных молекул ДНК также прикреплена к мембране. Мембрана и клеточная стенка между точками прикрепления начинают расти, образуют перетяжку, которая делит клетку на две. В этом процессе принимает участие сложное образование – мезосома, производное внешней клеточной мембраны. Бактерии могут обмениваться генетической информацией, находящейся в основной ДНК и в плазмидах. Известно несколько механизмов такого обмена: конъюгация, трансформация и трансдукция. Все они обеспечивают горизонтальный перенос генов между бактериями, вызывая возникновение но-

вых патогенных штаммов, вспышки эпидемий, быстрое появление и распространение устойчивости к лекарственным препаратам. Главными переносчиками генов между прокариотами являются бактериофаги. Именно бактериофаги переносят из бактерии в бактерию гены токсинов бактерий. При интеграции фага в геном бактерий последние приобретают способность вырабатывать токсин. Так, *Corynebacterium diphtheriae* приобретает токсичные для человека свойства благодаря инфицированию лизогенным фагом, и только такие штаммы вызывают заболевание человека дифтерией. Аналогичная ситуация для токсина стрептококка, стафилококка и других бактерий. При конъюгации прокариот происходит обмен плазмидами, именно этим путем бактерии быстро приобретают устойчивость к антибиотикам при лечении бактериальной инфекции. Всеобщая доступность антибиотиков привела к возникновению устойчивых бактериальных штаммов.

Некоторые бактерии могут внедрять свои плазмиды в растительные клетки. Таким свойством обладают *Agrobacterium tumefaciens*, образующие на корнях растений так называемые корончатые галлы – опухолевые образования.

Таблица 1

Основные различия между про- и эукариотами

Пара- метры Свойст- ва	Прокариоты	Эукариоты
Организмы	Бактерии и археи	Протисты, грибы, растения, животные
Ядра	Нет	Есть

Размеры клеток	1–10 мкм	До 100 мкм*
Метабо- лизм	Анаэроб- ный и аэробный	В ос- новном аэроб- ный**
О рга- нел- лы	Рибосомы, жгутики	Митохондрии, хлоропласты, пе- роксисомы, Рибо- сомы, ЭПР, лизо- сомы, цитоскелет, аппарат Гольджи, жгутики, реснич- ки
ДНК	Кольцевая в цитоплазме	Линейная с большим количе- ством не коди- рующих участков
Транс- ляция и транскрип- ция	В цито- плазме	Транскрипция в ядре, трансляция в цитоплазме
Фикса- ция азота	Есть	Нет
Деление клеток	Бинарное	Митоз или мейоз
Клеточ- ная стенка	Есть у большинства	Есть только у растений
Фагоци-	Нет	Есть

ТОЗ И ПИНО-ЦИТОЗ		
------------------	--	--

*Яйцеклетки страуса достигают 15 см, нервные клетки с их отростками – нескольких метров.

**Амебы, черви и др. эукариоты – анаэробы.

В клетки растений, с которыми они находятся в состоянии симбиоза, они вносят Ti-плазмиду. Генные инженеры, занимающиеся биотехнологией растений, используют эти плазмиды для переноса в геном растений генов других растений и животных. Для этого из плазмидной ДНК вырезается часть, ответственная за образование опухолей и включается новая генная конструкция. Плазмиды других бактерий также используются в биоинженерии как векторы для переноса генов (См. гл.12).

Горизонтальный перенос генов является одним из главных механизмов эволюции микроорганизмов. Это непременно надо иметь в виду при оценке экологического риска интродукции генно-инженерных штаммов микроорганизмов в природу.

Приблизительно 80 % прокариот способны к передвижению. Это свойство позволяет им выбирать оптимальные условия для существования. Для передвижения прокариоты используют самый экстравагантный способ – вращение жгутиков, подключенных к протонному мотору. По существу, это электродвигатель субмикронного размера, собранный из нескольких молекул белка.

Несмотря на то, что прокариоты – одноклеточные организмы, жизненная стратегия их характеризуется образованием сообществ особей одного вида или многовидовых сообществ, где продукты метаболизма одного вида служат пищей для другого. Так, цианобактериальный мат - очень древняя экосистема, практически не изменившаяся более чем за 2,5 млрд. лет, состоит из нескольких слоев, населенных разными видами бактерий: фотосинтезирующими цианобактериями и аэробными гетеротрофами, утилизирующими

кислород и отмершую органику; пурпурными бактериями - утилизаторами световых волн, неиспользуемых цианобактериями, и факультативными аэробами-гетеротрофами; анаэробами, утилизирующими все, что осталось. Общая регуляция в сообществе осуществляются межклеточными коммуникациями и метаболическими связями. Часто развитие одних видов бактерий невозможно, если продукты их метаболизма не утилизируют другие виды бактерий. Ярким примером распространения сигналов в сообществах бактерий являются миксобактерии. - кворум-чувствительные сигналы у миксобактерий. При неблагоприятных условиях при поступлении сигналов, выделяемых в среду при голодании, они сползаются вместе, их клетки агрегируют в плодовые тела, образующие споры. Это их стратегия выживания.

Такая тесная взаиморегуляция в сообществах прокариот позволяет говорить об общей регуляции генов сообщества – о его *метагеноме*, например, метагеноме микрофлоры человеческого кишечника.

3. 2. Археи как особый домен прокариот

В течение длительного времени термины «прокариоты» и «бактерии» считали синонимами. Однако постепенно накапливались данные о таких существенных различиях между некоторыми бактериями, которые послужили основанием для гипотезы об отсутствии между ними близкого эволюционного родства.

Все началось с обнаружения различий структуры рибосомной РНК малой субъединицы рибосом у разных прокариот. Эти данные плюс другие особенности организации, позволили разделить прокариот на два самостоятельных домена, имеющих различное эволюционное происхождение – бактерии и археи. Предполагают, что представители всех трех макротаксонов живых организмов возникли из одного общего предка прогенота, который мог дать начало трем самостоятельным ветвям – доменам: бактериям, археям и эукариотам.

На основании этой гипотезы эукариоты являются потомками эубактерий и архей (рис. 4).

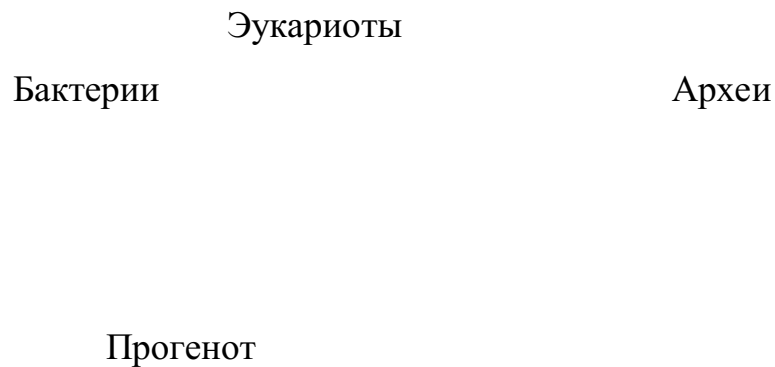


Рис. 4. Гипотетическая схема эволюции трех макротаксонов организмов на Земле

Археи обладают свойствами как эубактерий, так и эукариот, что и определяет отнесение их к особому домену прокариот.

1. *Archaeobacteria* не синтезируют муреин, как эубактерии, строя экзоскелет из различных белков, гликопротеинов и изопреноидов. Белки оболочки архей уложены регулярно, так что образуют правильные и часто причудливые формы (например, в виде цветочков).

Отказ от муреина позволил многим видам археев приспособиться к экстремальным условиям.

3. У многих архей мозаичное строение генов (наличие интронов и экзонов) и наличие повторяющихся последовательностей в ДНК. Это сближает их с эукариотами.

4. Субъединичный состав РНК-полимеразы отличается от бактериального и эукариотического фермента

5. Рибосомы и рибосомные РНК архей отличаются от бактериальных, но обнаруживают сходство с эукариотическими. Сложный компонентный состав рибосомных белков. Есть отличия и в белковом синтезе.

6. Археям свойственны биохимические процессы, не встречающиеся у бактерий, – образование метана, серной кислоты и т. д.

7. По образу жизни многие из архей экстремофилы. Их условно разделяют на термофилов (устойчивых к температурам 45-113°C); психрофилов (размножающихся при температурах от -10 до +15°C); ацидофилов (резистентных к средам с pH 1-5); алкалифилов (размножающихся при pH 9-11), барофилов (выдерживающих давление до 700 атм.); галофилов (способных к выживанию в 25-30% NaCl) и ксерофилов (обитающих в необычайно сухих условиях). Для каждой группы характерен определенный набор химических соединений, включаемых в клеточную стенку, а также определенный метаболизм. Изучение экстремофильных археев еще только начинается и, по-видимому, преподнесет много сюрпризов. Хотя далеко не все археи – экстремофилы. Многие из них сосуществуют с бактериями при обычных условиях.

8. Соответственно среде обитания археи обладают ферментами, работающими в экстремальных условиях повышенной или пониженной температуры, кислотности, щелочности и концентрации солей. Такие ферменты термофилов, как Taq-полимераза и Pfu-полимераза, используются при проведении полимеразной цепной реакции.

Археи оправдывают свое название (от греч. *arche* – древний). Благодаря особенностям метаболизма, они, по-видимому, играли ведущую роль в начальный период эволюции жизни на Земле, когда особое значение имели процессы получения энергии за счет окисления молекул водорода и исполь-

зования в окислительно-восстановительных реакциях соединений серы. Другими словами, на дне океана вблизи вулканических источников могла развиваться жизнь, не зависящая от энергии солнца. Археи делятся на две группы – кренархеоты и эвриархеоты.

Кренархеоты (от греч. Kren – ключ, источник, и arche – древний) обитают исключительно в горячих источниках на поверхности Земли и на дне океанов в зонах вулканической активности. В частности, местом их обитания являются расположенные на глубине тысяч метров так называемые «черные курильщики». Так их называют потому, что выделяющиеся из рифтовых зон сульфиды образуют в морской воде темные струи. Исследование глубоководных гидротермальных источников стало возможным после создания подводных минилодок и отбора проб из этих мест. Казалось, что они должны быть долинами смерти среди и так не слишком богатых жизнью морских глубин. Каково же было удивление ученых, обнаруживших в «черных курильщиках» обилие живых существ. Их поэтически стали называть райскими и розовыми садами. Благодаря высокому давлению, температура в «черных курильщиках» достигает 200–300⁰ градусов по Цельсию, но не кипит. Около таких источников живут экстремально термофильные археи. Они используют энергию, образующуюся в результате окисления водорода серой с образованием сероводорода или окисления элементарной серы кислородом. При этом среда их обитания является высококислотной (pH=1–6). Археи находятся здесь в симбиозе с моллюсками и недавно открытым новым типом животных – вестиментиферами. Последние интересны тем, что являются, если можно так сказать, аутотрофными животными. Они поглощают из среды кислород и сероводород, которыми снабжают своих симбионтов – архей. Археи используют указанные вещества для синтеза органических соединений и размножения. Вестиментиферы питаются археями, а часть их предусмотрительно оставляют для размножения и возобновления своего источника питания.

Эвриархеоты (от греч. Evry – повсюду) распространены на Земле повсю-

ду, в том числе их находят и в «черных курильщиках». К эвриархеотам относится большая группа метанообразующих архей. Только они способны к биологическому образованию метана! Его они образуют окислением водорода углекислотой в реакции $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 = \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$. В некоторых случаях в качестве окислителя они могут использовать муравьиную или уксусную кислоту. Метанообразующие археи находятся в осадках морей и пресных водоемов, болотах, почвах тундры и рисовых полей. Их находят также в составе кишечной флоры рубца жвачных. В небольшом количестве они обитают и в кишечнике человека. Они интенсивно синтезируют витамин B_{12} и снабжают им своих хозяев. Свойство этих архей образовывать метан используют в народном хозяйстве для утилизации отходов в так называемых метантенках. В них при высокой температуре без доступа кислорода идут процессы брожения с образованием водорода и углекислоты, которые используются археями для производства метана. Такие аппараты могут обеспечить газом небольшой поселок.

Другая группа архей, представляющая интерес, – это галофилы, способные к росту и размножению в насыщенных растворах соли (до 300 г/л), которые они окрашивают в красный цвет. Некоторые из них при этом предпочитают также щелочную среду с высоким значением pH. Галофилы – гетеротрофы, способные расти как в аэробных, так и анаэробных условиях. Для них характерна особая система фотосинтеза, основанная на свойствах не хлорофилла, а пигмента ретинальдегида из класса каротиноидов. Этот пигмент родственен родопсину, пигменту сетчатки человеческого глаза. В соединении с белком бактериопсином он пронизывает мембрану семью альфа-спиралями и работает как протонная помпа, создавая протонный потенциал для синтеза АТФ. О нем говорят: это белок, любящий соль и видящий солнце. Исследования этого пигмента показали, что у хлорофилла нет монополии на фотосинтез. При недостатке кислорода бактериопсин улавливает солнечные лучи и снабжает галофилы энергией. Как светочувствительный материал

бактериопсин может конкурировать с традиционными небиологическими материалами. На основе родопсиновых пленок сконструированы оптические системы памяти в устройствах для обработки информации, например для компьютеров. Возможно, в будущем его научатся использовать для изготовления живых протезов рецепторов глаза. При массовом размножении галофилы благодаря родопсину обуславливают красный цвет Мертвого моря. Галофилы живут в водоемах для выпаривания соли. Раньше красную соль, найденную в соляных озерах на юге России, как диковинку отправляли в Москву в Кремль.

Ацидофилы – это археи, обитающие в условиях повышенной кислотности, т. е. в таких растворах кислоты, которые попав на кожу, образуют ожоги, а на платье – дырки. К ацидофилам относятся живущие в кислом содержимом желудка человека *Helicobacter pylori*. Как недавно выяснилось, они играют этиологическую роль в развитии гастрита, язвенной болезни и рака желудка.

Экстремофильные археи представляют интерес с точки зрения использования их ферментов, работающих в экстремальных условиях. Галофильные археи *Thermus aquaticus* обладают ферментом *Taq*-полимеразой, которая используется в полимеразной цепной реакции на том ее этапе, который требует нагревания ДНК до 70 °С. Еще большее нагревание (до 100 °С) выдерживает ДНК-полимераза *Pyrococcus furiosus*, называемая *Pfu*-полимеразой. Ферменты экстремофилов используются также при производстве духов, окраске джинсовой ткани, производстве моющих средств и в других производственных процессах.

3.3. Цианобактерии

Цианобактерии – это большая группа прокариот, включающая более 2 000 видов. Им принадлежит особая роль в эволюции и существовании биосферы. Цианобактерии появились в биосфере на заре развития жизни на Зем-

ле. Осуществляя кислородный синтез, цианобактерии создали атмосферу, содержащую кислород, что определило в дальнейшем существование растений и животных.

Ботаники называют цианобактерии синезелеными водорослями и рассматривают их как таксон в системе низших растений. Это обусловлено наличием в их составе хлорофилла *a*, как у растений, и обитанием, в основном, в водной среде.

Цианобактерии существуют более 4 млрд лет. Они существовали в архее и большей части протерозоя. Об этом судят по палеонтологическим находкам продуктов жизнедеятельности цианобактерий – строматолитам. Строматолиты – это слоистые известняки, образовавшиеся в результате извлечения бактериями кальция из воды и откладывания кальцита в их слизистых капсулах. Нижние слои бактерий отмирали, образовывались новые и так до 200 м в высоту и многие километры в длину. Строматолиты находят в Австралии, на Урале, в Сибири. В настоящее время строматолиты образуют сообщества нитчатых цианобактерий, развивающихся в толстых пленках в условиях солоноводных мелководий, например на побережье Австралии.

Фототрофный тип питания является для цианобактерий основным, но не единственным. Они могут усваивать и имеющиеся в среде готовые органические вещества, т. е. становятся гетеротрофами. Среди цианобактерий много форм, способных к азотфиксации. Основным резервуаром азота для всех живых организмов является атмосфера. Однако ни растения, ни животные не могут усваивать азот воздуха. Такой способностью обладают только бактерии, некоторые водоросли и низшие грибы. Азотфиксация, т. е. превращение атомарного азота в NH_3 – аммиак, может происходить небиологическим и биологическим путем. Небиологический путь – это образование аммиака во время грозы, при разрядах молнии. Подобный химический метод используется в производстве аммиака, который получают из азота и водорода под давлением с участием катализатора. За это изобретение, позволившее сделать переворот в мировой азотной промышленности, Ф. Габеру и К.Бошу присуж-

дена Нобелевская премия. Эта технология и по сей день используется для получения минеральных азотных удобрений.

Биологический способ фиксации азота связан с активностью фермента нитрогеназы. Это сугубо восстановительный процесс, – в присутствии молекулярного кислорода нитрогеназа инактивируется. Но цианобактерии не только живут в присутствии кислорода, более того, они его образуют. Из этого следует, что в одной и той же клетке не могут идти и фотосинтез, и фиксация азота. Азотфиксация происходит в особых клетках, называемых гетероцистами. Они обладают дополнительными слоями оболочки, защищающей их от действия кислорода. В них экспрессируется ген нитрогеназы. Интересно, что его экспрессия определяется такими же перестройками в геноме, как в генах иммуноглобулинов человека. Фотосинтезирующие и азотфиксирующие клетки могут находиться в одном сообществе цианобактерий. При этом образующиеся в результате метаболизма вещества идут по специальным каналам. Необходимо отметить, что прокариоты – существа одноклеточные. Однако и в природных, и в лабораторных условиях они образуют сообщества, которые являются прообразами многоклеточных организмов. Среди отдельных представителей этих сообществ, как мы видим на примере цианобактерий, существует дифференциация функций. Колонии роевых бактерий состоят из двух типов клеток – длинных роящихся со жгутиками и коротких нероящихся без жгутиков. С помощью жгутиков они двигаются как единый организм. Наблюдая это явление Флеминг, открывший пенициллин, даже высказывался о существовании у них некоего прообраза нервной системы, по которой сигналы передаются всем членам сообщества. Поистине социальными существами являются также миксобактерии. Морфологически их сообщество напоминает цветущее дерево.

К сожалению, довольно многочисленные цианобактерии образуют токсины, губительные для человека и животных. Токсины – нейротоксины и гепатотоксины – образуются в основном планктонными формами цианобактерий. Известны случаи гибели людей, потреблявших воду во время «цвете-

ния» водоема, которое и представляет собой результат массового размножения цианобактерий.

Ризобактерии – это большая группа бактерий, способствующих улучшению роста и развития растений. К ним относятся почвенные бактерии псевдомонады (*Pseudomonas*). Их положительное влияние на растения связано с непосредственной стимуляцией роста растений за счет выработки индолил-3-уксусной кислоты – стимулятора роста корневой системы, улучшением фосфорного питания растений за счет гидролиза органических фосфатов бактериальными фосфатазами. Некоторые штаммы псевдомонад, обладая азотфиксирующей способностью, улучшают и питание растений азотом. Псевдомонады оказывают положительно опосредованное влияние на растения путем вытеснения и подавления развития почвенных фитопатогенов и организмов, угнетающих рост растений.

В общем, неоценимый вклад прокариот в эволюцию жизни на Земле и их участие в нашей повседневной жизни можно суммировать следующим образом:

1. Роль в геологических процессах – образование полезных ископаемых – железных руд, пирита, серы, графитов, карбонатов, нефти, газа и др.
2. Обеспечение плодородия почвы, образование гумуса.
3. Очистка сточных вод за счет разложения органических веществ.
4. Симбиоз с растениями, животными и грибами
5. Участие в промышленных процессах брожения – производство сыра, силоса, сбраживание сливок при изготовлении сливочного масла.
6. Производство антибиотиков.
7. бактерии как продуценты ферментов, гормонов и др. веществ в генной инженерии.
8. Биологический контроль размножения насекомых (например, *B. Thuringiensis*).
9. Стимуляция роста растений за счет усиления поступления в расте-

ния фосфора, фиксации азота, индукции устойчивости к заболеваниям за счет синтеза антибиотиков и цианистого водорода, антагонизма с почвенными патогенными бактериями и т. д.

10. Использование для биodeградации вредных ксенобиотиков – полихлорбифенолов, бензантрацена
11. Трансгенез в биотехнологии растений с помощью агробактерий

3.4. Эндосимбиотическая теория происхождения эукариот

Если бы не возникли эукариоты, прокариоты, благодаря их великолепной способности к эволюции и адаптации, одни представляли бы жизнь на Земле. Однако в настоящее время она в основном представлена сложными многоклеточными организмами, состоящими из эукариотических клеток. Естественным является вопрос, как возникли эукариоты?

Наиболее популярной и достаточно обоснованной гипотезой на этот счет является эндосимбиотическая гипотеза, основанная на идее многократного эндосимбиоза прокариот, приведшего к возникновению эукариот.

Предполагают, что первичные клетки были анаэробными гетеротрофными прокариотами. Питались они абиогенно синтезированными органическими веществами. Поэтому они должны были довольно быстро обеднить среду обитания необходимой им пищей. Выход из этого положения мог быть достигнут двумя путями: 1) возникновения питания за счет неорганических веществ – углерода (CO_2) и азота (N_2), имевшихся в атмосфере и 2) за счет поедания себе подобных.

Чтобы осуществить первый путь развития, прокариоты должны были приобрести способность улавливать химическую и солнечную энергию. Сейчас эти процессы получили наибольшее развитие в виде хемосинтеза и фотосинтеза. Большинство ученых предполагает, что первыми хемосинтезирующими прокариотами были предки современных хемосинтезирующих прока-

риот, а фотосинтезирующими – предки современных цианобактерий. Возможно, что эти механизмы мало изменились с тех пор и в настоящее время эти прокариоты являются поставщиками органических соединений, которые они синтезируют из CO_2 и N_2 .

Считается, что примитивные фотосинтезирующие анаэробные прокариоты кардинально изменили состав земной атмосферы – из лишенной кислорода смеси газов она превратилась в атмосферу, содержащую 21 % кислорода. Появление в атмосфере кислорода имело решающее значение для дальнейшего развития жизни на Земле. Однако анаэробные прокариоты вынуждены были найти для своего выживания бескислородные ниши или адаптироваться к кислороду за счет утилизации его для более эффективного окисления пищевых веществ. Так могли возникнуть аэробные организмы. Их преимущество состояло в том, что они могли более полно окислять органические соединения, прежде всего углеводы до H_2O и CO_2 . При этом получалось и аккумулировалось в виде фосфатных соединений много энергии. Мы и сейчас наблюдаем, что анаэробы при окислении 1 молекулы глюкозы до молочной кислоты (процесс гликолиза) образуют 2 молекулы АТФ, а аэробы окисляют глюкозу до образования H_2O и CO_2 и 38 молекул АТФ.

Как уже говорилось, был возможен и второй путь развития, когда прокариоты могли выжить, поедая друг друга. При этом анаэробные прокариоты могли не утилизировать часть аэробных в качестве пищи, а вступать с ними в симбиоз, в результате чего возникли эукариоты. При этом аэробные эндосимбионты, способные к дыханию кислородом и утратившие способность к фотосинтезу, стали митохондриями – энергитическими станциями эукариотической клетки. Другие эндосимбионты, потомки цианобактерий, способные к фотосинтезу, превратились в хлоропласты эукариотических организмов – растений. В борьбе за выживание такой эндосимбиоз, очевидно, был замечательным выходом.

Впервые идея о роли симбиоза в эволюции жизни была высказана рус-

скими учеными. В 1867 г. А. С. Фаминцин утверждал в своих публикациях, что лишайники – это взаимовыгодная ассоциация грибов и водорослей и что хлоропласты – это одноклеточные водоросли и симбионты растений. Идея была поддержана К. С. Мережковским и Б. М. Козо-Полянским в 20 гг. Однако мировой научной общественностью эта гипотеза расценивалась не более чем экстравагантная. Вспомнили о ней в 60-х гг., когда ученые показали, что ДНК митохондрий и хлоропластов отличается от эукариотической ДНК и очень сходна с бактериальной. Далее Лин Маргелис выявила большую структурную близость жгутиков и некоторых элементов цитоскелета эукариотических клеток с бактериями спирохетами. В последующем были получены и другие доказательства эндосимбиотического происхождения эукариот, главные из них связаны с тем, что митохондрии и хлоропласты по ряду биологических признаков близки к прокариотам :

1. Наличие в митохондриях и пластидах независимой от ядра генетической системы, сходной с прокариотической. В митохондриях кольцевая двунитевая ДНК (у некоторых простейших линейная ДНК), в пластидах более сложные структуры ДНК, состоящие из линейных и кольцевых фрагментов.

2. Ни митохондрии, ни хлоропласты не синтезируются в клетках эукариот, т. е. не образуются *de novo*, а размножаются бинарным делением, как прокариоты.

3. В митохондриях присутствует собственный белоксинтезирующий аппарат.

4. Рибосомная РНК и рибосомы из митохондрий и хлоропластов совершенно не похожи на эукариотические, но почти идентичны таковым из некоторых цианобактерий.

5. Во внутренней мембране митохондрий находится специфический фосфолипид – кардиолипид, характерный только для мембран бактерий и полностью отсутствующий в мембранах эукариот.

6. Среди ныне живущих эукариотических организмов есть такие, которые используют прокариот-симбионтов для своей жизнедеятельности (инфу-

зории с симбионтами – метанообразующими археями, вестиментиферы, своего рода аутотрофные организмы, питающиеся за счет симбиоза с археями, некоторые растения содержат в клетках цианеллы, сходные с цианобактериями и выполняющие функции хлоропластов и др.).

Таким образом, приобретя в результате эндосимбиоза митохондрии, будущие эукариотические клетки получили колоссальное преимущество – сильно повысили свою энергообеспеченность. Те клетки, которые кроме митохондрий приобрели еще и хлоропласты, получили способность к автотрофии, т. е. стали растениями. Какую же выгоду получили прокариоты-эндосимбионты, которые будучи свободно живущими обладали способностью к дыханию и фотосинтезу? Во-первых, они нашли новую и неплохую нишу для проживания. Во-вторых, клеточная мембрана освободилась от тех обязательных функций, которые она выполняла у прокариот (фотосинтез, фосфорилирование, синтез АТФ др.) и стала выполнять множество других функций (эндо- и экзоцитоз, межклеточные взаимодействия).

Возможность межклеточных взаимосвязей определило возникновение многоклеточных организмов. Мы наблюдаем результат этого симбиоза. Эукариоты характеризуются более сложным морфологическим строением. В основном они обеспечивают биоразнообразие на Земле, а биохимически, если исключить митохондрии и хлоропласты, они гораздо более просты, чем прокариоты. Получается, что сложнейшие механизмы клеточного дыхания, фотосинтеза, фиксации углекислоты и азота сложились у прокариот, в то время как эукариоты остались на уровне анаэробных сбраживателей. Не выяснен до сих пор вопрос о природе непосредственных предшественников эукариот. Все-таки прокариоты – это очень маленькие клетки, эукариоты в тысячу раз больше. Эту трудность сторонники эндосимбиотической теории объясняют предположением о многократности симбиоза разных прокариот или предположением о слиянии проэукариота – клетки, способной к фагоцитозу, с прокариотами. Наличие способности к фагоцитозу у проэукариотической клетки обусловило утрату клеточной стенки, но появление необходи-

мого для этого процесса цитоскелета и подвижной цитоплазмы. Вслед за этим возникла необходимость изолировать ДНК от подвижной цитоплазмы, так, предполагают, появилось клеточное ядро.

ГЛАВА 4. ВАЖНЕЙШИЕ БИОПОЛИМЕРЫ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ – БЕЛКИ И НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

4. 1. Белки. Структура и функции

Основу живого вещества составляют биополимеры – органические молекулы, состоящие из большого числа мономеров, соединенных в цепи ковалентными связями. К биополимерам относятся белки, нуклеиновые кислоты и углеводы. Эта глава посвящена описанию структуры и функций белков и нуклеиновых кислот, биополимеров, которые составляют основу жизни на Земле. Только белки и нуклеиновые кислоты синтезируются матричным способом.

Что бы ни происходило в клетке, в отдельных частях и органах многоклеточного организма, все это связано с работой, которую осуществляют белковые молекулы. Белки, или протеины, составляют более половины сухого вещества клетки. Действие генов управляется белками, которые специфически связываются с определенными участками ДНК. Белки с невероятной точностью распознают и взаимодействуют с другими молекулами. Белки-ферменты, связываясь с субстратами, регулируют скорость протекания био-

химических реакций. Белок-белковые взаимодействия обеспечивают работу мышц, гормональный контроль синтетических процессов, генерацию нервных импульсов, развитие иммунологических реакций и многое другое.

Белки – это высокомолекулярные соединения с молекулярной массой от 5 000 до нескольких миллионов Дальтон. Мономерами белков являются аминокислоты, органические соединения, включающие кислотную COOH группу и аминогруппу – H_2N при единственном атоме углерода. Одна из связей углерода несет водород – H , а другая занята боковым радикалом R . Каждая из аминокислот, за исключением пролина, может быть изображена формулой



I

В зависимости от положения аминогруппы в углеродной цепи по отношению к карбоксилу различают б, в, г, д – аминокислоты. В живых организмах встречается более 170 аминокислот, однако в состав белков входит только 19 б-аминокислот и одна иминокислота – пролин. Ф. Крик назвал их «магической двадцаткой». Они зашифрованы генетическим кодом и неоднократно повторяются в белках бактериального, растительного и животного происхождения. Здесь необходимо добавить, что недавно обнаружены еще две аминокислоты селеноцистеин и пирролизин, которые тоже закодированы в ДНК, хотя и несколько иным способом.

Различия между аминокислотами касаются как раз боковых групп, или радикалов – R . У пролина боковой радикал замкнут в кольцо на аминогруппу. Строго говоря, пролин не аминокислота, а иминокислота. Находясь в полипептидной цепи, пролин резко изгибает ее и тем самым придает ей особые свойства.

Боковые группы аминокислот различаются по своей химической структуре и свойствам. Именно они определяют физико-химические особенности

аминокислот и взаимодействия аминокислотных остатков в полипептиде.

В зависимости от свойств боковых цепей аминокислоты делятся на гидрофобные, гидрофильные, заряженные и незаряженные. Основные и кислотные. Среди гидрофильных аминокислот есть заряженные и незаряженные. Лизин, аргинин, гистидин, тирозин, аспарагиновая и глутаминовая кислота в зависимости от pH среды могут нести заряд. При нейтральных pH аспарагин, тирозин и глутамин имеют отрицательный заряд, лизин, аргинин и гистидин – положительный. Как правило, эти остатки располагаются на поверхности белковой молекулы и могут образовывать водородные связи и солевые мостики. Четыре аминокислоты имеют полярные неионные боковые группы – аспарагин, глицин, серин, серин и треонин. Эти аминокислоты располагаются, как правило, в активных центрах белков и также могут образовывать водородные связи.

Восемь гидрофобных аминокислот имеют алифатические (аланин, валин, лейцин, изолейцин и метионин)

или ароматические неполярные боковые группы (триптофан и фенилаланин, цистеин). Как правило, они располагаются внутри белковой глобулы и экранированы от воды. Гидрофобные взаимодействия между этими группами стабилизируют белковую глобулу. Особыми свойствами характеризуется цистеин, который может образовывать ковалентную дисульфидную связь. Об аминокислоте пролине сказано выше. Она обеспечивает "жесткий излом" полипептидной цепи.

Аминокислоты существуют в виде двух оптических изомеров – D и L, т. е. правовращающих и левовращающих (по отклонению поляризованного света). Однако белки состоят, за небольшим исключением, только из левовращающих аминокислот. Здесь уместно заметить, что сахара, в отличие от белков, состоят из D-изомеров. Этот феномен называется феноменом хиральной чистоты. От греч. *χειρὼν* – руки. В состав природных белков входят только L-аминокислоты, а в состав нуклеиновых кислот – только D-сахара (пентозы). Функционирование белков возможно только при наличии опреде-

ленной пространственной конформации, а, значит, и определенного направления химических связей. Зеркальные же изомеры веществ идентичны по химическим свойствам, однако отличаются пространственным расположением химических связей. Поэтому из рацемической смеси L- и D-аминокислот невозможно синтезировать биологически активные белки. То же самое характерно и для нуклеиновых кислот. Известно, что из указанной смеси возможно синтезировать короткие олигонуклеотиды длиной не более 3-4 мономеров. И только. Включение разных зеркальных изомеров делает невозможным матричный синтез. Хиральная чистота создает дополнительные сложности в проблеме возникновения жизни. Ведь абиогенный синтез органических веществ неизбежно приводит к получению рацемической смеси оптических изомеров. Идентичность химических свойств зеркальных изомеров делает возможным их разделение только с помощью живых организмов – бактерий или грибов

Человек и животные синтезируют аминокислоты (заменимые) из безазотистых продуктов обмена и аммонийного азота. Незаменимые аминокислоты должны поступать в организм с пищей. Для человека 10 аминокислот являются незаменимыми: аргинин, валин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин. Аминокислота тирозин образуется из фенилаланина и при недостатке последнего тоже оказывается незаменимой.

Аминокислоты соединяются в белке по типу голова-хвост пептидной связью – CO–NH с вытеснением воды. Такая структура носит название полипептида. Если в цепи не более 15 аминокислотных остатков, принято называть ее олигопептидом или пептидом, если больше – белком. Самый большой среди белков – структурный белок, компонент поперечно-полосатых мышц *титин*. Его длина в момент синтеза одной полипептидной цепью составляет 34350 аминокислотных остатков, затем он созревает и из него вырезается участок, после чего остается 26926 аминокислотных остатков.

Порядок расположения аминокислот в полипептиде называется амина-

кислотной последовательностью, или первичной структурой белка. Эта структура очень гибкая, поэтому белковая молекула, в принципе, может принимать бесконечно большое число различных пространственных форм – конформаций. Однако большинство полипептидных цепей существует лишь в одной необходимой для функционирования конформации. Это обусловлено тем, что боковые группы аминокислот взаимодействуют друг с другом и с водой с образованием слабых нековалентных связей.

Единой классификации белков нет. По форме различают фибриллярные и глобулярные белки, по функции – структурные, каталитические, транспортные, регуляторные, защитные и т. д. Простые белки – протеины – состоят из одних аминокислот, сложные – протеиды – имеют в своем составе кроме аминокислот углеводы (гликопротеины), липиды (липопротеины), нуклеиновые кислоты (нуклеопротеиды), металлы (металлопротеиды).



Рис. 5. Конформационная структура белка

Сразу после трансляции мРНК полипептиды представляют собой неразветвленные одноцепочечные полимеры, но в клетке они претерпевают сложный процесс укладки цепи в трехмерные структуры, образующие нативную белковую молекулу. В свою очередь эти молекулы могут объединяться друг с другом, образуя *мультимерные комплексы*. В случае объединения двух одинаковых молекул – *субъединиц*, образуется *гомомимер*, двух разных – *гетеродимер*, при трех и более субъединиц обычно говорят о *мультимерах*. Хотя конформация каждого белка уникальна, несколько способов укладки постоянно присутствует в разных молекулах. Они называются α -спиралями и β -складками. α -Спираль образуется при закручивании полипептидной цепи вокруг оси с образованием жесткого цилиндра, в котором каждая пептидная группа связывается водородными связями с другими такими же группами. Антипараллельный β -слой образуется в результате многократного изгибания полипептидной цепи на 180° так, что пласты располагаются антипараллельно. α -Спирали и β -слои представляют вторичную структуру белка (рис. 5). Некоторые комбинации α -спиралей и β -слоев, упакованные вместе, формируют компактно уложенные глобулярные единицы – домены. Это третичная конформация белка. Она целиком определяется взаимодействием радикалов аминокислотных остатков. Взаимодействия эти различны. Между цистеина-

ми возникают ковалентные *дисульфидные связи* (-S-S-). Это единственные ковалентные связи, стабилизирующие конформацию белка. Неполарные аминокислотные остатки стремятся соединиться, вытеснив ненавистную для них воду (гидрофобные взаимодействия); при сворачивании полипептидной цепи они уходят внутрь глобулы, где защищены экраном из гидрофильных аминокислот от доступа воды. Между разноименно заряженными радикальными группами образуются электростатические связи, так называемые *солевые мостики*. Несколько отдельных третичных структур – доменов, соединенных линкерами, могут находиться на одном пептиде. При этом каждый из доменов обладает некоторой автономией и при отделении от целой молекулы выполняет свою функцию. На этом основан метод получения одноцепочечных иммуноглобулинов, состоящих только из переменных доменов тяжелой и легкой полипептидных цепей. Как и в полной молекуле иммуноглобулина, они обладают антиген-связывающей активностью.

В случае, если несколько полипептидных цепей в виде доменов образуют комплекс и функционируют как единое целое, конформация называется четвертичной. Так гемоглобин состоит из двух альфа- и двух бета-полипептидных цепей и только в таком составе, еще и в комплексе с гемом, выполняет свою функцию. Белки, обслуживающие матричные и энергетические синтезы в клетке состоят из большого множества полипептидных цепей.

Белки могут образовывать также супрамолекулярные структуры для выполнения сложных функций.

Говоря о белках, невозможно не упомянуть о пептидах. Пептиды – это маленькие структуры, состоящие из небольшого числа аминокислотных остатков, (2–10), соединенных, как и в белках, пептидной связью. Они могут быть закодированы в определенных генах или получаться при расщеплении белков. Пептиды часто имеют линейную структуру, но могут образовывать и циклы.

Пептиды часто выступают в роли эндогенных регуляторов в иммунной и нейроэндокринной системе. Например, пептидами являются эндогенные опиоиды. Открыты они в начале 70-х гг. XX в., после установления в мозге рецепторов к морфину, наркотическому веществу, которое с древних времен применяли люди, чтобы снять напряжение, уйти от тревожащих их проблем. Оказалось, что в организме синтезируются вещества, взаимодействующие с этими рецепторами. Их называли опиоидами. Взаимодействуя с рецепторами, эти вещества включают систему награды. Именно опиоидам – эндорфинам и энкефалинам обязаны мы многими приятными ощущениями, которые испытывает человек, достигнув успеха в спорте, бизнесе, в науке, а также при удовлетворении чувства голода и жажды и т. д. Чувство радости также обусловлено их действием. Пептидами являются многие биологически активные вещества – пептидные антибиотики, гормоны: вазопрессин, глюкагон и др. В функционировании системы врожденного и приобретенного иммунитета большую роль играют дефензины – короткие пептиды, обогащенные остатками цистеина. Между остатками цистеина образуются внутримолекулярные ковалентные дисульфидные связи. Дефензины секретируются клетками лимфоидной ткани и большинством эпителиальных клеток, создающих барьеры для инфекционных агентов. В настоящее время искусственным путем получены природные пептиды и их аналоги, которые используют в качестве лекарственных биопрепаратов.

Функции белков чрезвычайно разнообразны. Сгруппировать их можно следующим образом.

1. Структурная функция. Структурную функцию выполняют многие белки. Белки, выполняющие скелетные функции, участвуют в образовании как внутриклеточного скелета, так и внеклеточных покровных и механических структур. Скелетные белки образуют прочные фибриллярные (коллаген) или слоистые (кератин) структуры. Полипептидная цепь каротина, составляющего структурную основу волос, ногтей, копыт и т. п., свернута в правую альфа-

спираль, затем две таких молекулы закручены вместе в левую спираль, а эти суперспирали соединены еще попарно, образуя протофибриллу, а 8 протофибрилл образуют конечную конформацию молекулы. Отсюда и прочность. В фибриллярном коллагене три полипептидные цепи скручены друг вокруг друга и стабилизированы водородными связями. У бактерий структурный белок муреин образует клеточную стенку, а хитин формирует покровы грибов и внешний скелет членистоногих.

2. Ферментативная функция. Это одна из главнейших функций белков. Наряду с сигнально-регуляторной функцией, она осуществляется глобулярными растворимыми белками. Выполняя эту функцию, белки выступают в роли биологических катализаторов, ускорителей реакций. После образования ферментсубстратного комплекса, субстрат, под действием активного центра фермента, подвергается химическому воздействию, затем ферментсубстратный комплекс диссоциирует на фермент и продукт. Катализ реакций может осуществляться в несколько стадий и включать связывание с субстратом, образование интермедиатов, продуктов и переходных состояний на протяжении пути реакции. Ускорение реакции ферментом очень существенно. Так, одна молекула фермента бактерий уреазы расщепляет 30 000 молекул мочевины на углекислый газ и аммиак за одну секунду. Кстати, по этому ферменту диагностируют зараженность бактерией *Helicobacter pilory*, которая вызывает у человека гастрит, язвенную болезнь и рак желудка. С многими примерами ферментативной деятельности белков мы будем встречаться при описании матричных синтезов в клетке.

3. Сигнальная функция обеспечиваются в основном растворимыми глобулярными белками. Белки, выполняющие ее, могут находиться как на поверхности, так и внутри клеток. Все межклеточные взаимодействия осуществляются путем лиганд-рецепторных взаимодействий, в которых белки выполняют функции и лиганда, и рецептора. В отличие от ферментсубстратного комплекса в данном случае при распадении комплекса

молекулы, его образующие остаются интактными, возвращаясь к исходной конформации. После такого взаимодействия сигнал передается в определенные клеточные структуры и тоже не без участия белков.

4. Направленное движение. Любые движения в организме осуществляются белками, которые способны резко менять свою конформацию пассивно – при приложении внешних сил или активно – за счет утилизации энергии АТФ - и тем самым существенно менять геометрические параметры третичной или четвертичной структуры. Среди белков, способных к активному сокращению, главными являются пары актин-миозин и тубулин-динин, обеспечивающие все разнообразие движений эукариот. Актин и миозин образуют мышечные ткани. В интерактивной иллюстрации вы можете видеть, как изменяя конформацию, двигаются актин и миозин, вызывая сокращение мышцы. Тубулин-дининовые микротрубочки играют важную роль в делении клетки, образуя нити веретена деления, обеспечивают направленный транспорт клеточных везикул и движение самой клетки, путем биения жгутиков и ресничек.

5. Белки обеспечивают транспорт веществ через мембрану. Транспортную функцию выполняют многие белки – белки-транспортеры и белки, образующие трансмембранные каналы. В эукариотических клетках белки, пронизывающие клеточную мембрану, осуществляют избирательное поступление в клетку одних веществ и выкачивание других. Так, К-На насос, или АТФ-аза закачивает в клетку против градиента концентрации К и выкачивает Na. АТФ-синтеза работает в мембране митохондрий как помпа протонов, в результате фосфорилируется АДФ с образованием АТФ.

6. Защитная функция в организме осуществляется различными белками. Обычно приводят пример с иммуноглобулинами, но масса других белков выполняют защитную функцию – белки системы комплемента, перфорины, дефензины и др.

7. Регуляторная функция осуществляется белками гормонами (ин-

сулин, вазопресин), медиаторами (цитокины, ацетилхолин), белковыми факторами, регулирующими матричные синтезы (репликация, транскрипция, трансляция).

8. Питательная функция. В качестве энергетического резерва организм использует белки только в крайних случаях, например при сильном истощении. Но у млекопитающих белки материнского молока (казеин) являются источником питания новорожденного.

Другие не менее важные функции белков будут освещены далее при описании процессов матричных синтезов.

4. 2. Структура нуклеиновых кислот

Несмотря на то, что нуклеиновые кислоты были открыты более 100 лет назад, их фундаментальная роль как носителей наследственной информации была выяснена лишь в середине XX в. Этому предшествовали важнейшие открытия молекулярной биологии. Авторы многих из них награждены Нобелевской премией:

А. Тодд (1957) за исследование нуклеотидов и нуклеозидов в составе ДНК и РНК;

Дж. Ледерберг (1958) за структуру генетического материала бактерий и рекомбинацию у них;

А. Корнберг (1959) за открытие механизмов биосинтеза ДНК;

С. Очоа (1959) за открытие механизма синтеза РНК;

Ф. Крик, Дж. Уотсон, М. Уилкинс (1962) за открытие структуры ДНК;

Р.Холли, Х. Корана, М. Ниренберг (1968) за расшифровку генетического кода;

А. Д. Херши (1969) за открытие генетической структуры вирусов;

Дж.Галл, М. Пардью (1969) за разработку метода гибридизации ДНК *in situ*;

В. Арбер, Д. Натанс, Х. Смит (1978) за открытие ферментов рестрикции;

П. Берг, У. Гилберт, Ф. Сэнгер (1980) за разработку технологии реком-

бинантных ДНК;

Б. Мак-Клинток (1983) за открытие мобильных элементов;

К. Б. Мюллис (1993) за разработку полимеразной цепной реакции;

Ф. Шарп, П. Робертс (1993) за открытие мозаичной структуры генов эукариот.

К настоящему времени достигнуты колоссальные успехи в расшифровке молекулярно-генетических процессов и накоплена масса экспериментальных данных. Описание сложнейшей функции генов и геномов, генных сетей, путей передачи сигнала в клетке, основных молекулярно-генетических процессов – репликации, транскрипции, трансляции, регуляции экспрессии генов стало возможным благодаря разработке компьютерных технологий автоматической обработки данных. Этим занимается наука биоинформатика, которая создает базы и банки данных для общего пользования, разрабатывает новые математические методы и алгоритмы для анализа информации, на основе которых становится возможным моделирование молекулярно-генетических процессов.

Нуклеиновые кислоты представляют собой нерегулярные полимеры, имеющие различную длину, обладающие разными свойствами и выполняющие в клетке разные функции. К нуклеиновым кислотам относят дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), а также несколько типов рибонуклеиновой кислоты (РНК) – матричную (мРНК), транспортную (тРНК), рибосомную (рРНК) и др.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) впервые была выделена из ядер клеток. Поэтому она и названа нуклеиновой (от греч. Nucleus – ядро). ДНК представляет собой полинуклеотид, состоящий из нуклеотидов. Нуклеотид состоит из остатка фосфорной кислоты, сахара и азотистого основания (рис. 6). Фосфорная кислота придает ДНК кислотные свойства. Сахар в ДНК представлен 2-дезоксид-Д-рибозой, образуя пятичленный цикл. В составе ДНК встречаются 4 азотистых основания: пуриновые – аденин и гуанин, и пиримидиновые – тимин и цитозин. В сокращенном виде они называются А, Г, Т,

Ц соответственно. Нумерация атомов в основаниях записывается внутри цикла. В отличие от этого, нумерация атомов сахара записывается вне цикла и со значком «штрих».

Нуклеотиды – не только мономеры нуклеиновых кислот. У некоторых из них есть и самостоятельные функции.

Так, аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) является носителем химической энергии в его легкогидролизуемой фосфоангидридной связи. Каждая клетка поддерживает быстрый кругооборот АТФ, включающий его гидролиз и ресинтез. Яд цианид вызывает мгновенную смерть, блокируя внутриклеточный ресинтез АТФ, в результате чего энергопотребляющие процессы останавливаются, как только резерв АТФ исчерпан. В энергетических системах клеток (у эукариот это митохондрии) в процессах синтеза АТФ участвуют знаменитые динуклеотиды НАД⁺ (никотинамидадениндинуклеотид) и ФАД (флавинадениндинуклеотид) являются переносчиками электронов, а ацетил-кофермент А – переносчиком ацильных остатков в цикле Кребса. В передаче сигналов в клетке участвует циклический аденозинмонофосфат (сАМФ). Во всех перечисленных моно- и динуклеотидах сахар представлен рибозой, а азотистое основание – аденином.

При образовании нуклеотида первый атом углерода дезоксирибозы связывается гликозидной связью с атомом азота в положении 1 пиримидинового или 9 – пуринового основания. Соединение, состоящее из основания и углевода, называется нуклеозидом (в ДНК – дезоксинуклеозидом), например дезоксигуанозин, дезоксиаденозин и т. д. На 5' конце дезоксирибозы присоединяется остаток фосфорной кислоты. Поэтому нуклеотиды в полном составе – это 5'-фосфонуклеотиды.

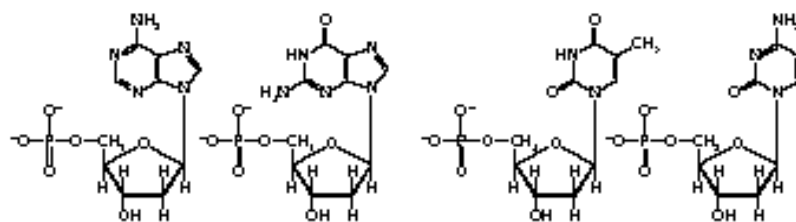


Рис. 6. Химическая структура нуклеотидов (по порядку А, Г- пуриновые, Т, Ц – пиримидиновые).

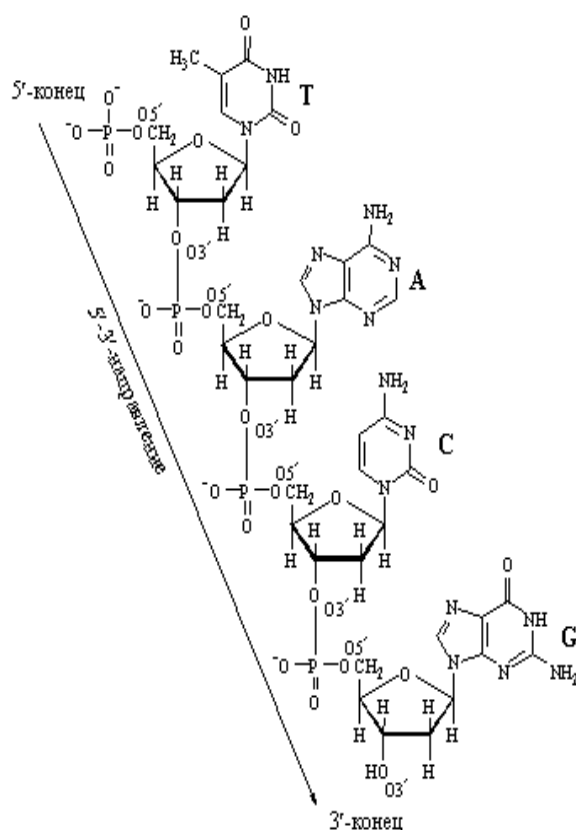


Рис. 7. Полинуклеотидная цепь ДНК

Цепь нуклеотидов образуется ковалентным соединением фосфорного остатка у 5' углеродного атома дезоксирибозы одного нуклеотида с гидроксильной группой С3' атома другого нуклеотида (рис.7). В результате получается сахаро-фосфатный остов ДНК с присоединенными к нему азотистыми

основаниями. На одном конце линейной молекулы ДНК при таком соединении нуклеотидов оказывается ОН-группа С3' атома дезоксирибозы – это 3' *конец*, а на другом - остаток фосфорной кислоты у 5' атома дезоксирибозы – это 5' *конец*. Описанная структура ДНК называется *первичной*.

ДНК почти всегда существует в виде двойной спирали, исключение составляют ДНК некоторых вирусов. В этих случаях для обеспечения термодинамической стабильности молекулы образуется сложная суперскрученная структура ДНК.

Модель уникальной вторичной структуры ДНК в виде регулярной двойной спирали была предложена в 1953 г. биологом Джемсом Уотсоном и физиком Френсисом Криком, опубликовавшими в журнале «Nature» письмо редактору, в котором они описали модель ДНК как полимера, состоящего из двух комплементарных нитей, каждая из которых состоит из мономеров – нуклеотидов. Нуклеотиды образуют две цепи, которые правозакручены одна вокруг другой и вместе – вокруг общей оси. В самой структуре такой двойной спирали заложен принцип самоудвоения (репликации) молекулы ДНК. Честь открытия вторичной структуры ДНК Д. Уотсон и Ф. Крик разделили с рентгенографами М. Уилкинсом и Р. Франклином, которые получили рентгеноструктурное изображение двойной спирали ДНК. За это открытие в 1962 году Джеймс Уотсон, Френсис Крик и Морис Уилкинс получили Нобелевскую премию. Розалинда Франклин, к сожалению, не дожидая до получения заслуженной награды.

Дальнейшие исследования показали, что модель вторичной структуры ДНК, представленная Уотсоном и Криком, верна. Обе цепи вместе удерживает комплементарность пар азотистых оснований. Между комплементарными основаниями А–Т и Г–Ц, которые называются парами Уотсона и Крика (рис.8), спонтанно образуются водородные связи. Между А и Т образуется две водородных связи, а между Г и Ц – три. Кроме этого возможно образование и других пар, например, в неуниверсальных вторичных структурах ДНК или РНК, в транспортных РНК. Но квантовомеханические расчеты показы-

вают, что Уотсон-Криковские пары наиболее энергетически оптимальны. Пара оснований всегда содержит одно пуриновое азотистое основание и одно – пиримидиновое. Так что пары комплементарных нуклеотидов имеют одинаковый размер.

Водородные связи слабые, они легко рвутся. Например, при повышении температуры до 95° происходит плавление ДНК, т. е. отделение цепей друг от друга за счет разрыва водородных связей. Однако при охлаждении водородные связи вновь образуются и двухспиральная структура ДНК восстанавливается. Этот процесс называется ренатурацией ДНК.

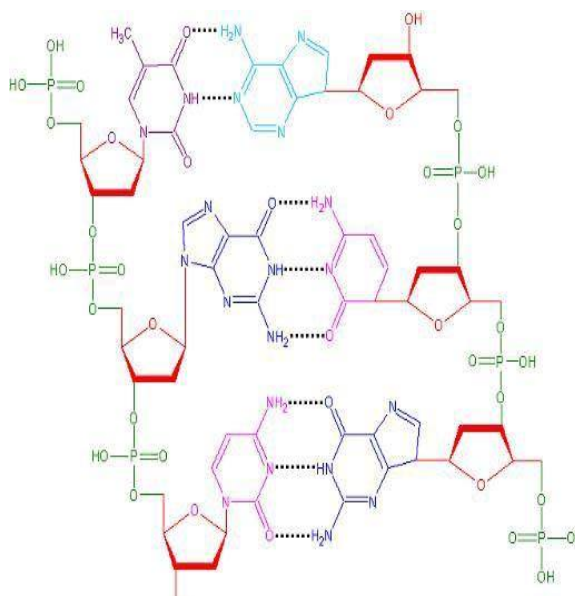
Вследствие комплементарности оснований в одной молекуле ДНК количество Г равно С, а количество А – количеству Т. Это так называемое правило Чаргаффа было открыто незадолго до создания модели двойной спирали ДНК. Уотсон и Крик воспользовались им. Естественно, что разные ДНК различаются по количеству пар А–Т и Г–Ц. В ДНК половой клетки человека 3,2 млрд пар нуклеотидов.

Из описанной структуры ДНК следует, что две цепи ДНК можно представить в виде лестницы, в которой сахаро-фосфатные остовы удерживают обращенные внутрь спаренные основания – ступени.

Поскольку азотистые основания ДНК гидрофобны, они в структуре ДНК должны быть уложены так, чтобы исключить их контакт с водой. Это как раз и достигается сближением оснований и укладкой их в спираль, в которой гидрофильные сахаро-фосфатные группы оказываются снаружи, а гидрофобные основания – внутри. Спираль правозакрученная и имеет большой и малый желобки (рис. 9). Часть каждого основания « видна » как из большой, так и из малой бороздки, поэтому они доступны для взаимодействия с другими молекулами. В бороздках к ДНК присоединяются белки, регулирующие процессы репликации, транскрипции и регуляции генной активности. Описанная конформация ДНК называется В-формой. Однако это не единственно возможная конформация ДНК. Например, при дегидратации ДНК приобретает форму А, а именно более сплюсненную форму с большим наклоном осно-

ваний относительно оси. Известно, что А-форма характерна для спор бактерий. Наиболее распространена *in vivo* В-форма ДНК. Одному шагу спирали соответствует одна комплементарная пара оснований. Для В-формы ДНК на один виток спирали приходится в среднем 10.5 пар оснований; поперечный размер спирали составляет 19 Е А-форма, характеризуется 11-12 п.о. на виток и поперечным размером 23 Е .

Возможна и Z-форма ДНК, когда обе цепи закручены влево. Есть предположение, что А- и Z-формы могут образовываться на коротких участках ДНК и обеспечивать регуляцию ее функции



8Образование комплементарных пар А-Т и Г-Ц при соединении анти-параллельных нитей ДНК

Рис.9. Правозакрученная спираль ДНК с большими и малыми бороздками.

Цепи ДНК антипараллельны, т. е. 3'ОН-концу одной цепи соответствует 5'ОН-конец комплементарной цепи. Например, последовательность нуклеотидов в небольшом фрагменте ДНК должна быть записана так:

5'ГАТГТА3'

3'ЦТАЦАТ5'

Чаще всего пишут последовательность только одной цепи, подразумевая, что вторая комплементарна первой. При этом можно даже не обозначать концы молекулы, если условиться, что всегда последовательность оснований записывается с 5'-конца. Поэтому последовательность нуклеотидов в приведенном выше фрагменте можно изобразить как ГАТЦТА.

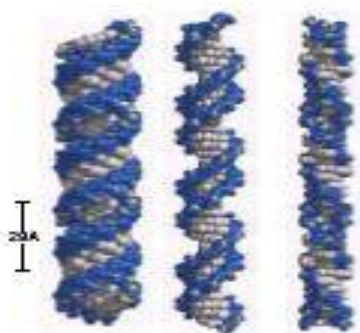


Рис.10. Изображение В, А и Z форм ДНК

В клетках ДНК упакована посредством взаимодействия с белками (рис. 11). Наиболее сложно ДНК упакована в ядрах эукариотических клетках. В

ядре каждой соматической клетки человека содержится 23 пары хромосом, длина всех 46 молекул ДНК в одной клетке равна около 2 м. Такого размера ДНК должна уместиться в ядре размером не более 10 мкм. Естественно, что ДНК должна быть в значительной степени компактизована, чтобы поместиться в хромосомах ядра.

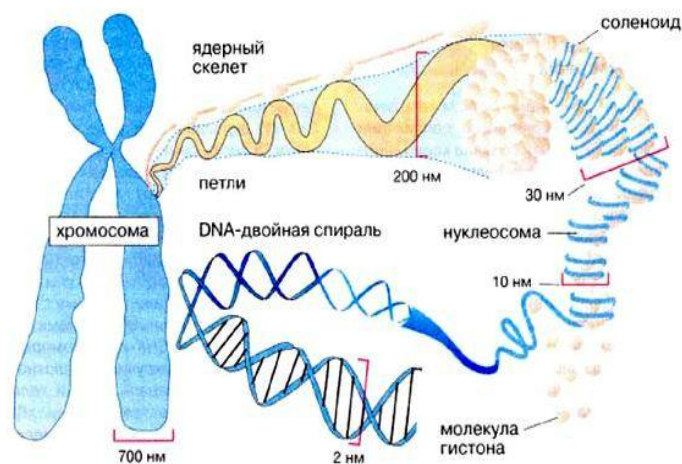


Рис. 11. Уровни упаковки ДНК в клетке

Комплекс ДНК с белками называется хроматином. Белки, в основном, представлены гистонами, которые благодаря своему положительному заряду образуют ионные связи с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК.

Первый уровень упаковки ДНК – нуклеосомный. Нуклеосома состоит из белкового октамера гистонов, обогащенных остатками основных аминокислот – лизина и аргинина. В нуклеосоме по два димера гистонов – H2A, H2B, H3 и H4, вокруг них ДНК делает 1,75 оборота (до 200 п.н.). Непосредственно с гистоновым октамером связаны 146 пар нуклеотидов, а остальные несколько десятков соединяют две соседние нуклеосомы. С-коцевые участки гистонов октамера плотно свернуты, а подвижные N-концевые части (N-хвосты) свободно расходятся в стороны. Одна молекула гистона H1 связыва-

ется с внешней стороной нуклеосомы в районе тетрамера (H3-H4)₂, тем самым фиксируя на ней нить ДНК. В таком виде ДНК похожа на нитку бусин, соединенных линейными участками ДНК – линкерами. Такая упаковка ДНК увеличивает ширину ДНК до 10 нм. Этого явно недостаточно, чтобы уместить ее в ядре. Следующий уровень упаковки ДНК – это образование соленоида за счет соединения нуклеосом гистоном H1 в шестерки. Такие структуры называются нуклеомерами. Степень компактизации ДНК в них в 40 раз. Нуклеомеры упакованы в петли – хромомеры, содержащие 20-40 нуклеомеров. Петли содержат по 60-100 тыс. п. н. Петли ДНК уложены в своеобразные структуры – розетки. Они прикреплены к внутренней поверхности ядерной мембраны. Места прикрепления называются MAR/SAR –элементы (matrix associated regions и scaffold associated regions). В образовании петель участвует топоизомераза II. Она связывается с MAR/SAR-элементами как димер в основании петель. Для некоторых геномов показано, что в петлях содержатся гены, объединяемые общей регуляцией или функцией.

На сегодняшний день с помощью рентгеноструктурного анализа установлены детали структуры нуклеосом. Важность взаимодействия ДНК с гистонами подтверждается тем, что мутации в гистоновых генах летальны. При намотке на октамер гистонов ДНК может изгибаться, при этом ее вторичная структура значительно отличается от В-формы. За сборкой нуклеосом следят особые белки, осуществляющие АТФ-зависимое упорядоченное распределение нуклеосом по ДНК. В этом процессе участвуют также гистоновые шапероны. В ДНК есть участки, свободные от нуклеосом. Это в основном сайты связывания регуляторных белков.

Во время репликации нуклеосомы разбираются на димеры и удаляются, а потом снова собираются. Кроме компактизации ДНК у нуклеосом есть и другие функции, такие как регуляция транскрипции. Установлено, что расположение нуклеосом в геноме определяется нуклеотидной последовательностью. Другими словами, связывание гистонического октамера с ДНК, как и связывание любого другого комплекса является сайт-специфическим. Суще-

ствуется несколько онлайн серверов, где можно ввести нуклеотидную последовательность ДНК, и программа выдаст вероятность расположения нуклеосом вдоль нее.

Наивысший уровень упаковки ДНК приводит к формированию митотических метафазных хромосом, готовых к транспортировке генетического материала в дочерние клетки. Фактически это фибриллы с петлевыми доменами, которые формируют хромонемы толщиной 700 нм. Последние укладываются на белках скаффолда в метафазные хромосомы (толщина до 1400 нм). Такой уровень укладки исключает всякую регуляцию генов. На этой фазе клеточного цикла гены замолкают, а функционирование клетки идет за счет ранее заготовленного запаса РНК и белков

По длине хромосомы упаковка ДНК не равномерна. Наиболее упакованная область приходится на центромеру, на внешней поверхности которой расположены белки кинетохора. Именно к кинетохору во время разделения дочерних хромосом присоединяются микротрубочки веретена деления. В теломерных концах хромосом также наблюдается большая конденсация ДНК. В интерфазных хромосомах ДНК менее упакована, чем в метафазных. На этой стадии клеточного цикла происходит реализация программы, записанной в ДНК – транскрипция. Наиболее конденсированы участки ДНК, свободные от генов – гетерохроматин, наименее – участки, содержащие гены, – эухроматин. Гетерохроматин транскрипционно неактивен, эухроматин, наоборот, является активным. Район хроматина, где сосредоточены гены для рибосомных и транспортных РНК, называется ядрышковым организатором. В нем гены объединены в кластеры. На ядрышковом организаторе формируется клеточная структура, называемая ядрышком. Здесь осуществляется синтез рибосомальной РНК (рРНК) и соединение этих молекул с белками, т. е. происходит формирование субъединиц рибосом, которые затем поступают в цитоплазму, где и завершается их сборка. При делении ядер ядрышки исчезают и вновь появляются на стадии телофазы. Внутри ядра хромосомы занимают определенные неперекрывающиеся пространства – хромосомные террито-

рии. При этом хромосомы, богатые генами локализуются ближе к центру ядра, а бедные генами – ближе к его периферии.

Поскольку у прокариот, а также в митохондриях и пластидах ДНК гораздо меньшего размера, то соответственно не требуется такой многоэтапной упаковки, она тоже упакована и находится в комплексе с белками.

Приведем некоторые физические параметры ДНК Диаметр – 2 нм, расстояние между парами нуклеотидов – 0,34 нм. Один поворот спирали составляет 10 пар оснований. Длина ДНК в самой длинной человеческой хромосоме – 8 см, во всех хромосомах одной клетки 2 м. В гаплоидном наборе человека 3,2 млрд. пар нуклеотидов. В ядрах клеток человека 7 пг ДНК.

Главной функцией ДНК является хранение передаваемой по наследству от клетки клетке, от родителей – потомству генетической информации, т. е. сведений о всех сторонах жизни – структуре, взаимодействии и функционировании всех частей клетки или организма. В связи с этим другая функция ДНК заключается в точной передаче этой информации, что обеспечивается механизмом репликации.

По количеству хранимой информации ДНК превосходит современные компьютеры по сверхбыстродействию и миниатюрности. Информация 1 млн. п.н. ДНК эквивалентна 1 мегабайту информации компьютера, а вся ДНК в геноме человека – 3 гига-байтам. В одном кубическом сантиметре ДНК информации больше, чем в одном триллионе CD дисков. В обычном винчестере в одном квадратном дюйме содержится 7 гигабайт информации, а в ДНК один символ занимает 1,3 нанометра и в дюйме ДНК 18 мегабайт или 1 млн. гигабайт на квадратный дюйм. Следовательно, на единицу площади ДНК содержит информации в 100000 раз больше чем винчестер. Вот поэтому для создания сверхмощных компьютеров биотехнологии пытаются использовать запись информации с помощью ДНК.

В геноме прокариот есть основная ДНК (ее еще называют прокариотической хромосомой или нуклеоидом) и дополнительные малые молекулы ДНК – плазмиды. Основная ДНК как правило представлена одной двуну-

вой ДНК, замкнутой в кольцо. Есть исключение из этого правила. Например, у спирохеты, вызывающей болезнь Лайма, ДНК в виде многочисленных линейных и кольцевых фрагментов разного размера, и различий между главными и плазмидными ДНК нет.

Содержание РНК в клетках во много раз больше, чем ДНК. Основная роль РНК – это транскрипция генетического материала и синтез белков, или трансляция. РНК может быть также и носителем генетической информации в РНК-содержащих вирусах и вироидах.

Известно несколько типов РНК:

1) геномная РНК – хранитель генетической информации у РНК-содержащих вирусов, может быть одно- и двуцепочечной

2) пре-мРНК – РНК-транскрипты, не подвергшиеся процессингу транскрибированные с генов, в которых записана информация о белках

3) мРНК – матричная РНК, матрица для синтеза полипептидных цепей в процессе трансляции. Этот тип РНК относится к кодирующим РНК, в ней генетическим кодом записана последовательность аминокислотных остатков в белке

Далее идет перечисление наиболее разнообразной группы РНК – некодирующих РНК.

3) рРНК – рибосомальные РНК участвуют в организации структуры рибосом и в синтезе белка

4) тРНК – транспортные РНК, участвуют в синтезе белка, являясь адапторными молекулами, устанавливая соответствие аминокислоты триплету генетического кода

5) sРНК – малые ядерные и малые цитоплазматические РНК, участвуют в сплайсинге и регуляции генной активности

6) интерферирующие РНК, участвуют в деградации и регуляции трансляционной активности

7) гРНК – гидовая РНК участвует в редактировании мРНК

8) рибозимы – РНК, выполняющие ферментативные функции

9) РНК в составе фермента теломеразы, участвующей в достройке теломерных концов линейных хромосом после их недорепликации.

В последние несколько лет получены данные о том, что у эукариот число генов для некодирующих РНК превышает число известных и предсказанных генов, кодирующих белки. Показано, что транскрибируется значительно большая часть генома, чем предполагалось ранее, при этом последовательности мРНК соответствуют не более чем 2% генома. В связи с этим появилось представление о транскрипционном шуме, т. е. что значительная часть некодирующих РНК являются результатом неспецифической транскрипции и не несут функциональной нагрузки. Противоположная точка зрения о важности некодирующих РНК в клеточных функциях основана на фактах тканеспецифической и стадийспецифической экспрессии ряда генов некодирующих РНК, а также на данных о их регуляторной роли.

Среди некодирующих РНК особое внимание ученых привлечено к микроРНК, классу регуляторных РНК длиной 19-24 нуклеотидов, образуемых из более длинных предшественников путем последовательного процессинга с участием белковых комплексов. Гены микроРНК представляют собой самостоятельные транскрипционные единицы. Они могут находиться в интронах белковых генов, интронах и экзонах генов других РНК. У вирусов тоже обнаружены микроРНК. Главная известная на сегодняшний день функция микроРНК заключается в регуляции генной активности, причем именно в сайленсинге регулируемых ими генов. МикроРНК образуют дуплекс с участками 3' нетранслируемых областей мРНК, что приводит к подавлению трансляции или к деградации мРНК-мишени. Показано также, что в некоторых случаях микроРНК вызывают повышение трансляционной активности мРНК.

Из одного перечисления типов РНК можно видеть, что в отличие от ДНК, РНК – многофункциональный полимер. Она выполняет функции и ДНК, и белков.

РНК – это полинуклеотид (рис. 12) длиной до 10 000 нуклеотидов. В ее

состав входят 4 нуклеотида: аденин, цитозин, гуанин и урацил. Вместо тимина, присутствующего в ДНК, в РНК находится урацил, у которого, в отличие от тимина, отсутствует 5'-метильная группа. Урацил составляет комплементарную пару с аденином. В составе РНК может присутствовать несколько модифицированных, или минорных оснований – риботимидин, 5,6-дигидроуридин, псевдоуридин, инозин и др. Как и в ДНК, в РНК нуклеотиды соединяются 5'-3'-фосфодиэфирными связями и имеют 5'- и 3'-концы. Первичная структура биологически активной РНК формируется после многочисленных модификаций и часто отличается от первичного транскрипта. Большинство клеточных РНК – одноцепочечные молекулы, но в них за счет спаривания комплементарных нуклеотидов часто образуются двуцепочечные участки – шпильки, спирали, соединения трех и более спиралей, петли. Совокупность двуцепочечных участков образует

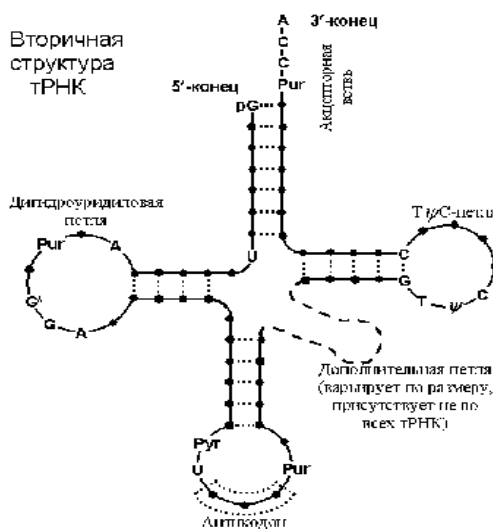


Рис.12. Структура транспортной РНК

вторичную структуру РНК. За счет взаимодействия между собой элементов вторичной структуры РНК в клетке сворачивается в трехмерную структуру. Вторичные и трехмерные структуры объединяют под общим термином *конформация*. В клетке РНК выполняет свои функции, будучи свернутой в

нативную трехмерную конформацию. Элементы нативной структуры обеспечивают защиту РНК от рестриктаз клетки, ответственных за деградацию экзо-РНК (прежде всего вирусной), обеспечивают стерический контакт с белками в комплексе с которыми работает РНК (в том числе и инициацию и регуляцию процессов трансляции) и, наконец, могут обеспечивать ферментативную (рибозимную) активность самой РНК. Именно трехмерная структура опознается ферментами аминокислот-РНК-синтетазами, играющими главную роль в адаптерной функции транспортных РНК.

4.3. Генетический триплетный код

В начале 40-х гг. Дж. Бидл и Э. Тэйтум выдвинули свой знаменитый тезис «Один ген – один фермент». В настоящее время в своей первоначальной форме этот принцип представляет скорее исторический интерес, однако заслуживает восхищения, поскольку он стимулировал создание целой научной области – молекулярной биологии гена, в которой гены были главным предметом исследования. Успехи этих исследований позволили ответить на вопрос, что и как записано в генетическом коде. Необходимость генетического кода обусловлено во-первых, отсутствием соответствия между числом мономеров в матрице (РНК) и продукте (полипептид), и во-вторых, отсутствием структурного сходства между мономерами матрицы и продукта. Это исключает комплементарное взаимодействие между ними.

Генетический код – это способ записи генетической информации о структуре белков в последовательностях нуклеотидов РНК или ДНК. Поскольку генетический код считывается с мРНК, его обычно записывают, используя основания мРНК – А, U, G и С. В конкретном смысле – это соответствие между кодонами матричной РНК и аминокислотами кодируемого белка.

Научные представления о генетическом коде были сформулированы Г. А. Гамовым сразу же после обоснования Дж. Уотсоном и Ф. Криком модели строения двойной спирали ДНК в 1953 г. Г. А. Гамов предложил идею ли-

нейного соответствия двух текстов, записанных с помощью разных алфавитов. В период с 1961 по 1966 г. в прямых экспериментах код был расшифрован.

Решающим в расшифровке кода было использование бесклеточной системы синтеза белка, в которой в качестве матрицы добавляли различной структуры полирибонуклеотиды. На матрице полиУ синтезировался полипептид из фенилаланина, на полиА – полилизин, на полиС – полипролин. Далее в качестве матрицы использовали синтетические полирибонуклеотиды с повторяющимися текстами из 2, 3 и 4 нуклеотидов. В 1966 году собрался съезд Победителей в Колд-Спринг-Харборе. На нем впервые представлена таблица ген кода. Ниренберг, Корана и Холли стали Нобелевскими лауреатами за расшифровку ген кода в 1968.

Основные свойства кода:

1. Генетический код триплетен, т. е. каждая кодирующая единица – кодон – состоит из трех нуклеотидов. В каждом гене триплеты считываются с фиксированной точки (рамка считывания), в одном направлении и без запятых. Как известно, оснований, которыми различаются нуклеотиды всего четыре. В РНК это аденин(А), цитозин (С), гуанин (G) и урацил (U). Следовательно, задача сводится к тому, чтобы четырьмя буквами записать 20 аминокислот. Отсюда следует, что код должен быть не менее чем триплетным. При этом из всех сочетаний четырех букв может получиться 64 кодона, т. е. даже больше, чем нужно. К 1965 г. генетический код был полностью расшифрован и выяснены основные его свойства. Удобнее всего представить код в виде круга (рис. 12), в центре которого первые буквы кодона, во втором – вторые и в третьем – третьи. В четвертом кольце – аминокислотные остатки. Видно, что каждой аминокислоте соответствует от одного до шести кодонов. Другими словами, код обладает свойством избыточности или вырожденности. Однако один кодон кодирует только одну аминокислоту – это свойство однозначности кода.

Важным принципом кодирования является то, что для кодирования

большинства аминокислот существенны две первые буквы в коде, а третья может быть любой. Из этого следует, что замены оснований в третьем положении кодона могут просто не проявляться. Это обеспечивает коду высокий уровень помехоустойчивости.

2. Генетический код содержит знаки пунктуации. Кодоны AUG и GUG инициируют трансляцию, UAG, UAA, UGA – терминируют ее. Терминирующие кодоны не кодируют никакой аминокислоты, AUG кодирует метионин, а GUG – валин. Функции инициации трансляции они выполняют только если находятся в контексте сайта узнавания рибосомы. В зависимости от иницирующего кодона, синтез белка начинается с метионина или валина, но впоследствии, в ходе посттрансляционной модификации белка эти аминокислоты, как правило, отщепляются. В конце гена обязательно стоит один, а то и два терминирующих кодона. Опасными являются мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания и появлению терминирующих кодонов в кодирующей области гена. В последнем случае трансляция приведет к образованию лишь начальных фрагментов белка после чего, встретив терминирующий кодон, остановится.

Ала ГЦУ,ГЦА,Г ЦЦ, ГЦГ	Арг ЦГУ,ЦГА, ЦГЦ,ЦГТ, АГА,АГГ	Асп ГАУ, ГАЦ	Асп ААУ,ААЦ	Вал ГУУ,ГУ Ц, ГUA,ГУ Г
Гис ЦАУ,ЦАЦ		Глу ГАА,ГАГ	Глук-та ЦАА,ЦАГ	Исл АУУ,АУ А, АУЦ
Лей УУА,УУТ,Ц УЦ, ЦУТ, ЦУА,ЦУЦ	Лиз ААА,ААГ	Мет АУГ	Про ЦЦГ,ЦЦЦ , ЦЦА, ЦЦУ	Сер АГУ,АГ Ц,УЦА, УЦГ,У ЦУ,УЦ Ц
Тир УАУ,УАЦ	Тре АЦУ,АЦА,А ЦГ АЦЦ	Фен УУУ УУЦ	Три УГГ	Цис УГУ,УГ Ц

Рис. 13. Схематическое изображение генетического кода

3. Генетический код является неперекрывающимся, то есть совместно транслируемые кодоны следуют один за другим без промежутков, составляя рамку считывания. Таким образом, в пределах рамки считывания кодируется одна полипептидная цепь. В кодирующей части мРНК нуклеотидов в 3 раза больше, чем аминокислотных остатков в полипептиде. Код неперекрывающийся, но гены могут перекрываться. Один ген может находиться внутри другого – ген-матрешка. Иницирующий кодон может перекрываться с терминирующим в предыдущем гене

4. Генетический код вырожден, так как одной аминокислоте, как видно из рис. 12, может соответствовать несколько кодонов. Кодоны, соответствующие одной и той же аминокислоте, называются синонимичными. Только две аминокислоты в белках кодируются каждая одним

триплетом – триптофан и метионин. Для кодирования остальных используется от 2 до 6 кодонов.

5. Генетический код характеризуется высоко помехоустойчивостью. Проведем некоторые подсчеты, руководствуясь таблицей генетического кода. В каждом триплете может произойти 9 однократных замен, во всех триплетах – $61 \times 3 = 549$. 23 замены вызовут образование стоп-кодонов. 134 замены из-за вырожденности кода не изменят кодирования аминокислотного остатка, 230 замен не меняют класс кодируемой кислоты, что не скажется на функции белка и только 162 замены изменяют класс, т. е. радикально повлияют на функции белка. Таким образом, показатель помехоустойчивости $134 + 230 : 162 = 2,25$

6. Генетический код является универсальным, т. е. правила соответствия между кодонами и аминокислотами одни и те же для трех *макρο-таксонов* – архей, эубактерий и эукариот. Однако есть небольшие исключения из универсальности кода. В связи с этим необходимо ввести понятие идеального кода. Основное правило, которому подчиняется идеальный код – если два кодона имеют два одинаковых нуклеотида, а третий различаются, но принадлежат к одному классу (пурины или пиримидины), то они кодируют одну и ту же АМК. Идеальный код использован для кодирования некоторых аминокислот в митохондриях, пластидах. В универсальном коде два исключения из этого правила АУА-лейцин, а АУГ-метионин. В идеальном оба – метионин. УГГ в универсальном кодирует триптофан, а УГА является стопкодоном, в идеальном – оба кодируют триптофан. Идеальный код не у всех митохондрий, но ни у одной нет универсального кода как у клетки

Кроме триплетного генетического кода в функционировании геномов эукариот огромную роль играет также большое число других надтриплетных генетических кодов, которые находятся в суперпозициях по отношению к линейному триплетному коду. При этом под кодом понимается любой тип нуклеотидного контекста, значимый для выполнения определенной биомоле-

кулярной функции. коды конформационных и физико-химических особенностей двойной спирали ДНК. В настоящее время известны: коды регуляции репликации; коды регуляции транскрипции (включая ее тканеспецифичность); коды формирования нуклеосом, коды организации, модификации и ремоделлинга хроматина; коды блочной организации кодирующих районов генов эукариот (на основе экзон-интронной структуры генов; коды регуляции сплайсинга и процессинга пре-мРНК; коды регуляции трансляции; коды укладки РНК молекул и полипептидных цепей в нативные структуры; коды функционирования генных сетей и др. Разработка методов выявления и расшифровки кодов, – одна из основных задач биоинформатики.

Глава 5. ГЕНЫ И ГЕНОМЫ

Лишь краткое описание достижений молекулярной генетики свидетельствует о том, что всего за сто с небольшим лет эта наука совершила скачок от умозрительного представления о дискретных элементарных факторах наследственности Г. Менделя до постижения тайны генов и манипулирования генами. Достижения молекулярной биологии положили начало грандиозным геномным проектам и фактически обеспечили власть человека над генами. Особое внимание общественности привлекают работы генетиков по переносу генов – трансгенезу – из одних организмов в другие, а также применение этих технологий для лечения заболеваний человека – генной терапии.

Определение и сама концепция гена подвергались эволюции. В 1865 г. Грегор Мендель опубликовал статью, где на основании своих экспериментов постулировал существование единиц наследственности в виде дискретных факторов, которые передаются от родителей потомству. Теперь мы знаем, что это и есть гены.

Свойства генов отражены в законах Менделя. Первый закон – единообразие гибридов первого поколения – рассматривает свойства индивидуально-

го гена. При этом диплоидный организм имеет две копии гена, находящиеся в гомологичных хромосомах. В процессе мейоза только по одной из этих копий попадает в гаметы, которые гаплоидны. Сливаясь они образуют зиготу, в которой по одной копии гена от каждого родителя. Ген может существовать в альтернативных формах, что проявляется в фенотипических различиях (например, красная и белая окраска цветков). Эти формы гена называются аллельными. Аллельные гены отличаются небольшими изменениями последовательности нуклеотидов в ДНК, которые в одних случаях приводят к изменениям кодируемого продукта и изменению фенотипа, а в других – никакого влияния на кодируемый продукт не оказывают. Уникальное сочетание аллельных состояний всех пар генов и определяет биологическую индивидуальность каждого организма. Если аллели одинаковы, организм гомозиготен по ним, если разные – гетерозиготен. Скрещивание двух гомозиготных особей дает гетерозиготу, в которой один аллель гена (доминантный) проявляется, а другой (рецессивный) – нет. Поэтому в первом поколении все особи одинаковы по фенотипу (а также по генотипу) и похожи на доминантного родителя. Однако рецессивный ген никуда не девается и в последующих поколениях проявляется. Поведение любой пары альтернативных генов не влияет на распределение другой пары генов.

Работа Г. Менделя не была замечена и не повлияла на бытовавшее тогда представление о наследственности. Вторичное открытие генетических законов состоялось в 1900 году Г. Де Фризом (Голландия), К. Корренсом (Германия) и Э. Чермаком (Австрия). Это убедило всех в существовании дискретных наследственных факторов.

С открытием хромосом стало ясно, что дискретные факторы Менделя соответствуют хромосомам – альтернативные гены находятся в гомологичных хромосомах. Законы Менделя получили цитологическую основу. В мейозе при образовании гамет каждая гамета получает только одну из двух гомологичных хромосом своих родителей. При этом каждый член одной гомологичной пары входит в гамету в случайном сочетании с другим членом

другой гомологичной пары хромосом. Это правило независимого распределения негомологичных хромосом.

С развитием генетики были обнаружены исключения из законов Менделя, которые основу этих законов подтверждают.

Далее гены идентифицировали только исходя из мутаций, которые вызывали отклонения в фенотипе. И уже в 1902 г. Герродом была высказана мысль, о том что мутации приводят к нарушению метаболизма (на примере алкаптонурии). Появились попытки связать гены с ферментами. Они приняты Дж. Бидлом и Э. Тейтумом в 30-х гг. Это привело в 1940 г. к возникновению гипотезы: один ген – один фермент. Однако прямого доказательства, что ген действительно детерминирует структуру белка, пришлось ждать до 1957 г. когда Ингрэм показал, что серповидно-клеточная анемия наследуется как моногенный признак и обусловлена изменением аминокислотного состава гемоглобина. Но поскольку выяснилось, что гемоглобин состоит из двух α - и двух β -полипептидных цепей плюс группировки гема, а функция его может быть изменена при мутации, затрагивающей любую цепь, гипотеза получила более точное выражение – один ген – одна полипептидная цепь.

Следующий этап исследований генов состоял в выяснении их биологической природы. Начало положили в 1928 г. эксперименты Ф. Гриффитса, который открыл явление трансформации при изучении пневмококковой инфекции у мышей. Если он инфицировал мышей смесью живых авирулентных пневмококков и убитых нагреванием вирулентных, мыши погибали. Значит, какой-то компонент убитых бактерий превращал невирулентных в вирулентные. В 1944 году Эвери показал, что трансформирующим агентом является ДНК. Это было неожиданным. Хотя уже знали, что ДНК является основным компонентом эукариотических клеток, никто не предполагал, что она входит в состав пневмококков. Эвери так подробно описывает полученное им трансформирующее вещество, что нам не трудно увидеть в нем ДНК! Однако еще долгое время оставалось скептическое отношение к ДНК как генетиче-

скому материалу, в основном, из-за ошибочного представления о монотонности структуры ДНК. Обескураживало также и то, что молекула ДНК намного длиннее белка.

После выяснения Уотсоном и Криком структуры ДНК стало понятно, что именно ДНК – носитель генетической информации, и начался следующий этап – изучение молекулярной структуры генов и генетического кода. Представление о том, что каждая цепь ДНК служит матрицей при синтезе комплементарной цепи при репликации ДНК, оказалось главным для формирования представлений о природе генов и их связи с синтезом белка.

Первое определение гена на молекулярном уровне предложено в начале 40-х гг. XX в. на основании изучения генетики нейроспоры. Это привело к формулировке: ген – это область, кодирующая один фермент. Затем это понятие уточнили еще более: ген – это область ДНК, кодирующая одну полипептидную цепь белка или одну структурную РНК (тРНК, рРНК, мяРНК). Этим представлениям не противоречил открытый в 70-х гг. феномен прерывистости генов эукариот. А вот открытие альтернативного сплайсинга определенно требует внесения поправки в определение гена. Подходит такое определение: ген – это последовательность ДНК, которая транскрибируется как отдельная единица и кодирует одну или несколько полипептидных цепей белка и отвечает за синтез всех типов РНК. Выяснение структуры генов изменило их определение. Гены эукариот могут быть прерывистыми, по образному выражению Уолтера Гилберта, состоят из кусков (экзон-интронное строение), могут перекрываться (считывание с разных рамок), за счет альтернативного сплайсинга один ген может кодировать разные полипептиды. Как, исходя из этого дать определение гена? Получается, что правильным является утверждение – одна полипептидная цепь соответствует одному гену. В этом случае мы можем считать геном последовательность ДНК (экзоны и интроны), отвечающую за синтез полипептида, игнорируя то, что в него входит другой ген, кодирующий другой полипептид.

Совокупность всех генов в диплоидном (или в гаплоидном, у гаплоид-

ных организмов) наборе хромосом называется генотипом. Весь комплекс внутренних и внешних признаков организма называется фенотипом. Суммарная ДНК в гаплоидном наборе хромосом называется геномом. В клетках животных геном представлен ядерным и митохондриальным, в клетках растений, кроме этого, есть еще геном пластид.

Исследование геномов разных живых организмов стало возможным благодаря развитию методов анализа ДНК, в частности методов получения рекомбинантных ДНК. Среди этих методов особое место принадлежит открытию рестриктаз, бактериальных ферментов, способных разрезать ДНК в определенных сайтах. После этого появилась возможность выделять определенные последовательности ДНК, встраивать их в плазмиды, и после заражения бактериальных клеток рекомбинантной плазмидой нарабатывать необходимые количества ДНК, клонировать ее для дальнейшего анализа, а также переноса в геномы других организмов. Несколько ранее были разработаны методы секвенирования ДНК, т.е. определения в ней последовательности нуклеотидов. Сначала секвенирование осуществляли вручную, затем с изобретением автоматических секвенаторов процедура секвенирования значительно ускорилась. Современный секвенатор позволяет прочесть около 800 п.н. за 2-4 часа. К настоящему времени секвенировано около 1 000 геномов разных организмов. Геномы ряда доклеточных организмов - фагов и вирусов секвенированы в конце 70-80-х годов XX века. На клеточном уровне первым, в 1995 году, секвенирован геном прокариота *Haemophilus influenzae*. Через год был секвенирован первый геном эукариотического организма – дрожжей. Геном первого многоклеточного организма *Caenorabditis elegans*, секвенирован в 1998 г. Вслед за этим секвенированы геномы дрозофилы, арабидопсиса и других многоклеточных. В 2000 году в двух ведущих журналах мира *Nature* и *Science* опубликованы статьи с результатами секвенирования генома человека. Это был черновой вариант сиквенса – геном прочтен с ошибками, которые в 10 раз превышали необходимый уровень (1 ошибка на 10 000 нуклеотидов).

Сравнение геномов разных видов показало, что суммарное количество ДНК в геноме (Content) в большой степени избыточно по сравнению с тем, которое используется для кодирования белков и транскрипции всех типов РНК, и не всегда коррелирует с уровнем эволюционной сложности организмов. Это явление называют С-парадоксом. Так, геном американской амфибии приблизительно в 30 раз больше, чем геном человека. Даже самая маленькая хромосома амфибии (а всего их в гаплоидном наборе 28) больше самой крупной хромосомы в кариотипе человека. Геномы саламандры и лилии в 30 раз превышают размер генома человека. У амёбы в 200 раз больше ДНК, чем у человека (600 млрд п.н. против 3,5 млрд п.н.). У *C. Elegans* 1000 клеток, 19099 генов в ДНК размером в 97 млн. п.н. Лягушки, жабы и тритоны – чемпионы по содержанию ДНК, в геноме, у них ДНК приблизительно в 25 раз больше, чем у любого из видов млекопитающих. Геномы близких видов могут сильно различаться по размеру. Так, *Amoeba proteus* содержит в геноме 290 млрд. п. н., а *Amoeba dubia* – 670 млрд. п. н. Если определять только размер некодирующей части ДНК, то С-парадокс исчезает. Следовательно, увеличение генома в эволюции организмов происходит в основном за счет увеличения их некодирующей составляющей. Число генов тоже возрастает в ходе эволюции от простых форм к сложным. Но это возрастание гораздо меньше, чем можно было предполагать исходя из сложности морфологического строения.

5. 1. Геномы вирусов

Минимальными размерами обладают геномы вирусов. В геноме фага ц-174 – 5374 п.н., включающих 9 генов; в геноме вируса гриппа 13 000 н. и 10 генов. Являясь облигатными паразитами, вирусы используют для жизнедеятельности геном клетки хозяина. При этом вирусный геном содержит гены структурных белков вириона и ферментов, необходимых для перестройки метаболизма клетки в соответствии с «нуждами» вируса. Так, вирус иммунодефицита человека обладает РНК-овым геномом, в составе которого име-

ется ген РНК зависимой ДНК полимеразы, которая необходима вирусу для осуществления обратной транскрипции на его РНК-овой матрице копии ДНК с последующим внедрением ее в геном клетки.

По структуре вирусные геномы очень разнообразны. Они могут быть представлены одно- и двунитевыми, кольцевыми, линейными и фрагментированными молекулами РНК или ДНК. Размер вирусных геномов колеблется в пределах нескольких тысяч пар нуклеотидов, число генов – от 3 до 200 в зависимости от сложности вируса. Вирусные геномы характеризуются компактностью, гены тесно прилегают друг к другу и часть их перекрывается. Исследование геномов вирусов имеет помимо теоретического, практическое значение. На основании этих данных можно находить мишени для лекарственных противовирусных препаратов, конструировать вакцины и прогнозировать изменчивость вирусов, с тем, чтобы предсказывать возможность преодоления конкретным вирусом видового барьера.

1. Большинство вирусов (полиомиелит, вирус табачной мозаики, вирус клещевого энцефалита и др.) содержат РНК (+РНК), которая при попадании вируса в клетку сразу начинает транслироваться. В результате образуются вирусные белки, необходимые для размножения вируса, в частности РНК-зависимая РНК-полимераза. По сути, эти вирусы представляют мРНК в изящной и надежной упаковке из белка. Чтобы начать инфекционный процесс, им ничего не нужно, кроме белоксинтезирующего аппарата клетки. Однако в естественных условиях в клетку попадает немного вирусных частиц и их мРНК трудно выдержать конкуренцию с клеточными мРНК за рибосомы.

2. Есть вирусы (вирус гриппа, кори, бешенства, желтой карликовости картофеля и др.), в геноме которых находится РНК (-РНК), комплементарная той, которая будет транслироваться. Кроме того, в их вирионе вместе с -РНК упакован фермент РНК-зависимая РНК-полимераза. Она копирует РНК с образованием

+РНК, которая, как и в первом случае, использует рибосомы клетки для синтеза своих белков. У другой группы вирусов, к которой относятся ротавирусы, вызывающие кишечные расстройства, РНК двуспиральная ($\pm$ РНК), а также имеется фермент РНК-зависимая РНК-полимераза. Новое поколение вирусов образуется по сходному с предыдущим механизму.

3. У вирусов – возбудителей герпеса и оспы, в геноме находится двуспиральная ДНК, которая сначала транскрибируется, а потом трансляция мРНК приводит к образованию вирусных белков и вирионов. Ферменты, необходимые для осуществления этих процессов, вирус берет у клетки.

4. Вирусы с односпиральным ДНК-геном сначала его дуплицируют, а затем все происходит, как в предыдущем варианте.

5. Ретровирусы – ВИЧ (см. рис. 3) и онкогенные вирусы, имеют +РНК, но сценарий, по которому развивается инфекционный процесс, отличается от описанного в п. 1. В вирусном геноме закодирован необычный фермент – ревертаза, который обладает свойствами как РНК-зависимой, так и ДНК-зависимой ДНК-полимеразы. Этот фермент при попадании вируса в клетку обеспечивает синтез одноцепочечной ДНК, а затем двуспиральной ДНК.

У вируса гепатита В генетический материал в виде двуспиральной ДНК, но реплицируется она иначе, чем описано в п.4. Сначала с ДНК транскрибируется +РНК, которая служит матрицей для синтеза белков и ДНК. Синтез ДНК осуществляется ревертазой

5. 2. Геномы прокариот

У прокариот геном значительно больше, чем у вирусов. Основным геном прокариот представлен нуклеоидом, компактной структурой ДНК, свободной от рибосом. Длина ДНК *E.coli* – 4,6 млн. п.н. В клетке ДНК нуклеоида ассоциирована с гистоноподобными белками HU, H-NS, IHF, которые ее компак-

тизуют. Второй компонент бактериального генома – это плазмиды. Плазмиды – кольцевые ДНК длиной 10^4 - 10^5 н.п. (до 8% длины основного генома). Число их в каждой клетке колеблется. Плазмиды обладают автономной репликацией. Некоторые плазмиды участвуют в конъюгации, другие – накапливают гены устойчивости к антибиотикам. Посредством вирусов и плазмид осуществляется горизонтальный перенос генов. Этот путь приобретения новых генов играл существенную роль в эволюции бактерий – свидетельства горизонтального переноса находят почти во всех бактериальных геномах. Есть данные о присутствии в геномах эубактерий генов архей.

На электронной микрофотографии можно видеть многочисленные петли ДНК, которые представляют собой активно транскрибируемые области. Геном прокариот компактен. Количество некодирующих последовательностей ДНК минимально, интроны редки. Однако для кодирования белков часто используются 2 или 3 рамки считывания одной и той же последовательности ДНК, что повышает кодирующий потенциал генома без увеличения его размера. В настоящее время секвенированы геномы более 100 типов прокариот. Как уже говорилось, геном бактерии *Haemophilus influenzae* был секвенирован первым из всех организмов. Среди секвенированных бактериальных геномов геномы бактерий, вызывающих опасные заболевания человека, такие как микобактерии проказы и туберкулеза, кишечная палочка, ряд почвенных бактерий и многие другие. Результаты этих исследований имеют важное значение не только для фундаментальной биологии, но и для практического применения в медицине и сельском хозяйстве. Становится реальным конструирование лекарств, воздействующих на критические мишени болезнетворных бактерий, прогнозирование их распространения и изменчивости. На основании данных о геноме прокариот составлен перечень генов, абсолютно необходимых для существования отдельной свободно живущей клетки. Предполагаемый гипотетический минимум генов для существования паразитической бактерии, подобной *M. genitalium*, составляет 256 генов.

Секвенирование геномов архей, особого домена прокариот, показало, что

в их геномах содержится три типа генов: типичные бактериальные (обеспечивают метаболизм, транспорт веществ и регуляторные процессы), подобные эукариотическим (обеспечивают матричные синтетические процессы) и специфические для архей (контролируют биосинтез жгутиков, липидов клеточной стенки и метаногенез). Многие гены архей организованы в кластеры – опероны, транскрибируемые с одного промотора и транслируемые в виде длинных неэкспонированных мРНК, содержащих короткие полиА-последовательности бактериального типа. Сходство геномов архей с эукариотами проявляется наличием интронов в генах.

5. 3. Геномы митохондрий

Митохондрии – важнейшие клеточные органеллы, присутствующие во всех (за небольшим исключением) эукариотических клетках. В них осуществляются реакции окислительного фосфорилирования, идущие с выделением энергии, которая запасается в макроэргических связях АТФ. Митохондрии, как и пластиды, относительно автономны. Митохондрии окружены двойной мембраной и имеют собственный генетический аппарат, обладающий рядом особенностей.

ДНК митохондрий кольцевая двуспиральная. В митохондриальном геноме человека 16 569 пар нуклеотидов, кодирующих 13 белков, 22 тРНК и 2 рРНК.

В генетическом коде митохондрий имеется ряд отклонений от универсальности генетического кода. Так, в митохондриях человека кодон AUA кодирует метионин, а не лейцин, как в универсальном коде. Кодоны AGA и AGG, кодирующие в ядерном коде лейцин, в митохондриях являются терминирующими кодонами, а стоп-кодон UGA кодирует в митохондриях аминокислоту триптофан.

Другой необычной чертой генетической системы митохондрий являются особенности узнавания кодонов мРНК антикодонами тРНК. Одна митохондриальная тРНК узнает 4 кодона, различающиеся третьим нуклеотидом, так

что в синтезе белка в митохондриях используется всего 22 тРНК, а не 62, как в цитоплазме эукариотической клетки.

В митохондриях сильно развито редактирование мРНК. Обычно это замена С на U в определенных местах.

В митохондриальной мРНК происходит сплайсинг. При этом вырезаемые интроны могут кодировать белки-матюразы, которые и осуществляют вырезание интронов.

В митохондриальной ДНК иногда наблюдается перекрывание генов. Так, в митохондриях курицы ген тирозиновой тРНК перекрывается одним нуклеотидом с геном цистеиновой тРНК. Размножаются митохондрии делением, никогда не возникая *de novo*.

Поскольку митохондрии находятся в центре энергетического обмена клетки, любое нарушение в них не может не отразиться на основных функциях организма. Клеточный энергетический кризис ведет к включению механизма запрограммированной гибели клетки – апоптозу. Вообще митохондрии представляют центр контроля апоптоза. Если митохондрии не справляются с удалением активных форм кислорода, последние инициируют открытие пор во внешней мембране и выход в цитозоль белка, ответственного за развитие каскада реакций, ведущих к синтезу протеаз и нуклеаз и к апоптозу.

Нарушения в геноме митохондрий наследуются по материнской линии, поскольку новорожденный получает их из яйцеклетки. Митохондрии сперматозоидов при оплодотворении не попадают в яйцеклетку. У человека выявлен ряд наследственных заболеваний, обусловленных мутациями в митохондриальной ДНК. К ним относятся энцефало- и миелопатии, аритмии, ацидоз, некоторые виды глухоты и слепоты.

5.4. Геномы эукариот

Наиболее сложно организованы геномы эукариот. Размеры генома эукариот на 2-3 порядка больше, чем у прокариот.

В 1988 году начал работу проект «Геном человека», возглавлял его Дж.

Уотсон. Благодаря своему высокому авторитету он добился финансирования, которого не имел до этого никакой другой научный проект. Вскоре образовалась Международная организация по изучению генома человека – Human Genome Organization, HUGO. Руководителем ее стал Френсис Коллинз.

Впоследствии от международного проекта отпочковалась коммерческая фирма Селера под руководством Крейга Вентера, которая первой сообщила о секвенировании генома человека в 2000 году. Это был черновой вариант, он был составлен с точностью в 10 раз ниже необходимой. Результаты секвенирования генома человека опубликованы в двух ведущих научных журналах Science и Nature в двух статьях более 500 соавторов. В настоящее время каждые 1-2 года публикуются новые данные о секвенировании генома человека. И все же наука еще далека от окончательного завершения расшифровки генома человека. Так как не определены локализации всех генов и их функции. По этому поводу Дж. Уотсон сказал, что для определения последовательности нуклеотидов в геноме человека понадобилось 10 лет, тогда как многие десятки лет необходимы для определения, что же было прочтено.

Основная часть генома эукариот локализована в ядре, значительно меньшая – в митохондриях и пластидах. Геномная ядерная ДНК распределена по нескольким хромосомам, где они находятся в комплексе с белками. Геномы эукариот содержат облигатные и факультативные элементы. Облигатные элементы включают структурные локусы, количество и расположение которых в геноме постоянно. К факультативным элементам генома относятся повторяющиеся последовательности, амплифицированные участки, псевдогены, плазмиды, ретровирусные последовательности, эписомы, дополнительные В-хромосомы, различные цитосимбионты. Их присутствие и расположение в геноме может меняться. Возможен переход от факультативных элементов к облигатным, и наоборот. Транспозоны принято относить к облигатным элементам генома, так как они могут переходить из одного состояния в другое.

Комплекс ДНК и белков называется хроматином. В каждой хромосоме

находится одна молекула ДНК в виде двухнитевой структуры. Исключение составляют так называемые политенные хромосомы слюнных желез двукрылых, в клетках которых репликация ДНК не сопровождается делением клеток, поэтому одна хромосома может содержать до 1 000 нитей ДНК. Показано, что основная часть генома представлена некодирующими последовательностями, которые включают интроны, межгенные промежутки, некодирующие и нетранскрибируемые регуляторные области, псевдогены, мобильные элементы и многочисленные повторяющиеся последовательности, которые характеризуются непостоянством состава и положения.

Одним из удивительных открытий геномики является обнаружение высокой гомологии между генами в геномах организмов, далеко отстоящих друг от друга на таксономической лестнице. Так гены человека и мыши имеют 99%-ю гомологию. Удастся выделить и так называемые синтенные группы, т. е. участки хромосом мыши и человека с одинаковым порядком расположения гомологичных генов в хромосомах.

Значительная часть генома эукариот занята разного рода повторяющимися последовательностями. Классификация повторяющихся последовательностей основана на количестве пар нуклеотидов в повторе, который повторяется в геноме много раз. Повторы, состоящие из 1-20 п.н., организованные в длинные tandemные блоки, называются сателлитными. Среди них различают микросателлиты (длиной 1-4 п.н.) и минисателлиты (5-20 п.н. в индивидуальном повторе). Число копий сателлитных повторов в ДНК характеризуется высокой вариабельностью у особей одного вида. Поэтому их еще называют tandemными повторами с изменяющимся числом. Поскольку число сателлитов индивидуально, этот признак используется как генетический маркер.

Диспергированные повторяющиеся последовательности не организованы в крупные блоки, а рассеяны по геному и могут локализоваться в генах. В общей совокупности они составляют около 50% генома. Они делятся на короткие SINE (short interspersed elements) и длинные LINE (long interspersed elements). Длина SINE-элементов около 90-400 п.н., LINE – до 7000 п.н.

Примером SINE повторов являются Alu-повторы, повторяющиеся мотивы которых составляют приблизительно 300 п. н., а всего в геноме человека их около 10 млн. копий, т.е. 5% от всей ДНК. LINE и SINE способны транскрибироваться. Диспергированные повторы могут перемещаться по геному. Впервые это явление было обнаружено Барбарой Мак Клинтон в конце 30-х годов XX века на кукурузе. LINE – элементы содержат ген ревертазы, которая осуществляет обратную транскрипцию, а потом образовавшаяся копия ДНК внедряется в новый сайт генома. Таким образом, такие элементы размножаются и распространяются по геному. Встраивание Alu –повтора ген фактора свертываемости крови является, наряду с мутациями в этом гене, причиной наследственного заболевания гемофилии. Другой пример наследственного заболевания, обусловленного амплификацией повторов, это синдром ломкой X-хромосомы. Триплет ЦГГ в гене FMR-1 в норме повторяется 6-54 раза. У больных он представлен 200-300 копиями.

Кроме перечисленных типов повторяющихся последовательностей в ДНК имеются еще обращенные повторы, или палиндромы. Это последовательности, читающиеся одинаково с одного и другого конца. Палиндромы могут образовывать в ДНК сложные конформационные структуры, например, кресты. Не исключено, что они могут являться сайтами для связывания белков – факторов транскрипции.

Геном человека содержит также около 10^5 повторов длиной 2-3 тысячи п.н., содержащих длинные концевые повторы, и несколько тысяч геномов ретровирусов.

В геноме присутствуют также нефункциональные копии нормальных генов, испорченные мутациями. Это так называемые псевдогены. Они не экспрессируются, но, как полагают, играют роль в регуляции генной активности и в возникновении новых генов. Псевдоген может образоваться в результате встройки в геном копии ДНК, образовавшейся в результате обратной транскрипции процессированной РНК. Поскольку такая копия ДНК лишена промотора, транскрибироваться такой усеченный псевдоген не может. При

амплификации определенного функционального гена в одной его копии могут произойти мутации, нарушающие рамку считывания и его транскрипцию. В такого типа псевдогенах накапливаются мутации.

В геномах всех живых организмов обнаружены также мобильные генетические элементы, или транспозоны. Их роль в регуляции экспрессии генов описана в главе 6. Перемещения мобильных элементов по геному происходят при исключительных ситуациях – ухудшение внешних условий, облучение нагревание и т. п. Способность транспозонов к перемещению строго контролируется. Так, в сперматозоидах, где нельзя допустить перемещения участков ДНК, оно сдерживается специальными микроРНК в комплексе с Piwi-белками.

В 2005 году секвенирован геном шимпанзе. Сравнение с геномом человека показало, что 29 % генов в обоих геномах идентичны, а в остальных генах наблюдаются различия по не более, чем 2-м нуклеотидам. Из этого следует, что эволюция высших организмов шла не по усложнению структуры генов, а по усложнению их регуляции.

Бытовавшее представление об эгоистической ДНК (избыточной, некодирующей) в соответствии с которым такая ДНК является геномным паразитом, размножающимся в результате транспозиций новых копий, в последние годы уступает гипотезам о функциональной значимости такой ДНК.

Предполагается, что наряду с системами детоксикации мутагенов и репарации повреждений в ДНК некодирующие последовательности участвуют в механизмах поддержания генетической стабильности генома. Представляя большую часть эукариотического генома, они разбавляют кодирующие последовательности ДНК и тем самым предохраняют ее от накопления мутаций. Важная роль принадлежит некодирующей ДНК в пространственной организации генома в хромосомах. Компактизация ДНК по длине хромосомы не одинакова, предполагается, что за счет участков некодирующей ДНК структура хроматина оптимальна для экспрессии генов и защиты их от мутаций. В интерфазных ядрах распределение хромосом высоко упорядочено, так

что петли интронов предохраняют экзоны от доступа мутагенов. Есть данные, что некодирующая ДНК может участвовать в конъюгации хромосом в мейозе и в достройке теломерных концов хромосом, укорачивающихся в процессе репликации. Псевдогены также не всегда являются «мусором». Показано, что они могут участвовать в регуляции генной активности и в генерации разнообразия генов за счет генной конверсии (например, при генерации разнообразия генов иммуноглобулинов).

Нет сомнения в том, что у эукариот преобладает комбинаторный принцип кодирования генетической информации. Этот принцип реализуется за счет наличия в геноме больших регуляторных районов с множеством сайтов для связывания белков, различных паттернов экспрессии одного и того же гена в зависимости от стадии онтогенеза и типа ткани; за счет альтернативного сплайсинга пре-мРНК, и, что очень важно, за счет комбинаторики на уровне генных сетей – в результате чего каждый фенотипический признак является результатом работы целой группы координировано экспрессирующихся генов.

Структурные гены в геноме могут образовывать мультигенные семейства, содержащие от нескольких единиц до нескольких сотен генов. Обычно это кластеры в определенных районах одной хромосомы или в нескольких. Примеры таких семейств – гены рибосомных и транспортных РНК, гены глобинов, тубулинов, миоглобина, актина, интерферонов и т. д. особое место среди мультигенных семейств занимают супергены – кластеры из сотен функциональных генов. Например, суперген HLA-комплекса, кодирующего антигены совместимости тканей, содержит более 6 млн. п. н. на коротком плече 6 хромосомы человека, состоит из множества тесно сцепленных генов, отвечающих за синтез белков, участвующих в иммунном распознавании, регуляции иммунного ответа, процессах репродукции и т. д.

В геноме животных и человека есть нуклеотидные последовательности, гомологичные некоторым генам вирусов. Поскольку для таких вирусных генов была показана их роль в возникновении злокачественных опухо-

лей, вирусные гены стали называть онкогенами, а клеточные гомологи – протоонкогенами. На самом деле протоонкогены – это нормальные клеточные гены, регулирующие такие критические для организма события, как пролиферация, дифференцировка клеточный цикл, ответ клетки на ростовые факторы и т. д. Гиперпродукция их или экспрессия в несвойственном им месте может привести к злокачественной трансформации клетки.

Митохондриальный геном человека также расшифрован. Всего он занимает 16,6 kb, содержит 37 генов. Из них 2 гена для рРНК, 22 – для т-РНК и 13- для белков. Присутствуют также, но в значительно меньшем размере умеренные повторы, мобильные элементы и tandemные повторы. Прочтение митохондриального генома человека открыло механизмы наследуемых по материнской линии наследственных митохондриальных заболеваний.

Почти 93 % последовательностей ДНК митохондрий составляют кодирующие гены. При некоторых условиях гены митохондриального генома могут внедряться в ядерный геном. В основном в межгенных областях и в интронах ядерного генома находят внедренные митохондриальные псевдогены. Они могут иметь разные структурные нарушения – вставки, делеции, дубликации и замены оснований. Переход митохондриальной ДНК в ядерный геном, как полагают, может быть сопряжен с делением митохондрий, с нарушением их повышенным уровнем активных форм кислорода – побочным продуктом синтеза АТФ. Внедрение в ядерный геном происходит, очевидно, в процессе репарации двуцепочечных разрывов.

Итак, текст ДНК считан и занесен в компьютерные базы данных. В руках исследователей гигантская библиотека, которая создавалась миллионы лет. Замечательно, что получение этих данных совпало по времени с так называемым информационным бумом. Новейшие достижения информационных технологий были применены для хранения огромных массивов информации и обработки ее. В результате этого информатика из вспомогательной дисциплины превратилась в новое научное направление, которое называется геноинформатика или биология *in silico*, оперирующие не экспериментальными

данными, полученными на живых организмах, а информацией в виде компьютерных данных. Задачи этой науки и методы связаны не только и не столько с хранением огромного объема информации. Главное, понять, что же прочитано в ДНК. Пройден относительно легкий путь – структурное исследование генома, начинается намного более трудный – изучение функций отдельных частей генома и их регуляции. В ДНК 1 млн. п.н. по заключенной в нем информации эквивалентен 1 мегабайту в памяти компьютера, а во всем геноме человека информация соответствует 3 гигабайтам. Поток информации в одной бактериальной клетке сопоставим с потоком информации в современном компьютере. Аналитическая работа с таким объемом информации, ее хранением и доступностью требует компьютеров сверхгигантской мощности. Компанией IBM создан компьютер, производящий с 7,5 триллионов операций в секунду. Очевидно, не обойтись без использования молекулярных систем при конструировании запоминающих устройств. Высший пилотаж современных информационных технологий – это создание памяти на основе ДНК. На единицу площади ДНК содержит информации в 100 000 раз больше чем современный винчестер. Уже появились сообщения о первых сверхминиатюрных нанокomпьютерах, в которых роль символов играют буквы ДНК А, Т, Г, Ц.

В научно-исследовательских работах, а также в практической медицине находят применение микрочипы – микроустройства с нанесенными на пластину кремния микроколичествами ДНК, РНК или пептидов. Технология микрочипов позволяет автоматизировать поиск мутаций, исследовать экспрессию генов в норме и при патологии, осуществлять диагностику заболеваний.

Главная задача исследований в так называемую постгеномную эру – это отыскать гены в огромном поле ДНК-ового текста. Поиск генов осложняется тем, что нет четких знаков препинания между генами, а методы классической генетики не применимы к человеку. Тем не менее, в настоящее время специалисты в области информационной биологии разработали алгоритмы для

поиска генов и успешно их используют. Эти данные сверяются с экспериментальными данными.

Секвенирование генома человека открывает постгеномную эру, характеризующуюся возникновением и развитием новых направлений биологии и медицины. Среди них протеомика, медицинская геномика и молекулярная медицина, геновая терапия, геновая диагностика, фармакогенетика, онкогеномика, психогеномика, геновая дактилоскопия, сравнительная геномика, геноинформатика и др.

На уровне современных знаний о функционировании геномов появилась возможность создавать синтетические геномы с заданными параметрами. Сначала создаются библиотеки взаимозаменяемых фрагментов ДНК и потом из них собираются искусственные генетические конструкции, системы, с заданными свойствами, может быть даже не мыслимыми для обычных живых организмов.

По мере изучения ДНК и геномов существенное изменение претерпело само определение гена.

Первое определение гена на молекулярном уровне предложено в начале 40-х гг. XX века на основании изучения генетики нейроспоры. В 1945 году Бидл и Татум сформулировали гипотезу "один ген – один фермент", согласно которой ген – это участок ДНК, который отвечает за синтез определенного белка-фермента, катализирующего определенную метаболическую ступень. Случайное изменение в гене – мутация может привести к утрате его функции. Прямое доказательство того, что ген действительно определяет структуру белка, было получено в 1957 году Ингремом, показавшим, что наследственное заболевание крови серповидноклеточная анемия обусловлена одной аминокислотной заменой в структуре в-цепи гемоглобина и, соответственно, точечной нуклеотидной заменой в ДНК гена. Поскольку многие белки образованы более чем одной полипептидной цепью и только в таком виде функционируют, было уточнено, что один ген соответствует одной полипептидной цепи. Но и это определение оказалось не достаточно точным. Это приве-

ло к формулировке: ген – это область, кодирующая один фермент. Затем это понятие уточнили еще более: ген – это область ДНК, кодирующая одну полипептидную цепь белка или одну структурную РНК (тРНК, рРНК, мяРНК). Этим представлениям не противоречил открытый в 70-х гг. феномен прерывистости генов эукариот. А вот открытие альтернативного сплайсинга определенно требовало внесения поправки в определение гена. Дело в том, что интрон-экзонное строение многих генов обеспечивает возможность кодирования в одном гене более чем одной полипептидной цепи за счет альтернативного сплайсинга, за счет транскрипции с разных промоторов, редактирования РНК и других механизмов. Подходит такое определение: ген – это последовательность ДНК, которая транскрибируется как отдельная единица и кодирует одну или несколько полипептидных цепей белка или РНК. Например, ген CD44 кодирует более 1000 полипептидов, играющих важнейшую роль в регуляции иммунного ответа. В общем случае ген, состоящий из 100 п.н. может кодировать 4^{100} полипептидов. Кроме, генов, кодирующих белковые молекулы, существует множество генов, продуктами которых являются все типы некодирующих РНК, являющихся конечными продуктами транскрипции этих генов. Это транспортные и рибосомные РНК, малые интерферирующие РНК, малые ядерные и малые цитоплазматические РНК, многочисленные микроРНК, рибопереключател и др. типы РНК, играющие роль в регуляции экспрессии генов. В связи с вышесказанным наиболее приемлемое определение гена следующее. Ген – это участок ДНК (или РНК у РНК-овых вирусов), в котором заложена информация о структуре одной или нескольких полипептидных цепях белка или молекул РНК. Или по-другому – ген- это последовательность нуклеотидов между старт-сигналом и стоп-кодоном и кодирующая одну полипептидную цепь или РНК. Получается, что наиболее общий признак гена, это то, что это – транскрибируемый участок ДНК.

Гены находятся в доменах. Домены – это петли ДНК, закрепленные на внутренней мембране ядра. В одной петле локализовано от одного до нескольких генов. Петли разграничены друг от друга инсуляторами, участками

некодирующей ДНК.

Координированное функционирование многих генов в клетке обеспечивается наличием в их структуре регуляторных областей, а непосредственно генетическая информация о структуре полипептида или РНК содержится в его структурной части. Регуляторные элементы генов состоят из промоторов, энхансеров, сайленсеров и других, контролирующих работу гена сайтов, которые могут располагаться на значительном расстоянии от структурной части гена, а также внутри гена (например в интроне). В отличие от структурной части гена, его регуляторные участки не транскрибируются, а служат местом связывания с белками- факторами транскрипции. В структурной части большинства эукариотических генов имеются кодирующие участки – экзоны, и некодирующие – интроны. Суммарный размер интронов зачастую многократно превышает таковой для экзонов. Транскрибируются и экзоны, и интроны, а затем из первичного транскрипта РНК вырезаются интроны и сшиваются экзоны сплайсингом.

Совокупность всех генов называется генотипом конкретного организма. При этом имеются в виду все аллели генов, если организм диплоидный или большей пloidности.

По хромосомам гены распределены неравномерно. Например, в 19 хромосоме один ген встречается на 100 тыс. п.н., а во 2-ой, 13-ой и Y-хромосоме приблизительно 0,15 – 0,7 генов на 100 тыс. п.н. Для сравнения в геноме бактерий находится более тысячи генов на млн. п. н. Между генами существуют знаки пунктуации, которые определяют начало и конец транскрипции гена, например, ТАТА-бокс. Подавляющее большинство генов человеческого генома имеют экзон-интронную структуру. При этом размеры интронов значительно превышают размеры экзонов. Максимальным по размерам является ген дистрофина. Он занимает в геноме $2,4 \times 10^6$ п.н. Наибольшую кодирующую последовательность имеет ген титин. Его размер 81 000 п.н. Он чемпион по числу интронов (178) и по длине единственного экзона (17×10^6 п.н.). Показано, что экзоны, как правило, кодируют отдельные домены полипептидов.

Обнаружены в геноме человека так называемые гены-матрешки, когда последовательность одного гена включает и последовательность другого. Часто один белоккодирующий ген располагается в интроне другого. В РНК-овом гене может располагаться белок-кодирующий ген. Например, в гене рРНК митохондрий содержится ген гуманина, белка, играющего ключевую роль в апоптозе. Может быть и наоборот – ген, кодирующий белок, располагается в участке для синтеза рРНК. Ярким примером последних являются интроны, часто на порядок превышающие суммарный размер экзонов.

В геномах про- и эукариот открыты перемещающиеся последовательности – *мобильные генетические элементы (МГЭ)*. Это особые последовательности в ДНК, способные удаляться и встраиваться в случайное место на ДНК. В их составе есть гены ферментов, необходимых для процесса перемещения. По сути, это – внутригеномный паразит, существующий за счет механизма собственного поддержания и размножения.

Впервые МГЭ были выявлены в 1947 г. Барбарой МакКлинтон при изучении явления генетической нестабильности у кукурузы. Она показала, что изменение окраски зерен в початке обусловлено перемещением по геному гена *Ds*, которые происходят в митозе. В 70-х гг. XX в. молекулярный механизм этого явления был расшифрован – был открыт мир мобильных генетических элементов или *транспозонов*. Подвижные элементы часто называют по особенностям их перемещения: *Magellan*, *Beagle*, *hobo* – бродяга; *gypsy* – цыган и др. Транспозон, подвижный в прошлом и заякоренный в настоящее время, остроумно назван Авророй. Открытие транспозонов опровергло догму о неизменности последовательности нуклеотидов по длине хромосомы при жизни одного поколения. Встраиваясь в окрестности гена, транспозоны могут вызывать инсерционные мутации. Так, у дрозофилы подавляющая часть спонтанных мутаций (до 80 %) обусловлена внедрением транспозонов.

В геноме типичный МГЭ выглядит как участок ДНК, ограниченный по флангам (фланкированный) короткими повторами, либо комбинацией коротких повторов.

Общепринято разделение мобильных элементов на два класса по структуре и механизму перемещения: 1) *ретротранспозоны*, чей механизм перемещения включает обратную транскрипцию, характерны в основном для эукариот; 2) *ДНК-транспозоны*, встречаемые у прокариот и эукариот.

МГЭ составляют от 10 до 80 % генома эукариот: в геноме человека - до 45%, в геноме *Drosophila melanogaster* - 15 %, у некоторых растений — 50-80%. Присутствие и активность МГЭ обеспечивает геному повышенную мутабельность. МГЭ также подразделяют на *активные* и *неактивные*. Активные МГЭ несут весь набор генов, необходимый для транспозиции, неактивные - утратили или повредили эти гены в результате мутаций.

Образование новой копии ретротранспозона начинается с транскрипции его ДНК, затем с образовавшейся молекулы РНК, которую называют РНК-интермедиат, происходит образование ДНК-копии методом обратной транскрипции. Далее ДНК-копия внедряется в геном, используя фланкирующие повторы. Таким образом, ретротранспозоны распространяются по геному.

ДНК-транспозоны в своем составе несут ген транспозазы, ключевого фермента, осуществляющего процесс транспозиции, т. е. вырезание из одного участка ДНК и встраивания в другой.

Очевидно, что наличие МГЭ является фундаментальным свойством геномной ДНК клеток и что они выполняют важную структурную, регуляторную, функциональную и эволюционную роль.

Как уже говорилось, гены собраны в семейства. Принадлежность к семейству определяется сходством нуклеотидных последовательностей в экзонах. В геноме человека около сотни таких семейств специфичны для человека, остальные имеются и у других видов. Члены одного семейства в эволюции вероятно возникли из одного гена - предшественника путем дупликации. Гены внутри семейства могут располагаться рядом и следовать друг за другом. Например, гены рРНК и гены гистонов расположены в геноме в виде кластеров. В семействе встречаются и псевдогены, обозначаемые буквой "ц". ц-Гены обычно не содержат ни промоторов, ни интронов. В них, как правило,

много мутаций. Экзон-интронная структура генов способствует образованию новых генов на основе старых путем перетасовки экзонов и интронов.

Главное, что вытекает из достижений программы «Геном человека», что очень небольшая часть генома кодирует белки (менее 1,5%), транскрибируется в рибосомные и транспортные типы РНК, большая же часть генома насыщена последовательностями с неизвестными функциями. В настоящее время становится очевидным, что так называемая некодирующая ДНК содержит информацию, способ кодировки которой существенно отличается от триплетного генетического кода, и которая определяется конформационными особенностями двойной спирали ДНК. Конформационные коды ДНК находятся в суперпозиции к триплетному генетическому коду.

Секвенирование генома человека показало его усложнение по сравнению с другими организмами. В геноме человека по сравнению с другими представителями животного мира увеличено число генов, участвующих в иммунологических процессах, развитии и функционировании нервной системы, транскрипции, трансляции и апоптозе. Тем не менее в геноме человека наблюдается сравнительно небольшое увеличение генов, кодирующих белки, – в 2 раза больше, чем у червя *C. elegans* и мухи *D. melanogaster*. Значит, усложнение генома человека связано не с увеличением числа генов, кодирующих белки, а с увеличением числа белков за счет сложных механизмов регуляции, альтернативного сплайсинга, посттрансляционной модификации, нелинейной сети регуляторных процессов.

Полученные сведения о геноме человека окажут со временем огромное влияние на медицину и на всю нашу жизнь. Уже сейчас ощущаются выгоды от полученных результатов – появились новые методы генетического тестирования, находящие применение в медицине и криминалистике, методы генной терапии, трансгенеза и т. д., сопряженные, правда, с рядом этических проблем. Однако для полномасштабного использования результатов выполненного проекта дело дойдет не скоро. Сейчас ученые только прочли всю последовательность нуклеотидов в хромосомах человека. Если эту информа-

цию записать на бумаге, она займет 6 000 км, 200 томов по 1 000 страниц каждый. Однако не гигантский объем информации является препятствием для ее использования, а то, что мы фактически мало знаем о ее назначении. Оказалось, что геном человека включает всего 30 000 генов, занимающих около 3 % ДНК. Остальная часть ДНК не кодирующая. Представление о том, что она является мусорной, не доказано. Основатель проекта Джеймс Уотсон считает, что полученную информацию придется осмысливать в течение нескольких десятилетий. Второй этап исследований как раз и связан с изучением функций генома. В 1998 г. стартовали два проекта – немецкий и американский, посвященные сопоставлению геномов приматов, отряда, к которому принадлежит и человек. Еще Клавдий Гален во II в. н. э., проанатомировав много обезьян, сказал, что это “смешные копии” людей. В настоящее время выяснено, что обезьяны и люди похожи не только внешне, но и на уровне ДНК. ДНК человека и шимпанзе идентичны более чем на 90 %. Между тем перепутать человека и шимпанзе нельзя. Парадокс! Какие же гены делают человека человеком? Пока это остается загадкой. Но уже есть убеждение, что изменения происходят не в генах, а в их регуляции.

Глава 6. РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

Репликация – это процесс воспроизведения ДНК, обеспечивающий передачу генетической информации из поколения в поколение и развитие многоклеточного организма из оплодотворенной яйцеклетки. На основании структуры ДНК, состоящей из двух комплементарных антипараллельных цепей, можно легко представить, что цепи при репликации расходятся, а потом каждая цепь служит матрицей, по которой синтезируется комплементарная ей цепь ДНК. В каждой дочерней клетке хромосомы состоят из одной двуспиральной молекулы ДНК, одна цепь которой является родительской, а другая

– вновь синтезированной. Такой характер репликации получил название полуконсервативного (рис. 14).

Рис. 14. Полуконсервативный принцип репликации ДНК

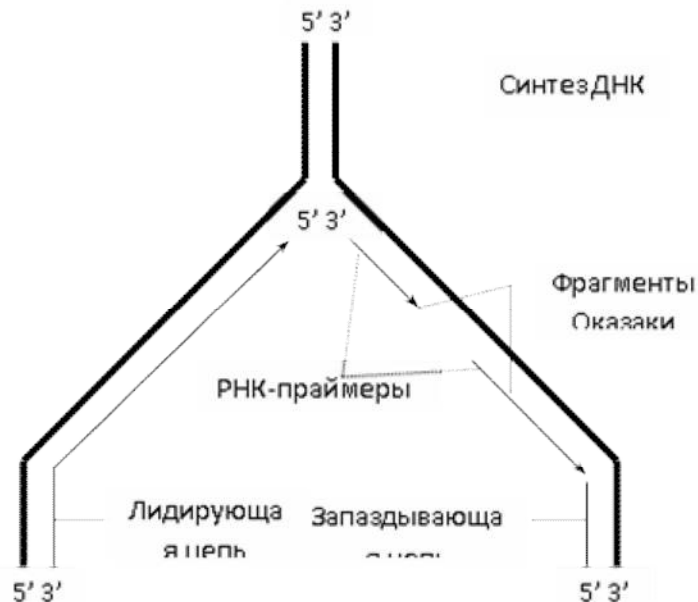


Рис. 15. Схема репликации ДНК

В эукариотических клетках репликация приурочена к определенному периоду клеточного цикла, который называется S-фазой. Чтобы приступить к делению, клетки должны получить сигнал. Обычно это сигналы от факторов роста, которые, связываясь со своими лигандами на поверхности клеток, посылают сигнал к их делению.

Инициация репликации. Чтобы началась репликация, цепи ДНК должны разделиться хотя бы на время. Для этого используются специальные ферменты ДНК-геликазы. Сайты инициации репликации имеют определенные А-Т богатые последовательности ДНК. Они называются ориджин (origin). В геноме их может быть тысячи. К ориджинам присоединяется множество молекул белка DnaA, после чего происходит разделение нитей ДНК. Это помогает основному расплетающему цепи ферменту хеликазе. Используя энергию

АТФ, хеликазы они быстро движутся по одиночной цепи, разрывая водородные связи. Процесс плавления цепей ДНК начинается в точке начала репликации, которая называется репликационным глазком (рис. 15). Далее продолжается локальное расплавление участка ДНК в обоих направлениях с образованием репликативной вилки. В этом процессе участие принимают также топоизомеразы, сложно организованные ферменты, способные релаксировать топологическое напряжение молекулы ДНК за счет внесения одно- и двухцепочечных разрывов в ДНК. Чтобы репликационная вилка могла двигаться, не удвоенная скрученная часть ДНК должна вращаться. Это обеспечивают ферменты – топоизомеразы. Они вносят в цепь ДНК одно- и двухцепочечные разрывы, позволяющие цепям раскрутиться, а потом заделывают эти разрывы.

У млекопитающих топоизомераза I участвует в выборе точки начала репликации в фазе G1 и в разделении цепей ДНК и начале движения вилки. С образовавшейся одноцепочечной ДНК связываются особые белки SSB (single strand binding), которые обладают сродством к одноцепочечной ДНК вне зависимости от нуклеотидной последовательности. Таким образом, не происходит обратное соединение расплетенных нитей ДНК.

Осуществляет репликацию фермент ДНК-полимераза, а его субстратами являются дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, полимеризующиеся на одной цепи ДНК (рис. 16).

Фермент наращивает цепь ДНК в направлении 5'-3', при этом присоединение нового нуклеотидного остатка сопровождается гидролизом богатой энергией связи между первым и вторым фосфорными остатками в дезоксирибонуклеозидтрифосфате и отщеплением пирофосфата, что делает реакцию энергетически выгодной. ДНК, имеющая огромные размеры, реплицируется с высокой скоростью – у бактерий 500 пар нуклеотидов в секунду, у человека – 50. При этом соблюдается высокая точность репликации. Так, у человека при репликации ДНК длиной 3 млрд. пар нуклеотидов возникает не больше трех ошибок. Это обеспечивается во многом работой самой ДНК-

полимеразы, которая осуществляет коррекцию, дважды проверяя соответствие каждого нуклеотида матрице – перед включением его в состав цепи и перед тем, как присоединить следующий нуклеотид. Очередная фосфодиэфирная связь образуется только при условии, что последний включенный нуклеотид образовал правильную уотсон-криковскую пару с нуклеотидом матрицы. Если произошла ошибка, фермент перемещается в обратном направлении и вырезает неправильное звено.

ДНК-полимераза не может начать синтез на ДНК-матрице, а способна только добавлять новые нуклеотиды к уже имеющейся полинуклеотидной цепи. Поэтому она нуждается в затравке. Роль затравки выполняет короткая последовательность РНК, синтезируемая из рибонуклеозидтрифосфатов ферментом РНК-полимеразой (праймазой), который, в отличие от ДНК, способен инициировать синтез комплементарной цепи по матрице. В процессе репликации затравка удаляется, а бреши застраиваются ДНК-полимеразой с высокой точностью.

Рис. 16. Образование репликационной вилки и репликационного глазка.

Отдельные белки, участвующие в репликации, объединены в крупный комплекс, включающий около 20 полипептидов и называющийся реписомой. После окончания репликации каждая хромосома представлена двумя копиями ДНК, которые остаются связанными в области центромер до наступления митоза. Различные области хромосомы в S-фазе реплицируются в

разное время. При этом активный хроматин реплицируется в ранней S-фазе, а высококонденсированный хроматин – в поздней. В митозе по одной копии ДНК оказывается в дочерних клетках.

Есть еще один принцип репликации. Дело в том, что новая цепь ДНК растёт только в направлении 5'-3'. Вспомнив, что цепи ДНК антипараллельны, легко представить, что только одну матричную цепь фермент может считывать непрерывно, на второй матричной цепи фермент, работая в том же направлении, считывает отдельные небольшие фрагменты длиной от 100 до 1000 нуклеотидов. Эта цепь ДНК называется отстающей, в отличие от другой – ведущей, а фрагменты в честь обнаружившего их ученого фрагментами Оказаки. После удаления РНК-затравки бреши застраиваются, как и на ведущей цепи. Удаление праймера на отстающей цепи приводит к укорочению 5'-конца дочерней цепи на размер первого праймера (10–20 нуклеотидов). При этом 3'-конец материнской цепи оказывается выступающим, он называется оверхенг (рис. 17).

Рис. 17. Схема, иллюстрирующая возникновение 5'-недореплицированного конца хромосомы и синтез теломерной ДНК с помощью теломеразы

Укорочение хромосом в каждом цикле репликации примерно на 50 нуклеотидов происходит во всех соматических клетках организма. Однако это не приводит к нарушению функции хромосом. Это обусловлено тем, что на концах хро

Рис. 17. Схема, иллюстрирующая возникновение 5'-недореплицированного конца хромосомы и синтез теломерной ДНК с помощью теломеразы

момеры существуют особые структуры – теломеры, образованные ДНК в комплексе с белками. Существование таких структур на концах хромосом было постулировано в 1938 г. классиками генетики, лауреатами Нобелевской премии Барбарой Мак-Клинток и Германом Меллером. Лишенные теломер хромосомы сливаются, что ведет к тяжелым генетическим аномалиям. В последние годы выяснилось, что теломеры не только предотвращают деградацию и слияние хромосом, но и ответственны за прикрепление их к ядерной оболочке. Теломерная ДНК представлена многократно повторенными гексамерами TTAGGG, общая длина которых у человека может достигать 10 тыс. пар нуклеотидов. Поскольку теломерные последовательности ДНК не являются кодирующими, их укорочение в каждом раунде репликации лишь сокращает нетранскрибируемый текст теломеры. Тем не менее это не проходит для клетки даром. Через определенное число делений концевая недорепликация приводит к дестабилизации генома, клетки впадают в состояние, называемое по-английски senescence – одряхление, и затем погибают.

В 1961 г. Леонард Хейфлик опубликовал результаты своей многолетней работы, свидетельствующей о том, что в культуре ткани, несмотря на обновление питательной среды, клетки делятся ограниченное число раз, что существует счетчик, считающий эти деления. После исчерпания этого предела (предел Хейфлика) клетки погибают. В 1967 г. наш соотечественник, ныне здравствующий А. М. Оловников на основании общих представлений о механизмах репликации предположил, что при репликации линейной матрицы происходит ее недорепликация. Реплика всегда короче, чем матрица. Он высказал также гипотезу, о том, что постепенное укорочение хромосом может лежать в основе ограниченного для каждого вида клеток потенциала деления, так называемого предела Хейфлика. Гипотеза Оловникова долгое время

оставалась умозрительной, пока не был обнаружен и выделен фермент, который может реплицировать концы хромосом. Фермент назвали теломеразой. Теломераза – это РНК-содержащий белок, который осуществляет синтез ДНК по РНК-матрице, т. е. фермент обладает свойствами обратной транскриптазы. РНК в его составе служит матрицей для синтеза теломерной ДНК, а белок катализирует этот процесс. Механизм действия теломеразы связан с повторным копированием, включающим этап элонгации, когда дезоксирибонуклеотиды добавляются к 3'-концу цепи теломеры и транслокацией фрагмента на конец новообразованной цепи (рис. 18).

Гены теломеразы работают в половых, опухолевых клетках и в клетках иммортализованных (бессмертных) культур. Возникает вопрос, какова роль репрессии теломеразы в соматических клетках? Можно считать установленным, что репрессия теломеразы ответственна за старение клеток в культуре ткани (предел Хейфлика) и, возможно, имеет отношение к старению организма.

Рис. 18. Этапы синтеза теломерного повтора теломеразой

В 1998 г. средства массовой информации сообщили о том, что американским ученым удалось преодолеть предел Хейфлика. Вместо того чтобы умереть, клетки человека в культуре ткани оставались юными, т. е. они потеряли способность стариться. Газеты откликнулись на это сообщение сенсационными заявлениями, что генетики нашли средство от старения, что таким образом достижимым представляется бессмертие. Действительно, ученым удалось заставить работать один из генов теломеразы в клетках, в которых он был молчащим. Открывает ли это путь к бессмертию?

Не все ясно в этом вопросе. На самом деле укорочение теломер скорее всего действительно является индикатором количества делений клеток, и

только. Механизмы старения разнообразны. Например, у мышей теломера в 3 раза длиннее, чем у человека, но при этом они не живут дольше человека. В то же время получены мыши, у которых ген теломеразы нокаутирован, т. е. от не работает ни в каких клетках. У этих мышей наблюдаются признаки раннего старения, подобные тем, которые возникают у людей при прогерии Вернера (синдроме раннего старения) и продолжительность жизни животных оказалась сниженной на 25 %. Однако из этих исследований можно сделать важные выводы. Известно, что в злокачественных клетках теломераза активна, и это один из главных механизмов, обеспечивающих бессмертие опухолевых клеток. Следовательно, если избирательно ингибировать эту активность в опухолевых клетках, можно добиться торможения роста опухоли. В настоящее время это одно из направлений в терапии опухолей. Так, испытываются ингибиторы теломераз, ингибиторы теломеразной РНК, антисенс-терапия и т. д.

Итак, принципы репликации заключаются в следующем.

Комплементарность – каждая из двух цепей материнской молекулы ДНК служит матрицей для синтеза дополняющей ее, т. е. комплементарной дочерней цепи.

Полуконсервативность – в результате репликации образуются две двойные дочерние спирали, каждая из которых сохраняет в неизменном виде одну из цепей материнской ДНК.

Униполярность - ДНК-полимераза перемещается по матричным цепям в направлении от 3' к 5'-концам. При этом синтез комплементарных цепей всегда ведется от 5' к 3', т. е. униполярно.

Прерывистость – одна цепь ДНК (лидирующая) реплицируется непрерывно, а другая (отстающая) прерывисто – в виде фрагментов по несколько сот нуклеотидов, фрагментов Оказаки.

Потребность в затравке – ДНК-полимераза не способна начать синтез ни лидирующей цепи, ни фрагментов Оказаки. Она может лишь наращивать уже имеющуюся полинуклеотидную цепь. Начальный концевой 5'-участок – за-

травку, или праймер, размером до 20 нуклеотидов синтезирует особая форма РНК-полимеразы, называемая ДНК-праймазой.

Недорепликация ДНК – удаление праймеров, комплементарных 3'-концам ДНК приводит к укорочению ДНК в каждом цикле репликации.

Глава 7. РЕПАРАЦИЯ ДНК

Последовательность оснований во вновь образованной цепи ДНК должна быть воспроизведена правильно, поскольку информация, которую она несет, необходима клетке и всему организму в течение всей жизни. Включение даже одного неправильного основания может привести к серьезным последствиям вплоть до летального исхода. Однако при огромном количестве нуклеотидов ДНК ошибки неизбежны. Механизм, с помощью которого ДНК-полимераза подбирает правильный нуклеотид к основанию матрицы, основан на том, что в соответствии с моделью Уотсона–Крика все пары комплементарных оснований имеют одинаковую геометрическую форму, отличную от любой другой пары оснований и это строго распознается ферментом. Образование водородных связей между правильными парами и между основаниями одной цепи также способствуют правильному выбору, поскольку это сопряжено с высвобождением энергии. Этот механизм имеет предел точности. ДНК-полимераза может совершать ошибки с частотой одно основание на 10^6 оснований. Это дало бы слишком большой уровень мутаций.

ДНК является объектом атаки многих физических и химических факторов. Они называются мутагенными. Репарация ДНК – это свойство восстанавливать повреждения, возникающие вследствие действия мутагенных факторов. Мутагенные факторы весьма разнообразны по своей природе и многочисленны. Это и физические, и химические, и биологические факторы. В клетке ДНК находится в виде полианиона и ее нативная структура сохраняется в виде двунитевой структуры только при существовании определенной

концентрации катионов. Изменение этой концентрации также может оказывать сильный мутагенный эффект.

Одними из наиболее распространенных биологически активных веществ, влияющих на ДНК, являются ионы металлов, таких как медь, кадмий, ртуть. Даже при малых концентрациях они приводят к локальным повреждениям ДНК – распаду двойной спирали, одно- и двунитевым разрывам, что проявляется хромосомными aberrациями, точечными мутациями и другими нарушениями структуры и функции ДНК. Совместное действие ионов металлов и ионизирующих излучений приводит к резкому усилению (синергизму) их влияния на хромосомные перестройки. Это показали многие экспериментальные исследования, а также исследования животных и людей, оказавшихся в зоне катастрофы на Чернобыльской АЭС.

Другая группа биологически активных веществ – это органические молекулы, природного происхождения и синтетические. Их можно разделить на две подгруппы: 1) вещества, при взаимодействии с ДНК укладывающиеся в бороздки ДНК и взаимодействующие с фосфатными группами и атомами азотистых оснований; 2) вещества, встраивающиеся между плоскостями оснований и называемые интеркаляторами. К первой группе относится ряд активных современных противомикробных и противоопухолевых лекарственных препаратов – дистамицин, нетропсин и др. Механизм их действия обусловлен ингибированием деятельности ферментов, обеспечивающих функционирование генетического аппарата микроорганизмов и опухолевых клеток. Ко второй группе относятся широко распространенные акридиновые красители, антрациклиновые антибиотики (адриамицин), краситель этидий бромид и противомаларийное средство акрихин. Встраиваясь между соседними парами оснований ДНК, они деформируют двойную спираль ДНК, изменяя ее гибкость. Алкилирующие соединения (циклофосфан, алкеран, сарколизин и др.) осуществляют замену протонов, участвующих в водородных связях, на алкильные группировки CH_3 и C_2H_5 . Многие интеркаляторы являются хорошими люминофорами, т. е. светятся в определенном спектре лу-

чей. Поэтому их используют для люминесцентного окрашивания ДНК *in vivo*. Избирательное связывание красителя с ДНК может быть обеспечено и ковалентным присоединением его к олигонуклеотиду, специфически связывающемуся с конкретным сайтом ДНК. Такие олигонуклеотиды называются антисмысловыми, или антисенсолигонуклеотидами. Использование их может повысить избирательность действия химиопрепарата. При этом гарантируется сохранение функции генома хозяина.

Спонтанные мутации, которые встречаются с частотой 1 на 10^9 , очень быстро изменили бы нуклеотидные последовательности ДНК, если бы не было механизма репарации.

Открытие и детальное изучение процессов репарации ДНК, произошедшее сравнительно недавно, менее полувека назад, стало одним из интереснейших и важных достижений молекулярной биологии. В настоящее время описано много механизмов репарации. Одни более просты и происходят непосредственно после мутагенного воздействия, другие требуют синтеза новых ферментов и поэтому отсрочены во времени. Некоторые реакции идут до того, как клетка вступит в новую фазу деления; другие могут проходить и после того, как клетка закончит деление. Главный принцип репарации ДНК основан на том, что при изменении информации в одной цепи, во второй она сохраняется в неизменном виде. В 1994 г. ферменты репарации были названы молекулами года.

Рассмотрим некоторые виды репарации.

1. Репарация образования димеров пиримидиновых оснований. Двойная связь между пятым и шестым атомами углерода в составе пиримидиновых оснований ДНК может рваться под влиянием мутагенов, в частности ультрафиолетового света. В результате атомы остаются связанными одной связью, а при разрыве и этой связи образуются две свободные валентности. Они могут замкнуться с образованием димера пиримидинового основания. (рис. 19). Для исправления димеризации существует фермент фотолиаза, который распознает димеры, присоединяется к ним и разрывает непопусти-

тельную связь. Фототиаза активируется светом. Этот фермент есть у про- и эукариот, у человека его нет.

2. Репарация O⁶-алкилированного гуанина. Алкилирующие соединения, в частности, присоединяют метильную группировку к гуанину (Рис. 20). В клетке есть метилтрансферазы, которые захватывают метильную группу от метилированного гуанина и восстанавливают структуру ДНК. Как правило, в клетке образуется достаточно молекул метилтрансфераз, чтобы обеспечить нужды репарации. В противном случае мутации такого рода не будут репарированы.

Рис. 19. Образование димеров тимина

3. Репарация АП-сайтов (отсутствие пуринов или пиримидинов) за счет прямой вставки пуринов и пиримидинов. При некоторых типах повреждений ковалентная связь между сахаром и основанием (гликозидная связь) рвется, в результате чего в цепи образуется брешь. Исходный неповрежденный вид ДНК восстанавливают ферменты инсертазы.

4. Репарация односторонних разрывов ДНК. Такой тип повреждений индуцируется ионизирующим облучением. В восстановлении повреждения участвуют ферменты полинуклеотидиллигазы, которые восстанавливают разорванные концы ДНК.

Рис 20. Метил-гуанин

5. Эксцизионная репарация. Механизм ее подобен хирургическому вмешательству, когда поврежденные участки вырезаются, а образовавшиеся бреши восстанавливаются неповрежденным материалом. Это происходит за счет работы гликозилаз, которые узнают поврежденные основания ДНК, присоединяются к ним, разрывают гликозидные связи и образуют АП-сайты. Восстановление последних описано выше. Другим типом эксцизионной репарации является более сложная и энергетически более дорогая реакция вырезания значительного участка цепи ДНК перед и позади повреждения (рис. 21). Этот тип репарации осуществляется целым комплексом ферментов. Так, у человека вырезание поврежденного участка идет при совместной работе 17 ферментов, называемых эксинуклеазой, застройка бреши также требует участия нескольких ДНК-полимераз.

6. Репарация неспаренных оснований. Включенные в строящуюся цепь некомплементарные нуклеотиды называются мисмэтчами. Исправление такого рода нарушений осуществляет ДНК-полимераза. Двигаясь в направлении от 5'-конца синтезируемой цепи к 3'-концу, она может делать шаг назад и вырезать последний нуклеотид, если он некомплементарен нуклеотиду материнской цепи. В этом случае матричная цепь служит эталоном. Как фермент узнает, какую цепь надо исправить? В принятии решения ему помогает метилирование аденина в положении ГАТЦ в матричной, но не в дочерней цепи. В дочерней цепи до окончания репликации аденины еще не метилированы.

7. SOS-репарация. Что происходит, когда клетка подошла к моменту репликации ДНК, а ни одна из перечисленных репарационных систем не смогла устранить повреждение? Репликация застопорится при первом же встреченном нарушении и если их к клетке много, она обречена на гибель. В

этих условиях в клетке активируется весьма рискованный механизм репликации. Индуцируется синтез ряда белков, которые соединяются с ДНК-полимеразой, «загрубляют» ее работу и такой подпорченный комплекс становится способным строить дочернюю цепь напротив подпорченной матричной цепи. Естественно при этом возникает много мутаций. Механизм удачно назвали SOS-репарацией, имея в виду аналогию с международно признанным сигналом бедствия (SOS – спасите наши души!). Клетка в результате спасается от гибели, ее ДНК оказывается удвоенной, хотя и с ошибками. Однако, если затронуты жизненно важные функции, она в дальнейшем все равно погибнет. Если же переживет, ее потомки навсегда будут нести последствия мутационной катастрофы.

Повреждение отдельных этапов репарации ведет к развитию наследственных заболеваний. У человека список таких болезней пополняется все новыми примерами.

Рис.21. Схема посттрансляционной репарации ДНК

Глава 8. ТРАНСКРИПЦИЯ

В 50-х г. Ф. Крик сформулировал знаменитую догму молекулярной биологии – генетическая информация, хранящаяся в ДНК, передается белкам через РНК по схеме ДНК – РНК – белок. Современная схема этих процессов представлена на рис. 22.

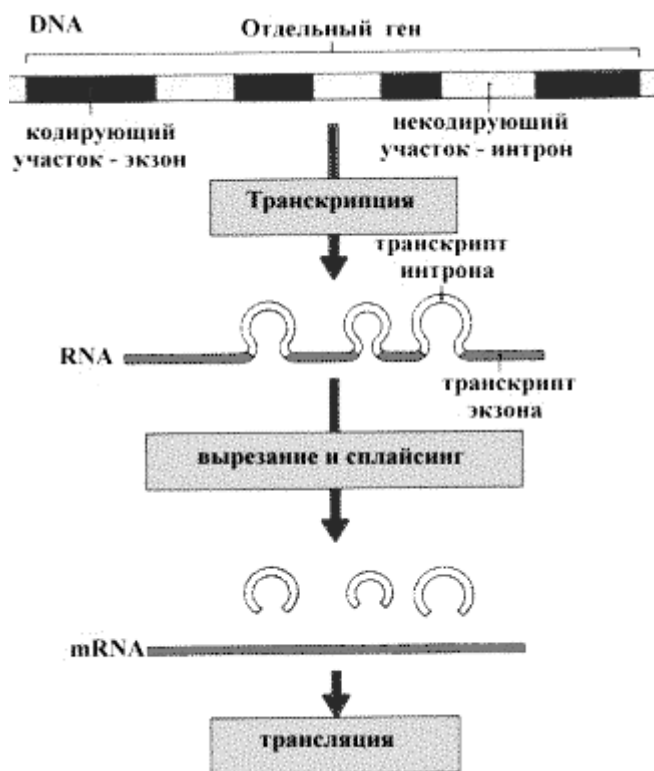


Рис. 22. Общая схема реализации генетической информации

В 1962 г. РНК-переносчик информации от ДНК была найдена у разных про- и эукариотических организмов. Ее называли матричной или информационной РНК – мРНК. Процесс образования мРНК на ДНК-матрице называли транскрипцией (от англ. Transcriptio – переписывать). В дальнейшем было показано, что все типы РНК в клетке – это результат транскрипции.

Синтез матричной РНК катализирует фермент РНК-полимераза; в эукариотических клетках их три типа – I, II и III. РНК-полимераза II осуществляет транскрипцию белковых генов, I – рибосомных РНК, III – транспортных и малых ядерных РНК. Строительным материалом для синтеза РНК служат аденил-, гуанил-, цитозил- и урацилрибозилтрифосфаты. При этом, как и при репликации ДНК, основным принципом синтеза является принцип комплементарности азотистых оснований.

Для того чтобы началась транскрипция, две цепи ДНК должны временно разъединиться, транскрибируется всегда одна цепь ДНК. Однако в других

клетках или в этой же клетке, но при другой ситуации может транскрибироваться другая нить в составе ДНК этого гена. Фермент РНК-полимераза способна инициировать синтез новой цепи, поэтому, в отличие от ДНК-полимеразы, ей не нужен праймер. РНК-полимераза осуществляет последовательное наращивание цепи РНК, используя в качестве субстратов рибонуклеозидтрифосфаты и одну из цепей ДНК в качестве матрицы. По сравнению с длинной молекулой ДНК молекула РНК невелика. Ее длина соответствует участку ДНК, в котором закодирована информация для синтеза одной полипептидной цепи белка или РНК. Поскольку в клетке одновременно синтезируется множество белков, то и образуется множество мРНК. У прокариот они оказываются непосредственно в цитоплазме, где и находится белоксинтезирующий аппарат, а у эукариот поступают в цитоплазму из ядра.

Цепь ДНК, служащую матрицей для синтеза РНК, называют матричной, а противоположную - нематричной. Последовательность нуклеотидов в матричной РНК такая же, как в нематричной цепи ДНК. Поэтому условимся называть нематричную цепь ДНК кодирующей и смысловой, а матричную – некодирующей и несмысловой.

5' CGATGCAT 3' – нематричная, кодирующая, смысловая цепь ДНК

3 GCTACGTA 5 – матричная, некодирующая, несмысловая цепь ДНК

5' CGATGCAT 3' – цепь мРНК.

Понятно, что ген функционирует только в качестве матрицы для синтеза РНК, последовательность оснований в которой соответствует нематричной цепи ДНК. Другими словами, ген – это фрагмент ДНК, который транскрибируется в РНК. Большая группа генов кодирует транспортные, рибосомные РНК и другие типы РНК, которые не являются матричными. Их роль в биосинтезе белка и в регуляции генной активности будет описана позднее.

Транскрипция мРНК проходит в три фазы – инициация, элонгация и терминация.

8.1. Фаза инициации

Фаза инициации начинается с распознавания точки инициации. Это обеспечивается благодаря наличию в генах промоторных районов, функция которых заключается во взаимодействии со специальными белками, обеспечивающими посадку РНК-полимеразы в начале старта транскрипции гена. Рассмотрим сначала, как эта фаза проходит у прокариот (рис. 23). У прокариот транскрипция осуществляется единственным ферментом РНК-полимеразой, которая состоит из нескольких отдельных взаимодействующих друг с другом субъединиц. РНК-полимераза присоединяется к промотору. Промоторы генов бактерий имеют определенную нуклеотидную последовательность, узнаваемую РНК-полимеразой. Однако для успешного связывания с промотором РНК-полимеразе помогают белки – сигма-факторы. Сначала РНК-полимераза в комплексе с сигма-фактором связывается с промотором, после чего сигма-фактор отсоединяется, а РНК-полимераза начинает синтез РНК. Промотор – РНК-полимераза узнает

Анализ последовательностей промоторов генов *E.coli* выявил следующие особенности их организации: наличие в районе старта транскрипции пуринов – последовательности САТ; наличие в окружении позиции -10 гексамера, гомологичного последовательности ТАТААТ; в окружении позиции -35 наличие гексамера, гомологичного последовательности TTGACA; расстояние между последовательностями «-35» и «-10» 16-18 нуклеотидов (спейсер). Мутации в сайтах -10 и -35 ингибируют транскрипцию. В настоящее время известно около десяти сигма-факторов, играющих роль в распознавании районов инициации транскрипции разных генов. РНК-полимераза *E.coli* - белок с четвертичной структурой. Нолю-фермент (полный) состоит из 5 субъединиц – α , β , β' , γ , ω . Без ω – это core-фермент. α узнает расплавленные области промотора. Нолю-фермент связывается с промотором и начинает транскрипцию после этого α уходит и далее элонгацию осуществляет core-фермент.

Существуют белки, которые в клетках бактерий выключают и включают гены, они называются соответственно репрессорами и активаторами. Репрессоры и активаторы связываются определенным сайтом на ДНК – оператором, который перекрывается с промотором. О регуляции генной активности у прокариот см. главу 10. Единицей транскрипции у прокариот является оперон. В 1961 году Ф. Жакоб и Ж. Мано предложили теорию оперона. Оперон – это группа генов, у прокариот их называют цистронами, функции которых тесно связаны в метаболизме. В начале оперона расположен промотор, перекрывающийся с регуляторным сайтом – оператором, затем идут несколько цистронов - каждый из которых кодирует один полипептид или одну РНК, и терминатор. Оперон весь либо активен, либо не активен. Если оперон активен, с него транскрибируется полицистронная мРНК, служащая матрицей для синтеза всех белков оперона.

Связываясь с ДНК, молекулы репрессора препятствуют присоединению РНК-полимеразы, таким образом регулируется, в частности, транскрипция генов, кодирующих белки, необходимые для расщепления сахаров.

Рис. 23. Транскрипция и ее регуляция у прокариот

Механизм действия репрессора обусловлен его взаимодействием с оператором. Иногда оператор перекрывается с областью промотора. При достаточном количестве сахара он взаимодействует с репрессором, изменяет его конформацию, после чего такой репрессор уже не способен связываться с ДНК. В результате начинают работать гены, обеспечивающие расщепление сахаров. Белок-активатор соединяется с участком ДНК, отстоящим от промотора, изгибает молекулу ДНК и, взаимодействуя с РНК-полимеразой, обес-

печивает эффективный синтез РНК. Затем мРНК сразу же связывается с рибосомами и транслируется с образованием белка.

Транскрипция у эукариот намного сложнее (рис. 24). Она осуществляется с участием РНК-полимераз трех типов – I, II, III. РНК-полимераза I транскрибирует гены рибосомных РНК большой субъединицы рибосомы; РНК-полимераза II – мРНК и некоторые малые ядерные и малые ядрышковые РНК; РНК-полимераза III – транспортные РНК, рибосомные РНК малой субъединицы рибосомы, малые ядерные РНК. Промоторы генов, транскрибируемых каждым из типов РНК-полимеразы, имеют свои особенности. Синтез РНК должен начаться с точно определенного места – нуклеотида на матрице ДНК. Каким же образом фермент РНК-полимераза Рис. 24. Транскрипционные комплексы эукариот

оказывается в нужном месте? Сам по себе фермент сайт инициации

транскрипции узнавать не может. В этом ему помогают белки – факторы транскрипции, при взаимодействии с которыми РНК-полимераза теряет способность неспецифически связываться с любым отрезком ДНК и связывается со стартовой позицией, находящейся в регуляторной части гена – промоторе.

Нельзя забывать, что ДНК в хромосомах плотно упакована, прежде всего, в нуклеосомы. Очевидно, что расположение нуклеосом определяет доступность ДНК для транскрипционных факторов и РНК-полимеразы. Существует класс транскрипционных факторов, которые могут связаться не с самой двойной спиралью ДНК, а с нуклеосомой как целым. Это так называемые затравочные транскрипционные факторы. К ним относится, например, FoxA. Однако большинство транскрипционных факторов конкурирует с гистоновым октамером за связывание с ДНК. Экспериментально показано, что промоторы транскрипционно активных генов чаще всего свободны от нуклеосом, а промоторы неактивных генов заняты нуклеосомами, которые удаляются в ходе активации этих генов. Механизм позиционирования нуклеосом связывают с во-первых, с конкурентным и кооперативным связыванием

транскрипционных факторов, а во-вторых, с работой АТФ-зависимых молекулярных моторов – белков, называемых ремоделерами хроматина, которые могут изменять нуклеосомы, переставлять их на другие места либо удалять. В настоящее время принимаются также две другие точки зрения относительно связи транскрипции с нуклеосомной упаковкой ДНК. Первая – РНК-полимераза отодвигает нуклеосому по мере элонгации транскрипции и вторая – РНК-полимераза может осуществлять транскрипцию через нуклеосому. В последнем случае нуклеосомные белки – октамеры гистонов – осуществляют поистине акробатические движения, чтобы позволить РНК-полимеразе перемещаться без разрушения нуклеосомы.

Некоторые гены, их называют генами домашнего хозяйства, экспрессируются постоянно, другие – тканеспецифические, их еще называют генами роскоши, – только в клетках определенных тканей, третьи – активируются гормонами и т. д. Эта сложная регуляция активности генов осуществляется факторами транскрипции, белками, специфически связывающимися с ДНК. Причем в активации одного и того же гена может участвовать целый комплекс разных факторов транскрипции. В отсутствие факторов транскрипции гены находятся в выключенном состоянии.

Регуляторные районы генов – промоторы, сайленсеры, энхансеры – располагаются преимущественно в некодирующих районах генов. Они могут находиться в 5'-области гена недалеко от точки инициации транскрипции, на очень большом расстоянии от нее, а также в интронах и 3'-области. Некоторые сайты могут распознаваться несколькими транскрипционными факторами, принадлежащими к одному семейству. Но есть и такие примеры, когда один и тот же сайт узнают разные факторы из разных семейств.

ДНК-связывающие белки взаимодействуют с двуспиральной ДНК, при этом сайт-специфическое связывание происходит между боковыми группами аминокислотных остатков и основаниями ДНК в области промотора. Для промотора эукариот общим является мотив ТАТА, называемый ТАТА-боксом.. Эти взаимодействия происходят в основном в большой бороздке

ДНК. ДНК-связывающие белки сгруппированы в несколько семейств. Главные из них – белки с мотивами типа спираль-виток-спираль, белки с мотивами типа лейциновой молнии, белки с мотивами типа цинковых пальцев, гомеодоменные белки и др. Регулирующие элементы генов – сайты для связывания факторов транскрипции у эукариот подразделяются на три типа регулирующих элементов генов – коровый промотор, энхансер и сайленсер. Если провести вполне допустимую в данном случае аналогию с работой автомобиля, то коровый промотор – это включение зажигания, энхансер – это акселератор, а сайленсер – тормоз. Энхансер и сайленсер (их может быть несколько для одного гена) могут находиться на большом отдалении от корового промотора, при этом взаимодействуя с факторами транскрипции, они могут изгибать ее так, что разные факторы транскрипции оказываются сближенными. Таким образом, факторы транскрипции, связывающиеся с коровым промотором (базальные факторы), необходимы для инициации транскрипции во всех генах, а взаимодействие их с энхансерами и сайленсерами определяет, с какой скоростью эта транскрипция будет идти. Одни и те же факторы транскрипции могут участвовать в регуляции активности разных генов, но набор их для разных генов отличается. В настоящее время многие представители семейств факторов транскрипции расшифрованы, что позволяет в ряде случаев управлять генной активностью.

В настоящее время показано, что к ТАТА-боксу промотора присоединяются базальные факторы транскрипции, прежде всего ТВР (ТАТА-binding protein). ТВР после этого связывается с семьей белками комплекса ТАФ (ТАТА-activating factors) и весь образовавшийся комплекс узнается РНК-полимеразой. Фермент состоит из большого числа субъединиц, его молекулярная масса более 500 кД. В процессе транскрипции наблюдается его модификация, например фосфорилирование. Образовавшийся белковый комплекс, в котором присутствует РНК-полимераза, отодвигает нуклеосому и расплетает ДНК. По мере расплетания ДНК происходит образование мРНК; мРНК образуется только на одной цепи ДНК. Какая из цепей ДНК будет транскри-

бирова́ться, определяется промотором. У разных генов могут транскрибироваться разные цепи.

Регуляция транскрипции достигается благодаря высокоспецифичным взаимодействиям факторов транскрипции с сайтами ДНК и между собой (рис. 25). Тем самым обеспечивается образование активирующего комплекса вблизи старта транскрипции или, наоборот, создание структуры, препятствующей транскрипции. Необходимо отметить, что образование кодируемого данным геном белка определяется не только транскрипцией, но и зависит от ряда химических превращений новообразованной молекулы мРНК на пути превращения ее в зрелую мРНК.

Рис. 25. Регуляция транскрипции стероидными гормонами.

Фаза элонгации. Цепь РНК растет в направлении 5' – 3'. На стадии элонгации транскрипционный комплекс отличается поразительной стабильностью, позволяющей РНК-полимеразе, не покидая матрицы, синтезировать молекулы РНК длиной до 10^4 н. в случае бактерий и до 10^6 н. – в случае эукариот. Комплекс, состоящий из гибрида ДНК-РНК, РНКполимеразы, неспаренной нематричной нити ДНК, неспаренной нити РНК позади гетеродуплекса, а также переднего и заднего (относительно хода транскрипции) ДНК-дуплексов, принято называть элонгационным комплексом, потому что все эти элементы действуют как единое целое. В его составе РНКполимераза легко скользит относительно нуклеиновых кислот, обеспечивая расплетание и заплетание гетеро- и гомодуплексов. Очень приблизительная аналогия работы этой транскрипционной машины – это движение застёжки “молния”. Сразу же после начала транскрипции к 5'-концу мРНК присоединяется метилированный гуанин – кэп, защищающий мРНК от деградации и участвующий впоследствии в инициации трансляции.

Фаза терминации. Для терминации транскрипции необходима дестабилизация элонгационного комплекса. В случае бактерий это происходит в результате взаимодействия РНКполимеразы со специальными последовательностями РНК, закодированными в ДНК, – терминаторами. Для узнавания терминаторов РНКполимеразе требуются специальные белковые факторы. Важную роль в структуре терминаторов играют шпилечные структуры в РНК. Конкретный механизм дестабилизации элонгационного комплекса пока не установлен.

8. 2. Созревание информационных РНК, кодирующих белки

По своим свойствам мРНК про- и эукариот отличаются. Бактериальные мРНК нестабильны (период полураспада несколько минут), они не претерпевают процессинга после синтеза и могут транслироваться в белок еще до окончания транскрипции. Все это обеспечивает быстрый контроль белкового синтеза на уровне транскрипции. В отличие от этого, мРНК эукариотических клеток стабильны, период их полураспада составляет несколько часов и даже дней. Их транскрипция и трансляция разобщены. Транскрипция происходит в ядре, а трансляция – в цитоплазме. Эукариотические мРНК синтезируются в виде предшественников, которые проходят потом стадию созревания, или процессинга. В отличие от прокариотических мРНК, которые содержат информацию для синтеза нескольких полипептидных цепей, т. е. являются полицистронными, мРНК эукариот кодируют только одну полипептидную цепь. Из всей массы мРНК, образовавшихся в ядре, только небольшая часть созревает и достигает цитоплазмы (не более 5 %) Остальные разрушаются в ядре.

К 60-м г. XX в. в молекулярной биологии сложилось представление о колинеарности гена, т. е. ген – это непрерывный сегмент ДНК, который транскрибируется в такой же сегмент мРНК, а последняя транслируется в белок. Однако это представление было опровергнуто в 1977 г. работами Ф. Шарпа и П. Робертса, показавшими, что у аденовируса единственная моле-

кула мРНК соответствует четырем различным сегментам ДНК. Когда они сделали гибридизацию этих молекул, то обнаружили в ДНК петли, видные в электронном микроскопе. В результате был сделан вывод о том, что ген имеет прерывистое или мозаичное строение. Он состоит из кодирующих участков – экзонов и не кодирующих – интронов. Предшественник мРНК содержит и экзонные, и интронные участки, но при созревании мРНК копии интронов вырезаются, а копии экзонов сшиваются. Оказалось, что экзон-интронная структура генов является скорее правилом, а гены без интронов – исключением. Гены бактерий обычно не содержат интронов.

Таким образом, эукариотические мРНК синтезируются в виде предшественников и затем проходят стадию созревания, или процессинга (рис. 26). Процессинг включает: 1) кэпирование 5'-конца, т. е. присоединение метилированного гуанина; 2) полиаденилирование 3'-конца; 3) вырезание копий интронов и воссоединение копий экзонов через обычную фосфодиэфирную связь – сплайсинг. Все стадии процессинга проходят в ядре, только после этого мРНК выходят через ядерные поры в цитоплазму. В результате удаления интронов мРНК значительно укорачивается.

Рис. 26. Созревание информационной РНК

Кэпирование 5'-конца происходит почти сразу после начала транскрипции; 5'-кэп играет важную роль в инициации трансляции мРНК и защите ее от деградации ферментами; 3'-конец мРНК также подвергается модификации. Она заключается в том, что растущий транскрипт расщепляется в определенном месте и к 3'-концу специальная полимеразы добавляет полиадениловый хвост из 100–200 остатков аденина.

Основная роль в механизме сплайсинга (рис. 27) принадлежит малым ядерным РНК (мяРНК), которые кодируются специальными генами. Они должны претерпеть некоторые модификации в цитоплазме, прежде чем станут активными. В цитоплазме они образуют комплексы с белками, узнающими, в частности, метилированный гуанин. После этого весь комплекс возвращается в ядро; мяРНК присоединяется к копии интрона по правилу Уотсона–Крика. Удаление копии интрона возможно, если на границе с экзонами находятся так называемые незаменимые канонические нуклеотиды GU – на одном конце и AG – на другом. мяРНК образуют двойные спирали с копиями интронов. При этом в двойную спираль не входит А. Именно этот А обладает особой реакционной способностью. В результате образуется ковалентная эфирная связь между гидроксилом рибозы А и фосфатной группой первого нуклеотида интрона G. Возникшая структура напоминает лассо. Пространственная структура взаимодействующих участков молекул РНК обеспечивает каталитические реакции разрыва одних межнуклеотидных связей и возникновение других. Реакция сплайсинга осуществляется в крупном рибонуклеопротеидном комплексе, включающем несколько молекул РНК и белков. Эта структура получила название сплайсосомы. В некоторых случаях вырезание интрона осуществляется без участия белков. Такое явление называется аутосплайсингом.

Аутосплайсинг открыт у *Tetrahymena*, бактериофага Т4, в некоторых митохондриях и хлоропластах. Известно два класса таких самосплайсирующихся интронов. Одни используют для вырезания активированный гуанин, другие – аденин. Реакция катализируется самой РНК, однако белки тоже могут участвовать в ней, значительно ускоряя процесс.

Оказалось, что копии экзонов, если их несколько, могут сшиваться в разных комбинациях. Более того, экзон в некоторых случаях может выступать в роли интрона и наоборот. Такое явление выбора путей созревания молекулы мРНК получило название альтернативного сплайсинга. Число вариантов зрелых молекул мРНК, содержащих разные наборы экзонов, может быть доста-

точно большим. Таким образом, экзон-интронная структура гена оказывается чрезвычайно экономичной, обеспечивая большое разнообразие белков, образующихся при транскрипции одного гена! Рекордсменом по числу белков, получающихся в результате альтернативного сплайсинга, является гликопротеин CD44. В его центральной части имеется тандем из 10 альтернативно сплайсирующихся экзонов, включение или делетирование которых позволяет продуцировать более 1 000 изоформ белка! Альтернативный сплайсинг нередко является механизмом ингибирования полноразмерного продукта. Так, альтернативный сплайсинг ряда рецепторов цитокинов приводит к образованию усеченных с С-конца растворимых рецепторов, не способных проводить сигнал в клетку. Известно, что интроны могут вести себя как регуляторные элементы гена, к ним присоединяются факторы транскрипции.

Из сказанного выше следует, что сплайсинг обеспечивает регуляцию работы генов, следовательно, участвует в процессах дифференцировки. Разные транскрипты одного гена могут образовываться также за счет инициации транскрипции

Рис. 27. Механизм сплайсинга ядерных РНК

с разных промоторов и за счет окончания ее с участием разных терминаторов.

8. 3. Транскрипция генов рРНК

Многие белки в клетках синтезируются в большом количестве, но кодируются они лишь одной копией гена в гаплоидном геноме. При этом с одной мРНК может синтезироваться до 10 белков в минуту, а в каждом клеточном цикле до 10 000 белков с одной матрицы. В случае рибосомных РНК аналогичный механизм невозможен, так как они являются конечными продуктами генов. Как же в этом случае решается вопрос о необходимости клетке огром-

ного множества копий рРНК для образования рибосом? Выход один – иметь множество генов, кодирующих рРНК. Так, в клетках человека содержится до 200 копий гена рРНК на гаплоидный геном. Они расположены в нескольких хромосомах человека в виде серии tandemных кластеров, разделенных спейсером. Гены рРНК транскрибируются РНК-полимеразой I. Сначала синтезируется РНК длиной в 13 000 нуклеотидов. Перед тем как выйти в цитоплазму в виде собранной рибосомной частицы она подвергается разрезанию. Гены тРНК, мРНК и 5SrРНК транскрибируются РНК-полимеразой III. Сборка рибосом осуществляется в ядре в области ядрышка. В составе ядрышка находятся петли ДНК, содержащие гены рРНК. Это и есть ядрышковый организатор.

Глава 9. ТРАНСЛЯЦИЯ

Информация, записанная в ДНК, очень важна для работы клетки и функционирования всего организма, однако она мертва без работы белков, которые осуществляют все процессы реализации этой информации. Что бы ни происходило в клетке, все это связано с работой, которую осуществляют белковые молекулы. Белки, или протеины, составляют более половины сухого вещества клетки. Действие генов управляется белками, которые специфически связываются с определенными участками ДНК. Белки с невероятной точностью распознают и взаимодействуют с другими молекулами. Белки-ферменты, связываясь с субстратами, регулируют скорость протекания биохимических реакций. Белок-белковые взаимодействия обеспечивают работу мышц, гормональный контроль синтетических процессов, генерацию нервных импульсов, развитие иммунологических реакций и многое другое.

Трансляцией называется процесс синтеза белков. В эукариотических клетках он происходит в цитоплазме после выхода мРНК из ядра и присоединения их к рибосомам

9.1. Фазы трансляции и ее регуляция

Синтез белка или трансляция – это одно из главных событий в жизни клетки. Информация в виде чередования дезоксирибонуклеотидов на одной из двух комплементарных цепей гена сначала переписывается на одноцепочечную молекулу информационной РНК – это процесс транскрипции. На следующем этапе по матрице мРНК строится последовательность аминокислотных остатков полипептида, фактически осуществляется перевод (translation) последовательности нуклеотидов в последовательность аминокислотных остатков в белке.

Итак, зрелая мРНК выходит в цитоплазму, где она подвергается трансляции. Зная последовательность ее нуклеотидов, можно ли определить последовательность аминокислот в белке? Оказывается сделать это не просто.

мРНК эукариот – сложные структуры. Они включают помимо информации об аминокислотной последовательности кодируемого белка (транслируемая область), достаточно протяженные нетранслируемые области (НТО) на обоих концах молекулы 3'-НТО и 5'-НТО. В этих районах мРНК содержится информация о их поведении в клетке, активности, времени жизни и т. д. (рис. 28).

Рис. 28. Структура информационной РНК

Процесс трансляции делится на три фазы: инициация, элонгация и терминация. Наиболее ответственной фазой является фаза инициации трансляции. У эукариот в основном на этом уровне происходит регуляция синтеза белка.

Начало трансляции не совпадает с началом мРНК. Известно, что она начинается с первого от 5'-конца метионинового кодона AUG. Это действи-

тельно так, однако чтобы кодон AUG стал иницирующим, он должен находиться в соответствующем контексте последовательностей нуклеотидов. Если первый кодон AUG оказался в неподходящем контексте, он пропускается и инициация осуществляется со следующего AUG. Для инициации трансляции большинства мРНК также важно наличие кэп-структуры на 5'-конце мРНК и полиА на другом ее конце. Указанные структуры узнаются белками, необходимыми для трансляции. Интересно, что контекст может существенно изменить генетический код. Так, аминокислота селеноцистеин, очень важная для функционирования клеток, кодируется одним из терминирующих кодонов UGA в соответствующем контексте.

Животные клетки используют несколько способов регуляции синтеза белка на уровне трансляции. Практически во всех случаях она осуществляется в фазе инициации.

Матричная активность разных мРНК может сильно различаться. Очень сильными матрицами являются вирусные РНК, а также клеточные, кодирующие мажорные белки, например глобины. Матрицы для белков, присутствующих в клетке в небольших количествах, являются слабыми. Сила матрицы определяется на уровне инициации трансляции. На сильных матрицах инициация происходит часто, на них нанизывается много рибосом. На слабых – наоборот. Осуществляют регуляцию специфические белки, которые связываются в 5'-НТО вблизи иницирующего кодона. Изменяя конформацию мРНК, они могут снижать доступность 5'-конца мРНК для белоксинтезирующего аппарата. Регуляторами могут выступать продукты трансляции данной мРНК, т. е. наблюдается ауторегуляция. Примером такой регуляции является синтез ферритина (рис. 29), который, в свою очередь, зависит от содержания в клетке железа – в присутствии железа он синтезируется, а при его отсутствии трансляция соответствующей мРНК останавливается на стадии инициации. Оказалось, что это зависит от шпилечной структуры в 5'-НТО мРНК. При отсутствии железа этот регулирующий элемент связывается со специальным белком, препятствующим сканированию 5'-НТО рибосомами.

Этот белок имеет сродство к ионам железа и при связывании с ними перестает связываться с ферритиновой мРНК. В результате включается инициация трансляции последней. Вновь синтезированный ферритин отнимает железо у белка-репрессора, который опять связывается с регуляторной областью ферритиновой мРНК. Репрессор – это аконитаза – фермент, цикла Кребса.

Рис. 29. Регуляция железом трансляции мРНК ферритина и стабильности мРНК рецептора трансферина

3'НТО отвечает за стабильность мРНК, которая варьирует в широких пределах – от десятков минут полужизни до десятков дней. Нестабильность мРНК рецептора трансферина в присутствии железа (рис. 30) определяется шпильчатыми структурами в 3' НТО. Регулирующим белком и в этом случае является акотиназа. Однако при этом она стабилизирует мРНК и позволяет ей активно транслироваться.

Одним из способов регуляции трансляции является маскирование мРНК, когда соответствующие мРНК становятся недоступными не только для трансляции, но и для других ее превращений, например разрушения нуклеазами. При этом маскирующий белок связывается с 3'НТО, что приводит к глобальной структурной перестройке мРНК.

Клетка использует также способ регуляции трансляции под названием тотальная репрессия, она обусловлена фосфорилированием факторов инициации, таких как IF2, что приводит к выключению инициации трансляции всех мРНК клетки. Причиной этого могут быть тепловой шок, недостаток ростовых факторов, вирусное поражение и др.

Таким образом, для эукариот характерна наработка мРНК не по потребности, а впрок. Такие стабильные мРНК не сразу вступают в трансляцию, а только тогда, когда это необходимо. Если необходимость в продукте транс-

ляции отпадает, мРНК может быть инактивирована перечисленными выше путями.

9. 2. Аппарат трансляции

Аппаратом трансляции являются несколько сот разных молекул нуклеиновых кислот и белков. Главными участниками этого сложного процесса являются мРНК, тРНК, АРС-азы и рибосомы. Именно благодаря трансляции существует представление о дискретных единицах генетической информации. Здесь уместно вспомнить о генетическом коде (см. гл. 4).

Многие свойства генетического кода реализуются молекулами ферментов аминоксил-тРНК-синтетазами (АРС-азами) и тРНК. Триплетность и неразрывность кодонов мРНК–матрицы обеспечивается антикодоном тРНК, выделенным в петле тРНК специальными модифицированными нуклеотидами. Таким образом, соответствие между триплетом нуклеотидов и аминокислотой устанавливается не во время синтеза белка на рибосоме, а в процессе присоединения аминокислоты к определенной молекуле тРНК. Если к тРНК присоединится неправильная аминокислота, она включится в состав белка вместо правильной. Это может привести к изменению или потере свойств данной молекулы белка. Поэтому именно дорибосомному этапу в биосинтезе белка уделяется в последние годы наиболее пристальное внимание.

9. 3. 1. Транспортные РНК (тРНК). Дорибосомный этап синтеза белка

тРНК (рис. 30) состоят примерно из 70–90 нуклеотидов. В тРНК организмов, принадлежащих к разным макротаксонам, выявляются консервативные участки, принимающие участие во взаимодействии с белками и рРНК. Есть так называемые полуконсервативные участки, содержащие только пуриновые или только пиримидиновые основания. Характерным свойством тРНК является присутствие нескольких модифицированных (минорных) оснований – риботимидина(Т), Псевдоуридина (Ш), 5,6-дигидроуридина (D),

инозина (I) и др. Они образуются в определенных позициях тРНК в результате посттранскрипционных модификаций. Вторичная структура у всех тРНК похожа на лист клевера. Она образуется:

D-шпилькой из дигидроуридиловых остатков, различающихся у разных тРНК,

ТШ-шпилькой, имеющей постоянную последовательность нуклеотидов,

антикодоновой (АС) шпилькой, содержащей ровно 7 нуклеотидов, представляющей собой адаптерный конец тРНК, три нуклеотида которого комплементарны кодону мРНК

АА – акцепторным стеблем, на 3 й конце которого универсальная последовательность ССА,

вариабельной петлей (V), сильно различающейся по длине у разных тРНК. Все спаренные участки шпилек образуют двойную спираль.

При образовании трехмерной структуры тРНК складывается в типичную L-образную структуру (рис. 32). Если кодоном на мРНК является UUU, то антикодомом в тРНК, соответствующим кодону, будет AAA и такая тРНК будет связывать фенилаланин. Известно, что аминокислоты закодированы в генетическом коде 61 кодоном. Можно предполагать, что столько же должно быть и антикодонов, т. е. разновидностей тРНК. В действительности тРНК меньше. Некоторые тРНК своим одним антикодомом узнают несколько кодонов на мРНК. Это достигается за счет механизма неоднозначного соответствия или качания. Это означает, что в отношении взаимодействия кодон–антикодон правило Уотсона–Крика выполняется не полностью. Первый и второй нуклеотиды антикодона строго следуют правилам комплементарности, а взаимодействие с третьим нуклеотидом кодона позволяет некоторую нестрогость при спаривании, неоднозначность спаривания.

Благодаря этому свойству каждое семейство кодонов для одной аминокислоты может обеспечиваться одним антикодомом. Исходя из этого для считывания всей кодовой таблицы достаточно всего 31 тРНК. Например, в

мРНК кодоны GCC и, значит GCU кодируют аланин. Антикодон, который спаривается и с тем и с другим кодоном, может быть CGG

Рис. 30. Укладка РНК в виде клеверного листа

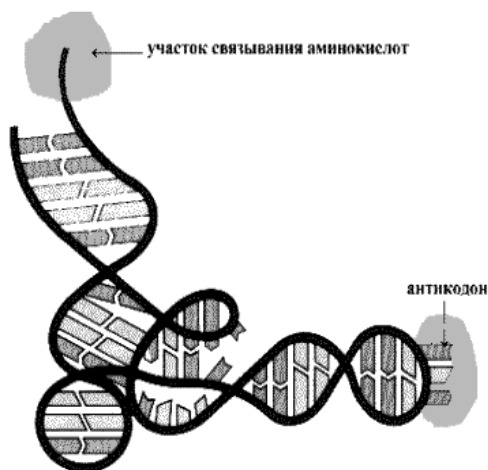


Рис. 31. L-образная структура тРНК

Для всех молекул тРНК характерно присутствие большого числа разнообразных модифицированных нуклеотидов, часто называемых минорными. Во всех видах тРНК число их превышает 60. Среди них много метилированных производных.

За счет комплементарных участков цепь тРНК складывается в характерную вторичную структуру. Благодаря спариванию оснований образуется двуспиральный стебель с петлей из неспаренных оснований. Такая структура получила название клеверного листа — четыре стебля и три петли (см. рис. 30). Стебель с петлей формируют ветвь. Иногда в структуре тРНК присутствует дополнительная вариабельная V-ветвь. За счет взаимодействия элементов вторичной структуры образуется третичная структура, называемая L-формой из-за сходства с соответствующей буквой латинского алфавита (см. рис.31).

В каждой клетке присутствует более, чем 20 видов индивидуальных тРНК, потому что несколько различных тРНК могут соединяться с одной и той же аминокислотой, такие тРНК называются изоакцепторными.

Транспортные РНК обладают двумя главными функциями: акцепторной, т. е. способностью ковалентно связываться с аминокислотным остатком, и адапторной, т. е. способностью узнавать триплет и обеспечивать поступление аминокислоты на законное место в растущей полипептидной цепи. Присоединение аминокислоты к тРНК (аминоацилирование) катализируется ферментами аминоацил-тРНК-синтетазами (АРС-азами). В клетке имеется 20 индивидуальных АРС-аз. АРС-азы с высокой степенью специфичности узнают свою тРНК (все изоакцепторные тРНК) и соответствующую ей аминокислоту. Очевидно, для этого у всех изоакцепторных тРНК должны быть некие общие свойства, распознаваемые одним и тем же ферментом. В настоящее время показано, что это определяется нуклеотидами, занимающими одни и те же места в структуре большинства тРНК. Они включают, прежде всего нуклеотиды антикодона, нуклеотид в положении 73, предшествующий ССА-концу, первые три пары нуклеотидов акцепторного стебля. Экспериментальные данные показывают, что одни и те же участки тРНК узнаются АРС-азами из разных организмов. После специфического узнавания тРНК АРС-азой происходит подгонка двух макромолекул в результате изменения их конформации. АРС-азы осуществляют реакцию аминоацилирования в два этапа:

- 1) активирование аминокислоты – к аминокислоте присоединяется аденозинмонофосфат с образованием аминоациладенилата, который остается в комплексе с АРС-азой, выделяется пирофосфат

- 2) акцептирование аминокислоты молекулой тРНК с образованием аминоацилтРНК, при этом аминокислота оказывается ковалентно присоединенной к ССА концу тРНК в соответствии с генетическим кодом. Таким образом именно на этом дорибосом-

ном этапе происходит перевод генетического кода в последовательность аминокислот в полипептиде.

В ходе эволюции APC-азы приобрели новые домены и дополнительные неканонические функции. Так, известно, что некоторые из них могут участвовать в клеточной гибели путем апоптоза, в регуляции ангиогенезе, в сплайсинге некоторых митохондриальных РНК, регуляции трансляции и т. д.

9. 3. 2. Рибосомный этап синтеза белка

Следующий этап проходит с участием рибосом и поэтому называется рибосомным. Он катализируется самой рибосомой без участия экзогенных ферментов. Итак, рибосома в процессе биосинтеза белка принимает кодированную генетическую информацию от ДНК в виде мРНК и расшифровывает ее, катализирует образование пептидных связей в реакции транспептидации, передвигает цепь мРНК и молекулы тРНК. Таким образом, рибосома – это сложная белоксинтезирующая частица, обладающая генетической (декодирующей), энзиматической (образование пептидных связей) и механической (передвижение мРНК) функциями.

Химически рибосома представляет собой рибонуклеопротеид. Она состоит из комплекса рибосомных РНК и белков. Физически рибосома представляет собой компактную частицу. В функциональном смысле – это молекулярная машина, протягивающая вдоль себя цепь мРНК, считывающая закодированную в мРНК генетическую информацию и параллельно в соответствии с кодом синтезирующая полипептидную цепь белка из поступающих в нее аминокислотных остатков. Электронномикроскопическое изображение рибосомы показывает, что она состоит из двух неравных частиц – большой и малой, довольно лабильно ассоциированных друг с другом. Рибосомные РНК концентрируются ближе к центру частиц, а рибосомные белки занимают периферию. Каждая рибосомная частица содержит много белков, и все они разные. Основная морфологическая черта электронно-микроскопических

изображений рибосомы – это борозда, разделяющая две рибосомные частицы. В одном месте она расширяется, образуя так называемый «глаз». В этой полости размещаются основной субстрат рибосомы – тРНК.

Теперь рассмотрим отдельно малую субъединицу рибосомы. Она разделяется глубокой бороздой на головку и тело. В ней размещается участок связывания мРНК и через нее цепь мРНК протягивается от одного конца к другому в процессе трансляции. В большой субъединице рибосомы тоже есть борозда, разделяющая головку и тело. В ней располагается главный каталитический центр рибосомы, осуществляющий синтез полипептидных цепей.

Трансляция состоит из трех стадий: инициации, элонгации и терминации (рис. 32). Самым ответственным этапом является инициация. Для осуществления ее в клетке имеются специальные механизмы.

Трансляция начинается с того, что мРНК связывается с рибосомной частью. При этом рибосомная частица (у прокариот прямо и непосредственно, а у эукариот после некоторого скольжения вдоль некодирующей части мРНК) специфически взаимодействует с началом кодирующей нуклеотидной последовательности мРНК – с кодоном AUG. Вслед за инициацией рибосома последовательно триплет за триплетом считывает цепочку мРНК, по направлению к 3'-концу, наращивая цепочку полипептида. Этот этап называется элонгацией. Достигнув стоп-кодона, рибосома освобождает синтезированную цепь – это терминация трансляции.

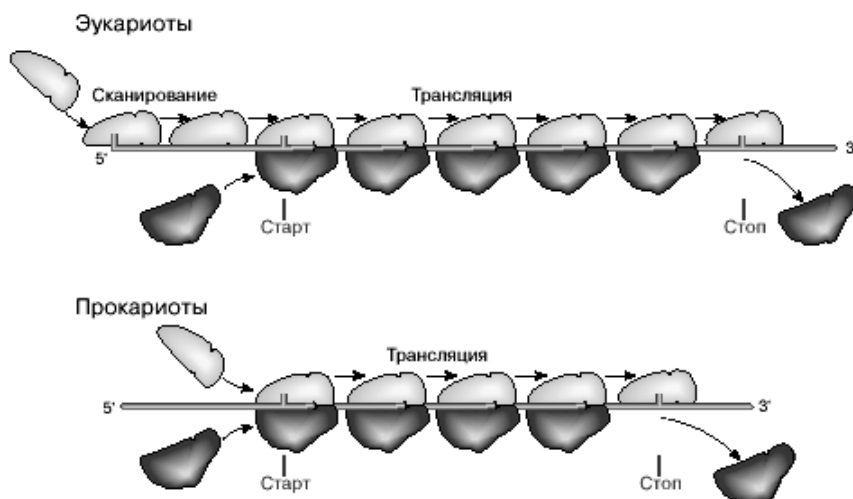


Рис. 32. Трансляция у про- и эукариот

Необходима абсолютно точная инициация, так как правильная трансляция зависит от правильной рамки считывания. Если произойдет сдвиг рамки считывания, то образовавшиеся стоп-кодоны прекратят синтез еще до образования полноразмерного пептида. Дефектный пептид быстро деградирует.

Характерной особенностью инициации трансляции является то, что на этом этапе участвуют не целые рибосомы, а только их отдельные субъединицы (см. рис. 33). Поэтому, чтобы началась трансляция, рибосома должна диссоциировать на две ее составляющие части. Именно малая единица рибосомы, и только она, связывается с мРНК и удерживает ее. При этом в связывании с мРНК вовлечен участок в 30 нуклеотидов, но в каждый момент только две тРНК могут разместиться в рибосоме. Большая единица рибосомы с мРНК никак не взаимодействует.

Все начинается со связывания инициаторной метиониновой тРНК в Р-участке рибосомы с кодоном AUG (рис. 33). Этот же кодон кодирует метионины, находящиеся повсюду в молекуле белка. Оказывается, существуют две разные тРНК для метионина. Одна для инициации, а другая – для добавления метионина в процессе элонгации. Инициаторная тРНК имеет структурные особенности, которые распознаются белковым фактором инициации IF2. По-

следний и доставляет ее к инициаторному комплексу. Элонгаторная метиониновая тРНК распознается другим белковым фактором, который также доставляет ее к рибосоме.

На рибосоме имеются два участка связывания с тРНК. А-участок – акцепторный, т. е. участок, который может быть занят очередной вновь поступающей аминоацил-тРНК. До того как в А-участок придет аминоацил-тРНК, в этот участок входит триплет (кодон), кодирующий аминокислоту, которая должна быть включена в пептид. Другой участок Р-участок – пептидил-тРНК-связывающий, или донорный (рис. 34).

Механизм элонгации заключается в следующем. Инициаторная тРНК поступает в Р-участок. Затем в А-участок малой субъединицы рибосомы поступает тРНК, нагруженная той аминокислотой, которая кодируется следующим за инициаторным кодоном. Получается, что два аминокислотных остатка, каждый из которых присоединен к соответствующей тРНК, находятся вблизи рибосомной пептидилтрансферазы. В таком состоянии происходит реакция транспептидации, т. е. переход метионина из Р-участка рибосомы на свободную аминогруппу аминокислоты в А-участке. В Р-участке тРНК остается ненагруженной аминокислотой, поэтому она высвобождается. Далее тРНК движется из участка А в Р, таща за собой связанный

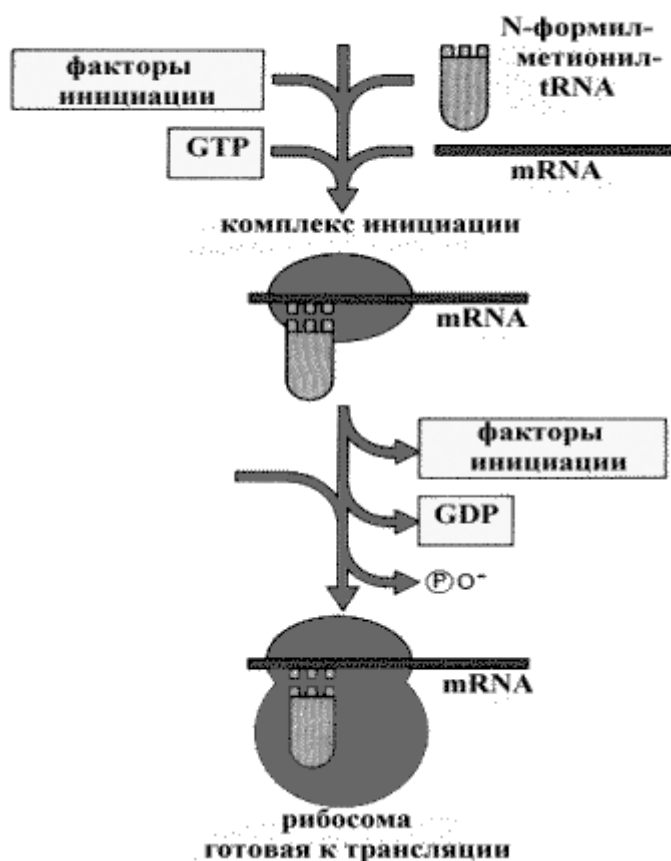


Рис. 33. Инициация трансляции.

с ней триплет мРНК. Так цепь мРНК протаскивается относительно рибосомы ровно на один триплет. В этом процессе участвует фактор EF-G (транслоказа), и теперь в А-участке устанавливается смежный с предыдущим триплет нуклеотидов, т. е. следующий кодон.

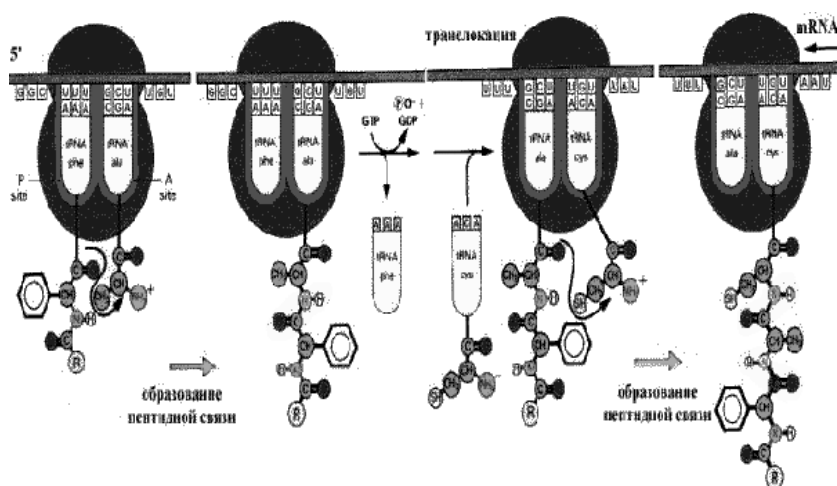


Рис. 34. Элонгация трансляции

Все готово для следующего раунда элонгации. Далее аналогичным способом аминоацил-тРНК, соответствующая вновь установленному в А-участке кодону, связывается с ним. Полипептидная цепь удлиняется на одну аминокислоту, на ту, которая принесена тРНК в А-участок. Сама тРНК, принесшая эту аминокислоту, так и остается с ней связанной, а следовательно, связанной и с удлиненным полипептидом. За образование пептидных связей отвечает большая единица рибосомы. В элонгации участвует много белковых факторов – EF-Tu, EF-G и др. Все они обладают ГТФ-азной активностью.

Итак, мы видим, что на всех этапах синтеза белка работают механизмы, отвечающие за точность этого процесса. Хотя следует заметить, что ошибка в биосинтезе белка не имеет серьезных последствий, так как образуется множество молекул белков. Другими словами, эти ошибки не имеют таких далеко идущих последствий, как ошибки при репликации ДНК.

Глава 10. ПОСТТРАНСЛЯЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ И РОЛЬ ЕЕ НАРУШЕНИЙ В ПАТОЛОГИИ

Образование полипептидной цепи – это только первый шаг в процессе формирования белка. Для образования функционально активного белка полипептидные цепи претерпевают ряд изменений. Для функционирования ряда белков необходимо объединение нескольких полипептидных цепей. Так, гемоглобин образуется при объединении двух α - и двух β -цепей, а также после связывания с ними гемогруппы. Некоторые белки подвергаются гидроксилированию, фосфорилированию или дефосфорилированию. Многие белки синтезируются в виде крупных предшественников, а потом активируются путем отщепления частей полипептидных цепей. Например, сначала образуется проинсулин, затем он расщепляется с удалением N-концевого и внутреннего фрагмента цепи.

Во-первых, за счет взаимодействия аминокислотных остатков полипептиды автоматически сворачиваются, образуя вторичную и третичную структуры (см. рис. 28). Существовало представление, что, поскольку структуру белка определяет лишь последовательность нуклеотидов в гене, сворачивание полипептидной цепи зависит и определяется только последовательностью аминокислот. Для этого утверждения были экспериментальные подтверждения. Так, Anfinsen показал, что, если РНК-азу денатурировать, а потом удалить из раствора денатурирующие агенты, фермент вновь восстанавливал свою нативную структуру и проявлял каталитическую активность. В дальнейшем было выяснено, что не для всех белков это так. Оказалось, что для большинства белков процесс их сворачивания является энергозависимым и ни в коем случае не спонтанным. Он имеет иерархическую природу. Сначала за доли секунды формируются элементы вторичной структуры. Затем также за доли секунды происходит специфическая ассоциация некоторых элементов вторичной структуры с образованием супервторичной структуры – это сочетания нескольких α -спиралей, нескольких β -пластов или смешанные

ассоциаты этих элементов. Далее образуется третичная структура, в основном, за счет гидрофобных взаимодействий. Многие белки составлены из нескольких полипептидных цепей, значит, должны установиться дополнительные контакты между доменами этих цепей. Действительно, в цепи аминокислот имеются практически безграничные возможности ассоциации аминокислотных остатков друг с другом. Если полипептид будет «пробовать» все мыслимые варианты такой ассоциации, пока не достигнет формы нативного белка, ему понадобится несколько миллионов лет. В клетке же это происходит в считанные минуты.

В середине 80-х г. было обнаружено, что в клетке существует особая категория белков, основной функцией которых является обеспечение правильного характера сворачивания полипептидных цепей в нативную структуру. Эти белки названы молекулярными шаперонами. Они не дают полипептиду образовывать нежелательные связи. Это и отражено в их названии (английское слово *chaperone* означает гувернантка). Это целое семейство белков со сходной функцией. Есть еще белки – шаперонины – более сложно устроенные, представляющие собой сложные ологимерные структуры. Несколько олигомеров образуют цилиндр с полостью в центре – канал, в котором и происходит процесс сворачивания белка. Для проникновения белков через мембрану митохондрий и хлоропластов необходимо их развернуть – это тоже делают шапероны. Известно, что синтез шаперонов индуцируется под влиянием теплового шока, стресса, радиации, ультрафиолетового излучения. Поэтому шапероны называют белками теплового шока или белками стресса. По этому их проявлению впервые и были открыты белки теплового шока. Открытие сделано работами Риттозы на политенных хромосомах слюнных желез личинок дрозофилы. При повышении температуры до 37 °C (а оптимум для дрозофилы 20 °C) образовывались пuffs там, где их не было раньше. Идентифицированы эти белки в 1974 г. После денатурации в результате этих воздействий конформацию белков восстанавливают шапероны. Шапероны метят белки, которые должны быть деградированы в лизосомах. Известен

среди них убиквитин, осуществляющий эту функцию (его называют меткой смерти). Шапероны участвуют также в сборке крупных белковых комплексов, работающих как молекулярные машины.

Помимо шаперонов и шаперонинов, в сворачивании(фолдинге) белка принимают участие и другие белки-ферменты. К ферментам, участвующим в фолдинге, относится протеиндисульфид-изомераза, перемещающая дисульфидные связи в полипептидной цепи, разрывая недопустимые и создавая новые S–S связи между остатками цистеина. Другой фермент из этой группы, пептидил-пролилин-изомераза катализирует изомеризацию пептидных связей пролина.

Белки синтезируются в цитоплазме клеток, а также в митохондриях и хлоропластах. Они при этом имеют разные пункты назначения. Какие-то из них остаются в цитоплазме, другие встраиваются в клеточную мембрану, третьи проникают в лизосомы и пероксисомы, четвертые идут в ядро, митохондрии, хлоропласты и т. д.

Рис. 35. Перенос полипептида в цистерны ЭПР

В эукариотических клетках для обеспечения транспорта белков имеется сложный аппарат. Белки, предназначенные для некоторых органелл и цитозоля (водной фракции цитоплазмы), синтезируются на свободных рибосомах, а белки, остающиеся в лизосомах, аппарате Гольджи и в мембранах, синтезируются на рибосомах, ассоциированных с эндоплазматическим ретикулулом (ЭПР). ЭПР – это сложная сеть мембран, ограничивающая огромное количество сплюснутых полостей. ЭПР с прикрепленными к нему рибосомами называется шероховатым, не связанный с рибосомами – гладким. Белки, предназначенные для экспорта к одной из клеточных мембран или внутриклеточным органеллам, имеют так называемую сигнальную последовательность, которая прокладывает белку путь в просвет ЭПР (рис. 35).

Сначала сигнальный полипептид связывается с рибонуклеопротеидной сигнальной распознающей частицей (СРЧ). СРЧ, в свою очередь, связывается с рецептором на мембране ЭПР. Таким образом рибосома прикрепляется к ЭПР. Синтезирующийся полипептид постепенно втягивается в просвет ЭПР через белковую пору. В просвете ЭПР сигнальный пептид отщепляется эндопептидазами. В просвете ЭПР происходит существенная модификация белков, а именно гликозилирование, т. е. присоединение углеводных остатков к NH_2 -группе аспарагина. Далее белки окружаются мембраной, образуя везикулу и отпочковываются от ЭПР. Везикулы доставляют белок в аппарат Гольджи путем слияния его с мембраной (рис. 36).

Аппарат Гольджи является удивительной органеллой эукариотической клетки. Структура его проста – это ряд замкнутых мешочков, ограниченных мембранами, но у него очень важная функция. Аппарат Гольджи сортирует белки, упаковывает их в везикулы и доставляет по точно указанным адресам. Предназначенные для экскреции белки в составе пузырьков мигрируют к плазматической мембране. Далее посредством экзоцитоза они освобождаются из клетки. Например, таким образом происходит секреция ферментов из клеток поджелудочной железы.

Для белков, направляемых в лизосомы, адресом является их углеводная часть. Лизосомы – это небольшие окруженные мембраной внутриклеточные органеллы, содержащие высокоактивные гидролитические ферменты. Эти ферменты узнаются в аппарате Гольджи, происходит их фосфорилирование, после чего они отпочковываются от аппарата Гольджи в виде лизосом. При нарушении фосфорилирования не происходит поступление ферментов в лизосомы и развивается тяжелейшее наследственное заболевание – синдром Гоше.

Рис. 36. Путь полипептидов через аппарат Гольджи

В ЭПР образуются также мембранные липиды и новые мембраны. Интегральные белки мембран идут тем же путем, но за счет гидрофобных аминокислот заякориваются в мембране.

Время существования белков в клетке сильно варьирует. Некоторые белки имеют период полужизни более 20 часов (белки печени – несколько дней), а другие – 10 или даже 2 минуты. Структурные белки и гемоглобин являются долгожителями.

Быстро деградируют белки, содержащие неправильные аминокислоты, что обуславливает их неправильный фолдинг. Белки, пострадавшие от химических воздействий, например окисления, также должны быть уничтожены. В деградации долгоживущих белков участвуют лизосомы.

Нарушения фолдинга белков могут лежать в основе тяжелых наследственных заболеваний человека. В настоящее время показано, что причиной развития вялотекущих заразных губчатых энцефалопатий у животных и человека является изменение фолдинга белка, который называют прионом. Эти заболевания объединяют термином «прионовые». Ген прионового белка очень консервативен и имеется у всех млекопитающих. У человека он кодируется в коротком плече 20-й хромосомы. Формы нормального и прионового белка кодируются одним и тем же геном и имеют одинаковую последовательность аминокислот. А вот их трехмерная форма существенно различается. Несмотря на то что исследования агента, вызывающего эти заболевания, отмечены уже двумя Нобелевскими премиями, окончательная ясность в решении этой проблемы до сих пор отсутствует. Бесспорно одно: заболевание поражает и людей, и животных, и люди могут заразиться от животных, а

также через хирургические инструменты, биопрепараты и т. п. Так что это еще одна экологическая угроза человечеству.

Одна из этих болезней – скрепи овец, известна еще с XVIII в. У больных животных вначале наблюдается расстройство координации движений, затем наступают параличи и смерть.

В 1947 г. на одной из звероводческих ферм США была обнаружена энцефалопатия норок, которая возникла после скармливания им субпродуктов от овец больных скрепи. Когда эта причинная связь была установлена и приняты соответствующие меры, заболевание прекратилось.

У человека сходную картину заболевания наблюдал и изучал сначала Якоб в 1921 г. (болезнь Кройцфельда–Якоба), а затем Даниель Карлтон Гайдушек в середине 50-х гг. в племени форе Новой Гвинеи (болезнь куру). Оба заболевания характеризовались различными неврологическими симптомами и слабоумием. Гайдушек установил, что распространение куру связано с ритуальным каннибализмом в этом племени. Гайдушек заразил обезьян экстрактами мозга людей, умерших от куру. У последних через 2 года появились первые симптомы заболевания. В 1971 г. подобным образом осуществили передачу болезни Кройцфельда–Якоба от человека животным. К прионовым заболеваниям человека относится также синдром Герстманна–Шейнкера и фатальная семейная бессонница. В 1976 г. Гайдушек был удостоен Нобелевской премии за расшифровку механизмов губчатых энцефалопатий, хотя на самом деле до открытия механизмов было еще далеко. Предполагалось, что этиологическим фактором болезни являются медленные вирусы, которые, однако, не были выделены. Не выделены они и до сих пор.

В 1974 г. Стенли Прузинеру с сотрудниками удалось получить достаточное количество очищенного агента скрепи. Исследование его свойств показало, что агент исключительно белковой природы, устойчив к ультрафиолетовому и ионизирующему излучению, нагреванию, обработке ферментами. Прузинер выдвинул гипотезу «только белок» (protein only), говорящую о том, что инфекционным агентом скрепи и других губчатых энцефалопатий явля-

ется белок с молекулярной массой 27–30 кД, имеющий 3-мерную форму, отличную от аналогичного нормального белка. Прузинер назвал этот белок прионом, а соответствующие заболевания – прионовыми. Показано, что в нормальном прионовом белке больше α -спиралей, а в патологическом больше β -пластов (рис. 37)

Рис. 37. Конформация нормального и прионового белка.

Согласно гипотезе Прузинера, аномальная конформация белка приона может передаваться молекулам нормального белка. Возникает вопрос, каким образом неправильно свернутый белок может стать инфекционным и воспроизводить самого себя? Ни один из рассмотренных нами механизмов образования белка не позволяет белковой молекуле управлять своей собственной репликацией. Как бы то ни было, поведение этого белка противоречит догме классической генетики. И хотя за исследование прионов Прузинер в 1997 г. награжден Нобелевской премией, многое в этой проблеме остается неясным. Возможно, что процесс «прионизации» обусловлен тем, что шапероны по каким-то причинам не помогают складываться этому белку в правильную третичную структуру.

У дрожжей обнаружены белки – аналоги прионов человека. Они также состоят преимущественно из β -пластов и тоже склонны к олигомеризации. Олигомеризованные формы белка проявляют повышенную протеазоустойчивость. Еще один прион обнаружен у гриба *Podospora anserina*. Постепенно накапливающиеся в этой области данные грозят крушением некоторых при-

вычных представлений о реализации генетической информации. По крайней мере, уже сейчас ясно, что одной первичной структуре белка может соответствовать не одна нативная конформационная структура белка и не один уровень ферментативной активности. Возможно, это до сих пор неизвестный уровень эпигенетического контроля трансляции белков и, главное, наследование модификаций находится на уровне конформации белка. Значит, наследственные изменения не сводятся только к мутациям.

Нормальный белок приона экспрессируется в клетках мозга, особенно в синапсах. В легких, селезенке и мышцах содержание этого белка в 10–15 раз меньше, чем в нервной ткани. До сих пор роль этого белка неизвестна. Интересно, что нокаутированные по гену приона мыши, не экспрессирующие этот белок вообще, нормально существуют. Когда прион становится патогенным, он накапливается в мозге в больших количествах в виде волокон или палочек, образующих амилоидные бляшки. Ген прионового белка находится у человека в 20-й хромосоме. В настоящее время он клонирован и изучена его структура. Ген оказался консервативным у млекопитающих. Описаны мутации в гене приона, которые обуславливают наследственные формы болезни Кройцфельда–Якоба и семейную фатальную бессонницу. Одни мутации представлены точковыми аминокислотными заменами в полипептидной цепи белка, другие – увеличением числа повторов в *N*-концевой части белка. Есть данные, что эти повторы существенны для превращения белка в патологическую конформацию.

Изучение патогенеза прионовых заболеваний показало, что для переноса инфекции от одного животного к другому необходима нормальная экспрессия нормального гена приона. Нокаутированных мышей, у которых ген приона отсутствует, заразить инфекционным прионом не удастся. Выяснено также, что повышенная экспрессия нормального гена приона также приводит к развитию заболевания губчатой энцефалопатией. Это как будто подтверждает предположение, что возможна спонтанная перестройка нормального прионового белка в патологический.

С экологической точки зрения интерес представляет возможность межвидового переноса прионовых агентов. Особенно актуальна эта проблема в связи с опасностью заражения человека от больных животных. Попытки заражения мышей хомячковым и коровьим прионом сначала дали отрицательные результаты, однако впоследствии мыши все же заболели. Просто в этих случаях латентный период был гораздо больше, чем при заражении мышей мышинным прионом.

Вспомним эпидемию коровьего бешенства в Англии, которая началась в середине 80-х гг., после того как были изменены условия приготовления пищевых добавок к корму крупного рогатого скота из органов овец, больных скрепи. В 1996–1997 гг. эпидемия достигла небывалых размеров, пришлось уничтожить 130 тыс. больных коров. Ущерб составил 300 млн фунтов стерлингов. Есть предположение, что 900 тыс. коров, находящихся в инкубационном периоде энцефалопатии, были съедены в основном в Англии. Английские ученые предсказывают в связи с этим проявление прионовой патологии у 70–80 тыс. англичан. То, что болезнь Кройцфельда–Якоба можно передать от человека обезьяне, доказал в своих исследованиях еще Гайдушек. До него это заболевание заразным не считалось. В процессе развития эпидемии коровьего бешенства в Англии появилась новая нетипичная форма болезни Кройцфельда–Якоба. Появление ее связывают с заражением людей через мясо больных коров. Белок прион этих больных очень похож на коровий и отличается от типичных прионов, характерных для ранее встречавшейся болезни Кройцфельда–Якоба. Прионовый агент настолько устойчивый, что никакая термическая обработка мяса его не инактивирует.

Человек может заразиться и от больного человека (при лечении препаратами гормонов из гипофизов трупов, а также при пересадке твердой оболочки мозга, либо при введении биопрепаратов). Какова роль в развитии описываемых заболеваний иммунной системы? Распознает ли она прионовый агент? Развиваются ли при попадании приона в организм эффекторные реакции иммунитета и какие? Все эти вопросы волнуют исследователей с самого

начала открытия прионов. Показано, что специфическая иммунологическая реакция, направленная на элиминацию прионовых агентов, не развивается. Само по себе это представляется странным: изменилась первичная структура белка и его конформация, что однако совершенно не замечается иммунной системой. Тем не менее иммунная система не остается безучастной к ним. При любом способе заражения инфекционный агент не сразу попадает в мозг. Показано, что он длительно может персистировать в лимфоузлах, миндалинах, пейеровых бляшках и селезенке. Спленэктомия, произведенная до или в короткое время после заражения мышей прионами, значительно удлиняла латентный период заболевания. Тимэктомия подобного эффекта не вызывала. Если инфекция уже локализовалась в нервной системе, спленэктомия ничего не изменяла. У мышей с тяжелым комбинированным дефицитом, у которых, наряду со зрелыми *T*- и *B*-лимфоцитами, отсутствуют и дендритные клетки, вызвать инфекцию прионами не удастся.

Все это доказывает важность периферического периода в течение прионного заболевания. Кроме того, что очень важно, эти данные фокусируют внимание исследователей на существовании реальной опасности горизонтального переноса прионовых заболеваний путем гемотрансфузии, трансплантации органов и тканей, а также через хирургические инструменты.

Следует отметить, что разного рода воздействия, стимулирующие иммунную систему, повышают чувствительность мышей к заражению агентом скрэпи, а иммунодепрессанты, наоборот, уменьшают эту чувствительность.

В патогенезе прионовых заболеваний остается много неясного. Не все ученые разделяют точку зрения, что прионовый белок является непосредственным этиологическим фактором указанных заболеваний. Они предполагают, что причина не выяснена и что прион – это лишь свидетель неизвестного инфекционного агента.

Глава 11. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ

За некоторыми исключениями, клетки разных тканей и органов многоклеточного организма содержат одинаковую генетическую информацию. Однако внешне они мало похожи друг на друга и выполняют разные функции. Порой эти различия так велики, что трудно представить, что они обладают одним и тем же генотипом. Происходит это в результате того, что в процессе развития из оплодотворенной яйцеклетки (зиготы) в разных типах клеток работают (экспрессируются) разные наборы генов. В одной и той же клетке не могут работать все имеющиеся в генотипе гены. Только часть их, так называемые гены домашнего хозяйства, экспрессируются в каждой клетке, так как без их работы клетка не может существовать. Это гены, продукты которых обеспечивают, репликацию, транскрипцию, трансляцию, синтез клеточных мембран и др.

Как же происходит включение и выключение определенных генов? Как получается, что в клетках разных типов или на разных стадиях развития клеток одного типа синтезируются разные наборы белков?

Механизмы регуляции генов стабильны и передаются по наследству от клетки к клетке. Это подтверждается экспериментами *in vitro* – при выращивании вне организма на культуральной среде определенного типа клетки сохраняют свои уникальные свойства.

Регуляция генной активности сложна и многогранна из-за необычайного разнообразия участвующих в ней процессов и проходит на всех уровнях реализации генетической информации от ДНК к РНК и белку, т. е. на уровне самой структуры ДНК, репликации, транскрипции, трансляции и посттрансляционной модификации белков. Из дальнейшего изложения механизмов регуляции активности генов следует, что при реализации генетической информации за счет эпигенетических влияний обеспечивается возможность появления множественных фенотипических вариантов.

11. 1. Регуляция генной активности на уровне компактизации ДНК.

В ядрах эукариотических клеток ДНК почти не присутствует в свободном виде. Она связана с большим количеством белков, формируя комплекс, называемый хроматином. Известно, что длинные молекулы ДНК (у человека в его 46 хромосомах общая длина ДНК около 2 м, а диаметр ядра при этом менее 0,01 мм) компактизованы, т.е. упакованы, белками.

Первый уровень упаковки ДНК, нуклеосомный, безусловно оказывает влияние на работу генов.

Расположение нуклеосом регулирует доступность ДНК для белков, осуществляющих ее транскрипцию. Установлено, что промоторы активных генов чаще всего свободны от нуклеосом, тогда как промоторы неактивных генов заняты нуклеосомами и в ходе активации этих генов удаляются. Многие промоторы активных генов имеют плохое сродство к гистоновому октамеру нуклеосом.

Для большинства процессов, проходящих на уровне хроматина, необходима свободная ДНК и нуклеосомная укладка на первый взгляд служит препятствием для них. Однако именно нуклеосомная укладка и обеспечивает скоординированную работу хроматина. На состояние хроматина и на работу генов оказывают влияние модификации гистонов в составе нуклеосом. К настоящему времени известно несколько важных для экспрессии генов модификаций гистонов – ацетилирование лизина, ацетилирование и метилирование лизина и аргинина, фосфорилирование серина и треонина, убиквитирование и деубиквитирование т.д. Добавление ацетогрупп нейтрализует положительный заряд гистона, добавление фосфатных групп – увеличивает отрицательный заряд гистона. К гистонам могут быть присоединены и достаточно крупные молекулы, например, белок убиквитин. Это в свою очередь изменяет конформацию нуклеосомы и ее доступность для различных белков-регуляторов транскрипции. Однако, механизм, очевидно, сложнее. Во-первых, для осуществления модификации в клетке должны быть в наличии соответствующие ферменты. Во-вторых, модифицированные гистоны (метки) должны быть опознаны какими-то белками. Сочетание этих факторов и

есть, так называемый гистоновый код. Выясняется, что гистоновый код намного сложнее генетического триплетного кода для кодирования последовательности аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Разные модификации гистонов в составе нуклеосом включены в иерархию взаимодействий между собой. Одна и та же модификация в сочетании с другими факторами может вызывать и активацию, и подавление работы гена. Разные модификации могут приводить к одному и тому же эффекту.

Упаковка ДНК по длине хромосомы неодинакова. Более компактизована ДНК в участках, называемых гетерохроматином. Гетерохроматин представлен центромерными, теломерными районами и интеркалярным хроматином. В нем мало экспрессирующихся генов. Для гетерохроматина характерна более поздняя репликация, он обогащен повторяющимися последовательностями ДНК. Напротив, в эухроматиновых районах, менее компактизованных, находятся работающие в клетке гены. Перенос активно экспрессирующегося гена из эухроматина в гетерохроматин приводит к его инактивации. Феномен, известный под названием эффект положения гена. Показано, что гены становятся неактивными, если соответствующий участок подвергается суперспирализации, т. е. образованию гетерохроматина. В настоящее время показано, что в гетерохроматиновых районах могут присутствовать активно экспрессирующиеся гены. Это касается так называемого факультативного гетерохроматина. Он образуется в клетке в результате репрессии генов, которые в других клетках и в других условиях работают. Как правило, это гены раннего развития, тканеспецифические гены, импринтированные гены (инактивация аллеля, пришедшего от одного из родителей). Феномен случайной инактивации одной из X-хромосом в клетках млекопитающих относится также к проявлениям факультативного гетерохроматина. Все клетки женского организма имеют две X-хромосомы, а мужского – одну X- и одну Y-хромосому. Предполагают, что двойная доза продуктов генов X-хромосомы является летальной, поэтому одна X-хромосома в клетках женского организма инактивируется. При этом она полностью конденсируется и обра-

зует гетерохроматин. Такие конденсированные хромосомы можно увидеть в световом микроскопе. Это так называемые тельца Барра. У трехцветных кошек случайное распределение пятен окраса шерсти обусловлено этим феноменом.

В отличие от факультативного, конститутивный гетерохроматин постоянно находится в компактном состоянии и локализуется в прицентромерных, прителомерных районах хромосом.

11. 2. Роль метилирования ДНК в регуляции экспрессии генов.

Модификации ДНК, в частности метилирование, не изменяют ее первичной нуклеотидной последовательности и не влияют на генетический триплетный код, но могут влиять на конформацию ДНК и тем самым на работу других кодов, находящихся в суперпозициях к триплетному, что несомненно скажется на экспрессии генов. Изменение паттерна экспрессии генов за счет метилирования относится к эпигенетической регуляции.

Более 50 лет тому назад в ДНК было обнаружено азотистое основание – 5-метилцитозин. Сначала предположили, что оно, подобно четырем основным основаниям, в составе нуклеотидов включается в ДНК при ее репликации. Однако вскоре выяснилось, что цитозин метилируется уже после начала репликации специальным ферментом – ДНК-метилтрансферазой. В ДНК позвоночных метилируется цитозин в составе CpG динуклеотида, в позиции C5 цитозинового кольца. Метилирование ДНК, открытое еще до открытия двойной спирали ДНК, остается до сих пор наиболее старой из нерешенных проблем. Трудно назвать генетические процессы, в которых не участвует метилирование ДНК; оно влияет на экспрессию генов, репликацию и репарацию ДНК, активацию хромосом, разрывы, обмены, образование Z-формы и другие процессы. Подобная полифункциональность не знает аналогии в клетке.

Метилирование ДНК присуще в основном эукариотам. У человека метилирована 1% ДНК. Среди CpG динуклеотидов метилировано 70%. Немети-

лированные CpG динуклеотиды сгруппированы в островки, которые присутствуют в 5' регуляторных областях многих генов.

В то же время, если метилирование так важно, то почему оно совсем отсутствует у дрозофилы, дрожжей и нематоды *C. elegans*?. Нормальное развитие млекопитающих невозможно без метилирования. Если нокаутировать ген метилтрансферазы, осуществляющей метилирование, развитие эмбриона останавливается на ранних стадиях. В то же время метилирование представляет опасность, так как метилцитозин может дезаминироваться и превращаться в тимин. Таким образом, при репликации ДНК вместо пары GC будет AT.

Известно, что мутации, подобные GC – C*G – TG – AC, вызывают такие заболевания как фенилкетонурия, тяжелый комбинированный иммунодефицит, гемофилия и др. Примерно у половины больных гемофилией мутации не наследуются от родителей, а возникают заново в течение жизни. Превращение метилированного цитозина в тимин, а следовательно, накопление мутаций, происходит при старении. Однако в процессе дифференцировки клеток этот способ регуляции активности генов носит скорее вспомогательный характер и используется для закрепления выбранного пути развития клетки.

ДНК неактивных генов метилирована в большей степени, чем активных. Метилирование привлекает белки, подавляющие транскрипцию. Метилирование интрона, наоборот, может активировать ген. В процессе образования гамет рисунок метилирования стирается и устанавливается новый: один, характерен для гена в сперматозоиде, другой – для того же гена в яйцеклетке. Может случиться так, что ген, пришедший в зиготу от отца, сильнее метилирован и, следовательно, неактивен. Другими словами, гены эукариот способны сохранять память (импринтинг – след, запечатление) о том, в составе какого генотипа они пребывали, и соответственно химически модифицироваться, изменяя характер своей экспрессии.

Рис. 38. Импринтинг, сопровождающийся инактивацией гена (показан *)

Предположим, что заболевание проявляется у гомозигот по рецессивному мутантному аллелю a . В этом случае при отсутствии импринтинга гена гетерозиготные особи Aa будут здоровы. Если же ген, наследуемый от отца, подвергается метилированию и инактивации (рис.38), то попадание отцовского мутантного аллеля не будет замечено у гетерозиготы, так как необходимую функцию будет выполнять неметилированный материнский аллель (Aa). Если мутантный аллель будет получен от матери, то у гетерозиготы A^*a болезнь проявится, так как отцовский нормальный аллель неактивен. Установить различия в генотипах особей A^*a и aa , страдающих заболеванием, можно только специальным генетическим анализом.

Феномен импринтинга не позволяет развиваться особи из двух однородительских пронуклеусов, т. е. партеногенез у млекопитающих запрещен. У человека менее 0,1% импринтированных генов. Если, например, 11-я хромосома от матери, мышцы очень маленькие, если от отца – очень большие. У человека шизофрения и псориаз протекают очень тяжело, если передаются по отцовской линии; поликистоз почек и эпилепсия, наоборот, передаются по материнской линии.

11. 3. Роль перестройки генетического материала

Рассмотрим способ регуляции активности генов путем возникновения перестроек генетического аппарата, возникающих в онтогенезе. При этом зародышевая конфигурация генов не изменяется. Такие перестройки распространены у одноклеточных организмов и в соматических клетках многоклеточных. Многие из них происходят случайно, другие запрограммированы и приурочены к определенным стадиям дифференцировки клеток и связаны с этими стадиями.

Перестройки генетического материала обусловлены гомологической и негомологической рекомбинациями, т. е. перераспределением генетического материала (ДНК), приводящими к возникновению новых комбинаций генов. В отличие от репликации и репарации, обеспечивающих воспроизведение и сохранение генетического материала, рекомбинация приводит к генетической изменчивости.

Гомологическая рекомбинация приводит к обмену гомологичными участками хромосом. Биологическое значение гомологической рекомбинации велико. Она вносит вклад в генетическую изменчивость, позволяющую организмам приспосабливаться к среде обитания. Негомологическая рекомбинация – это процесс, использующий очень ограниченную гомологию между рекомбинирующими участками либо вообще обходящийся без нее. К последней относятся сайт-специфическая рекомбинация, транспозиции и незаконная рекомбинация.

11. 3. 1. Рекомбинации генных сегментов в генах В- и Т-клеточных антигенраспознающих рецепторов

К сайт-специфической рекомбинации относятся перестройки в последовательностях ДНК, кодирующих иммуноглобулины и антигенраспознающие рецепторы В- и Т-лимфоцитов. При тканеспецифической дифференцировке В- и Т-лимфоцитов в локусах антигенраспознающих рецепторов происходит рекомбинация генных сегментов в результате чего в онтогенезе каждый раз заново из зародышевых генов формируются новые сочетания, кодирующие переменные домены тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов и цепей Т-

клеточных антигенраспознающих рецепторов (типа бв и гд). Рекомбинация генных сегментов обеспечивается работой особых ферментов – рекомбиназ – RAGI и RAGII. Их экспрессия заканчивается после осуществления рекомбинации. Только после прохождения рекомбинации в указанных сайтах возможна экспрессия соответствующих генов рецепторов, потому что после этого они оказываются присоединенными к промоторам. Каждый этап перестройки, а их несколько, приурочен к строго определенной стадии дифференцировки. Этот механизм обеспечивает беспрецедентное разнообразие генов В- и Т-клеточных рецепторов при использовании относительно небольшого числа зародышевых генных сегментов. Подробнее этот механизм описан в главе 15.

Кроме этого, после рекомбинации специальный фермент терминальная дезоксиутидилтрансфераза добавляет в сформированный генный комплекс добавочные нуклеотиды. И, наконец, в генах иммуноглобулиновых рецепторов происходят еще и соматические мутации и альтернативный сплайсинг при созревании мРНК. Все это еще более увеличивают разнообразие. Таким образом, каждая клетка В- и Т-лимфоцит имеет в определенных сайтах совершенно уникальную генную конфигурацию, не похожую на другие клетки.

Примерами сайт-специфической перестройки является инверсия сегмента Н в хромосоме *S. typhimurium*, ответственного за смену жгутиковых антигенов. Это обеспечивает выживание бактерий в условиях иммунного ответа хозяина. За счет смены антигена они избегают развившихся эффекторных реакции иммунитета и обеспечивают новую волну инфекции. Хозяин включается в борьбу с новыми антигенами. Так продолжается гонка между паразитом и хозяином – до окончательной победы.

Незаконная рекомбинация происходит без гомологии между участками ДНК, а также без сайт-специфической рекомбинации и транспозиции. Примерами незаконной рекомбинации являются захват ретровирусами участка ДНК и перенос в другое место, в другой организм, а также интеграция ДНК, вводимой в клетку инъекцией.

11. 3. 2. Диминуция и амплификация хроматина

Еще один механизм регуляции активности генов путем перестроек – это диминуция хроматина. Можно сказать, что это экстремальная форма регуляции. Она описана у нематод в 1887 г. классиком клеточной биологии Т. Бовери. Диминуция заключается в фрагментации и элиминации значительной части генома. При диминуции у циклопов может удаляться до 85 % хроматина. У млекопитающих при дифференцировке эритробластов в эритроциты полностью удаляется ядро

В противоположность этому, запрограммированная амплификация (увеличение числа его копий) генов – механизм усиления функционирования генов. Амплификация генов описана в генах рибосомных РНК и гистонов в ооцитах многих организмов. В опухолевых клетках происходит амплификация генов множественной лекарственной устойчивости, что обеспечивает клетке резистентность к химиотерапии. В ядрышках ооцитов образуются экстрахромосомные копии генов рРНК. Этим достигается усиление синтеза рибосом. К примерам амплификации можно отнести также образование политенных хромосом в клетках слюнных желез двукрылых. Политенные хромосомы содержат не по одной молекуле ДНК как обычные, а до нескольких тысяч. Это результат многократной репликации ДНК без митоза и расхождения хромосом. Биологический смысл феномена заключается в необходимости работы многих копий генов для обеспечения интенсивного синтеза определенного продукта – белка или РНК.

Суммируем основные механизмы регуляции работы генов, ради которых происходят следующие типы перестройки:

- 1) подстановка кодирующей рамки гена под промотор;
- 2) состыковка разобщенных частей гена;
- 3) удаление гена из генома;
- 4) амплификация гена.

11. 3. 3. Роль транспозонов

В 70-х гг. 20 в. в области молекулярной биологии было сделано удивительное открытие. Оказалось, что в ДНК есть фрагменты, которые могут перемещаться как в пределах одной хромосомы, так и между хромосомами. Они были названы мобильными элементами, или транспозонами. Размеры транспозонов сопоставимы с размерами генов, локализация которых в геноме стабильна, т. е. они включают от тысячи до десятков тысяч пар нуклеотидов.

Перемещения транспозонов – транспозиции осуществляются с помощью белков-ферментов. Они либо производят вырезание транспозона из одного места и встраивание его в другое, либо образуют сначала копию транспозона и ее внедряют в новое место. При этом родительская копия остается на прежнем месте. В последнем случае наблюдается размножение транспозонов в геноме.

Открытие транспозонов опровергло существовавшую в молекулярной биологии догму относительно неизменности последовательности нуклеотидов ДНК по длине хромосомы. Оказалось, что последовательность их может изменяться благодаря перемещению фрагментов ДНК.

Встраиваясь в окрестности гена, транспозоны могут вызывать мутации, называемые инсерционными (*insertio* – вставка). Так, у плодовой мухи дрозофилы подавляющая часть спонтанных мутаций (до 80 %) обусловлена внедрением транспозонов.

Подвижные элементы часто называют по их способности перемещаться – Магеллан, Бигль; *hobo* – бродяга; *gypsy* – цыган и др. Авророй остроумно назван транспозон, подвижный в прошлом и закоренный в настоящее время.

Транспозоны вездесущи. Они обнаружены у прокариот и эукариот, у растений и животных. Транспозоны эукариот представлены несколькими семействами. Обычно они рассеяны по геному, составляя 10–40 % генома, но иногда могут концентрироваться в некоторых участках. У бактерий транспозоны могут содержать гены устойчивости к антибиотикам.

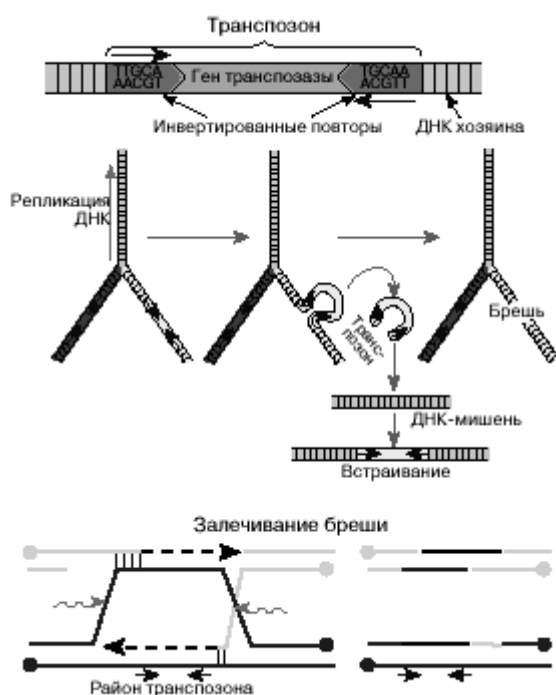


Рис. 39. Структура транспозонов, механизм перемещения и их участие в репарации

Перемещения транспозонов – достаточно редкие явления. Например, у бактерий наблюдается один акт перемещения на 10 000 – 1 000 000 клеток. Однако при определенных внешних воздействиях (стрессе, вызванном изменением температуры, облучением) частота перемещений может сильно возрастать, так что составит частоту 1 акт на 10–100 особей за поколение.

В зависимости от молекулярных механизмов, обеспечивающих перемещение, транспозоны разделяются на собственно транспозоны и ретротранспозоны.

Транспозоны (рис. 39) обязательно включают ген, кодирующий транспозазу и ограничивающие его инвертированные повторы. Инвертированные повторы сближаются и точно вырезаются из ДНК вместе с геном транспозазы. Транспозаза делает разрыв в ДНК-мишени и вносит вырезанный фрагмент ДНК. Бреши в ДНК после вырезания транспозона застраивается транспозазой с участием гомологичного участка сестринской хромосомы, только что реплицированной.

Другой класс подвижных элементов – ретротранспозоны. Механизм их перемещения связан с работой обратной транскриптазы – фермента, открытого Г. Теминим и Д. Балтимором в 1970 году. Обратная транскриптаза была обнаружена при изучении ретровирусов, содержащих РНК, которая служит матрицей для синтеза ДНК. При этом обратная транскриптаза осуществляет и синтез второй цепи ДНК, а РНК-матрица удаляется и распадается. Вновь синтезированная ДНК перемещается в ядро и может встроиться в хозяйскую хромосому, образуя провирус. Провирус стабильно наследуется в ряду поколений клетки, также как обычный ген. В геноме млекопитающих в большом количестве содержатся эндогенные провирусы, которые безвредны. Провирус ограничен длинными концевыми повторами (long terminal repeats – LTR). Они необходимы для его репликации и транскрипции. Один из них является промотором, с которым взаимодействует РНК-полимераза. Синтезированная РНК в дальнейшем транслируется с образованием белков, необходимых для формирования вирусных частиц, а также белков, необходимых для синтеза ДНК провируса и его внедрения в геном. Образовавшиеся вирусные частицы могут из клетки выйти и заразить другие клетки. Транспозаза, в отличие от ДНК-полимеразы, работает с ошибками. Может случиться, что в состав будущего провируса попадет материал других клеточных генов, например, управляющих пролиферацией. Это может обусловить злокачественное перерождение клеток.

Структуру провирусов фактически повторяют ретротранспозоны. Отличие лишь в том, что ретротранспозоны не имеют генов, кодирующих белки вирусной оболочки и, следовательно, они не инфекционны, так как не могут выйти из клетки и заразить другие клетки.

Остается открытым вопрос, произошли ли ретровирусы от ретротранспозонов, или, наоборот, ретротранспозоны возникли из вирусов, утратив способность к заражению.

Отношение к подвижным элементам ДНК как к эгоистической ДНК, которая паразитирует в ДНК хозяина и занимается только своим размножением

ем, в последние годы изменилось. В гл. 4 рассмотрена проблема недорепликации ДНК и достраивания концов хромосом с помощью теломеразы. Оказалось, что иногда укороченные концы хромосом восстанавливаются за счет транспозонов. Например, у дрозофилы отсутствует теломеразный механизм, а утраченные концы хромосом восстанавливаются за счет ретротранспозонов. В этом случае они выступают как спасатели хромосом.

Подвижные элементы иногда используются клеткой для заживления двунитевых разрывов ДНК. Заплата в виде транспозона позволяет хромосоме не утратить оторванный от центромеры фрагмент. Конечно, при этом исходная последовательность нуклеотидов не будет восстановлена. Однако если этот район ДНК не содержит генов, то клетка полностью сохранит жизнеспособность.

Помимо этих важнейших функций, транспозоны могут участвовать в регуляции экспрессии генов. Внедряясь в ген, транспозон может разорвать экзон; в этом случае ген лишается возможности кодировать белок. Внедряясь в район промотора, сайты энхансеров или сайленсеров, он может нарушить регуляторную область гена. Только попадание в интрон оказывается безвредным, если вся последовательность интрона вместе с транспозоном будет вырезаться при процессинге РНК.

При рассмотрении роли транспозонов в регуляции экспрессии генов не следует забывать, что они имеют собственные промоторы и сайты терминации транскрипции, а также экзоны, интроны и сигналы, обеспечивающие сплайсинг.

Внесение с транспозоном нормального регулирующего сигнала в некоторых случаях приводит к усилению транскрипции гена. Если этим геном окажется протоонкоген, начинается сверхпродукция соответствующего белка, ведущая к злокачественной трансформации клетки.

Есть данные, что в эволюции генома регулирующие сайты подвижных элементов превращаются в энхансеры клеточных генов. Так, белок-рецептор ретиноевой кислоты узнает регуляторную последовательность гена, которая

была приобретена в результате внедрения подвижного элемента. Ретротранспозон иногда приводит к экспрессии гена в ткани, где он обычно молчит.

Подвижные элементы могут принимать участие в хромосомных перестройках. Процесс рекомбинации в присутствии подвижных элементов может изменить свой характер. Так, в результате неравного кроссинговера, проходящего по встройке подвижного элемента, может образоваться делеция или дупликация генов.

Необходимо отметить, что из всех перечисленных механизмов вытекает одно важное обстоятельство — в разных клетках организма, возникших из одной оплодотворенной яйцеклетки, могут быть различия в структуре генетического материала.

11. 4. Контроль генной активности на уровне транскрипции

Раньше всех были открыты механизмы регуляции генной активности на уровне транскрипции у прокариот. Как уже было сказано, для прокариот характерна оперонная структура ДНК и полицистронный характер транскрипции. Оперон как единое целое либо активен, либо неактивен. Белки, регулирующие это состояние, называются репрессорами и активаторами. Механизм их функционирования обусловлен их специфическим связыванием с участком ДНК, называемым оператором. Оператор может находиться в разных положениях относительно промотора — располагаться перед промотором или за ним, а также перекрываться с областью промотора. Рассмотрим несколько способов регуляции транскрипции у прокариот.

- 1) Негативная индукция транскрипции. В этой ситуации молекулы репрессора, связанные с ДНК, либо мешают посадке РНК-полимеразы, либо взаимодействуя с РНК-полимеразой и ДНК, препят-

ствуют началу синтеза РНК. Примером может служить регуляция транскрипции генов, кодирующих белки, необходимые для расщепления и сбраживания дисахарида – лактозы. Если в среде, в которой находятся бактерии, лактозы нет, соответствующие гены лактозного оперона не работают. При появлении лактозы происходит ее взаимодействие с белком-репрессором, что изменяет его конформацию. В результате репрессор не способен связываться с ДНК и препятствовать связыванию РНК-полимеразы с промотором. Транскрипция успешно проходит, образовавшаяся РНК транслируется, нарабатываются ферменты метаболизма лактозы.

2) Позитивная индукция транскрипции. Рассмотрим ее на примере работы оперона, содержащего три гена, кодирующие ферменты метаболизма сахара арабинозы. Оперон не активен из-за того что белок-репрессор связан с оператором, пока в среде не появится арабиноза. Тогда она, связываясь с репрессором, превращает его в активатор, наоборот облегчающий присоединение РНК-полимеразы к промотору и прохождение транскрипции.

3) Позитивная репрессия транскрипции. По механизму противоположна позитивной индукции. Обычно оперон активен, при этом белок-активатор обеспечивает успешное связывание РНК-полимеразы с промотором. При появлении избытка соответствующего продукта происходит взаимодействие с белком-активатором, который утрачивает способность обеспечивать РНК-полимеразе успешную транскрипцию оперона.

4) Негативная репрессия транскрипции. Рассмотрим ее на примере регуляции работы триптофанового оперона. В опероне пять цистронов, кодирующих ферменты синтеза триптофана. Обычно оперон включен. Есть белок в виде апорепрессора, т. е. он в таком виде не может играть роль репрессора. Если триптофан, синтезированный в клетке в достаточном количестве, взаимодействует с апорепрессором,

последний меняет конформацию и связывается как репрессор с оператором, предотвращая транскрипцию оперона.

В прокариотических клетках образующаяся молекула мРНК сразу связывается с рибосомами и транслируется. РНК-полимераза движется по оперону, а рибосомы продвигаются по РНК, освобождая место для новых рибосом. Образуется полисома. Чтобы синтез белка прекратился, если в нем уже нет потребности, не достаточно прекращения транскрипции. Необходимо еще и разрушение матрицы. Это осуществляет РНК-аза, окусывающая по одному нуклеотиду с 5'конца РНК, если он не занят рибосомой. Таким образом, клетка не тратит силы на производство лишних молекул.

У эукариот регуляция на уровне транскрипции протекает значительно сложнее, чем у прокариот. Она осуществляется специальными белками, специфически связывающимися с ДНК в области промотора гена. Результатом этого связывания может быть как активация работы гена, так и подавление ее. Разные типы клеток обладают разным набором таких регуляторов и, следовательно, разными наборами активированных генов. Гены высших эукариот обычно регулируются путем комбинированного воздействия нескольких белков – факторов транскрипции. В отличие от прокариот, у которых фермент РНК-полимераза узнает сайт инициации транскрипции непосредственно, у эукариот транскрипция представляет собой гораздо более сложный процесс. В ней принимают участие три РНК-полимеразы – I, II, III, эволюционно родственные ферменту бактерий, но содержащие большее число субъединиц. Эукариотическая РНК-полимераза узнает комплекс ДНК со специфическим фактором транскрипции. Фактор связывается с последовательностью ТАТА, расположенной на участке 25–30 п. н. от сайта инициации транскрипции. Оказалось, что для эффективной транскрипции необходимо взаимодействие факторов транскрипции с сайтами ДНК, находящимися на большом отдалении от промотора, на десятки тысяч п. н. Одни из них – энхансеры, т. е. усилители, это генетические элементы, находящиеся в цис-

ориентации, возможно в большом отдалении от гена. Соединение с ними факторов транскрипции усиливает транскрипцию. Противоположным эффектом обладают сайленсеры, т. е. сайты ДНК, которые, взаимодействуя с факторами транскрипции, ингибируют ее. Эффект энхансеров и сайленсеров, находящихся в большом отдалении от промотора, возможен благодаря гибкости ДНК, что позволяет присоединившимся к ним белкам влиять на РНК-полимеразу. Включение и выключение полимеразой и друг с другом многих факторов транскрипции. Для каждого типа клеток набор факторов транскрипции является уникальным. Определенные сайты на ДНК называются инсуляторами.

Неотъемлемой частью регуляции генной активности является взаимодействие транскрипционных факторов с нуклеосомами. Существует класс транскрипционных факторов, которые не с самой ДНК, а с нуклеосомой как целым. Это так называемые затравочные транскрипционные факторы. К ним относится, например, транскрипционный фактор FoxA. Однако большинство транскрипционных факторов конкурирует с гистоновым октамером за связывание с ДНК. Положение нуклеосом изменяется, изменяется величина линкерной ДНК. Есть так называемые ремоделеры хроматина – белки, которые могут переставлять нуклеосомы и удалять их.

Таким образом, можно заключить, что в настоящее время в молекулярной генетике господствует представление, что для сборки преинициаторного комплекса РНК-полимеразы промотор должен быть свободен от нуклеосом. Это достигается привлечением к промоторной области факторов ремоделирования хроматина с участием факторов транскрипции.

Факторы транскрипции весьма разнообразны по структуре. Общее в их характеристике это то, что они имеют один или несколько ДНК-связывающих домена, домены активации транскрипции или антирепрессорные домены, домены, связывающие другие лиганды, например лиганды-индукторы или лиганды репрессоры. Лигандами индукторами транскрипции

являются многие гормоны, а лигандами-репрессорами могут являться конечные продукты метаболических путей.

Рассмотрим активацию транскрипции генов стероидными гормонами. Гормон легко проникает в клетку и связывается со своим рецептором, являющимся фактором транскрипции. В результате такого взаимодействия ДНК-связывающий домен рецептора освобождается от других белков, скрывавших его в отсутствие гормона. Комплекс гормона с рецептором перемещается в ядро, где связывается с определенными сайтами генов, регулируемых данным гормоном. Начинается транскрипция этих генов.

У некоторых генов может быть не по одному, а несколько промоторов, энхансеров и сайленсеров. При этом в клетках разных тканей многоклеточного организма транскрипция может осуществляться при участии разных регуляторных сайтов и разных тканеспецифичных факторов транскрипции, что значительно увеличивает разнообразие белковых продуктов, кодируемых одним и тем же геном. Так, в гене коллагена, состоящего из 43 экзонов, имеется два промотора. Варианты транскрипции приводят к образованию трех изоформ белка – одной короткой и двух длинных. Синтез изоформ строго контролируется. Дисбаланс изоформ может приводить к патологии сетчатки глаза. Рецептор пролактина имеет три промотора, обладающих разной тканеспецифичностью.

11.5. Посттранскрипционный уровень регуляции активности генов

Транскрипция заканчивается синтезом любого типа РНК в клетке. Как правило, первичный транскрипт РНК не может выполнять свою биологическую функцию. Первичные транскрипты претерпевают ряд изменений –

процессинг. Происходит экспонирование 5' конца, полиаденилирование 3' конца, вырезание копий интронов и сшивание экзонов (сплайсинг). Пока не закончится процессинг и РНК не приобретет зрелую форму она не может выйти в цитоплазму. Следовательно, если в клетке нет возможности осуществить какую-либо ступень процессинга первичного транскрипта, соответствующий ген не будет экспрессироваться.

При наличии в генах нескольких экзонов и интронов комбинация их в разных клетках может происходить по-разному. Такое явление выбора путей созревания молекулы мРНК получило название альтернативного сплайсинга. Аппарат сплайсинга включает пять мРНК (U1, U2, U3, U4, U5) и 150 белков – это сплайсингосома. Места сплайсинга – это консенсусные последовательности, маяки на 3' и 5'-концах интронов. МРНК присоединяются к ним и образуют лассо, которое отрывается. В сплайсинге участвуют также сплайсинг регулирующие белки (SR), направляющие сплайсингосому к местам связывания с интронами. В зависимости от наличия в клетке каждого из перечисленных участников процесса осуществляется сближение определенных экзонов и образование разных форм транскрипта. В результате этого один и тот же ген может быть матрицей для нескольких белков.

Конститутивная форма альтернативного сплайсинга обусловлена двусмысленностью интрона, когда механизм сплайсинга не может различить две или более альтернативные пары 5' и 3'-сайтов сплайсирования. Поэтому случайно образуются разные формы мРНК. Это характерно для наследственного заболевания в-талассемии. В большинстве случаев отбор сайтов сплайсинга определяется клеткой, в результате чего образуются тканеспецифические белки.

Замены экзонов, происходящие при альтернативном сплайсинге, приводят к появлению белков, чаще всего обладающих сходными функциями. Однако возможны и такие случаи, когда синтезируются белки с различающимися и даже противоположными свойствами. Предполагают, что выбор сайтов

сплайсинга обусловлен связыванием тканеспецифических белков с растущим РНК-транскриптом.

Экзон в некоторых случаях может выступать в роли интрона и наоборот. Число вариантов зрелых молекул мРНК, содержащих разные наборы экзонов, может быть достаточно большим. Таким образом, экзон-интронная структура гена оказывается чрезвычайно экономичной, обеспечивая большое разнообразие белков, образующихся при транскрипции одного гена! Рекордсменом по числу белков, получающихся в результате альтернативного сплайсинга, является гликопротеин CD44. В его центральной части имеется тандем из 10 альтернативно сплайсирующихся экзонов, включение или делетирование которых позволяет продуцировать более 1 000 изоформ белка! Альтернативный сплайсинг нередко является механизмом ингибирования полноразмерного продукта. Так, альтернативный сплайсинг ряда рецепторов цитокинов приводит к образованию усеченных с С-конца растворимых рецепторов, не способных проводить сигнал в клетку. Известно, что интроны могут вести себя как регуляторные элементы гена, к ним присоединяются факторы транскрипции.

Из сказанного выше следует, что сплайсинг обеспечивает регуляцию работы генов, следовательно, участвует в процессах дифференцировки. Разные транскрипты одного гена могут образовываться также за счет инициации транскрипции с разных промоторов и за счет окончания ее с участием разных терминаторов.

К посттранскрипционной модификации РНК относится также ее редактирование. Этим термином обозначают процесс подстановки или удаления нуклеотидов из зрелого РНК-транскрипта при участии гидовой РНК в качестве матрицы. Биологические последствия редактирования РНК разнообразны. Редактирование может привести к образованию пригодной для трансляции мРНК из транскрипта, в котором открытая

рамка считывания отсутствует. В других случаях и отредактированная и нередактированная мРНК могут являться матрицами для синтеза белков, раз-

личающихся функцией. Редактирование может сделать матрицу более стабильной или наоборот. Таким образом, редактирование дает еще большее разнообразие продуктов одного гена. Так, при формировании разнообразия антигенраспознающих рецепторов В- и Т-лимфоцитов наряду с перестановкой генных сегментов используется также и редактирование РНК.

Феномен редактирования впервые открыт при изучении транскрипта гена субъединицы II цитохромоксидазы митохондрий *Trypanosoma brucei* в 1986 году.

В митохондриях трипаносомы синтезируется фермент цитохромоксидаза, ключевой белок для синтеза АТФ, состоящий из трех субъединиц. В геноме трипаносомы имеется два гена для двух субъединиц цитохромоксидазы. При редактировании в одну иРНК встраивается 4 уридина, происходит сдвиг рамки считывания и транслируется 3-я субъединица цитохромоксидазы. В организме теплокровных у трипаносомы синтезируется только две субъединицы, и фермент не работает, так как достаточно АТФ синтезирующегося в процессе гликолиза. В организме холоднокровных после редактирования одной их мРНК синтезируется три субъединицы и фермент работает.

11. 6. Регуляция активности генов на уровне трансляции.

Если экспрессия гена дошла до стадии транскрипции и образовалась и адекватно процессировалась мРНК, это еще не означает, что соответствующий продукт появится в клетке. Регуляционные механизмы работают и на этой стадии, и не все мРНК, хотя это может показаться нерациональным, транслируются. А те из них, которые идут в трансляцию, транслируются с разной скоростью.

Регуляция генной активности на дорибосомном этапе трансляции может реализоваться через ограниченное число изоакцепторных тРНК и соответствующих аминоацил-тРНК-синтетаз.

Наиболее ответственным этапом в синтезе белка является инициация трансляции в рибосомном этапе. Трансляция большинства эукариотических мРНК происходит по механизму линейного сканирования. При этом 40S субъединица рибосомы взаимодействует с кэпом на 5' конце и линейно движется вдоль мРНК до начала белоккодирующего района (рамки считывания). Эффективность распознавания иницирующего кодона АУГ зависит от расположения его в оптимальном контексте. Стабильные шпильки в этом районе препятствуют движению 40S субъединицы, что приводит к снижению уровня трансляции.

В разных клетках или на разных стадиях развития одного типа клеток может происходить дифференциальная трансляция с альтернативных промоторов в пределах одного и того же гена. Конкретно, какой промотор будет выбран, зависит от многих факторов, прежде всего белковых, которые имеются в клетке. В зависимости от этого в клетке будут образовываться разные продукты при экспрессии одного и того же гена.

Немалая роль в регуляции уровня трансляции принадлежит активности мРНК как матрицы. мРНК эукариотических клеток транслируются с различной интенсивностью, зависящей от контекстных и структурных их особенностей. На активные матрицы нанизывается много рибосом, и синтез полипептидных цепей идет с большой интенсивностью. Так ведут себя сильные и стабильные матрицы для белков домашнего хозяйства и белков, нарабатываемых в клетке в больших количествах, например секретируемые клеткой белки. Наоборот, матрицы для коротко живущих белков, необходимых клетке для кратковременных воздействий, как правило, слабые и нестабильные. Например, матрицы для некоторых короткоживущих факторов транскрипции. Для РНК матриц генов гемоглобина период полужизни составляет около 10 часов, а для факторов транскрипции – менее часа.

На активность мРНК избирательно могут оказывать влияние специфические регуляторные белки или регуляторные РНК. Свое действие они проявляют, связываясь с регуляторными сайтами на мРНК, которые располагаются в 5' и 3'-нетранслируемых областях (НТО)(рис. 40). Связываясь вблизи иницирующего кодона АУГ, белки могут создавать препятствия для компонентов иницирующего комплекса; однако и связывание на большом расстоянии от точки начала трансляции может привести к аналогичному результату посредством изменения конформации мРНК. В качестве регуляторных белков могут выступать специальные белки, выполняющие только эту функцию, а также белки, для которых основной является другая функция, а регуляцию они выполняют «по совместительству». Случается, что регуляторами являются продукты трансляции данной мРНК (ауторегуляция). Например, у бактерий трансляция мРНК для треонил-тРНК-синтетазы находится под контролем ее продукта. При этом связывание треонил-тРНК-синтетазы с ее мРНК происходит в 5' НТО. Следовательно, при достаточном увеличении в клетке данного фермента он сам останавливает трансляцию.

Примером подобной регуляции в эукариотических клетках является поддержание в клетках уровня свободного железа, которое в несвязанном состоянии токсично для клеток. Связывание свободного железа осуществляется белком ферритином, синтез которого в свою очередь зависит от уровня свободного железа – в присутствии свободного железа ферритин синтезируется, а в отсутствии – трансляция соответствующей матрицы останавливается в фазе инициации. Выяснилось, что это зависит от шпилечной структуры в области 5'-НТО мРНК ферритина. Этот регуляторный элемент при отсутствии железа связывается с особым белком (репрессором), что останавливает трансляцию. В присутствии свободного железа репрессор, обладая сродством к нему, связывается с ним, а не с мРНК – трансляция разрешается. Удивительно, что репрессором оказался хорошо известный белок, работающий в цикле Кребса, – аконитаза. Время жизни разных мРНК широко варьирует – от десятков минут до десятков суток. Стабильными матрицами являются те,

которые обеспечивают наработку белков домашнего хозяйства или белков, секретируемых клеткой в большом количестве. Срок жизни мРНК может быть запрограммирован в 3' НТО, где находится шпилечная структура – элемент нестабильности мРНК. Кстати, необходимо заметить, что подобные элементы могут находиться и в транслируемой области мРНК. Например, нестабильность мРНК рецептора трансферина определяется пятью шпилечными структурами в 3'-НТО. Белком-регулятором и в этом случае является фермент аконитаза. Ее связывание с 3'-НТО ведет к снижению синтеза рецептора трансферина. Таким образом, один и тот же фермент в клетке в железосодержащей форме участвует в цикле Кребса, а в форме без железа связывается с 5' НТО мРНК ферритина, репрессируя ее трансляцию, а связываясь с 3'-НТО мРНК рецептора трансферина, защищает ее от деградации.



Рис. 40. Схема расположения функциональных участков в мРНК

Помимо альтернативных сайтов инициации трансляции, в мРНК могут быть альтернативные сайты терминации синтеза полипептидных цепей. Их дифференцированное использование приводит к образованию разных белковых продуктов.

11. 7. Регуляция экспрессии генов некодирующими РНК

В последнее время внимание исследователей привлечено к участию в регуляторной сети активности генов различных типов некодирующих РНК.

На современном этапе знаний считается, что транскрибируется значительно большая часть генома, чем предполагалось ранее. Показано, что более 90% геномных последовательностей представлены в первичных РНК транскриптах в различных тканях. Множество из них представлено некодирующими РНК, не являющимися матрицами для синтеза белка. Выяснилось, что число генов для некодирующих РНК превышает число известных и предсказанных генов, кодирующих белки. На основании этого можно предсказать, что некодирующие РНК выполняют некие очень значимые функции генетической программы.

Уже говорилось о важнейших для синтеза белка функциях рРНК и тРНК. Малые ядерные РНК, мРНК, (U РНК 1,2,4,5,6,11,12) принимают участие в сплайсинге преРНК. 7SLРНК – образуют каркас в сигнализирующей частице для транспорта белков в ЭПР. В составе фермента теломеразы находится РНК, обеспечивающая специфическое удлинение теломерных концов линейной ДНК после репликации. Особые РНК, транскрибирующиеся с ДНК X-хромосомы, принимают участие в инактивации одной из X-хромосом самок млекопитающих. Процессинг митохондриальных РНК также осуществляют РНК. Малые ядрышковые РНК (Sno-РНК) участвуют в разрезании пре рРНК и ее модификации.

Все больше накапливается данных об участии некодирующих РНК в регуляции генной активности на уровне транскрипции и трансляции, регуляции альтернативного сплайсинга, модификации хроматина и т. д.

РНК в клетках могут взаимодействовать с другими РНК и ДНК. При этом большинство их таких взаимодействий не подчиняется каноническим правилам спаривания уотсон-криковский пар оснований. Образуются триплексы и другие сложные структуры в комплексе еще и с белками. В течение

нескольких последних лет были открыты новые механизмы регуляции экспрессии генов, в основе которых лежат комплементарные взаимодействия коротких РНК, содержащих 20-30 нуклеотидов.

В 1990-1998 годах было показано, что короткие двуцепочечные РНК способны подавлять экспрессию генов. Явление, названное РНК-интерференция, было открыто на трех объектах – петунья, табак и круглый червь *C. elegans*. Оно заключается в способности введенных извне или искусственно экспрессируемых (например, при трансгенезе) двуцепочечных (дц) РНК избирательно подавлять экспрессию генов-мишеней с гомологичной нуклеотидной последовательностью. Эффектором в этом процессе является короткая дц РНК, состоящая из 21-23 нуклеотидов (si – short interfering РНК). Почти одновременно были открыты так называемые микро РНК (миРНК), такого же размера и тоже осуществляющих подавление генной активности. Механизм образования si и миРНК очень сходны. Разница лишь в том, что для микро РНК в геноме есть свои гены, а для siРНК – нет. Si РНК образуются в клетке при транскрипции вирусного гена, при транскрипции повторяющихся последовательностей, при которой обе нити ДНК могут быть матрицами для транскрипции, транскрипции мобильных элементов или введенного трансгена. Можно сказать, что это эволюционно древний механизм, стоящий на страже неприкосновенности генома.

Феномен РНК-интерференции был открыт при изучении и применении антисмысловых РНК, которые способны специфически останавливать экспрессию гена после транскрипции. Эту технологию стали использовать для функционального нокаутирования генов-мишеней. При этом выяснилось, что подобным эффектом обладает не только антисмысловая РНК, комплементарно связывающаяся с транскриптом, но контрольная смысловая РНК, которая по идее не могла спариваться с целевой мРНК. Выяснилось, что эффект замалчивания гена обусловлен двухспиральными РНК-дуплеками – 20-30 п. н., несущими на 3'концах неспаренные нуклеотиды.

siРНК (small interfering) своих генов не имеют. Они образуются из длинных РНК, источником которых являются вирусы, искусственных генетических конструкций, длинные шпильки в составе транскриптов, двунаправленная транскрипция мобильных элементов. Они нарезаются РНК-азой Dicer затем одна нить входит в состав белкового комплекса RISC и в этом комплексе направляет специфическое разрезание мРНК.

В отличие от siРНК, микроРНК имеют свои гены. Открытие их было сделано в процессе картирования мутаций в этих генах. Оказалось, что гены слишком малы, чтобы кодировать белки. После определения последовательностей нуклеотидов в микроРНК было показано, что они комплементарны к определенным регуляторным сайтам мРНК. МикроРНК

обычно транскрибируются в виде предшественника длиной около 70 нуклеотидов, представляющего собой шпильку (спаренные комплементарные участки). Часто участок ДНК, кодирующий микро РНК, расположен в интроне гена, работу которого данная микро РНК регулирует. Далее в работу вступает специальный фермент, называемый Dicer (от англ. «нарезающий кусочками»). Он вырезает из шпильки участок, почти полностью комплементарный мРНК данного гена и расплетает его. После этого ферментативный мультибелковый комплекс RISC, в который входит ряд белков семейства Argonaute, связывают микро РНК с мишенью и обеспечивают ее разрезание, в результате ген выключается. При неполной комплементарности к мРНК они обуславливают супрессию трансляции. Таким образом, микро РНК – это посттранскрипционный супрессор. Они широко распространены в мозге и могут участвовать в патогенезе заболеваний (шизофрения, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона). В научных исследованиях описанный феномен применяется для изучения функции определенных генов, которые можно таким способом выключать специфически.

Регуляция экспрессии генов посредством микроРНК отличается от регуляции, осуществляемой факторами транскрипции, большей скоростью воздействия, обратимостью и возможностью локально изменять уровень мРНК-

мишеней и белков в отдельных компартментах клеток. Это очень полезно при быстрых адаптивных изменениях для поддержания гомеостаза и для быстрого ответа на специфические сигналы и воздействия среды. Очевидно, что эта регуляция играет ключевую роль в дифференцировке клеток и эмбриональном развитии и других клеточных процессах. Выявлена ключевая роль микроРНК в нарушении баланса пролиферации, дифференцировки и программируемой клеточной гибели при некоторых общераспространенных заболеваниях. При развитии онкологических заболеваний профиль экспрессии микроРНК может меняться, что в настоящее время уже находит применения для диагностики первичных опухолей и их метастазов.

В 2002 году у прокариот были открыты так называемые РНК-переключатели. Это пример регуляции транскрипции без участия белков активаторов или репрессоров. В ДНК участки, кодирующие РНК-переключатели, находятся в транскрибируемой, но не транслируемой области оперона, т. е. они транскрибируются первыми. После транскрипции они приобретают сложную шпильчатую структуру. Наличие шпилек препятствует дальнейшей транскрипции. Если же рецепторный участок этого РНК-переключателя соединяется с субстратом кодируемого этим опероном фермента, то переключатель принимает такую конформацию, которая позволяет продолжить транскрипцию.

По-видимому короткие некодирующие РНК формируют регуляторную сеть, контролирующую множество фундаментальных биологических процессов: дифференцировку тканей, развитие, апоптоз, и т. п. В практической медицине этот феномен со временем может найти применение для подавления сверхэкспрессии генов, определяющих развитие конкретной патологии.

11. 8. Посттрансляционный уровень регуляции экспрессии генов

Образование полипептидной цепи – это только первый шаг в процессе формирования белка. Для образования функционально активного белка полипептидные цепи претерпевают ряд изменений. Для функционирования ря-

да белков необходимо объединение нескольких полипептидных цепей. Так, гемоглобин образуется при объединении двух б- и двух в-цепей, а также после связывания с ними гемогруппы. Некоторые белки подвергаются гидроксилированию, фосфорилированию или дефосфорилированию. Многие белки синтезируются в виде крупных предшественников, а потом активируются путем отщепления частей полипептидных цепей. Например, сначала образуется проинсулин, затем он расщепляется с удалением N-концевого и внутреннего фрагмента (интеина) цепи.

Существовало представление, что, поскольку структуру белка определяет лишь последовательность нуклеотидов в гене, сворачивание полипептидной цепи зависит и определяется только последовательностью аминокислот. Для этого утверждения были экспериментальные подтверждения. Так, Анфинсен показал, что, если РНК-азу денатурировать, а потом удалить из раствора денатурирующие агенты, фермент вновь восстанавливал свою нативную структуру и проявлял каталитическую активность. В дальнейшем было выяснено, что не для всех белков это так. Оказалось, что для большинства белков процесс их сворачивания является энергозависимым и ни в коем случае не спонтанным. Он имеет иерархическую природу. Сначала за доли секунды формируются элементы вторичной структуры. Затем также за доли секунды происходит специфическая ассоциация некоторых элементов вторичной структуры с образованием супервторичной структуры – это сочетания нескольких α -спиралей, нескольких β -пластов или смешанные ассоциаты этих элементов. Далее образуется третичная структура, в основном, за счет гидрофобных взаимодействий и дисульфидных связей. Многие белки составлены из нескольких полипептидных цепей, значит, должны установиться дополнительные контакты между доменами этих цепей. Действительно, в цепи аминокислот имеются практически безграничные возможности ассоциации аминокислотных остатков друг с другом. Если полипептид будет «пробовать» все мыслимые варианты такой ассоциации, пока не достигнет формы

нативного белка, ему понадобится несколько миллионов лет. В клетке же это происходит в считанные минуты.

В середине 80-х гг. было обнаружено, что в клетке существует особая категория белков, основной функцией которых является обеспечение правильного характера сворачивания полипептидных цепей в нативную структуру. Эти белки названы молекулярными шаперонами. Они не дают полипептиду образовывать нежелательные связи. Это и отражено в их названии (английское слово *chaperone* означает гувернантка). Это целое семейство белков со сходной функцией. Есть еще белки – шаперонины – более сложно устроенные, представляющие собой сложные ологимерные структуры. Несколько олигомеров образуют цилиндр с полостью в центре – канал, в котором и происходит процесс сворачивания белка. Для проникновения белков через мембрану митохондрий и хлоропластов необходимо их развернуть – это тоже делают шапероны. Известно, что синтез шаперонов индуцируется под влиянием теплового шока, стресса, радиации, ультрафиолетового излучения. Поэтому шапероны называют белками теплового шока или белками стресса. По этому их проявлению впервые и были открыты белки теплового шока. Открытие сделано работами Риттозы на полигенных хромосомах слюнных желез личинок дрозофилы. При повышении температуры до 37°C (а оптимум для дрозофилы 20°C) образовывались пuffs там, где их не было раньше. Идентифицированы эти белки в 1974 г. После денатурации в результате этих воздействий конформацию белков восстанавливают шапероны. Шапероны метят белки, которые должны быть деградированы в лизосомах. Известен среди них убиквитин, осуществляющий эту функцию (его называют меткой смерти). Шапероны участвуют также в сборке крупных белковых комплексов, работающих как молекулярные машины.

Помимо шаперонов и шаперонинов, в сворачивании (фолдинге) белка принимают участие и другие белки-ферменты. К ферментам, участвующим в фолдинге, относится протеиндисульфид-изомераза, перемещающая дисульфидные связи в полипептидной цепи, разрывая недопустимые и создавая новые S–S-связи между остатками цистеина. Другой фермент из этой группы,

пептидил-пролин-изомераза катализирует изомеризацию пептидных связей пролина.

Белки синтезируются в цитоплазме клеток, а также в митохондриях и хлоропластах. Они при этом имеют разные пункты назначения. Какие-то из них остаются в цитоплазме, другие встраиваются в клеточную мембрану, третьи проникают в лизосомы и пероксисомы, четвертые идут в ядро, митохондрии, хлоропласты и т. д.

Нарушения фолдинга белков могут лежать в основе тяжелых заболеваний человека и животных – губчатых энцефалопатий. В настоящее время показано, что причиной развития этих заболеваний является изменение фолдинга белка, который называют прионом, поэтому и заболевания называют еще прионовыми. Ген прионового белка консервативен и имеется у всех млекопитающих. У человека он кодируется в коротком плече 20-й хромосомы. Формы нормального и прионового белка кодируются одним и тем же геном и имеют одинаковую последовательность аминокислот. А вот их трехмерная форма существенно различается. Несмотря на то, что исследования агента, вызывающего эти заболевания, отмечены уже двумя Нобелевскими премиями, окончательная ясность в решении этой проблемы до сих пор отсутствует. Бесспорно одно: заболевание поражает и людей, и животных, и люди могут заразиться от животных, а также через хирургические инструменты, биопрепараты и т. п. Так что это еще одна экологическая угроза человечеству.

Глава 12. МАНИПУЛИРОВАНИЕ ГЕНАМИ И ГЕНОМАМИ

12.1. Технология рекомбинантных ДНК

Для изучения структуры и функций ДНК классическим подходом является использование генетических методов, которые на основе анализа фенотипов мутантных организмов позволяют судить о функции генов, их местоположении в хромосомах. В последнее время этот подход обогатился набором методов, позволяющих производить детальный анализ генетического материала, – это технология рекомбинантных ДНК. Появление этих методов в 70-х гг. называют методической революцией в молекулярной биологии. С их помощью можно вырезать определенные участки ДНК, получать практически неограниченное число их копий, определять последовательность нуклеотидов в них, изменять по желанию экспериментатора выделенный ген и вводить его в геном вируса, бактерии или эукариотической клетки, где этот ген начнет функционировать. Техника рекомбинантных ДНК оказала существенное влияние на фундаментальную биологическую науку, позволяя решать задачи, которые раньше представлялись неразрешимыми. Применение этих методов в биотехнологии обеспечивает получение труднодоступных биологических веществ в виде лекарственных препаратов, новых штаммов полезных бактерий, трансгенных растений и животных.

1. Расщепление ДНК рестриктазами – первый этап на пути выделения гена. Рестриктазы – это класс бактериальных ферментов, опознающих определенные последовательности нуклеотидов в двуспиральной ДНК и разрезающие ее в этих сайтах. В настоящее время производится более 100 рестриктаз, распознающих разные сайты. Необходимо отметить, что бактерии используют рестриктазы как средство защиты от вторжения чужеродных молекул ДНК, например фаговых. При этом геном бактерии защищен метилированием нуклеотидов в сайтах рестрикции. Комбинация рестриктаз позволяет разрезать ДНК в строго установленных местах с хирургической точно-

стью, с образованием заданных фрагментов (рис. 41). Рестрикционные фрагменты ДНК уникальны у каждого человека. Поэтому, проведя их электрофорез в геле, можно получить картинку, напоминающую товарный код. По ней устанавливают отцовство, материнство и дальнейшее родство.

2. Клонирование ДНК. Многие рестриктазы производят разрезание в двуцепочечной ДНК со смещением в несколько нуклеотидов, так что на концах фрагментов образуются одноцепочечные участки. Их называют липкими концами, так как они могут образовывать комплементарные пары с одноцепочечными участками другого фрагмента. Таким образом, любой фрагмент ДНК можно воссоединить, включить в другую ДНК, например вируса или плазмиды и др. Клон – это множество копий идентичных одному предшественнику. Схема клонирования гетерологичной ДНК в плазмиде представлена на рис. 42. Для получения клона ДНК можно использовать также бактериофаги, которые могут принять фрагмент чужеродной ДНК. Чаще всего для этой цели используют ДНК фага *λ*. Центральная часть его ДНК может быть заменена фрагментом в 15–20 т. п. н. без ущерба для репликации такого рекомбинантного фага в клетках *E. coli*. Далее *E. coli* заражают фагами с фрагментом, например человеческой ДНК, так, что одна *E. coli* заражается одним рекомбинантным фагом; при размножении она будет нарабатывать фрагмент человеческой ДНК.

Таким образом получают полное собрание генома человека, распределенное по отдельным томам рекомбинантных молекул фаговых частиц в суперобложке бактерии *E. coli*. Это и есть геномная библиотека. *E. coli*, зараженные фагом, высевают на питательную среду. Неинфицированные клетки растут, образуя «газон», а инфицированные фагом – лизируются с образованием пятна лизиса, или бляшки. Каждая бляшка содержит множество копий фага с одним фрагментом ДНК человека. Теперь надо отобрать бляшки с нужным фрагментом ДНК. Это делается с помощью ДНК-зонда, т. е. корот-

кой последовательности в гене человека. Далее только этот фаг с нужным фрагментом размножают в *E. coli*.

3. Клонирование кДНК. Если клонирование геномной ДНК предполагает получение клонов ДНК независимо от того, есть в ней гены или нет, то клонирование кДНК направлено на получение генов. Для этого сначала из клеток, в которых интересующий ген экспрессируется достаточно интенсивно, выделяют мРНК. Она, как известно, после созревания не содержит интронов. Затем *in vitro* производят ее копирование с помощью обратной вирусной транскриптазы (открыта в 1970 г. Г. Темином и Д. Балтимором) в однонитевую ДНК, а потом к ней достраивают вторую комплементарную цепь. Клонирование полученной ДНК осуществляют, как описано выше. Получается библиотека кДНК или генов. Такой метод применяют для получения так называемых одноцепочечных антител. Схема метода представлена на рис. 43. Сначала получают кДНК для VH- и VL-доменов антител и сшивают эти фрагменты ДНК. После трансфекции *E. coli* этой ДНК и заражения нитчатым фагом трансфицированные бактерии размножают. В результате образуется множество нитчатых фагов, которые на своей поверхности экспрессируют V-домены антител человека.

4. Секвенирование ДНК. Это определение последовательностей нуклеотидов в ДНК. Существует два метода секвенирования. Один из них химический метод Максама–Гилберта, другой основан на репликации ДНК – метод Сэнгера. Во избежание излишнего усложнения учебного пособия, методы не описываются.

5. Амплификация сегментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (рис. 44). Для проведения ПЦР достаточно небольшого количества ДНК (из нескольких клеток). Метод прост и изящен, но для его осуществления необходимо знать нуклеотидную последовательность амплифици-

руемой ДНК, чтобы синтезировать два олигонуклеотида – праймера, каждый из которых комплементарен участку одной из цепей ДНК, примыкающему к выбранному для амплификации сегменту. Сначала ДНК нагревают для разделения дуплекса и копируют. Вновь образовавшиеся дуплексы опять разделяют нагреванием и проводят следующий раунд амплификации. В ПЦР используют фермент ДНК-полимеразу термофильных архей – Taq- или Pfu- полимеразы. В ПЦР можно амплифицировать фрагменты ДНК длиной до 35 тыс. п. н.

Применение этих и других методов сделало возможным выделение и анализ структуры и функции любого гена.

Выдающимся достижением современной генетики является создание способов направленной модификации геномов животных, растений и микроорганизмов. Имеется в виду рукотворное направленное воздействие на геном – изменение структуры генов, введение в геном чужеродных генов в виде природных или искусственно созданных генных конструкций, а также конструирование новых, доселе не существовавших в природе геномов. В 1982 г. создан Международный центр по генной инженерии и биотехнологии, объединяющий 32 государства.

Рис. 43. Получение антител человека с помощью нитчатых фагов

Началось все с трансгенеза, т. е. с переноса генов из одного организма в другой. Основанием для этого послужила разработка методов молекулярной биологии гена, позволяющих выделять определенный ген, получать необходимое число его копий (т. е. клонировать, осуществлять кройку-шитье генов – убирать ненужные участки и пришивать новые), а также техника рекомбинантных ДНК, позволяющая помещать гены в реплицирующийся вектор – вирус или плазмиду – для дальнейшего переноса в другой организм.

Рис. 44. Проведение полимеразной цепной реакции

В настоящее время трансгенез превратился в стратегическое направление исследований, дающее ответы на многие фундаментальные и прикладные вопросы. С помощью трансгенеза создают новые породы животных, сорта растений и штаммы микроорганизмов. Трансгены можно вводить в соматические клетки, в оплодотворенную яйцеклетку, а также в стволовые эмбриональные клетки, культивируемые *in vitro*.

Методы введения генов разнообразны и выбор их зависит от клеток, которые подвергаются трансгенезу. Введение в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки осуществляют непосредственной инъекцией генетической конструкции с использованием микроманипулятора. Таким способом получают трансгенных животных. В стволовые эмбриональные клетки трансгены вводят с помощью вирусной инфекции или электропорации. Затем модифицированные таким образом клетки вводят в бластоцисту мыши, которую трансплантируют в матку ложнобеременной самки. При успешном исходе получается химерная мышь, содержащая трансгенные клетки в разных тканях, в том числе и в зародышевом пути. Трансгенез соматических клеток используют как основной прием в генной терапии. Но об этом несколько позже.

12.2. Генетическая инженерия

В 1972 г. американский ученый Пол Берг опубликовал сообщение о получении *in vitro* рекомбинантной ДНК, состоящей из фрагментов ДНК вируса и бактерии. Так, развитие технологии рекомбинантных ДНК ознаменовало рождение новой отрасли молекулярной биологии – генетической инженерии. Задачи этого направления исследований разнообразны. Во-первых, это изучение механизмов функционирования генетического материала эукариот,

включая человека. Во-вторых, это практические задачи, многие из которых уже сейчас успешно решены. На основе переноса искусственно созданных генетических конструкций в разные организмы получены трансгенные микроорганизмы, растения и животные. Разработаны методы создания новых диагностикумов для выявления наследственных и вирусных заболеваний. В медицине в связи с успехами генной инженерии появилась генная терапия, основанная на введении в организм больного новой генетической конструкции. Генная инженерия индуцировала развитие таких направлений, как генная археология, генная дактилоскопия и т. д. Предпосылками к возникновению генной инженерии были три группы важнейших открытий:

- 1) открытие структуры и функции генетического аппарата клетки;
- 2) открытие механизмов рекомбинации ДНК – гомологичной и негомологичной;
- 3) обнаружение в бактериальных клетках внехромосомных маленьких кольцевых ДНК, плазмид, способных к репликации и выделяющихся из бактерий в нативном виде;
- 4) открытие рестриктаз, бактериальных ферментов, способных расщеплять ДНК в строго определенных местах с образованием фрагментов с липкими концами.

Из этого перечисления открытий видно, что главным теоретическим принципом генной инженерии является генетическая рекомбинация, которая в естественных условиях постоянно осуществляется в организмах. Однако в природе существует много ограничений на рекомбинацию между участками ДНК. Гомологичная рекомбинация происходит только между гомологичными хромосомами при скрещивании близкородственных организмов. Нельзя извне управлять процессом рекомбинации в организме, поэтому нельзя предугадать, какое получится потомство при скрещивании, и результаты часто бывают прямо противоположными ожидаемым. Эти обстоятельства делают путь к получению новой породы животных или нового сорта растений клас-

сическими методами селекции долгим, тернистым и зачастую малоуспешным.

Сущность генной инженерии заключается в том, что процесс рекомбинации производится вне организма. При этом преодолеваются все препятствия, с которыми сталкиваются ученые при классической селекции. В результате появились неограниченные возможности скрещивать гены видов, далеко отстоящих друг от друга на эволюционной лестнице. Кроме того, появилась возможность управлять процессом рекомбинации, так как *in vitro* он не защищен запрещающими механизмами организма. И наконец, можно предсказывать результат.

Как же получают необходимую рекомбинантную ДНК? Для этого используют вирусы или плазмиды. Сначала получают фрагмент гетерологичной ДНК, например эукариотической и плазмидной с одинаковыми липкими концами. Для этого ту и другую ДНК обрабатывают одной и той же рестриктазой. В результате одноцепочечный липкий конец одного фрагмента оказывается комплементарным концу другого фрагмента. Гибридизацию фрагментов проводят *in vitro*, а затем рекомбинантную плазмиду вводят в клетку. Обычно используемая плазида имеет маркерный ген, придающий бактерии устойчивость к антибиотику. Поэтому бактерии, несущие рекомбинантные плазмиды, будут расти на среде с добавлением этого антибиотика, а все другие погибнут. Рекомбинантная плазида начинает функционировать, т. е. ее ДНК реплицируется и транскрибируется. В результате в бактериальной клетке появляется белок, которого никогда в этих клетках в естественных условиях не было. Таким способом можно ввести любой ген в любую клетку.

Итак, основные процедуры генной инженерии сводятся к следующим:

- 1) рекомбинация *in vitro* ДНК-вектора и ДНК-гена;
- 2) введение рекомбинантной ДНК в вирус или плазмиду;
- 3) получение клона клеток, экспрессирующих данный ген.

12.3. Трансгенные микроорганизмы

Первыми организмами, которые по воле ученых содержали рекомбинантную ДНК, явились бактерии, а именно *E. coli*, производящие генноинженерный человеческий инсулин. Инсулин – гормон поджелудочной железы – играет главную роль в углеводном обмене. Если он не производится в организме (по разным причинам), развивается тяжелое заболевание – диабет. Для лечения больных диабетом применяли инъекции свиного инсулина, на который у многих больных развивалась иммунологическая реакция. Но даже потребности в свином инсулине удовлетворялись всего на 60 %. Поэтому в качестве первой практической задачи генные инженеры клонировали ген человеческого инсулина и включили его в плазмиду, которой заразили *E. coli* (рис. 45). В результате *E. coli* стали нарабатывать человеческий инсулин. За ночь каждая бактерия дает потомство 10^7 клеток. Из 1 000 л бактериальной культуры получают 200 г инсулина, столько же, сколько получали раньше из 1 600 кг поджелудочной железы свиней. Главное, для этих больных решена проблема иммунологической реактивности на чужеродный свиной инсулин.

Другой генно-инженерный биопрепарат – это интерферон, успешно применяемый для лечения вирусных заболеваний и злокачественных опухолей. В настоящее время на стадии клинического испытания находится более 1 000 генно-инженерных лекарственных веществ. Около 200 новых диагностических препаратов уже введено в медицинскую практику. Так начало развиваться одно из главных направлений в генной инженерии – наработка труднодоступных лекарственных биопрепаратов: гормонов, факторов роста, нейро- и иммуномодуляторов, аминокислот, витаминов, антибиотиков. Второе направление – это получение рекомбинантных вакцин для профилактики инфекционных заболеваний. Идеалом является комбинированная вакцина, состоящая из иммунодоминантных эпитопов ряда возбудителей (что в естественных условиях не встречается), эффективная при использовании в малой дозе для перорального введения людям и сельскохозяйственным животным.

В пищевой промышленности используются трансгенные штаммы организмов в хлебопечении, сыроварении, получении кисломолочных продуктов, виноделии и т. д.

Рис. 45. Получение генноинженерного инсулина

Для использования в сельском хозяйстве получены штаммы трансгенных бактерий, которые наиболее эффективно осуществляют фиксацию азота, улучшают состояние почв, препятствуют образованию льда на корнях растений и т. д. Для целей охраны окружающей среды используют трансгенные бактерии, которые очищают почву и воду от фенолов, от загрязнения нефтью, ракетным топливом гептилом и др. загрязняющими веществами.

Ген фермента хитиназы встроили в бакуловирус (вирусы этой группы поражают только насекомых), последний используют в качестве биоинсектицида. Попадая в организм насекомых, он поражает их кишечник. Есть проект, предусматривающий введение гена хитиназы в растения.

12.4. Трансгенные растения

Согласно прогнозам, к 2020 г. население Земного шара достигнет 8 млрд человек. Питание и медицинское обслуживание такого количества людей становится первостепенной задачей, стоящей перед человечеством. Растения являются основой питания людей. Кроме того, они, по-видимому, еще долго будут оставаться источником биологически активных и лекарственных препаратов. Следовательно, повышение урожайности сельскохозяйственных растений является главной проблемой современности.

Зеленая революция, в результате которой при использовании традиционных методов селекции ученые добились повышения урожайности сельскохозяйственных культур вдвое, завершилась 30 лет назад. Это было достигнуто

за счет переноса в создаваемые сорта растений генов, отвечающих за развитие короткого и прочного стебля, за более эффективную утилизацию удобрений, за устойчивость к заболеваниям и вредителям и др. Идеолог Зеленой революции Норман Борлуаг в 1970 г. награжден Нобелевской премией. Сохранение демографического роста не снимает с повестки дня проблему обеспечения населения продовольствием. Одно из ее решений заключается в создании трансгенных растений методами переноса генов не путем скрещиваний выбранных сортов, а непосредственным внесением в геном нужных генов.

Растения имеют одно важное преимущество перед животными – легко осуществима их регенерация *in vitro* из недифференцированных соматических клеток с получением нормальных фертильных растений. Это обусловлено тотипотентностью растительных клеток. Для конструирования генома растений необходимо решить следующие задачи: выделить конкретный ген, обеспечить включение его в наследственный аппарат растительной клетки и регенерировать из единичных модифицированных клеток нормальное растение с измененным генотипом. Для этого используют несколько методов трансгенеза.

Одним из наиболее распространенных является перенос генов с помощью Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, бактерий, которые поражают растения с образованием на корнях опухолеподобных разрастаний – корончатых галлов (рис. 46).

Рис. 46. Методы получения трансгенных растений

Эти бактерии обладают естественным механизмом горизонтального переноса генов, передавая свои плазмиды растительным клеткам. Это самый замечательный из известных примеров природной генетической инженерии. В природных популяциях *Agrobacterium tumefaciens* имеются плазмиды, содержащие опухолеродный генный сегмент. Встраивание его в клетку растения обуславливает развитие опухоли, которая синтезирует производные ар-

гинина, отсутствующие у хозяина. Они необходимы для роста бактерий. Генные инженеры используют эти бактерии для трансгенеза. При этом из их плазмид вырезают гены, ответственные за образование корончатых галлов, и вносят нужные генетические конструкции. Однако этот метод эффективен только для двудольных растений, для однодольных, в основном злаковых, применяют баллистический метод – выстреливание из «генного ружья» золотых или вольфрамовых пулек, частиц величиной 4мкм, покрытых ДНК, которую следует перенести в клетку. Кроме того, применяют введение плазмидной ДНК в лишенные оболочки клетки растений (протопласты), электропорацию клеток, прокалывание клеток путем встряхивания их в суспензии микроигл, а также с помощью вирусной инфекции.

Вместе с нужным геном встраивают обычно и так называемый репортерный ген (ген устойчивости к канамицину), по которому судят, встроилась ли конструкция в клетку.

Постоянную угрозу для урожая сельскохозяйственных культур представляют сорняки. Для борьбы с ними применяют токсичные вещества – гербициды. Но при применении их страдают и культурные растения. Значит, надо сделать так, чтобы последние стали устойчивыми к гербицидам. Достигается это за счет введения генов, обеспечивающих ускоренный метаболизм гербицидов или кодирующих нечувствительные к гербицидам белки-мишени. В настоящее время выведены такие растения, которые являются устойчивыми к гербицидам широкого спектра действия. Бельгийцы пытаются выйти на рынок с трансгенной капустой, устойчивой к гербицидам. Пока им это не удается, так как существует опасность того, что она сама станет сорняком, с которым не справиться. Устойчивая к гербициду Roundup соя признана в США в 1997 г. растением года.

Другая проблема, которая решается методами трансгенеза, – это создание растений, устойчивых к различным болезням: вирусным, бактериальным, грибковым, а также к вредителям. Такие растения получены. Многие из них устойчивы к десятку вирусов.

Для создания устойчивости к вредителям генные инженеры использовали способность токсина *B. turingiensis* поражать насекомых. Токсин bt расщепляется в кишечнике насекомых и активизируется, после чего связывается с рецепторами клеток кишечника и вызывает их лизис. Для млекопитающих токсин *B. turingiensis* совершенно безвреден. Ген, отвечающий за синтез этого токсина, выделен, клонирован и перенесен в геном растений. Они оказались не поедаемыми насекомыми. В настоящее время трансгенные растения хлопка, кукурузы, картофеля с геном токсина bt уже производятся разными фирмами и семена их продаются.

Новая генетическая информация может быть включена не только в ядерный геном растений, но и в пластиды. В результате в такой трансгенной клетке образуется до 1000 копий трансгена. Такие растения называются транспластосомиками.

Особое направление в трансгенезе растений связано с получением так называемых съедобных вакцин. Для этого в растения вводятся гены, кодирующие белки патогенных для человека бактерий и вирусов. Получены бананы и картофель, синтезирующие вакцины против холерного вибриона. Растения могут производить и белки животного типа. Удалось получить растения, в листьях которых содержатся антитела против стрептококка, вызывающего зубной кариес.

С помощью трансгенеза оказалось возможным управлять синтезом жирных кислот в растениях в целях повышения или снижения содержания ненасыщенных жирных кислот в растительном масле, а также получение белка, более сбалансированного по аминокислотному составу и легкоусвояемого млекопитающими.

Получение трансгенных растений превратилось в рутинную технологию для решения различных практических задач, которыми занимаются научные учреждения и коммерческие фирмы. В настоящее время у 120 видов растений получены трансгенные формы. Разрешены для использования в народном хозяйстве трансгенные виды: соя, кукуруза, картофель, томаты, хлопок,

рапс, тыква, табак, папая, свекла. В растения введены гены устойчивости к гербицидам, насекомым, вирусам, грибковым и бактериальным заболеваниям, а также гены, регулирующие созревание плодов и др. В Китае на многих тысячах гектаров произрастают растения с генами ризобактерий, фиксирующих азот. Пока не ясно, можно ли заменить использование азотистых удобрений таким способом.

Но главной задачей трансгенеза растений все-таки остается повышение продуктивности. Российскими учеными создано 20 видов трансгенных растений. Некоторые из них в настоящее время проходят испытания. Ниже представлен перечень некоторых трансгенных растений.

1. Растения с генами устойчивости к вирусным заболеваниям (табак с геном интерферона, томаты, кукуруза с генами устойчивости).

2. Растения с генами устойчивости к гербицидам «Баста» и «Облава».

3. Растения с генами устойчивости к вредителям, в основном с генами токсина *B. turingiensis* (картофель устойчивый к колорадскому жуку и фитофторе, кукуруза, хлопчатник).

4. Растения с генами нитрогеназы, фермента из азотфиксирующих бактерий, способные усваивать атмосферный азот.

5. Растения – пищевые вакцины (картофель и бананы как вакцины против холеры), растения с генами антител против холеры и других заболеваний.

6. Транспластомики – растения, у которых трансген введен в пластиды (неординарная экспрессия гена до 10 000 копий в клетке).

7. Растения с генами, обеспечивающими распад предшественника этилена, для предотвращения быстрой порчи (негниющие томаты, бананы свключенными в их геном генов, тормозящих синтез этилена, и др.).

8. Растения с генами лекарственных препаратов.

9. Синие розы, с геном пигмента, заимствованным у других растений.

12.5. Трансгенные животные

Главным достижением генной инженерии является создание способов модификации геномов животных. Речь идет о направленном изменении структуры генов животного или введения в геном чужеродных натуральных и искусственных генов, т. е. о направленном конструировании новых геномов.

Основой этого подхода является введение клонированной ДНК с помощью микроинъекции в пронуклеус, обычно мужской, зиготы (рис. 47). При этом экзогенная ДНК способна интегрироваться в геном и становиться его компонентом – трансгеном, следовательно, наследоваться в поколениях. Для проведения этой процедуры оплодотворенные яйцеклетки выделяют из яйцевода животного и с использованием микроманипулятора вводят ДНК. На рис. 47 представлена схема подобного эксперимента. Введенная таким способом экзогенная ДНК способна интегрироваться в геном реципиента случайным образом и зачастую в виде множества копий.

Рис. 47. Получение трансгенных животных

Вследствие этого экспрессия одного и того же трансгена может варьировать в широких пределах – от полного ее отсутствия до уровня, превышающего экспрессию аутентичного гена. Тем не менее этот метод активно используется для получения как лабораторных, так и сельскохозяйственных трансгенных животных. Лабораторные трансгенные животные используются, в основном, для моделирования заболеваний человека. В настоящее время благодаря трансгенной технологии получено более 300 трансгенных линий мышей, моделирующих воспалительные, аутоиммунные, нейродегенеративные, онкологические и другие заболевания человека. Трансгенные сельскохозяйственные животные

используются, в основном, как «фабрики» для наработки необходимых для человека биопрепаратов.

В последующем техника введения чужеродной ДНК в геном животных усовершенствовалась так, что стало возможным вводить ДНК направленно, адресно в конкретную часть генома. Основой этой технологии послужило использование эмбриональных стволовых (ЭС) клеток. Известно, что ЭС-клетки сохраняют высокие плюрипотентные свойства при длительном культивировании *in vitro* и, будучи вновь введенными в эмбрион, способны формировать химеры. Эта уникальная способность ЭС-клеток открыла широкие возможности для манипуляции с их генами. Адресное введение гена достигается благодаря возможности рекомбинации между экзогенной ДНК и ДНК реципиента. В результате этого происходит адресная инсерция гена в ДНК-мишень ЭС-клеток. После этого ЭС-клетки внедряют в бластоцисту животных на ранних стадиях развития (рис. 48). В результате трансгенные эмбриональные стволовые клетки принимают участие в формировании тканей развивающегося плода, который представляет собой химеру. У химерных животных до 50 % клеток составляют клетки – потомки введенных трансгенных эмбриональных стволовых клеток. Показано, что они присутствуют во всех тканях, в том числе и зародышевом пути.

В эмбриональные стволовые клетки трансгены вводят с помощью ретровирусов, электропорации, липосом, в виде «голой» плазмидной ДНК и искусственных конструкций на основе полисахаридов и др. К настоящему времени получено более 2 000 трансгенных мышей, в геноме которых находятся различные введенные генетические конструкции. Получены трансгенные козы, овцы, свиньи, коровы и другие сельскохозяйственные животные.

Вводимая таким способом ДНК интегрируется в геном случайным образом и зачастую в виде множественных копий. Вследствие этого экспрессия трансгена у разных животных может сильно варьировать. Тем не менее этот метод активно используется для практических целей, например, для получения животных, которые являются поставщиками человеческих белков – фак-

торов свертывания крови, гормонов и других необходимых для лечения человека белков. Дело в том, что трансгенные прокариоты, которые получать проще, не достаточно полно справляются с аналогичной задачей. Они не могут осуществлять посттрансляционную модификацию белков так, как это делают эукариотические клетки (фолдинг, гликозилирование и др.). Использование биореакторов, в которых продуцентами биопрепаратов являются культивируемые клетки животных, очень дорого. К тому же культивируемые клетки часто проявляют нестабильность генома. В связи с этим наиболее перспективной для получения белков человека является биотехнология с использованием трансгенных животных. Животные адекватным образом осуществляют посттрансляционные процессы и могут быть настоящими фабриками по производству любого белка. При этом можно сделать так, что нужный белок будет выделяться с молоком, что очень удобно в ряде случаев. Для этого трансген помещают под контроль одного из генов, контролирующих белки молока. Для промышленного биопроизводства используют коров, коз, овец и свиней. В настоящее время имеется реальная возможность производства в молоке трансгенных животных более 65 биологически активных белков человека. Так получают антитрипсин для лечения заболевания легких, антитромбин, необходимый для лечения инфаркта миокарда и инсульта, факторы свертывания крови для лечения гемофилии, С-реактивный белок для лечения иммунодефицитов, иммуномодуляторы, биостимуляторы, антитела и др.

Трансгенные животные находят применение для моделирования заболеваний человека. Введенный трансген обеспечивает экспрессию рецептора к соответствующему вирусу и, следовательно, возможность возникновения вирусной инфекции. Такой прием необходим в случае моделирования на животных вирусных инфекций, поражающих только человека.

В последние годы внимание исследователей привлечено к возможности модификации генома животных на уровне индивидуальных хромосом. Появились способы создания искусственных хромосом и подходы к переносу их

от одного животного к другому. По сути, это новая биотехнология или генная инженерия. Она основана на модификации генома эмбриональных стволовых клеток. В Институте цитологии и генетики СО РАН О. Л. Серовым с сотрудниками используется оригинальный подход. Получают гибриды между эмбриональными стволовыми клетками и соматическими клетками. В полученных гибридах, только в тех из них, которые сохраняют плюрипотентные свойства и способны образовывать при введении в бластоцисту химеры, находятся единичные хромосомы от соматического партнера. Будучи введенными в бластоцисту мыши, они способны формировать химеры, а последние – продуцировать гаметы, идентичные по генотипу гибридным клеткам. Согласно этой схеме, возможен перенос индивидуальных хромосом от одного животного к другому. Не менее привлекательным выглядит сочетание метода с клонированием. В этом случае ядра полученных гибридов переносят в энуклеированную яйцеклетку. Значит, такие реконструированные ооциты обеспечат развитие особей с генотипом гибридной клетки.

Есть еще одна модификация трансгенеза, представляющая интерес тем, что она позволяет переносить большие количества генетического материала. В основе его – контролируемая фрагментация клеточного ядра, так что отдельные фрагменты содержат индивидуальные хромосомы или фрагменты, называемые микроклетками. Последние сливаются с эмбриональными стволовыми клетками. Полученные мыши-химеры (способом, описанным выше) называют транс-хромосомными. Недавно группа английских ученых получила серию транс-хромосомных мышей, несущих фрагменты 21 хромосомы человека. Важно, что у этих животных наблюдается тканеспецифическая регуляция экспрессии человеческих генов. Ученые научились также получать искусственные хромосомы и вводить их в геном животных. Уже получены такие мыши, которые могут использоваться для изучения роли отдельных структур в организации хромосом млекопитающих.

В последнее время особую популярность приобретает бакуловирусная экспрессионная система на основе клеток насекомых отряда Spodoptera для

получения белковых препаратов, необходимых человеку. Геном бакуловирусов обеспечивает включение больших фрагментов чужеродной ДНК. После заражения насекомых рекомбинантным вирусом трансген экспрессируется. При этом белковый продукт трансгена проходит все стадии созревания и модификации, присущие эукариотическим клеткам.

12.6. Клонирование

Новая страница в модификации геномов животных – это клонирование, основанное на переносе в энуклеированную яйцеклетку ядер соматических клеток, т. е. замене генома созревающей яйцеклетки на геном, взятый от другого животного. В комбинации с методами трансгенеза клонирование открывает фантастические возможности для генетической модификации геномов животных. Клонирование – это точное воспроизведение того или иного живого объекта в каком-то количестве копий. Бесполое размножение одной бактерии или амебы – это образование клонов соответствующих организмов.

Для генетиков растений получение клонов не составляет никаких проблем. Апомиксис – это не что иное, как специфический способ размножения, позволяющий получать генетические копии материнского организма. Однако такая природой созданная технология в естественных условиях используется только некоторыми растениями (например, кукурузой). Для многих сельскохозяйственных растений характерен половой способ размножения. Но и для них метод клонирования разработан давно. Если любую растительную клетку лишить прочной оболочки, а потом обработать ростовыми факторами, она начинает делиться, образуя колонии клеток, каллус, из которых каждая может дать начало целому растению. Для селекционеров эта технология представляет большой практический интерес, так как дает возможность вводить определенные гены в клетки каллуса и впоследствии получать серию растений, модифицированных по желанию экспериментатора.

Генетики животных получают клоны, если животные размножаются партеногенезом, т. е. бесполом путем, без предшествующего оплодотворения. Получают клоны и в экспериментальной эмбриологии. Если зародыш морского ежа на ранней стадии дробления разделить на составляющие его клетки – бластомеры, то из каждого бластомера разовьется целый организм. У человека известны случаи своеобразного естественного клонирования. Это так называемые однояйцевые близнецы, развивающиеся сравнительно редко из-за разделения оплодотворенной яйцеклетки на два бластомера. Каждый из них в дальнейшем развивается самостоятельно. Такие близнецы очень похожи друг на друга.

В настоящее время предприняты попытки (и они увенчались успехом!) клонирования животных путем пересадки ядер соматических клеток в энуклеированные яйцеклетки.

История клонирования животных началась с исследований российского ученого Г. В. Лопашова в 40-х гг. Он разработал метод пересадки ядер в яйцеклетку лягушки. Однако из-за беспредельного господства в отечественной биологии печально известной лысенковщины, объявившей генетику лженаукой, статья Г. В. Лопашова не была опубликована, а в 50-е гг. американские эмбриологи Бригс и Кинг выполнили сходные эксперименты и приоритет достался им, как это часто случалось в истории российской науки. В дальнейшем Джон Гердон из Великобритании усовершенствовал эту методику и стал удалять ядра из яйцеклеток лягушки и вводить вместо них ядра разных дифференцированных соматических клеток, в частности из эпителия кишечника и плавательной перепонки. В результате развития такие модифицированные яйцеклетки превращались во взрослых особи, точные копии лягушки, от которой взяты ядра соматических клеток (рис. 49). Вслед за этими работами Карл Иллмензее опубликовал сообщение о том, что ему удалось получить клон из трех мышат. К сожалению из-за того, что никому из экспериментаторов не удалось воспроизвести эти эксперименты, опыты Иллмензее признали недостоверными и на некоторое время в этой области исследований воцари-

лось спокойствие. Однако в феврале 1997 г. появилось сообщение о том, что в лаборатории Яна Вильмута из Рослинского института (Эдинбург, Шотландия) разработан эффективный метод клонирования млекопитающих и на его основе создана овечка Долли. Схема эксперимента представлена на рис. 50.

Рис. 49. Схема получения клонированных лягушек

Ооциты были извлечены из овец породы шотландская черномордая и помещены в культуральную среду, после чего на них проведена операция энуклеации – удаления клеточного ядра. Ядро соматической клетки взяли для трансплантации из молочной железы лактирующей овцы породы Финский дорсет и слили с энуклеированной яйцеклеткой. После этого модифицированную яйцеклетку активировали к делению электрическим током и после культивирования в питательной среде в течение шести дней трансплантировали в матку овцы – суррогатной матери. Получается, что у Долли три матери: которая дала свой генетический материал; от которой взяли яйцеклетку (кстати, митохондрии у Долли от этой овцы); и которая вынашивала ягненка, – и ни одного отца. Из 236 опытов успешным оказался один. В результате родилась овечка Долли. Вслед за этим был получен клон мышей группой ученых из Гонолулу под руководством Риузо Янагимачи.

Рис. 50. Схема получения овечки Долли

Эти работы безусловно являются выдающимся достижением биотехнологии. Можно сказать, что техническая задача получения клонированных животных решена.

Появление Долли вызвало немедленную реакцию во всех странах. Ответственность взволнована вопросом: допустимо ли распространить метод кло-

нирования на человека? Правительства многих стран наложили мораторий на клонирование человека, но запретить эти эксперименты вряд ли удастся. Нет ничего, что было бы недоступно в этой технологии для современной эмбриологической лаборатории. Американские ученые получили клонированных обезьян, что очень близко к человеку. Однако есть надежда на то, что сама природа поставит заслон этим исследованиям на человеке. Нельзя сказать, что яйцеклетка человека больше похожа на яйцеклетку овцы, чем сам человек на овцу. Различия большие, но теоретически клонирование человека возможно. Только вряд ли нужно. Хочется думать, что человечество воздержится от таких рискованных экспериментов.

В теоретическом плане работа Яна Вильмута показала, что в процессе развития геном не претерпевает необратимых изменений и возможно репрограммирование генома соматических клеток путем трансплантации их в цитоплазму ооцита. В связи с этим клонирование млекопитающих открывает возможность выращивания ткани для пересадки пациентам с тяжелыми неизлечимыми заболеваниями, т. е. создание банков здоровых тканей.

Глава 13. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

Успехи трансгенеза обусловили возникновение нового комплекса методов лечения заболеваний – генную терапию, основанную на введении в организм генетических конструкций в целях лечения заболеваний путем направленного изменения генных дефектов или придания клеткам новых функций. В арсенале генной терапии несколько приемов. Один из них используется в тех случаях, когда утрачена функция какого-либо гена и для лечения эту функцию нужно восстановить. Наиболее подходят для такого способа лечения заболевания, которые обусловлены дефектом одного гена, особенно если этот ген выделен и клонирован. В этом случае введение в организм нормального гена при его экспрессии обеспечит недостающий продукт (позитивная генная терапия).

Второй подход связан с необходимостью подавления функции «больного» гена или избыточно экспрессирующегося гена. Этот прием называется генный нокаут. Для решения этой задачи применяют ряд методов. Во-первых, перенос гена, кодирующего антисмысловую РНК (антисенсРНК), т. е. РНК, комплементарную РНК «больного» гена; в результате трансляция последней подавляется. Такой подход называется негативной генной терапией, или антисенс-терапией. Для избавления от ненужного генного продукта используют также метод, называемый внутриклеточной иммунизацией. Он заключается в том, что в клетку вводят ген, кодирующий антитело к нежелательному белку, при экспрессии гена такие антитела будут связывать специфически образующийся белок и отменять его функцию. Такие внутриклеточные антитела получили название интрабоди. Их применение облегчилось замечательной находкой. Известно, что за связывание с антигеном отвечает не вся сложная молекула антитела, состоящая как минимум из двух тяжелых и двух легких полипептидных цепей, а только переменные домены каждой из них. Вот и сделали конструкцию, кодирующую эти два домена – так называемые одноцепочечные антитела. К этой конструкции можно присоединить сигнальные последовательности, которые будут направлять ее в определенные компартменты клетки, к определенным клеточным структурам. Таким образом внутриклеточные антитела открывают универсальный способ воздействия внутри клетки на любые продукты синтеза. Например, подобная работа проведена с б-субъединицей рецептора интерлейкина-II. Экспрессия этого рецептора в значительной степени повышена при некоторых формах лейкомии. Внутриклеточные антитела в данном случае обусловили отсутствие рецептора на поверхности клеток и обусловили тем самым лечебный эффект. Еще один прием для подавления функции гена связан с введением генетической конструкции, кодирующей рибозим, т. е. РНК, обладающую ферментативными свойствами и специфически расщепляющую соответствующую вредную мРНК, что, как нетрудно догадаться, приведет к отмене ее трансляции и выработки белка.

Третий подход – это коррегирующая генная терапия, т. е. исправление структуры и, следовательно, функции испорченного гена.

Иногда как отдельный способ генной терапии выделяют модификацию генетическим путем клеток для усиления иммунного ответа. В этом случае гены вводят либо в клетки, против которых вследствие их модификации развивается иммунный ответ (усиление иммунитета на опухолевые клетки), либо в клетки иммунной системы (для коррекции функции иммунной системы при иммунодефицитах).

В число заболеваний, подлежащих генной терапии, входят, прежде всего, наследственные болезни, и среди них те, которые обусловлены рецессивной мутацией и являются моногенными. В настоящее время известно более 4 500 заболеваний, относящихся к генетическим, т. е. в основе их патогенеза лежит повреждение генов. Но и такие болезни, как рак, атеросклероз, нейropsychические заболевания, диабет и др., также могут быть объектами генной терапии. Следует заметить, что если речь идет о человеке, то подразумевается только соматическая генная терапия, т. е. введение генов в соматические, а не зародышевые клетки.

Во всех случаях генной терапии чаще всего используют метод *ex vivo* (рис. 51), заключающийся в том, что клетки, взятые из организма пациента, подвергают трансгенезу *in vitro*, отбирают трансфицированные клетки и возвращают обратно.

Рис. 51. Генотерапия способом *ex vivo*

Какую бы стратегию генной терапии ученые ни использовали, в каждом случае необходимо рассмотреть ряд практических вопросов, которые решаются, в принципе, так же, как и при получении трансгенных животных, а именно: как сделать и как доставить необходимую генную конструкцию, как обеспечить экспрессию гена и ее регуляцию в организме. Процесс генокор-

рекции начинается с создания полноценно работающей генетической конструкции, содержащей кодирующую и регуляторную части гена. На следующем этапе решается проблема вектора, обеспечивающего эффективную, а по возможности и адресную доставку гена в клетки-мишени.

По выражению Индера Вермы из Института им. Солка в США, в генной терапии есть три основных проблемы – доставки, доставки и доставки.

Векторы для доставки генетических конструкций по назначению делят на вирусные и невирусные. В вирусных векторах рекомбинантная ДНК, несущая экспрессируемый ген, упакована в геном ретровируса, аденовируса, герпес-вируса и т. д. При этом из вирусного генома удаляют ту его часть, которая ответственна за формирование инфекционных вирусных частиц и лизис клеток, но сохраняют те гены, которые отвечают за перенос и экспрессию клонированного гена. До последнего времени главное место среди вирусных векторов занимали ретровирусы (РНК-содержащие вирусы). Ретровирусы обладают такими свойствами, словно они специально созданы для переноса генов: для репликации они должны внедриться в геном клетки-хозяина, стабильно в нем реплицироваться. Затем они, подобно клеточным генам, передаются в поколениях клеток. При этом ретровирусы позволяют включать в состав их генома чужеродные гены без утраты способности к репликации. Проникновение модифицированного ретровируса в клетку индуцируется его присоединением к соответствующему рецептору. Это делает возможным переносить гены в вирусном векторе в определенный тип клеток. Правда, эти клетки должны быть делящимися, потому что ретровирусы не могут проникать через ядерную мембрану и только при ее лизисе (что происходит при делении клеток) оказываются способными внедриться в геном хозяина.

Аденовирусные векторы создаются на основе ДНК-содержащих вирусов, в частности вызывающих у человека заболевания верхних дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта. Они обладают широкой видовой и тканевой специфичностью, заражают клетки на любой стадии клеточного цикла, способны заражать клетки нервной системы, мышечной ткани, иммунной

системы. В подавляющем большинстве случаев они не интегрируются в геном, а находятся в клетке в форме эписом. В качестве векторов используют также вирусы герпеса, осповакцины, лентивирусы и др.

Вирусные векторы эффективно доставляют генетические конструкции в клетки, однако у них много недостатков. Ретровирусы проникают, как уже было сказано, только в делящиеся клетки, внедряются в геном хозяина, что чревато инсерционным мутагенезом и активацией онкогенов или инактивацией антионкогенов и как следствие риском развития опухолей. Аденовирусы не внедряются в геном, что является их преимуществом, но эписомальная их локализация не обеспечивает длительной экспрессии трансгена. Поэтому такие рекомбинантные вирусы надо вводить повторно, что вызывает развитие иммунологических реакций. В 1999 г. все молекулярные биологи (и не только они) были потрясены трагическим случаем с пациентом, лечившимся в США методом генной терапии. Ему вводили аденовирус с геном орнитилкарбомилтрансферазы, по которому у него был дефицит. После четвертой инъекции пациент погиб. Вскрытие показало атрофию всех внутренних органов за счет гибели клеток по типу апоптоза.

Недостатки вирусных векторов заставляют генных инженеров изыскивать другие способы доставки генетических конструкций. Так появились невирусные векторы. Арсенал их довольно разнообразен – это «голая» плазмидная ДНК, катионные липосомы, искусственные макромолекулы, состоящие из углеводных адресных групп и сигнальных последовательностей, обеспечивающих поступление в клетки, введение генов в искусственных хромосомах и др. Перечисленные векторы пытаются ввести так, чтобы обеспечить целевую доставку в клетки, где они будут экспрессироваться. Наиболее распространены следующие способы направленного введения векторов: непосредственно в ткань (кожа, мышцы, тимус), в специальном баллончике в сосуд для лечения ишемической болезни сердца, в виде аэрозолей для лечения болезней легких и т. д. Однако перечисленные векторы и способы их введения имеют один главный недостаток – встраивание переносимой гене-

тической информации происходит случайным образом. В идеале введение гена для замещения испорченного должно быть прицельным, т. е. сайт-специфическим. Поэтому в настоящее время начинают применять метод химеропластики. Делают шпильку – дуплекс, состоящий из комплементарных нуклеотидов ДНК и РНК. Ветви шпильки комплементарны участкам испорченного гена, а в петле – нуклеотид, который нужно заменить. Такие химеропласты доставляют в клетки (чаще всего в эмбриональные стволовые) с помощью липосом. В конструкции обязательно присутствует бактериальная рекомбиназа. Таким способом удастся исправить до 40 % клеток. Другой способ исправления гена основан на исключении экзона, в котором находится мутация. В некоторых случаях удаление из первичного транскрипта экзона, содержащего стоп-кодон, несущественного для функции белка, спасает ситуацию. Белок синтезируется, правда без соответствующего домена, но может выполнять основную функцию и при этой утрате. Для исключения экзона в клетки вводят короткие антисенс-РНК, комплементарные участкам сплайсинга, чтобы экзон оказался сплайсированным.

В последнее время особое внимание исследователей уделяется созданию векторов на основе искусственных хромосом млекопитающих. Благодаря наличию в них основных структурных элементов обычных хромосом такие мини-хромосомы длительно удерживаются в клетках и способны нести полноразмерные гены и их регуляторные элементы, которые необходимы для правильной работы гена в нужной ткани и в должное время.

Наиболее успешна генная терапия при лечении наследственных дефектов метаболизма. Генно-терапевтическая стратегия облегчается в данных случаях тем, что для нормального существования организма необязателен 100 % уровень отсутствующего у больного фермента. Например, гемофилия В развивается от недостаточности фактора свертывания крови IX, когда уровень его менее 1 % от нормы. Если этот уровень удастся увеличить до 1–10 %, больные чувствуют себя вполне удовлетворительно. Поэтому в этих случаях легче осуществить заместительную терапию.

Первое успешное применение генной терапии связано с лечением ТКИД – тяжелого комбинированного иммунодефицита, обусловленного недостаточностью фермента аденозиндезаминазы (АДА). В сентябре 1990 г. в Бетесде (США) четырехлетней девочке, страдающей этим заболеванием, были пересажены ее собственные клетки – лимфоциты, в которые с помощью ретровируса был введен ген АДА. В результате наблюдалось улучшение состояния пациентки. Столь же успешным было лечение еще одной такой же пациентки.

Другой пример лечения заболевания из этой же группы болезней – наследственной гиперхолестеринемии. Дефект находится в гене, кодирующем рецептор липопротеинов низкой плотности. Следствие этого – гиперхолестеринемия, ранний атеросклероз, инфаркты миокарда. Для лечения у пациента провели частичное удаление ткани печени и в печеночные клетки с помощью ретровируса ввели генетическую конструкцию, содержащую ген нормального рецептора. Через воротную вену трансгенные клетки возвращены пациенту. Наблюдалось восстановление экспрессии рецептора. Это очень важный результат. Он показывает некую общую идею использования клеток печени для трансгенеза ввиду ее особого значения для функционирования организма. Не зря наши предки считали печень (а не мозг) местом жизненной силы и управительницей эмоций. Клетки печени, которые синтезируют много важных белков, могут быть использованы для вставки генов, компенсирующих наследственные дефекты. Аналогично лечению наследственной гиперхолестеринемии лечат гемофилию В. С гемофилией А – болезнью королей и царей – дела обстоят сложнее из-за большого размера гена фактора свертывания крови VIII. Это препятствует встраиванию его в вирусный вектор. Однако можно использовать укороченный ген, который кодирует белок без одного не существенного для проявления функции домена и обеспечивает терапевтический уровень фактора свертывания крови.

В эксперименте достаточно хорошо разработаны молекулярно-генетические подходы к лечению миодистрофии Дюшенна (МДД). Это одно из частых наследственных заболеваний человека (1: 5 000). Причиной его яв-

ляется мутация в гене дистрофина, структурного белка сарколеммы. Ген дистрофина – один из самых больших в геноме человека. Он содержит 85 экзонов и занимает 0,1 % ДНК клетки. Его молекулярная масса составляет 427 кD. Мутация в гене проявляется дегенерацией мышечных волокон скелетной мускулатуры, диафрагмы и сердца. Разработаны следующие приемы генной терапии МДД:

1. Введение в мышцу в аденовирусном или ретровирусном векторе мини-гена дистрофина, способного восстанавливать нормальный мышечный фенотип.
2. Невирусные способы доставки полноразмерного гена дистрофина прямой инъекцией, баллистической трансфекцией, введение в составе липосом и полимерных носителей.
3. Химеропластика, или генная хирургия, заключающаяся в трансфекции гибридными ДНК/РНК молекулами шпилечной структуры с нужным основанием, по которому планируется замена.
4. Исключение экзона путем трансфекции короткими антисмысловыми РНК, комплементарными сайтам сплайсинга первичного транскрипта, Это приводит к выбрасыванию экзона, несущего мутацию. При этом восстанавливается рамка считывания и образуется усеченный белок, способный выполнять функцию.
5. Дерепрессия аутосомного гомолога дистрофина – гена утрофина, продукт которого может компенсировать недостаток дистрофина.

Список наследственных заболеваний, находящихся на разных стадиях реализации метода генной терапии, пополняется с каждым годом. Генной терапии подлежат и многие приобретенные заболевания. Среди них инфекционные болезни и злокачественные опухоли, хорея Геттингтона, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и др. К настоящему времени в мире более 3 000 человек имеют в своем организме трансгенные клетки, введенные в целях лечения. Среди 396 одобренных для клинических испытаний протоколов

60 % направлены на лечение опухолей, 15 – инфекционных заболеваний, 15 – наследственных, 10 % – прочих заболеваний.

Глава 14. РИСК ГЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ.

ОПАСНОСТЬ МНИМАЯ И РЕАЛЬНАЯ

Развитие генной инженерии и ее достижения создают впечатление, что человек может властвовать над генами, в том числе и над собственным геномом. В связи с этим в общественной среде появились опасения относительно использования новых генных технологий. Не окажутся ли опасными для человека организмы, созданные с помощью этих технологий? Не вызовут ли трансгенные микроорганизмы эпидемии ранее неизвестных заболеваний? Не нарушат ли они экологическое равновесие? Не произойдет ли горизонтальный перенос генов устойчивости к болезням и вредителям от трансгенных культурных растений к сорнякам? Не увеличится ли в результате применения генной терапии число людей гомозиготных по вредным генам? Не встанет ли в результате этого человек на «генные костыли»? Оправданны ли эти процедуры на фоне грядущего перенаселения? Нет ли опасности создания биологического оружия на основе трансгенных вирусов и бактерий? Не представит ли это угрозу всему человечеству? Хорошо ли, что создает новые организмы и наполняет ими сушу и море человек, существо, как показывает опыт, неразумное и непредусмотрительное? Не открывают ли генные технологии путь к клонированию человека по злему или доброму умыслу? Не означает ли последнее возврат к евгенике – улучшению породы человека? Вот неполный перечень возникающих вопросов. По данным вопросам проходят активные дискуссии в прессе и по телевидению. Обсуждаются преимущества генных биотехнологий и их возможный риск. Вывод напрашивается очевидный: остановить развитие генных технологий нельзя, но надо всерьез заняться обеспечением их биологической безопасности.

Опасность, связанная с введением в обиход трансгенных растений скорее всего мнимая. Серьезных аргументов против использования трансгенных растений нет. Традиционные методы селекции, например гибридизация, не вызывающие ни у кого опасений, ведут к рекомбинации огромного числа генов и возникновению самых разнообразных генотипов. В противоположность этому генные инженеры вносят в геном растения 1–2 гена. По сути дела, это та же селекция, только направленная и прицельная. Это касается всех генов, в том числе и обуславливающих резистентность к болезням и вредителям. В естественных условиях тоже происходит их перенос в разные растения, так что новые биотехнологии ничего сверхъестественного не делают. Однако нельзя исключить опасность утечки трансгенов к другим растениям – сорнякам через спонтанную гибридизацию (например, если гены гербицидоустойчивости окажутся в геноме сорняков). Вместе с появлением растений, устойчивых к болезням и вредителям, происходит коэволюция возбудителей болезней и насекомых-вредителей. В результате естественным отбором будут отбираться среди них более устойчивые к используемым против них ядам.

Более всего общественность озабочена введением в окружающую среду трансгенных микроорганизмов. Однако Федерация европейских микробиологических обществ (ФЕМО) констатирует, что широкомасштабная, действующая в течение более 20 лет генная инженерия не дала ни одного примера повышения вирулентности и патогенности трансгенных форм по сравнению с исходными. Но, как утверждают эксперты, повысить устойчивость к антибиотикам легко. Однако следует быть справедливыми в том, что в естественных условиях и без применения генных технологий этот процесс происходит в результате генных мутаций и переноса генетического материала между бактериями. Именно поэтому многие болезнетворные бактерии оказываются резистентными к применяемым для лечения антибиотикам. Для вируса гриппа, в большей степени для вируса иммунодефицита человека, характерным является процесс образования новых антигенных вариантов, что позволяет

им ускользать от иммунного ответа. Эксперты ФЕМО на основе многолетних наблюдений пришли к выводу: не зарегистрировано ни одного случая опасного распространения в окружающей среде рекомбинантных организмов. Очевидно, что вводимые в окружающую среду трансгенные микроорганизмы будут подвержены всем типам мутационных процессов и участвовать во всех видах генетического переноса, т. е. в эволюции. Последствия этого процесса непредсказуемы и могут быть самыми неожиданными.

Следует согласиться с тем, что на основе трансгенеза относительно легко создать биологическое оружие. В этой ситуации стоит уповать только на человеческий разум, на контроль со стороны международных организаций, а также на борьбу с терроризмом.

Безусловно, необходима разработка разумных, адекватных и гибких правил безопасности генных технологий. Уже сейчас есть документы, регламентирующие применение генных технологий. Это директивы, касающиеся правил безопасности работы в лабораториях, промышленности и правила внесения генетически модифицированных организмов в окружающую среду. В большинстве стран эти директивы включены в свод национальных законов, а это, согласитесь, не мало.

Во многих странах принят мораторий на работы с яйцеклетками и эмбрионами человека, а также полный запрет на клонирование человека. Начата разработка специальных законов, ограничивающих применение генных технологий. Совет Европы вынужден был принять дополнительный протокол к Конвенции «О правах человека и биомедицине», где говорится, что «инструментализация человеческих существ путем намеренного создания генетически идентичных человеческих существ несовместима с достоинством человека и, таким образом, представляет собой злоупотребление биологией и медициной».

Необходимо отметить, что в последнее время принцип безусловного запрещения введения генетических конструкций в половые клетки начинает приобретать менее категоричный характер, чем несколько лет назад. Так, в

мае 2001 г. появилось сенсационное сообщение о рождении в США генетически модифицированных детей. Речь идет об использовании генетического метода, позволяющего преодолеть врожденное бесплодие, обусловленное дефектом митохондрий. Коллектив ученых во главе с Д. Коэном в институте репродуктивной медицины в штате Нью-Джерси разработал и применил технику переноса цитоплазмы из ооцита. Оплодотворение яйцеклетки женщины, страдающей бесплодием, проводят *in vitro* и тончайшей пипеткой в оплодотворенную яйцеклетку вводят часть цитоплазмы из яйцеклетки здоровой женщины. Перенесенные с ней митохондрии приживаются и обеспечивают нормальное развитие плода. С 1997 г. такая операция выполнена на 30 страдающих этой формой бесплодия женщинах; 12 из них родили детей, причем у трех были двойни. Получившиеся таким путем дети здоровы. Перенос митохондрий – цитодукция – в клетки различных организмов проводится давно. В данном случае это вмешательство в зародышевый путь. Девочки передадут митохондрии своим потомкам, вместе со всеми изменениями в их ДНК. Избавление женщин от бесплодия, бесспорно, благородная задача, однако надо отдавать отчет в том, что это манипуляции с яйцеклетками человека. Выходит, они допустимы?

В Институте репродуктивной генетики в Чикаго группой исследователей под руководством Ю. Верлинского на людях опробован так называемый метод предимплантационной диагностики. Он заключается в следующем. Оплодотворение производят *in vitro*. Когда зародыш достигает стадии восьми клеток, одну без ущерба для дальнейшего его развития удаляют и подвергают диагностике. Авторы метода обеспечили рождение здорового ребенка после оплодотворения спермой мужчины, гетерозиготного по мутации в гене P53. Из нескольких зародышей был отобран тот, который не содержал этой мутации и был имплантирован в матку. Этот метод является альтернативой пренатальной диагностике, когда устанавливается генотип развивающегося в матке эмбриона и в необходимых случаях проводят аборт. При распространенном осуждении абортов метод предимплантационной диагности-

ки представляется предпочтительным. Используя этот метод, можно по заказу сделать донора, например, клеток костного мозга. Есть сообщение, что в указанном выше институте в 2000 г. появился на свет путем отбора эмбрионов ребенок, который стал донором костного мозга и спас жизнь своей старшей сестре. Техника оплодотворения человеческой яйцеклетки в пробирке была разработана в Англии еще в 1978 г. В настоящее время она обогащена тестированием и отбором эмбрионов. По сути, здесь нет вмешательства в геном.

В отношении человека применяют также так называемое терапевтическое клонирование. В отличие от репродуктивного клонирования, которое применяют для производства клонированных животных, терапевтическое клонирование не сопровождается имплантацией зародыша в матку, а используется лишь для получения эмбриональных стволовых клеток человека. Далее полученные эмбриональные стволовые клетки можно использовать для дифференцировки в определенном направлении в целях «ремонта» больного органа.

Что касается репродуктивного клонирования человека, то возможность его, безусловно, существует. Однако из-за массы морально-этических возражений во многих странах, в том числе и в России, введен мораторий на эти работы. Главное возражение – технически процедура клонирования недостаточно отработана и может привести к появлению физически и психически неполноценных детей. Это недопустимо! Кто будет нести за это ответственность?

Не менее выдающиеся достижения биологии и медицины в предшествующее время (изобретение шприца, рентгена, антибиотиков, вакцинации и др.) не сопровождалось разработкой этико-правовых документов, регулирующих их применение, очевидно, потому, что они не противоречили традиционным моральным принципам, чего нельзя сказать о некоторых генных технологиях.

Глава 15. ГОМЕОСТАЗ

Все организмы представляют собой открытые системы, активно обменивающиеся с окружающей средой различными веществами, энергией и информацией и сохраняющие постоянство своей внутренней среды – гомеостаз. Вещества, с которыми соприкасается организм, могут использоваться как пищевой ресурс для пополнения энергии, а также как сигналы, например различные феромоны, для получения соответствующей информации.

Однако существует немало веществ, оказывающих вредное влияние на организм. Они должны быть обезврежены и выведены.

Низкомолекулярные соединения, растворимые в воде, обезвреживаются в печени и выводятся почками. Другая группа веществ – это нерастворимые в воде, но растворимые в жирах вещества. К ним относятся многие лекарственные препараты, пестициды, гербициды и др., объединяемые одним термином – ксенобиотики. Они накапливаются в мембранах, в вакуолях жировых клеток и не выводятся с мочой. В обезвреживании таких веществ принимает участие система, включающая до 30 ферментов. Главную роль в ней играют ферменты семейства цитохрома P450 печени, находящиеся в клетках на внутренней стороне мембран эндоплазматического ретикулума. После попадания ксенобиотика в печени многократно увеличивается поверхность эндоплазматического ретикулума и синтез P450. В результате метаболизма ксенобиотики становятся растворимыми и выводятся из организма. Однако некоторые соединения после биотрансформации становятся более токсичными из-за образования высокореактивных промежуточных продуктов, необратимо связывающихся с белками, модифицируя их. Такой процесс происходит с канцерогенными веществами, которые для проявления эффекта нуждаются в метаболической активации. В плазматической мембране многих клеток присутствует еще один механизм защиты от ксенобиотиков – Р-гликопротеин. Он удаляет гидрофобные вещества из клетки за счет гидролиза АТФ. В круг

удаляемых

Р-гликопротеином веществ попадают многие лекарственные препараты, в частности противоопухолевые соединения. Поэтому при всей ее полезности эта система является мощным препятствием для лечения заболеваний.

Многие реакционно-активные вещества могут образовывать комплексы с белками. Их называют конъюгированными антигенами. Они индуцируют у позвоночных развитие иммунологических реакций, прежде всего синтез антител и развитие иммунологической памяти. Эти представления основаны на работах дважды нобелевского лауреата Карла Ландштейнера. Он установил, что иммунитет может развиваться не только против вирусов, бактерий и чужеродных клеток, но и против простых химических веществ. Однако последнее происходит только в том случае, если эти вещества химически связаны с белками. Ландштейнер назвал их гаптенами (прищепками), а их комплекс с белком – конъюгированным антигеном. При повторном попадании этого же вещества оно связывается с антителами. Антитело, таким образом, можно представить как пептидный аналог непептидного ксенобиотика, закодированное обратным кодом. Оказывается, в организме может существовать и прямой двойник ксенобиотика (только в пептидной форме). Это не что иное, как антиидиотипическое антитело, т. е. антитело против активного центра антитела, связывающего ксенобиотик. Существование таких антител, несущих внутренний образ антигена, постулировано всемирно известным иммунологом Нильсом Ерне, а впоследствии подтверждено экспериментально. В настоящее время антиидиотипические антитела получены на разные структуры патогенов, они используются в качестве вакцин. В отличие от живых ослабленных вакцин, такие вакцины совершенно безвредны и обладают рядом других преимуществ. Из сказанного выше следует удивительный вывод: в организме в виде белков-иммуноглобулинов существует параллельная сеть веществ, с которыми он встречается в своей жизни. Такие аналоги ксенобиотиков имитируют нередко и биологическую активность вещества, связываясь с

соответствующими рецепторами. Все это позволяет говорить об активно работающей в организме позвоночных иммунохимической системе гомеостаза.

С крупными чужеродными макромолекулами, а также целыми клетками и патогенами, включая вирусы и бактерии, справляется защитная система, называемая иммунитетом. Иммунитет обеспечивается двумя системами – неспецифической, или врожденным иммунитетом, и специфической, или приобретенным иммунитетом. Обе системы, используя разные принципы защиты, тесно связаны друг с другом, так что могут рассматриваться как стадии одного и того же процесса. Неспецифический иммунитет выступает как первая линия защиты и как заключительная ее стадия, а система приобретенного иммунитета выполняет промежуточные функции специфического распознавания и запоминания болезнетворного агента и подключения средств врожденного иммунитета на заключительном этапе процесса. Таким образом, обе системы работают как единое целое, несмотря на то что используют разные механизмы.

15.1. Система врожденного иммунитета

Система врожденного иммунитета, филогенетически более древняя, имеется у всех организмов. Факторы, обеспечивающие ее функционирование, постоянно присутствуют в организме, поэтому они первыми включаются в борьбу. Они достаточно разнообразны, но их можно сгруппировать следующим образом: кининовая система, барьерные свойства кожных и слизистых покровов, фагоцитоз, воспаление, комплемент, гуморальные защитные белки, натуральные киллеры.

Кининовая система входит в систему свертывания крови. Ее начальный компонент – фактор Хагемана, XII фактор свертывания крови, активируется в результате взаимодействия с чужеродными веществами (занозы, стекло и др.) и через каскад ферментативных реакций приводит к образованию бради-

кинина – пептида, состоящего из девяти аминокислотных остатков, мощного активатора воспаления.

Барьерные свойства кожи и слизистых препятствуют проникновению чужеродных агентов в организм. Ранения, ожоги кожи и слизистой открывают ворота для инфекции.

Другая эффекторная система врожденного иммунитета – фагоцитоз (рис. 52).

Рис. 52. Стадии фагоцитоза

Его осуществляют макрофаги и нейтрофилы. При этом макрофаги активируются и секретируют вещества, являющиеся медиаторами воспаления (ФНО, интерлейкины, интерферон, хемокины и т. д.). В то же время макрофаги осуществляют процессинг чужеродных веществ (антигенов) и представление его в форме, распознаваемой иммунокомпетентными клетками – Т-лимфоцитами.

Не менее мощной защитной системой является комплемент, включающий более 20 белков крови, которые, каскадно активируясь, превращаются в сеть протеолитических ферментов. Конечными членами этого каскада являются компоненты, способные при полимеризации образовывать мембраноатакующий комплекс, формирующий в мембранах бактерий или чужеродных клеток поры и вызывающий их гибель. Кроме того, компоненты комплемента, присоединяясь к бактериям, делают их более фагоцитируемыми. Этот процесс называется опсонизацией. И наконец, в результате активации комплемента происходит образование медиаторов воспаления, обеспечивающего защитную функцию (рис. 53).

Рис. 53. Основные функции комплемента

Помимо комплемента, в крови имеется гетерогенная группа белков, осуществляющих защитную роль (С-реактивный белок, интерлейкины, лизоцим, тромбоцитарный катионный белок, интерфероны и др.).

Среди факторов естественной резистентности есть клетки, способные убивать зараженные вирусом или мутировавшие клетки, а также клетки опухолей. Это так называемые натуральные киллеры.

Таким образом, можно видеть, что все рассмотренные механизмы суть одного – воспаления. Именно воспаление осуществляет главную функцию по очистке организма от патогенов. Основные признаки воспаления описаны еще в Египетских папирусах, относящихся к 1600 г. до н. э. В 1 в. н. э. римский врач Цельсис описал четыре главных признака воспаления: *rubor*, *color*, *dolor*, *tumor* (покраснение, жар, боль, припухлость). Гален добавил к этому *functio laesa* (утрата функции).

Факторы врожденного иммунитета обеспечивают достаточную защиту беспозвоночных животных, у которых стратегия выживания основана на быстрой смене поколений и многочисленности потомства.

Несмотря на разнообразие факторов неспецифической резистентности организма, одни они не могут справиться с инфекцией. Их слабость заключается в том, что они одинаково реагируют на разные патогены, не различая их, т. е. являются относительно неповоротливыми. Будучи врожденными, они не могут угнаться за быстро изменяющимися паразитами, которые к тому же всяческими способами пытаются обойти систему защиты. Патогены используют разнообразные приспособления. Существуют микроорганизмы, которые используют макрофаги как свой дом, в котором живут припеваючи (микобактерии туберкулеза, возбудители проказы, лейшманиоза). Другие просто спасаются от действия комплемента, образуя капсулу, не пробиваемую мембраноатакующим комплексом комплемента. Третьи секретируют ферменты, «срезающие» рецепторы фагоцитов, чувствительные к хемотаксическим молекулам, в результате чего макрофаги становятся неспособными двигаться в очаг воспаления. Четвертые выделяют смертельные яды, отравляю-

щие организм хозяина. Вирусы из-за очень маленьких размеров вообще не захватываются фагоцитозом, а поражая клетки-мишени, они становятся совершенно неуязвимыми для факторов врожденного иммунитета. В общем, паразиты делают все, чтобы поживиться ресурсами многоклеточных организмов, обойти, обмануть и даже воспользоваться системой их защиты.

В этих ситуациях врожденный иммунитет бессилен. Организм спасают более изощренные и гибкие механизмы приобретенного иммунитета.

15.2. Система приобретенного иммунитета

Итак, животным, особенно длительно живущим, менее защищенным из-за отсутствия наружного скелета, обладающим более совершенной системой кровообращения, способствующей диссиминации инфекционных агентов, требовалась другая стратегия защиты. И она возникла на основе иммунной системы, и именно там, где она больше всего была нужна, т. е. у позвоночных, начиная с костистых рыб, и достигла совершенства у млекопитающих. Тем не менее у животных, обладающих иммунной системой, первая линия защиты при любой инфекции осуществляется действующими немедленно факторами врожденного иммунитета. Если они справляются с инфекцией полностью, развития иммунного ответа может и не быть. Если агент пробивает эту первую линию обороны, после определенного латентного периода развивается иммунный ответ.

Для иммунной системы характерна высочайшая специфичность в распознавании чужеродных агентов – антигенов (АГ), а также способность запоминать первую встречу с ними и развивать при последующем контакте более энергичную иммунную реакцию на него. На генетическом уровне механизм распознавания бесконечного числа антигенов порядка 10^8 обеспечивается

механизмом, не имеющим аналогов в эволюции позвоночных – перегруппировкой отдельных зародышевых генных сегментов в онтогенезе для формирования зрелых генов, кодирующих переменные домены полипептидных цепей антигенраспознающих рецепторов В- и Т-лимфоцитов. Это обеспечивает генерацию их колоссального разнообразия, вполне соответствующего разнообразию антигенов и обеспечивающего надежность распознавания чужеродности. При этом в течение жизни организма ему вряд ли понадобится 1/100 от разнообразия этих белков. В то же время среди такого разнообразия клонов иммунокомпетентных клеток, рецепторы которых формируются случайным образом и независимо от антигенов могут быть аутоагрессивные. Значит, иммунная система может быть опасной для того организма, в котором она развивается. Следовательно, в дополнение к этому беспрецедентному разнообразию иммунокомпетентных клеток должен формироваться механизм, обеспечивающий безопасность организменных структур.

АГ, попавший в организм, распознается рецепторами иммунокомпетентных клеток. Антиген играет роль селективного фактора – только те лимфоциты, рецепторы которых провзаимодействовали с АГ, вступают в пролиферацию и дифференцировку, образуя клоны, осуществляющие эффекторную функцию иммунитета.

Эффекторные функции иммунитета разнообразны, но главными из них являются антителогенез и цитотоксические клеточные реакции.

15.2.1. Антителогенез

Антитела (АТ), иммуноглобулины (ИГ) – удивительные белковые молекулы. С одной стороны, они обладают необыкновенным разнообразием, в силу чего могут с высокой степенью специфичности взаимодействовать с огромным числом АГ. С другой стороны, наблюдается большое сходство между молекулами с разной АГ-специфичностью и даже между АТ разных видов животных. Получаемые

в ответ на иммунизацию определенным АГ антисыворотки содержат чрезвычайно гетерогенную популяцию АТ (АТ на разные детерминанты АГ, разные изоотипы и аллотипы АТ). Это осложняло расшифровку первичной структуры АТ. Но, как говорится, не было бы счастья, да несчастье помогло. У человека и животных есть такой тип злокачественных опухолей, которые представляют собой клон малигнизированных В-лимфоцитов (миелома) или плазматических клеток (плазмоцитомы). Эти опухолевые клетки в большом количестве секретируют однородные АТ (миеломные белки). При этом легкие цепи иммуноглобулинов могут у пациентов выделяться с мочой.

Исследование этих белков позволило выявить структуру антител. При обработке папаином получалось три фрагмента с приблизительно одинаковой молекулярной массой (рис. 54). Два из этих фрагментов связывали АГ и отличались вариабельностью. Они были названы Fab1 и Fab2 (fragment antigen binding). Третий фрагмент АГ не связывал и характеризовался, напротив, высокой степенью гомологии у различных АТ одного и разных видов. Его назвали Fc (fragment constant). Пепсин расщепляет молекулу АТ на два фрагмента – $F(ab)_2$ и Fc. Первый в два раза больше второго и, как и исходное антитело, бивалентно связывает АГ. Эдельман, обрабатывая АТ меркаптоэтанолом, рвущим дисульфидные связи, получил четыре полипептидных цепи: две легких (L – light) и две тяжелых (H – heavy). L-цепи имели молекулярную массу 25 кД, а H-цепи – 50 кД. Ни одна из цепей не соединялась с АГ.

Рис. 54. Фрагменты, получаемые при гидролитическом расщеплении иммуноглобулинов

На основании этих исследований Портер и Эдельман создали модель АТ (см. рис. 54), которая, как оказалось, полностью соответствует действительности.

Итак, молекула АТ состоит из двух идентичных легких цепей и из двух идентичных тяжелых цепей, соединенных между собой дисульфидными связями.

N-Концевые участки легких и тяжелых цепей АТ очень вариабельны. Их так и называли – вариабельные, или V-домены. Остальные участки относительно неизменны, их называли константные, или С-домены. В легких цепях содержится по одному V α - и С α -домену. В тяжелых – один V κ -домен и три-четыре (в зависимости от класса ИГ) С-домена: СН1, СН2, СН3 и СН4. Отдельные участки V-доменов отличаются особым разнообразием. Это гипервариабельные районы, их по три на каждой цепи. Именно они участвуют в формировании АГ-связывающего центра АГ, или паратопы. Эта структура, в образовании которой участвуют V-домены тяжелой и легкой цепей, комплементарна эпитопу – участку АГ, с которыми связывается АТ (рис. 55).

Рис. 55. Общая схема структуры иммуноглобулинов

АТ и АГ связываются между собой нековалентно, за счет комплементарных взаимодействий. Антитела связываются с конформационными эпитопами АГ, состоящими из аминокислотных остатков, в полипептидной цепи удаленных друг от друга. При этом антителами узнается конфигурация эпитопа, его трехмерная структура. Силы, удерживающие АТ и АГ, принципиально не отличаются от сил, участвующих в неспецифических взаимодействиях между любыми молекулами. Они включают электростатические взаимодействия, водородные связи, гидрофобные взаимодействия и ван-дер-ваальсовы силы. Прочность связывания АТ с АГ зависит от аффинности и авидности. Аффинность – это степень сродства, комплементарности между паратопом и эпитопом. Авидность определяется числом контактов АГ и АТ, как правило, специфичных к разным детерминантам АГ. Это функциональная аффинность сыворотки к поливалентному АГ.

На границе СН2-доменов имеется участок длиной 15–60 аминокислотных остатков, содержащий много пролина. Это шарнирный участок или талия ИГ. Он лишен вторичной и третичной структур и доступен для протеолитических ферментов. Из-за большого содержания дисульфидных связей он обладает гибкостью, обеспечивающей изменение угла между Fab-фрагментами при взаимодействии обоих активных центров молекулы с эпитопами.

Константные домены легких цепей представлены двумя типами κ и λ . В каждой молекуле ИГ могут содержаться только либо κ , либо λ -легкие цепи. Только искусственно созданные молекулы могут содержать оба типа цепей.

Константные домены тяжелых цепей характеризуются большим разнообразием. По этому признаку они подразделяются на классы и подклассы. У человека известно пять классов ИГ: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Соответствующая тяжелая цепь каждого класса – μ , δ , γ , α , ϵ . Поскольку в сыворотке крови одного индивидуума циркулируют все структурные варианты константных доменов тяжелых и легких цепей, их называют изотипами. О функциональных различиях κ - и λ -легких цепей данных нет. В противоположность этому АТ, имеющие разные изотипы тяжелых цепей, т. е. разные классы ИГ, характеризуются различными эффекторными функциями.

Двойственность в строении АТ определяет двойственность и их функции: 1) связывание АГ, обусловленное V-доменами и 2) эффекторные функции ИГ, выполняемые их С-доменами. В большинстве случаев АТ только метят АГ, чтобы направить на него реакции неспецифического иммунитета – комплемент, фагоцитоз, реакции воспаления. Здесь мы видим пример тесного взаимодействия двух сторон иммунитета. Но в ряде случаев АТ сами справляются с АГ. Так, связываясь с токсинами бактерий (которые, надо заметить, совершенно не замечаются факторами врожденного иммунитета), они их нейтрализуют. Это свойство АТ научились использовать еще когда не были известны ни структура АТ, ни их свойства. За открытие антитоксических

свойств сывороток в 1901 г. присуждена Нобелевская премия Э. Берингу (это была первая Нобелевская премия в области иммунологии). Полученные им противодифтерийные, противостолбнячные и другие сыворотки спасли миллионы человеческих жизней. В настоящее время АТ к дифтерийному, столбнячному, гангренозному токсинам, а также к змеиному яду применяются с этой же целью. Спасают они и при передозировке наркотиков, сердечных гликозидов и других препаратов. При вирусных заболеваниях АТ также могут быть эффективными: они препятствуют прикреплению вирусов к клеткам-мишеням. Поэтому они более эффективны в начальных стадиях вирусного заболевания, пока вирусы не проникли внутрь клеток, где они оказываются недоступными для АТ.

АТ придают системе комплемента специфичность и усиливают ее активность. Они включают классический путь активации комплемента (IgG, IgM), что, в свою очередь, запускает воспаление во всей его полноте. Фагоцитозу антитела тоже придают специфичность и усиливают его. Это происходит за счет опсонизации фагоцитируемых бактерий, которые распознаются рецепторами к Fc-фрагментам АТ. У человека IgG способен проходить через плаценту, в результате чего материнские антитела защищают организм новорожденного от инфекции; IgM секретируются с молоком, а IgA присутствует в секретах слизистых, являясь первым барьером на пути инфекционных агентов.

Антитела класса IgE обладают высоким сродством к мембранным рецепторам тучных клеток. Следствием их взаимодействия являются активация тучных клеток и выброс гистамина, серотонина и других медиаторов воспаления. Это явление лежит в основе сильных аллергических реакций – острых воспалительных процессов в ответ на следовые количества совершенно безвредных антигенов (пыльца растений, выделения животных и др.). Иммуноглобулины выполняют также функции антигенраспознающих рецепторов В-лимфоцитов.

15.2.2. Гены иммуноглобулинов

Иммунная система располагает беспрецедентно большим разнообразием антител и соответствующих рецепторов В-лимфоцитов. Такое разнообразие, оцениваемое цифрой 10^9 – 10^{11} , обеспечивает распознавание и взаимодействие с любыми антигенами как природного происхождения, так и искусственно созданными.

С позиций существовавшего в начале 60-х гг. постулата «один ген – одна полипептидная цепь» невозможно было представить, как закодировано такое множество белков. Во всем геноме для этого попросту нехватало генов. В 1965 г. У. Дрейером и Дж. Беннетом была выдвинута гипотеза о том, что вариабельные и константные домены тяжелых и легких цепей ИГ кодируются разными генами, т. е. для кодирования одной полипептидной цепи используется не один, а два гена. В то время эта гипотеза казалась безумной и недоказуемой. Новые методы исследования ДНК открыли возможность выделять один ген из множества генов, клонировать его, чтобы иметь достаточное количество для анализа, и определять его структуру. В 1976 г. в Базельском институте иммунологии С. Тонегава с сотрудниками исследовали гены ИГ, секретируемых миеломой МОРС 321. Тонегава установил. В ДНК зрелых В-клеток V- и С-генные сегменты более сближены, чем в эмбриональных. Следовательно, при тканеспецифической дифференцировке В-лимфоцитов происходит перестройка генного материала, в результате которой в разных клетках оказывается разный генетический материал. За это открытие в 1980 г. С. Тонегава был награжден Нобелевской премией.

Гены иммуноглобулинов подразделяются на три кластера: гены H-цепей; гены L-цепей κ ; гены L-цепей λ , находящихся на разных хромосомах.

Проще всех устроены гены легкой λ -цепи ИГ (рис. 56).

Рис. 56. Продукция λ -цепи ИГ человека

Для кодирования V-домена λ -цепи используется один ген из кластера V-генов в сочетании с J-сегментами. В зрелом B-лимфоците эти сегменты сближены, но разделены интронными последовательностями. У человека всего 2 V-гена λ -легкой цепи, 4 J-сегмента и 4 C-сегмента. При этом V_1 может объединяться во время созревания B-лимфоцитов с J_1 и C_1 или J_3 и C_3 , а V_2 соответственно с J_2 и C_2 , и J_4 и C_4 . Гены для κ -легкой цепи содержат 300–600 V-сегментов, 5 J-сегментов и один C-ген (рис. 57).

Рис. 57. Продукция κ -цепи ИГ

В кодировании H-цепей ИГ, а именно в формировании зрелого V-гена для кодирования V-домена принимают участие V, J, D-сегменты и C-сегменты (рис. 58, 59).

Рис. 58. V-D-J-рекомбинация в кластере генов тяжелых цепей ИГ

Механизм рекомбинации обеспечивает сначала объединение D и J-сегментов, а затем и V, D и J-сегментов, которые совместно кодируют домен тяжелой цепи (см. рис. 58).

Кластер генов, кодирующих C-домены тяжелых цепей ИГ, организован более сложно, чем соответствующие кластеры генов легких цепей (см. рис. 59).

Рис. 59. Организация кластера C-генов тяжелых цепей ИГ

Специфика организации C μ -генов состоит в том, что в процессе дифференцировки антителообразующей клетки возможно последовательное пере-

ключение с $C\mu$ -гена, на $C\gamma$ и $C\alpha$ -гены, а также переключение с мембранных форм ИГ на секреторные. Как и k и λ -гены, $C\kappa$ -гены построены из экзонов и интронов. Число экзонов соответствует числу $C\kappa$ -доменов. Поэтому каждый $C\kappa$ -ген

содержит

3–4 экзона и 2–3 интрона. В эмбриональных клетках $C\kappa$ -гены не сцеплены и располагаются на расстоянии нескольких тысяч пар оснований от $V\kappa$ -генов. В эмбриональной конфигурации гены ИГ неактивны. Экспрессия их происходит только после перестройки, которая является тканеспецифической, т. е. происходит только при созревании В-лимфоцитов.

В постэмбриональном периоде в результате реаранжировки генные сегменты соединяются в геноме зрелого В-лимфоцита. И все же $C\kappa$ -гены отделены от кластера V , D и J -генов интроном в несколько тысяч пар нуклеотидов. После транскрипции ДНК и образования первичного транскрипта РНК происходит сплайсинг – вырезание интронов, и последовательности, кодирующие V -домены (V и J для легких цепей и V , D и J – для тяжелых) соединяются с генами C -доменов. Так образуется матричная РНК, на которой в результате трансляции синтезируется цепь ИГ. Для синтеза растворимого IgM и мембранного IgM используется механизм альтернативного сплайсинга. Этот же механизм работает и при синтезе мембранного IgM и IgD.

Как любая соматическая клетка, В-лимфоцит содержит диплоидный набор хромосом. Поэтому каждый кластер генов ИГ присутствует в ней в двух экземплярах – в отцовской и в материнской гомологичных хромосомах. Однако в В-клетках работает еще не до конца расшифрованный механизм аллельного исключения. Он заключается в следующем. В дифференцирующейся клетке происходит перестройка V , D , J -генных сегментов одного кластера тяжелых и одного кластера легких цепей, в гомологичных хромосомах этой перестройки не происходит. Таким образом, каждый В-лимфоцит оказывается запрограммированным на синтез АТ, одновременно используемых и в качестве АГ-распознающего рецептора, только одной специфичности.

Второй раз реорганизация генного материала происходит в дифференцированных клетках, синтезирующих АТ. Поскольку в эмбриональных клетках за кластерами V, D и J-сегментов следует Сμ-ген, он и экспрессируется первым. В результате синтезируется IgM, сначала трансмембранный, в качестве АГ-распознающего рецептора, а затем и растворимый. В процессе дифференцировки происходит класс-переключение, когда тот же VDJ-сегмент может экспрессироваться с любым Сн-генным сегментом – Сγ, Сα и Сε. В настоящее время существует представление, что В-лимфоциты плюрипотентны в отношении синтеза АТ разных изотипов, т. е. один В-лимфоцит после стимуляции АГ может дать потомство, синтезирующее АТ разных изотипов, но обладающих одним и тем же паратопом.

Процесс генной реаранжировки, происходящий в В-лимфоцитах, обеспечивает большое разнообразие АТ при относительно небольшом числе зародышевых генов. По подсчетам один лишь этот механизм обеспечивает кодирование $2,4 \cdot 10^7$ АТ разной АГ специфичности. Он дополняется еще соматическими мутациями в V-генах при класс-переключении, заменой одного V-гена на другой после завершения VDJ-перестройки, неточностью объединения сегментов V, D и J в разных клетках, ошибками сплайсинга, наличием трех рамок считывания в D-генном сегменте. В результате всех этих процессов, происходящих в онтогенезе каждый раз заново, организм генерирует огромное разнообразие ИГ, а также АГ-распознающих рецепторов В-лимфоцитов, порядка 10^9 – 10^{11} .

15.2.3. Моноклональные антитела (МАТ) 1976 г. немецкий иммунолог Георг Келер и английский иммунолог Цезарь Мильштейн предложили метод

получения гибридом-соматических гибридов между антителообразующей и опухолевой клетками (рис. 60).

Рис. 60. Схема получения моноклональных антител

Опухолевая клетка, в данном случае клетка плазмоцитомы, придает гибридоме черты опухоли, т. е. способность к неограниченному размножению, а лимфатическая – способность к синтезу АТ. Прежде всего, был получен штамм плазмоцитомы, который не содержал ферментов, обеспечивающих запасной путь синтеза нуклеотидов при блокировании аминоптерином основного пути. Другие клетки, используя гипоксантин и тимидин, могли включать резервный путь синтеза нуклеотидов. Следовательно, среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин (ГАТ), являлась селективной. На ней погибали клетки плазмоцитомы, но выживали нормальные лимфоциты и гибридомы. Поскольку лимфоциты не могут долго размножаться в культуре и гибнут, остаются только гибридомные клетки.

Для получения МАТ мышей иммунизируют АГ (причем не обязательно химически чистым), затем берут селезеночные клетки и с помощью полиэтиленгликоля производят их слияние с плазмоцитомными клетками. Смесь клеток высаживают на среду ГАТ. Как уже говорилось, на этой среде выживают только гибридомы.

Следующий этап заключается в отборе нужных клонов. Для этого проводят скрининг клонов. Клоны, продуцирующие нужные АТ, могут быть размножены в культуре ткани или *in vivo*. В последнем случае их трансплантируют в брюшную полость сингенных мышей, в которой они размножаются и выделяют асцитическую жидкость, содержащую АТ. Клоны можно хранить замороженными при температуре -70°C , пока они не потребуются. Все антитела, синтезированные одним клоном – МАТ, имеют одну и ту же специфичность, изотип, аллотип и идиотип. Будучи стандартным реагентом для всех лабораторий мира, МАТ могут применяться, по выражению Г. И. Абе-

лева, как «иммунологический микроскоп» с чрезвычайно высоким разрешением.

Действительно, МАТ сыграли огромную роль в фундаментальной и прикладной иммунологии. С помощью МАТ удалось исследовать многие АГ, в частности Т- и В-лимфоцитов. Благодаря открытию поверхностных дифференцировочных АГ лимфоцитов идентифицированы их субпопуляции и составлена схема дифференцировки.

При лейкозах с помощью МАТ можно выяснить степень зрелости клеток, что определяет стратегию лечения и прогноз. МАТ применяются для диагностики, когда нужно найти определенный АГ. Например, для диагностики злокачественных опухолей, вирусных и аутоиммунных заболеваний.

Антиидиотипические МАТ используются в качестве вакцин. Эти вакцины безопасны, не содержат аллергизирующих примесей. В ряде случаев МАТ могут применяться и для лечения, прежде всего злокачественных новообразований. Для этого делают комплекс МАТ с лекарственным препаратом, изотопом и т. д. В экспериментах на животных обнадеживающие результаты получены при применении МАТ в комплексе со стрептавидином. Такие гибридные молекулы накапливаются в опухолевых клетках, не повреждая их. Затем вводят другие гибридные молекулы – биотин с токсином. Биотин с высокой аффинностью связывается с стрептавидином, в результате чего оказавшийся в этом комплексе токсин убивает опухолевые клетки.

Несмотря на то что АТ выполняют очень важные функции в организме, самостоятельно они не решают проблему преодоления инфекции. Для этого у иммунной системы есть еще один важный эффекторный механизм – цитотоксические реакции. Они осуществляются Т-лимфоцитами-киллерами, мишенями которых являются зараженные вирусами и опухолевые клетки. Отсюда следует главная особенность распознавания чужеродных АГ этими клетками. Они узнают их только в контексте собственных белков. Контекст представлен продуктами генов главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex – МНС), взаимодействующими

щими с фрагментами АГ после его процессинга в антигенпредставляющих клетках.

15.2.4. Роль главного комплекса гистосовместимости

Ткани в развитии иммунного ответа

Подробнее остановимся на функциях МНС в процессах иммунного распознавания: презентации АГ, селекции Т-лимфоцитов в тимусе и взаимодействии с Т-клеточным АГ-распознающим рецептором.

О генах комплекса МНС известно с тех пор, как появились инбредные линии мышей и онкологи стали трансплантировать им опухоли, в результате чего были открыты законы трансплантации тканей. Оказалось, что приживление или отторжение трансплантированной опухоли (и, как потом выяснилось, любой другой ткани) зависит от совместимости донора и реципиента по генам локуса, который назвали главным локусом гистосовместимости. С момента открытия по сей день этот локус не перестает удивлять биологов. Сначала совершенно мистическим представлялось закрепление в эволюции генов, отличающихся чрезвычайным полиморфизмом и отвечающих за приживление ткани, пересаженной от одного организма другому. Ведь в естественных условиях такие процессы не происходят. Трансплантацию используют хирурги для замены неизлечимо больных органов человека донорскими. Мистический ореол рассеялся, когда было выяснено, что главная функция продуктов этих генов состоит в их участии в иммунологическом распознавании и межклеточных взаимодействиях в ходе развития иммунного ответа, а феномен отторжения ткани – лишь одно из проявлений основной функции.

Система МНС включает три класса генов: I, II, III. При этом только гены классов I и II участвуют в иммунологическом распознавании, а в классе III находятся гены, кодирующие компоненты комплемента, фактор некроза опухолей и другие гены, не имеющие отношения к иммунологическому распознаванию.

Каждый из генов классов I и II МНС имеет более 100 аллелей. Аллели МНС в одной хромосоме называются гаплотипом.

Гены класса I МНС кодируют тяжелую полипептидную цепь с молекулярной массой 43 кД (рис. 61). Она нековалентно связана с легкой цепью, представленной β_2 -микроглобулином (его ген у человека и мыши находится в 15-й хромосоме). Тяжелая цепь состоит из трех доменов: (α_1 , α_2 , α_3), небольшого гидрофобного участка, закоривающего пептид в мембране клетки, и гидрофильного хвоста. Домены α_1 и α_2 являются вариабельными (за счет их реализуется полиморфизм МНС-I), а домен α_3 – константным. Домены α_1 и α_2 образуют пептидсвязывающий центр МНС-I. Молекулы МНС-I экспрессируются всеми клетками организма. Исключение составляют ворсистые клетки трофобласта. Наибольшее количество МНС-I экспрессируется на поверхности лимфоцитов и макрофагов.

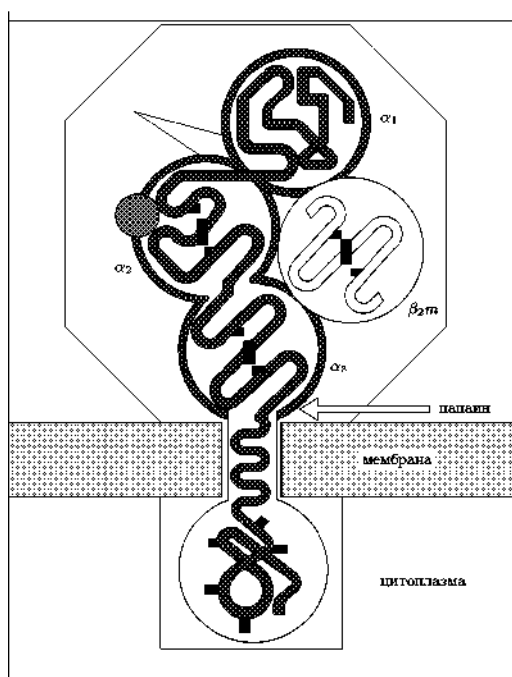


Рис. 61. Структура молекулы МНС-I

Молекулы класса II МНС представляют собой гетеродимеры, состоящие из α и β -цепей, с молекулярной массой 34 кД и 29 кД соответственно (рис. 62). Каждая цепь состоит из двух доменов, при этом N-концевые домены обеих цепей составляют пептидсвязывающий центр МНС-II. Продукты МНС-II экспрессируются только определенной группой клеток, которые называют АГ-представляющими клетками (АПК), а также В-лимфоцитами.

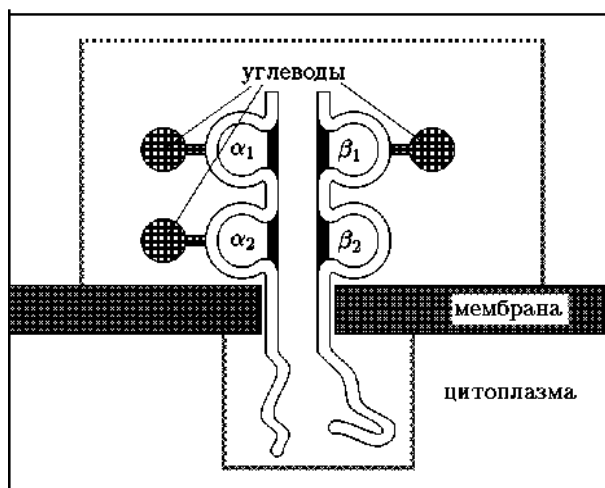


Рис. 62. Структура молекулы МНС-II

Возникает вопрос: как в эволюции могла закрепиться такая генная система, отвечающая за приживание или отторжение трансплантата? В природе в естественных условиях такая операция не осуществляется. Это изобретение человека. Вопрос оставался интригующим, пока Цинкернагель и Догерти не описали феномен МНС-рестрикции и стало очевидным, что главная функция МНС заключается в его роли в иммунологическом распознавании и межклеточных взаимодействиях в ходе иммунного ответа, а феномен отторжения ткани - это лишь одно из проявлений этой основной функции.

Феномен МНС-рестрикции представлен на рис. 63.

Если Т-лимфоциты, взятые от животного, пораженного вирусом А, перенести в культуру тканей и добавить к ним клетки-мишени от разных животных, пораженных этим же вирусом А, то они будут взаимодействовать толь-

ко с сингенными клетками-мишенями, но не с аллогенными. Этот опыт доказывает, что АГ-распознающая функция Т-лимфоцитов рестриктирована гено-типом МНС (см. рис. 63) Из этого следует важный практический вывод: в отличие от АТ, которые можно взять от другого человека (или даже животного) и использовать для быстрого связывания токсинов, вирусов и любых других АГ (что применяется, в частности, для лечения дифтерии, клещевого энцефалита и др. заболеваний), Т-лимфоциты для лечебных целей ни у кого не могут быть взяты «взаймы», за исключением гомозиготных близнецов или особей в пределах одной инбредной линии.

Более того, как было показано позднее, отдельные субпопуляции Т-лимфоцитов рестриктированы по определенным продуктам МНС. Так, у Т-хелперов (T_H) АГ-распознающая функция рестриктирована по классу II МНС, а у Т-киллеров (T_K) – по классу I МНС.

Рис. 63. Феномен рестрикции иммунного ответа

Все дальнейшие исследования позволили сформулировать перечисленные ниже функции МНС-системы.

1. Антигены МНС – это распознающие структуры. Они имеют центр связывания пептидов. Существует беспрецедентный полиморфизм по МНС, но не в одном индивидууме, как в случае с иммуноглобулиновыми рецепторами, а на уровне популяции. Значит, в популяции разные особи способны реагировать с разным набором чужеродных антигенов, обуславливая резистентность к инфекционным агентам на уровне популяции.

2. Антигены МНС – это распознаваемые структуры. Образующийся комплекс МНС плюс антигенный пептид распознается рецепторами Т-лимфоцитов.

3. Из этого вытекает рестрикция Т-клеточного иммунного ответа.

4. Молекулы МНС, экспрессируемые на эпителиальных клетках тимуса, участвуют в процессах селекции Т-лимфоцитов и формировании репертуара Т-лимфоцитов, обладающих рецепторами определенной АГ-специфичности.

15.2.5. Процессинг и презентация АГ

Поскольку Т-лимфоциты не способны распознавать нативный АГ, а могут распознавать только его отдельные пептиды в комплексе с МНС-продуктами, АГ, чтобы быть узнанным Т-лимфоцитами, должен пройти процессинг и презентацию

Процессинг – это гидролиз АГ на отдельные пептиды, а презентация – появление их в комплексе с МНС-I или МНС-II на поверхности клетки (рис. 64). Тх распознают АГ в комплексе с МНС-II, а Тк – с МНС-I. То, с какой молекулой МНС свяжется АГ-пептид, с МНС-I или МНС-II, определяется типом АГ. Экзогенные пептиды интернализованных в клетку АГ презентуются МНС-II, а эндогенные пептиды, образовавшиеся в ядре или цитоплазме, например после вирусной инфекции или в результате мутационных событий, презентуются МНС-I.

Экзогенные АГ проходят процессинг в так называемых АГ-представляющих клетках (АПК). Это фагоцитирующие клетки. После фагоцитоза АГ образуется эндосома, затем фаголизосома, где под влиянием протеолитических ферментов АГ деградирует с образованием пептидов длиной 15–20 аминокислотных остатков. МНС-II после синтеза на мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭПР) поступает в его цистерны в комплексе с инвариантной цепью i , которая, как полагают, защищает его от связывания с эндогенными пептидами. Комплекс МНС-II + i поступает в эндосомную везикулу, где в условиях кислого рН i -цепь отщепляется, и на ее месте оказывается экзогенный пептид. Связь с пептидом стабилизирует МНС-II и делает возможным его экспозицию на клеточной поверхности.

Деградация синтезированных внутри клетки белков осуществляется цитоплазматическим протеолитическим комплексом – протеосомой. Протеосома содержит субъединицы LMP-2 и LMP-7 (low molecular protein). Они расщепляют белки до пептидов длиной 8–9 аминокислотных остатков и образуют комплекс с белками теплового шока (HSP-70). Затем из цитозоля эти пептиды переносятся в ЭПР специальными транспортерами TAP-1 и TAP-2. После поступления в ЭПР пептиды связываются с MHC-I, стабилизируя его димерную структуру. Образовавшийся комплекс гликозилируется в аппарате Гольджи и экспонируется на клеточной поверхности. Если в клетке нет чужеродных АГ, молекулы MHC-I экспрессируются на мембране в комплексе собственными пептидами.

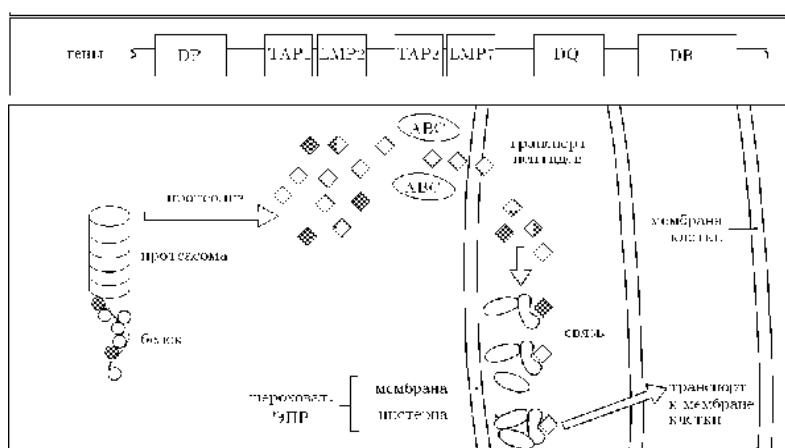


Рис. 64. Процессинг и презентация антигенов в комплексе с MHC-I

Соответственно своей структуре молекулы MHC-I или MHC-II размещают пептиды, образовавшиеся в результате процессинга, в своем пептид-связывающем центре. Разные аллели MHC, по-видимому, по-разному связывают разные антигенные пептиды и, следовательно, по-разному представляют их иммунокомпетентным Т-лимфоцитам.

Возможно, на этом уровне реализуется генетически детерминированная способность к высокому или низкому уровню иммунного ответа на опреде-

ленные АГ, а также ассоциированность конкретных аутоиммунных заболеваний с гаплотипами МНС.

15.2.6. Взаимодействие клеток при развитии иммунного ответа

Функции иммунитета в организме выполняют лимфоидная система при взаимодействии с нервной и эндокринной системами.

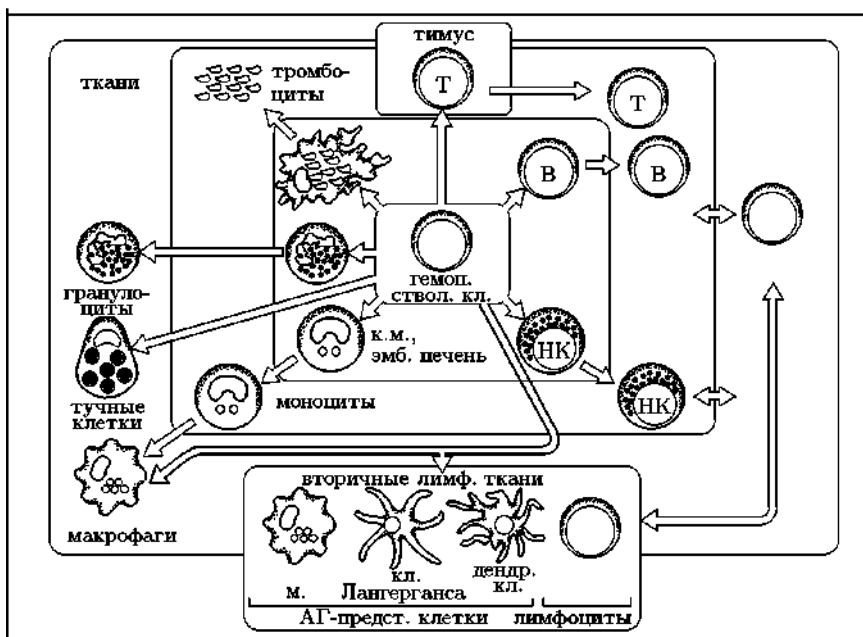


Рис. 65. Происхождение клеток иммунной системы

Иммунная система представлена как центральными органами (тимус, костный мозг и сумка Фабрициуса птиц), так и периферическими (лимфоузлы, селезенка, пейеровы бляшки, аденоиды, миндалины), не имеющими капсул скоплениями лимфоидной ткани в слизистых, а также циркулирующими в крови, лимфе и тканях лимфоидными клетками.

Источником всех клеток, участвующих в развитии иммунного ответа, являются полипотентные стволовые кроветворные клетки (ПСКК), дающие начало всем форменным элементам крови (рис. 65). ПСКК способна к многократной репликации, т. е. образованию новых ПСКК, а также к дифференцировке в условиях микроокружения гемо- и лимфопоэтических органов в клетки разных типов.

Клетки иммунной системы делятся на иммунокомпетентные: Т- и В-лимфоциты, и АГ-представляющие (АПК): макрофаги, моноциты, дендритные клетки, клетки Лангерганса, астроциты глии, интердигитатные клетки, Купферовские клетки печени. В-лимфоциты являются и иммунокомпетентными, и АГ-представляющими клетками.

Иммунокомпетентные клетки обладают антигенраспознающими рецепторами. Для В-лимфоцитов – это мембранные формы ИГ всех изотипов, а для Т-лимфоцитов – гетеродимеры, состоящие из α/β (95 % Т-лимфоцитов) и γ/δ (5 % Т-лимфоцитов)-цепей. Механизмы генерации разнообразия Т-клеточных антигенраспознающих рецепторов (ТКР) подобны таковым для рецепторов В-лимфоцитов (ВКР).

Судьба АГ в организме во многом зависит от того, каким путем он в него попал. АГ, проникшие через верхние дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт или мочеполовые пути, ассоциируются с лимфоидной тканью этих органов. АГ, проникшие в ткани, попадают в дренирующие лимфоузлы. Прежде всего, они подвергаются элиминации механизмами неспецифической резистентности (активация комплемента по альтернативному пути, фагоцитоз и др.). Если этот барьер преодолевается, включается вторая линия обороны – иммунная система. Все начинается с захвата АГ макрофагами или другими АПК. Если в организме есть АТ к данному АГ, они опсонизируют его. В таком виде он лучше поглощается макрофагами, имеющими рецепторы к Fc-фрагментами АТ. Затем осуществляется процессинг АГ и его презентация на поверхности АПК в комплексе с МНС. При этом АПК активируются, в них начинается экспрессия ИЛ-I, который секретируется. В-лимфоциты также являются АПК. В них нативный АГ сначала соединяется с ВКР, затем весь комплекс интернализуется, АГ подвергается процессингу и в комплексе с МНС-II выставляется на поверхность В-лимфоцита. Следующий этап – узнавание АГ Т-лимфоцитами-хелперами. Тх, обладающие ТКР, специфичными к данному комплексу МНС плюс антигенный пептид, связываются с ними. При этом, как уже было сказано, молекула CD₄ Т-хелпера также связыва-

ется с МНС-II, но не в его пептидсвязывающем сайте. Это первый сигнал для активации Тх. Но одного его недостаточно, необходим второй сигнал, которым является ИЛ-I, взаимодействующий с соответствующим рецептором Тх. Это важнейший сигнал для Тх; в результате его начинается экспрессия ИЛ-2 и его рецептора на одном и том же Тх, т. е. проявляется аутокринный эффект. Кроме этого, Тх взаимодействует еще рядом своих рецепторов, не имеющих АГ-специфичности с лигандами АПК. Главным из них является взаимодействие CD28 и В7. Далее Тх пролиферирует и выделяет цитокины, которые обуславливают дальнейший ход событий. Если АПК был макрофаг, стимулируются Тх1, секретирующие ИЛ-2, ФНО и ИНФ γ , если АПК был В-лимфоцит, то активируются Т х 2, секретирующие ИЛ4, 5, 6, 10 и 13. Соответственно развивается иммунный ответ I или II типа. Цитокиновые сигналы, поступающие от Тх, воспринимаются эффекторными клетками иммунной системы В-лимфоцитами, Т-лимфоцитами киллерами и эффекторами гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

В лимфоциты, прореагировавшие своим ВКР с нативным АГ и получившие цитокиновый сигнал от Тх, вступают в дифференцировку и пролиферацию. Образуется клон специфических клеток, которые синтезируют АТ на данный АГ. Первыми синтезируются АТ IgM-класса, затем IgG и других изотипов. ИЛ-4, секретируемый Т х 2, влияет на переключение синтеза на IgE и связанные с последним аллергические проявления за счет дегрануляции тучных клеток. Т-лимфоциты киллеры, прореагировавшие своим антигенраспознающим рецептором с комплексом МНС-I-пептид на клетке мишени и получившие костимулирующие сигналы от Т-хелперов, развивают цитотоксическую реакцию. Она заключается в убийстве клетки-мишени за счет включения в ней программы апоптоза или за счет выброса перфорины, полимеризация которого приводит к нарушению мембраны, а также и другими способами.

В ряде случаев иммунологические реакции при нарушении регуляции становятся избыточными, в результате чего развиваются соответствующие патологические процессы – аллергические и аутоиммунные заболевания (См: Попова Н. А. Иммунология: Учеб. пособие. Новосибирск: НГУ, 1999–2000).

Глава 16. БИОЛОГИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО РОСТА

Проблема злокачественного роста во многом является медицинской. Но, в основном, это проблема биологии, и прежде всего клеточной, так как в основе раковых заболеваний лежат нарушения наиболее фундаментальных законов поведения клеток в многоклеточном организме. Именно по этой причине исследования в области канцерогенеза существенно обогатили наши знания о функционировании клеток вообще, особенно в области регуляции роста и пролиферации клеток.

В настоящее время большое развитие получила молекулярная биология злокачественных опухолей. Можно спорить о том, в какой степени эти исследования способствовали решению основной задачи – развитию профилактики и лечения рака. Тем не менее, определенный прогресс в этих направлениях безусловно есть.

Многоклеточный организм представляет собой сообщество тесно взаимодействующих клеток. При этом в норме они подвергаются согласованным влияниям друг на друга. Если какие-то клетки начинают процветать и неуклонно размножаться в ущерб своим соседям и всему организму, не подчиняясь сдерживающим регулирующим сигналам, они образуют злокачественную опухоль, которая убивает организм.

Если опухоль образует компактное скопление клеток и не прорастает окружающую ткань, ее называют доброкачественной. Нельзя сказать, что это определение является удачным, так как и такая опухоль может доставлять организму массу неприятностей. В отличие от доброкачественных, злокачественные опухоли прорастают окружающие ткани, будь то сосуд, нерв, кость и т. д. Это

свойство называется инвазивностью. Опухолевые клетки могут проникать в кровеносное и лимфатическое русло и формировать вторичные опухолевые узлы (метастазы) в местах, отдаленных от локализации первичных опухолей.

В быту все опухоли называют раками, но специалисты классифицируют их по типу ткани, из которой они происходят. Карциномы – опухоли из эпителиальной ткани, саркомы – из соединительной, миомы – из мышечной, лейкозы – из кроветворной ткани и т. д.

Злокачественная трансформация, очевидно, является наследуемой. Наследуемый дефект может быть результатом как генетического (мутации), так и эпигенетического изменения, т. е. изменения экспрессии генов, а не структуры ДНК, что так ярко проявляется в процессе дифференцировки клеток в онтогенезе. Оба эти механизма участвуют в превращении нормальных клеток в злокачественные.

16.1. Причины возникновения опухолей

Среди главных причин смертности людей злокачественные опухоли занимают второе место после сердечно-сосудистых заболеваний. Несмотря на успехи в изучении причин и механизмов развития онкологических заболеваний, их частота и смертность от них продолжают увеличиваться. Это делает проблему злокачественного роста одной из самых актуальных в биологии и медицине.

Опухоль (oncos), или новообразование, представляет собой структуру, которой нет в нормальном организме. Как правило, сначала возникает доброкачественная опухоль, не инвазирующая окружающие ткани и не распространяющаяся по организму. В дальнейшем опухолевые клетки изменяются так, что становятся способными прорасти в окружающие ткани. В этом случае опухолевые клетки могут проникать в кровь и разноситься ими по организму, образуя вторичные опухолевые узлы, или метастазы.

Как правило, метастазы и являются главной причиной гибели онкологических больных.

Рак поражает все многоклеточные организмы. По данным палеонтологов, эта древняя болезнь гораздо старше человека как биологического вида. По свидетельствам античных папирусов, еще за 2 тыс. лет до н. э. врачи пытались лечить рак.

Бытует представление о том, что проблема злокачественного роста не решается по причине неведения, отчего возникают опухоли. Однако это не так. Факторы, вызывающие возникновения опухолей, известны. Они оказались многочисленными. Другая, пока не объясненная, сложность заключается в том, что между причиной и следствием (опухолью), как правило, проходит такой большой промежуток времени, что сопоставить их для каждого конкретного пациента удастся не всегда. Это возможно только в экспериментах на животных. Латентный период развития опухоли имеет разную продолжительность у животных разных видов, составляя минимум 5 %-ной видовой продолжительности жизни. Так, у мышей он составляет 1 месяц, а у человека – 5 лет и более.

16.1.1. Роль химических веществ в возникновении злокачественных опухолей

В настоящее время ни у кого не вызывает сомнений факт, что этиологическими факторами возникновения опухолей человека являются, главным образом, химические канцерогенные вещества и канцерогенные физические факторы. Все возрастающее их количество – результат антропогенного влияния на нашу среду обитания. Опасность воздействия этих факторов на организм усугубляется курением, ожирением, неправильной диетой и всеми воздействиями, угнетающими иммунную защиту.

Прямые исследования влияния канцерогенных веществ (а также и других факторов) на человека являются неприемлемыми с этической точки зрения,

что в значительной степени осложняет проблему. Поэтому обычно проводятся эпидемиологические исследования, в которых сопоставляется частота опухолей у людей, испытывающих на себе действие определенных вредных факторов с таковой среди прочего населения данной местности. При использовании этого метода прежде всего были установлены причины так называемых профессиональных раков. Впервые причинная связь между химическим веществом и возникновением опухоли была установлена в 1775 г. английским врачом Персивалем Поттом. Он опубликовал сообщение о раке мошонки у трубочистов и назвал причину этого заболевания. По его мнению, это были сажа и каменноугольная смола, содержащиеся в каминных трубах, которые прочищали трубочисты. В дальнейшем это было подтверждено на рабочих, занятых на производстве каменноугольной смолы. При перегонке смолы Эрнест Кенноуэй выделил 3,4-бензпирен – канцероген в чистом виде. До этого Кук синтезировал 1,2,5,6-добензантрацен, который тоже является канцерогеном. Оба вещества принадлежат к классу полициклических углеводородов.

Другая группа этиологических факторов злокачественных опухолей была открыта при наблюдении за людьми, в силу своей профессии соприкасающимися с радиоактивным излучением.

Опасность радиоактивного излучения была распознана не сразу. Одно время было даже увлечение радиоактивными веществами. Их использовали как лекарства. Считалось, что «радиевая волна» излечивает от всех болезней. Некоторым больным эти вещества вводили даже внутривенно. Врачи в целях диагностики назначали облучение рентгеновскими лучами, в том числе и беременным женщинам. Существовало мнение, что рентгеновские лучи откроют путь к благоденствию человека. Это заблуждение было преодолено в связи с двумя крупными трагическими случаями. Первый – связан с работницами, расписывающими люминесцентными красками, содержащими радиоактивные вещества – радий и торий, циферблаты часов и военных приборов. Они заболели раком костей, а именно – нижней челюсти.

Второй случай связан с врачами-рентгенологами. Работая без каких-либо средств защиты, они подвергли себя воздействию радиации. В результате у них проявился рак кожи рук. В Гамбурге воздвигнут монумент, на котором высечены имена 110 врачей, инженеров и ученых, ставших жертвами рентгеновских лучей.

Во второй половине XIX в. в Европе распространилось производство анилиновых красителей, а вместе с этим появились и случаи заболевания раком у людей, работающих на этих производствах. Врачи заподозрили, что анилин повинен в возникновении опухолей, особенно рака мочевого пузыря.

Таблица 2

Канцерогены на рабочих местах

Хим. или физ. агенты	Где встречаются	Тип опухоли
1	2	3
Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ)	Химическая промышленность	Опухоли печени, мочевого пузыря, кроветворной ткани и др.
Мышьяк	Инсектициды, гербициды, дубление кожи, рафинирование масел	Рак легкого, кожи
Асбест	Тормозные прокладки, верфи, изоляторы	Мезотелиома, рак легких
Бензол	Очистка бензо-	Лейкемия

	ла, резиновая про- мышленность	
Выхло- пы дизтоп- лива	Авто и желез- ные дороги, гаражи, шахты и др.	Рак легко- го
Фор- мальдегид	Деревообраба- тывающие, текстиль- ные, целлюлозно- бумажные предпри- ятия, больницы, ла- боратории	Рак верх- них дыхатель- ных путей
Ионизи- рующая ра- диация	Радиоактивные материала, мед. процедуры	Лейкозы, рак кожи

Окончание табл. 2

1	2	3
Мине- ральные масла	Машинострое- ние, эксплуатация и ремонт машин и ав- тотранспорта и др.	Рак кожи,
Пести- циды	Производство и применение пести- цидов	Рак легко- го, печени
Краски	Производство и применение красок	Рак легко- го
Сажа	Пожары, чистка печей	Опухоли кожи
Родон	Шахты, подва- лы и др.	Рак легко- го

Поли- хлорирован- ные дифени- лы	Смазочные масла, гидравличе- ские жидкости, клеи, инсектициды и др.	Опухоли печени, кожи, мозга
---	---	-----------------------------------

В то время появился термин «анилиновый рак». Правда, впоследствии выяснилось, что не сами анилиновые красители вызывают рак, а вещества, используемые при их производстве: β -нафтиламин, бензидин и др. После этого проверке на канцерогенную активность на животных были подвергнуты многие красители. В результате обнаружили канцерогенные азокрасители – ортоаминоазотолуол (ОАТ) и диметиламиноазобензол (ДАБ). Последний назывался раньше желтым масляным красителем, так как его добавляли к сливочному маслу для придания ему красивого желтого цвета. В табл. 2 приведены сведения о канцерогенах, представляющих профессиональную вредность.

16.1.2. Роль вирусов, бактерий и простейших в возникновении опухолей

Микроорганизмы также могут быть причиной возникновения опухолей. У экспериментальных животных некоторые опухоли вызываются онкогенными вирусами, которые, как правило, передаются вертикально – от родителей потомству.

У человека лишь относительно небольшое число опухолей индуцируется вирусами. В последнее десятилетие получены доказательства участия вирусов папилломы 16-го и 18-го типа в развитии рака шейки матки. Установлена также связь вируса гепатита В с раком печени. Хронические носители этого вируса образуют группу повышенного риска возникновения рака печени. Вирусы группы герпес повинны в развитии африканской лимфомы Беркетта, карциномы носоглотки, распространенной в Юго-Восточной Азии, лимфо-

гранулематоза и лимфомы Ходжкина. Очевидно, вакцинация против этих вирусов поможет снизить частоту этих опухолей. В странах, где высока заболеваемость гепатитом *B*, проводятся массовые вакцинации, что уже заметно снизило частоту опухолей печени. С возникновением рака желудка ассоциировано инфицирование бактериями *Helicobacter pylori*. Они вызывают воспаление слизистой желудка и при сопутствующей генетической предрасположенности на этом фоне возникает опухоль. В регионах, где потребляется рыба, зараженная *Opisthorchis filineus*, повышена частота опухолей печени, развивающихся на фоне воспалительного процесса, вызванного описторхами.

16.1.3. Роль гормонов в возникновении опухолей

Эпидемиологические исследования свидетельствуют о том, что среди женщин, у которых менструация начинается очень рано (раньше 14-летнего возраста), а заканчивается поздно (климакс наступает позднее 50 лет), выше частота опухолей молочной железы и матки. Очевидно, это связано с увеличением периода, в течение которого эти органы подвергаются атаке эстрогенными гормонами.

В развитых странах репродуктивное поведение женщин определяется, главным образом, экономическими и социальными факторами. Наблюдается тенденция вступления в брак в более позднем возрасте, чем раньше, наступления первой беременности также в более позднем возрасте и уменьшения числа детей в семье. Все это увеличивает риск опухолей молочной железы и яичников. По некоторым данным, аборты повышают канцерогенный риск. Отмечаются также некоторые ассоциации между половым поведением и возникновением опухолей, но они не являются прямыми. Так, при наличии многих сексуальных партнеров повышенный риск развития опухолей обусловлен, по-видимому, передающимися половым путем онкогенными вирусами.

16.1.4. Роль лекарств и медицинских процедур

Считается, что лекарственные препараты и медицинские процедуры ответственны за 1 % всех опухолей человека. Это, прежде всего, процедуры,

проводимые в целях диагностики заболеваний, лечение методами радиоактивного облучения и некоторые лекарственные препараты. Известно, что комплекс препаратов, применяющихся для лечения лимфомы Ходжкина, у 5 % пациентов вызывает развитие острой лейкемии и в редких случаях рак мочевого пузыря. Иммунодепрессивные агенты вызывают увеличение частоты опухолей, в особенности в лимфоретикулярной ткани (лимфомы, лейкемии и др.). Применение эстрогенов для купирования симптомов климакса нередко приводит к развитию рака молочных желез и матки. Лекарственные препараты для лечения бесплодия, в особенности те из них, которые имитируют эффекты гонадотропинов, например пергонал, увеличивают риск развития рака яичников. Применение гормона роста в детском возрасте чревато развитием лейкемии. Оральные контрацептивы предположительно увеличивают риск появления некоторых типов опухолей молочной железы и печени. Нормальное развитие и функционирование молочной железы существенно снижает риск развития опухолей. В противоположность этому роды, не сопровождающиеся грудным вскармливанием (лактацией) ребенка, являются фактором, предрасполагающим к развитию опухоли. Автору данного пособия удалось существенно повысить процент опухолей молочной железы и снизить латентный период их появления у мышей, в результате отсадки новорожденных мышат от матери и предотвращения естественной лактации. Вскармливание материнским молоком, безусловно, важно для здоровья ребенка, так как он получает с ним все необходимое и, прежде всего, антитела; еще в большей степени оно необходимо для здоровья матери, так как снижает для нее риск заболевания раком молочных желез.

В последнее время эпидемиологи бьют тревогу по поводу загрязнения окружающей среды веществами, обладающими эстрогенной активностью. Их называют эко- или ксеноэстрогенами. Эти вещества стимулируют процессы деления клеток в молочных железах и других репродуктивных органах, обеспечивая предрасположенность к развитию опухолей (о влиянии экоэстрогенов см. также разд. 1.4).

16.1.5. Курение и рак

По данным американских онкоэпидемиологов, 60 % опухолей человека обусловлены курением табака и неправильной диетой, при этом курение является причиной 30 % смертей от рака. «Не будет преувеличением сказать, что рак легкого в наши дни является величайшим онкологическим экспериментом» – эти слова принадлежат онкологу К. Бауэру. Добавим к этому: экспериментом, который люди поставили сами на себе, разделившись на подопытную (курильщики) и контрольную (некурящие) группы.

Статистические данные свидетельствуют о том, что заядлые курильщики, выкуривающие две пачки сигарет в день, имеют в 20 раз больше шансов заболеть раком легкого. Эти данные позволили другому известному онкологу сказать, что только невежеством и предвзятостью можно объяснить отрицание прямой связи между курением и раком легкого. Ветеринары наблюдают увеличение рака легких среди собак и кошек, хозяева которых курят.

Курение обуславливает не только рак легких, но и дыхательных путей, пищевода, мочевого пузыря, поджелудочной железы, желудка и печени. При этом риск возникновения опухоли зависит от того, в каком возрасте человек начал курить, что курит, сколько, а также от сопутствующих условий и заболеваний. У «пассивных» курильщиков, т. е. у людей, которые сами не курят, но позволяют курить в их присутствии (дети из семей курящих родителей), частота рака легких меньше, чем у активных курильщиков, но больше, чем у людей, избегающих соприкосновения с табачным дымом.

В дыме сигарет, помимо никотина, много вредных для человека веществ: полициклические ароматические углеводороды (3,4-бензпирен и др.) главным образом продукты неполного сгорания, многие металлы и др., всего около 4 000 веществ. Среди них тяжелый металл кадмий. Онкологи его аббревиатуру *Cd* расшифровывают как cancer disease (так опасен этот металл!). Курильщики же добровольно потребляют его.

Если курение сочетается с употреблением большого количества алкоголя, увеличивается риск заболевания раком верхних дыхательных путей и же-

лудочно-кишечного тракта. Кроме того, алкогольный цирроз – это неблагоприятный фон для развития первичного рака печени.

Несмотря на опасность не только для курильщиков, но и всех людей, остановить курение табака – это повальное безумие – пока не удастся. Конечно, кое-какие шаги в этом направлении предпринимаются: некоторые фирмы не берут на работу курильщиков, не разрешается курить в рабочих помещениях, учебных заведениях и т. д. Однако в целом борьба с курением неудовлетворительна. Пока, к сожалению, нам не с чем себя поздравить. Как ни странно, решить эту проблему может помочь мода – если станет немодно курить. Надо заметить, что такая тенденция уже наблюдается.

16.1.6. Роль генетических факторов в возникновении опухолей

Молекулярно-генетические исследования показывают, что причины рака кроются и в наших генах. Рак может начаться после повреждения химическим канцерогеном или радиацией важного гена в клетке. В результате мутировавшая клетка размножится, потомки ее образуют большой агрегат клеток – опухоль. В последнее время выявлены генетические мишени канцерогенов. Ими оказались гены, в норме участвующие в регуляции дифференцировки и пролиферации клеток. Одни из них стимулируют пролиферацию, другие ее подавляют. И те и другие могут влиять на дифференцировку клеток. Первые называют протоонкогенами. При воздействии ряда факторов может произойти гиперэкспрессия этих генов, способствующая развитию опухоли. Другими словами, эти становятся онкогенами. Противоположным эффектом обладают гены второго типа. В норме они сдерживают пролиферацию и включают апоптоз. Мутации в этих генах либо снижение их экспрессии, вызванное другими причинами, очевидно, могут снять ограничение на опухолевый рост.

Вместе с тем, оценивая причинно-следственную связь между канцерогенами и активацией онкогенов, нельзя не учитывать другую информацию,

ставящую под сомнение необходимость активации онкогенов. Так, активация онкогенов выявляется не во всех индуцированных канцерогенами опухолях. В последнее время рядом онкологов развивается концепция, согласно которой ряд онкогенов взаимодействует в процессе канцерогенеза.

Для относительно небольшого числа опухолей человека установлена прямая связь с мутациями в определенных генах. Так, мутации в генах-супрессорах *BRCA-1,2* и *p53* обуславливают высокий риск рака молочной железы, в гене *RB* — ретинобластомы, в генах *Nf-1,2* и *RET* — опухолей мозга и щитовидной железы. Развитие меланомы ассоциировано с повреждениями генов *MTS1* и *CDN4*. Вопрос о том, можно ли считать мутации в критических генах необходимым и единственным звеном в злокачественной трансформации клеток, является принципиальным, так как это определяет дальнейшую тактику выявления канцерогенных веществ, профилактики и терапии опухолей.

Гипотеза мутационного механизма возникновения опухолей была выдвинута немецким биологом Бовери в начале XIX в. Каково же состояние этой проблемы в настоящее время? Каковы связи между канцерогенезом и мутагенезом ?

При исследовании в тестах на мутагенность было показано, что многие канцерогены являются мутагенами. При этом многие канцерогены сами по себе опухолей не вызывают, не вызывают они и мутаций. Канцерогенными и мутагенными они становятся после метаболической активации в организме. Образовавшиеся высокоактивные продукты могут вступать в связь с ДНК, РНК и белками, что приводит к возникновению опухолей. Подтверждением ведущей роли мутаций в канцерогенезе являются факты, доказывающие, что в основе превращения протоонкогена в онкоген лежат мутации. Как показано для семейства генов *RAS*, мутации, в основном точечные, возникают преимущественно в 12-м и 61-м кодонах этих генов. Предполагают, что они возникают благодаря непосредственному связыванию канцерогенов с ДНК. При этом

нарушение процесса репарации ДНК является необходимым условием для развития опухолей.

Процесс развития опухолей протекает в две стадии: инициации и промоции. Считается, что мутации необходимы для прохождения первой стадии. Вторая стадия вызывается веществами, усиливающими действие канцерогенов. Таковы основные положения мутационной теории рака.

Однако имеются факты, которые невозможно объяснить с точки зрения преобладающей роли мутаций в канцерогенезе. Во-первых, не все канцерогены, как уже было сказано, являются мутагенами. Игнорировать этот факт нельзя. Мутационист Дж. Эшби считает немутагенные канцерогены скрытыми мутагенами, т. е. вызывающими незначительные изменения ДНК, не улавливающиеся обычными тестами на мутагенность. Не проще ли согласиться с тем, что, если некоторые канцерогены не являются мутагенами, канцерогенный эффект опосредуется совершенно другими механизмами, а мутации представляют собой одно из проявлений эффекта канцерогенов, не главное для развития опухолей. Приверженцы мутационной теории рака должны объяснить тканевую и видовую специфичность канцерогенов, т. е. способность некоторых веществ вызывать опухоли только у определенного вида животных или у многих, но в одной ткани.

Наряду с мутационной теорией канцерогенеза существуют представления, связывающие злокачественный процесс с нарушением не структуры ДНК, а генетической программы, т. е. с эпигенетическими механизмами. Предполагают, что канцерогены взаимодействуют с факторами транскрипции и инактивируют их. Это обуславливает сбой в развертывании нормальной для данной ткани генетической информации. В результате в клетке может проявиться такое сочетание функционирующих генов, которое обусловит ее автономизацию от сдерживающих сигналов организма и образование злокачественной опухоли. Многочисленными экспериментами показано, что, действительно, у опухолевых клеток нет необычных свойств, но есть необычное сочетание свойств, характерных для нормальных клеток разных

тканей, в том числе и эмбриональных. Концепция эпигенетического механизма канцерогенеза позволяет объяснить многие факты, не объяснимые с точки зрения мутационной теории рака, а именно: отсутствие однозначного соответствия между канцерогенной и мутагенной активностью веществ; латентный период в формировании опухоли; необходимость длительного введения канцерогенов; обратимость ранних стадий канцерогенеза и т. д. Согласно этой концепции, канцерогенную активность веществ следует определять по их способности вмешиваться в нормальную дифференцировку клеток, по нарушению регуляции экспрессии генов.

Знание механизмов канцерогенеза важно для выявления канцерогенных свойств химических соединений, с которыми в век бурного развития химии человек все больше сталкивается в повседневной жизни. Если основываться на генотоксическом механизме действия канцерогенов, то потенциально канцерогенные вещества нужно выявлять по их мутагенной активности. Были разработаны многочисленные тесты на мутагенность веществ. В них тестирование проводится на дрожжах, дрозофиле, клеточных культурах, грибах Физариум, на эритроцитах и т. д. Однако в случае, если канцерогенные вещества не обладают мутагенными свойствами, они тестами на мутагенность будут пропущены. Их необходимо и возможно тестировать по влиянию на экспрессию генов. В настоящее время такие подходы уже имеются.

16.2. Канцерогенные факторы и иммунная система

Все возможные причины возникновения опухолей являются в равной, а иногда даже в большей степени причинами нарушения функции иммунной системы, которое можно обнаружить задолго до того, как будет диагностирована опухоль той или иной локализации. Многие онкологи считают, что в организме с нормальной иммунной системой опухоль возникнуть не может, что главным предрасполагающим моментом в этом процессе является подав-

ление иммунитета. Это утверждение основано на гипотезе иммунологического надзора.

Эта гипотеза утверждает, что в обычных условиях иммунная система реагирует на появление в организме опухолевых клеток и включает все свои эффекторные механизмы для их уничтожения. Впервые эта гипотеза была сформулирована в 1900 г. Паулем Эрлихом, известным иммунологом, награжденным в 1908 г. Нобелевской премией за создание гуморальной теории иммунитета. Эрлих полагал, что опухолевые клетки распознаются иммунной системой как чужеродные и элиминируются.

В середине 60-х гг. Макферлайн Бернет вернулся к этой гипотезе и доработал ее. Он считал иммунологический надзор за генетическим постоянством соматических клеток главной функцией иммунной системы. Возникновение в процессе эволюции у позвоночных иммунной системы Бернет объяснял тем, что огромное число клеток, составляющих организм этих животных, обуславливает высокую вероятность появления в клетках различных генетических изменений. Часть этих изменений может обуславливать злокачественное перерождение клеток. Без системы защиты от таких клеток ни одно многоклеточное животное не смогло бы существовать.

Предсказания гипотезы иммунного надзора подтверждаются обширным фактическим материалом. Прежде всего показано, что многие иммунодепрессивные воздействия приводят к увеличению частоты возникновения опухолей. Это ярко проявляется при наследственных иммунодефицитах, характеризующихся дефектом *T*-клеточного звена иммунитета. Пациенты с таким дефектом погибают, как правило, от различного рода опухолей. При развитии синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИДа) больные погибают либо от инфекций, либо от опухолей. Еще одно доказательство в пользу существования иммунологического надзора за возникновением опухолей представляют реципиенты трансплантатов органов. Для предотвращения реакции отторжения этих пациентов подвергают иммунодепрессивной терапии в течение длительного

времени. Есть данные, что опухоли у них возникают в 20–140 раз чаще, чем в обычных условиях. Таким же эффектом обладает длительная иммунодепрессия, применяемая для лечения аутоиммунных заболеваний.

Это все были аргументы в пользу гипотезы иммунологического контроля. Однако есть аргументы и против. Главный из них состоит в том, что у мышей nude, у которых отсутствует тимус и, следовательно, сильно угнетена тимусзависимая клеточная иммунореактивность (в результате чего им можно трансплантировать разные опухоли, в том числе и человека), никаких спонтанно возникающих опухолей вообще не обнаружено. Сторонники Бернета, пытаясь совместить этот феномен с представлениями парадигмы, объясняют отсутствие опухолей у мышей nude недостаточным сроком наблюдений – эти мыши обычно доживают лишь до 7–8-месячного возраста. Однако именно по теории Бернета опухоли у бестимусных мышей должны развиваться значительно раньше, чем у обычных. В одном из экспериментов этих животных содержали в стерильных условиях, в результате чего они доживали до такого возраста, в котором возникают опухоли у обычных мышей. Оказалось, что у старых мышей nude опухоли возникали, но не чаще чем у нормальных мышей. Есть еще один серьезный аргумент против теории иммунологического надзора. Если у мышей высокоракковых линий в раннем постнатальном периоде удаляли тимус, то возникновение у них опухолей молочной железы, вопреки ожиданиям, не стимулировалось, а, наоборот, тормозилось. У автора пособия имеются публикации на эту тему.

Таким образом, основной постулат теории иммунологического контроля, а именно то, что злокачественные опухоли возникают только в том случае, если иммунная система повреждена или если опухолевые клетки, утрачивая иммуногенность, ускользают от иммунного надзора, остается, к сожалению, пока недоказанной. Эта теория представляет интерес, ибо, окажись она верной, с опухолями можно было бы бороться гораздо проще.

Сторонники противоположной точки зрения на взаимоотношения опухоли и организма полагают, что, поскольку опухоль возникает из нормальных

клеток организма, она не отличается от них, поэтому иммунная система не реагирует на опухолевые клетки. Следовательно, опухолевые клетки гарантированы от иммунной атаки и могут свободно и безнаказанно размножаться в организме даже с нормальной иммунной системой. Но и эта гипотеза встречает возражения. Где же истина?

Постараемся ответить на этот вопрос, рассмотрев два других. Во-первых, могут ли опухолевые клетки экспрессировать на своей поверхности антигены? Во-вторых, какие эффекторные механизмы развивает иммунная система, реагируя на эти антигены?

Некоторые опухоли, индуцированные онкогенными вирусами и химическими канцерогенами, экспрессируют специфические опухолевые антигены. Большинство опухолевых антигенов не являются уникальными. Они экспрессируются и многими нормальными клетками, только, может быть, в меньшей степени. Они называются антигенами, ассоциированными с опухолью. Среди антигенов этого типа – стадийспецифические дифференцировочные антигены, такие как α -фетопротеин в опухолях печени и раковоэмбриональный антиген в опухолях кишечника, а также белки, кодируемые онкогенами и генами-супрессорами. Если на опухолевых клетках присутствуют антигены, отличающиеся от тканей организма, иммунная система должна распознавать их и развивать свои эффекторные механизмы (См.: Попова Н. А. Иммунология. Ч. 2). Таким образом, на роль противоопухолевой иммунной реакции может претендовать только механизм клеточной цитотоксичности, осуществляемый Т-киллерами. Однако многие опухоли успешно ускользают от

Т-киллеров. Этого добиваются опухолевые клетки, в которых синтез молекул МНС-I снижен вплоть до полного отсутствия. Вследствие этого Т-киллерный ответ на опухоль не развивается, поскольку Т-киллеры распознают АГ только в комплексе с молекулами МНС-I.

Итак, из-за низкой иммуногенности большинства опухолей, а также из-за того, что опухоли легко избегают иммунной атаки, иммунологические меха-

низмы нельзя считать главными в противоопухолевой защите организма. Тем не менее это не означает, что их вообще нет. На этом основана иммунодиагностика опухолей. Особенно широко этот метод применяется для иммунофенотипирования гемобластозов, каждая из форм которых соответствует стадии дифференцировки определенной ветви кроветворения. Эта закономерность настолько четко проявляется, что некоторые стадии онтогенеза лимфоцитов описаны благодаря соответствующим лейкозам. Именно так была определена ранняя стадия, на которой только начинается рекомбинация *D*- и *J*-генных сегментов в *B*-лимфоцитах. Иммунофенотипирование является бесценным методом для определения терапии и для прогноза лечения. α -Фетопротеин и раковоэмбриональный антигены относятся к серологическим маркерам солидных опухолей. Они используются для ранней диагностики соответствующих опухолей. Особое внимание онкологов в последнее время привлекает серологический маркер рака простаты (PSA); он, в частности, может применяться даже для диагностики клинически не проявляющихся опухолей, т. е. годится для иммуномониторинга групп мужчин повышенного риска.

На роли иммунной системы в канцерогенезе основаны и методы иммунопрофилактики и иммунотерапии опухолей (См.: Попова Н. А. Иммунология. Ч. 2).

В большей степени, чем иммунная система, от опухолей организм защищает система неспецифической резистентности, а именно натуральные киллеры (НК) и активированные макрофаги. НК представляют собой гетерогенную группу больших гранулярных лимфоцитов, составляющих 0,6–2,4 % общего пула лимфоцитов. НК распознают опухолевые клетки способом, отличающимся от иммунологического распознавания, но еще не до конца изученным. Показано, что НК имеют несколько типов рецепторов. Одни активируют, другие подавляют их функцию. Уничтожение опухолевых клеток НК осуществляют за счет образования в клетке-мишени пор порообразующим

белком перфорином, освобождающимся из НК при контакте с опухолевой клеткой.

Значительная роль в защите от опухолей принадлежит макрофагам (МФ). Их в большом количестве находят в регрессирующих опухолях. МФ, изолированные от животных-опухоленосителей, тормозят рост опухолевых клеток *in vitro*. Противоопухолевая активность МФ осуществляется за счет секреции токсичных для опухолевых клеток лизосомальных ферментов и фактора некроза опухолей (ФНО).

Изложенное выше свидетельствует о том, что нарушение иммунологического надзора или неспецифических факторов защиты может создать фон, благоприятный для развития опухолей. Чем слабее иммунная система, тем она снисходительнее к измененным клеткам, тем легче возникают опухоли.

После того как опухоль возникла, она может осуществлять настоящую контратаку на иммунную систему или вербовать ее на свою сторону, так что усиление иммунитета приведет в последнем случае к стимуляции ее роста.

Опухолевые клетки могут экспрессировать *FasL* и, следовательно, запускать апоптоз *T*-лимфоцитов, в норме экспрессирующих *Fas*. Показано, что *T*-лимфоциты, инфильтрирующие некоторые опухоли, весьма чувствительны к *FasL*-опосредованному апоптозу. Следует также заметить, что опухолевые клетки совсем не экспрессируют или экспрессируют очень мало костимулирующих молекул *B7*, необходимых для активации *T*-лимфоцитов. Опухоли, экспрессирующие *FasL*, вызывают гибель и натуральных киллеров, что позволяет им избегать их противоопухолевого эффекта. Поэтому чем больше *FasL* в опухоли, тем хуже прогноз. *FasL* может выделяться опухолевыми клетками в растворимой форме благодаря мембранному шеддингу и вызывать апоптоз в клетках, например в печени. Таким образом, *FasL* является существенным фактором ингибирования противоопухолевой защиты организма. В связи с этим одним из подходов к повышению противоопухолевого иммунитета может быть снижение чувствительности *T*-лимфоцитов к *FasL*-

опосредованному апоптозу. Это можно сделать, например, введением *T*-лимфоциты гена антисенс *Fas* РНК.

Из всего сказанного о причинах (только основных!) развития опухолей ясно, что знание их может существенно снизить заболеваемость людей. И это действительно наблюдается в отношении так называемых профессиональных раков. Ограничение соприкосновения с химическими канцерогенами на производстве значительно уменьшило риск заболеваемости. Но беда в том, что если раньше с канцерогенными веществами контактировали лишь ограниченные профессиональные группы населения, то в настоящее время, в условиях сильного загрязнения среды обитания человека, канцерогены «употребляют» очень многие: с выхлопными газами автомобилей, при попадании в пищу инсектицидов, диоксинов, многих мутагенных веществ, химических экотоксикантов и др. Один американский онколог так обрисовал современную ситуацию: мы живем опасной жизнью в «канцерогенном» океане. Логичнее ставить вопрос о том, не почему так часто люди болеют раком, а почему некоторым все же удается дожить до глубокой старости, не заболев раком. Мы не знаем, как влияет на человека сочетание, с одной стороны, разнообразных канцерогенных факторов, а с другой – сочетание этих факторов с факторами, обеспечивающими генетическую предрасположенность к развитию опухолей. Последние, как известно, отвечают за чувствительность ткани-мишени к канцерогенному воздействию, метаболизм канцерогенов, гормональную регуляцию клеточного деления и т. д.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Голубовский М. Д. Век генетики: эволюция идей и понятий. СПб.: Борей Арт., 2000.

Грин Н. и др. Биология / Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор. М.: Мир, 1996.

Льюин Б. Гены. М.: Мир, 1997.

- Молекулярная биология / Под ред. А. С. Спирина. М.: Высш. шк., 1990.
- Молекулярная биология клетки: В 3 т. /Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис, М. Рэфф, К. Робертс, Дж. Уотсон. М.: Мир, 1994.
- Молекуляр. биология. 2001. Т. 35, № 4 (весь журнал посвящен биосинтезу белка).
- Общая биология. 10–11 кл. / Под ред. В. К. Шумного, Г. М. Дымшица, А. О. Рувинского. М.: Просвещение, 2001.
- Попова Н. А. Иммунология: Учеб. пособие. Новосибирск, 1999. Ч. 1; 2000. Ч. 2.
- Попова Н. А. Экология и иммунитет: Учеб. пособие. Новосибирск: Изд-во НГУ, 2001.
- Рэфф Р., Кофмен Т. Эмбрионы, гены, эволюция. М.: Мир, 1986.
- Сингер М., Берг П. Гены и геномы. М.: Мир, 1998.
- Уилсон Дж., Хант Т. Молекулярная биология клетки: Сб. задач. М.: Мир, 1994.
- Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. М.: Изд-во НИИ биомед. химии: ООО «Материк-альфа», 2000.

